

ショウジョウバエの痛覚受容シグナルに関わる神経ペプチドの探索

柏原 秋穂 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古久保-徳永 克男 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

痛覚受容システムは、組織傷害を起こすような刺激(痛覚刺激)を受容する機構であり、動物が危険から身を守るために必須の機能である。しかし一方で、痛覚受容システムの過剰な活動は動物の生存に不利に働く。ヒトにおいては、痛覚受容は痛みの知覚を引き起こす。従って痛覚受容システムの理解は、動物の感覚応答機構を理解するうえでも、そしてヒトにおけるよりよい痛みのコントロールを目指すうえでも、重要な課題である。これまでに、疼痛疾患患者や哺乳類モデルの研究などから、痛覚受容の分子機構について多くの知見が得られてきた。しかし、その全容は未だ明らかになっていない。本研究は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデルに用いて、神経ペプチドによる痛覚受容システムの機能調節メカニズムを詳細に解明していくことを目的としている。

神経ペプチドは神経から分泌される短鎖のアミノ酸で、神経伝達物質やホルモンとして、動物の睡眠や摂食行動といった様々な生理機能の調節に関わる。哺乳類モデルの研究から、痛覚受容に関与する神経ペプチドも既に複数同定されている。しかし、哺乳類の複雑な体制や神経ペプチドの生体内機能の多様さ、複雑さから、痛覚受容システムにおける神経ペプチドの作用機序の理解はあまり進んでいない。ショウジョウバエは体制もシンプルであり、優れた遺伝学的実験法が多く利用できる。また先行研究から、ショウジョウバエと哺乳類の間で痛覚受容に関わる分子が進化的に保存されていることがわかってきている(Milinkeviciute et al., 2012)。神経ペプチドとその受容体の構造も進化的に良く保存されており(Nassel and Winther, 2010)、ショウジョウバエは痛覚を調節する神経ペプチドの作用機序を研究するうえで非常に有効なモデルになると考えられる。

ショウジョウバエには 45 個の神経ペプチド遺伝子が存在すると推定されているが(Nassel and Winther, 2010)、そのほとんどについて痛覚受容システムの機能調節に関わるかどうかは調べられていない。そこで本研究では、神経ペプチド遺伝子の欠失変異体を利用し、まず痛覚受容シグナルの調節に関わる可能性の高い神経ペプチド遺伝子の探索を行った。

材料・方法

・神経ペプチド遺伝子欠失変異体系統

国立遺伝学研究所の近藤周助教によって CRISPR/Cas9 法を用いて作成された、27 の神経ペプチド遺伝子に対する 44 の欠失変異体系統を利用した。対照群には遺伝的背景が同じコントロール系統(y^w^{1118} または $y^2cho^2v^1$ 系統)を用いた。変異体系統のうち 8 系統はホモ接合体では致死であったため、コントロール系統とのヘテロ接合体を用いて実験を行った。

・熱刺激アッセイ

ショウジョウバエの幼虫は、組織傷害を起こすような熱刺激や機械刺激などの痛覚刺激に対して、特徴的な横転回避応答を示す。(図) (Tracey et al., 2003)。この横転回避応答は痛覚刺激に特異的

にみられることから、痛覚受容の明確な指標として利用できる。本研究では、後期三齢幼虫の腹部側面を熱刺激プローブにより刺激し、幼虫が横転回避応答を示すまでの時間を計測し、熱痛覚受容感度の指標とした。すべての実験は室温 25 °C の恒温室で行った。

・一次スクリーニングと再テスト

各神経ペプチド変異体系統に熱刺激アッセイを実施し($n=30$)、対照群の系統と比較して熱刺激に対する応答が速い系統を痛覚過敏系統、遅い系統を痛覚鈍麻系統の候補として選出した。その後、選出した系統について、系統名を伏せた状態で再度実験を行い、再現性の確認をした($n=100$)。

結果

これまでのスクリーニングの結果、痛覚過敏系統が 5 遺伝子 5 系統、痛覚鈍麻系統が 7 遺伝子 9 系統見出されている。見出された神経ペプチド遺伝子の多くが、これまでに痛覚への関与が報告されていないものや、その作用機序が不明なものであった。詳細は発表会で報告する。

今後の展望

スクリーニングから、これまでに痛覚受容シグナル調節での機能がよくわかっていない神経ペプチド遺伝子を多数見出すことができた。これらの神経ペプチド遺伝子の欠失がどのように痛覚受容の過敏や鈍麻を引き起こすか、そのメカニズムは現時点では不明である。今後はショウジョウバエで利用できる遺伝学的実験ツールを駆使し、見出した神経ペプチドの痛覚受容システムにおける作用機序の解明を目指したい。

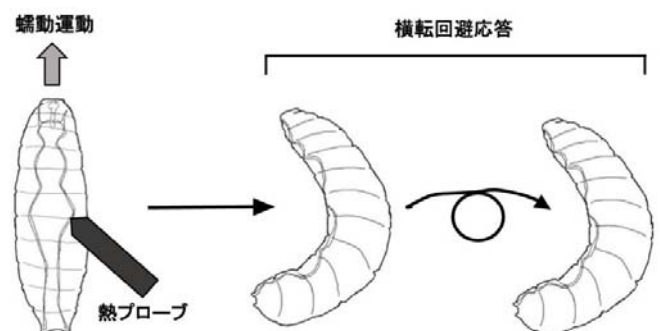


図. 幼虫の横転回避応答