

進化的に保存された神経ペプチド DSK を介した痛覚制御メカニズム

及川 泉 (筑波大学 生物学類)

指導教員：本庄 賢 (筑波大学 生命環境系)

《背景》

生物は、危険から身を守りそれを回避する重要な防御機構として、痛覚を獲得・進化させてきた。しかしその一方で、痛みは我々ヒトの社会生活に負の影響を及ぼす存在でもある。国際疼痛学会の調査では、慢性疼痛疾患の罹患率は世界人口の20%にも及ぶと推計されている。また、現在利用されている鎮痛薬の中には、なぜ効果があるか全く分からないものも存在する。こういった現状の根本的な原因に、そもそも痛みがどのような情報処理によって生じるのか、そのメカニズムが明らかでないという点が挙げられる。つまり、痛覚のメカニズムを分子レベルで理解していくことは、難治性疼痛疾患の病理理解や、より良い鎮痛法の開発に繋がるものと考えられる。

哺乳類における先行研究から、神経ペプチドは痛覚シグナルの伝達と調節に重要な役割を果たすことが分かってきている。しかし、生体内に存在する神経ペプチドの種類の多様さと機能の複雑さ故に、そのメカニズムの理解は遅々として進んでいない。この複雑な機能分子の研究をするにあたり、哺乳類に比べて体制がシンプルなうえ遺伝学的解析手法が蓄積されているショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、非常に適したモデル生物となる。

所属研究室で行われた神経ペプチド変異体のスクリーニングから、ショウジョウバエの痛覚感受性に関わる神経ペプチドが複数見出された。私はこの候補神経ペプチドの中から、哺乳類のコレストキニンと相同性を持つ DSK に注目した。DSK は2種類の受容体もヒトと相同性があるため、このシグナル伝達系はショウジョウバエとヒトで進化的によく保存されていると考えられる。現在、コレストキニンは哺乳類において痛覚シグナルの伝達に関与しているとの報告があるが、その生体内メカニズムは分かっていない。そこで私は、体制がシンプルなショウジョウバエを用いて、進化的に保存された DSK による痛覚制御メカニズムの解明にアプローチした。

《材料・方法》

・痛覚応答試験

ショウジョウバエの幼虫では、痛覚刺激に対して特徴的な応答である「Rolling behavior (ローリング)」を示すことが知られている。適切な有害刺激温度に設定した熱プローブを幼虫の体側面に当て、ローリングを示すまでの時間を計測することで、熱刺激への感度を評価することが出来る (図1)。

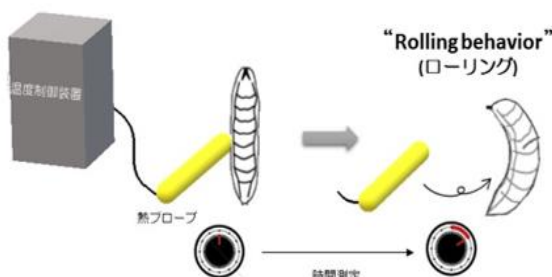


図1 熱刺激に対する痛覚応答の評価法

・変異体系統の作製

2種類の DSK レセプターにはどちらも有効な変異体系統は存在しなかったため、CRISPR-Cas9 技術を用いて各レセプターについて欠失変異体のショウジョウバエを作製した。

・抗体染色によるペプチド及びレセプターの発現解析

DSK 受容体の局在に関する知見は皆無であったため、信頼性の高い GAL4 を用いた受容体の局在解析を行った。更に、痛覚関連ニューロンと DSK 受容体の発現パターンについて調べるため、GAL4/UAS 及び LexA/LexAop を用いた共染色を行った。また、DSK 分泌細胞を報告した唯一の先行研究 (Nichols R et al, 1996) では使用した抗体の抗原特異性について確かめられていなかったため、*dsk* 変異体を用いた抗体染色により DSK 分泌細胞の特定を試みた。

《結果・考察》

痛覚応答試験の結果、*dsk* 変異体では痛覚感受性に顕著な異常が見られた。この結果から、DSK レセプターの変異体でも同じような表現型になるのではないかと考えられたため、CRISPR-Cas9 技術により作製したレセプター変異体を用いて痛覚応答試験を行った。その結果、予想通り、*dsk* 変異体と同様の痛覚感受性異常が確認された。*dsk* 変異体及び DSK レセプター変異体の両方で同様の痛覚感受性異常の表現型となったことから、DSK がショウジョウバエの痛覚シグナル調節に関与していることが強く示唆された。

続いて、レセプターの局在について調べるために GAL4 を用いた抗体染色を行った。その結果、各レセプターは脳の広範囲で発現していた。共染色によって痛覚関連ニューロンとレセプターの発現パターンについて調べた結果、DSK レセプターはローリング誘発に関与する既知の痛覚関連ニューロンの一部で発現していることが分かった。

抗体染色の結果から DSK レセプターが痛覚の経路に関与している可能性が十分に示されたため、続いて、DSK 分泌細胞の特定を試みた。*dsk* 欠失変異体を用いた抗体染色を行った結果、先行研究 (Nichols R et al, 1996) で報告された複数の分泌細胞はいずれも、*dsk* 変異体でその発現が抜けていた。これにより、先行研究で報告された分泌細胞が DSK を分泌している可能性が非常に高いということが示唆された。

《今後の展望》

これまでの研究で私は、DSK がショウジョウバエ中枢神経系のどの細胞に作用し痛覚シグナルを調節しているか、その手掛かりを掴むことに成功した。今後は、カルシウムイメージングや RNAi といった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て DSK 作用機構の解明を進めるとともに、ヒトとの間の機能的相同性について検証していきたい。