

腸を由来とするペプチドホルモン Neuropeptide F の生理機能の解析

星野 涼 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

生物は個体を取り巻く外的環境に応じて、生理状態を柔軟に調節するメカニズムをもっている。配偶子形成もその例外ではなく、ショウジョウバエを用いた研究によって、栄養状態や老化が配偶子をつくる大本となる幹細胞“生殖幹細胞”の動態に影響を与えることが報告されている^{1,2}。しかし、外環境からのシグナルがどのように生殖幹細胞の動態を調節するのかについては、未解明な部分が多い。

このような背景の中、所属研究室は、雌キイロショウジョウバエの生殖幹細胞の増殖が、雄との交尾によって引き起こされることを報告した³。さらに、その交尾依存的な生殖幹細胞の増殖には、腸の分泌細胞から放出される神経伝達物質 Neuropeptide F (以下略称 NPF) が必須であること、そして腸から放出された NPF は生殖細胞を取り囲む卵巣の体細胞によって受容されることを報告した⁴。しかしながら、交尾のシグナルがどのようにして腸からの NPF の放出を制御するのか、また生殖幹細胞の増加に腸を介する生物学的意義については未解明である。

私は腸管が栄養吸収の場であることを鑑み、腸内分泌細胞で発現する NPF が栄養状態の変化を読み取っている可能性を想定した。そこで私は、栄養状態の変化が交尾依存的な生殖幹細胞の増殖や腸内分泌細胞における NPF の放出に影響を与えるかどうかを調べた。

方法

(1) 個体の飼育と交尾・解剖

メス個体は 25°C で飼育した。羽化後 4 日目から 5 日目の間の 24 時間、野生型オス個体と共にプラスチックバイアルに入れ、交配させたメス個体を「交尾後メス」とした。一方、オス個体を存在させずに同等の時間を経過させたメス個体を「未交尾メス」とした。交尾後メスと未交尾メスのそれぞれを羽化後 5 日目で解剖し、取り出した卵巣および腸を固定した。

(2) 飼育栄養条件の検討

羽化後 4 日目から 5 日目のメス個体を、以下の異なる栄養条件・実験期間で飼育した。

・富栄養エサ (寒天、コーンミール、グルコース、乾燥酵母を煮詰めたもの / 48 時間) ・飢餓エサ (水のみ / 48 時間) ・糖のみのエサ (200 mM スクロース水溶液 / 48 時間) ・タンパク質除去エサ (200 mM スクロース水溶液 / 10 日)

(3) 生殖幹細胞の免疫組織化学染色法

生殖幹細胞は免疫組織化学染色によって可視化した。4%パラホルムアルデヒド/PBS で卵巣組織を固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。生殖幹細胞と生殖幹細胞ニッチ構成細胞を可視化するために、1 次抗体として抗 Hu-li tai shao 抗体 1B1 と抗 DE-カドヘリン抗体 DCAD2 をそれぞれ用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体を加え、染色した。

(4) 生殖幹細胞の計測

1 つの卵巣小管 (卵巣を構成している小さな管) 内にいくつの生殖幹細胞が存在するかを、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss AxioPlan) を用いて計測した。マンホイットニーの U 検定を用いて交尾前後の生殖幹細胞数の増殖の有無を評価した。

(5) 腸 NPF の免疫組織化学染色法

腸 NPF は生殖幹細胞と同様に免疫組織化学染色によって可視化した。腸 NPF の可視化のために抗 NPF 抗体を用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2 次抗体を加え、染色した。

(6) 腸内分泌細胞における NPF 量の定量

腸 NPF を免疫組織化学染色法により染色したのち、蛍光顕微鏡を用いて写真を撮影し、腸内分泌細胞における NPF の蛍光強度を ImageJ を用いて定量した。

結果・考察

先行研究において、腸 NPF 分泌細胞における NPF の量は交尾後に減少していた。私がタンパク質除去エサ、糖のみのエサ、飢餓エサ等の栄養条件を用いて交尾前後における腸 NPF 量を定量したところ、いかなる栄養条件であっても交尾後の腸内分泌細胞から NPF が放出されることが分かった。これらの結果から、腸内分泌細胞からの NPF 放出は栄養条件に関係なく交尾依存的に引き起こされることが示唆された。また、交尾後の腸内分泌細胞における NPF の放出と一致して、交尾後の生殖幹細胞の増殖は栄養条件に関係なく引き起こされた。

富栄養エサで飼育した場合と飢餓エサで飼育した場合の腸 NPF タンパク質量を比較してみたところ、富栄養エサでの飼育に比べ、飢餓エサで飼育した個体の腸 NPF タンパク質量は高かった。その一方で NPF の mRNA 発現量は富栄養エサ個体に比べ、飢餓エサ飼育個体で減少していた。これらの結果は、貧栄養状態において腸 NPF は発現量が落ちるにもかかわらず、放出が抑えられて分泌細胞内に蓄積されることを示唆している。

これらの結果は、栄養と交尾という 2 種のシグナルがそれぞれ違った経路で腸 NPF の放出・産生を調節することを示している。より高い解像度で腸 NPF の放出・産生を議論するためには、実際に体液中に存在する NPF の量を定量・比較することが重要だと考えられる。そこで、今後は交尾前後、ひいては栄養条件を変化させた際の体液中の NPF 量を定量することを計画している。

参考文献

1. Hsu, H.-J., and Drummond-Barbosa, D. (2009). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1117-1121.
2. Kao, S.H., Tseng, C.Y., Wan, C.L., Su, Y.H., Hsieh, C.C., Pi, H., and Hsu, H.J. (2015). *Aging Cell* 14, 25-34.
3. Ameku, T., and Niwa, R. (2016). *PLoS Genet.* 12.
4. Ameku, T., Yoshinari, Y., Texada, M.J., Kondo, S., Amezawa, K., Yoshizaki, G., Shimada-Niwa, Y., and Niwa, R. (2018). *PLoS Biol.* 16, e2005004.