

交尾刺激による腸の神経ペプチド放出のメカニズムの追究 ～ショウジョウバエを用いた解析～

金谷 彩 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

生物の生理状態は、個体外部からの情報や刺激に応じて柔軟に変化する。交尾はそうした外部刺激その1つであり、多くの動物において行動や生理状態が交尾により劇的に変化することが知られている。

2016年に所属研究室において、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) の成虫メスをを用いた研究から、交尾が卵子の元となる生殖幹細胞の数を増加させることを報告した¹。この過程は、オスの精液に含まれるペプチド Sex peptide がメスに受け渡されることから始まる。Sex peptide を受容したメスショウジョウバエにおいては、Sex peptide 受容体発現ニューロンを介した情報伝達の後、何らかのメカニズムを介して腸の分泌細胞からペプチドホルモン Neuropeptide F (以下 NPF) が放出される。そして、この腸由来 NPF が卵巣に存在する NPF 受容体を受容されることで、メス生殖幹細胞の増殖が促される²。しかし、交尾の情報がどのようにして神経系から腸から伝わり、NPF の放出を制御するのかについては不明である。

そこで私は、交尾の情報を腸 NPF 分泌細胞で受容するために必要な因子として、腸 NPF 細胞において発現する膜受容体に着目した。私は、先行研究によるメスショウジョウバエの腸を用いたトランスクリプトームの情報³から、腸 NPF 分泌細胞において強く発現する膜受容体遺伝子として *Dopamine/Ecdysteroid receptor* (*DopEcR*) を見出した。*DopEcR* は、ドーパミン、および昆虫ステロイドホルモンであるエクジステロイドを受容する、Gタンパク質共役受容体である⁴。また、所属研究室の研究において、交尾が卵巣でのエクジステロイドの産生を促進することが報告されている¹。これらのことから私は、「交尾により卵巣から放出されたエクジステロイドが、腸 NPF 分泌細胞に存在する *DopEcR* に受容されることで腸の NPF の放出を制御しているのではないか」という仮説を立て、研究を行なった。

方法

(1) 個体の飼育と交尾・解剖

羽化後 25°C で飼育したショウジョウバエのメス個体を用いた。羽化後 4~6 日目の間のメスを、野生型オス個体と 24 時間交配させた個体を「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をそれぞれ解剖し、腸を摘出した。

(2) *DopEcR* ノックダウンの方法

DopEcR のノックダウンを組織特異的に行うために、異所的遺伝子発現系である GAL4-UAS システムを用いた⁵。本研究では、腸分泌細胞で特異的な GAL4 系統あるいは NPF 細胞において発現する GAL4 系統を、*UAS-DopEcR-RNAi* 系統とかけ合わせることで、*DopEcR* 遺伝子がノックダウンされたメス個体を得た。

(3) 腸 NPF の免疫組織化学染色

4%パラホルムアルデヒド/PBS で腸を固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBS でブロッキング処理した。腸分泌細胞の核と NPF を可視化するために、1次抗体として抗 Prospero 抗体 MR1A (マウス; Developmental Studies Hybridoma Bank より購入) と抗 NPF 抗体 (ウサギ; 所属研究室で作出) 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。

DopEcR の発現を確認するために、*DopEcR* 遺伝子領域の終始コドン手前に 2A-GALA 配列の挿入された *DopEcR-2A-GALA* 系統⁶を用いて、*GFP* を強制発現させた。*GFP* を明瞭に可視化するために1次抗体として抗 *GFP* 抗体 ab13970 (ニワトリ; Abcam より購入) を用いた。その後、Alexa 蛍光標識 2次抗体を加え、染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。

(4) 腸内分泌細胞における NPF 量の定量

抗 NPF 抗体を用いた免疫化学像を LSM700 を用いて撮影し、腸内分泌細胞での NPF の蛍光強度を ImageJ を用いて定量した。

結果・考察

DopEcR-2A-GALA の発現は、中腸の腸分泌細胞で認められた。また、7~8割の細胞において抗 NPF 抗体のシグナルと *DopEcR-2A-GALA* によって誘導された *GFP* のシグナルがオーバーラップすることが分かった。次に、交尾後の NPF の放出に対する *DopEcR* の機能を評価するために *NPF*⁺細胞特異的に *DopEcR* をノックダウンした。その結果、*DopEcR* ノックダウン個体の腸分泌細胞において、コントロールと比べて NPF の放出が抑えられている傾向が見られた。このことから、*DopEcR* が交尾依存的な NPF の放出を促進している可能性が示唆された。

エクジステロイドは *DopEcR* を介して MAPK シグナリングを活性化する⁴。そこで、腸 NPF 分泌細胞で MAPK シグナリング活性化しているかを調べるために、下流である ERK の活性を抗リン酸化 ERK (pERK) 抗体を用いて観察した。その結果、抗 pERK 抗体のシグナルは腸分泌細胞において見られなかった。このことから、腸分泌細胞における *DopEcR* がエクジステロイドを受容することは支持されなかった。

本研究によって、交尾依存的な NPF 放出の制御に関わる因子として *DopEcR* が提示された。今後、*DopEcR* のもう1つのリガンドであるドーパミンに注目した解析を実施し、交尾がどのようにして *DopEcR* を介して NPF の放出を制御するかを明らかにする予定である。

参考文献

1. Ameku, et al. (2016) PLOS Genet 12(6), e1006123
2. Ameku et al. (2018) PLOS Biol 16(9), e2005004
3. Buchon et al. (2013) Cell Rep 3, 1725-1738.
4. Srivastava et al. (2005). J Neurosci 25(26), 6145-6155
5. Brand & Perrimon (1993) Development 118(2), 401-15
6. Diao & White (2012) Genetics 190(3), 1139-1144