

ドーパミンによるキイロショウジョウバエ腸内分泌細胞の活性化

山口 泰生 (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】

多くの動物の腸には外部刺激を受けてさまざまなペプチドホルモンを分泌する腸内分泌細胞 (EEC) があり、キイロショウジョウバエも例外ではない。例として、交尾刺激を卵巣で受容したメスは EEC から Neuropeptide F (NPF) の分泌が促進され、生殖幹細胞の増殖を行うことが報告されている¹。しかし、交尾刺激がどのように NPF 分泌を促すかはまだ解明されていない。

所属研究室の先行研究により、NPF 分泌には神経伝達物質であるドーパミンの受容体の 1 つ (以下、DR) が必要であることが示唆されている²。そこで私は、EEC からの NPF 分泌は、DR を介したドーパミン受容が関与すると仮説を立てた。

また、EEC からのペプチドホルモンの分泌は、Ca²⁺レベルにより調節されることを示唆した報告がある³。そこで、NPF 分泌のメカニズムを解明するにあたって NPF+EEC の Ca²⁺レベルの変動に着目した。上記のことを踏まえて私は、ドーパミンが NPF+EEC 上の DR に受容される際の Ca²⁺レベルの変動を解析した。

【方法】

実験 1. 系統

NPF+EEC での各種遺伝子の発現にあたっては、GAL4-UAS システムを利用した。

NPF 遺伝子領域に GAL4 配列の挿入された系統を使用して、UAS の下流に配置した GCaMP6s および turboRFP を強制的に発現させた系統を作製した (以下 Control と略)。GCaMP は、Ca²⁺ が結合することによって蛍光強度が上昇するタンパク質であり、細胞内 Ca²⁺ レベルの変動を可視化できる⁴。GCaMP 蛍光強度は turboRFP 蛍光強度によってノーマライズするために使用した。また、さらに UAS-DRRNAi が挿入されて DR がノックダウンされた系統 (以下 DRRNAi) を作製した。

実験 2. Control を使用した live imaging

羽化後 3~5 日の未交尾 Control メスを解剖し、腸を取り出した。ガラスベースディッシュの底に滴下した 20µl の Schneider's Drosophila Medium (SDM; ペニシリン/ストレプトマイシン添加、血清非添加) の中に腸を移し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM900 (カールツァイス) で live imaging を行った。2 秒ごとに蛍光像を撮影し、115 回撮影した後、ガラスベースディッシュの底にさらに溶液 80µl を加え、さらに 185 回撮影した (合計 300 回の撮影)。この 80µl の溶液としては、ドーパミン 1mM を含むものと含まないものを用いた。そして、それぞれの溶液を加えた後の GCaMP 蛍光強度の変化を解析した。

実験 3. DRRNAi を使用した live imaging

未交尾の DRRNAi 系統のメスを用いて、2 と同じプロトコルで実験を行った。

【結果・考察】

まず、Control の腸にドーパミンを含まない SDM を添加しても、添加前と比較して相対的な GCaMP 蛍光強度に有意差はなかった。よって、溶液の添加による物理的衝撃が EEC を活性化することはないことが確認された。次に、ドーパミンを含む SDM を添加した結果、添加前よりも相対的な GCaMP 蛍光強度が有意に上昇することが明らかになった。以上の実験結果は、NPF+EEC はドーパミンに感受性があることを示唆する。

私は次に、ドーパミンによる NPF+EEC 内の Ca²⁺レベルの上昇に DR が関与しているかを検討するため、DR RNAi 系統を用いた実験を行った。その結果、Control の腸とは異なり、DRRNAi の腸にドーパミンを含む SDM を添加しても相対的な GCaMP 蛍光強度は上昇しなかった。したがって、NPF+EEC における Ca²⁺レベルの上昇には、DR が必要であることが示された。

以上の結果から、NPF+EEC の Ca²⁺レベルの上昇は、ドーパミンが DR に受容されることで引き起こされることが示唆された。私は、細胞内 Ca²⁺レベルの上昇が細胞からのペプチドホルモン分泌に関与することを考慮し、ドーパミンは NPF+EEC 内の Ca²⁺レベルを上昇させることで NPF 分泌を促すと推測している。

【今後の展望】

本研究で注目したドーパミン受容体アイソフォームは DR のみであるが、ショウジョウバエのゲノムにはこれ以外にも複数のドーパミン受容体アイソフォームが存在する。そのため、ドーパミンによる NPF+EEC の Ca²⁺レベルの上昇に、DR 以外のドーパミン受容体アイソフォームが関与するのかわかる必要がある。そこで、それぞれのアイソフォームをノックダウンするための系統の準備を行っている。

さらに、DR はドーパミンを受容する際、Ca²⁺だけでなく cAMP を細胞内の 2 次メッセンジャーとして利用する可能性がある。しかし、今回の実験では cAMP の変動を見ていないので、ドーパミンを添加したときの反応を、PinkFlamindo⁵ や RFlinc⁶ といった cAMP レポーターのシステムを利用して検討する。

【参考文献】

- 1) Ameku et al. (2018) *PLOS Biology*, 16, e2005004.
- 2) 金谷彩 (2022) 修士 (理学) 学位論文.
- 3) Malita et al. (2022) *Nature Metabolism*, 4, 1532–1550.
- 4) Nakai et al. (2001) *Nature Biotechnology*, 19, 137–141.
- 5) Harada et al. (2017) *Scientific Reports*, 7, 7351.
- 6) Ohta et al. (2018) *Scientific Reports*, 8, 1866.