

令和元年6月20日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K14928
研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いたRFアミド型神経ペプチドによる痛覚調節メカニズムの解析

研究課題名(英文) Nociceptive regulation mediated by RF-amide neuropeptides in Drosophila

研究代表者
本庄 賢 (Honjo, Ken)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：50731866
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチドは、ヒトの痛みの調節に関わる因子として古くから研究が進められてきた。しかし、神経ペプチドが痛みを調節する詳しいメカニズムについては、未だによくわかっていない。本研究は、遺伝子機能の詳細な生体内解析に優れるショウジョウバエをモデル動物として活用し、これまでにその痛覚調節作用のメカニズムが明らかになっていない神経ペプチドの細胞レベルでの機能メカニズム解明を試みた。研究の結果、注目した3種類のRFアミド型神経ペプチドについて、体内のどの細胞に作用して機能しているか、またその際に相互作用している受容体分子などについて、新しい知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で注目したRFアミド型神経ペプチドは、哺乳類では30年以上前から痛覚の調節に関わるものと考えられてきたが、その機能メカニズムについては理解が進んでこなかった。ショウジョウバエを用いた本研究で得られた、その侵害受容調節メカニズムの細胞レベルでの知見は、哺乳類において進化的に保存された神経ペプチドがどのように痛覚調節を行っているかを理解していく上で、有用な手掛かりを提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuropeptides have been extensively studied as key components in regulating pain. However, despite its long history of research, the in vivo mechanisms of pain regulation mediated by neuropeptides remain largely unclear. This study aimed to reveal the in vivo mechanisms of nociceptive regulation mediated by RF-amide type neuropeptides utilizing Drosophila model at a cellular resolution. This study focused on three RF-amide type neuropeptides in Drosophila, and gained novel insights on their target neurons and receptor molecules in regulating nociceptive responses.

研究分野：神経行動遺伝学

キーワード：侵害受容 痛覚 神経ペプチド 神経内分泌 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

痛みの適切なコントロールは私たちの心身の健康を守り、より良い社会と経済を実現する上で重要な課題である。神経細胞から分泌される短鎖アミノ酸である神経ペプチドは、痛覚シグナル調節の重要因子として、そして有力な創薬ターゲット候補として大きな注目を集め、世界中で研究が進められてきた。しかし、それにも関わらず神経ペプチドの痛覚シグナル調節における作用機序は、ほとんどよくわかっていない。

哺乳類モデルを用いた先行研究では、多くの神経ペプチドが痛覚反応修飾作用を持つことが示唆されており、神経ペプチドによる痛覚シグナル調節メカニズムの包括的理解には、これに関わる神経ペプチドの網羅的かつ詳細な知見が必要となると考えられる。しかし、系統作出・維持のコストが高い哺乳類モデルでは、全ての神経ペプチドを対象とした網羅的アプローチは困難であり、結果として哺乳類に存在が予測されている神経ペプチド遺伝子の多くについて生体内機能がよくわかっていない。さらに、神経ペプチドは神経伝達物質およびホルモンとして、複数の組織で異なる生理機能調節に関わり得るといった複雑な機能様式を持つ(図1)。このことから、複雑な体制の哺乳類においては個々の神経ペプチドの生体内機能解析もまた困難であり、これまでに痛覚シグナル調節への関与が示唆された神経ペプチドについても、どこから分泌され、どの細胞のどの受容体に作用し、どのような細胞内機能変化を通じて痛覚シグナル調節を行うか、といった細胞レベルでの作用メカニズムはほとんど明らかになっていない。

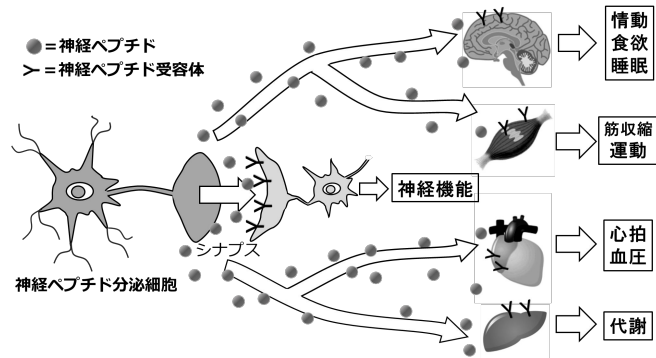


図1. 生体内での神経ペプチドによる生理機能調節の概念図

2. 研究の目的

申請者は、体制が単純で、生体内遺伝子機能解析のための優れた遺伝学的実験ツールが利用でき、系統作出維持コストが小さいショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)をモデルに用い、神経ペプチド群による痛覚シグナル調節機構の包括的な理解を目指して研究を開始した。これまでに行ってきたショウジョウバエゲノム上の全神経ペプチド遺伝子を対象とした欠失変異体スクリーニングからは、機能欠失した際に痛覚反応異常を引き起こす神経ペプチド遺伝子として、ペプチドC末端にRFモチーフを持つRFアミド型神経ペプチド遺伝子が複数見出された。哺乳類では、1984年に精製ペプチドの投与実験からRFアミド型神経ペプチドの痛覚シグナル調節への関与が報告されている(Tang et al., 1984)。しかし、哺乳類でこれまでに得られたRFアミド型神経ペプチドの痛覚シグナル調節作用に関する知見は、現在もなお精製ペプチドの投与実験によるものにほぼ留まっており、その生体内作用機序への我々の理解は30年間あまり進展がない(Ayachi and Simonin, 2014)。そこで本研究では、ショウジョウバエモデルの利点を活用し、RFアミド型神経ペプチドの痛覚シグナル調節機構を細胞レベルで理解していくことを目的とした。

3. 研究の方法

申請者のこれまでの研究から、ショウジョウバエの神経ペプチド遺伝子の中に、欠失変異体が熱への侵害刺激応答異常の表現型を示す3種類のRFアミド型神経ペプチド遺伝子を見出した。ショウジョウバエにおいて、これらの神経ペプチドの侵害受容調節への関与は一切報告がなく、またその他の生理機能調節作用においても、その詳細な作用機序に踏み込んだ研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、これらのRFアミド型神経ペプチドの細胞レベルでの作用機序、すなわち、どこから分泌され、どの細胞のどの受容体に作用し、どのような細胞機能変化を通じて痛覚シグナル調節を行うかを明らかにしていくために、具体的に以下のような手法を利用し課題解決を目指すこととした。

(1) 痛覚シグナル調節に関わるRFアミド型神経ペプチド受容体の特定

我々の見出した3種のRFアミド型神経ペプチドと結合する受容体候補は培養細胞実験系を用いて同定されているが、その生体内での機能解析はほとんど進んでいない。また、複数の受容体候補が存在するものについては、それらの受容体間の機能的差異についてもほとんどわかっていない。受容体の生体内機能解析が進んでいない原因として、これまでこれらの受容体の欠失変異体が存在しなかったことが大きい。そこで、これらの受容体の欠失変異体をCRISPR/Cas9ゲノム編集法により作成する。侵害受容シグナル調節に重要な受容体であれば、その欠失変異体は各ペプチド遺伝子変異体と同様の痛覚反応異常を示すと予想される。

(2) 痛覚シグナル調節に関わるRFアミド型神経ペプチド受容体の発現細胞の特定

(1)で特定した受容体の発現解析を行い、注目するRFアミド型神経ペプチドそれぞれが侵害受容シグナル調節過程で作用する標的細胞を特定する。近年、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術の

応用により、ショウジョウバエゲノム上の任意の位置に、目的の遺伝子配列を高効率でノックインすることが可能になった。これを利用し、(1)で特定した受容体遺伝子の発現を高精度に反映する GAL4 発現システムを作成する。作成した高精度受容体 GAL4 は UAS-膜結合 GFP 系統などと組み合わせ発現細胞を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察によって受容体遺伝子発現細胞の局在を調べる。注目する 3 種類の RF アミド型神経ペプチド遺伝子の変異体は侵害熱反応に異常が見られることから、これらの神経ペプチドは侵害受容神経系の構成ニューロンに直接作用している可能性が考えられる。そこで、受容体 GAL4 の発現細胞特定の際は、侵害受容神経系の構成ニューロンとの二重染色を行い、侵害受容神経回路と受容体発現細胞の同一性、位置関係に注目しながら解析を進める。

(3)RF アミド型神経ペプチドが機能調節している侵害受容系ニューロンの特定

注目する 3 種の RF アミド型神経ペプチドの遺伝子変異体は侵害熱反応に異常が見られることから、これらの変異体の侵害受容神経回路のどこかで、行動レベルでの異常を説明する神経活動の異常が観察できるものと考えられる。申請者は、ショウジョウバエ幼虫の侵害受容神経系ニューロンの活動を生体内で観察するためのイメージング法を独自に開発した(図 2)。ショウジョウバエにおいては、痛覚神経系の一次ニューロンから四次ニューロンにそれぞれ特異的な GAL4 系統が利用可能である(Ohyama et al., 2015)。そこで、注目する RF アミド型神経ペプチド遺伝子の各変異体において、侵害一次ニューロンから四次ニューロンまでの熱刺激に対する生理応答性を上記イメージング法により観察し、変異体の侵害熱反応異常の原因が侵害受容神経回路のどの段階で観察されるかを絞り込む。(2)の受容体発現細胞の解析において、もし侵害受容神経回路のニューロンで発現がみられる受容体があった場合には、その受容体と対応する神経ペプチドについては、特にその受容体発現ニューロンに注目して解析を進める。

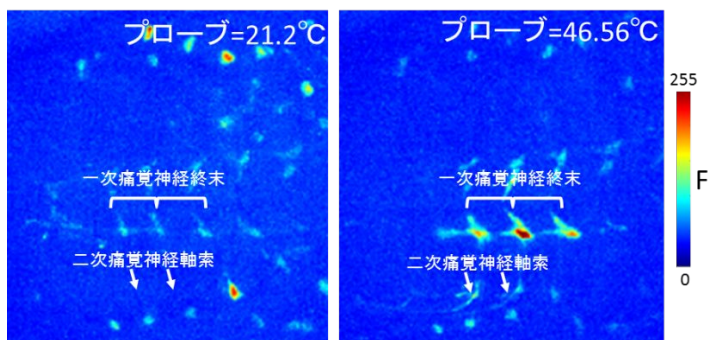


図 2. 申請者の開発したショウジョウバエ幼虫中枢神経系における神経活動イメージング。Ca²⁺センサー-GCaMP6 を幼虫の一次、二次痛覚神経に同時に発現させ、体壁を熱プローブで刺激した際の神経活動を中枢神経系において観察した。プローブ温度が 40 を超えると(右)、プローブ温度が低い状態(左)に比べて一次痛覚神経の軸索終末部と二次痛覚神経の軸索部で同時に GCaMP6 の蛍光強度(F)の上昇が認められ、熱に対し痛覚神経系が反応していることが観察できる。

(4)痛覚シグナル調節に関わる RF アミド型神経ペプチド分泌細胞の特定

注目する 3 種の RF アミド型神経ペプチドを発現する細胞は中枢神経系と消化器系に多く局在することが知られるが(Nassel et al., 2010)、この全てが痛覚シグナル調節に機能的に重要であるかは不明である。そこで高精度 GAL4 系統の作成と、GAL4 機能抑制タンパクの GAL80 発現システムを組み合わせた GAL4 発現細胞の絞りこみにより、痛覚シグナル調節に機能的に重要な分泌細胞を特定する。

4. 研究成果

痛覚シグナル調節に関わる RF アミド型神経ペプチド受容体の特定に関しては、注目した 3 種類の神経ペプチドについて、CRISPR/Cas9 法を利用した受容体変異体の作製を実施した。3 種類のペプチドに対して受容体として働く可能性のある 6 種類の受容体遺伝子について、それぞれ微小欠失を導入した変異体を作出した。次にこの 3 種類の RF アミド型神経ペプチドに対する受容体欠失変異体について、侵害熱受容反応テストによる行動評価を行った。その結果、3 種のうち 2 種の RF アミド型神経ペプチドに関してはペプチド遺伝子変異体表現型が一致する受容体変異体を見出すことができたが、残りの 1 種については、先行研究で推定されている受容体のどれを欠失させた場合にも、ペプチド遺伝子の変異体との表現型の一致は認められなかったことから、これまでに予測されていない別の受容体を通じて侵害受容シグナル調節に関与している可能性が考えられる。

上記実験から見出した神経ペプチド受容体に関して、その発現と同時的・同所的に GAL4 レポーターを発現する高精度 GAL4 系統を研究協力者から予定通り入手または自ら作出した。この高精度 GAL4 を利用してそれぞれの受容体遺伝子の発現解析も実施し、二重染色によって幼虫の侵害受容神経回路で発現が見られる受容体を複数同定することができた。さらに、組織特異的 RNAi を利用した遺伝子機能阻害実験では、1 種類の神経ペプチド受容体を侵害受容の四次ニューロンで阻害した場合、欠失変異体と同様の侵害受容反応異常を引き起こすことがわかった。従って、この神経ペプチドについては侵害受容の四次ニューロンの機能調節を通じて侵害受容の調節を行っている可能性が示唆された。この仮説を検証するために、生体内神経活動イメージングの条件検討を行い、侵害受容の四次ニューロンの侵害熱刺激応答を安定的にモニタリング可能な実験法の確立に成功した。現在この方法を用いて、侵害受容反応行動に異常が見られた変異体における侵害熱刺激応答の可視化を進めている。

着目した3種のRFアミド型神経ペプチドのうち、受容体変異体で表現型がみとめられ、さらにその受容体発現細胞の特定が進んでいるものについて、分泌細胞特異的なRNAi実験を行った。結果、ペプチド変異体と同様の侵害受容反応異常が観察され、侵害受容に必要な分泌細胞が特定できたと思われたが、コントロール実験の結果、実験に用いたRNAi系統にもともと侵害受容反応異常が見られることが発覚したため、現在系統の遺伝学的背景について再検討を行っている。

以上のように注目した3種類のRFアミド型神経ペプチドについて、新たな実験材料と実験技術を確立しながら、その侵害受容調節メカニズムについて細胞レベルでの理解を進めることができた。この研究期間において、どの神経ペプチドについてもその細胞レベルでのメカニズムの完全な理解には残念ながら至らなかったものの、今後もう少しばらばらの研究によって、その全体像は明らかにできるものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) “ An evolutionarily conserved neuropeptide pathway that negatively regulates nociception in *Drosophila* ” , Oikawa I, Kondo S, Kashiwabara A, Tanimoto H, Furukubo-Tokunaga K and Honjo K, The 13th Japan Drosophila Research Conference, 京都, 2018.9

2) “ Neuropeptides involved in *Drosophila* nociception ” , Kashiwabara A, Kondo S, Furukubo-Tokunaga K and Honjo K, 第40回日本神経科学学会大会, 幕張, 2017.7

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：近藤 周

ローマ字氏名：KONDO, Shu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。