

## 147. 神経ペプチドシグナル網による痛覚シグナル調節機構

本庄 賢

筑波大学 生命環境系

Key words : 痛覚, ショウジョウバエ, 神経ペプチド

### 緒言

神経細胞が分泌する短鎖ペプチドである神経ペプチドは、痛覚の重要な調節因子として注目され、過去数十年に渡り研究が進められてきた<sup>1)</sup>。哺乳類モデルを用いた先行研究から、痛覚修飾に作用する可能性のある神経ペプチドが多数発見されてきた。しかし一方、神経ペプチドによる痛覚修飾の生体内機序については、知見が非常に限られている。

神経ペプチドは神経伝達物質として近傍のニューロンに作用する一方、ホルモンとして血中に分泌され遠心性の作用も持ち、複数の組織で異なる生理機能調節に関わり得る<sup>2)</sup>。また一種類のペプチドに対応する受容体がしばしば複数存在することから、生体内におけるその作用点を明らかにすることが難しい。さらに、神経ペプチドは他の神経ペプチドと機能的相互作用を持つことが知られるが、哺乳類では数百種の神経ペプチドが生体内で活性を持っていると推測されており、多くの神経ペプチドの機能が未だにわかっていない<sup>3)</sup>。こうした状況から、痛覚修飾に関わる神経ペプチドがどれほど存在し、どの細胞に作用し、どのように相互作用しながら痛覚シグナルを調節しているのか、その生体内作用機序はほとんど理解が進んでいない。

我々は生体内における遺伝学的解析手法に優れるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデルに用い、痛覚修飾に関わる神経ペプチドの網羅的同定と、その生体内作用機序の解明を目標として研究を進めている。これまでに行った、37の神経ペプチド遺伝子に対するノックアウト変異体を用いたスクリーニングからは、欠失した際に痛覚過敏を引き起こす神経ペプチド遺伝子を5、痛覚鈍化を引き起こすものを7見出した。現在これらの神経ペプチドについて、ショウジョウバエの遺伝学的実験ツールを利用した生体内解析を進めている。

### 方法および結果

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法で作製した神経ペプチド遺伝子ノックアウト変異体について、熱プローブを用いた侵害刺激反応試験<sup>4,5)</sup>を実施し、その熱痛覚反応性をコントロール系統と比較した。テストした37の神経ペプチド遺伝子に対する47の変異体系統のうち、ホモ接合で致死であった8を除く全てについて、46℃と42℃の2種類のプローブ温度を用いて熱痛覚反応試験を実施した。この結果、欠失した際に痛覚過敏を引き起こす神経ペプチド遺伝子を5、痛覚鈍化を引き起こすものを7、それぞれ見出した。これらの神経ペプチド遺伝子およびその受容体遺伝子について、ヒト相同遺伝子の有無を調べたところ、見出された12の神経ペプチドのうち10 (83%) についてヒトでペプチドまたは受容体遺伝子が保存されていることが明らかになった。

スクリーニングで見出された神経ペプチドの痛覚調節メカニズムを解明するべく、特に哺乳類との保存性の高い神経ペプチドに注目して解析を開始した。変異体が痛覚過敏の表現型を示した神経ペプチド A について、その受容体変異体についても熱プローブを用いた痛覚反応試験を実施した。その結果、複数報告のある受容体遺伝子のうち一つの変異体が、神経ペプチド遺伝子変異体と同様に痛覚過敏の表現型を示すことがわかった (図1)。

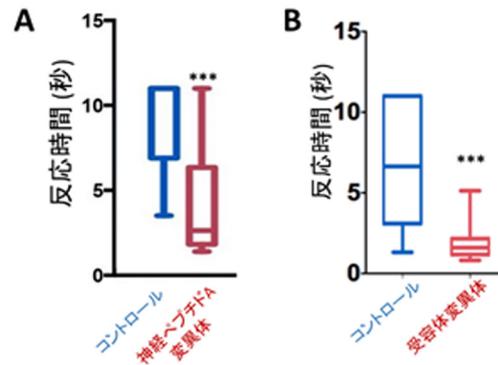


図1. 神経ペプチド A 変異体およびその受容体変異体の熱痛覚反応

(A) 42°Cの熱プローブ刺激に対し、痛覚反応を示すまでの時間を反応時間として計測したところ、コントロールに比べて変異体では有意に短い時間で反応が見られた。(B) 同様の試験を神経ペプチド A の受容体変異体について行った結果、受容体変異体も同様に 42°C プローブに反応するまでの時間が有意に短かった。\*\*\*  $p < 0.001$ , Mann-Whitney U-test.

神経ペプチド A の抗体と GAL4 発現システムを用いた生体内発現解析を行ったところ、神経ペプチド A の分泌細胞は幼虫の痛覚四次ニューロンと絡み合うように投射していることがわかった (図2)。シナプス接続の有無を検出するために用いられる GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) 法を試みたところ、神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロンの間で GRASP シグナルが観察され、神経ペプチド A 分泌細胞が実際に痛覚四次ニューロンと密接なコンタクトを持っていることがわかった (図3)。

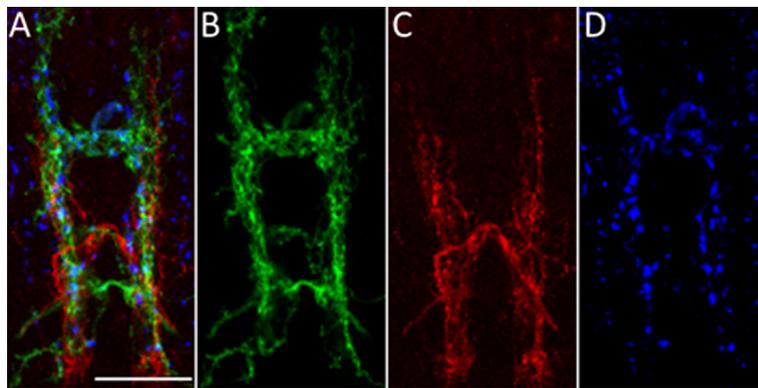


図2. 神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロン

(A) ショウジョウバエ幼虫の中樞神経系における神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロンの神経投射。緑色は神経ペプチド分泌細胞 (B)、赤色は痛覚四次ニューロン (C)、青色は神経ペプチド A (D) をそれぞれ特異的にラベルしている。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。

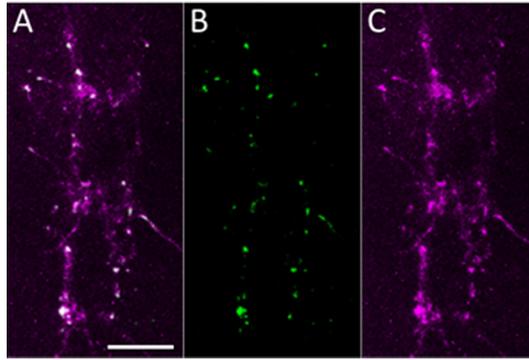


図3. GRASP 法による神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロンの接点の検出

GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) 法は、2 種類のニューロンのそれぞれに分割された膜結合型 GFP を発現させる。2 種類のニューロンがシナプス接続している場合など、距離が非常に近い場合、それぞれ発現された膜結合型分割 GFP 分子が再会合し、蛍光を取り戻す。神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロンにそれぞれ膜結合型分割 GFP を発現させた結果、再会合した GFP 分子による蛍光シグナルが認められ、2 つのニューロンが接触するほど近接していることがわかった。(A) マージ像、(B) GFP 再会合による蛍光シグナル (C) 神経ペプチド A 分泌細胞および痛覚四次ニューロン。スケールバーは 20  $\mu$ m。

## 考 察

ノックアウト変異体を利用したスクリーニングからは、欠失した際に痛覚反応異常を引き起こす 12 の神経ペプチド遺伝子を見出すことができた。この 12 の神経ペプチドシグナル系のうち、実に 10 がヒトとの間で保存されており、ヒトとショウジョウバエとの間で痛覚調節に関わる神経ペプチドシステムに高い共通性が見出されたと言える。

また哺乳類との間での高い保存性から注目した神経ペプチド A の解析では、神経ペプチド A 受容体 1 の変異体が、神経ペプチド A 変異体同様に痛覚過敏の表現型を示すことがわかった。また、神経ペプチド A の発現解析では、神経ペプチド A 分泌細胞と痛覚四次ニューロンの密接なコンタクトが明らかとなった。これらの結果は、神経ペプチド A が受容体 1 と痛覚四次ニューロンの活動調節を通じて、痛覚調節を行っている可能性を示唆している。現在、受容体の GAL4 発現システムを利用した発現解析を行っており、神経ペプチド A の痛覚調節作用について、その生体内機序の解明を進めていく予定である。また、スクリーニングから見出されたその他の神経ペプチドに関しても、同様に解析を進めていく。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、国立遺伝学研究所の近藤周博士および筑波大学生命環境科学研究科生物科学専攻の柏原秋穂氏である。本研究の推進に当たり、ご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hoyer D, Bartfai T. Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. *Chem Biodivers.* 2012 Nov;9(11):2367-87. doi: 10.1002/cbdv.201200288. Review. PMID:23161624
- 2) van den Pol AN. Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron.* 2012 Oct 4;76(1):98-115. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.014. Review. PMID:23040809

- 3) Wang Y, Wang M, Yin S, Jang R, Wang J, Xue Z, Xu T. NeuroPep: a comprehensive resource of neuropeptides. Database (Oxford). 2015 Apr 29;2015:bav038. doi: 10.1093/database/bav038. Print 2015. PMID:25931458
- 4) painless, a Drosophila gene essential for nociception. Tracey WD Jr, Wilson RI, Laurent G, Benzer S. Cell. 2003 Apr 18;113(2):261-73. PMID:12705873
- 5) Honjo K, Mauthner SE, Wang Y, Skene JH, Tracey WD Jr. Nociceptor-Enriched Genes Required for Normal Thermal Nociception. Cell Rep. 2016 Jul 12;16(2):295-303. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.003. Epub 2016 Jun 23. PMID:27346357