

## 【学位論文審査の要旨】

### 1 研究の目的

餌は動物の生存に必須であり、動物体内の満腹・空腹シグナルは摂食行動の調節に関与する。さらに満腹・空腹シグナルは感覚受容や脳機能を変化させることから、体内の環境変化に応じて動物の神経機能を調節する仕組みが存在すると考えられている。痛覚は生物の生存に必須な感覚の1つである。侵害刺激に対する忌避反応は、哺乳類だけでなく多くの動物種で見られる。興味深いことに、空腹のラットは侵害化学物質に対する逃避行動が低下する。よって、ラットでは空腹により痛みに対する反応が抑制されると考えられる。しかし、他の動物種にもこの現象が見られるのかは不明であり、さらに、その分子機構や神経機序も明らかになっていない。本研究では、遺伝学の発達したモデル動物であるショウジョウバエ（以下、ハエ）を利用し、空腹による侵害反応が低下するのかを明らかにし、さらに、その神経制御機構の解明を目的として遺伝学的解析を行った。

### 2 研究の方法と結果

ハエは様々な侵害刺激に対して忌避反応を示すが、とりわけ侵害熱刺激を用いた研究が盛んに行われてきた。近年の大規模遺伝子解析の結果から、哺乳類とハエの侵害熱刺激受容の機構はある程度保存されていることが知られている。さらに、ハエは様々な遺伝子発現技術が利用可能であり、侵害熱反応の制御機構を解明するモデル動物として極めて有用である。

本研究では、ホットプレートを用いてハエ成虫（有頭バエ）の侵害熱反応を測定する実験系を確立した。野生型では44℃以上で強い侵害熱反応を示したが、侵害熱センサーとして機能するPain TRPチャンネルの突然変異体の侵害熱反応は野生型よりも有意に低下した。次に断頭した野生型を用いて44℃の侵害熱刺激に対する反応を観察したところ、顕著なジャンプ反応は確認されなかった。したがって、有頭バエのジャンプによる侵害熱反応の制御には脳機能が必要であると考えられる。一方、断頭バエでは44℃の侵害熱刺激に対して何度も倒れては起き上がる行動（タンブリング）が観察された。断頭した*pain*変異体では野生型に比べてタンブリング頻度が有意に低下したことから、タンブリングは断頭バエ特有の侵害熱反応であり、この反応にPain TRPチャンネルが必要であると考えられる。

摂食制限したハエを用い侵害熱に対する反応（侵害熱反応）を測定した。12時間の摂食制限により侵害熱反応は低下したが、6時間および18時間の摂食制限では低下しなかった。12時間摂食制限が引き起こす侵害熱反応の低下は、脳によって制御されているのかどうかを推定するため、断頭バエを用いて同様の実験を行った。しかし、断頭バエでは、摂食制限による侵害熱反応の低下は見られなかった。よって、12時間摂食制限が脳機能を変化させ、その結果として侵害熱反応が低下したと考えられた。

ハエでは、空腹および満腹状態により様々な神経ペプチドの発現や分泌が変化し、接食

行動を制御している。そこで、摂食行動の調節にかかわる神経ペプチドに注目し、摂食制限による侵害熱反応低下に関与する神経ペプチドを推定する実験を行った。本研究では、複数の神経ペプチドの中から Leucokinin (Lk) に注目し、CRISPR/Cas9 システムを用いて Lk の受容体である *Lk receptor (Lkr)* 遺伝子のノックアウト変異体を作製した (*Lkr<sup>KO</sup>*)。 *Lkr<sup>KO</sup>* ホモ、およびヘテロ変異体はいずれも摂食制限による侵害熱反応の低下が見られなかった。さらに、Lk 抗体による免疫染色の結果から、12 時間の摂食制限は Lk の分泌を促進する可能性が考えられた。以上の結果から、空腹により Lk/Lkr シグナルが促進され、その結果侵害熱反応が抑制されることが明らかになった。

### 3 審査の結果

空腹により侵害反応が低下することはこれまでに唯一ラットで報告されていたが他の動物種での報告はなく、その分子機構や神経機序は不明であった。本研究では、空腹によりハエの侵害熱反応が低下することを初めて明らかにした。さらに、摂食行動を制御する神経ペプチド Lk およびその受容体 Lkr を介した情報伝達経路の関与も見出した。ハエの遺伝学ツールを利用して Lk 発現ニューロンの神経活動を抑制した形質転換バエを用いたのみならず、ゲノム編集技術を利用して Lk および Lkr のノックアウト変異体を作製して本研究に利用した。このように異なる実験を通して空腹による侵害熱反応低下に Lk/Lkr シグナルが必須であることを明らかにしたことから、非常に整合性のとれた説得力のある実験結果を提示することに成功している。これらの実験計画は慎重によく考えられており、また、結果から導かれる結論も明確であるといえる。

形質転換バエやノックアウト系統を利用した行動解析のみならず、新たに作製した Lk 抗体を用いて、空腹により Lk の分泌が促進されることも明らかにした。12 時間の摂食制限のみで Lk の分泌が促進されることは行動解析の結果とも一致している。以上の結果から、空腹により Lk/Lkr シグナルが促進され、その結果侵害熱反応が抑制されると考えられる。空腹により侵害反応が低下する神経機構に関しては不明であったが、本研究において神経ペプチドの関与を世界に先駆けて報告したことは高く評価できる。また、本研究の内容は国際誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* にすでに発表している。よって、本研究は本学の博士（理学）の学位に十分値するものと判断した。

### 4 試験及び試問の結果

本学の学位規定および、生物科学専攻の申し合わせに従って試験および試問を行った。公開の席上で論文内容を発表し、生命科学専攻教員による質疑応答をもって試験にあてた。また、論文審査委員が本論文および関連分野について試問を行った。その結果、専門分野、関連分野および外国語について十分な学力があることを認め、合格と判定した。