

## 論文内容の要旨

研究題目 ミツバチの触角において雌雄間、カースト間で発現の異なる分子群の同定と解析

氏名 上川内 あづさ

様々な動物種において匂いは外界の環境を認知する重要な感覚情報であり、動物個体に様々な反応を引き起こす。中でもフェロモンは同種個体に対して配偶行動や防衛行動などの決められた本能行動を惹起する点で特徴的である。

社会性昆虫であるセイヨウミツバチ *Apis mellifera* L. はコロニーを形成して生活しており、多様なフェロモンを発達させることでコロニー内部や外部の環境変化に柔軟に対応している。ミツバチのコロニーは、雌の成虫である女王蜂（生殖カースト）と働き蜂（労働カースト）、雄蜂から構成され、女王蜂は生殖行動と産卵、働き蜂は育児、巣の防衛や採餌などを行い、雄蜂は生殖行動のみを行う。幼虫の世話や採餌、外敵への攻撃などは働き蜂に固有な本能行動であり、それぞれ特異的なフェロモン（幼虫フェロモン、警報フェロモン）によって惹起される。こうしたフェロモンを介した行動調節は動物社会の成立に重要であるが、なぜ一部の個体のみが選択的に特定のフェロモンに応答性を示すのか、その分子機構は不明である。私は、これらの個体間にはそれぞれ固有な嗅覚情報処理機構が存在するのではないかと考え、この仮説を検証する目的で、ミツバチの触角において性選択的、カースト選択的に発現する分子群を検索し、同定した。

### 1. 触角において性選択的に発現する分子群の同定

まず始めに、ミツバチの触角において性選択的に発現する分子を同定する目的で、働き蜂、雄蜂の触角から粗抽出液を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により粗抽出液中に含まれるタンパク質を分離してバンドパターンを比較した。その結果、雄蜂選択的に発現するタンパ

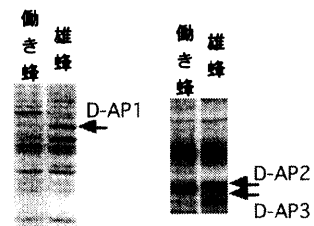


図1 触角において雄蜂選択的に発現するタンパク質のSDS-PAGEによる同定。矢印で同定したタンパク質を示す。

ク質 D-AP1 (60kDa)、D-AP2 (15kDa)、D-AP3 (13kDa) を見出した (図1)。そこで、これらのタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、続いて全長 cDNA を単離することにより全一次構造を決定した。予想アミノ酸配列を用いた相同性検索の結果、D-AP1 はショウジョウバエの carboxylesterase 6 と 33%、D-AP2 と D-AP3 はそれぞれタバコスズメガの細胞質レチノイン酸結合タンパク質と 58%、32%の相同性を示し、これらの分子のミツバチホモログと考えられた (表1)。昆虫の触角で性選択的に発現する細胞質レチノイン酸結合タンパク質が同定されたのはこれが初めての例である。一方、D-AP1 は N 末端の上流に分泌シグナルを持つことが分かり、分泌タンパク質として機能すると考えられた。RT-PCR 法により、D-AP1 の触角での発現を検討した結果、D-AP1 は雄蜂特異的に発現しており、転写段階で発現が制御されることが判明した (図2)。

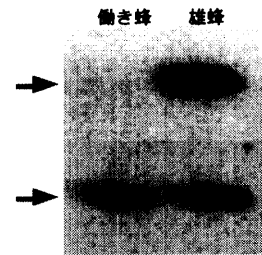


図2 D-AP1 の mRNA 発現解析。上段に D-AP1、下段にコントロール遺伝子 (EF1 $\alpha$ ) のシグナルを矢印で示す。

次に、雄蜂の触角においてカルボキシルエステラーゼの比活性が実際に働き蜂よりも高いか否かを知る目的で、働き蜂、雄蜂の触角より粗抽出液を調製し、2-naphthyl acetate を基質としたカルボキシルエステラーゼ活性を測定し、比活性を算出した。その結果、触角におけるカルボキシルエステラーゼ活性の比活性は働き蜂は  $4.2 \pm 0.5$  Units/ $\mu$ g protein、雄蜂は  $9.5 \pm 1.2$  Units/ $\mu$ g protein であり、比活性としても雄蜂で約 2.3 倍高いことが示された (図3)。D-AP1 は雄蜂特異的に発現することを考えると、ミツバチの触角においては複数のカルボキシルエステラーゼのファミリー分子が存在する可能性がある。

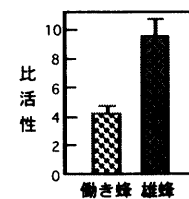


図3 働き蜂、雄蜂の触角粗抽出液中におけるカルボキシルエステラーゼ比活性の測定。縦軸の単位、Units/ $\mu$ g protein。

## 2. 触角においてカースト選択的に発現する分子群の同定

ミツバチの触角においてカースト選択的に発現する分子を同定する目的で、働き蜂と女王蜂の触角から粗抽出液を調製し、SDS-PAGE 後のバンドパターンを比較した。その結果、働き蜂選択的に発現するタンパク質として W-AP1 (分子量 8kDa) を見出した (図4)。そこで、このタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、続いて全長 cDNA を単離することにより一次構造を推定した。予想アミノ酸配列を用いた相同性検索の結果、W-AP1 はイナゴの触角に発現する chemosensory protein と 44%の相同性を示し、この分子のミツバチホモログと考えられた (表1)。また、N 末端の上流に分泌シグナルを持つことが分かり、分泌タンパク質として機能すると考えられた。W-AP1 の発現制御段階を知る目的で、RT-PCR 法により W-AP1 の触角での発現を検討した結果、mRNA の段階ではカーストや性で等しく発

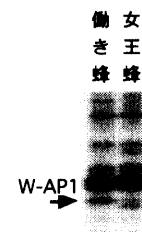


図4 触角において働き蜂選択的に発現するタンパク質の SDS-PAGE による同定。矢印で W-AP1 のバンドを示す。

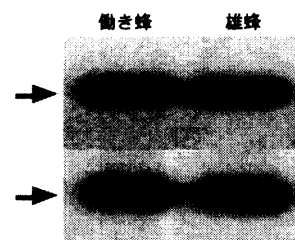


図5 W-AP1 の mRNA 発現解析。上段に W-AP1、下段にコントロール遺伝子 (SF-B52) のシグナルを矢印で示す。

現していることが分かり、翻訳段階や翻訳後修飾段階での発現制御が考えられた (図5)。触角などの感覚受容組織においてカースト選択的に発現する分子が同定されたのはこれが初めての例である。

次に、カースト間で発現量に差のある分子群のさらなる同定を目的として、働き蜂、女王蜂各 100 匹分の触角から抽出した RNA を用いて differential display による検索を行った。約 1200 個の遺伝子断片を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し比較した結果、働き蜂選択的な候補遺伝子を 6 個、女王蜂選択的な候補遺伝子を 12 個同定した。得られた候補遺伝子全てについて再増幅を行い、RT-PCR 法またはノザンプロット法により遺伝子発現を検討した結果、C6 遺伝子が女王蜂選択的に、C14 遺伝子が働き蜂選択的に発現することを見出した (図6、7)。次に、それらの遺伝子の一次構造を明らかにし、遺伝子産物の機能予測を行う目的で、RACE 法により全長 cDNA を単離してアミノ酸配列の推定及び相同性検索を行った。その結果を表1に示す。C6 遺伝子は 232 アミノ酸のタンパク質をコードすると推定され、相同性検索の結果、ショウジョウバエの Peritrophin A と 67%の相同性を示したことから Peritrophin A のミツバチホモログをコードすると考えられた。一方、C14 遺伝子は 87 アミノ酸のタンパク質をコードし、von Heijne 法によるシグナル配

列予測の結果、分泌タンパク質をコードすると推定された。又、相同性検索の結果、ショウジョウバエ成虫頭部由来、タバコスズメガ触角由来の機能未知の EST clone の予想アミノ酸配列とそれぞれ 43%、43%の相同性を示した。このことから、C14 遺伝子産物は昆虫種によらず発現する新規な分泌タンパク質だと考えられた。そこで、C14 遺伝子産物の機能を推測する目的で、働き蜂の全身での発現解析を行った。ノザンプロット解析の結果、C14 遺伝子は触角と肢で高発現する事が分かり、C14 遺伝子産物は付属肢に特徴的な機能に関与する可能性が考えられた (図8)。昆虫類の肢には味覚受容器が存在することから、C14 遺伝

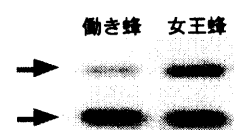


図6 RT-PCR 法による、働き蜂、女王蜂の触角での C6 遺伝子の発現量の比較。上段、C6 遺伝子。下段、Ribosomal protein S8 遺伝子。

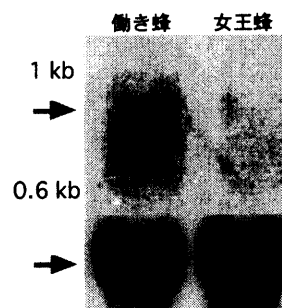


図7 ノザンプロット法による働き蜂、女王蜂の触角での C14 遺伝子の発現量の比較。矢印でシグナルの位置を示す。上段、C14。下段、18S rRNA。

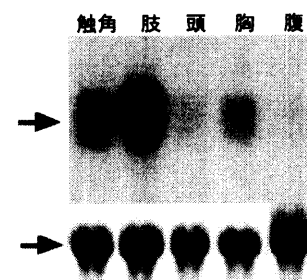


図8 働き蜂の身体各部分における C14 遺伝子の発現解析。上段に C14 遺伝子、下段に 18S rRNA のシグナルを矢印で示す。

表1 ミツバチの触角において性選択的、カースト選択的に発現する分子群。

分子名	発現	他種相同分子 (相同性)
W-AP1	働き蜂>女王蜂、雄蜂	イナゴ chemosensory protein-sg4 (44%)
D-AP1	雄蜂>>女王蜂、働き蜂	ショウジョウバエ carboxylsterase 6 (33%)
D-AP2	雄蜂>女王蜂、働き蜂	蛾 細胞質レチノイン酸結合タンパク質 (58%)
D-AP3	雄蜂>女王蜂、働き蜂	蛾 細胞質レチノイン酸結合タンパク質 (32%)
C6	女王蜂>働き蜂	ショウジョウバエ peritrophin A (67%)
C14	働き蜂>女王蜂	ショウジョウバエ EST clone (43%)

子産物は働き蜂選択的な化学受容一般に関与する可能性がある。

### 考察

本研究は、ミツバチの触角において性やカーストに選択的に発現する分子群を同定した初めての例である(表1)。D-AP2、D-AP3 のホモログ分子である細胞質レチノイン酸結合タンパク質は脂肪酸結合タンパク質ファミリーに属し、細胞内の脂質代謝に関与すると考えられている。また、Peritrophin A はキチン結合性の構造タンパク質である。D-AP2、D-AP3 や C6 遺伝子産物の発現により性やカーストに特徴的な細胞内脂質組成や細胞外表皮構造が生じる可能性がある。

匂い分子は触角の感覚子表面の嗅孔から内部に入り、感覚子液中を移動して匂い分子受容体と結合する(図9)。W-AP1、D-AP1、C14 遺伝子産物の機能として、感覚子液中に分泌され匂い分子と結合することで運搬、修飾、分解などに関与する可能性が挙げられる。例えば働き蜂に作用して固有な本能行動を引き起こす警報フェロモン(Isoamyl acetate)や幼虫フェロモン(Oleic acid methyl ester、Linoleic acid methyl ester、Linolenic acid methyl ester)はカルボン酸エステル化合物であり、雄の触角特異的に発現する D-AP1 によって分解されることが考えられる。今回同定した分泌タンパク質群は、

このように匂い分子が受容体へ到達する以前の段階で作用し、匂い情報受容に対する性選択性やカースト選択性を与える可能性がある。

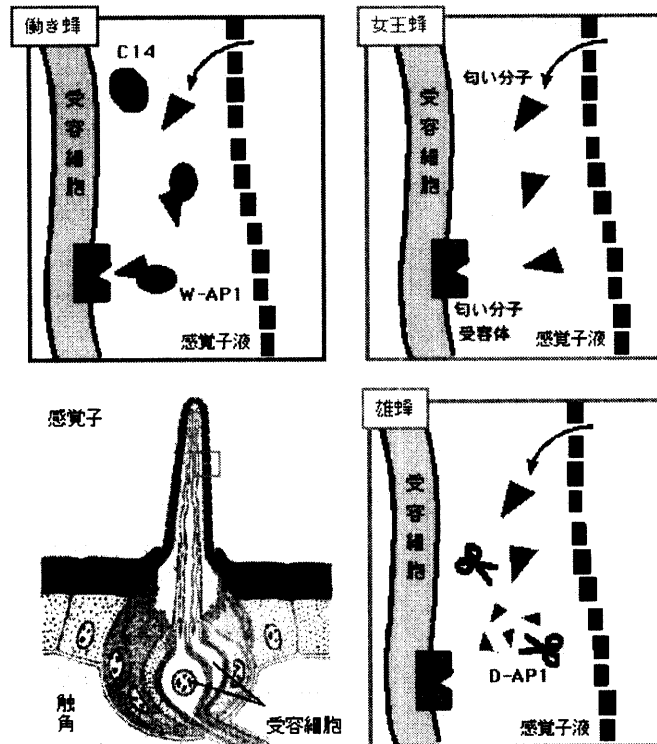


図9 カーストや性選択的な匂い情報の受容モデル図。感覚子液中に存在する分泌タンパク質群により、匂い分子が細胞外において個体選択的な輸送や分解を受ける可能性がある。