

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. 課程・論文博士の別 | 課程博士 |
| 2. 申請者氏名 (ふりがな) | 朴 正敏 (ぱく ちよんみん) |
| 3. 学位の種類 | 博士 (薬学) |
| 4. 学位記番号 | 博薬 第 1049 号 |
| 5. 学位授与年月日 | 平成15年 9月30日 |
| 6. 論文題目 | |

Biochemical and functional analysis of Mblk-1, a novel transcription factor preferentially expressed in the mushroom body of the honeybee brain.

(セイヨウミツバチ脳のキノコ体選択的に発現する新規な転写因子Mblk-1の機能解析)

- | | |
|--------------------|--------|
| 7. 学位論文を独自にネット上で公開 | 希望しない。 |
| 8. 提出ファイルの仕様等 | |

提出ファイル名	朴正敏審査結果.doc
使用	Microsoft Word 10
OS	Macintosh Office X

論文の内容の要旨

論文題目 「Biochemical and functional analysis of Mblk-1, a novel transcription factor preferentially expressed in the mushroom body of the honeybee brain」

(セイヨウミツバチ脳キノコ体に選択的に発現する新規な転写因子 Mblk-1 の機能解析)

氏名 朴 正敏

ミツバチは最も高度な社会性を獲得した昆虫の1つで、雌の成虫が、女王蜂と働き蜂にカースト分化する。また、働き蜂は育児や採餌といった様々な作業の分担や、ダンス言語を用いた情報伝達など高度な個体間コミュニケーションを行う。こうした社会性行動を支えるために、ミツバチには感覚統合や記憶・学習、コミュニケーション能力などに働く高度な脳機構が備わっていると考えられるが、その分子的基盤は不明な点が多い。キノコ体は昆虫脳において、感覚統合や記憶・学習に重要な役割を担う領域であり、ミツバチでは他の昆虫に比べて、容積的にも構造的にも顕著に発達していることから、キノコ体で機能する分子はミツバチの行動に関わる有力な候補になると考えられる。

Mblk-1 は、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) のキノコ体の介在神経の1つである大型ケニオン細胞に選択的に発現する遺伝子として、当研究室の竹内らにより同定された。*Mblk-1* は、RHF1, 2と名付けた二つの helix-turn-helix DNA 結合モチーフ及び、グルタミンランを含むことから、転写

因子として機能する可能性が考えられた。しかしながら、Mblk-1 が実際に DNA 結合活性や転写制御能を持つのか、また、どのような遺伝子の発現を制御するのかは不明であった。本研究では、これらの点を解決することにより、ミツバチの脳神経系における Mblk-1 の役割を解明することを目的にした。

1. Mblk-1 の結合 DNA 配列の同定

先ず Mblk-1 の結合配列を同定する目的で、結合部位選択法により、ランダムオリゴヌクレオチドの中から全長のリコンビナント Mblk-1 に選択的に結合するものを選別した。得られた element の配列を決定したところ、約 43% がほぼ同一のパリンドロームを含む 22bp の塩基配列 (MBE; Mblk-1 Binding Element) を有しており、ゲルシフト法を用いた競合阻害実験により、Mblk-1 がこの element に特異的に結合することが明らかになった。さらに、2つの DNA 結合モチーフ RHF1、2 のどちらか一方を含む部分 Mblk-1 を作成し同様の解析を行ったところ、いずれも単独で MBE と特異的に結合した。このことは RHF1 と 2 が、DNA 結合ドメインであることを示している。

2. Mblk-1 の転写活性

次に Mblk-1 が MBE 依存に転写を制御する活性を有するかをレポーターアッセイにより検証した。Mblk-1 発現コンストラクトを、MBE 又は無関係の配列 (UAS) を複数組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子とともにショウジョウバエ SL-2 細胞に導入し、転写活性に与える影響を調べた。その結果、Mblk-1 の導入により、MBE 依存の転写活性は約 6 倍上昇した。さらに、Mblk-1 の転写活性化能を担うドメインを同定するため、様々な部分 Mblk-1 発現コンストラクトを作製し、その転写活性化能を測定した。その結果、RHF2 を欠失すると、転写活性化能が完全に失われた。以上の結果は Mblk-1 が塩基配列特異的転写促進因子であり、DNA 結合ドメインである RHF2 が転写活性に必須であることを示している。

3. Ras/MAPK 経路による Mblk-1 転写活性化能の制御

神経可塑性や記憶・学習には、PKA, CaMK, MAPK といったセカンドメッセンジャー依存性キナーゼが重要な役割を果たすこと、またミツバチにおいては、PKA, CaMKII がキノコ体選択的に発現することから、私は Mblk-1 がこれらのキナーゼによってリン酸化され、転写活性が制御される可能性を考えた。この点を検証する目的で、リコンビナント部分 Mblk-1 タンパク質を用いて PKA, CaMKII, MAPK による *in vitro* リン酸化アッセイを行った。その結果、Mblk-1(384-808)が MAPK によりリン酸化されることが分かった。次に、MAPK によるリン酸化のコンセンサス配列に含まれる Ser444 を Ala に置換した変異体 Mblk-1 (384-808)S444A を作成し、同様のリン酸化アッセイを行ったところ、リン酸化のシグナルが消失したことから、MAPK によるリン酸化部位は Ser444 であることが分かった。次に、MAPK によるリン酸化が Mblk-1 の転写活性化能に及ぼす影響を調べる目的で、Mblk-1-S444A を用いてレポーターアッセイを行ったところ、転写活性化能は野生型 Mblk-1 の約 65%に低下した。一方、ショウジョウバエの活性化型 MAPK 又は Ras を共発現すると、Mblk-1 による転写活性化は 2-3 倍に増強された。このことは、Mblk-1 の転写活性化能が Ras/MAPK 経路によって調節されうることを示している。

4. Mblk-1 の標的遺伝子の同定

次に Mblk-1 の標的遺伝子の候補を同定する目的で、ミツバチの脳で Mblk-1 を強制発現させた際に発現誘導される遺伝子を cDNA マイクロアレイ法を用いて検索した。電気穿孔法により Mblk-1 又は空の発現ベクターを働き蜂の脳に導入し、一日飼育した後の生存個体の視葉から全 RNA を抽出し、プローブを作製した。当研究室で作製した、ミツバチ脳由来の cDNA 3072 個をスポットした DNA チップを用いて解析を行った結果、Mblk-1 発現依存に 4 倍以上強いシグナルを与えるクローンが 9 個見つかри、データベース検索の結果、最も発現量の増加率が高かった 3 つのクローンは、各々ショウジョウバエの RabGAP1, 14-3-3 epsilon, inositol polyphosphate 4-phosphatase と高い相同性を示した。

まとめと考察

本研究において私は、Mblk-1 が塩基配列特異的な転写因子であり、Ras/MAPK 経路により、その転写活性が調節されることを示した。さらに、ミツバチ脳における Mblk-1 の標的遺伝子の候補を同定した。これは、昆虫のキノコ体選択的に発現する転写因子の機能を明らかにした世界初の例である。Mblk-1 は、ミツバチのキノコ体の大型ケニオン細胞で Ras/MAPK 経路によって活性化され、下流遺伝子の発現を亢進することで、RabGAP1 を介した神経伝達物質の細胞内輸送、inositol polyphosphate 4-phosphatase を介したカルシウムの遊離と神経細胞の生存の維持、14-3-3 epsilon による Ras-mediated signaling などの調節をもたらすと考えられる。Mblk-1 が Ras/MAPK 経路で制御されることは、Mblk-1 が神経可塑性に関わる新規な転写因子であることを示唆するとともに、ミツバチ脳ではキノコ体の神経可塑性が選択的に亢進している可能性を示唆しており、動物の脳機能の進化を考える上で興味深い。

1. Park J.-M. , Kunieda T. , Kubo T. The activity of Mblk-1, a mushroom body-selective transcription factor from the honeybee, is modulated by the ras/MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 18689-18694, 2003.
2. Kunieda T. , Park J.-M. , Takeuchi H. , Kubo T. Identification and characterization of Mlr1,2: two mouse homologues of Mblk-1, a transcription factor from the honeybee brain. *FEBS Lett.* 535, 61-65, 2003.
3. Park J.-M. , Kunieda T. , Takeuchi H. , Kubo T. DNA-binding properties of Mblk-1, a putative

transcription factor from the honeybee. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 23-28, 2002.