

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

セイヨウミツバチ脳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

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

7. 審査委員会委員 (主査) 東京大学 教授 久保 健雄
教授 堅田 利明
教授 三浦 正幸
助教授 西山 信好
講師 東 伸昭

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

審査の結果の要旨

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一つで、女王蜂と働き蜂、雄蜂からなるコロニーを形成して生活する。コロニーの内部では、多彩な個体間コミュニケーションがなされており、特に、花の蜜を集めて帰巢した働き蜂は、ダンス言語を利用して花の位置を仲間に教えると言った高次行動を示す。しなしながら、こうしたミツバチの高次行動を支える脳の分子的な基盤については不明な点が多い。

ミツバチの脳では、記憶、学習、感覚統合に重要と考えられているキノコ体が他の昆虫に比べて顕著に発達しており、これまでに、ミツバチの高次行動に関わる遺伝子の候補として、キノコ体選択的に発現する遺伝子 *Mblk-1* (*Mushroom body / large type Kenyon cell-preferential gene-1*) が同定されている。*Mblk-1* は2つの推定上のDNA結合モチーフを含む新規なタンパク質をコードしているが、その機能は明らかではない。本研究で朴は、*Mblk-1* の転写因子としての生化学的な機能解析を行っている。

最初に、リコンビナント *Mblk-1* を利用した結合部位選択法により、*Mblk-1* が選択的に結合するDNA配列を検索し、22bpのDNA配列 (MBE; *Mblk-1 Binding Element*) が同定された。またゲルシフトアッセイにより、*Mblk-1* の2つのDNA結合モチーフの両方が、同じMBE配列に結合することが示された。

次いで、ショウジョウバエの培養細胞 (SL2) を用いたレポーターアッセイにより、*Mblk-1* が実際にMBE依存の転写促進活性をもつか検証した。その結果、*Mblk-1* の発現により、MBE依存の転写活性は約6倍増強した。また、様々な部分を欠失した変異体 *Mblk-1* を発現させ、*Mblk-1* のどの部位が重要か調べたところ、2番目のDNA結合ドメインが、転写活性化に必須であることが判明した。

神経可塑性や記憶、学習においては、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。またミツバチでは、CaMKIIとPKAがキノコ体選択的に発現する。そこで、*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検討した。まず、リコンビナント部分 *Mblk-1* を用いた *in vitro* リン酸化アッセイを行ったところ、*Mblk-1* はいずれのキナーゼによってもリン酸化されたが、MAPK によっては、*Mblk-1*(384-808)が選択的にリン酸化されることが判明した。また、そのリン酸化部位は Ser444 であることが分かった。

次いで、MAPK によるリン酸化が *Mblk-1* の転写活性に与える影響を調べる目的で、*Mblk-1S444A* を用いてレポーターアッセイを行ったところ、転写活性は野生型の65%に低下していた。一方、活性化型ショウジョウバエMAPKまたは、Rasを共発現すると、転写活性化は2-3倍増強された。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示している。

最後に *Mblk-1* の標的遺伝子の候補を同定する目的で、電気穿孔法により働き蜂脳に *Mblk-1* 遺伝子を導入、発現させた後、RNAを回収し、ミツバチの脳由来のcDNA 3072個をスポットしてあるcDNA microarrayを用いて発現誘導される遺伝子を検索した。その結果、最も強く発現誘導された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 と高い相同性を示すタンパク質をコードしていた。

以上、本研究では、*Mblk-1* が塩基配列特異的転写因子であり、その活性がRas/MAPK経路で制御されうること示した。これは、昆虫のキノコ体に選択的に発現する転写因子の初めての例であり、*Mblk-1* は神経可塑性に関わる新規な転写因子の候補と考えられる。またミツバチの脳では、キノコ体の神経可塑性が亢進している可能性を示唆する点で、動物の脳機能の進化を考える上でも興味深い。本研究は神経生化学、分子生物学の分野へ貢献するもので

あり、博士(薬学)の学位に相応しいと判断した。