

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification and Expression Pattern Analysis of Mushroom Body-  
Selective Genes from the Honeybee Brains

(ミツバチの脳においてキノコ体選択的に発現する遺伝子の同定および発現パターンの解析)

氏 名 Paul, Rajib Kumar

ミツバチは社会性昆虫であり、精緻で多彩な社会性行動を示す。例えば、働き蜂はダンスという象徴的言語を用いて花蜜の位置を仲間に伝達する。また働き蜂では若齢蜂では巣内で育児を行い、老齢蜂は巣外で採餌をする(加齢分業)。ミツバチの脳はわずか約  $1\text{mm}^3$  にも満たず、単純で小さな脳を持つミツバチがなぜこのような高度な行動ができるのかは古くから神経生物学の謎であった。

キノコ体は昆虫脳の感覚統合及び記憶・学習の中枢であり、ミツバチでは特徴的に発達している。ミツバチキノコ体は全脳容積の 10%以上を占めるが、ショウジョウバエやイエバエではキノコ体の容積は全脳容積の数%に過ぎない。一方でミツバチでは、キノコ体の構造が加齢分業に従って変化することも報告されている。働き蜂では、加齢に従い役割が変化するとき、神経細胞体が集合しているキノコ体の皮層の容積が 30%も減少し、シナプスが集合しているニューロパイルの容積が 15%増大する。このことからキノコ体の機能がミツバチの高度な社会性行動に関わると考えられてきた。

キノコ体は 34 万個の固有の介在神経(ケニオン細胞)によって構成されている。ミツバチにおいては、ケニオン細胞は神経細胞体の大きさにより、大型と小型の 2 種類に分類される。大型ケニオン細胞は嗅覚情報または視覚情報を専門に処理する2種類のサブタイプから構成される。一方で、小型のケニオン細胞は様々な感覚情報を統合・処理をしていると考えられている。神経回路レベルの知見からもキノコ体は感覚情報処理の高次中枢であることが予想される。

私が所属する研究室ではミツバチの高次行動に関わる候補遺伝子を同定する目的で、ミツバチ脳内でキノコ体選択的に発現する遺伝子群の検索及び同定が行われていた。これまでに Differential display 法(DD 法)を用いて、スモールスケール(約 1000 種類の遺伝子を比較)での検索を行った結果、キノコ体選択的に発現する遺伝子として5種類の遺伝子(PKC, CaMKII, IP<sub>3</sub> 受容体, IP<sub>3</sub> ホスファターゼ、Mblk-1 遺伝子)が同定されている。

*Mblk-1* はキノコ体の中でも大型ケニオン細胞選択的に発現し、DNA 結合型の転写因子をコードする。生化学的な解析から Mblk-1 タンパク質は特定の DNA 塩基配列(MBE 配列)に選択的に結合し、Ras-MAPK シグナル経路のリン酸化によりその転写促進活性が制御されることが分かっている。また Mblk-1 の構造は種間で保存されており、そのホモログ遺伝子は線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトにおいて同定されている。ショウジョウバエホモログである E93 は変態過程において昆虫ステロイドホルモン依存に誘導されるアポトーシスに関わる。昆虫ステロイドホルモンは E93, BR-C, E74 などの転写因子群の発現を誘導することにより、変態過程においてアポトーシスなどの組織の再編成を誘導する。私は E93 以外の昆虫ステロイドホルモンの機能に関わる転写因子(BR-C, E74)も、ミツバチキノコ体の機能に関わる可能性を考えて、これらのミツバチホモログ遺伝子を同定し、*In situ* hybridization 法により脳内での発現解析を行った。その結果、予想通り両遺伝子は脳内でキノコ体に強く発現しており、さらに BR-C, E74 は大型または小型ケニオン細胞にそれぞれ選択的に発現していた。以上の点からミツバチでは昆虫ステロイドホルモンに関わる転写因子群(Mblk-1, BR-C, E74)はケニオン細胞のサブタイプ選択的に発現する遺伝子群の発現調節に関わることが示唆された。昆虫ステロイドホルモンはショウジョウバエの変態過程において、キノコ体の神経回路の再編成を引き起こす。またミツバチキノコ体は加齢

分業に従って構造が変化することから、これらの転写因子群は成体脳における神経回路の再編成に関わる可能性を考えている。

次はキノコ体選択的に発現する遺伝子を網羅的に同定する目的で、ラージスケールでの検索を行った。このことにより、キノコ体だけでなく大型ケニオン、小型ケニオン細胞選択的な機能に関わる分子機構がさらに明らかになることを期待した。方法はミツバチ脳をキノコ体、嗅覚中枢である触角葉、視覚中枢である視葉の3領域を解剖により単離し、Differential Display法により3領域の遺伝子発現様式を比較した。約10000種類のバンドの強度を比較した結果、165種類のバンドがキノコ体選択的に検出された。そしてこれらのバンドに含まれるPCR断片を増幅し、プラスミドにクローニングした。DD法は偽陽性の比率が高い為、他の方法で発現確認をする必要がある。また周辺バンドの混入により1種類の目的バンド由来に複数のcDNAがクローン化されることがある。そこで、それぞれ1種類のバンド由来に6つのクローンをプリントしたマイクロアレイを作製し、多数の候補cDNA群の発現を一度に確認することにした。二蛍光標識法を行うことにより、キノコ体 vs 視葉、及びキノコ体 vs 触角葉の2通りの組み合わせで発現強度を比較し、キノコ体に強く発現する候補クローンを112種類得た。全てのクローンについて *In situ* hybridization法を行い、脳内の遺伝子発現を解析した結果、29種類のcDNA断片(200-700bp)に対応する遺伝子がキノコ体のケニオン細胞選択的に発現することが確認された。*In situ* hybridization法により、これらの遺伝子群はキノコ体での発現様式により、3種類(ケニオン細胞全体:14種類、大型ケニオン細胞選択的:11種類、小型ケニオン細胞選択的:4種類)に分類できることが分かった。ホモロジー検索の結果、既知の転写因子(dachshund, fruitless(Clone No. 440, Clone No. 567))、Phospholipase C(Clone No. 231)、PDZドメインを持つ新規タンパク質(Clone No. 314)、GEF活性ドメインを持つ新規タンパク質(Clone No. 466)、イムノグロブリンドメインを持つ新規タンパク質(Clone No. 60)をコードする遺伝子群を同定した。これらの遺伝子がコードするタンパク質はケニオン細胞固有のシグナル伝達経路や発現制御機構に関わると予想される。残りのcDNA断片はいずれも非翻訳領域をコードしており、遺伝子産物の構造は不明である。現在、ミツバチゲノムプロジェクトの結果を利用した *in silico* クローニングが進行中である。今後、同定した遺伝子群の情報をミツバチゲノムプロジェクトデータベースとリンクし、遺伝子構造や遺伝子座の情報や遺

伝子産物の機能についてデータベース化する予定である。

これまでの結果から神経可塑性や神経回路形成に関わる遺伝子が、ミツバチキノコ体に選択的に発現することが分かってきた。例えば、5種類のカルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子(PLC, PKC, CaMKII, IP<sub>3</sub>受容体, IP<sub>3</sub>ホスファターゼ)がキノコ体選択的に発現するが、これらの遺伝子はマウスなどのモデル生物を用いた解析から神経可塑性に関わる事が示されている。Mblk-1 遺伝子は線虫ホモログを用いた遺伝学的解析から、線虫の正常な神経回路形成に必要であることが示されている。また *dachshund* については成体脳における機能は不明だが、ショウジョウバエの変態過程においてキノコ体の発生に必要であることが分かっている。このようにミツバチのキノコ体では神経可塑性や神経回路形成に関わる因子をコードする遺伝子群の発現が協調的に増強している。このような発現様式が、ミツバチのキノコ体の神経機能を特化し、分業に伴う神経回路の再編成やダンス言語に代表される高度な脳情報処理を可能にしたのではないかと考えている。

また逆にミツバチキノコ体で選択的に発現する新規遺伝子群は、動物一般の高次神経機能に関わる候補遺伝子になることが予想される。例えば Clone No.318 や Clone No.579 がコードするタンパク質は既知のドメインを持っておらず、神経系における役割は全く不明である。モデル生物を用いてこれらの因子の機能解析し、カルシウムシグナル伝達系などの既知のシグナル伝達経路との関連を明らかにすることにより、動物一般の高次神経機能に関わる新規なシグナル伝達経路の発見に寄与できるのではないかとと思われる。また興味深い事に、Clone No. 466 は、ヒトの遺伝病である Niemann-Pick 病の原因遺伝子のミツバチホモログであった。Niemann-Pick 病の患者は知能発育低下、筋緊張低下、運動障害など神経系にも異常が観察されるが、原因遺伝子産物の神経細胞内における機能については不明な点が多い。Clone No. 466 は大型ケニオン細胞に局限して発現しており、大型ケニオン細胞での細胞内シグナル伝達系を明らかにすることにより、ヒトの神経疾患に関わる新規な分子機構の解明にもつながることも期待している。