

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification and characterization of two novel non-coding nuclear RNAs, Ks-1 and AncR-1, expressed in the honeybee (*Apis mellifera* L.) brain  
ミツバチの脳に発現する二つの新規非翻訳性核内 RNA、Ks-1 と AncR-1 の同定と解析

氏 名 徳廣 (澤田) 美由紀

セイヨウミツバチ(*Apis mellifera* L.)は社会性昆虫であり、様々な社会性行動を示す。一つのコロニーは女王蜂、働き蜂、雄蜂で成り立ち、女王蜂と雄蜂が生殖に関わる行動をする一方、働き蜂は育児や採餌、巣作りといった生殖以外の全労働を行う。このようなミツバチの社会性行動の分子的基盤については、未だ不明な点が多い。私は本学大学院薬学系研究科での修士課程において、ミツバチの高次行動に関わる遺伝子の候補として、記憶・学習の高次中枢とされている脳のキノコ体で、介在神経細胞のサブタイプ (小型 Kenyon 細胞) 選択的に発現する新規遺伝子、*Ks-1* を同定している。本研究で私は、この *Ks-1* の転写産物が、非翻訳性核内 RNA であることを明らかにした。さらにミツバチ脳の cDNA データベースから新たな非翻訳性核内 RNA 遺伝子の候補を検索した結果、*AncR-1* を同定した。これらは、組織/器官特異的に発現する新しいタイプの非翻訳性核内 RNA で有り、RNA の新たな分子機能を提唱するものである。

第一章では *Ks-1* について詳細な発現解析と cDNA クローニングを行った。まず、働き蜂脳切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、*Ks-1* がミツバチ脳の

キノコ体以外の領域、及び食道下神経節においても、一部の神経細胞に限局して発現することが分かった。女王蜂、及び雄蜂においても、*Ks-1* はキノコ体小型 Kenyon 細胞と他の脳領野の一部の神経細胞に限局した発現が認められ、カーストや性差による大きな発現パターンの違いはなかった。働き蜂体内での *Ks-1* の発現分布を調べるために RT-PCR を行った結果、*Ks-1* は頭部、特に脳のキノコ体に強く発現しており、その脳機能との関連が強く示唆された。続いて cDNA クローニングを行った結果、最終的に 5'末端を含む 17.5kb の *Ks-1* コンセンサス cDNA を同定した。しかしながら、その配列中には長い ORF が認められず、*Ks-1* がタンパク質をコードしている可能性は低いと考えられた。このことは、コンセンサス cDNA 中に見出される、200bp 以上の長さの ORF の内で、最も翻訳される可能性が高いと考えられた 5'末端側に位置する ORF が、近縁種であるトウヨウミツバチの *Ks-1* cDNA 中では保存されていなかったことから支持される。一方で *Ks-1* の塩基配列はミツバチ種間でよく保存されていた。更に、*Ks-1* 転写産物の細胞内局在を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションにより調べたところ、*Ks-1* 転写産物は神経細胞内で核に点状に局在しており、その局在点の数は *Ks-1* を発現する神経細胞の種類によって異なっていた。従って、*Ks-1* は神経細胞の核内で機能する、新規な非翻訳性 RNA をコードすることが強く示唆された。また、*Ks-1* 転写産物の核内での局在箇所を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いてより詳細に解析した結果、局在点の幾つかは *Ks-1* 遺伝子座とは離れた位置にあり、*Ks-1* 転写産物が転写後に核内の別の場所に移動して機能する可能性が示唆された。この結果は、哺乳類の *Xist* RNA やショウジョウバエの *roX* RNA など、既知の非翻訳性核内 RNA で遺伝子量補正に関わる因子群が、転写後にそれらの遺伝子座の近傍に局在するとの知見とは異なっている。よってこれらの結果から、*Ks-1* は全く新しい非翻訳性核内 RNA をコードしており、ミツバチ特有の脳機能に関わる可能性が考えられる。

第二章で私は、*Ks-1* の他にもミツバチの脳機能に関わる非翻訳性核内 RNA 遺伝子が存在する可能性を考え、ミツバチ脳で発現する遺伝子のデータベース中からその候補をスクリーニングした。働き蜂脳切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションにより、転写産物が核内に局在する遺伝子を探索した結果、約 100 個の遺伝子断片の中から一つの候補遺伝子、*AncR-1* を見出した。*AncR-1* は *Ks-1* とは異なり、ミツバチ脳の全ての皮質領域で発現していた。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析の結果でも、*AncR-1* 転写産物が実際に核内に局在することが確認された。このとき、*AncR-1* 転写産物も *Ks-1* 転写産物同様に点状の局在を示したが、両者の核内での局在箇所は異なっており、一つの神経細胞の核内で違う機能を担うことが推測された。次に *AncR-1*

転写産物の構造を知る目的で EST 検索および RACE 法による cDNA クローニングを行い、約 7kb の *AncR-1* cDNA を同定した。その過程で *AncR-1* 転写産物がスプライシング及びポリ(A)付加を受けるといふ、mRNA 様の構造を持つことが判明した。更に *AncR-1* 転写産物は選択的スプライシングを受けており、最も長いバリエント(*AncR-1a*, 6.8kbp)の他に、一部がスプライシングされた 6.7kbp 及び 2.8kbp のバリエント(*AncR-1b* 及び *AncR-1c*)が存在することが分かった。次に、*AncR-1* の転写開始部位を決定するために、*AncR-1* cDNA の上流ゲノム領域の発現をノザンプロット解析により調べたところ、cDNA より上流の配列は発現していなかった。また、ショウジョウバエ SL-II 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、*AncR-1* cDNA の 5'末端上流約 30base の位置にある TATA ボックスがプロモーター活性を持つことが分かり、現在までに同定されている cDNA の 5'末端が転写開始部位であると結論した。以上より全長 *AncR-1* cDNA が単離されたので、その配列中に含まれる ORF を解析したところ、*AncR-1a~c* のどのバリエント cDNA 配列中にも長い ORF は存在せず、また *Ks-1* と同様に、最も翻訳可能性が高いと考えられた 5'末端側に存在する 200bp 以上の ORF は、ミツバチ種間で保存されていなかった。一方で全体的な *AncR-1* の塩基配列はミツバチ種間でよく保存されていた。これらの結果は、*AncR-1* が新規な非翻訳性核内 RNA をコードすることを強く示唆している。

更に、ミツバチ個体内における *AncR-1* の発現領域を知る目的で、まず働き蜂、女王蜂、雄蜂各々の頭部、胸部、腹部における *AncR-1* の発現をノザンプロット解析で調べた結果、女王蜂では全ての部位で発現が認められたのに対し、働き蜂の腹部、雄蜂の頭部では発現が検出されず、*AncR-1* のミツバチ体内での発現パターンはカーストや性によって異なることが示唆された。更に頭部、腹部における *AncR-1* の発現箇所を *in situ* ハイブリダイゼーションにより詳細に調べたところ、働き蜂の頭部では脳以外でも下咽頭腺（ローヤルゼリー等の分泌腺）で発現していた。また腹部においては、女王蜂と雄蜂の生殖器官、働き蜂の脂肪体エノサイトに発現していた。従って、*AncR-1* は脳以外でもミツバチの役割に応じてそれぞれの組織／器官に特異的に発現し、様々な組織／器官の機能に関与する可能性が考えられた。なお、これらの組織／器官における *AncR-1* 転写産物のスプライスバリエントの発現を RT-PCR 法により調べたところ、いずれの組織／器官においても *AncR-1a~c* の 3つのバリエントの存在が示唆され、組織／器官による違いは認められなかった。

さて、cDNA クローニングの過程で得られた幾つかの *AncR-1* 3'RACE 産物の 3'末端には長いポリ(A)配列が見出された。通常ポリ(A)付加を受けた転写産物は速やかに核外へ輸送されるため、この結果は *AncR-1* 転写産物が核内に局在することと矛盾するよ

うに思われた。そこで核内にある *AncR-1* 転写産物が実際にポリ(A)付加を受けているか調べるために、下咽頭腺細胞の核画分から抽出した total RNA を用いて 3'RACE 法を行った結果、先と同様に幾つかの長いポリ(A)配列が付加された産物が得られた。従って、少なくとも一部の *AncR-1* 転写産物はポリ(A)付加を受けてなお、核内に留まることが示唆された。

以上、私は本研究においてミツバチの脳に発現する二つの新規な非翻訳性核内RNA 遺伝子、*Ks-1*と*AncR-1*の同定ならびに解析を行った。既知の非翻訳性核内RNAとしては、哺乳類とショウジョウバエの各々で遺伝子量補正に関わる*Xist* RNAと*roX* RNAが挙げられるが、今回ミツバチで新規に同定された*Ks-1* RNAおよび*AncR-1* RNAはいずれも比較的大きな分子サイズや、*AncR-1* RNAではmRNA様の構造を持つといった点ではこれら因子との類似点が認められる。しかしながら、*Xist*や*roX*が性特異的にすべての体細胞で発現しているのに対し、*Ks-1*は脳内の限られた神経細胞、また*AncR-1*は組織／器官特異的に発現する点で異なっており、核内での点状の局在と合わせて、これらの遺伝子が組織／器官特異的な遺伝子発現に関与する新規な制御因子である可能性が指摘できる。それぞれの組織／器官における実際の生理機能や核局在のメカニズム、他動物種でのホモログの存在の有無など、不明な点は未だに多いが、ミツバチという分子生物学の分野では余り注目されて来なかった動物を用いて新しいRNAの分子機能を提唱した点で、本研究は学術的な意義があるのではないかと考えている。