

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 セイヨウミツバチの脳においてカースト選択的に発現する遺伝子群の 網羅的同定と解析

氏名 白 井 健 一

[序]

社会性昆虫であるセイヨウミツバチのコロニーは、生殖行動に専念する一匹の女王蜂（生殖カースト）とコロニー維持のための様々な仕事に携わる数万匹の働き蜂（労働カースト）、雄蜂から構成されている。女王蜂と働き蜂は、同じ遺伝的背景をもつ雌が示す表現型多型（polyphenism）であり、異なる生理状態や行動様式を有しているが、その制御に関わる分子的基盤は不明である。ミツバチの脳には感覚情報を統合・処理するキノコ体や、様々なホルモンを分泌する神経分泌細胞が存在する。私は修士課程において、ミツバチ脳においてカースト間で発現量の異なる遺伝子を Differential Display 法により検索し、女王蜂の脳に選択的に発現する遺伝子 *QBp-1* (*queen brain-selective protein-1*) を同定した。QBp-1 は哺乳類の Insulin-like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) と相同性を示し、*in vitro* でヒトインスリンとの結合活性を有していた。他の昆虫の IGFBP については卵巣発達促進活性が報告されていることから、QBp-1 は女王蜂特異的な卵巣発達に関わる可能性が考えられた。本研究では QBp-1 遺伝子の発現解析をさらに進めるとともに、大規模な Differential Display 法と cDNA microarray と組み合わせることで、カースト選択的な遺伝子を網羅的に同定したので以下に報告する



図1 ミツバチの女王蜂（中央）とそれを取り囲む働き蜂（周囲）

## 1. QBp-1 遺伝子の発現解析

これまでに QBp-1 の ORF 領域をプローブとした *in situ* hybridization 法により、QBp-1 遺伝子が神経分泌細胞に発現することを示している。しかしながら 3' 非翻訳領域に対応するプローブを用いた *in situ* hybridization 法を行うと、シグナルはキノコ体選択的に検出された (図 2A、B)。ミツバチゲノム中に QBp-1 遺伝子は単一コピー存在する。そのため ORF 領域と 3' 非翻訳領域が異なるスプライズバリエーションとして存在する可能性を考えて、両者にまたがる RT-PCR と、ORF 領域から 3'-RACE 法を、3' 非翻訳領域から 5'-RACE 法をそれぞれ行なったが、得られた RT-PCR 産物と、RACE 産物は全て ORF 領域と 3' 非翻訳領域が続いた形になっていた。また QBp-1 の ORF 領域に対応するプローブを用いて女王蜂、働き蜂の脳由来 RNA に対してノザンプロット法を行ったところ、3' 非翻訳領域をプローブとしたときと同様に約 1.5kb の位置にシグナルが女王蜂選択的に検出された (図 2C)。これらの結果は、女王蜂の脳で発現している *QBp-1* 転写産物は単一であることを示唆しており、ORF と 3' 非翻訳領域での *in situ* hybridization の結果の違いはそれぞれ、神経分泌細胞とキノコ体における *QBp-1* 転写産物の存在様式の違いを反映する可能性が考えられた。

## 2. Differential Display 法と cDNA マイクロアレイ を用いたカースト選択的に発現する遺伝子の網羅的同定と発現解析

これまでの研究から QBp-1 は卵巣発達を制御するホルモンであると予想されたが、脳機能に関わる候補因子は未だ同定されていない。そこで Differential Display 法による大規模スクリーニングを行った。216 通りのプライマー対を用いて約 10000 本のバンドを比較したところ、カースト選択的なバンドが 531 本を得られた。Differential Display

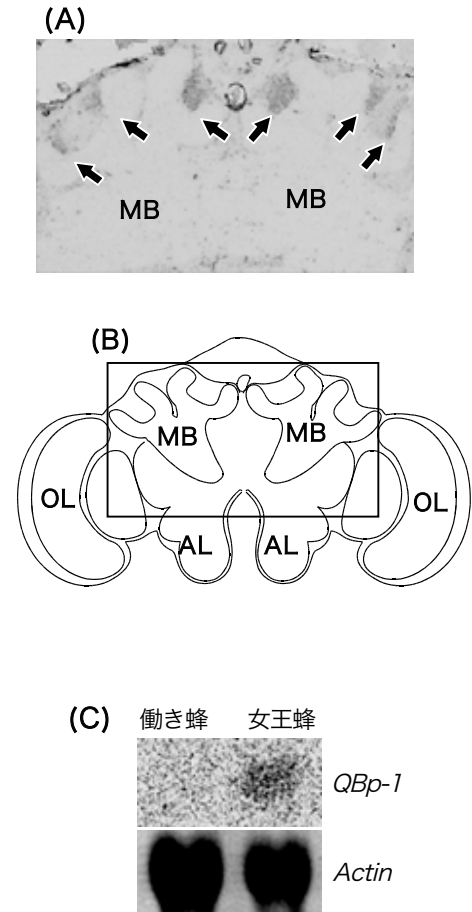


図 2 (A) 3'非翻訳領域に対応するプローブを用いた *in situ* hybridization。矢印は発現部位を示す。(B) ミツバチ脳の模式図。枠は (A) に示す領域を表す。MB:キノコ体、OL:視葉、AL:触角葉 (C) ORF 領域に対応するプローブを用いたノザンプロット解析

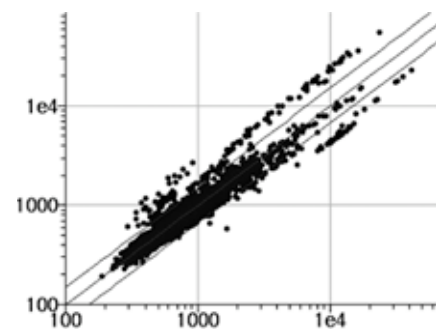


図 3 cDNA microarray 法の結果。縦軸は女王蜂での発現強度、横軸は働き蜂での発現強度を示す。対角線は上から、働き蜂より女王蜂で 1.5、1、1/1.5 倍、発現が強いことを示す。

法の結果には偽陽性が含まれるため、バンドに含まれる候補遺伝子断片全てをスポットした cDNA マイクロアレイを作製し、カースト選択的な発現を確認することにした。まず候補バンドをゲルから切り出し、目的遺伝子断片のクローニングを行った結果、約 73 % にあたる 391 種類の候補バンドについてクローニングに成功した。続いて、一つのコロニーから 6 つのサブクローンを選択し、それら全てをスライドガラスにスポットした。作製した cDNA マイクロアレイに対して女王蜂と働き蜂の脳から抽出した total RNA を用いて 4 回、独立にハイブリダイゼーションを行った。その結果、110 個のコロニーがカースト選択的に検出された (図 3)。シーケンス解析の結果、QBp-1 遺伝子を含めて女王蜂選択的に発現する遺伝子が 4 種類、働き蜂選択的に発現する遺伝子 2 種類が同定された (表 1)。

このうち、後の解析により、神経組織以外の組織で強く発現することが示された Vitellogenin (卵黄タンパク質) と、働き蜂選択的な発現が再現されなかった 18S rRNA は候補から外した。その結果、最終的に女王蜂選択的に発現する遺伝子として GB10339 と GB16101 を同定した。データベース解析の結果、GB10339 は哺乳類の  $\alpha$ -crystallin とアミノ酸配列上約 40% の相同性を有していた。 $\alpha$ -crystallin はもともと哺乳類のレンズの構成タンパク質として同定された遺伝子であるが、その後低分子量熱ショックタンパク質 (sHsp) としてシャペロン活性を持つことが知られている。一方、GB16101 については推定上の遺伝子としてショウジョウバエホモログ遺伝子が同定されているが、いずれも機能不明で構造上の特徴も見つからなかった。

次に、女王蜂選択的に発現する遺伝子について、カースト選択的な発現をノザンプロット法によって確認した。その結果  $\alpha$ -crystallin 遺伝子 (GB10339) と GB16101 はそれぞれ女王蜂選択的に発現することが確認された (図 4)。また、*in situ* hybridization 法により女王蜂の脳内での発現部位を解析した。

女王蜂選択的遺伝子	タンパク質	スポット (数)	シグナル比 (女王蜂/働き蜂)
GB10339	QBp-1	20	2.30
GB13999	$\alpha$ -crystallin	45	2.05
GB16101	vitellogenin	12	2.36
GB16101	機能未知	3	2.00

働き蜂選択的遺伝子	タンパク質	スポット (数)	シグナル比 (女王蜂/働き蜂)
GB14996	18S rRNA	27	0.48
GB14996	機能未知	3	0.62

表 1 cDNA microarray 法によりカースト選択的に発現が検出された遺伝子。

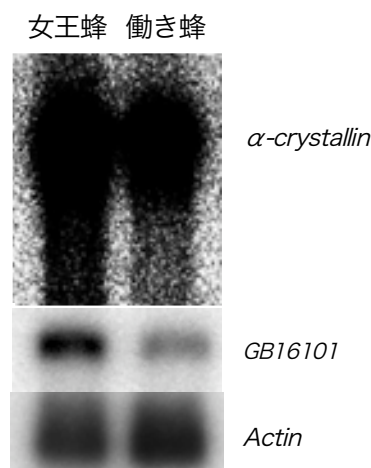


図 4 ノザンプロット法による女王蜂、働き蜂の脳における発現量の比較

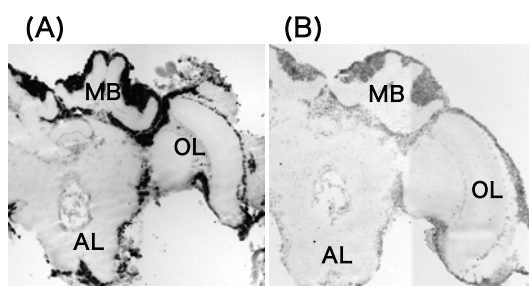


図 5 *In situ* hybridization による女王蜂脳内の (A)  $\alpha$ -crystallin 遺伝子、(B) GB16101 の発現部位の同定。MB:キノコ体、OL:視葉、AL:触覚葉

その結果、 $\alpha$ -crystallin 遺伝子、GB16101 とも脳の皮質全体で発現することが分かった (図 5)。

### 3. $\alpha$ -crystallin のシャペロン活性の検討

先に同定したミツバチ  $\alpha$ -crystallin は crystallin ドメインと呼ばれる sHsp によく保存された領域を持っている。そこで GB10339 遺伝子産物が実際に分子シャペロンとして機能するか確かめる目的で、*in vitro* においてインスリンを基質にした系でシャペロン活性を測定した。N 末端に His-tag を融合させたリコンビナントミツバチ  $\alpha$ -crystallin を作製し、ニッケルカラムで精製した。活性測定の結果、

このリコンビナント  $\alpha$ -crystallin は、ウシ  $\alpha$ -crystallin と同様に、インスリンを DTT 添加による還元により変性させることで生じる濁度の上昇を濃度依存的に防ぐことが示された (図 6)。一方、negative control であるウシ histone H1 を添加した場合には、このような効果は認められなかった。このことはミツバチ  $\alpha$ -crystallin がシャペロン活性を有することを示唆している。昆虫の  $\alpha$ -crystallin が実際にシャペロン活性を持つのを示したのはこれが初めての例である。

#### [まとめと考察]

本研究で私は、女王蜂の脳では単一の *QBp-1* 転写産物が存在すると考えられるにも関わらず、*in situ* hybridization 法では ORF 領域については神経分泌細胞に、3' 非翻訳領域についてはキノコ体にシグナルが検出されることを見いだした。これについては神経分泌細胞とキノコ体における 3' 非翻訳領域と ORF 領域へのプローブの結合を妨げるような *QBp-1* 転写産物の存在様式の違いを反映している可能性を考えている。例えば神経分泌細胞では 3' 非翻訳領域、キノコ体では ORF 領域がアンチセンス RNA によってマスクされるといった転写後制御機構が存在するのかもしれない。

また今回、Differential Display 法と cDNA マイクロアレイを組み合わせる方法を用いて、新たに女王蜂選択的に発現する遺伝子として *GB10339* と *GB16101* を同定した。*GB10339* は  $\alpha$ -crystallin のミツバチホモログであり、その遺伝子産物は *in vitro* でシャペロン活性を持つことを示した。哺乳類において  $\alpha$ -crystallin などの分子シャペロンは神経細胞内でストレスや老化で生じた不溶性タンパク質の除去に働き、ポリグルタミン病などの神経疾患に関与することが示唆されている。働き蜂の寿命は通常約 2 ヶ月であるのに対し、女王蜂は数年の間生き続け、産卵する。女王蜂で  $\alpha$ -crystallin が強く発現することで脳内のタンパク質が安定化され、脳機能が維持されるのかもしれない。また、*GB16101* は、カーブ選択的な脳機能に関与する新規遺伝子と期待される。以上、本研究はミツバチの脳でカーブ選択的に発現する遺伝子を網羅的に解析した初めての例であり、今回同定した遺伝子群の解析を通じて、動物の表現型多型の分子基盤の解明につながることを期待される。

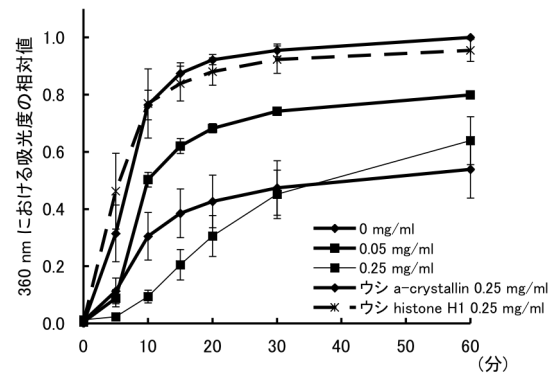


図 6 ミツバチの  $\alpha$ -crystallin のシャペロン活性