

審査の結果の要旨

氏名 白井健一

社会性昆虫であるセイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) の雌は、生殖行動を行う女王蜂 (生殖カースト) とコロニー維持のための仕事に携わる働き蜂 (労働カースト) にカースト分化する。社会性昆虫におけるカースト分化は、同じ遺伝的背景を持つ動物が不連続な二相性の生理状態や行動様式を示すポリフェニズム (polyphenism) の典型であるが、その分子の基盤には不明な点が多い。申請者は修士課程において、ミツバチの脳でカーストにより発現量が異なる遺伝子を 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*) を同定している。*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もつことが示された。蚊やバッタではインスリンや IGFBP が卵巣発達促進活性をもつことから、*QBp-1* はインスリンと協調的に女王蜂における卵巣発達に関わる可能性が考えられた。本研究では *QBp-1* の発現解析をさらに進めるとともに、differential display 法と cDNA microarray を組み合わせることにより、カースト選択的に脳で発現する遺伝子を網羅的に検索した結果を報告している。

QBp-1 については、ORF 領域をプローブとした *in situ* hybridization 法により、女王蜂の脳の神経分泌細胞に限局して発現することが示されている。しかしながら今回、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ることが分かった。この原因を探るべく、女王蜂の脳由来の RNA を用いて ORF 領域と 3'非翻訳領域にまたがる RT-PCR 法や 3'、および 5'-RACE 法を行ったが、全て両者がつながった形の配列が得られた。また *QBp-1* の ORF 領域と 3'非翻訳領域に対応するプローブを用いてノザンプロット法を行ったところ、ともに約 1.5kb のバンドが女王蜂の脳に選択的に検出された。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強く示唆しており、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。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 や RNA 結合タンパク質によりマスクされるといった、新しい RNA 発現制御機構が存在する可能性が指摘されている。

続いて、differential display 法と cDNA microarray を組み合わせることで、女王蜂の脳に選択的に発現する遺伝子を網羅的に検索している。まず、differential display 法の結果得られた 391 種類の候補バンドについて、一つのバンドから 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することで cDNA マイクロアレイを作成した。女王蜂と働き蜂の脳から抽出した total RNA を用いてハイブリダイゼーションを行った結果、最終的に *QBp-1* 遺伝子を含めて女王蜂選択的に発現する遺伝子を 4 つ、働き蜂選択的に発現する遺伝子を 2 つ同定し、このうち、女王蜂選択的に発現する *GB10339* と *GB16101* について解析が進められた。データベース解析の結果、*GB10339* は哺乳類の ζ -crystallin とアミノ酸配列上で約 40% の相同性を有していた。 ζ -crystallin は哺乳類のレンズの構成タンパク質として同定されたが、

その後低分子量熱ショックタンパク質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* についてはショウジョウバエでホモログ遺伝子が推定されていたが、機能不明で構造上の特徴も見つからなかった。ノザンプロット法の結果、 α -crystallin 遺伝子 (*GB10339*) と *GB16101* はともに女王蜂選択的に発現すること、また *in situ* hybridization 法の結果、両者はともに脳の皮質全体で発現することが示された。

先に同定したミツバチ α -crystallin は crystallin ドメインと呼ばれる低分子熱ショックタンパク質によく保存された領域を持っていたが、昆虫の α -crystallin がシャペロン活性を持つかは分かっていなかった。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、リコンビナントミツバチ α -crystallin を作成し、*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。その結果ミツバチ α -crystallin は、ウシ α -crystallin と同様に、インスリンを DTT により還元、変性させることで生じる溶液の濁度上昇を防ぐことが示された。一方、negative control としてウシ 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 α -crystallin が実際にシャペロン活性を有することを示している。哺乳類において α -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わ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 α -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。一方、*GB16101* はカーブト選択的な脳機能に関わる新規遺伝子であると考えられた。

以上、本研究ではポリフェニズムを示す動物としては初めて、ミツバチにおいて脳でカーブト選択的に発現する遺伝子の網羅的な検索が行われ、2 遺伝子の同定と解析がなされている。本研究は動物生理学、神経分子生物学の分野に寄与する点があり、博士（薬学）の授与に値すると認めた。