

## 論文内容の要旨

### 論文題目

#### Analysis of gene expression profile in the brain and physiologic state of European honeybee workers in queenless colonies

(女王蜂除去群におけるセイヨウミツバチ働き蜂の脳での遺伝子発現と生理状態の解析)

氏名 中岡 貴義

多くの動物は社会を構成することで採餌効率、繁殖機会、子育て時の安全性などを向上させるとともに、外敵による捕食の危険性を減らすことで、適応度(個体あたりの繁殖可能齢に達する子供の数)を上昇させている。その一方で、自らの適応度を犠牲にして他個体の適応度の上昇に貢献する「利他行動」も、しばしば動物社会の中で観察されるが、そのような利他行動に関わる分子・神経基盤については不明な点が多い。セイヨウミツバチ(*Apis mellifera* L.)はコロニーを形成して生活する社会性昆虫であり、雌は女王蜂(生殖カースト)か働き蜂(労働カースト)に分化する。女王蜂は発達した卵巣を持ち、産卵に専念するが、働き蜂は成虫でも卵巣が成熟せず、コロニー維持のための労働を行う。働き蜂は羽化後の日齢に伴い育児から採餌へと分業移行し、その際、分業に応じて下咽頭腺(頭部外分泌腺)の形態・機能が変化する。育児蜂は発達した下咽頭腺を持ち、幼虫や女王蜂の餌となる major royal jelly proteins (MRJPs)を主に合成するが、採餌蜂では組織が退縮し、花蜜をハチミツに加工する糖代謝酵素が主に合成されるようになる。通常、働き蜂は女王フェロモンの影響で卵巣発達が抑制され、自らは産卵をすることなくコロニーのために労働を行うことから利他行動の典型例とされている。しかし、女王蜂不在下ではその制御が解除されて、卵巣が発達して産卵を行うようになる。このように女王蜂不在によって引き起こされる、働き

蜂の「利他」から「利己」への行動転換については、生態学的には古くから知られていたものの、それを制御する分子基盤はまったく不明であった。私は修士過程において、そのような行動の変化が起きる時期に着目し、女王蜂除去後に働き蜂脳内で発現変動する遺伝子を **Differential Display** 法を用いて探索した。博士課程では、**cDNA** マイクロアレイ法を用いてさらなる遺伝子スクリーニングを行うとともに、産卵を行うようになった働き蜂(産卵働き蜂)の生理状態、特に脳と末梢(下咽頭腺、体液)における組織形態、遺伝子/タンパク質発現の変化について解析を行った。

コロニーから女王蜂がいなくなると、残された働き蜂は若い幼虫をコロニー内から探し出し、ローヤルゼリーを与えて新しい女王蜂の育成を行う。しかし、若い幼虫しか女王蜂へ分化する能力を持たないため、コロニー内からそのような若い幼虫がない場合には、女王蜂新生をやめ、働き蜂は卵巣を発達させて産卵を始める。女王蜂除去後1週間ほどたつと若い幼虫がいなくなるため、この時期に働き蜂では利他から利己への行動変化が開始すると考えられる。そこで、行動転換期の脳機能の変化に関わる遺伝子候補として、女王蜂除去後、4、7、10 日後に働き蜂脳内で発現変動する遺伝子の網羅的探索を行った。女王蜂存在群から採取した同日齢の働き蜂を対照群として、遺伝子発現を比較した(図1)。全脳から **total RNA**を抽出し、脳由来の遺伝子クローン約 5,200 個がスポットされたチップを用いた **cDNA** マイクロアレイ法により、女王蜂除去群と女王蜂存在群との間で発現量に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。働き蜂の採取はコロニーと時期を変えて独立に3回行い、3ロットのうち2ロット以上で 1.3 倍以上の発現量差を示したスポットを候補遺伝子とした。その結果、女王蜂除去群の働き蜂脳内で発現量の高い遺伝子候補として、グルタミン合成酵素(**LOC727342**)、**vitellogenin-like lipoprotein(LOC408696)** の遺伝子、また、女王蜂除去群で発現量の低い遺伝子候補として **$\alpha$ -crystallin(LOC400857)**、**HSP70(LOC409418)**の遺伝子を同定した。このうち、グルタミン合成酵素遺伝子は修士課程におけるスクリーニングでも同定されている。これらの候補遺伝子について定量的 **RT-PCR** 法による発現解析を行ったところ、 **$\alpha$ -crystallin** では、女王蜂除去後7日で3つのロットすべてにおいて女王蜂除去群での発現量が女王蜂存在群の 0.8 倍以下であった(図2A)。グルタミン合成酵素遺伝子は、全9サンプル(女王蜂除去後4、7、10 日×3ロット)のうち6サンプルにおいて、女王蜂除去群での発現量が、女王蜂存在群の 1.2 倍以上であった。また、**vitellogenin-like lipoprotein** は、ロット1、2において4、7、10 日後いずれのサンプルにおいても 1.5 倍以上の発現量を示した(図2B)。**HSP70**については、1.2倍以上あるいは0.8倍以下の発現変動は認められなかった。以上の結果は、女王蜂除去により、働き蜂脳での遺伝子発現プロファイルが変化することを示唆している。グルタミン合成酵素は、神経伝達物質であるグルタミン酸の合成に関わり、 **$\alpha$ -crystallin** には神経保護作用が知られている。**vitellogenin-like lipoprotein** は他生物種において相同性の高い遺伝子が見出せず、脳での機能は不明である。女王蜂除去により、女王フェロモンを感受しなくなったことで、一部の脳領野でこれらの遺伝子発現が変化し、産卵行動型の神経回路が形成される可能性が考えられる。*in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学により、これらの遺伝子が発現変動する領野が同定されれば、ミツバチ働き蜂の利他行動を制御する脳領野の同定につながることを期待される。

女王蜂除去群においては、女王蜂除去後、約2-3週間で働き蜂による産卵が始まる。従来の研究では、産卵働き蜂の生理状態について女王蜂との比較をなされることが多かったが、本研究では、働き蜂間の分業に深く関わる下咽頭腺の生理状態と体液中のビテロジェニン量について解析を行い、産卵働き蜂の生理状態は育児蜂と採餌蜂のどちらに類似しているかという点に注目した。まず、女王蜂存在群から育児蜂、採餌蜂を12匹ずつ採取し、下咽頭腺および卵巣の発達度を測定したところ、下咽頭腺の房の直径はそれぞれ、 $155 \pm 4.6$ 、 $107 \pm 4.0 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  S.E.M.)であり、卵巣小管の直径はそれぞれ、 $103 \pm 5.7$ 、 $99 \pm 5.0 \mu\text{m}$ であった。次に、女王蜂除去群の働き蜂を無作為に採取し(n=52)、同様に下咽頭腺の形態と卵巣の発達度の相関を調べた。女王蜂存在群の働き蜂では(平均値+標準偏差 x 2)は $143 \mu\text{m}$ となることから、それより大きな卵巣小管を持つ個体を産卵働き蜂と定義したところ、52匹中28匹が産卵働き蜂であった(育児蜂、採餌蜂では24匹中0匹)。その下咽頭腺の房の直径は $140 \pm 3.8 \mu\text{m}$ であり、採餌蜂のものに比べ有意に大きかったが( $p < 0.01$ )、育児蜂と比べて有意差は認められなかった(図3)ことから、産卵働き蜂の下咽頭腺は形態的には育児蜂型であることが示された。次に機能面での類似性を検証するため下咽頭腺タンパク質について SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によりバンドパターンを比較したところ、産卵働き蜂は育児蜂に似たパターンを示し、さらに抗 MRJP 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、産卵働き蜂は育児蜂同様に MRJP を発現していることが判明した。育児蜂は不妊性であるにもかかわらず、体液中に卵黄前駆タンパク質であるビテロジェニン(Vg)を多く含み、採餌蜂ではその含量が低下することが知られている。そこで、女王蜂除去群の働き蜂について卵巣の発達度と体液中の Vg 濃度の相関を調べたところ、産卵働き蜂では、育児蜂と同等かそれ以上の Vg 濃度を持つことが明らかになった。以上のことから、産卵働き蜂は採餌蜂型よりも育児蜂型に近い生理状態を持つことが示された。また、Vg 濃度と下咽頭腺のサイズにも正の相関が見られ、これらのことから卵巣発達度、下咽頭腺の生理状態、体液中の Vg 濃度調節について共通の制御機構の存在が示唆された。ハチ目では、単独性のカリバチ類から、高度な真社会性を有するミツバチまで、多様な社会性が観察される。マルハナバチなどの単年性の社会性ハチ類では、巣の創設期には新女王蜂が単独で営巣、産卵、採餌、育児のすべての作業を行うが、働き蜂が羽化すると採餌を働き蜂に任せようになり、女王蜂は産卵と育児を継続する。ミツバチの女王蜂は産卵以外の巣内の労働は一切行わないことから、ミツバチの産卵働き蜂の行動や生理状態は、ミツバチの女王蜂よりも単年性のハチの女王蜂に近いのではないかと考えられる。ミツバチでは女王蜂によって、そのような行動が制御されており、その分子・神経基盤は進化的な面からも興味深い。

本研究は、ミツバチ働き蜂が利他から利己へ行動変容していく際の脳での遺伝子発現を解析するとともに、産卵働き蜂が女王蜂と育児蜂の生理状態を併せ持つことを示した初めての例である。今後、女王蜂除去後に働き蜂の脳で発現変動する遺伝子の機能解析や女王フェロモンへの応答、脳と末梢との相互作用を解析することで、働き蜂の生殖生理の制御機構、ひいては利他行動に関する分子・神経基盤の解明につながると考えている。また、ミツバチとは異なる社会性を持つハチ類や、ハチ以外の動物種との比較により、様々な動物が見せる利他行動の進化的起源が明らかになっていくことも期待される。

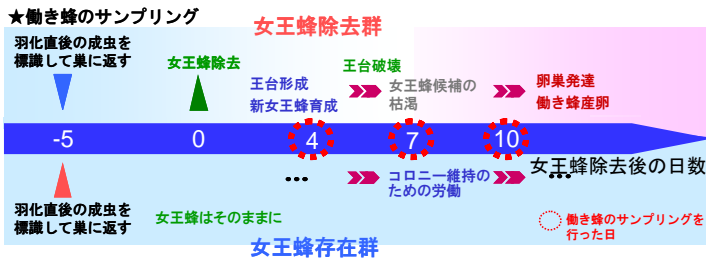


図1 サンプリングのデザイン  
女王蜂除去後4、7、10日後に女王蜂除去群と存在群から同日齢の働き蜂を採取した。

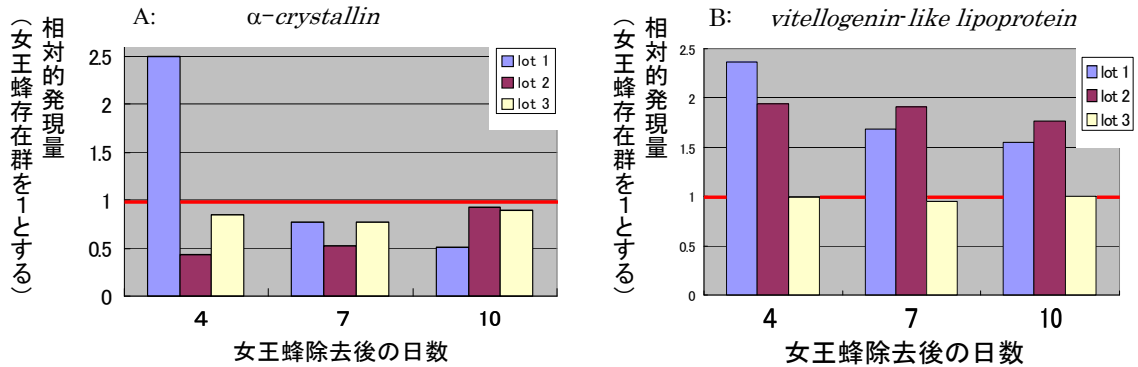


図2 定量的 RT-PCR A:  $\alpha$ -crystallin B: vitellogenin-like lipoprotein

女王蜂除去群において  $\alpha$ -crystallin では発現低下、vitellogenin-like lipoprotein では発現上昇の傾向が見られた。

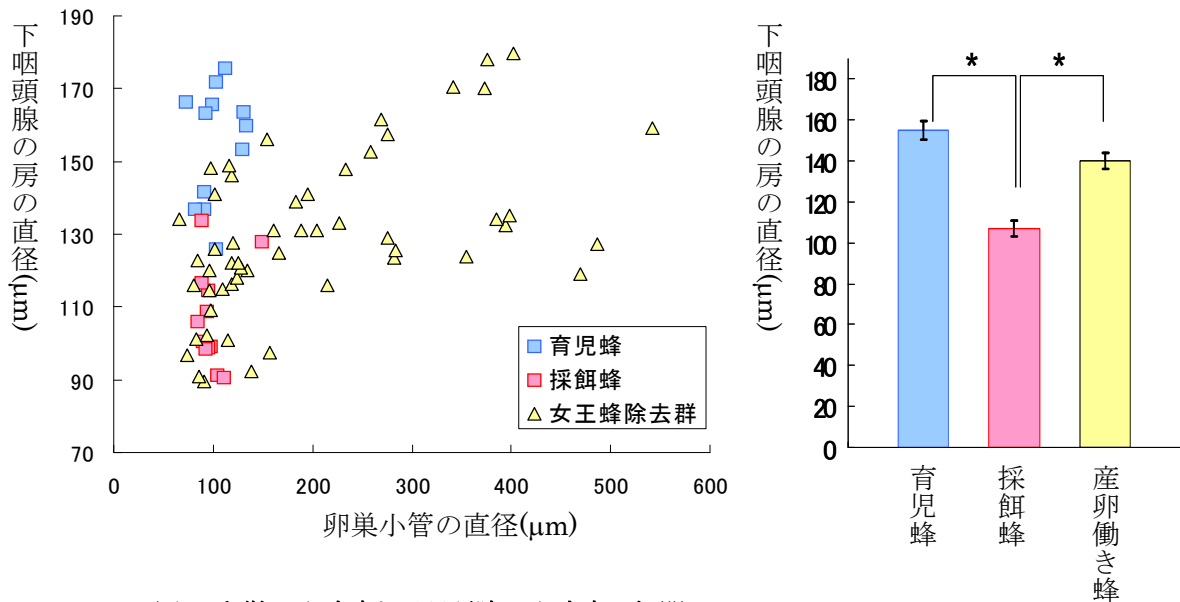


図3 卵巣の発達度と下咽頭腺の発達度の相関

女王蜂存在群の育児蜂、採餌蜂、女王蜂除去群の産卵働き蜂(卵巣小管の直径 $>150\mu\text{m}$ )の下咽頭腺の房の直径はそれぞれ、 $155 \pm 4.6$ 、 $107 \pm 4.0$ 、 $140 \pm 3.8\mu\text{m}$  (mean  $\pm$  S.E.M.)であり、産卵働き蜂の下咽頭腺は、採餌蜂のものに比べ、有意に大きかった( $P < 0.01$ )。