

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Study of mushroom body-preferential expression of genes/proteins for juvenile hormone metabolism and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release in honeybee brain

(ミツバチ脳における幼若ホルモン代謝と小胞体カルシウム放出に関わる  
遺伝子・タンパク質のキノコ体選択的な発現に関する研究)

氏名 宇野 佑子

動物は進化の過程で環境に適応するために様々な行動形質を獲得してきた。ヒトを含むいくつかの生物種では、同種個体と社会を形成し仲間とのコミュニケーション能力を発達させることで、他の種よりも有利に環境に適応している例も知られる。このような戦略をとる生物種には、近縁の種と比較して高い記憶・学習能力を獲得している種もあり、これらの生物に着目することで社会性動物がもつ脳の分子的・神経的基盤が明らかになると期待される。

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) は数万匹の個体と集団を形成して生活する社会性昆虫であり、メスは女王蜂（生殖カースト）と働き蜂（労働カースト）に分化する。さらに働き蜂は羽化後の日齢依存的に、幼虫の世話を行う育児から花蜜・花粉を集める採餌へと労働分担をシフトする（齢差分業）。また採餌蜂は、「ダンスコミュニケーション」により餌場の位置を仲間に伝達するなど、高い記憶・学習能力やコミュニケーション能力を有する。ミツバチがこうした特徴的行動様式をもつ背景として、ミツバチ脳では他の昆虫と比較して高次中枢であるキノコ体が、顕著に発達していることが1つの要因と推測されている。キノコ体を構成する介在神経の細胞体（「ケニヨン細胞」）は主に傘の構造の内側に

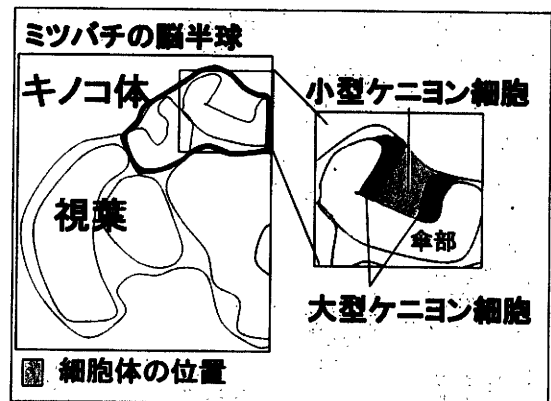


図1 ミツバチの脳の模式図

存在する（図 1）。ケニヨン細胞には細胞体の大きさが異なる「大型」と「小型」の2種類が存在し、それぞれ異なる遺伝子発現プロファイルをもつことが報告されている。また、キノコ体のプロポーシオンが分業に伴い変化することも知られており、キノコ体が社会性行動の制御中枢である可能性も考えられている。これまでキノコ体の機能解析を目的として、ミツバチ脳でキノコ体選択的に発現する遺伝子の解析が進められているが、実際の機能分子であるタンパク質に着目した解析はほとんど行われていない。遺伝子機能は主に転写後に翻訳・プロセッシング・修飾を受けたタンパク質が担う。またその量は、転写・翻訳段階に加え、分解により調節される。そこで私はキノコ体のタンパク質の発現プロファイルに着目することにより、キノコ体の機能の新しい特徴を見いだせるのではないかと考え、キノコ体で発現するタンパク質のプロテオーム解析を行ってきた。

修士課程で私は、キノコ体選択的に発現するタンパク質として幼若ホルモン（JH）の代謝酵素：JH diol kinase（JHDK）を新規に同定した。博士課程では、引続きキノコ体選択的なタンパク質を網羅的に同定するとともに、JHDK をはじめとしたキノコ体選択的なタンパク質をコードする mRNA の発現解析や定量を行った。結果の詳細は以下の通りである。

- 1) キノコ体選択的なタンパク質候補として、JH 合成酵素（Farnesoic acid O-methyltransferase（FAMeT））と、小胞体のカルシウム結合タンパク質であるレティキュロカルビンおよびカルレティキュリンを新たに同定した（表 1）。
- 2) JHDK mRNA の発現解析の結果、JHDK は mRNA の段階からキノコ体、特に大型ケニヨン細胞の一部で選択的に発現していることが示された（図 2）。ミツバチでは働き蜂の分業に伴い体液中の JH 濃度が上昇し、JH の投与が分業を促進することから JH が分業の制御因子と考えられている。しかしながら、JH がどのように分業を制御するかは明らかではなく、この結果はキノコ体の大型ケニヨン細胞の一部が JH の標的器官である可能性を初めて示すものである。さらに JHDK mRNA は採餌蜂のみならず、カーストの異なる女王蜂やオス蜂の大型ケニヨン細胞でも同様のパターンとして検出されることを見出し、カースト差や性差によらず、脳で JH の代謝が起こる可能性を示した。

さらに、JHDK のホモログ（Calexcitin）と結合し、カルシウム放出を促進することが知られる小胞体のカルシウムチャネル、リアノジン受容体 mRNA についても脳での発現部位を調べたところ、JHDK 同様にキノコ体の大型ケニヨン細胞選択的に検出された（図 3）。

- 3) mRNA の発現解析の結果、FAMeT やレティキュロカルビンの mRNA がそれぞれキノコ体の近傍（図 4）やキノコ体の大型ケニヨン細胞（図 5）で発現していることを示した。一方で、カルレティキュリン mRNA のキノコ体を含む脳の広範な領域での発現が検出された（図 6）。次に抗ヒトカルレティキュリン抗血清を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、キノコ体特異的なスポットが観察された（図 7）。また定量的 RT-PCR 法による mRNA の定量の結果でも、視葉に比べてキノコ体で有意に強い発現が検出された。
- 4) リアノジン受容体やレティキュロカルビンといった小胞体に局在するカルシウム放出・貯留

に関与すると考えられるタンパク質がキノコ体で発現亢進していることを考えると、キノコ体の小胞体では、カルシウム放出・貯留に関わる機能のみが発達している可能性が考えられる。しかしながらキノコ体は他の脳領域に比べて小胞体密度や発達が異なる可能性も考えられる。そこで次に小胞体局在因子のいくつかについて、キノコ体と視葉での遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法により比較して、上記仮説の検討を行った。その結果、カルシウム貯留・放出に関わる機能を持つリアノジン受容体とレティキュロカルビンの発現は有意にキノコ体で亢進していることが示された一方で、カルシウムとは直接関連しない機能を持つ因子 (Protein disulfide isomerase, Sec61, ERP60) に関しては有意なキノコ体選択性は検出されなかった。以上のことから、キノコ体では他の領域と比較して、カルシウム放出・貯留能を亢進した小胞体を持つと考えられる。

本研究で私は、ミツバチ脳のプロテオーム解析と得られた因子の発現解析を通じて、ミツバチのキノコ体で JH の代謝が起きる可能性、キノコ体では小胞体のカルシウム放出・貯留機能が亢進している可能性を初めて示した。特にミツバチの行動を制御する JH の代謝酵素やカルシウム情報伝達系が、ともに大型ケニヨン細胞で亢進していることはミツバチの脳の中で大型ケニヨン細胞が特殊な細胞個性を持つことを示しており、昆虫の脳機能の進化を考える上で興味深い (図 8)。

キノコ体		視葉	MW	pI	Honeybee	Blast search	MW	pI	match	cover	推定されるタンパク質の機能
#1			45k	酸性	cAMP-dependent protein kinase type II regulatory chain		43.9 k	4.85	10	25%	タンパク質のリン酸化 (キノコ体での発現が報告済み(Müller 1999))
#2			25k	酸性	similar to ENSANGP00000020907	Juvenile hormone diol kinase (JHDK)	21.5 k	4.79	4	4%	幼若ホルモン(JH)代謝酵素
#3			42k	酸性	similar to CG10527-PA	Farnesic acid O-methyltransferase (FAMeT)	27.9 k	4.5	5	18%	JH(またはJHアナログ)合成酵素
#4			60k	酸性	similar to CG31650-PC, isoform C	Reticulocalbin	38.0 k	4.42	8	41%	Ca <sup>2+</sup> 結合タンパク質 (小胞体に局在)
#5			60k	酸性	similar to Calreticulin CG9429-PA isoform 1	Calreticulin	47.7 k	4.46	8	35%	

表 1 LC-MS/MS とデータベースを用いたキノコ体選択的なタンパク質の推定  
キノコ体選択的に得られたスポットの、二次元電気泳動結果と、データベース (NCBI) 上の情報を比較した。MW: 分子量、pI: 等電点、match: マッチしたペプチド断片の数、cover: 全アミノ酸配列のうち、同定したアミノ酸残基数 (%)

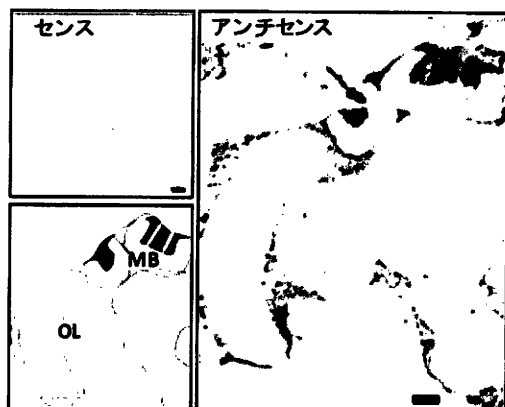


図2 *jhdk* の発現解析 DIG 標識した *jhdk* のアンチセンス/センス RNA プローブをハイブリダイズさせた採餌蜂の脳切片。Bar は 100µm を示す。

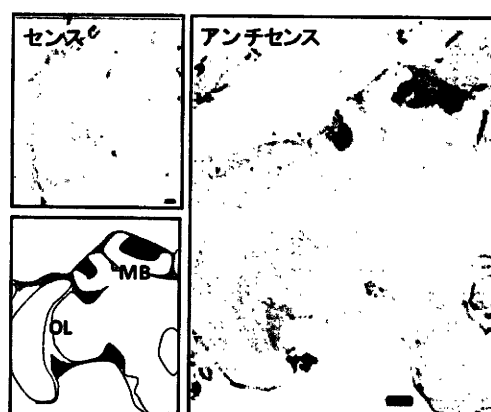


図3 リアノジン受容体 mRNA の発現解析 DIG 標識した アンチセンス/センス RNA プローブをハイブリダイズさせた採餌蜂の脳切片。Bar は100µm を示す。

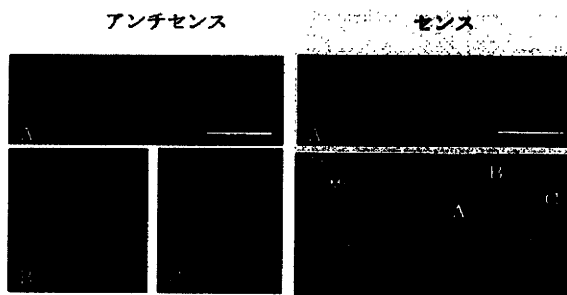


図4 *famet* の発現解析 (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) DIG 標識した *famet* のアンチセンス(A-C)/センス (A') RNA プローブをハイブリダイズさせた採餌蜂の脳切片. (D) それぞれの写真の位置を示す. Bar は100 $\mu$ m を示す。

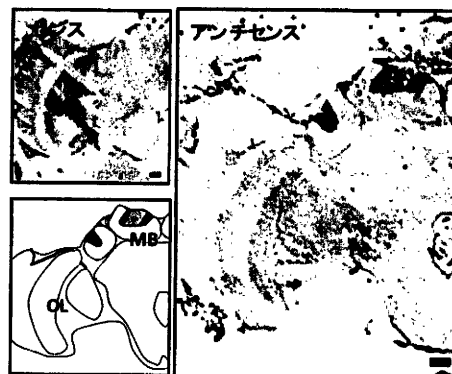


図5 レティキュロカルビン mRNA の発現解析 DIG 標識した アンチセンス/センス RNA プローブをハイブリダイズさせた採餌蜂の脳切片. Bar は100 $\mu$ m を示す。

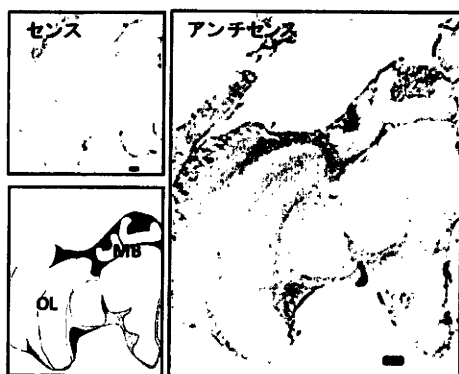


図6 カルレティキュリン mRNA の発現解析 DIG 標識した アンチセンス/センス RNA プローブをハイブリダイズさせた採餌蜂の脳切片. Bar は 100 $\mu$ m を示す。

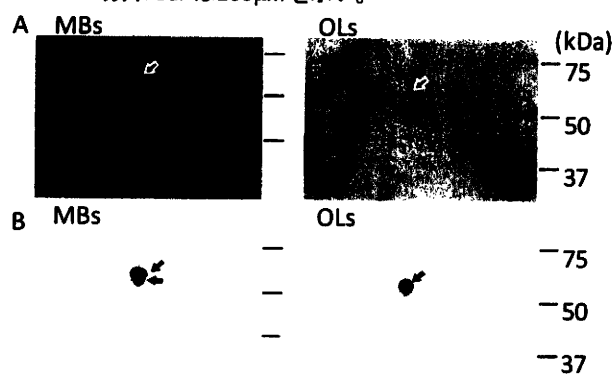


図7 カルレティキュリン抗血清によるイムノブロット (A)二次元電気泳動後、PVDF 膜に転写し、アミドブラックで染色した膜。(B)イムノブロットの結果。カルレティキュリンを赤矢印で示す。

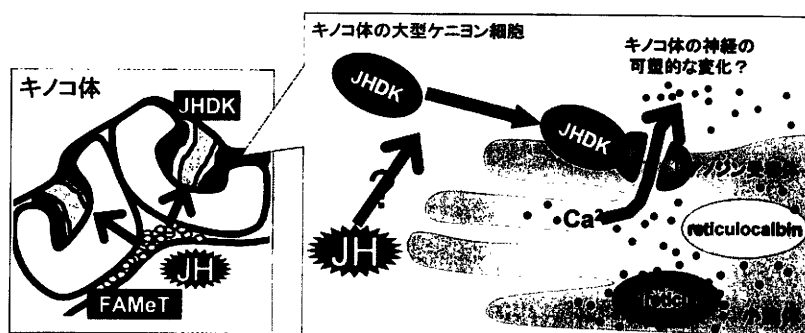


図8 ミツバチのキノコ体大型ケニオン細胞における JH とカルシウム情報伝達系カスケードの模式図

キノコ体では JH の代謝酵素が亢進し、さらにその近傍で JH の合成が起こるため、キノコ体自体が JH の標的器官の 1 つとなっている可能性がある。さらにキノコ体の中でも大型ケニオン細胞内では、JHDK をはじめとしたカルシウム情報伝達系の因子の亢進が起っており、キノコ体の可塑的な変化に寄与していると考えられる。今後 JH とカルシウム情報伝達系の関連を解析することで、ミツバチの社会性と高い記憶学習能力の関わりが明らかになることを期待する。