

論文内容の要旨

論文題目

Analysis of a novel honeybee brain structure based on brain region-preferential gene expression

(脳領野選択的な遺伝子発現パターンに基づくミツバチ脳の新規構造の解析)

氏名 金子 九美

ヒトの脳に見られる「視覚野」や「言語野」のように、動物の脳では多くの領野が機能を分担することで、感覚情報の統合や行動の制御が行われると考えられている。しかし、こうした脳領野が果たす機能の分子的基盤はほとんど不明である。近年、こうした脳の領域に対応して発現する遺伝子や、領域の一部に限局して発現する遺伝子が同定されてきた。これらの遺伝子の解析は、脳における情報処理の分子的基盤の理解や、新しい脳領野の発見に繋がると期待されるが、その研究は未だほとんど進んでいない。

セイヨウミツバチは高度な社会性をもつ昆虫であり、わずか数 μl の小さな脳しかもたないにも関わらず、加齢に応じた分業や、記憶した花の位置を「8の字ダンス」に変換して仲間伝える等の高度な行動を示す。したがって、ミツバチは高次行動を制御する脳機能を調べる上で格好のモデルになると考えられる。ミツバチの脳は、キノコ体（高次中枢）・視葉（視覚中枢）・触角葉（嗅覚中枢）などの領野に区分けできる（図1）。私は、これらの領野で行われる情報処理の仕組みを理解するためには、各領野で限局した発現パターンを示す遺伝子を見出すことが重要ではないかと考え、研究に着手した。

ミツバチの網膜で受容された視覚情報は、視葉を経て一部がキノコ体に投射される（図1）。視葉は視葉板・視髄・視小葉からなる3層構造をとり、各層では動きや色、形など異なる

情報が処理される。一方キノコ体は、細胞体の大きさが異なる大型と小型のケニヨン細胞からなる2層構造をとり(図5A)、様々な感覚情報が処理・統合される。私は、8の字ダンスでは餌場の距離と方向という視覚情報がダンス軸の傾きとテンポに記号化され、伝達されることから、修士課程では視覚中枢である視葉に注目して解析を行った。ミツバチの脳で視葉選択的に発現する遺伝子を網羅的に検索し、その中から視葉の一部に限局して発現する遺伝子の同定を試みた結果、4つの候補遺伝子を得た(図2)。博士課程では、これら遺伝子をより詳細に解析することで、視葉に加え、キノコ体においても、これまで解剖学的には見出されてこなかった新規な構造を同定した。

まず始めに、視葉の単極細胞選択的に発現することを見出していたクローン#1/*futsch*と*tau*の解析を行った。クローン#1は、MAP(microtubule associated protein)ファミリーの1つであるFutschホモログをコードし、同じファミリーに属するTauホモログとともに、視葉の単極細胞で強く発現する(図2A)。ショウジョウバエでは、これらの因子は発生過程において軸索伸長などの神経回路形成に関わるが、ミツバチでも同様の機能をもつか推測するために、神経発達が起きている蛹脳を用いて発現解析を行った。その結果、蛹の発生ステージに関わらず*tau*はキノコ体で分化直後(軸索を伸長する時期)のケニヨン細胞で強く発現していた(図3)。一方、*futsch*はキノコ体を除く蛹のほぼ全脳で発現していた。このことから、TauとFutschはミツバチでも発生過程で軸索の伸長や構造維持に関与する可能性が支持されたが、当初の予想とは異なり、蛹脳ではTauとFutschが神経発達において領野毎に役割分担する可能性が考えられた。働き蜂の脳ではTauとFutschが単極細胞に共発現することから、MAPファミリーは単極細胞の細胞機能に重要であると推察される。

次に、視葉板-視髄の一部に限局して発現するクローン#2/*mesk2*の解析を行った。クローン#2は、RAS/MAPK情報伝達系に関わるショウジョウバエのMESK2(Misexpression Suppressor of dominant-negative KSR 2)ホモログをコードし、働き蜂の視葉板と視髄の間の細胞層で、腹側の一部の神経細胞に限局して発現することを、これまでに示している(図2B)。ミツバチの雄蜂は空中で交尾相手(女王蜂)を探すため、視葉が顕著に発達している。そこで、雄蜂脳での*mesk2*の発現パターンを調べたところ、視葉の大きさの違いにも関わらず、働き蜂と同様に視葉板と視髄の間の、腹側の一部の神経細胞に限局して発現していた(図4)。したがって*mesk2*発現細胞は、蜂の性別や役割によらない基本的な情報処理に関わる可能性がある。また、視葉の前後軸に添って*mesk2*発現細胞が分布することから、これらの細胞群は地上の視覚情報処理に関わる可能性が考えられた。

最後に視葉とキノコ体の一部で選択的に発現するクローン#3の解析を行った。クローン#3はアレスチンドメインを含む新規タンパク質をコードし、視葉全体とキノコ体の一部で発現することを、これまでに示している。蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法による解析の結果、視葉の外側(視葉板-視髄)の層では発現細胞と非発現細胞が混在したが、内側(視髄-視小葉)の層ではほぼ全ての神経細胞で発現していた(図2C)。従って、視葉の神経細胞はこの遺伝子の発現の有無により2種類に区別されると考えられる。

一方、キノコ体では傘の内側で 2 本の縦縞状に発現するという特異な発現パターンを示した (図 2C)。従来、キノコ体は大型と小型の 2 種類のケニヨン細胞から構成されると考えられており (図 5A)、当研究室でも各々のケニヨン細胞に選択的に発現する遺伝子が同定されている。私は、クローン#3 の発現細胞を特定するため、二重蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法により、2 種の既知のキノコ体選択的な遺伝子とクローン#3 との発現比較を行なった。1 つは *CaMKII* (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, リン酸化酵素) で、大型ケニヨン細胞選択的に発現する (図 5G)。もう 1 つは *jhdk* (*juvenile hormone diol kinase*, 幼若ホルモン代謝酵素) で、大型と小型の両方のケニヨン細胞で発現するが、その境界領域 (従来は、大型ケニヨン細胞の一部と推定されていた) での発現が弱いことが報告されている (図 6G)。

その結果、クローン#3 は *CaMKII* の発現領域の内側で発現したが、小型ケニヨン細胞では発現しておらず、クローン#3 の発現細胞は大型ケニヨン細胞ではないことが判明した (図 5)。またクローン#3 は *jhdk* が発現しない大型と小型のケニヨン細胞の境界領域に *jhdk* と相補的に発現した (図 6)。従って、クローン#3 は大型と小型のケニヨン細胞の境界領域に存在する、これまで未知の新規なケニヨン細胞 (細胞体の大きさが大型と小型の間であることから「中間型ケニヨン細胞」と命名した) 選択的に発現することが判明した。さらに、視葉でも *CaMKII* とクローン#3 の発現細胞は重ならなかった (図 7)。以上の結果は、ミツバチのキノコ体は、各々固有な遺伝子発現パターンをもつ 3 種類のケニヨン細胞から構成されること、キノコ体と視葉の双方に遺伝子発現パターンに基づく「モジュール構造」が存在することが示唆された。クローン#3 は細胞内情報伝達に働くと考えられるタンパク質をコードすることから、この遺伝子産物が大型や小型のケニヨン細胞で発現する遺伝子の発現を抑制することで、キノコ体に中間型ケニヨン細胞が生じている可能性がある。また、キノコ体の中間型ケニヨン細胞と視葉の一部の神経細胞に共通してクローン#3 が発現することから、両者が構造・機能的に連絡している可能性も考えられる。なお、同様な *CaMKII* の遺伝子発現パターンは近縁種であるマルハナバチでも観察されたことから、キノコ体の 3 層構造はハナバチ科の昆虫に共通した脳の構造である可能性が考えられた。

本研究は昆虫の脳において、遺伝子発現パターンに基づいた視葉の新しい区画や、キノコ体の中間型ケニヨン細胞、脳のモジュール構造を見出した初めての知見である。特にクローン#3 の発現パターンは、当研究室で初期応答遺伝子 (*kakusei*) を用いて同定されていた、「採餌蜂で活動する脳領域」と重なる可能性があることから、採餌行動に関わる脳機能の解析につながる可能性もある。本研究で同定した遺伝子群は、今後の機能解析等を通して、採餌行動の分子・神経的基盤の解析や、脳のモザイク構造の成因の理解にもつながると期待している。

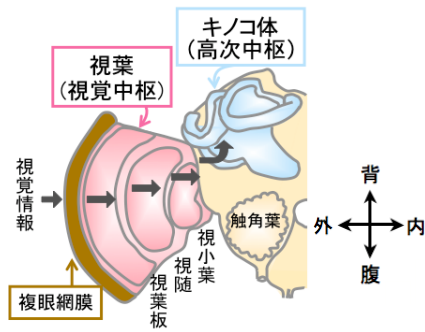


図1 ミツバチ脳 (左半球) の模式図
網膜で受容された視覚情報は矢印のように視葉 (赤) を経てキノコ体 (青) に投射される。視葉は3層構造 (視葉板・視髄・視小葉)、キノコ体は上向きの2つの傘の構造をもつ。

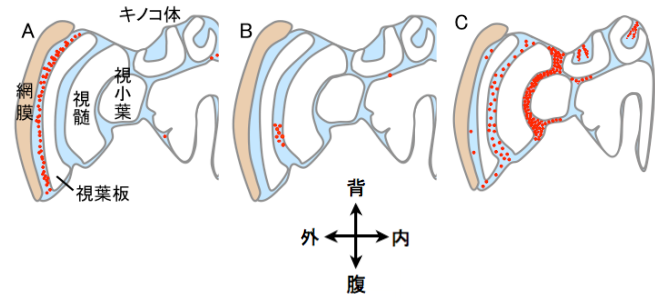


図2 クローン#1-3の発現の模式図

クローン#1 (A)、2 (B)、3 (C) の発現の模式図。発現部位を赤で示す。(A) 視葉板の単極細胞選択的に発現する。(B) 視葉の一部で強く発現する。(C) 視葉の外側ではまばらに、内側ではほぼ全ての細胞に発現した。キノコ体では傘の内側で2本の縦縞状に発現した。

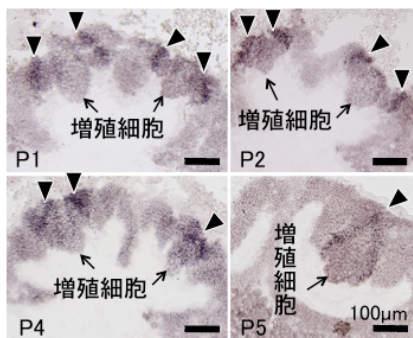


図3 *tau* の蛹での解析

成虫で視葉板選択的に発現した *tau* は、蛹ではステージ (P1, 2, 4, 5) に関わらず、キノコ体の増殖細胞の周囲の、分化直後と思われるケニヨン細胞で発現した。

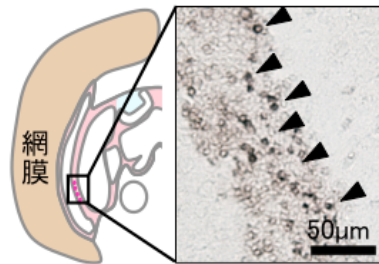


図4 *mesk2* の雄蜂での解析

(左) 雄蜂の頭部の切片の模式図。(右) 左の枠内の染色像。働き蜂と同様の発現パターンを示した。

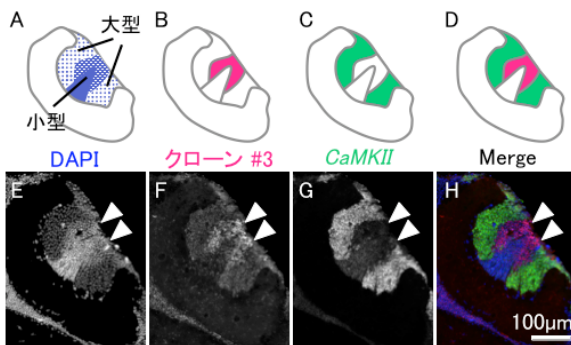


図5 クローン#3と、大型ケニヨン細胞選択的な遺伝子 (*CaMKII*) との比較

キノコ体の1つの傘当たりの発現の模式図 (上段) と切片の写真 (下段)。(A, E) DAPIによる核染色。傘の中央部の濃く染まった部分 (青) が小型ケニヨン細胞、両側の薄く染まった部分が大型ケニヨン細胞。(B, F) クローン#3の「中間型ケニヨン細胞」(赤) での発現。(C, G) *CaMKII*の大型ケニヨン細胞 (緑) 選択的な発現。(D, H) 重ね合わせ。赤 (中間型) は、青 (小型) と緑 (大型) の境界部に存在する。

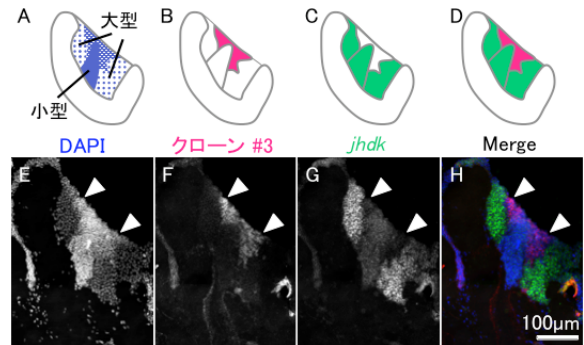


図6 クローン#3と、「両端と中央部」で発現する遺伝子との比較

図の見方は図5と同様で、(B, F) クローン#3、(C, G) *JHDK*の発現パターン。(D, H) 重ね合わせ。赤 (中間型) は、*jhdk*の発現領域 (緑) と相補的である。

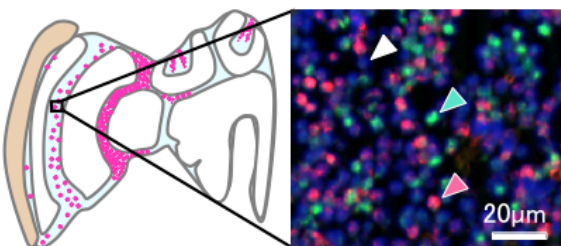


図7 視葉におけるクローン#3と *CaMKII* 発現細胞の比較

(左) クローン#3の脳半球における発現の模式図。(右) 左の枠内の染色像。クローン#3の発現細胞 (赤矢尻で示す赤いシグナル) と *CaMKII* の発現細胞 (緑矢尻で示す緑のシグナル)、どちらも発現しない細胞 (白矢尻で示す青いシグナル) が別々に存在する。青はDAPI染色。