

論文内容の要旨

論文題目

Study on ecdysteroid biosynthesis in worker honeybee (*Apis mellifera* L.)

(セイヨウミツバチの働き蜂におけるエクダステロイド合成に関する研究)

氏名 山崎 百合香

社会性昆虫であるセイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) の雌は生殖カーストである女王蜂と労働カーストである働き蜂の2つのカーストに分化する。生殖行動を行うのは女王蜂だけであり、働き蜂は不妊化されており子孫を残さない。さらに、働き蜂は羽化後の加齢に応じて分業し、コロニー維持のための様々な役割を担う。具体的には、若い時は育児蜂として巣の中で女王蜂や幼虫の世話をを行うが、年をとると採餌蜂として巣の外で花粉や花の蜜を採集する(齢差分業)。ミツバチは哺乳類に比べて小さな脳しかもたないが、こうした高度で生得的な社会性行動を示すため、動物の社会性行動の分子・神経的基盤を調べる上で良いモデル生物となると考えられる。

ミツバチの脳では、他の昆虫に比べてキノコ体(高次中枢)が発達している。キノコ体は学習、記憶、感覚の受容やその情報の統合に重要な役割を果たす。また、齢差分業や採餌経験によって構造に可塑性がみられる。私は修士課程においては、働き蜂が示す多彩な社会性行動の分子基盤を明らかにするため、ミツバチの脳においてカースト間で働き蜂選択的に発現する遺伝子を検索した。その結果、働き蜂、特に採餌蜂選択的な発現をする遺伝子として、*Hormone Receptor 38 (HR38)* を同定し、この遺伝子がキノコ体を構成する神経細胞の1種である小型ケニオン細胞で選択的に発現することを明らかにした。*HR38* はエクダイン受容体(*EcR*)と良く似た核内受容体であり、エクダステロイド情報伝達系のモード転換のキーとなる因子である。さらに、これまで当研究室では、*EcR*, *USP*, *E74*, *Broad-Complex*, *E76* といった複数のエクダステロイド情報伝達系関連遺伝子がキノコ体で発現していることが報告されており、これらの知見から、ミツバチ脳では、キノコ体におけるエクダステロイド情報伝達系が、働き蜂の齢差分業において重要な役割を果たす可能性が示唆されていた。

しかしながら、ミツバチの働き蜂におけるエクダステロイドに関しては、ほとんど研究がなされていない。

一般に、昆虫のエクダステロイドの合成器官としては、前胸腺(幼虫、蛹)と卵巣(成虫の雌)が知られているが、成虫である働き蜂は前胸腺をもたず、卵巣も退縮して不妊化されているため、その合成場所は不明である。私は、ミツバチの働き蜂の何れかの組織でエクダステロイドが合成・分泌され、それが脳内でエクダステロイド情報伝達系を動かすことで、働き蜂の行動を制御する可能性を考えた。

本研究ではまず、エクダステロイドの合成器官の候補を調べるため、エクダステロイド合成酵素をコードする遺伝子群がどの器官で発現するかを調べた。昆虫ではエクダステロイドは、植物のステロイドを前駆物質とし、前胸腺や卵巣のようなエクダステロイド合成器官において *Phantom*(幽霊), *Disembodied*(霊魂)といった一連の *Halloween* 水酸化酵素群の働きによって、エクダイソンへと変換される。エクダイソンはさらに表皮、脂肪体、腸、卵巣などの末梢器官に運ばれ、そこで *Shade*(陰)によって活性化型の 20-ヒドロキシエクダイソン(20E)に変換される。私は、*phantom* と *disembodied* の発現場所を調べる事でエクダイソンの合成器官を、また *shade* の発現場所を調べることでエクダイソンを 20E に活性化する器官を明らかにできるのではないかと考えた。

その結果、*phantom*, *disembodied*, *shade* どの遺伝子についてもほとんど全ての組織においてその発現が見られた(図1)。特に、*phantom*, *disembodied* は働き蜂の脳で高い発現が見られた。その発現量は、*phantom* においては、産卵を行う女王蜂の卵巣における発現量と同程度であった。よって、働き蜂では、脳がエクダステロイド合成の主要器官である可能性が示唆された。また、*shade* に関しては、育児蜂では脳、卵巣、脂肪体で、採餌蜂では脳と脂肪体で高い発現が検出された。このことは、これらの組織でエクダイソンが利用されることを示唆している。卵巣における *shade* の発現量をさまざまな役割をもつミツバチ間で比較すると、女王蜂と産卵可能な働き蜂(コロニーから女王蜂が消失するという特殊な条件下で、産卵することが可能になった働き蜂)で発現量が高く、不妊化された蜂(育児蜂と採餌蜂)では発現量は低かった。このことは、エクダステロイドが卵巣で利用され、卵巣機能に関わるという過去の知見と矛盾しない。

次に、エクダステロイドの合成器官、利用器官の候補となった組織において、実際にエクダステロイドが合成されているかを明らかにするため、各組織の培養上清について、エクダイソンや 20E に反応する抗体を用いたラジオイムノアッセイを行った(表 1)。その結果、脂肪体と脳に加えて、下咽頭腺の培養上清にも、培養依存にエクダステロイドの分泌が検出された。さらに分泌されたエクダステロイドが培養中に新たに合成されたものか調べるために、培養前と培養後の、組織中と培養液中のエクダステロイド量を比較した結果、脂肪体と下咽頭腺の両者において、エクダステロイド量は培養前より培養後で多かった(図 2)。このことから、下咽頭腺と脂肪体では、エクダステロイドは新規にこれらの器官で合成され、分泌されたものと考えられる。ただし、利用した抗 20E 抗血清はエクダイソンよりも 20E に3倍反応性が高いため、これらの結果が、エクダステロイドの分泌ではなくて、エクダイソンから 20E の変換を見ている可能性は残る。しかしながら何れの場合でも、これらの器官ではエクダステロイドの新規合成か、エクダイソンから 20E への転換が起きていると考えられる。また組織から分泌され、RIA 法で検出されたエクダステロイドを HPLC で分画し、標品との溶出時間を比べた結果、脂肪体からは主にエクダイソンと 20E が分泌されることが判明した(図 3)。

以上のように、エクダステロイド合成酵素である *phantom* と *disembodied* の遺伝子発現は脳で高く、脳がエクダステロイドの主要な合成器官と推察される。また、一般に昆虫では体液中のエクダイソンは、それが利用される末梢組織で 20E に転換される。エクダイソンを 20E へ転換する酵素遺伝子である *shade* は、脳と卵巣、脂肪体で発現量が高いことから、脳で合成されたエクダイソンは体液中に分泌され、これら3つの組織で活性化されると考えられる。一方、組織培養の実験では、脳と脂肪体に加えて下咽頭腺で、抗 20E 抗血清にイムリアクティブな物質が分泌されることが分かった。下咽頭腺では、20E への転換酵素で

ある Shade の遺伝子発現がほとんど見られなかったことから、下咽頭腺から分泌されるエクダステロイドはエクダインではないかと推察される。また、下咽頭腺では合成酵素の遺伝子発現がそれほど高くなかったにも関わらず、エクダステロイドの分泌が見られたことについては、下咽頭腺が外分泌器官であり、体液中から大量のリポタンパク質を取り込むことから、前駆体となるステロイドの量が大量に貯蔵されていたのではないかと考えている。また、今回、卵巣での分泌エクダイン量が少なかった事に関しては、働き蜂の卵巣は退縮しており、他の組織に比べて組織の容積が小さかったことが原因ではないかと考えている。

他の昆虫では、エクダステロイドは、脂肪体では卵黄タンパクの合成、卵巣では卵形成に関わることが知られており、ミツバチの脂肪体や卵巣においても同様の機能を担う可能性が考えられる。一方、ミツバチの働き蜂では、脳でエクダインが合成、活性化され、その受容体である EcR や HR38 の遺伝子も脳で発現することから、ちょうど哺乳類におけるニューロステロイドのように、脳で合成、活性化されたエクダステロイドは脳のエクダステロイド情報伝達系を直接、活性化させ、齢差分業などの働き蜂の社会性行動の発現制御に関わる可能性が考えられる。昆虫において、脳でエクダステロイドが合成され、働く可能性を示したのは今回が初めてである。また、これまで外分泌腺と考えられていた下咽頭腺がホルモン分泌に関わる可能性も示唆された。本研究は、ミツバチの脳でエクダステロイドが合成・分泌され、働き蜂の齢差分業を制御する可能性を示唆した点で、ミツバチの、さらには動物一般の社会性行動の制御機構の理解に寄与するものではないかと考えている。

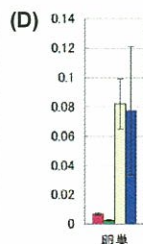
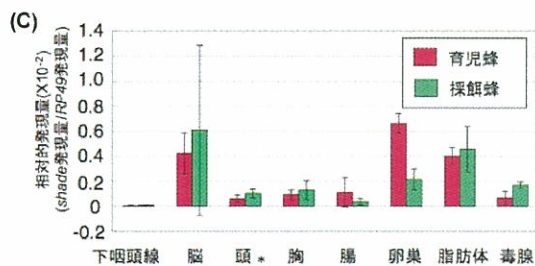
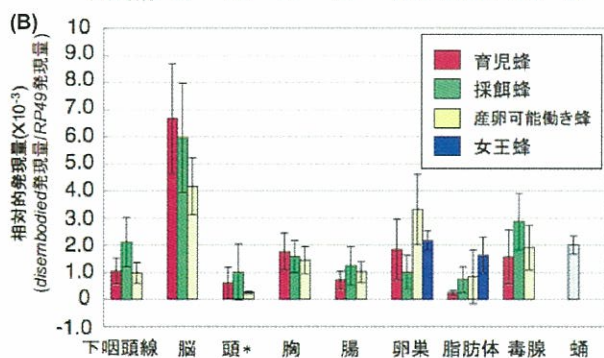
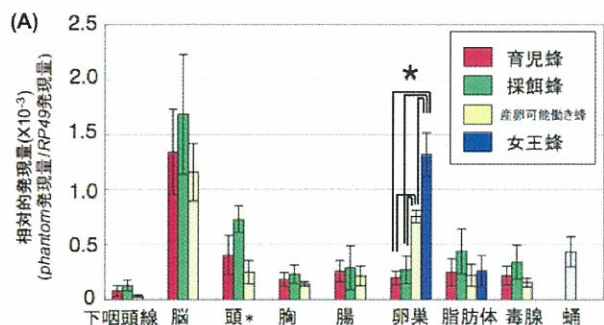


図1 定量的 RT-PCR 法によるエクダステロイド合成酵素遺伝子の発現量比較 (A) phantom, (B) disembodied, (C,D) shade
頭* は脳と下咽頭腺を除いたサンプル

表1. 培養前と培養10時間後の様々な組織からのエクダステロイド量 (pg)

	下咽頭腺 (20匹)	脳 (20匹)	アラタ体 (20匹)	卵巣 (20匹)	脂肪体 (5匹)
培養前	u.d.	u.d.	u.d.	u.d.	25.2±3.7
培養後	75.8±15.2	54.6±4.8	u.d.	u.d.	151.6±13.9

下咽頭腺、脳、アラタ体、卵巣は20匹分を集め、グレース培地50μl中で30°C10時間培養した。

脂肪体は5匹分から集め、グレース培地50μl中で30°C10時間培養した。

値は4回の実験の平均値±SEMを表している。u.d., 検出限界以下

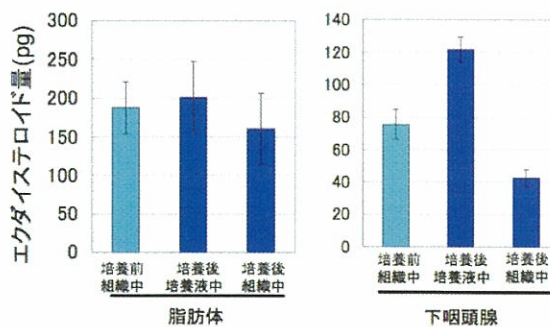


図2 培養前後の組織中、培養液中のエクダステロイド量

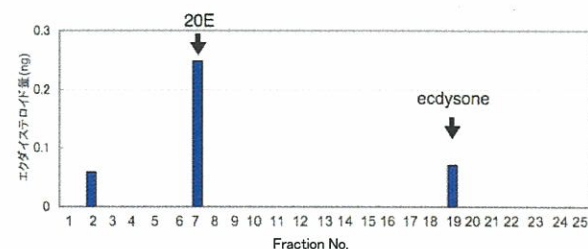


図3 HPLC-RIA 法による脂肪体からの分泌エクダステロイドの同定