

論文内容の要旨

論文題目 Molecular mechanisms of structural and functional changes of the hypopharyngeal gland associated with the role change of worker honeybees

(ミツバチ働き蜂の分業に伴う下咽頭腺の構造・機能変化の分子機構に関する研究)

氏名 上野 貴之

<序論>

社会性動物では社会を構成する各個体が育児や採餌、防衛などの役割を分担することで適応度を上げている。社会性昆虫であるセイヨウミツバチでは、働き蜂が羽化後の日齢に伴って、育児から採餌へと齢差分業する。この分業に伴い、働き蜂の下咽頭腺(頭部外分泌腺)の構造と機能は顕著に変化する。育児蜂の下咽頭腺は発達し、幼虫の餌となる Major Royal Jelly Proteins (MRJPs)を合成・分泌するが、採餌蜂では退縮し、花蜜をハチミツに転換するための α -glucosidase等の糖代謝酵素を合成・分泌する(図 1)。この下咽頭腺の変化は働き蜂の分業に伴って起きることから、その分子機構の解析は齢差分業を支える分子基盤、ひいては社会性昆虫一般において個体の役割と生理状態が連携して変動する仕組みの解明に繋がると期待される。

修士課程で私は、下咽頭腺の変化に関わる候補因子を同定する目的で下咽頭腺で分業依存に発現変動する遺伝子をディファレンシャル・ディスプレイ法と定量的 RT-PCR 法を用いて検索し、育児蜂選択的に発現する遺伝子として *buffy*、採餌蜂選択的に発現する遺伝子として *matrix metalloproteinase 1(MMPI)*を同定した(図 2)。*buffy* は *bcl-2* タンパク質の 1 つで、ショウジョウバエではカスパーゼ依存のアポトーシスを抑制する。採餌蜂の下咽頭腺では *buffy* の発現が低下し、カスパーゼが活性化すると予想されるが、下咽頭腺ではアポトーシスは生じないことから、*buffy* は下咽頭腺の構造・機能変化に関わる新規なシグナル経路に関わる可能性がある。*MMP1* は細胞外マトリクス分解酵素であり、採餌蜂における下咽頭腺の退縮に関与する可能性がある。博士課程では、コロニーの状況やホルモン投与に応じて、これら遺伝子が下咽頭腺でどのように発現制御されるか調べることで、ミツバチ社会において個体が社会行動を行う上での「社会的文脈」に応じた下咽頭腺の機能調節の分子機構の解明を目指した。

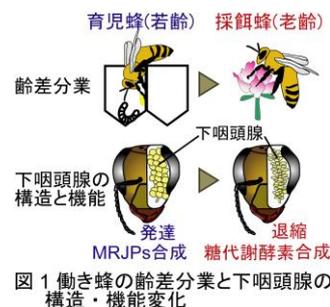


図 1 働き蜂の齢差分業と下咽頭腺の構造・機能変化

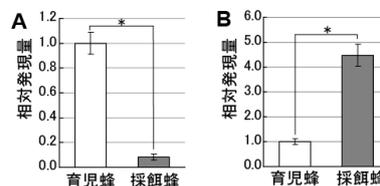


図 2 育児蜂と採餌蜂の下咽頭腺で発現量に差のある候補遺伝子の発現量解析

縦軸は育児蜂の値を1としたときの相対発現量を表す
n=4 (9~14匹を1ロットとした) * ウェルチの検定(p<0.01)
A) *buffy* B) *matrix metalloproteinase 1 (MMP1)*

<結果と考察>

実験 1. *buffy* と *MMP1* の発現の組織選択性

先ず、*buffy* と *MMP1* の分業依存の発現変化が下咽頭腺選択的かを検証するため、育児蜂と採餌蜂の各組織・部位における遺伝子の発現解析を行った。その結果、採餌蜂では、*buffy* は下咽頭腺でのみ発現低下し、*MMP1* は下咽頭腺と中腸で発現上昇していた(図3)。*buffy* と *MMP1* の発現変動は下咽頭腺を含む限られた組織で生じることから、組織選択的な転写制御機構の存在が示唆された。中腸においても下咽頭腺と同様に何らかの分業依存な構造・機能変化が生じている可能性がある。

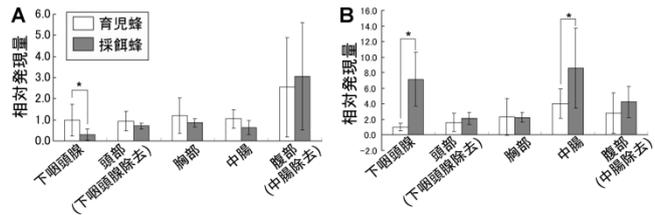


図3 各部位・組織における*buffy*と*MMP1*の発現量解析

縦軸は育児蜂の下咽頭腺の値を1としたときの相対発現量を表す。n=8 (2-3匹の働き蜂を1ロットとした) (*p<0.05, t-test)

A: *buffy* B: *matrix metalloproteinase 1 (MMP1)*

実験 2. シングルコホートコロニー (ほぼ同齢の働き蜂から構成される) を用いた遺伝子の発現解析

通常の齢差分業では加齢に伴って分業が進行するため、*buffy* と *MMP1* の発現変化が働き蜂の日齢と行動のどちらと相関するかは分からない。この点を解明するため、約 3000 匹の働き蜂新成虫 (全て 0-2 日齢) と 1 匹の女王蜂から構成される「シングルコホートコロニー」を作出した。数日後にはほぼ同齢であるにも拘わらず、育児を行う個体と、採餌を行う個体 (早熟な採餌蜂) が現れるので、これら働き蜂を採集し、両遺伝子の発現を解析したところ、それぞれ育児蜂と早熟な採餌蜂に選択的に発現し (図 4A、B)、両遺伝子が日齢ではなく行動と相関して発現することが判明した。また、下咽頭腺の機能自体が日齢と行動のどちらと相関するか調べるため、*mrjp2* と α -*glucosidase* の発現を解析したところ、それらもそれぞれ育児蜂と早熟な採餌蜂に選択的に発現し (図 4C、D)、「シングルコホートコロニー」の働き蜂では、下咽頭腺機能は行動と相関することが示された。このことは、働き蜂の行動と下咽頭腺の機能を連動して制御する機構の存在を示唆している。

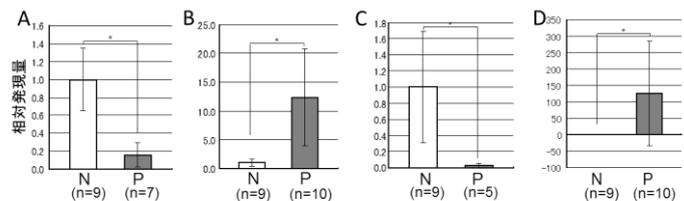


図4 シングルコホートコロニー (ほぼ同齢の働き蜂から構成) から採取した育児蜂と早熟な採餌蜂の下咽頭腺における遺伝子発現量解析

縦軸は-20E群の値を1としたときの相対発現量を表す。

A: *mrjp2* B: α -*glucosidase* C: *buffy* D: *MMP1* (*p<0.05, t-test)

実験 3. 育児蜂と採餌蜂の下咽頭腺におけるエクダイン情報伝達関連遺伝子の発現比較

ショウジョウバエの変態期では *buffy* と *MMP1* はエクダイン情報伝達系で発現制御されること、及び当研究室の知見として、働き蜂脳でエクダイン情報伝達関連遺伝子 (エクダイン受容体 *EcR*, *E74*, *Mblk-1*) が発現することが知られていることから、行動と下咽頭腺機能を連動して制御する機構としてエクダイン情報伝達系を考えた。そこで下咽頭腺における上記遺伝子の分業依存の発現変動を調べたところ、いずれも採餌蜂下咽頭腺で発現増強していた (図 5)。採餌蜂下咽頭腺ではエクダイン情報伝達系が活性化している可能性がある。

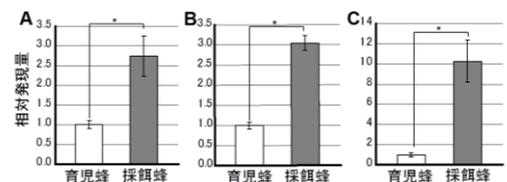


図5 エクダイン情報伝達系関連遺伝子の育児蜂と採餌蜂下咽頭腺での発現量解析

縦軸は-20E群の値を1としたときの相対発現量を表す。

A: *EcR* B: *E74* C: *Mblk-1* (*p<0.05, t-test)

実験 4. 20-ヒドロキシエクダイン(20E) 注射が各遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

エクダイン情報伝達系が *buffy*、*MMP1* の発現や下咽頭腺の機能変化に関与するかを直接的に検証するため、育児蜂頭部に 20E 2.5 μ g を注射し、1~3 日間容器で飼育した後、下咽頭腺での各遺伝子の発現を解析した。その結果、注射後 3 日目で *buffy* の発現が 20E 注射依存に有意に低下した (図 6A)。*mrjp2* の発現も 20E 依存に低下する傾向があった (図 6C, p=0.07)。*MMP1* や α -*glucosidase* の発現は変化しないことから、20E は育児蜂

の下咽頭腺機能を規定する遺伝子の発現を抑制する一方で、採餌蜂の下咽頭腺機能は別の因子で制御される可能性が考えられた。*EcR* と *Mblk-1* は注射後 1 日目で 20E 依存に有意に発現低下したが(図 6E、F)、これはこれらの遺伝子発現が負のフィードバックによる調節を受けた可能性を示唆している。

<まとめと今後の展望>

今回、シングルコホートコロニーを用いた実験により、下咽頭腺機能が働き蜂の行動と関連することを初めて示した。*buffy* と *MMP1* の発現も、それぞれ *mrjp2* と α -glucosidase の発現と付随して変動したことから、*buffy* と *MMP1* が下咽頭腺の構造・機能変化に関わる候補と考えて矛盾しない。また 20E の投与実験から、育児蜂と採餌蜂の生理状態がそれぞれ 20E と、20E に依存しない様式で制御される可能性を示唆した。先行研究で、幼若ホルモン(JH)が育児から採餌への行動変化の促進作用があること、また下咽頭腺の退縮を引き起こすことから、JH が採餌蜂の下咽頭腺機能を規定する可能性がある。従ってエクダイソンと JH の 2 つのホルモンの協調的な制御によって下咽頭腺の生理状態が変化すると考えられる。今後は、それぞれの制御様式の解明と下咽頭腺の生理状態が行動と連動して制御される仕組みの解明が重要な課題である。

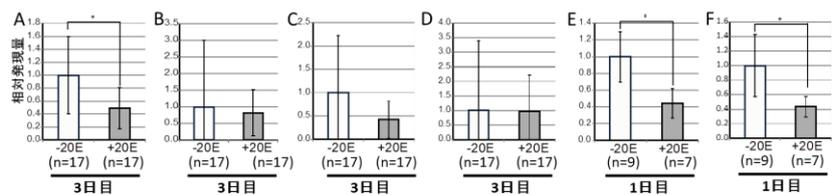


図6 20-ヒドロキシエクダイソン (20E) 注射が各遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

20E 2.5 μ gを頭部に注射した後、インキュベーター内(33 $^{\circ}$ C)で飼育し、注射後1,3日目にサンプリングを行った。下咽頭腺での各遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法により解析。縦軸は-20E群の値を1としたときの相対発現量を表す。

+20E: 20E 注射 -20E: 溶媒のみ注射 (* $p < 0.05$, t-test)

A: *buffy* B: *MMP1* C: *mrjp2* D: α -glucosidase E: *EcR* F: *Mblk-1*