

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of the functions of cephalic and thoracic exocrine glands of the European honeybee using proteomics

(プロテオミクスを用いたセイヨウミツバチ頭部・胸部外分泌腺の機能解析)

氏名 藤田 俊之

多くの生物種において、同一のゲノムをもつにも関わらず環境からの刺激に応じて異なる表現型を示す現象(polyphenism)が知られている。例えばいくつかの動物種で、発生期に与えられる栄養や、生育密度に依存して異なった成熟の仕方/病気への感受性を獲得する生態学的知見がある。しかしながら、それらの多くは関わる要因が複雑で、分子基盤は明らかではない。そこで私は、幼虫期に与えられる栄養に依存して異なる表現型を示す社会性昆虫、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.)に着目した。ミツバチでは、メスが幼虫期に与えられるローヤルゼリー(RJ)の量に依存して、女王蜂か働き蜂へとカースト分化する。RJはタンパク質が豊富な働き蜂の分泌物である。近年、最も主要なRJタンパク質(MRJPs: major RJ proteins)の一つ(Royalactin)が女王蜂への分化に必要であることが報告されたが、機能的な女王蜂への分化に十分であるかは不明なままである。MRJPsは働き蜂の頭部外分泌腺である下咽頭腺に由来することが知られていたが、私は修士課程において、RJとミツバチ働き蜂の頭部・胸部に存在する機能不明な外分泌腺である後脳腺・胸部唾液腺の小規模なプロテオミクス解析を行い、後脳腺に発現する成虫原基成長因子(IDGF4: Imaginal disc growth factor 4)がRJ内に存在するを見いだした。これによりIDGF4がRJに外分泌されて、他個体の生理状態に影響する可能性を提唱した。本研究では、RJに含まれるタンパク質のショットガンプロテオミクスを用いた網羅的解析、それらのRJタンパク質が由来する外分泌腺

の同定と、各々の外分泌腺のプロテオームに基づく機能解析を行った。修士課程の研究で、後脳腺と胸部唾液腺から新規 RJ タンパク質 IDGF4 が発見されたことから、RJ タンパク質の全貌を理解する上では、RJ タンパク質が由来すると考えられる外分泌腺のプロテオームの解析が有用であると考へた。そこで、RJ、下咽頭腺、後脳腺、胸部唾液腺から各々タンパク質を抽出し、トリプシン消化の後、ダイレクトナノフロー液体クロマトグラフィータンデム質量分析システムを用いたショットガンプロテオミクス解析を行った(図1)。その結果、RJ と各々の組織から重複のない38(RJ)、632(下咽頭腺)、711(後脳腺)、833(胸部唾液腺)種のタンパク質を同定した($p < 0.01$)。RJ は働き蜂の口器から分泌されるため、含まれるタンパク質は分泌性タンパク質であると期待される。そこで、RJ から同定されたタンパク質から分泌性タンパク質を抽出する目的で、タンパク質の局在予想ツール(PSORT)を用いた解析を行った。その結果、38種中22種類が分泌性と予想された(図2)。この内9種は新規 RJ タンパク質であった。これらの由来を知る目的で、3つの外分泌腺から同定されたプロテオームのリストと比較した結果、11、9、5種は下咽頭腺、後脳腺、胸部唾液腺に共通して検出された。加えて下咽頭腺、後脳腺、胸部唾液腺の内の一つのみと共通するものが、それぞれ7、2、1種あったことから、RJ は従来考えられてきたように下咽頭腺だけではなく、これら3つの外分泌腺に由来するタンパク質のカクテルであることが示された。特に、個体の生理状態に影響しうる候補タンパク質として、IDGF4に加えて、insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit-like(IGFBP-ALS)と protein takeout-like(To)を見いだした。IGFBP-ALSはインスリンシグナリング、Toは脂質輸送に関与する。これらは内分泌性のタンパク質であるが、RJ から検出されたことおよび、RT-PCR法で由来外分泌腺での発現が確認されたことから、RJ へ外分泌される可能性が示唆された。RJ タンパク質の由来する外分泌腺のうち、後脳腺と胸部唾液腺については、後脳腺がフェロモン的一种であるオレイン酸エチル(EO)を含むことが報告されている他は、それらの機能は不明であった。そこで、各分泌腺のプロテオームのリストを用いてこれら外分泌腺の機能解析を行った。まず、各々の分泌腺で特異的に同定されたタンパク質が各々の分泌腺に固有な機能と関連すると考え、これらのタンパク質を検索した結果、それぞれ137(下咽頭腺)、138(後脳腺)、213(胸部唾液腺)種の各分泌腺に特異的に検出されたタンパク質を見いだした(図3)。これらのタンパク質について、それぞれ KEGG データベースを用いてパスウェイ解析を行った(図4A)。その結果、下咽頭腺では Genetic Information Processing に分類されるタンパク質の割合が高く、これらのタンパク質の高発現が下咽頭腺の高い RJ タンパク質分泌能の分子基盤であると考えられた。

また、胸部唾液腺のみで Environmental Information Processing に分類されるタンパク質が検出され、胸部唾液腺の機能が外部環境に影響されることが示唆された。さらに、各々の外分泌腺で Metabolism に分類されたタンパク質を詳細に調べた結果、後脳腺では炭水化物代謝に関わるタンパク質の割合が他の分泌腺より高かった(図4B)。質量分析機で所得したスペクトラルカウントに基づくタンパク質の発現の半定量的解析も、KEGG パスウェイ解析の結果と一致した。さて、働き蜂は羽化後の加齢に伴い、育児蜂から採餌蜂へと分業し、EO は採餌蜂が分泌する。そこで、これら炭水化物代謝に分類された脂質代謝酵素遺伝子群について定量的 RT-PCR 法を用いて組織および分業間での発現量比較を行った結果、*acyl-CoA Delta (11) desaturase-like* は後脳腺選択的に発現し、育児蜂より採餌蜂の後脳腺で有意に発現量が高いことが判明した(図5A)。この傾向は *trans-2, 3-enoyl-CoA reductase-like* についても確認された(図 5B)。他の脂質代謝酵素遺伝子について同様な傾向が見られた。これらの結果は、採餌蜂後脳腺で EO 合成が行われている可能性を支持するものである。本研究において、新規タンパク質9種を含む22種の RJ タンパク質を同定し、その由来外分泌腺を同定した結果、RJ が3つの外分泌腺に由来するタンパク質のカクテルであることが初めて明らかとなった。また内分泌性のタンパク質が RJ に外分泌され他個体に影響する可能性が示された。さらに、プロテオームに基づき、3つの外分泌腺の機能を解析した結果、下咽頭腺の高タンパク質合成・分泌能の分子基盤を明らかとし、後脳腺が EO 合成に働く可能性を示した。今後は同定した新規な RJ タンパク質の、カースト分化における機能解析や、各々の外分泌腺のミツバチの分業における役割の解析が重要な課題である。

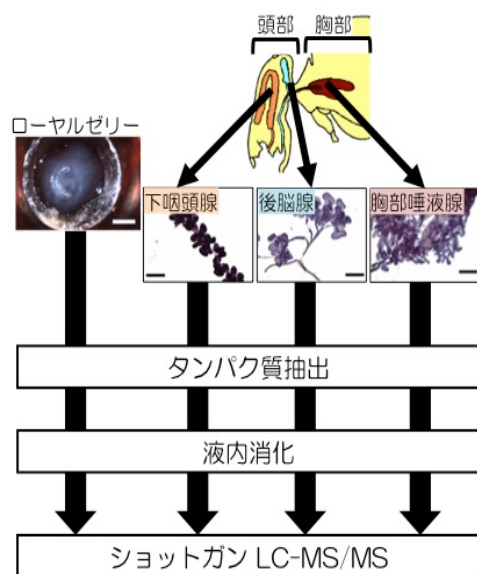


図1実験のワークフロー

上段右: ミツバチ頭部・胸部の模式図。、下咽頭腺、後脳腺、胸部唾液腺をそれぞれ橙色、水色、赤で示す。下段: ショットガンプロテオミクスのワークフロー

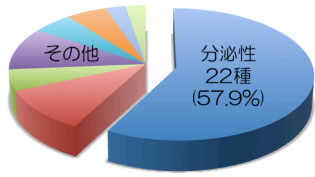


図 2 RJ タンパク質の局在予測
同定した RJ タンパク質の内、分泌性と予想されたものを青で示す。

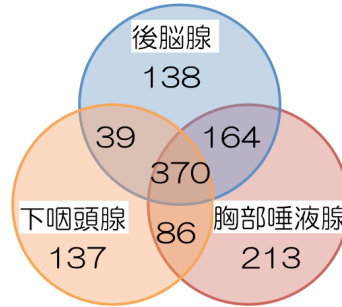


図 3 各々の外分泌腺に特異的なタンパク質の探索
数字はそれぞれの分画に対応するタンパク質の種数を示す。

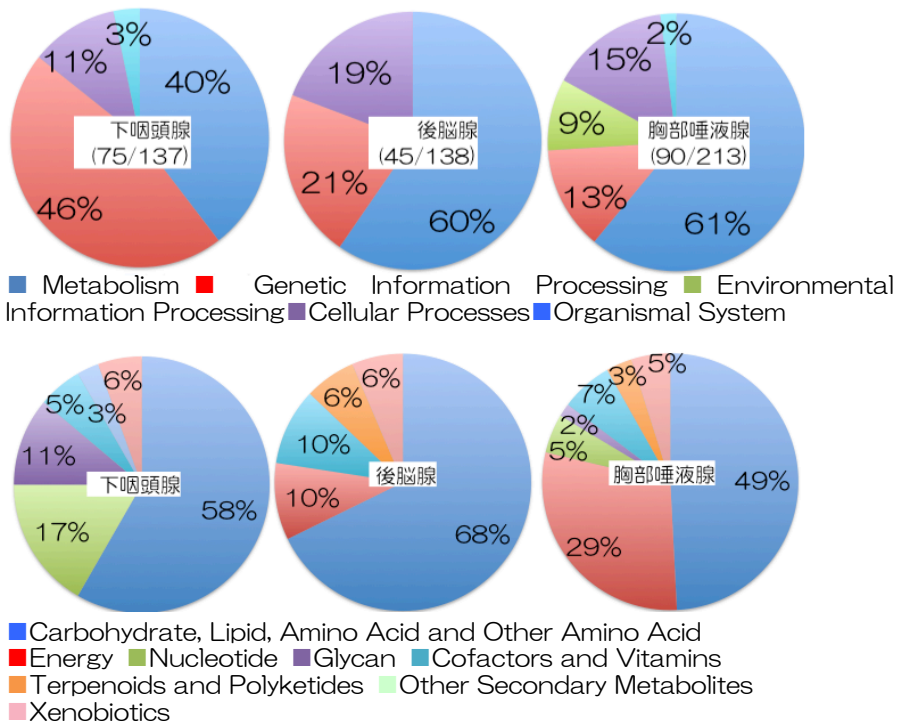


図 4 外分泌腺の KEGG パスウェイ解析

(A) 大分類に基づき各々に含まれるタンパク質の割合を示した。(B) (A)の Metabolism 分類の詳細を割合で示した。

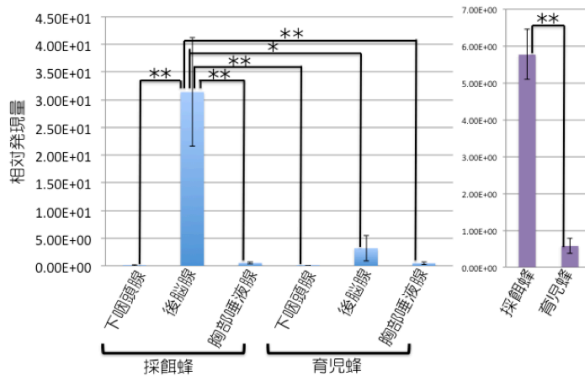


図 5 後脳腺特異的な炭水化物代謝遺伝子の発現量比較

(A) *acyl-CoA Delta(11)desaturase-like* の発現量比較。ANOVA, Scheffe's test, **; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$

(B) 後脳腺での *trans-2, 3-enoyl-CoA reductase-like* の発現量比較。t 検定。**; $p < 0.01$