

ミツバチ働き蜂の行動変化にともなう
下咽頭腺細胞の機能転換に関する研究

大橋 一雄

学位論文

ミツバチ働き蜂の行動変化にともなう
下咽頭腺細胞の機能転換に関する研究

東京大学大学院薬学系研究科
機能薬学専攻

大橋一晶

目次

第1章 序論	1
第2章 下咽頭腺蛋白の構造決定と、働き蜂の行動変化にともなう遺伝子発現変化	14
第1節 序	15
第2節 3種類のローヤルゼリー蛋白の構造解析	17
第3節 セイヨウミツバチ α -glucosidase の構造の解析	23
第4節 セイヨウミツバチ amylase の構造の解析	26
第5節 セイヨウミツバチ glucose oxidase の cDNA cloning	28
第6節 働き蜂の行動変化にともなうローヤルゼリー蛋白群、および糖代謝酵素群の遺伝子発現の解析	31
第7節 考察	33
第3章 下咽頭腺の機能転換における遺伝子発現の細胞レベルでの解析	64
第1節 序	65
第2節 下咽頭腺の器官全体における、ローヤルゼリー蛋白、および α -glucosidase の mRNA の発現部位の解析	67
第3節 下咽頭腺の個々の細胞レベルでの、ローヤルゼリー蛋白、および α -glucosidase の mRNA の発現の解析	70
第4節 考察	73

第4章 コロニーの状況に依存した下咽頭腺細胞の機能転換の可塑性	86
第1節 序	87
第2節 日齢の進んだ働き蜂と雄蜂幼虫からなるコロニーの作製とその観察	89
第3節 day28における今回の実験群の下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析	93
第4節 ランダムにサンプリングした働き蜂各個体ごとの下咽頭腺の 蛋白発現パターンの解析	95
第5節 育児行動をとっていた働き蜂について、各個体ごとの下咽頭腺の 蛋白発現パターンの解析	96
第6節 経時的なサンプリングによる今回の実験群の働き蜂の下咽頭腺の 状態の解析	98
第7節 外勤蜂に育児を強制した際の下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析	100
第8節 考察	103
第5章 下咽頭腺細胞の機能転換に関する分子機構の解明の試み	118
第1節 序	119
第2節 下咽頭腺の組織培養系の試み	121
第3節 α -glucosidase, amylase, glucose oxidase についてのゲノム サザンプロット解析	122
第4節 考察	125
第6章 総括と展望	131
第1節 まとめ	132
第2節 今後の展望	135
材料と方法	142
参考文献	160
謝辞	

図表

図 1	SDS-PAGE による働き蜂下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析	12
図 2	働き蜂下咽頭腺およびローヤルゼリー蛋白のイムノブロット解析	13
図 3	56kDa ローヤルゼリー蛋白 cDNA (p56-4) の核酸配列と予想アミノ酸配列	43
図 4	N-glycosidase F による 56kDa ローヤルゼリー蛋白の脱糖処理	45
図 5	64kDa ローヤルゼリー蛋白の予想アミノ酸配列	46
図 6	50kDa ローヤルゼリー蛋白 cDNA (p13502) の核酸配列と予想アミノ酸配列	48
図 7	ローヤルゼリー蛋白 (64kDa-, 56kDa-, 50kDa 蛋白) の予想アミノ酸配列の比較	49
図 8	セイヨウミツバチ 56kDa ローヤルゼリー蛋白 とショウジョウバエの <i>yellow protein</i> の予想アミノ酸配列の比較	50
図 9	セイヨウミツバチ α -glucosidase cDNA (p70-11) の核酸配列と予想アミノ酸配列	51
図 10	セイヨウミツバチ α -glucosidase とショウジョウバエと蚊の <i>possible maltase gene product</i> の予想アミノ酸配列の比較	53
図 11	セイヨウミツバチ <i>amylase</i> cDNA (p56-4) の核酸配列と予想アミノ酸配列	54
図 12	セイヨウミツバチ <i>amylase</i> とショウジョウバエの <i>amylase precursor gene product</i> の予想アミノ酸配列の比較	56
図 13	セイヨウミツバチ <i>glucose oxidase</i> cDNA (p61) の核酸配列と予想アミノ酸配列	57
図 14	セイヨウミツバチ <i>glucose oxidase</i> とショウジョウバエの <i>glucose dehydrogenase precursor gene product</i> の予想アミノ酸配列の比較	60
図 15	セイヨウミツバチ <i>glucose oxidase</i> と <i>Aspergillus niger</i> <i>glucose oxidase</i> の予想アミノ酸配列の比較	61
図 16	働き蜂下咽頭腺のローヤルゼリー蛋白 mRNA のノザンブロット解析	62
図 17	働き蜂下咽頭腺の糖代謝酵素 mRNA のノザンブロット解析	63
図 18	働き蜂下咽頭腺の組織染色像	78
図 19	下咽頭腺の機能転換の模式図	79
図 20	内勤蜂下咽頭腺における 64kDa ローヤルゼリー蛋白 mRNA の <i>in situ</i> hybridization	80
図 21	内勤蜂下咽頭腺における 56kDa ローヤルゼリー蛋白 mRNA の <i>in situ</i> hybridization	81
図 22	外勤蜂下咽頭腺における α -glucosidase mRNA の <i>in situ</i> hybridization	82
図 23	外勤蜂下咽頭腺における 56kDa ローヤルゼリー蛋白 mRNA の <i>in situ</i> hybridization	83

図 24	内勤蜂下咽頭腺分泌細胞におけるローヤルゼリー蛋白 mRNA の <i>in situ</i> hybridization	84
図 25	外勤蜂下咽頭腺分泌細胞における α -glucosidase mRNA と 56kDa ローヤルゼリー蛋白 mRNA の <i>in situ</i> hybridization	85
図 26	日齢の進んだ働き蜂と雄蜂幼虫からなるコロニーの作製	112
図 27	日齢の進んだ働き蜂 (28日齢以上) に育児を強いた場合の下咽頭腺の蛋白発現パターン	113
図 28	day 28 のランダムに採取した働き蜂各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン 14	
図 29	day 47 に内勤蜂の行動をとっていた働き蜂各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン	115
表 1	日齢の進んだ働き蜂に育児を強いた場合に内勤蜂型の下咽頭腺を持つ働き蜂の割合	116
図 30	外勤蜂に育児を強いた際の各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン	117
図 31	下咽頭腺の <i>in vitro</i> 培養後の蛋白発現パターン	129
図 32	糖代謝酵素遺伝子のゲノムサザンプロット解析	130



口絵1

セイヨウミツバチのコロニー（一部）

社会性昆虫であるセイヨウミツバチは多数の個体からなるコロニーを形成し、役割分担を行う。産卵を行う女王蜂はコロニー内に1匹だけ存在する（中央よりやや上の、腹の大きく黄色いものが女王蜂）。他のほとんどの個体は働き蜂である。産卵以外のほとんどの作業はこれら働き蜂が行う。働き蜂は形態形成がすでに終了した成虫であるにも関わらず、その体内では各分業に応じた身体機能の変化が生じる。



口絵2 野外での実験風景

(上) 外勤蜂の採集

蜜や花粉を集め、巣箱（後ろの木箱）に戻ってくる働き蜂を捕虫網でとらえる。

(下) 巣板の観察

巣箱の中には数枚の巣板が入っている。巣板は、ハチミツや花粉の貯蔵に用いられ、また幼虫が生育する場でもある。内勤蜂を採集する際には、幼虫のいる巣室に頭を入れて給餌している個体を探す。

略語

bp	base pairs
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CBB	coomassie brilliant blue R-250
DIG	digoxigenin
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
HNPP	2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide
Ig	immunoglobulin
kDa	kilo dalton
NBT	nitroblue tetrazolium chloride
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrilamide gel electrophoresis
ssss DNA	single strand salmon sperm DNA
TBS	Tris buffered saline
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

第1章
序論

なぜミツバチなのか

科学は自然界の普遍性を追求する。ところが、往々にして対象は多様であり、まして生物は、その複雑さとあまりの多様性から、一般性を見出すのは非常に困難である。

さて、生物は著しい多様性を示すが、ある生物の一見極端にみえる現象でも、実は生物が共通に有している資質の一面を強調したものである、というのが、最近の進化の知見（Gould, S. J. 1977）から示されつつある主張である。

ミツバチは、おそらく我々にとって最も身近な昆虫の一つである。しかしその生活形態は、我々とはかなりかけ離れた突飛なものといえよう。ミツバチは社会性昆虫と呼ばれるように、群を構成し、生活している。そのコロニーは、女王蜂、雄蜂、働き蜂からなり、役割分担を行っているが、その様子は、我々、人間の社会とは異なり、コロニー内で、かなり明確に決まった分業が行われている。

すなわち、女王蜂は産卵、雄蜂は交尾、働き蜂はそれ以外の作業全て、であり、もっぱらそれ専門である。働き蜂のように生殖をまっ

たく行わない、また、女王蜂のように餌を集めることをまったく行わない、という個体が存在すること自体が、我々の感覚からすれば、かなり奇妙に感じられる。このとき着目すべきは、これら役割の異なる各個体が、行動が異なるのみならず、身体機能も役割にふさわしく構築されている点である。女王蜂は発達した卵巣を、働き蜂は、花粉を持ち帰るための花粉籠を、成虫への形態形成の際に完成させている。つまり、ミツバチは、あたかも多細胞生物が各種分化した細胞を体内に持つように、役割分担の異なる各個体の分業によりコロニーを成立させているのである。したがって、ミツバチは、そもそも1匹の個体がすべて行ってきた生存のための作業を、分担し、特にその作業が行いやすくなるように、行動と体のつくりのある部分を強調した、と考えることができる。

さて、目を転じて、我々を含めた哺乳類や鳥類に着目すると、ここでも、広い意味での分担（役割）が随所に観察され、本能的な行動と、身体機能の両者の特殊化を伴うものが存在することがわかる。最も身近で理解容易なのは、雄と雌であろう。また、ある意味で、育児を行う動物の親と子もあてはまる（子の場合は受益が多く、役

割とするのは困難であるが)。哺乳類の親は、子に餌を与えるという本能行動と、乳腺の発達といった身体機能の特殊化が生じる。ホシムクドリの子(ひな)は、巣を汚さないように、明るいほうへ向かってフンをする、という本能行動以外にも、そのフンが薄い膜に包まれており、これは身体機能の特殊化である。

すなわちミツバチの社会性があまりに特殊なものに見えようとも、我々の中にも、他の哺乳類の中にも共通して存在する、役割に応じた本能行動と身体機能、と根本には共通の由来の現象といえよう。おそらくは、群を作る動物が、群の中での役割(多少とも理性や判断は含まれるとも)を行うことと、本能的な側面では一致しようと考えられるのである。

したがって、先にも述べたとおり、むしろ、その突飛で強調された現象に手をつけることによって、あたかも拡大鏡に移された細かい文字を判読するかのように、影にかくれた普遍性を引き出すことが可能となる、と私には思われる。

以上の理由から、本研究では、ミツバチを材料に用いて、動物の社会性の分子的基盤の解明を行うこととした。

動物の社会性と、器官の機能転換と

社会性昆虫として有名なミツバチであるが、その研究はダンス言語の解明 (Frisch, 1967) に代表されるように、行動の観察が主たるものであり、分子生物学的解析はほとんどなされていない。したがって、上記の観点から、社会性を、役割に応じた本能行動と身体機能の特殊化としてとらえ、それを説明する分子機構を解析することは、これまでに類のない全く新たな試みである。

私は、解析の容易さ、結果の説明の合理性が得易いこと、の2点から、「役割に応じた身体機能の特殊化」の解明について着手した。

さて、上でも述べたが、働き蜂は、産卵以外の全ての作業を受け持つ。しかしながら、シロアリのように各分業ごとに身体構造の異なる専門家が存在するわけではない。働き蜂は、外見上は皆同じような姿をしており、羽化後の日齢ごとに次第に作業内容を変えるのである。

すなわち、おおよその日齢で、羽化後3-10日目では幼虫にローヤルゼリーを与える育児行動を行うが、羽化後20日目以降には花

の蜜や花粉を集める採餌行動を行う。前者を内勤蜂、後者を外勤蜂と呼ぶが、働き蜂では、同一個体において内勤蜂から外勤蜂への役割の変化が生じるので、身体機能の特殊化という点でも、育児行動に応じた身体機能から採餌行動に応じた身体機能へと転換することが予想される。この働き蜂の特徴は、「役割に応じた身体機能の特殊化」を説明する上で、どの様にその特殊化が生じてゆくのか解析可能なことを示しており、社会性の分子メカニズムを探る上で有用であると考えられる。

さて、ここで、この問題に関して発生物学的にも非常に興味深い問題が提起されることに気づく。働き蜂は身体機能を転換するはずである、と上で述べた。一般に、細胞、器官などで、機能の獲得（特殊化）は、分化と呼ばれる現象を伴う。しかしながら、働き蜂は形態形成の完了した成虫であるため、この身体機能の転換にもなると、大幅な身体構造の変化や、器官の再構築は、生じ得ない。

したがって、この機能の転換は、動物界では非常にまれとされる分化転換により生じる可能性が提起されるのである。言い換えれば、働き蜂の身体は、豊富な分化転換の場である、といえるかもしれない。

い。

なるほど、内勤蜂の時には、あるAという器官が発達していたのが、外勤蜂になると機能を止め、別のBという器官が発達するのに違いない、と考える向きもあろう。しかし私が着目した働き蜂の下咽頭腺という器官は、内勤蜂と外勤蜂とで機能が異なり、上で述べた可能性があてはまりうる例であり、本研究により、その機能転換の機構が非常に新規なものであることが明らかになった事例である。以後本研究の直接の対象となった下咽頭腺について述べる。

さて下咽頭腺は、働き蜂の頭部分泌腺で、分泌腺がブドウの房のように多数ダクトにつながった構造を持ち、内勤蜂では非常に発達した形態を持つが、外勤蜂では退縮してしまう。下咽頭腺は、ローヤルゼリーの分泌腺なのではないかと推測されており、内勤蜂から外勤蜂への移行に伴い形態が変化することから、私は、この下咽頭腺が、社会性の解明のための「役割に応じた身体機能の特殊化」の格好の題材であると考え解析を行うこととした。

修士課程では、まず、下咽頭腺の蛋白発現パターンが、働き蜂の行動変化に伴って大きく変化することを見出した(図1)。内勤蜂

では分子量64,56,50kDaの3種類の蛋白、外勤蜂では分子量70kDa-
の蛋白がmajorな成分として検出される。次に私は、これらの蛋白
を精製し、その性状解析を行うことにより、内勤蜂が産生する3種
類の蛋白はいずれも下咽頭腺から分泌されるローヤルゼリーの構成
蛋白であり（図2）、外勤蜂が産生する70kDa蛋白は花の蜜を分解
するための α -glucosidaseであることを示した。以上の結果から、
働き蜂の分業に伴って下咽頭腺が機能転換することを私は明らかに
した。

繰り返しになるが、働き蜂の分業とそれにとまなう下咽頭腺の機
能転換は、形態形成が終了した成虫（Adult）で観察される現象で
ある。そのため、そこでは、大幅な身体構造の変化や、器官の再構
築は、生じ得ない。

したがって、この機能転換は、現在までに知られている発生にとま
なう細胞分化の概念にはあてはまらない可能性が高い。したがって、
その解析を行うことは、社会性の基盤となる「役割に応じた身体機
能の特殊化」の解明、のみならず、細胞分化の可塑性に関する新し
い視点をも、もたらすと期待される。

本研究では、この下咽頭腺の機能転換のメカニズムの解明を目的として実験を行い、下咽頭腺蛋白のcDNA cloningと遺伝子発現の解析を行った結果、以下の3点を明らかにした。

- (1) 外勤蜂下咽頭腺は種々の糖代謝酵素を合成する器官であり、機能転換は遺伝子発現変化による。
- (2) 下咽頭腺の機能転換が単一な細胞レベルで生じる。
- (3) 単に働き蜂の日齢の進行によるのではなく行動変化に伴って生じる。

本研究は、動物の社会性を、役割に応じた本能行動と身体機能の特殊化としてとらえ、役割に応じた身体機能の特殊化について、細胞生物学的に解明した初めての研究である。

さらに、細胞生物学的観点からは、細胞の脱分化や新生によらずに、単一な細胞が行動変化にともない機能転換する、という動物細胞の分化の可塑性について新しい可能性を示した。

また、個体を構成する細胞が、その個体が置かれた集団の環境変化に対応して変化する点で、社会生物学的にも興味深い知見である。

高度な分業は、社会性昆虫であるハナバチ科の中ではミツバチだけに観察される。この事実は、この現象が進化の末端で現れたことを示している。進化の末端に現れる現象は、往々にして、それ以前に獲得された形質を大幅に変更することなく、基本的な枠組みの上に新たな形質を積み上げたものである。したがって、このような形質は、(少しの修正で現れうるので) 様々な生物に出現可能であり、現に哺乳類にも、ハダカモグラネズミという女王の存在する明確な社会性を持った生物が存在する。同様に考えると、下咽頭腺のような細胞の機能転換も実はもっと広く生物界に観察される現象としてとらえられる日が来る可能性がある。

第1章

図表

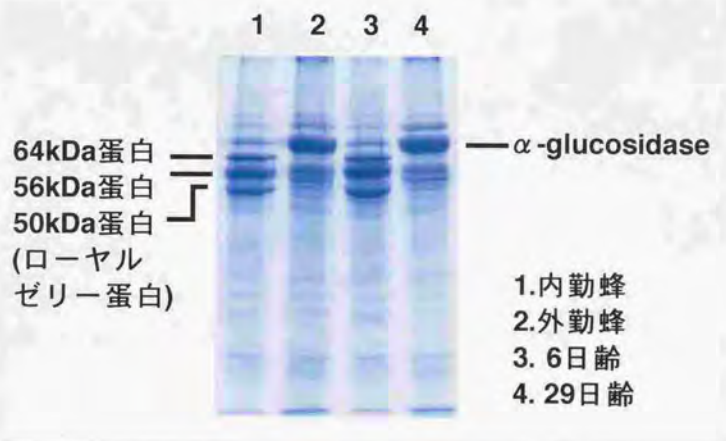


図1 SDS-PAGE による働き蜂下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析
 各レーン15 μ gずつホモジネートを用いた。

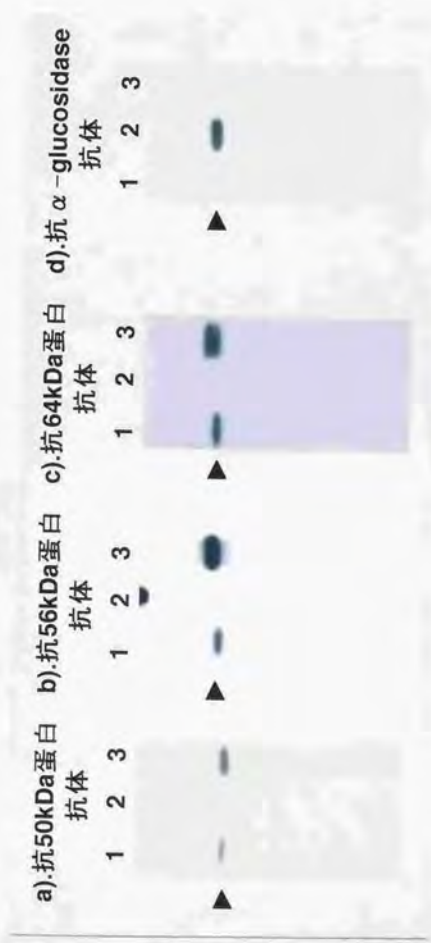


図2 働き蜂下咽頭腺およびローヤルゼリー蛋白のイムノプロット解析
 各レーンは1.内勤蜂、2.外勤蜂、3.ローヤルゼリー、をそれぞれ示す。
 各ホモジネートは15 μ gずつを用いた。

第2章

下咽頭腺蛋白の構造決定と、
働き蜂の行動変化にともなう
遺伝子発現変化

第1節 序

修士課程までに、下咽頭腺が、内勤蜂では3種類のローヤルゼリー蛋白、外勤蜂では α -glucosidaseを主要な蛋白として特異的に発現することから、働き蜂の加齢にともなう行動変化に従って、下咽頭腺の機能が変化していることを明らかにした。

さて、一般に、細胞の分化においては、その細胞の分化状態特徴づける機能分子の合成が、遺伝子発現のレベルで生じていると考えることができる。

そこで本章では、内勤蜂から外勤蜂への移行の際に、下咽頭腺についても機能分子（ここでは、ローヤルゼリー蛋白や α -glucosidase）の遺伝子発現の転換が生じているのかどうか、ということの問題点として取り上げた。

最初に、働き蜂の行動変化にともなう遺伝子発現変化を解析する目的で、まず 50, 56, 64kDaローヤルゼリー蛋白と、 α -glucosidaseのcDNA cloningを行った（Ohashi, *et al.* 1996, 1997-）。さらに、外勤蜂下咽頭腺の機能は、ハチミツの生成のための糖分解酵素群の合成である可能性を考え、蜂蜜中に酵素活性が検出さ

れていたamylaseとglucose oxidaseについてもcDNAを得た。

次に、ノザンプロット解析により、これら下咽頭腺の機能蛋白の変動が遺伝子発現の調節によって生じているのかどうかを調べた。その結果、56kDaローヤルゼリー蛋白を除くほとんどの産物が、遺伝子発現レベルで調節されていることがわかった。

以上の結果は、内勤蜂では、機能分子であるローヤルゼリー蛋白が発現しているが、外勤蜂になると、その遺伝子発現はほとんど抑制され、外勤蜂下咽頭腺にとっての機能分子である、種々の糖代謝酵素が、新たに発現してくることを示している。

第2節 3種類のローヤルゼリー蛋白の構造解析

(1) 56kDaローヤルゼリー蛋白のcDNA cloning

修士課程で精製した3種類のローヤルゼリー蛋白(50, 56, 64 kDa蛋白)についてcDNA cloningを行った。cDNA libraryは、それぞれ内勤蜂、外勤蜂の下咽頭腺mRNAを等量ずつ混ぜ、構築したものをを用いた。

これら3種類のローヤルゼリー蛋白について、それぞれ下咽頭腺蛋白でイムノプロット解析を行った際に単一なバンドを与える抗体を持っていたので、スクリーニングは、まず抗体を用いて行った。

その結果、56kDa蛋白については、スクリーニングを行っただけの約30%のクローンが陽性であった。任意に選んだ陽性クローン8個のうち、最も長いインサート長を持つ5クローンについて、5'側および3'側よりその塩基配列を解析したところ、解析できた約300塩基ほどが同じ配列であったので、その内の一つのクローン、p56-4について、その全塩基配列を決定した。図3にp56-4のインサート部分の塩基配列および、予想アミノ酸配列を示す。p56-4は、432残基からなる蛋白をコードする open reading frame を有して

おり、精製56kDa蛋白について決定した部分アミノ酸配列 (56-1, FFDYDFGSDE; peptide 56-2, NNYPSEDIDQ; peptide 56-3, EALPHVPIFDRYINREYILV) を全て含んでいた。これらの結果から、p56-4 は56kDa蛋白のcDNAであると判断した。

また、56kDa蛋白について、蛋白のN末端配列の決定を試みたが、配列は得られなかった。しかし、シグナル配列解析をPSORTを用いて行ったところ、開始メチオニンから16残基目までが、シグナルシーケンスであると考えられた。また、cDNAから計算される分子量は48.8kDaであり、56kDaよりも小さかった。cDNAから予想されるアミノ酸配列にはN結合型糖鎖の付加部位が存在し、実際の分子量が大きいのは糖鎖の付加によると考えられた。そこで、N-glycosidase Fにより、精製56kDa蛋白を処理し、SDS-PAGEにより分子量を算定した。その結果、酵素処理により分子量は47kDaとなり、シグナルシーケンスの部分のをぞいた、47.1kDaにほぼ一致した(図4)。

(2) 56kDaローヤルゼリー蛋白のcDNA cloning

64kDa蛋白については、スクリーニングを行ったうちの約15%のクローンが陽性であった。任意に選んだ陽性クローン4個について、5'側および3'側よりその塩基配列を解析したところ、同じ配列であったので、その内の一つのクローンについて塩基配列を決定した。その結果、その塩基配列はpRJP57-1と同一であった。pRJP57-1とは、Kaudinyらにより、ローヤルゼリー中の蛋白成分に対する抗血清を用いて働き蜂頭部由来 cDNA library から単離された cDNAであり、コードされた蛋白の実体は明らかではなかった (Klaudiny, J et al. 1994, Albert, S. et al. 1996)。

さらに、精製した64kDa蛋白について決定した5つの部分アミノ酸配列 (peptide 64-1, NYPFDVVR; peptide 64-2, EGLIMYQNSDD; peptide 64-3, HIDDFGSDERRDAA; peptide 64-4, LTVAGESXTVK; peptide 64-5, GGPLLRPYPDWXFAK) は、pRJP57-1の予想アミノ酸配列中に全て含まれていた (図5)。したがって、64kDa蛋白のcDNAは、pRJP57-1であると判断した。予想アミノ酸配列から、シグナル配列解析をPSORT (McGeoch 1985, Nakai, K. 1991, von Heijne, G.

1986) を用いて行ったところ、開始メチオニンから16残基目までが、シグナルシーケンスであると考えられた。また、cDNAから計算される分子量は59.9kDaであり、64 kDa蛋白もおそらく、N-結合型糖鎖が付加していると思われる。

(3) 50kDaローヤルゼリー蛋白のcDNA cloning

50kDa蛋白については、抗体スクリーニングで得られる陽性クローンの塩基配列を5'側および3'側より部分的に決定したところ、すべて、64kDa蛋白陽性クローン (pRJP57-1) と同じ配列であった。しかし、50kDa蛋白と64kDa蛋白の決定した部分アミノ酸配列は、似てはいるが明らかに異なり、さらにpRJP57-1に、決定した50 kDa蛋白の部分アミノ酸配列は含まれていないため、pRJP57-1とは異なる転写産物に50kDa蛋白はコードされていると考えられた。

そこで、50kDa蛋白に特徴的な部分アミノ酸配列を用いて、これより予想される核酸配列をもとに primer を作製し、下咽頭腺 cDNA library からPCR により50kDa蛋白のcDNAの一部を増幅し

た。この産物をprobeとしてlibraryからスクリーニングを行い、多数の陽性クローンを得た。

そのうちの一つのクローンp13502についてその塩基配列を決定した(図6)。cDNAから計算される分子量は50.8kDaであり実際の蛋白の分子量とほぼ一致した。

(3) ローヤルゼリー蛋白の構造の比較

次に、これらローヤルゼリー蛋白と相同性の高い蛋白を、各種databaseより検索した。

まず、cDNAの配列について、GenBankとEMBLより検索した。その結果、前出のpRJP57-1、及び、同時にcloningされた、pRJP57-2と高い相同性を示した。したがって、これらローヤルゼリー蛋白同士も互いに構造が類似している可能性を考え、50、56、64kDaローヤルゼリー蛋白について相同性を調べた。その結果、全体にわたって相互に約60%の相同性を示すことがわかった(図7)。したがって、これらの蛋白はfamilyを形成することが明らかとなった。

さらに、これらcDNAの予想翻訳産物について、相同性の高い蛋白を、PIR, SWISS-PROT, PRFの各databaseより検索した。図8-
に示すように、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の
yellow protein (Chia W. et al. 1986) の予想翻訳産物と29%の相
同性を示した。この結果は、ローヤルゼリー蛋白の由来を考える上
で興味深い知見である。

第3節 セイヨウミツバチ α -glucosidase の構造の解析

修士課程において精製した外勤蜂下咽頭腺の α -glucosidase について cDNA cloning を行った (Ohashi, K. *et al.* 1996)。SDS-PAGE による外勤蜂下咽頭腺の蛋白発現パターン (図1) から判断すると、 α -glucosidase の割合は約30~50%であり、下咽頭腺由来 cDNA library 中の α -glucosidase cDNA の content は非常に高いことが予想された。そこで、phagemid に変換した library から任意に15コロニーを選び、部分アミノ酸配列をもとに作製した primer を用いて、菌体に対して直接、PCRを行うことによりスクリーニングを行った。

その結果、1個のクローン (p70-11) が、アガロースゲル電気泳動上で予想サイズにバンドを与えたので、このクローンについて、約1.9kbp からなるインサートの全塩基配列を決定した (図9)。p70-11について、とりうる最大の open reading frame から、翻訳される蛋白は、650アミノ酸残基で、精製した α -glucosidase について決定した部分アミノ酸配列 (N末, AWKPLPENLKE; 70-1, IYTHDIPETYNVV; peptide 70-2, EDLIVYQVYPRSFK; peptide

70-3, IILDFVPNHTSDQHEWFQLXLK) を全て含んでいた (図9) 。これらの結果から, p70-11 は α -glucosidase のcDNAであると判断した。

N末端解析の結果, α -glucosidase のN末端配列は 18残基目の Ala からであり, また, hydropathy profile から, 1~17残基までは疎水的であるので, この1~17残基は signal sequence であると考えられる。

次に, ミツバチ α -glucosidase とホモロジーを有する既存の蛋白を, PIR, SWISS-PROT, PRF の各database より検索した。図10-に示すように, ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の possible maltase genes 1, 2, 3 (Henikoff, S. *et al.* 1988) また, 蚊 (*Aedes aegypti*) の possible maltase gene (James, A. A. *et al.* 1989) からの予想翻訳産物とそれぞれ42.2%, 46.3%, 46.2%, 41.9%の相同性を示した。また, 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Vandenbol, M. *et al.* 1994) やカビ (*Candida albicans*) (Geber, A. *et al.* 1992) といった他の下等真核生物の maltase とも, 約30%の相同性を示した。

これらの結果は, α -glucosidase が下咽頭腺で合成され分泌され

て、花蜜の sucrose を glucose と fructose に分解することにより、
蜂蜜の生成に働くという結果を裏付けるものである。

この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。
また、この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。

この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。
また、この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。

この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。
また、この結果は、花蜜中の sucrose が、蜂の体内で invertase の作用により、
glucose と fructose に分解され、蜂蜜の生成に働くことを示している。

第4節 セイヨウミツバチ *amylase* の構造の解析

次に、外勤蜂下咽頭腺に特異的に発現する産物を α -glucosidase 以外に検索する目的で、PCRを用いたsubtraction法を行った。方法は、内勤蜂、外勤蜂の下咽頭腺total RNAの逆転写産物それぞれを、まずPCRにより増幅した。次に、この増幅産物について、外勤蜂下咽頭腺由来産物から内勤蜂由来産物を差し引き、得られたcDNA断片をさらにPCRにより増幅した。この、subtracted PCR product を任意に50クローンほど選び、ドットプロットにより外勤蜂特異的発現をするものについて塩基配列を解析した。

そのうちの一つのクローン (f1-6) については、ホモロジー検索の結果から、種々の生物の *amylase* と高い相同性を有し、ミツバチの *amylase* のcDNA断片であると考えられた。他のクローンについては、 α -glucosidase あるいは、ホモロジー検索により有為な相同性を示さなかった産物であった。

そこで次に、f1-6 をプローブとして、ミツバチ下咽頭腺 cDNA library からスクリーニングを行い、全長をコードするcDNAの単離を試みた。

得られた陽性クローンのうち、もっとも長いインサートを持つクローンp151について、そのインサートの全塩基配列を決定した(図11)。次にp151について、とりうる最大の open reading frame から、翻訳される蛋白について、ホモロジーを有する既存の蛋白を、PIR, SWISS-PROT, PRF の各database より検索した。その結果、図12に示すように、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の amylase precursor gene (Boer, Hickey 1986) からの予想翻訳産物と56.2%の相同性を示した。また、その他、各種昆虫、哺乳類などのamylaseと高い相同性を示した。

また、このクローンの翻訳産物の先頭付近から、ショウジョウバエ amylase precursor gene の予想翻訳産物とホモロジーが高く、その付近に開始メチオニンが存在しないことから、このクローンは、ミツバチ amylase の全長はコードしていないと考えられる。

第5節 セイヨウミツバチ *glucose oxidase* の cDNA cloning

glucose oxidase は、蜂蜜中にその活性が知られた酵素で、グルコースを基質とし、グルコン酸を生成する。その際に副産物として、 O_2 より H_2O_2 が発生し抗菌性を発生すると考えられている（越後、1973）これは、グルコン酸による低pH化とともに、蜂蜜の貯蔵に役立つとされている（越後・竹中、1974）。*glucose oxidase* に類似の反応を行う酵素として、*glucose dehydrogenase* があげられ、同様にグルコースを基質とし、グルコン酸を生成するが、 O_2 から H_2O_2 が生じる代わりにNADやNADP⁺を用いる。

したがって、その酵素活性の類似性から、*glucose oxidase* は、構造的に *glucose dehydrogenase* と相同性が高いであろうと予想された。

さて、この項で述べる、*glucose oxidase* の cDNA は、以下に述べるように、cDNA library のアーティファクトとして偶然得ることができた。すなわち、前項の、ミツバチ下咽頭腺 cDNA library からの *amylase* の cloning の際に、陽性クローンのひとつとして、2種類の cDNA からなるクローンが得られた (pA15)。このクロー

ンは、塩基配列を解析した結果、目的とするamylase cDNA の前部に他の cDNA が結合した、cDNA library 作成時のアーティファクトであった。この、amylase cDNA の前部に結合した配列 (A15-2) について、ホモロジーを有する既存の塩基配列を、GenBank から検索したところ、ショウジョウバエの glucose dehydrogenase 遺伝子と高い相同性を有していることがわかった。したがって、A15-2 は、蜂蜜中に含まれる glucose oxidase の塩基配列の一部である可能性が考えられた。

そこで、この断片がコードする cDNA の全長を得る目的で、A15-2 をプローブとして、ミツバチ下咽頭腺 cDNA library からスクリーニングを行った。約 1×10^4 クローンについてスクリーニングを行ったところ、数十個の陽性クローンが得られた。A15-2 は、この遺伝子にコードされる蛋白の開始メチオニンと考えられる部分の配列を含んでいたため、次にこの部分を挟むように primer を設計し PCR を行うことで全 open reading frame を含む cDNA の単離を試みた。陽性クローン 14 個を任意に選び、PCR で陽性であったクローン 1 個 (p61) を得た。

p61 について、約 1.9 kbp からなるインサートの全塩基配列を決

定した(図13)。とりうる最大の open reading frame から、翻訳される蛋白は、615アミノ酸残基であった。

次に、p61の予想アミノ酸配列とホモロジーを有する既存の蛋白を、PIR, SWISS-PROT, PRF の各database より検索した。その結果、ショウジョウバエの glucose dehydrogenase precursor gene (Krasney *et al.* 1990) からの予想翻訳産物と44.1%の相同性を示した(図14)。また、カビ(*Aspergillus niger*)の glucose oxidase (Frederick *et al.* 1990)とも、約24%の相同性を示した(図15)。さらに、alcohol dehydrogenase などの参加還元に関わる酵素とも相同性を示した。

これらの結果は、p61にコードされている蛋白が、ミツバチ glucose oxidase である可能性が高いことを示す結果である。

第6節 働き蜂の行動変化にともなうローヤルゼリー蛋白群、 および糖代謝酵素群の遺伝子発現の解析

下咽頭腺の機能転換が遺伝子発現のレベルで調節されているかどうかを調べた。方法は、内勤蜂下咽頭腺、外勤蜂下咽頭腺について、それぞれ total RNA を抽出し、ローヤルゼリー蛋白群および糖代謝酵素群の cDNA 断片をプローブに用いて、ノザンプロット法をおこなった。

その結果、ローヤルゼリー蛋白遺伝子については、50kと64kDa-蛋白遺伝子が内勤蜂で非常に強く発現することがわかった(図16)。また、56kDa蛋白遺伝子は内勤蜂と外勤蜂の両方でシグナルが検出され、バンド強度は内勤蜂のほうが強かった(図16)。したがって、ローヤルゼリー蛋白については、50kDaと64kDaは転写レベルで発現していたものが、外勤蜂になる際には、転写がオフになることが示された。また、56kDa蛋白遺伝子は内勤蜂と外勤蜂の両方にmRNAが検出されることから、翻訳レベルで抑制がなされている可能性も考えられる。

一方、蜂蜜の生成に関わると考えられる糖代謝遺伝子群についての結果を、図17に示す。その結果、 α -glucosidase、amylase、また、glucose oxidaseの三者いずれもが、外勤蜂に特異的に発現することが分かった。したがって、これら糖代謝酵素群の遺伝子発現は、それぞれの酵素としての基質が異なるにも関わらず、外勤蜂になると転写がオンになる制御を受けていると考えられる。

以上の結果から、ローヤルゼリー蛋白遺伝子、および糖代謝遺伝子について調べた6種類の産物のうち、56kDa蛋白を除くほとんどのものが転写レベルで発現調節されていることが明らかとなった。このことは、内勤蜂から外勤蜂への働き蜂の行動変化に伴って、ローヤルゼリー蛋白群から糖代謝酵素群へと、下咽頭腺の遺伝子発現の様式が大きく転換することを示している。

第7節 考察

本章では、まず、ローヤルゼリー蛋白群、および、 α -glucosidase, amylase, glucose oxidaseのcDNA cloningを行った。これらのcDNAが、ミツバチから単離されたのは本研究が初めてである。さらに、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴う、これら遺伝子の発現変化を調べた。その結果、56kDa蛋白遺伝子を除いた、6種類中5種類の産物について、分業に伴う発現変化が遺伝子のレベルで調節されていることがわかった。

現在のところ、これらローヤルゼリー蛋白の生化学的な機能は不明である。だが、幼虫に摂取され、消化されることを考えると、おそらくは、幼虫の餌としての栄養蛋白であろうと考えられる。さて、幼虫の餌について、ミツバチにおいて興味深い知見として、女王蜂の分化があげられる。女王蜂と働き蜂は、遺伝的には同じであり、その違いは、与えられるローヤルゼリーの量であるということが知られている。働き蜂と女王蜂とで、与えられるローヤルゼリー蛋白の質が異なっているのかどうかについてはまだ明らかではないが、

これらローヤルゼリー蛋白に様々なファミリーが存在することから考えると、これらの蛋白の割合や量が、女王蜂の発生の際の決定に必要な機能を担っているのかもしれない。

また、これらローヤルゼリー蛋白は、構造的にはショウジョウバエの *yellow protein* とアミノ酸配列が類似しているという特徴がある。このことは、おそらくローヤルゼリー蛋白と *yellow protein* は、進化的に同一の起源であることを示しているように思われる。*yellow protein* は、現在のところ、機能は不明であるが、ショウジョウバエにおいて、表皮の色素沈着に関与すると考えられている蛋白である。さて、幼虫に、餌として自分の分泌物を与えるという行動を行うのは、おそらくはハナバチの一部であり、比較的限られた種において進化の後のほうで獲得された現象と考えられる。このことから考えると、ミツバチは、ローヤルゼリー蛋白の遺伝子を、全く新たに栄養蛋白遺伝子として獲得したというよりはむしろ、自分自身既に持っていた *yellow protein* 遺伝子を改編し、コピー数を増やして、ローヤルゼリー蛋白遺伝子としたのではないかと考えられる。

3種類のローヤルゼリー蛋白(50, 56, 64kDa蛋白)についてノザンプロット解析を行った結果は、50kDa蛋白と64kDa蛋白が内勤蜂で強く発現しているのに対して、56kDa蛋白は、内勤蜂、外勤蜂ともに発現していることを示している。これらの蛋白は、構造上は相互に約60%の相同性を示しファミリーを形成している。また、上で述べたように、進化上、比較的に後になって獲得された蛋白であり、おそらくは遺伝子の重複により生じたものと考えられる。しかしながら、その構造の類似にも関わらず、遺伝子発現では、明らかに異なった制御を受けており、非常に興味深い点である。

これら3種類のローヤルゼリー蛋白に関して、イムノプロット解析によりその蛋白発現を調べた結果は、56kDa蛋白をも含め、いずれの蛋白も、内勤蜂に特異的な発現を示している。したがって、56kDa蛋白は、もしかすると、翻訳レベルでの制御を受けているのかもしれない。

今のところ、56kDa蛋白遺伝子が外勤蜂でも発現が持続することについて、私が考えている仮説は以下のようなものである。Roeschらは、コロニーから内勤蜂を除いた際に、外勤蜂が育児を行うようになることを述べている(Rosch, G. A. 1930)。この実

験結果については、実験デザインは異なるが、下咽頭腺の蛋白発現レベルでは明確な追試はできなかった（第4章・第6節）。しかしながら、このような場合が生じた際に、外勤蜂が緊急にローヤルゼリー蛋白を合成することが必要になり、常に56kDa蛋白の遺伝子発現が生じていることが役立っているのかもしれない。内勤蜂のみが失われてしまうような状況は、実際には、自然の状態では生じにくいと考えられるが、下咽頭腺が、外勤蜂から内勤蜂の状態へと逆に移行するのにも、おそらく、ある程度の時間がかかってしまうのであろう。

また、結果には述べなかったが、ここで、個体ごとに発現の異なる内勤蜂特異的蛋白（おそらくローヤルゼリー蛋白）についてふれておく。詳しくは第4章に示すが、コロニー内の内勤蜂、外勤蜂の割合を調べるために、各個体ごとの下咽頭腺の蛋白パターンを解析した。その際に内勤蜂の発現パターンを示す個体について着目すると、分子量60~70kDa付近に各個体ごとに発現パターンの異なる蛋白が4種類ほど観察された（図28A、図29A）。

これらの蛋白は、外勤蜂では観察されず、内勤蜂では、各個体ご

とに、全く発現していない個体から、2~3種類が適当な組み合わせで発現している個体まで様々であった。また、これらの蛋白は、内勤蜂特異的であること、全蛋白中の割合が比較的高い(約10%)こと、というローヤルゼリータンパクの持つ特徴を有していた。

これらが本当にローヤルゼリー蛋白であるかをまず示すことが重要であるが、おそらくは、64kDaローヤルゼリー蛋白も、SDS-PAGEから判断すると、発現している個体と発現していない個体が存在するようである。

今のところ、個体ごとに発現する意義については不明だが、興味深い観察結果として、内勤蜂の中でも、細かい分業があることが知られており、もしかしたら、この蛋白の発現は、この細かい分業に対応しているかもしれないという可能性がある。すなわち、育児という作業でも、もっぱら1齢~2齢の若い幼虫を世話する個体もいれば、3齢、4齢といった幼虫を世話専門の個体という分業が内勤蜂の中でさらに細かく存在する。したがって、これらの蛋白の発現パターンと個体ごとの行動の関連の解明は、もしかしたらローヤルゼリー蛋白の機能を明らかにする手がかりとなるかもしれない。

外勤蜂下咽頭腺からは、3種類の糖代謝に関与する酵素、 α -glucosidase、amylase、glucose oxidaseのcDNAをそれぞれ単離した。これらの酵素は、いずれも蜂蜜中に活性が検出されていたものであるが、本研究の結果から、これらの酵素がいずれも下咽頭腺由来であることがはじめて明らかとなった。さらに、外勤蜂下咽頭腺において、 α -glucosidaseだけではなく、amylase、glucose oxidaseも発現することがわかったことから、外勤蜂下咽頭腺が、蜂蜜の生成のために糖代謝酵素の合成を行う器官となっていることが明らかとなった。

α -glucosidaseについては、修士課程で精製した蛋白の構造をもとにcDNAを得たが、一次構造的にも、ショウジョウバエや蚊のmaltaseと相同性が高く、 α -glucosidaseである、という結果を裏付けるものであった。

また、amylaseについては、蛋白自体は、ミツバチからはまだ同定されていないが、おそらく外勤蜂特異的な発現をすることから考えて、蜂蜜中に分泌される下咽頭腺に特異的なサブタイプであろうと考えられる。

これら二つの酵素は、ともに他の昆虫では唾腺で発現する蛋白であるが、ミツバチにおいて下咽頭腺で外勤蜂特異的に発現するようになったかは下咽頭腺の由来を考える上で興味深い問題である。

glucose oxidaseについては、蜂蜜中にその活性は知られていたが、その構造は不明であった。今回単離したcDNA、p61に関しては、外勤蜂特異的に発現し、カビのglucose oxidaseや、活性の類似したショウジョウバエの glucose dehydrogenaseと、相同性が高いことから、おそらくミツバチ glucose oxidaseのcDNAであると考えられる。glucose oxidaseには、酵素反応の精製産物であるグルコン酸によるpHの上昇と、反応の際に同時に生じる H_2O_2 より、蜂蜜の保存効果を高めるという興味深い作用が予想されている。このcDNAからリコンビナント蛋白を作製し、グルコース依存の抗菌活性が検出されるかどうかは、今後の課題である。

また、これら3種類の糖代謝酵素遺伝子は、いずれも外勤蜂特異的な遺伝子発現を示した。したがって、これら糖代謝酵素群の遺伝子発現は、蛋白の一次構造や、それぞれの酵素としての基質が異なるにも関わらず、ローヤルゼリー蛋白とは対照的に、共通の制御を

受けている可能性が考えられる。このことは、内勤蜂から外勤蜂への移行に伴う下咽頭腺の機能転換が、大腸菌における β -galactosidaseの誘導などのように、単に、花蜜中のショ糖のシグナルにより、 α -glucosidaseが誘導されたという単純なものではないことを示している。この結果は、この章の最初にも述べたが、組織の状態を特徴づける機能分子の発現という意味では、組織自体の性質が変わったことを強く示している。

本章の結果は、働き蜂の行動変化に伴って、ローヤルゼリー蛋白群から糖代謝酵素群へと、下咽頭腺の遺伝子発現の様式が大きく転換することを明らかにした。このことは、下咽頭腺の機能が、あたかも乳腺から消化腺へと転換することを示している。

もしも、分化というものが、細胞の分化状態を特徴づける機能分子の合成によって定義づけられるのならば、下咽頭腺は、内勤蜂の時には、ローヤルゼリーを合成する状態への分化を、外勤蜂の時には、蜂蜜生成のための糖代謝酵素の合成する状態への分化を、それぞれとっている、と考えることは可能である。すなわち、下咽頭腺

の機能が働き蜂の行動変化に伴って転換する、ということは、言い換えれば、下咽頭腺は、働き蜂の行動変化に伴って分化転換している、と述べることも可能かもしれない。

第2章

図表

10 20 30 40 50 60
 TTCACGTACAATATCCATTGCTTCGTTACTCGCAGCTTAGAAAAATGACAAGATTGTT
 M T R L F

70 80 90 100 110 120
 ATGCTGGTATGCCCTTGGCATAGTTTGTCAAGGTACGACAGGCAACATTCCTCGAGGAGAG
 M L V C L G I V C Q G T T G N I L R G E

130 140 150 160 170 180
 TCTTTAAACAAATCATTACCCATCCTTCACGAATGGAATTCCTTGATTATGATTCGGT
 S L N K S L P I L H E W K F F D Y D F G

190 200 210 220 230 240
 AGCGATGAAAGAAGACAAGATGCAATTCTATCTGGCGAATACGACTACAAGAATAATTAT
 S D E R R Q D A I L S G E Y D Y K N N Y

250 260 270 280 290 300
 CCATCCGACATTGACCAATGGCATGATAAGATTTTGTCCACATGCTGAGATACAATGGC
P S D I D Q W H D K I F V T M L R Y N G

310 320 330 340 350 360
 GTACCTTCCCTTTGAACGTGATCTAAAAAGTCCGGTGATGGTGGTCCCTCTTCTACAA
 V P S S L N V I S K K V G D G G P L L Q

370 380 390 400 410 420
 CCTTATCCCGATTGGTCGTTTGGCTAAATATGACGATTGCTCTGGAATCGTGAGCGCCTCA
 P Y P D W S F A K Y D D C S G I V S A S

430 440 450 460 470 480
 AAATTGCGATCGCAAAATGCGACAGATTGTGGGTTCTGGACTCAGGTCTTGTCAATAAT
 K L A I D K C D R L W V L D S G L V N N

490 500 510 520 530 540
 ACTCACCCATGTGTTCTCCAAAAGTCTCACCTTTGATCTGACTACCTCGCAATTGCTC
E Q P M C S P K L L T F D L T T S Q L L

550 560 570 580 590 600
 AAGCAAGTTGAAATACCACATGATGTTGCCGTAATGCCACTACAGGAAAGGGAAGATTA
 K Q V E I P H D V A V N A T T G K G R L

610 620 630 640 650 660
 TCATCTTAGTGTTCATCTTTAGATTGCAATACAAATAGCGATACTATGGTGTACATA
 S S L A V Q S L D C N T N S D T M V Y I

670 680 690 700 710 720
 GCAGACGAGAAAGGTGAAGTTTAAATCGTGTATCATAATCTGATGATTCCTCCATCGA
 A D E K G E G L I V Y H N S D D S F H R

730 740 750 760 770 780
 TTGACTTCCAACACTTTCGATTACGATCCTAAATTTACCAAAAATGACGATCGATGGAGAA
 L T S N T F D Y D P K F T R M T I D G E

790 800 810 820 830 840
 AGTTACACAGCCCAAGATGGAATTTCTGGAATGGCTCTTAGTCCCATGACTAACAAATCTC
 S Y T A Q D G I S G M A L S P M T N N L

850 860 870 880 890 900
 TATTACAGTCCTGTAGCTCCACCAGTTTGTATTATGTTAACACGGAAACAATTCAGAACA
 Y Y S P V A S T S L Y Y V N T E Q F R T

910 920 930 940 950 960
 TCCGATTATCAACAGAATGACATACATTACGAAGGAGTCCAAAATATTTGGATACCCAA
 S D Y Q Q N D I H Y E G V Q N I L D T Q

970 980 990 1000 1010 1020
 TCGTCCGCTAAAGTAGTATCAAAGAGTGGCGTTCCTTCTTCGGATTGGTGGCGATTCA
 S S A K V V S K S G V L F F G L V G D S

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GCTCTTGGCTGCTGGAACGAACATCGAACACTTGAAAGACACAATATCCGTACCGTCCGT
 A L G C W N E H R T L E R H N I R T V A

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CAAAGTGATGAGACTCTTCAAATGATCCGTAGCATGAAGATTAAGGAAGCTCTTCCACAC
 Q S D E T L Q M I A S M R I K E A L P H

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTGCCTATATTCGATAGGTATATAAACCGTGAATACATATGGTTTTAAGTAACAAAATG
V P I F D R Y I N R E Y I L V L S N K M

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CAAAAATGGTGAATAATGACTTCAACTTCGACGATGTTAACTTCAGAATTATGAACGCG
 Q K M V N N D F N F D D V N F R I M N A

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AATGTAACGAATTGATATTGAACACTCGTTGCGAAAATCCCGATAATGATCGAACACCT
 N V N E L I L N T R C E N P D N D R T P

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TTCAAAATTTCAATCCATTTGTA AAAATCTGAGTTTTTGTATATATAAATATTTCTCG
 F K I S I H L *

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AAATTTCTTCCATTATGAATGTATAAAATAAATATGTTTTTCGCATAAAAAAAAAAAAA

1450
 AAAAAA

図3 56kDaローヤルゼリー蛋白 cDNA (p56-4) の核酸配列と予想アミノ酸配列

上段に核酸配列を、下段に予想アミノ酸配列を示す。決定した部分アミノ酸配列は下線で示した。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。終止コドンと poli A 付加シグナルはそれぞれ、アステリクスと二重の下線で示した。

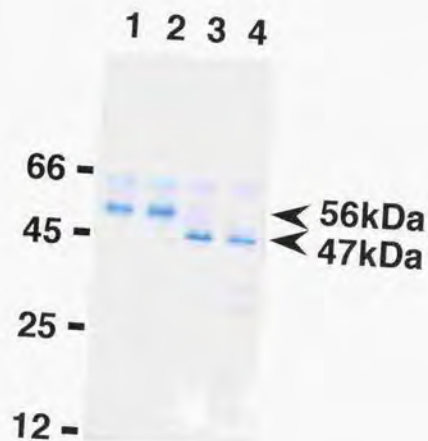


図4 N-glycosidase Fによる56kDaローヤルゼリー蛋白の脱糖処理
 レーン1; 精製56kDa蛋白、2; 精製56kDa蛋白+0U N-glycosidase F、3; 精製
 56kDa蛋白+0.03U N-glycosidase F、4; 精製56kDa蛋白+0.3U N-glycosidase F、
 をそれぞれSDS-PAGEにより解析した。

10	20	30	40	50
MTKWLLLVVC	LGIACQDVTS	AAVNHQRKSA	NNLAHSMKVI	<u>YEWKHIDFDF</u>
60	70	80	90	100
<u>GSDERRDAAI</u>	KSGEFDHTKN	<u>YFPDVDRWRD</u>	KTFVTIERNN	GVPSSLNVVT
110	120	130	140	150
<u>NKKGKGGPLL</u>	<u>RPYPDWSFAK</u>	YEDCSGIVSA	FKIAVDKFDK	LWVLDSGLVN
160	170	180	190	200
NNQPMCSPKL	LTFDLKTSKL	VRQVEIPHNI	<u>AVNATTGMGE</u>	LVSLAVQAID
210	220	230	240	250
RTNTMVYIAD	<u>EKGEGLIMYQ</u>	<u>NSDDSFHRLT</u>	SNTFDYDPRI	<u>TKLTVAGESF</u>
260	270	280	290	300
<u>TVKNGIYGIA</u>	LSPVTNNLYY	SPLLSHGLYY	VDTEQFSNPQ	YEENNVQYEG
310	320	330	340	350
SQDILNTQSF	GKVVSKNGVL	FLGLVNGSGI	ACVNEHQVLQ	RESFDVVAQN
360	370	380	390	400
EETLQMIVSM	KIMENLPQSG	RINDPEGNEY	MLALSNRMQK	IINNDPFDND
410	420	430	440	450
VNFRILGANV	DDLNRNTRCG	RYHNQAGNQ	NADNQADNQ	NANNQADNQ
460	470	480	490	500
NANKQNGNRQ	NDNRQNDNKQ	NGNRQNDNKQ	NGNRQNDNKQ	NGNRQNGNKQ
510	520	530	540	
NDNKQNGNRQ	NDNKRNGNRQ	NDNQNNQNDN	NRNDNQVHHS	SKLH

図5 64kDaローヤルゼリー蛋白の予想アミノ酸配列
決定した部分アミノ酸配列は下線で示した。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。

10 20 30 40 50 60
 TGTCACTCGTAAAAATATCTGCAGTATCTAAAAAATGACAAGGTGGTTGTTTCATGGTGGC
 M T R W L F M V A

70 80 90 100 110 120
 ATGCCTCGGCATAGCTTGTCAAGGCGCCATTGTTTCGAGAAAATTCTCCAAGAAACTTGGG
 C L G I A C Q G A I V R E N S P R N L E

130 140 150 160 170 180
 AAAATCATTGAACGTAATTCACGAATGGAAGTATTTTGATTATGACTTCGGTAGCGAAGA
 K S L N V I H E W K Y F D Y D F G S E E

190 200 210 220 230 240
 AAGAAGACAAGTGGCATTCAATCTGGCGAATATGACCATACGAAAAATTATCCCTTCGA
 R R Q A A I Q S G E Y D H T K N Y P F D

250 260 270 280 290 300
 CGTCGATCAATGGCGTGATAAGACTTTGTCCACTACTAAGATACGATGGTGGTCCCTC
 V D Q W R D K T F V T I L R Y D G V P S

310 320 330 340 350 360
 TACTTTGAACGTGATATCTGGTAAACTGGTAAGGTGGACGACTTTTAAACCATATCC
 T L N V I S G K T G K G G R L L K P Y P

370 380 390 400 410 420
 TGATTTGGTCGTTTCAGAGTTTAAAGATGCTCTAAAATTGTGAGCGCTTTCAAATTCG
 D W S F A E F K D C S K I V S A F K I A

430 440 450 460 470 480
 GATTGACAAATTCGACAGATTGGGGTTTTGGATTCCAGGTCTTGTCAATAGAACTGTACC
 I D K F D R L W V L D S G L V N R T V P

490 500 510 520 530 540
 TGTATGTCTCAAAGTTGCACGCTTTTGATCTGAAAACCTCAAATCACCTTAAGCAAAT
 V C A P K L H V F D L K T S N H L K Q I

550 560 570 580 590 600
 CGAGATACCGCATGATATTGCCGTGAATGCCACCACAGAAAGGGAGGGCTAGTGTCTTT
 E I P H D I A V N A T T G K G G L V S L.

610 620 630 640 650 660
 GGCTGTTCAAGCTATAGACTTTGCAAATACCTTTAGTGTACATGGCAGACCATAAAGGTGA
A V Q A I D L A N T L V Y M A D H K G D.

670 680 690 700 710 720
 TGCTTTAATCGTCTACCAAATGCCGATGATTCCTTCCATCGATTGACTTCCAACACTTT
A L I V Y Q N A D D S F H R L T S N T F

730 740 750 760 770 780
 CGACTACGATCCCAGATATGCCAAAATGACGATCGATGGAGAAAGTTTCACACTGAAAAA
 D Y D P R Y A K M T I D G E S F T L K N

790 800 810 820 830 840
 TGGAATTTGGGAATGGCTTTAGTCCCGTGACGAACAATCTTTATTACAGTCTCTCCG
 G I C G M A L S P V T N N L Y Y S P L A

850 860 870 880 890 900
 TTCTCACGGTTTGTATTATGTTAACACGGCACCATTATGAAATCACAATTTGGAGAAAA
 S H G L Y Y V N T A P F M K S Q F G E N

 910 920 930 940 950 960
 TAACGTCCAATACCAAGGATCCGAAGATATTTTGAACACGCAATCGTTGGCTAAAGCAGT
 N V Q Y Q G S E D I L N T Q S L A K A V

 970 980 990 1000 1010 1020
 ATCGAAAAATGGCGTCTCTCGTCGGACTTGTGGTAATTCAGCTGTTGGCTGCTGGAAC
 S K N G V L S S D L W V I Q L L A A G T

 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GGCATCAATCACTTCAGAGACAATTTTAGAATGGTCGCTCAAATGACAGAACACTTCA
 A S I T S E T I L E L V A Q I D R T L Q

 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AATGATCGCAGGTATGAAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTTCGTAGGAAGCAACAACC
 M I A G M K I K E E L P H F V G S N K P

 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TGTAAGAGATGAATATATGTTAGTTTAAAGTAACAGAAATGCAGAAAAATAGTAAATGATGA
 V R D E Y M L V L S N R M Q K I V N D D

 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TTTTAATTTTCGACGATGTAACCTCCGAAATTTGGGTGCAAATGTAAGGAATTAATAAG
 F N F D D V N F R I L G A N V K E L I R

 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 ACATACTCATTTGCGTAATAAACAATCAGAATGATAACATTCAAAATACTAACAAATCAGAA
 H T H C V N N N Q N D N I Q N T N N Q N

 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TGATAACAATCAGAAGAATAACAAGAAAAATGCTAACAAATCAAAGAGTAACAATCAGAAA
 D N N Q K N N K K N A N N Q K S N N Q N

 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TGATAATTAAGTTGGTCGTTTTTCAAATTCGATTAATAAATCAATTAATATGATGTAAC
 D N

 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TAAATATCTTTTGAATATTTTCTCAATATAAACCAAATATTTTGTAAAAATCTTTTTAA

 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 ATTATATTAATAAATGAATAAAATATGTTTTTGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

 1570
 AA

図6 50kDaローヤルゼリー蛋白 cDNA (p13502) の核酸配列と予想アミノ酸配列

上段に核酸配列を、下段に予想アミノ酸配列を示す。決定した部分アミノ酸配列は下線で示した。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。終止コドンと poli A 付加シグナルはそれぞれ、アステリスクと二重の下線で示した。

64kDa	1:HTKMLLVVCLGIACQDVTSAAVNHQRKSANNLAHSHKVIYEWKHIDFDYDFGSDERRQDAI	60
56kDa	1:HT-RLFMVLVCLGIVCQG--TGNI--LR-G-ESLNKSLPILHEWFFDYDFGSDERRQDAI	54
50kDa	1:HTRWLFHVACLGIACQ---GAVV-RE-NSPRNLEKSLNVIHEWYFYDFYDFGSEERRQAAI	55
64kDa	61:KSGEPDHTKHYPPDVRIRDKTFVTIERNHGVPSSLNVVTHKKGKGPILLRYPDHSFAK	120
56kDa	55:LSGEYDYKHHYPSDIDQHNDRIFVTHLRYNGVPSLNVISKRKVGDDGPIILQYPPDHSFAK	114
50kDa	56:QSGEYDHTKHYPPDVDQIRDKTFVTILRYDGVPSLNVISGKTKGGRLLKYPDHSFAE	115
64kDa	121:YDCGSGIVSAPKIAVDRFDRLWVLDGSLVNHQPMCSPLLTFDLKESLVRQVEIPHHI	180
56kDa	115:YDCGSGIVSASKLAIDRCDRHWLDSGLVNHQPMCSPLLTFDLTFSQLLKQVEIPHDV	174
50kDa	116:FKDCSKIVSAPKIAIDRFDRHWLDSGLVNHQPMCSPLLTFDLKESLVRQVEIPHHI	175
64kDa	181:AVNATTGNGELVSLAVQAIID---RTFTMVIYIADEKGEGLIHYQNSDOSPHRLTSNTFDYD	237
56kDa	175:AVNATTGKGRVSSLAQGLSLOCHTNSDTHVIYIADEKGEGLIVYHNSDOSPHRLTSNTFDYD	234
50kDa	176:AVNATTGKGRVSLAVQAIID---LANTLVYHADRKGDALIVYQADDSPHRLTSNTFDYD	232
64kDa	238:PRYTKLVAGESPVTKNGIYGIASPVTHNLYSPLLSHGLYVDTQVSNPQYEEHNVQ	297
56kDa	235:PKFTKMTIDGESYTAQDQISGMALSPMTHNLYSPLLSHGLYVDTQVSNPQYEEHNVQ	294
50kDa	233:PRYAKMTIDGESFTLNGICGMALSPVTHNLYSPLLSHGLYVDTQVSNPQYEEHNVQ	292
64kDa	298:YESSQDILNTQSPGRVVRKNOVFLGLVHNSGICVNEHQVLQRESFDVVAQNEETLQMI	357
56kDa	295:YEGVQNILDTQSSAARVVRKNOVFLGVLGDSALGCWNEHRTLERHNRITVAQSDTELQMI	354
50kDa	293:YQSEDILNTQSLARAVSRKNOVLSLWVQLLA-AGTASITSETILELVAQIDRTELQMI	351
64kDa	358:VSHKIHENLPQSGRINDPEGNETHLALSHRHRQKIIHNDPFNFDVNFRIILGANVDDLHRRT	417
56kDa	355:ASHRIKELPHVPIFDRIYHREYILVLSNKHQKRVNDPFNFDVNFRIIMHNAVHELILRT	414
50kDa	352:AGHKIKELPHFVGSNKPVRDEYHLVLSRRHRQKIVNDPFNFDVNFRIILGANVDELIRRT	411
64kDa	418:RCGRYHQQNAGNQADNQADHQNANNQADHQNANKQNGRQNDNRQNDHKNQNGRQND	477
56kDa	415:RCENPDHRTPPKRSIHL-----	432
50kDa	412:HCVH-NHQNDHIQNTNHQNDHKNKKNHANNQKSNHNDN-----	451
64kDa	478:NKQNGRQNDNKQNGRQNGKQNDKQNGRQNDHKNRQNDHKNRQNDHKNRQNDHKNRQND	537
56kDa	433:-----	
50kDa	452:-----	
64kDa	538:HHSSKLE	544
56kDa	433:-----	
50kDa	452:-----	

図7 ローザゼリー蛋白 (64kDa-, 56kDa-, 50kDa蛋白) の予想アミノ酸配列の比較
 相同性が最大になるように、ギャップを挿入した。三者で共通するアミノ酸を赤い文字で示した。

[29.1% / 409 aa]

```
1' MTRLFMLVCLGIVCQGTGNILRGESLNKSLPILHEWKFFDYDFGSDERRQDAILSGEYD
      * * * * *
1"      MFQDKGWLIVLTLITLVTPSWAAYRLQERYSWSQLDFAPNTRLKQDALASGDYI
61' YKNNYPSDIDQWHDKIFVTMLRY-NGVPSSLNVI SKKVG-DGGPLLQEPDWSFAKYDDC
      * * * * *
55" PQNALPVGVEHFGNRLFVTVPRWRDGI PATLTYINMDRSLTGSPELIPYPDWRSENTAGDC
119' --SGIVSASKLAIDKCDRLWVLD SGLV---NNTQPMCS PKLLTFDLTTSQLLKQVEIPHDV
      * * * * *
115" ANSITTA YRIKVD ECGRLWLD TGT VGI GNTT TNP CYAVNVFDLTTDTRIRRYELP-GV
175' AVNATGKGRSLSSLA VQSLDCNTNSDTMVYI ADEKGEGLIVYHNSDDSFHRLT SNTFDY-
      * * * * *
174" DTNPNTFIANI-AVDIGK-NC---DDAYAYFADELGYGLIAYSWELNKS WRFSAHSYFFP
234' DPKFTKMTIDGESYT-AQDGISGMALSPM---TNNLYSPVASTSLYYVNT EQFRTSDY
      * * * * *
229" DPLRGDFNVAGINFQWGE EGF GMSLSPI RSDGYRTLYF'SPLASHRQFAVSTRILRDETR
289' QQNDIH-YEGVQNI-LDTQSSAKV VSKSGVLF FGLVGD SALGCWNEHRTL ERHNIRTVAQ
      * * * * *
289" TEDSYHDFVALDERGPN SHTTSRVMSDDGIELFN LIDQNAVGCWHSSMPYSPQFHGIVDR
347' SDETLQMIASMKI KEALPHVPI FDRYINREYILVLSNKM QKMVNNDNFDDVNFRI MNAN
      * * * * *
349" DDVGLVFPADVKIDE-----NKNV-----WVLSDRMPVFLSDDL DYSDTNFRIY TAP
407' VNELILNTRCENPDNDRTPFKIS IHL
      * * * * *
396" LATLIENTVCDLRNNAYGPNTVSI PKQAVLPMGPPLYTKQYRPVLPQKPQTSWASSPPP
```

図8 セイヨウミツバチ 56kDaローヤルゼリー蛋白 とショウジョウバエの *yellow protein* の予想アミノ酸配列の比較

上段にセイヨウミツバチ 56kDaローヤルゼリー蛋白を、下段にショウジョウバエ *yellow protein* を示す。相同性が最大になるように、ギャップを挿入した。共通するアミノ酸をアスタリスクで示した。

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 TCGATTTAACGCTACTACTATTAATATATTGCAGCTTCTAGTTGGTAGCATGAAGGCAAGTAATCGATTTCGCTTATGGCATTGTCCATTG
 M X A V I V F C L M A L S I V

100 110 120 130 140 150 160 170 180
 TGGACGACAGCATGGAAGCCGCTCCCTGAAAACCTGAAGGAGGACTTGGATCGTGTATCAGGTCTACCCGAGAAGCTTCAAGGATAGCAATG
 D A A W K P L P E N L K E D L I V Y Q V Y F R S F K D S N G

190 200 210 220 230 240 250 260 270
 GAGATGGTATTGGTGTATCGAAGGTATTAAGAAAAATGGATCATTTCCTCGAAATCGGGGTTCGACATGTTTGGTATTCCCTATTT
 D G I G D I E G I K E K L D H F L E M G V D M F W L S P I Y

280 290 300 310 320 330 340 350 360
 ATCCAGCCCTATGGTCGATTTGGTTACGACATTCGAATTACACCGACGTTCCATCCCATATTTGGCCACCATATCAGACTTACGATTAATC
 P S P M V D F G Y D I S N Y T D V H P I F G T I S D L D N L

370 380 390 400 410 420 430 440 450
 TAGTCAGTCTCGACATGAGAAAGGATTGAAGATAATCTGGATTTCGTCGCCAATCATACTGTGATCAACACGAATGGTTCAGTGA
 V S A A H E K G L K I I L D F V P N H T S D Q H E W F Q L S

460 470 480 490 500 510 520 530 540
 GTTTGAAAACATTGAACCTTATAACAACATTAACATTTGGCATCCAGGAAAAATGTAAATGGCAAACGCTTCCACCACTAAATGGG
 L K N I E P Y N N Y Y I W H P G K I V N G K R V P P T N W V

550 560 570 580 590 600 610 620 630
 TAGCCGTGTTGGTGGATCAGCTTGGTCGTGCGGGGAAGAAGACAGGCATATTAATCTGCATCAATTTGCACCAGAACCAACAGATCTAA
 G V F G G S A W S W R E E R Q A Y Y L H Q F A P E Q P D L N

640 650 660 670 680 690 700 710 720
 ATTACTATAATCCAGTGTACTGGATGATGCAAAATGTTCTCAGATTCGGCTGAGAAGGGGATTTGATGGTTTCAGAGTAGATGCTC
 Y Y N P V V L D D M Q N V L R P W L R R Q F D G F R V D A L

730 740 750 760 770 780 790 800 810
 TGGCTTACATTTGGAGACATCCGATTTAGACGAACCTCTATCAGGTGAAACAAATGATCCCAATAAAACGGAGTCACTCTCAAGA
 P Y I C E D M R F L D E P L S G E T N D P N K T E Y T L K I

820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TCTCACTCACGATATCCGAGAAACCTACAATGTAGTTCCGCAATTTAGAGATGTGTAGACGAATTCGCGCAACCAAAACACATGCTTA
 Y T H D I P E T Y N V V R K F R D V L D E F P Q P K H M L I

910 920 930 940 950 960 970 980 990
 TCGAGCATACAGATTTATCGATGACCATGAATATACGATTACGGAGCAGATTTCCCTTCAATTTTGCATTCATCAAGAATGTTT
 E A Y T N L S M T M K Y Y D Y G A D F P P N F A F I R N V S

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTAGGGATTCAAATTCATCAGACTTCAAAAAATTTGGTGTATTAATGGATGACGTACATGCCACCAAGTGGTATTCCTCAACTGGGTGCCCG
 R D S N S S D F K K L V D N W M T Y M P P S G I P N W V E G

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 GAAATCAGCATCAATGAGATTGGTGTGAGATTTGGAGAGGAGAAGGCCCGTATGATCACCACGATGTGCTTTTCTGCCAGTGTG
 N H D Q L R L V S R F G E E K A R M I T T M S L L L P G V A

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCCTGAATTACTACGGTGATGAAATGGTATGTCGGATACTTATATCTCGTGGGAGCATACCCAGGATCCCGAGSAGATCCGGCCCGGTA
 V N Y Y G D E I G M S D T Y I S W E D T Q D P Q C C G A G K

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 AAGAAAATTACTCAAAGGATGTCGAGAGATCCCGGAGAACGCCATTCCAATGGGACGACTCAGTTCTGCTGGATTTCTCAAGCTCTA
 E N Y Q T M S R D F A R T P F Q W D D S V S A G F S S S S N

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATACCTGGCTCGTCTCAAGAAAATTACAAGACTGTCAATCTAGCTGCTGAAAAGAAAGCAAGAACTCGTTCTTCAATATGTTCAAGA
 T W L R V N E N Y K T V N L A A E K K D K N S F F N M F K K

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
 AATTTCGGTCGCTGAAAAATCGCATACTTTAAAGAGCCCAFTTAAATACGAGGATGCTGAACGACAATGTTTTCGCATTCTCTAGGG
 F A S L K K S P Y F R E A N L N T R M L N D N V F A E S R E

1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 AAACCGAAGATAATGGATCTCTTACGCAATATGAACTTCTCGAACGAGAACAAATCGTGGATTTGAAAGCUTTCATTAACGTGCCGA
 T E D N G S L Y A I L N F S N E E Q I V D L K A F N N V P K

1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
 AAAAATTGAATATGTTTACAAATTTTAACTCTGATATAAAGTCCATCTCCAACAATGAACAAGTAAAGTTTCTCGCTTAGGATTTT
 K L N M F Y N N E N S D I K S I S N N E Q V K V S A L G F F

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TCATCTTAATCTCAAGATGCTAAATTTGAAACTTTAATTCCTCTGAAATATGCTATCTTTGAAGCGCGAAGGAAACATATA
 I L I S Q D A K P G N F *

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 TCGTTAAAACTCTCTATATATTATATATATATATATGATTAGCTAATAAATTTAAATATTTTGAACGTAACAAAAA

1900
 AA

図9 セイヨウミツバチ α -glucosidase cDNA (p70-11) の核酸配列と予想アミノ酸配列
 上段に核酸配列を、下段に予想アミノ酸配列を示す。決定した部分アミノ酸配列は下線で示した。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。終止コドンと poli A 付加シグナルはそれぞれ、アスタリスクと二重の下線で示した。

Bee alpha-glucosidase	1:M-KAVIVFPLMALSIYDAAWKPLPENLKEKLDIVQVYPRFRDSDNGKIGIGIIGIEKELKD	59
Drosophila maltase1	11:P-WAHLGLAAL.I.STTQECTADIDWM.NASL.....D.....D.....L.....L.....TSR.G	60
Drosophila maltase2	11:---MRPQSAAC.LLAIVGFVGA-TEWV.SGNY.....R.....D.....L.....L.....VT.....Q	58
Drosophila maltase3	11:---MKLLVLSLAL.LPBLAEVGVWVWVQGF.....D.....V.....L.....L.....TQQ.B	56
Mosquito maltase	11:---MKIVP.LSFL.LGLTTGLDWM.HGNV.....D.....L.....L.....VT.....K	54
Bee alpha-glucosidase	60:HFLMGVDMFWLSPITPSPMVDGVDISNYTQVRIEGLISDLONLUSAHREGLFIID	119
Drosophila maltase1	51:YK.I.ITAT.....PT.....S.....FY.ID.....L.F.D.IVE.KSL.V.....	120
Drosophila maltase2	56:YKDI.PTGT.....FR.....D.....DFYQI..EY..ME.FEEMIAK.K.V.....	125
Drosophila maltase3	57:YK.I.ITAT.....FT.....A.....VADLKGID.....ME.FEA.LAR.K.LDI.....	126
Mosquito maltase	55:YKDI.N.GV.....FG.....A.....FRMIQTEY.DLDAFOR.SDKCKQL..HL.....	124
Bee alpha-glucosidase	120:FVPMHTSDQHMFQSLKNIIEPYNNTYIWPQ--KIVNGKRVPTNWVGVGGSAWSWRE	177
Drosophila maltase1	121:.....S..ENV..EK.VNREDG.DDF.V.DD.KLNKET.A.D.....S..S..PM.T.N.	180
Drosophila maltase2	116:.....S..TEN..TK.VDSDPV.KDF.....D.KINNET.E.E.S..NSE.RY.....E.N.	175
Drosophila maltase3	117:.....ECD..TR.AAGE.E.KDF.V.PT.KVVN---E.Q.....S..R..M.E.N.	174
Mosquito maltase	115:.....Y.KK.VQKD.T.KDF.V.....VHGP.NTK.....S..IS..R..S.E.N.	173
Bee alpha-glucosidase	178:ERQAYLHQFAPEQFDLNYNPNVLDQMNVLRFWLRGDFGFRVQALFYICE----DM	232
Drosophila maltase1	181:K..Q.F.....QVK.....FT..M.REH.LD..K.....D..V.....I..V.H.Y..HRNA.G	239
Drosophila maltase2	176:V..Q.....IQ.A.....R..A.VNE.R..L.....GR.VS.....I..V..LP.VDLDRVN	235
Drosophila maltase3	175:.....HAK.....R..K.VEA.RD.....K.AY.....I..V.HVY.IEADA.G	234
Mosquito maltase	174:.....EF.....LK.....R..A.VER.F.....Y..D..VS.....I..V..LF..SDII.G	232
Bee alpha-glucosidase	233:RFLDEP---LSGETNDPNKTEVTLKIYTHDIPETYNVVRKPROVLDE----FPQKIML	284
Drosophila maltase1	240:SYV.....V..WGS.....AYD.HDH..K.Q.A.VDLMYEW.EF..NVRAQNGGDSRVL	296
Drosophila maltase2	236:QVP...LTND.VNCP..DWHC..QH.....Q.M.....IDM.YQM.ELV..FHVENGDDRLLM	295
Drosophila maltase3	235:WVP.....RNEAV--S..EDVT.LQH..T.Q.....LEL.YA.....IE.IDAELGGDRVL	291
Mosquito maltase	233:YRN.....E.RT.D..ENPA.LVHTQ.M.Q.....DMIQW.A.....YSKEDNSTRIM	288
Bee alpha-glucosidase	285:IEAYTNL---SMTMKYYDYGADFFNFAPIKVSRSDNSNSDFKLVNWM-TYMPPSGI	339
Drosophila maltase1	297:A...S.VETLSAYEGNSTHQ.TQG.M..QLM-YL.GY.TAK.VVGS.I.Y..N.MNREHOT	355
Drosophila maltase2	296:T...S.FENIMTYGNGVNR.SHI.....D.LTSINNA.KAGEVY.HIKK..D-AS.ECNY	354
Drosophila maltase3	292:T...SP.EVLMQYYGNGTHL.SQI.....ELLAQI.YS.DAYHYSE.IH..LD-N..EGGV	350
Mosquito maltase	289:T.G..S.PKIEFFGNATAN..QI.....EV.S..KKN.PGA..ATY.KR.LD-AK.ANR	347
Bee alpha-glucosidase	340:PNWVPGNHQDLRLVSRFGEKARMITMSLLPGVAVVNYGDEIGMSDTYISWEDTQDPQ	399
Drosophila maltase1	356:A..V.....TN.VAD.M.AH.VDLNIVNA..AS.T.....NV-----VE--	407
Drosophila maltase2	355:A..L.....NK.VA...VQRTDL.NLLOP..H..T.N-E-L.E.T.VN.....L.T.V.N	414
Drosophila maltase3	351:A..F.....S.IG..L.ADRIDACNMII.G.....S.T.Q.E.M.M.T.VN.....V.N	410
Mosquito maltase	348:S..L.....NN..G..L..N.IDLYNIALOT..DI..T.....E.....L.QW.P.NE.V..A	407
Bee alpha-glucosidase	400:GCCAGKENYQTMERDQARTFFQWDDSVSAGFSSSSNTLWRVNVENYKTVLNAEKKRDKRF	459
Drosophila maltase1	408:--T..D-S.CED..GE...M..TAGKN.D..DGES..PLSPS.QVY.VQV.RGVSR.S	462
Drosophila maltase2	415:A.NSDPD..YAR.....S.Y...A.SK...T.ADH...P.ADD..N.ALQQLRAPL.H	474
Drosophila maltase3	411:A.QSNQEPERLT...V.....S.E.N.....NA.V...P.AS...L..VKR.RGIAL.H	470
Mosquito maltase	408:A.RSDEAS.SAY.....M...SGKN...HAAR...P.AD.....L.VKIQDRAR.H	467
Bee alpha-glucosidase	460:FNMFKKFSALKKSPYFKEANLNRMLNDNVFAFSRETEINGSLYAILNFSNEZQIVDLKA	519
Drosophila maltase1	463:I..I..GLQE..S.SA.LAFKEGGFSYEA.TEQLVQIIRYVKQILF	
Drosophila maltase2	475:LQT...LXRV.R.E.S.RDGE.IQAD.D.IY..QVYQSRLRSFDY	
Drosophila maltase3	471:L.VY.QLRA.RDE.TL.QCDVSVTRIGP..L..K.	
Mosquito maltase	469:LKI...LTRYR.RQILT.GDIDTVSGE.LLVXK.KVDRV.YVVVA...GT.PVALG.SS	527
Bee alpha-glucosidase	520:FNVVFKLNNPYNFNFSDIKSIKSNQVQVVSALGFFLISQDARFGNF	
Drosophila maltase1		
Drosophila maltase2		
Drosophila maltase3		
Mosquito maltase	528:LFDRADORMQVWVSS.RVSTPDNWWVD.DNYV..IGESG.VLQYLN.KNPIVS	

図10 セイヨウミツバチ α -glucosidase と ショウジョウバエ と 蚊 の possible maltase gene product の 予想 アミノ酸配列 の 比較
 相同性 が 最大 に なる よう に、ギャップ を 挿入 し た。セイヨウミツバチ α -glucosidase と 共通 す る アミノ酸 を ドット で 示 し た。4 者 で 共通 す る アミノ酸 は 配列 の 下 に アスタリ スク で 示 し た。

10 20 30 40 50 60
 CCGCGATCGTGTATTGTTGGCACTGCTCACGTTGGCAGCGGGTGAATTTGCTCACAAATG
 A I V L L L A L L T L A A G E I A H N D

70 80 90 100 110 120
 ACCCAACATTTTGTCTCTGGCCACGACGCTATCGTCCATCTCTCGAATGGAATGGAACG
 P H F A P G H D A I V H L F E W K W N D

130 140 150 160 170 180
 ACATTCGGAAGAGTGGCAACAATTCCTTGGACCTGTAGGCTTTGGTGGAGTTCCAGGTAT
 I A K E C E Q F L G P V G F G G V Q V S

190 200 210 220 230 240
 CACCGGTACAAGAGAACAATAGTGATCGACAAGAGGCCATGGTGGGAACGTTATCAACCGA
 P V Q E N I V I D K R P W W E R Y Q P I

250 260 270 280 290 300
 TTTCTTACAAATGGATCACGCGGTTCGGGCACGCGAGAACAATTCATCGATATGGTGGCGA
 S Y K W I T R S G T R E Q F I D M V A R

310 320 330 340 350 360
 GATGCAACAAAGCGGGTGTACGGATCTACGTGGACGTTATAATGAACCATATGTCCGGTG
 C N K A G V R I Y V D V I M N H M S G D

370 380 390 400 410 420
 ATCGGAACGACGCGCACGGTACAGGCAACTCGAGGCGGAACACGTTACAATTTGACTATC
 R N D A H G T G N S R A N T Y N F D Y P

430 440 450 460 470 480
 CGCAAGTGCCTTACACCGTCAAAAATTTCCACCTCGTTCGCGGGTGAACAATTACAACG
 Q V P Y T V K N F H P R C A V N N N Y N D

490 500 510 520 530 540
 ACCCGTCAAACGTAAGGAACGCGAGCTGGTCCGCTCCACGACTGGATCAGAGCCAAG
 P S N V R N C E L V G L H D L D Q S Q E

550 560 570 580 590 600
 AGTACGTCAGGTCGAAGCTTGTGACTTCTCAACGATCTGGTCAACGTTGGTGTGGCCG
 Y V R S K L V D F L N D L V T V G V A G

610 620 630 640 650 660
 GTTCCGAGTGGATGTCGGAACACATGTGGCCGAGCGATTGAGAACGATTACTCGA
 F R V D A A K H M W P S D L R T I Y S R

670 680 690 700 710 720
 GAGTGAGGAATCTGAACAGGACGACGCTTCCCTAACGATGCACGCCATACATATCC
 V R N L N R T H G F P N D A R P Y I F Q

730 740 750 760 770 780
 AAGAGGTGATCGATTACGGGAACGAGGCTATCTCGAAACGGGAGTACAACGGAATGCGCG
 E V I D Y G N E A I S K R E Y N G M A A

790 800 810 820 830 840
 CGGTGATCGAGTTCAAATATTCATATGAATTTCCAATGCGTTTCGGGGGAACAATAATC
 V I E F K Y S Y E I S N A F R G N N N L

850 860 870 880 890 900
 TGAATGTTGGTAAATTTGGGAGAGCAATGGGGTTTCCCTACCCCTCGAAGGATTTCTCTCG
 K W L V N W G E Q W G F L P S K D S L V

910	920	930	940	950	960
TTTTCGTCGCAATCACGACCGCACGCAATCCTCAAATACTCACTTACAATACTC					
F V D N H D T H A T I L K Y S L T N T P					
970	980	990	1000	1010	1020
CAAACGGTACAAGATGGTGTCCGATTCATGCTGTCCCATCCATTCGGCACCCACGAATA					
N G T R W C R I H A V P S I R H P T N N					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ATGAGCTCCCTCGACTCCAAAGCAAGGATCAAGGCCGCTAATGCCGGCAATGGCAACA					
E L L R L P K Q G S R P P N A G N G N I					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TTCTGTCCCTTCGATCCAGACAACATTTGCAGCAACGGATGGATCTGTGAACACCGTT					
L S P S I H D N I C S N G W I C E H R W					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GGAGGCAAAATCTACAACATGGTTCGTTCCGCAATTTGGTCAAAGGAACGAAGATCGATA					
R Q I Y N M V R P R N L V K G T K I D N					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ATTGGTGGGATAACGGAAGCAATCAAATCCGATTCAGTCGGGGATGTTCCGGATTTGTGC					
W W D N G S N Q I A F S R G C S G F V A					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGTTCAACGGTGATCAATACGATCTCAAGAAAAATCTGAAAGTCTGTCTACCTCCTGGCC					
F N G D Q Y D L K K N L K V C L P P G Q					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
AATATTGCCGACGTGATTTCTGGTAATTTGGAGAAGGACGATGCATCGGCAAGATTTGTCA					
Y C D V I S G N L E K G R C T G K I V T					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTGTGGGATCGGATGGAATGCTAATATAGAGATCGGCGCAGGAGAAGAGGATGGAGTTTC					
V G S D G N A N I E I G A G E E D G V L					
1450	1460	1470	1480	1490	1500
TCGCCATTCACGTTAAGGCTAAAAATGGCGTAAAGAAAATCATAAGCATCAGCAGAGATTGC					
A I H V K A K M A					
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GATTGAACGAAATGAGAGTTCTTAAAAATTCATCTTACGACGAAAAAAGGTTGTATTTAA					
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TTCCTCGTAGAGCAAATAATTATTAATAATATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					
1630	1640	1650	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		

図11 セイヨウミツバチ *amylase* cDNA (p56-4) の核酸配列と予想アミノ酸配列

上段に核酸配列を、下段に予想アミノ酸配列を示す。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。終止コドンと poli A 付加シグナルはそれぞれ、アスタリスクと二重の下線で示した。

910 920 930 940 950 960
 CCGTGACCAAAAGTGAGAACGTTGAACAAGAGGGCGACGGCCGTGAACGTGTTGATCAACG
 V T K V R T L N K R A T G V N V L I N G

970 980 990 1000 1010 1020
 GGAGGAGAGGATCATATTCCGCGAGACGGGAGGTGATCCTGTCCGACGGCTCGGTGAACA
 R K R I I F A R R E V I L S A G S V N T

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTCCTCAACTGCTCATGTTGTCCGGCATAGGGCCGAAGGAACACCTTCGATCCCTGGGAA
 P Q L L M L S G I G P K E H L R S L G I

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TCCCGTGGTGGTTGATCTGCCCTGGAGTTGGCGAGAACCTTCACAATCACAATCGTTCG
 P V V V D L P G V G E N L H N H Q S F G

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCATGGATTTCCTGTTGAACGAGGACTTTTACCCGACCTTCAACCAGACCAACGTCGACC
 M D F S L N E D F Y P T F N Q T N V D Q

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AGTACCTGTACAATCAGACGGGCCCTTATCCAGCACCGGGTTGGCTCAGGTGACCGGTA
 Y L Y N Q T G P L S S T G L A Q V T G I

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TATGGCACTCGAATCTCACCACCCCGACGACCCCGACATACAGATATTCTTCGCCGGTT
 W H S N L T T P D D P D I Q I F F A G Y

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 ACCAGGCAATTTGCAAGCCAAAATTTGAAGATCGCAGATCTATCGGCCACGACAAACAGG
 Q A I C K P K L K I A D L S A H D K Q A

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CGGTGAGAATGTCCGGTGTGAACGTTACGCCGACGAGCAAGGTCGCATCACGTTGAACA
 V R M S A L N V Q P T S K G R I T L N S

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCAAAGACCCCTCGACCCCGCCGTCATCTGGAGCAACGATCTGGCCACCGAGCAGGACC
 K D P L D P P V I W S N D L A T E H D R

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GCAGCGTCATGATACAGGCGATCCGAGTCGTGCAAAAATGGTGAACACTACCGTCATGA
 S V M I Q A I R V V Q K L V N T T V M R

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GGGATCTCGGGGTCGAGTTTCAAAGATCGAACTGAAGCAATGCGACGAGTTGTCGCGAGG
 D L G V E F Q K I E L K Q C D E F V E D

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ACAGCGACGATTACTGGAACCTGCGTATACAGTACAACACGAGGGCGGAAAATCATCAGA
 S D D Y W N C V I Q Y N T R A E N H Q T

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CCGGCACGGGGAAGATGGGACCCAGTTACGATCCTATGGCGGTCGTCTCCTCCCGGCTCA
 G T A K M G P S Y D P M A V V S P R L K

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 AGGTGCACGGCATCAGGGGACTGAGAGTGGCAGACGCCCTCCGTTACGCCGAGGTGATCT
 V H G I R G L R V A D A S V Q P Q V I S

1810	1820	1830	1840	1850	1860
CGGGTAATCCTGTCGCCCTCTGTCAATATGGTCGGCGAGAGGGCTGCAGACTTTATCAAGG					
G N P V A S V N M V G E R A A D F I K E					
1870	1880	1890	1900	1910	1920
AGGATTGGGGAGAATTACTTCAATTACTGTAATCATTGTGGAGTTAACTGTACTCGTG					
D W G E L L Q L L *					
1930	1940	1950	1960	1970	
TTTTAAAGCTACGTATATATATAATAATTATTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					

図13 セイヨウミツバチ *glucose oxidase* cDNA (p61) の核酸配列と予想アミノ酸配列

上段に核酸配列を、下段に予想アミノ酸配列を示す。予想糖鎖付加部位は、四角で囲った。終止コドンと poli A 付加シグナルはそれぞれ、アスタリスクと二重の下線で示した。

[44.13 / 610 aa]

```
1' MAILNSMYNNVSPLOQTSFPLGGPQLTDVCSASNGELFLALLNFFVATSPVIGEPQQRVH
  * ..*..*
1" MSASASACDCLVGVPTGPTLASTCGGSAFMLFMGLLEVFIRSQCLEDLEPCGRAS
61' S--SRIPDLSYDFIVVGGGAAGAVVAGRLSEVSNWKVLLLEAGPDEPAGAEIPSNLQLYL
  * ..*..*
55" SRFRSEPDYDYDFIVIGGGSAGSVVASRLESEVPQWKVLLLEAGDEPVGAQIPSMFLNFI
119' GDDLWKYVTTNESHACLST-GGSCYWPRGKNLGGTTLHGMAYHRGHRKDYERWVQQA
  *..*..*
115" GSDIDYRYNTEPEPMACLSSEMQRCYWPRGKVLGGTSLVNGMMYVRGNREYDDWAADGN
178' FGWSWDEVMPYLYKSENTELSRVGTYKHSRGGMLNVERFFYPQPPFAWKILKAAEEAGFG
  *..*..*
175" PGWAYNDVLPFFKXSEDNLDLDEVGTEYHAKGGLLPVGGKFPYNPPLSYAILKAGEELGFS
238' VSEDLGSDRINGFTVAQTI SRNGVRLSSARAFITPFENRSLNHVIVNATVTK--VRTLNK
  *..*..*
235" V-HDLNGQNSTGFMAIQMTARNGIRYSSARAFLRPARMNNLHILLNNTATKILIHPTK
296' RATGVNVLIN-GRKRIIFARREVLSAGSVNTPQLMLLSCIGPKHELRSLGIPVVVDLPG
  ..*..*
294" NVLGEVSDQFGSTRKILVKKEVVL SAGAVNSPHILLSGVGPKDELQVNVRTVHNLPG
355' VGENLHNHQSGFMDPSLNEDFYPTFNQTNVDQYLYNQGTPLSSTGLAQVTGIWHSNLT-T
  ..*..*
354" VGKNLHNHYTYFTNFFIDDADTAPLNWATAMEYLLFRDGLMSGTGISDVTKLATRYADS
414' PDDPDIQIFFAGYQAICKPKLKIADLSAHDKQAVRMSALNVQPTSKGRITLNSKDPDLP
  *..*..*
414" PERPDLQLYFGGYLASCARTGQVGEILLSNNSRSIQIFPAVLNPRSRGFIGLRSADPLEP
474' VIWSNDLATEHDRSVMIOAIRVVQKLVNTTVMRDLGVEFQKIELKQCDEFVEDSDDYWNC
  *..*..*
474" RIVANYLTHERDVKTLVEGIKFVIRLSQTTPLKQYGMRLDKTVVKGCEAHAFGSDAYWEC
534' VIQYNTRAEHQGTAKMGPSYDPMVAVSPRLKVHGIRGLRVADASVQPOVISGNPVASV
  ..*..*
534" AVRQNTGPNHQAGSCKMGPSHDPMAVVNHEL RVHGIRGLRVMDT SIMPKVSSGNTHAPA
594' NMVGERAADFIKEDWGELLQLL
  *..*..*
594" VMIAEKGAYLLKRAWGAKV
```

図14 セイヨウミツバチ *glucose oxidase* とショウジョウバエの *glucose dehydrogenase precursor gene product* の予想アミノ酸配列の比較

上段にセイヨウミツバチ *glucose oxidase* を、下段にショウジョウバエ *glucose dehydrogenase precursor gene product* を示す。相同性が最大になるように、ギャップを挿入した。共通するアミノ酸をアスタリスクで示した。

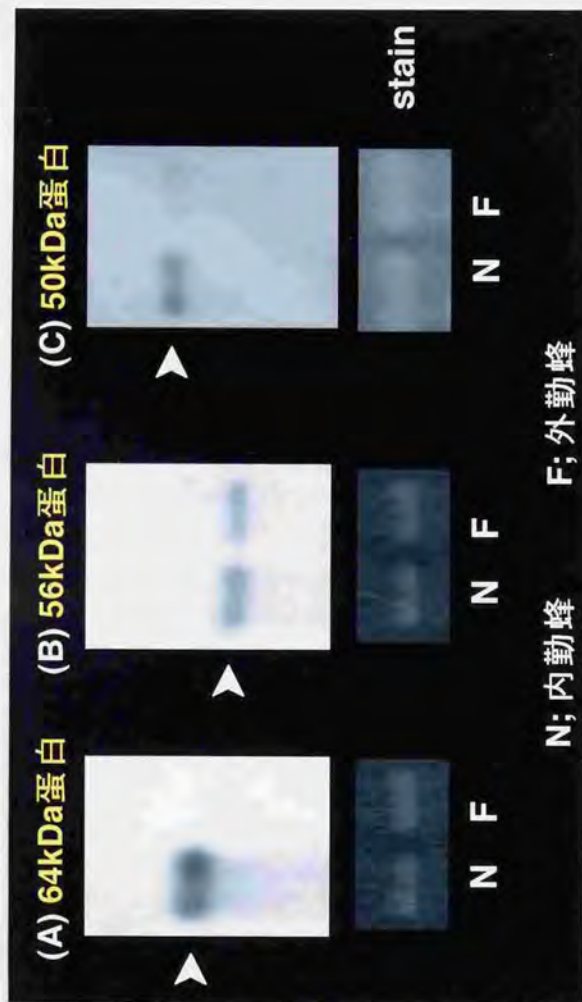


図16 働き蜂下咽頭腺のローヤルゼリー蛋白 mRNA のノザンプロット解析
 内勤蜂および外勤蜂の下咽頭腺の total RNA を、それぞれ 1 μ gずつ用いた。それ
 ぞれ、(A) 64kDa蛋白、(B) 56kDa蛋白、(C) 50kDa蛋白、についての結果を
 示す。

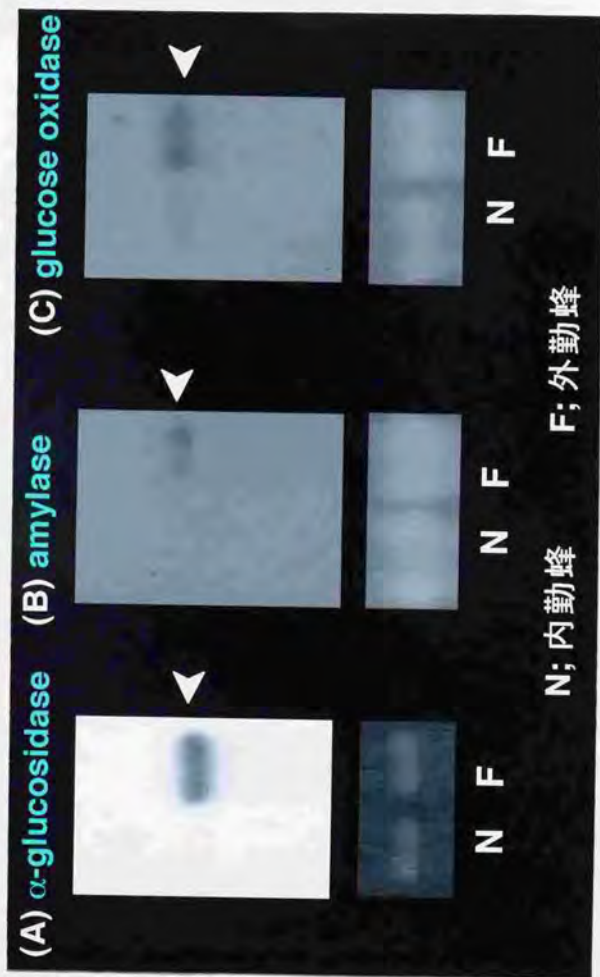


図17 働き蜂下咽頭腺の糖代謝酵素mRNAのノザンプロット解析
 内勤蜂および外勤蜂の下咽頭腺の total RNA を、それぞれ 1 μ gずつ用いた。それぞれ、(A) α -glucosidase、(B) amylase、(C) glucose oxidase、についての結果を示す。

第3章

下咽頭腺の機能転換における 遺伝子発現の細胞レベルでの 解析

第1節 序

修士課程、また、第2章で述べた結果から、下咽頭腺は内勤蜂から外勤蜂への移行に伴って、器官の機能が変化することが明らかとなった。このように組織の機能が転換する例は少なく、あまり解析が進んでいないため、そのメカニズムの解明は大変興味深い問題である。

本章では、内勤蜂、外勤蜂間で、発現の差が一番明瞭であった64kDaローヤルゼリー蛋白と α -グルコシダーゼ、および両方に発現が検出された56kDaローヤルゼリー蛋白について、それぞれ遺伝子発現を指標とし、下咽頭腺の機能転換の様式を細胞レベルで調べた結果について述べる。

図18に下咽頭腺の組織染色像を示すが、下咽頭腺は約15個の分泌細胞が集まってできた分泌腺（濃い紫に染まった核が、数個存在している）が多数、ダクトにつながった構造をしており、分泌顆粒が非常に発達している。

下咽頭腺の機能転換については、以下の2つのモデルが可能性として考えられる（図19）。

モデル1；同一の細胞が機能転換する、すなわち、1つの細胞が2つの機能を持ちうる。

モデル2；細胞ごとに機能が分担されており、異なる細胞が別々の蛋白を発現する。

下咽頭腺の機能転換がもし、同一の細胞で生じるのであれば、ローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseのmRNAはそれぞれ、内勤蜂と外勤蜂の全ての分泌腺細胞で検出され、全体にシグナルを与えると予想される。一方、異なる細胞が別々の遺伝子を発現するのであれば、ローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseのmRNAはただらに検出されると期待される。

この点について調べる目的で、下咽頭腺で *in situ* hybridization 法をおこなった結果は、分泌腺細胞全てで、ローヤルゼリー蛋白遺伝子、および α -glucosidase遺伝子が発現していることを示した。この結果は、モデル1を支持するものであり、下咽頭腺では単一の細胞レベルで機能転換が生じることが明らかになった (Ohashi, *et al.* 1996)。

第2節 下咽頭腺の器官全体における、ローヤルゼリー蛋白、 および α -glucosidaseのmRNAの発現部位の解析

先に述べたように、下咽頭腺の機能転換の際の、移行のメカニズムを解析する目的で、最初に、下咽頭腺の器官全体でのローヤルゼリー蛋白、および α -glucosidaseのmRNAの発現部位を調べた。

まず、内勤蜂下咽頭腺で特異的に発現する64kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子、外勤蜂下咽頭腺で特異的に発現する α -glucosidase遺伝子について、whole-mount *in situ* hybridization法を用いて解析をおこなった。

whole-mount *in situ* hybridization法は組織の形態が比較的よく維持されるという特徴を持つが、図20、図22に示すように、下咽頭腺についても、分泌腺がブドウの房状に多数ダクトにつながり、その分泌腺は、内勤蜂(A)では発達し、外勤蜂(B)では退縮した構造がよく保たれている。

ここでは、digoxigeninで標識されたprobeの検出系として、NBT/BCIPによるアルカリフォスファターゼ依存の反応を用いているため、mRNAの発現部位は紫色の発色で示される。このとき、

図20に示すように、内勤蜂下咽頭腺における64kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子の発現は、antisense probe 依存に、全ての分泌腺で検出された。

先に示した下咽頭腺の組織染色像では、分泌顆粒の部分が白く抜けているのに対し、今回の*in situ hybridization* 法の結果では、一面紫色に発色しているが、これは前者が切片像であるのに対し、後者が whole-mount なので何層もの細胞を含むことによる。

また、外勤蜂下咽頭腺について同様に、 α -glucosidase 遺伝子の発現部位を調べた結果では、antisense probe 依存にダクトにつながった分泌腺全てが紫色に発色し、 α -glucosidase mRNAは外勤蜂の全ての分泌腺で発現していることが明らかとなった。

(図22)

以上の結果は、個々の分泌腺のそれぞれが、内勤蜂ではローヤルゼリー蛋白、外勤蜂では α -glucosidase の遺伝子を発現することを示している。

さて、第二章、第6節で示したように、56kDa ローヤルゼリー蛋

白遺伝子は内勤蜂だけではなく、外勤蜂でも遺伝子発現が生じる。

(ただし、外勤蜂では56kDaローヤルゼリー蛋白の発現は、イムノブロット解析では検出されない。)そこで、この特徴を生かし、ローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseの遺伝子発現が本当に同一の分泌腺で行われているかを確認するために、内勤蜂、外勤蜂のそれぞれの下咽頭腺について56kDa蛋白遺伝子の発現部位を調べた。

このとき下咽頭腺は各個体ごとの一対のうち的一方を56kDa蛋白遺伝子に、もう一方を、 α -glucosidase遺伝子(外勤蜂の場合)または64kDa蛋白遺伝子(内勤蜂の場合)の検出用に用いた。

その結果、内勤蜂、外勤蜂ともに56kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子は全ての分泌腺で検出された(図21、図23)。したがって、外勤蜂では56kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子および α -glucosidase遺伝子が、下咽頭腺全体の分泌腺で発現していることが示された。その結果から、これらの遺伝子発現は同一の分泌腺で行われていると考えられる。

第3節 下咽頭腺の個々の細胞レベルでの、ローヤルゼリー 蛋白、および α -glucosidase の mRNA の発現の解析

以上の結果は、モデル1に示したように、同一の細胞が、内勤蜂から外勤蜂への移行に伴い、遺伝子発現を転換し、機能転換を行うという可能性を強く支持する。そこで次に、それぞれの分泌腺を構成する分泌細胞のレベルで whole-mount *in situ* hybridization 法により遺伝子発現を解析した。

今回は、アルカリフォスファターゼの基質として赤色の蛍光を発する物質を検出に用いているため、mRNAの発現部位は赤色の蛍光で示される。分泌腺は、約15個ほどの分泌腺細胞が球状に集まって形成されており、図24,25には、1個または2個の分泌腺が示されている。

今回も先ほどと同様に、内勤蜂下咽頭腺では、64kDaと56kDaのローヤルゼリー蛋白遺伝子について、また、外勤蜂下咽頭腺では、 α -glucosidase 遺伝子と56kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子について解析を行った。DAPI染色の結果はそれぞれ、アンチセンスプローブを用いた図と同じサンプルについて、一つの分泌腺の中の個々の

分泌細胞の位置を調べるために、行ったものである。

その結果、図24に示すように、内勤蜂では分泌腺を構成する全ての分泌細胞で64、56kDa蛋白遺伝子について、それぞれ特異的蛍光が観察され、これら二つのローヤルゼリー蛋白遺伝子は下咽頭腺分泌細胞全てで遺伝子の発現が生じていることがわかった。また、外勤蜂下咽頭腺についても、同様に、 α -glucosidase 遺伝子と56kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子について解析を行った結果、分泌腺全体でシグナルが検出され、分泌腺細胞全てで、これらの遺伝子が発現していることが明らかとなった。(図25) 従って、分泌腺細胞レベルでも、先に示した組織レベルの結果と同様の結果が示された。

さらに、個々の分泌腺を構成する細胞の数を、内勤蜂、外勤蜂についてそれぞれ調べたところ、内勤蜂では、 14.4 ± 2.3 (n=50) 外勤蜂では、 14.3 ± 2.3 (n=50) と、ほぼ同数であった。また、どの分泌腺細胞も、全て細胞質が非常に大きく、比較的均質であり、分裂中の細胞、または、この先、分化して分泌細胞になる幹細胞のようなものは観察されなかった。したがって、外勤蜂特異的な産物を

合成する分泌腺細胞が、外勤蜂への移行に伴い、未分化な細胞から新たに生じる可能性は、下咽頭腺では低いと考えられる。

以上の結果をまとめると、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴い、1個々の分泌腺細胞が、内勤蜂ではローヤルゼリー蛋白、外勤蜂では α -glucosidase の遺伝子を発現する。

2 外勤蜂下咽頭腺では、分泌腺細胞が α -glucosidase 遺伝子と56kDaローヤルゼリー蛋白遺伝子を発現している。

3 内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴う、下咽頭腺細胞の新生は観察されなかった。

1～3の結果から、下咽頭腺では働き蜂の行動変化にともない、同一の細胞がローヤルゼリー蛋白から α -glucosidaseへと遺伝子発現を変化させることが示された。すなわち、下咽頭腺では単一な細胞レベルで機能転換が起きることが明らかになった。

第4節 考察

本章では、下咽頭腺で *in situ hybridization* 法をおこない、ローヤルゼリー蛋白遺伝子、および α -グルコシダーゼ遺伝子の発現部位が、全ての分泌腺細胞であることを明らかにした。このことから、働き蜂の加齢にともなう分業の変化に従って、下咽頭腺の個々の細胞が、遺伝子発現の様式を変化させ、細胞機能を転換させていることが示された。すなわち、個々の分泌腺細胞が機能転換することにより、下咽頭腺の機能が変化することが明らかとなった。

下咽頭腺においては、組織染色像にも示したとおり、全ての分泌腺細胞が発達しており、途中で細胞が置き換わることなく、内勤蜂から外勤蜂の状態へと移行する。この結果は、ホルモンの刺激により、新たな分泌腺細胞が細胞分裂により生じる乳腺とは対照的な結果である。

動物細胞が機能転換する例としては、これまでによく研究がなされているものとして、イモリのレンズの再生に代表されるように、再生時の細胞の脱分化と再分化 (Ito, Y. *et al.* 1986, Agata, K. *et*

al. 1985,1993) が挙げられる。しかし、こういった、細胞の脱分化と再分化、または、分化転換と呼ばれる現象は、一般には、(失われた組織の再構築、または、発生途中の現象であるため)細胞増殖を伴う。さらに、その機能転換の様式は、細胞の脱分化の際に、(脱分化という言葉のとおり)いったんニュートラルな状態に戻り、新たな機能を持った状態へと移行する、というものである。

一方、下咽頭腺は、細胞増殖を伴わず、同一の細胞が機能転換する点が、非常に特徴的である。このような例は、マウスの発生過程において、食道の形成時に、平滑筋細胞が骨格筋細胞へと分化転換する例 (Patapoutian, A. *et al.* 1995) や、腸の細胞がリンパ球にふれることにより機能転換する (M cell へと) 例 (Kerneis, S. *et al.* 1997) が知られるのみである。しかしながら、転換前、転換後ともに、器官レベルでの役割変化が明確であり、器官の機能転換が生じたといえるのは下咽頭腺細胞のみである。

さて、こういった同一の細胞の機能転換、といった現象が生じる背景には、下咽頭腺の場合のみならず、上にあげた、食道や、腸の細胞の例でもあてはまると考えられるが、おそらく、形態形成がほ

ば完了してしまった際、またはその後、細胞の性質の転換が必要となる何らかの事象があるためなのであろうと考えられる。

下咽頭腺の場合には、この機能転換が生じるのは、第1章でも述べたとおり、形態形成が全て終了してしまった成虫においてである。働き蜂成虫は、内勤蜂から外勤蜂への移行に伴い、内容の異なる作業を行う。したがって、それぞれの分業に対応するために、新たな器官の新生を伴うことなしに（実際には新たな細胞の新生さえも伴わずに）、下咽頭腺において細胞の機能のみを転換させねばならなかったのであろう。

さいごに、このような形式の機能転換は、分業の変化にともなって、働き蜂の他の様々な器官でも生じうる可能性があることを述べたい。その一例として、ここでは偽女王蜂の大腮腺による女王物質の合成を挙げる。女王物質とは、女王蜂が大腮腺で合成し分泌する物質で、働き蜂の卵巣の発達を抑える作用を持ち、いわばコロニーを秩序建てたものにする働きがある。働き蜂の通常分業とは異なるが、コロニーから女王蜂を除くと、働き蜂のあるものが産卵を始め、ごくまれに、その中から、あたかも女王蜂のようにふるまう個

体が現れる (Moritz *et al.* 1996, Plettner *et al.* 1993)。実際に、この個体は女王物質を分泌する。このとき、間違いなく、通常ならばローヤルゼリー中の油状の成分を作っている大腮腺細胞は、女王物質を合成するように機能が転換していると考えられる。実際に、働き蜂の大腮腺でも、女王蜂に移植することにより女王物質が合成されるようになることが示されている。(Sasaki, M. *et al.* 1989)

以上、下咽頭腺細胞からの解析結果に基づき、細胞自体の機能転換について述べたが、こういった現象にどの程度の普遍性があるのか、また、どのような細胞内のメカニズムが働いているのかが興味深い問題である。

第 3 章

図表

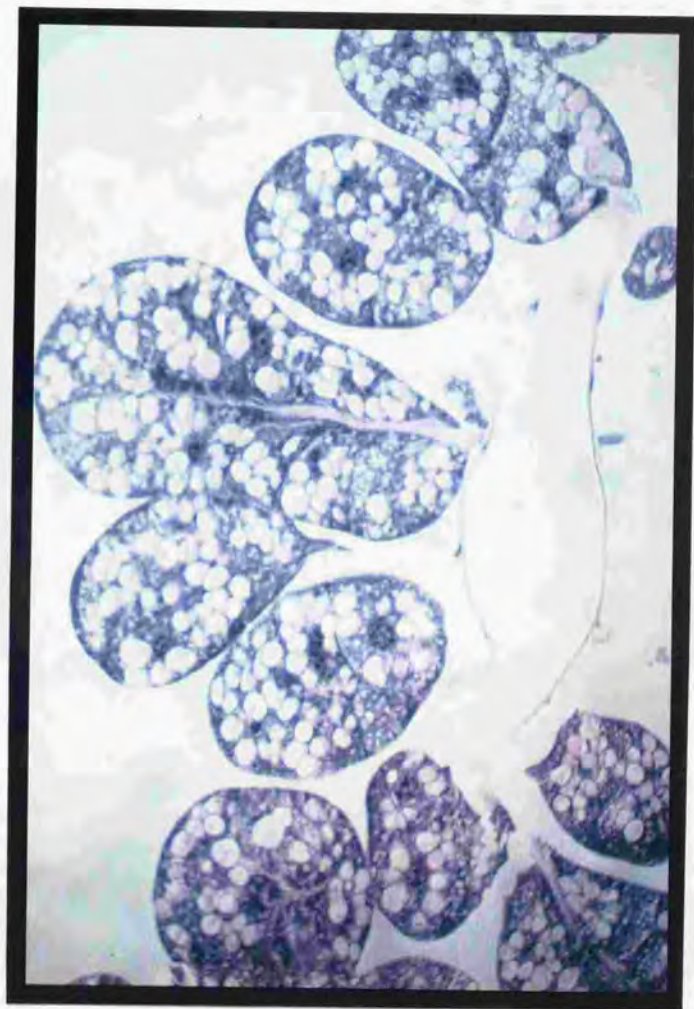


図18 働き蜂下咽頭腺の組織染色像
働き蜂下咽頭腺をパラフィン包埋後、ヘマトキシリン-エオシン二重染色法により染色した。

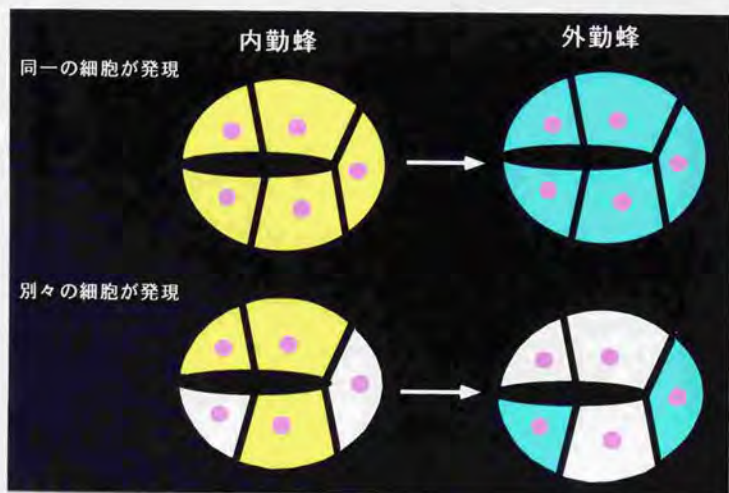


図19 下咽頭腺の機能転換の模式図

下咽頭腺の1つの分泌線、すなわち、ブドウの房状の組織の1つに対応する部分の構造を模式的に示した。下咽頭腺の機能転換がもし、同一の細胞で生じるのであれば、ローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseのmRNAはそれぞれ、内勤蜂と外勤蜂の全ての分泌腺細胞で検出されると期待される。一方、異なる細胞が別々の遺伝子を発現するのであれば、ローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseのmRNAはまだらに検出されると期待される。

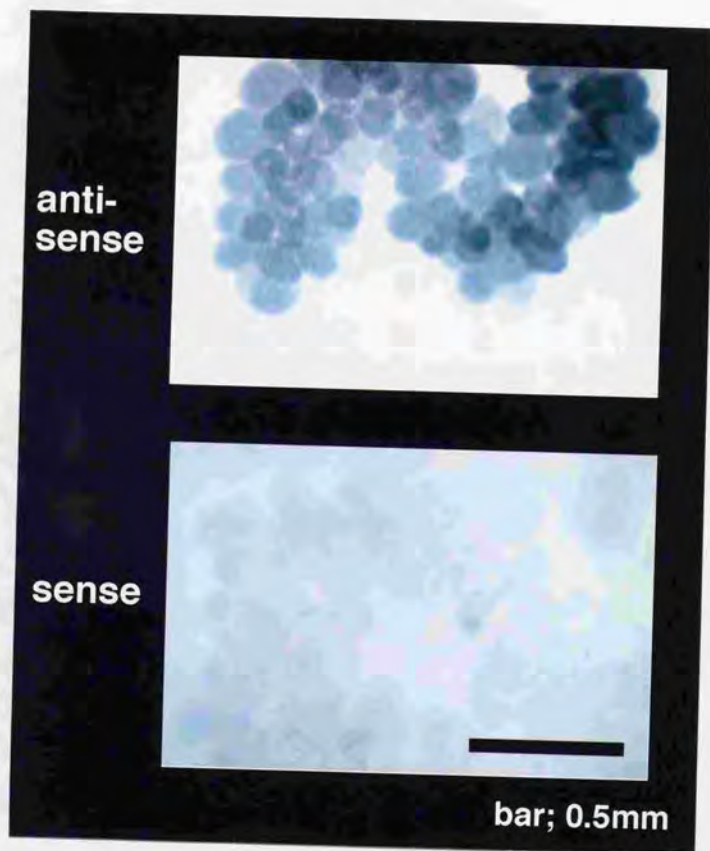


図20 内勤蜂下咽頭腺における64kDaローヤルゼリー蛋白 mRNA の *in situ* hybridization

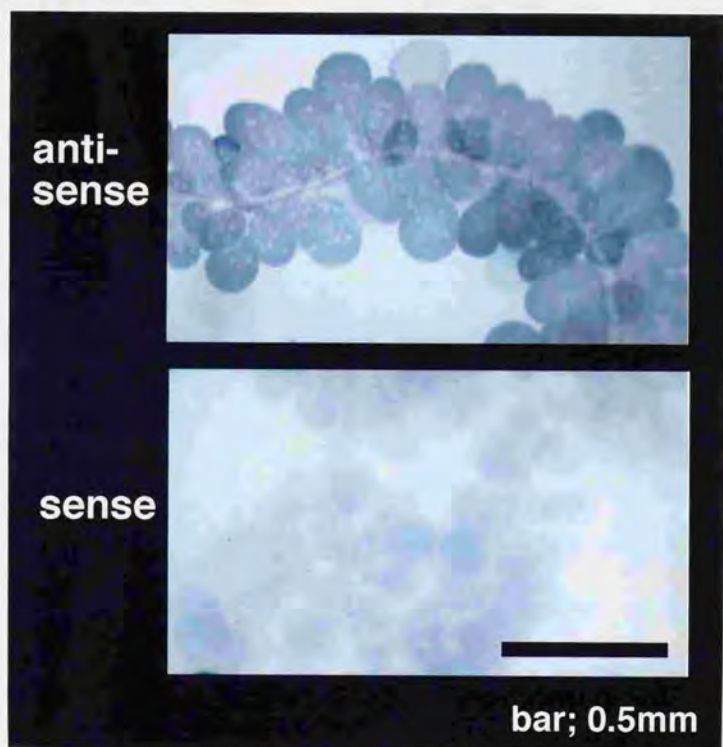


図21 内勤蜂下咽頭腺における56kDaローヤルゼリー蛋白 mRNA の *in situ* hybridization

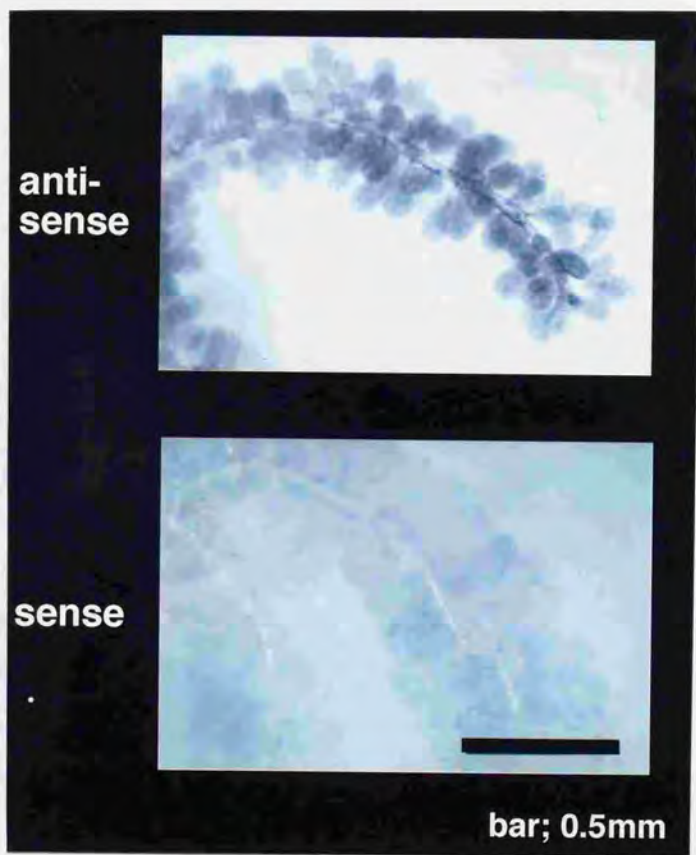


図22 外勤蜂下咽頭腺における α -glucosidase mRNA の *in situ* hybridization



図23 外勤蜂下咽頭腺における56kDaローヤルゼリー蛋白mRNAの *in situ* hybridization

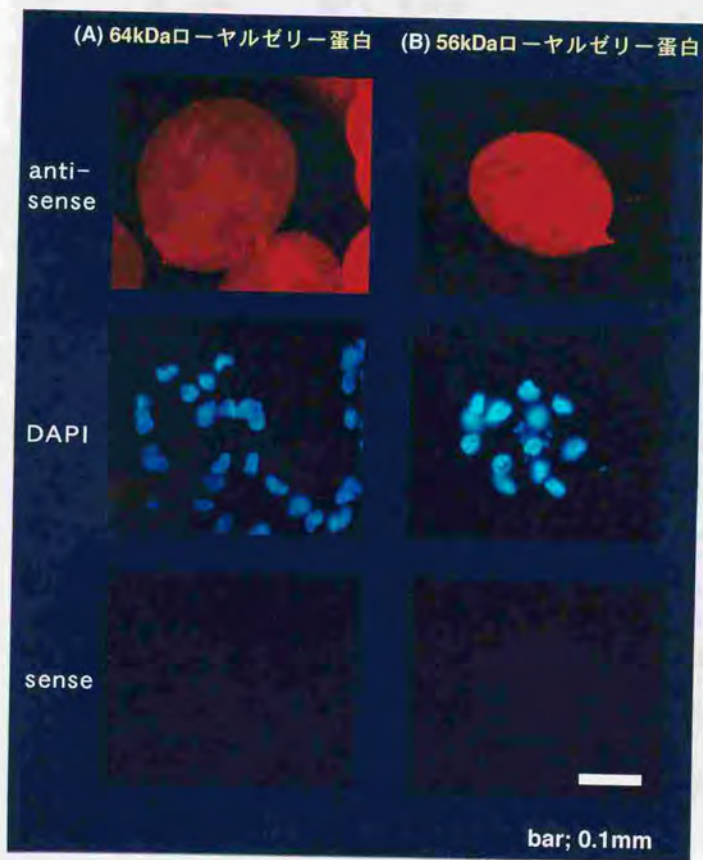


図24 内勤蜂下咽頭腺分泌細胞におけるローヤルゼリー蛋白mRNA の *in situ* hybridization

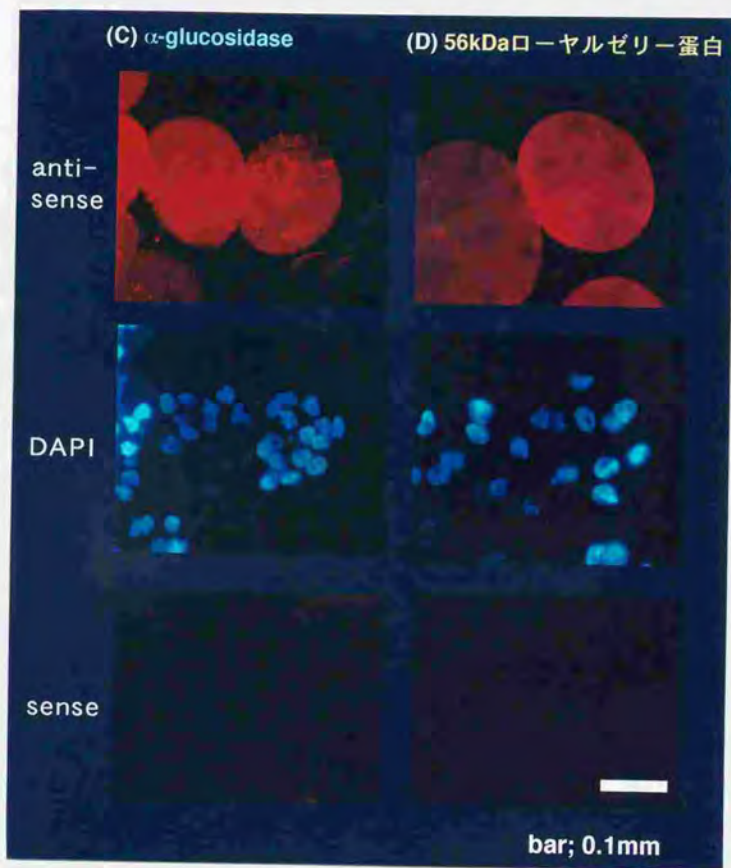


図25 外勤蜂下咽頭腺分泌細胞における α -glucosidase mRNA と 56kDaローヤルゼリー蛋白 mRNA の *in situ* hybridization

第4章

コロニーの状況に依存した 下咽頭腺細胞の機能転換 の可塑性

第1節 序

第3章までに、内勤蜂から外勤蜂への、加齢にともなう行動変化において、下咽頭腺では、分泌腺細胞自体が機能転換することを明らかにした。

この下咽頭腺の機能転換においてとりわけ特徴的であり、生物学的に興味深いと考えられるのが、この細胞の機能転換が、単に加齢によりプログラムされたものではなく、行動に依存するものかもしれないという点である。

しかしながら、通常の条件では働き蜂の行動変化は羽化後の日齢に伴って約10~20日後に起きる (Lindauer 1952, Sakagami 1953-) ため、下咽頭腺細胞の機能転換が、働き蜂の行動の変化に伴って生じるのか、それとも、単に日齢の進行によって生じるのかについては、これまで明らかではなかった。そこで、本章では、この点を検討する目的で、日齢の進んだ働き蜂と、雄蜂幼虫からなるコロニーを人為的に作製し、通常なら外勤蜂となるはずの日齢の働き蜂に育児を強制した場合の下咽頭腺の状態を調べたことについて述べる。

仮に下咽頭腺の機能転換が行動変化に伴って生じるなら、たとえ

普段なら外勤蜂になるはずの20日齢以上の働き蜂に育児をさせた場合でも、幼虫を育てるためにローヤルゼリー蛋白を産生すると予想される。しかし、単に日齢の進行に伴って下咽頭腺の機能が変化するのであれば、 α -glucosidaseを産生するようになると予想される。そこで、上記のコロニーから経時的に採集した働き蜂の下咽頭腺の蛋白発現のパターンをSDS-PAGEおよび、50kDa蛋白と α -glucosidaseに対する抗体を用いたイムノブロット解析により調べた。

その結果、これら日齢の進んだ働き蜂でも内勤蜂に特有な蛋白発現パターンが観察されること、内勤蜂の発現パターンを示す働き蜂の割合は、日齢の進んだ働き蜂からなる群でも通常群と同じく全体の8-9割に維持されることが分かった。このことは、若い働き蜂が存在しない状況では、日齢が進んだ働き蜂の下咽頭腺が、雄蜂幼虫を育てるために内勤蜂型に維持されることを示している。以上から、下咽頭腺細胞の機能の変化が、単に日齢によるのではなく、働き蜂の行動に依存することが、本研究により初めて明らかとなった。

第2節 日齢の進んだ働き蜂と雄蜂幼虫からなるコロニーの 作製とその観察

下咽頭腺の機能変化が日齢の進行によるのか、加齢に伴うのかを調べる目的で、日齢が進行した働き蜂と雄蜂幼虫からなるコロニーを作製した(図26)。まず、この節ではそのコロニーの観察結果について述べる。

まず、数万匹ほどからなる通常のコロニーから女王蜂を除いた。コロニー内には、このとき、100~200匹くらいの卵、幼虫、さなぎが観察された。女王蜂を除いたので、これ以後、コロニー内での産卵はなくなり、新たに生じる働き蜂は、巣の中にいた卵、幼虫、さなぎからのみとなる。

通常の場合には、ミツバチは、女王蜂が失われた場合には、働き蜂の巣を改造して女王蜂育成用の巣(変成王台とよばれる)に改造し、中にいる働き蜂の卵または若い幼虫に大量のローヤルゼリーを与え、女王蜂を作り出す。このコロニーにおいても、変成王台が観察されたので、実験の目的上、これを取り除いた。

その後、巣の中に残っていた卵、幼虫、さなぎは次第に成長し、

最後には、全てが羽化し働き蜂となった。実際には成虫の羽化を、各個体全てについて観察する事は困難であったので、巣の中のさなぎの数を数え、さなぎが観察されなくなった日を、このコロニーの中の最後の働き蜂が羽化した日と便宜的に決めた。このさなぎが観察されなくなった日をday0と名付け、以後、この実験における日付をdayで表すこととした。day0以降は、新しい働き蜂が供給されないで、コロニーに残った働き蜂の日齢は進む一方となり、その日齢はdayで示される数字よりも大きくなる。

例えば、最後の蛹が羽化してから28日目、day28では、最も若い働き蜂でも28日齢となるので、このコロニーには十分に日齢の進んだ働き蜂ばかりからなることになる。

さて、女王蜂を巣から取り除いてしまったために、働き蜂の卵巣の発達を抑えていた女王物質が巣内で不足する。このとき、一部の働き蜂の卵巣が発達し、産卵を開始することが知られている(坂上、1983)。しかし、働き蜂は交尾は出来ないで、産んだ卵は全て未受精卵となり、ミツバチでは、ハプロイドである雄が生じる。

day28には、実際にこのコロニーでも、多数の卵、幼虫、さなぎ

が観察された。さなぎを10匹ほど取り出してその形態を観察したところ、全て雄蜂であった。また、働き蜂産卵の特徴である、乱雑な産卵（一つの巣室に複数の卵が産みつけられる、卵の位置が巣室の中で一定ではない）が観察された。このことは、このコロニーで、day28で新たに観察された卵、幼虫、さなぎは、すべて働き蜂が産んだ雄蜂であることを示している。また、働き蜂による産卵が開始された時期は、幼虫の生育の具合から考えるとday10くらいになると判断できた。

雄蜂のさなぎが観察されたことは、卵からかえった幼虫が正常に成長していることを示しており、働き蜂による育児（ローヤルゼリーを与える）の可能性が考えられた。実際に、働き蜂の一部で育児行動を行っている蜂が観察された。

この状況はday35, 47でも観察された。day35にはコロニーの中の幼虫の数は極大に達した（巣板の20~30%）が、産みつけられた卵の数はやや減少していた。day47では、卵の数はかなり減少し、幼虫も減っていた。しかしながら、day61になると卵はほとんど観察されず、幼虫の数もかなり減少してしまっていた。

また、雄蜂成虫については、day35以降に観察されたが、その

数は蛹から予想される数ほどには観察されなかった。

働き蜂の数については、この実験を通してそれほど減ることはなく、day61の時点でも7割程度は残っていた。

次節以降に、day28, 35, 47, 61にコロニーから働き蜂をサンプリングし下咽頭腺について蛋白パターンを調べた結果を示す。

第3節 day28における今回の実験群の下咽頭腺の蛋白発現 パターンの解析

まずday28 にサンプリングした働き蜂について下咽頭腺蛋白の発現パターンを解析した結果を示す(図27)。

図AのSDS-PAGE像に示すように、通常のコロニーにおける内勤蜂と外勤蜂では、内勤蜂下咽頭腺では50, 56kDaのローヤルゼリー蛋白、外勤蜂下咽頭腺では α -glucosidaseが主要な蛋白として検出された(図27 laneN, F)。

また、イムノブロット解析により、50kDa蛋白は内勤蜂、 α -glucosidaseは外勤蜂に特異的にそれぞれ単一なバンドとして検出された(図27 B,C)。

このとき、今回作成したコロニーにおいてday28にサンプリングした働き蜂に関して解析した結果(lane day28)、コロニーからランダムに10匹分をサンプリングし、まとめたサンプルは、電気泳動でもイムノブロットでも、50kDaローヤルゼリー蛋白が検出され、 α -glucosidaseは検出されず、内勤蜂の蛋白発現パターンを示した。

コントロールとして、通常のコロニーの29日齢の働き蜂の下咽頭腺の蛋白発現パターンを示すが（図27 lane29）、50kDaローヤルゼリー蛋白が検出されず、 α -glucosidaseが検出され、典型的な外勤蜂の蛋白発現パターンを示した。

従って、今回作成したコロニーでは、day28（28日齢以上の働き蜂からなる）の時点でも、働き蜂下咽頭腺の蛋白パターンは内勤蜂型であり、ローヤルゼリー蛋白を合成していることが明らかとなった。すなわち、この実験群では、通常群とは異なり、日齢の進行に伴う下咽頭腺の機能変化が生じていないことを示している。

第4節 ランダムにサンプリングした働き蜂各個体ごとの下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析

前項のように、サンプルをまとめて解析した場合、おおよその傾向をしらべるのには適しているが、実際に内勤蜂型の下咽頭腺を持った個体が存在するのか、またそれはどのくらいの割合であるのかを知るには、各個体ごとに調べる必要がある。そこで、day28-のランダムにサンプリングした働き蜂について、下咽頭腺の蛋白発現パターンを各個体ごとに調べた。

このとき、内勤蜂型のパターン（50kDa ロイヤルゼリー蛋白の発現が観察され、 α -glucosidaseの発現は観察されない）を示す個体は、lane 1-3, 5-8 の働き蜂であった（図28）。lane 4 に示す個体は、外勤蜂のパターンを示したが、lane 9 の個体は、50kDa-ロイヤルゼリー蛋白、 α -glucosidaseの発現がともに検出され、内勤蜂と外勤蜂の両方の状態を示した。

このことから、このコロニーでは、下咽頭腺が内勤蜂型の個体が実際に存在し、通常に加齢に伴う下咽頭腺の機能変化が生じていない個体の割合は比較的高い（7匹/9匹）ことが明らかになった。

第5節 育児行動をとっていた働き蜂について、各個体ごとの下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析

このコロニーでは、本来外勤蜂になっている日齢であるにも関わらず、育児行動をしている働き蜂が、各サンプリング時に観察された。しかしながら、行動の点では育児を行っていても、日齢が非常に進んでいるので、その際の下咽頭腺の状態が、内勤蜂型に制御されているかどうかは不明である。そこで、これらの働き蜂を行動によりサンプリングし、その下咽頭腺の蛋白パターンを解析した。

解剖の結果、全ての個体について下咽頭腺は非常に発達しており、形態的には内勤蜂型であった。

一例として、day47に採取した、育児行動を示した個体についての、蛋白発現パターンの解析結果を図29に示す。lane 9の個体を除く、10匹中9匹で、50kDaローヤルゼリー蛋白が検出され、 α -glucosidaseは検出されず、内勤蜂型の蛋白発現パターンを示すことがわかった。また、lane 9の個体は、50kDaローヤルゼリー蛋白、 α -glucosidaseがともに検出されなかった。

以上の結果から、この群では羽化後1カ月近くまたはそれ以上の

働き蜂からなるにも関わらず、行動の点では、実際に育児行動を行
う蜂（内勤蜂）が存在し、また、生理状態（身体機能）の点でも、
下咽頭腺の状態は内勤蜂型であることがわかった。

第6節 経時的なサンプリングによる今回の実験群の働き蜂 の下咽頭腺の状態の解析

前項までの結果をまとめる意味で、今回の実験群について、経時的にサンプリングを行い、各個体ごとに下咽頭腺が内勤蜂型であるか外勤蜂型であるかを調べた。具体的には、day28, 35, 47, 61の計4回、30匹ずつの働き蜂について、電気泳動およびドットブロットを行い、それぞれ50kDaローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseの発現の有無により、内勤蜂型か、外勤蜂型かの判断を行った。

その結果、day28から61に至るまでいずれのサンプルも、通常のコロニーであれば外勤蜂になっているはずの日齢であるにも関わらず、働き蜂の80-90%で下咽頭腺が内勤蜂型であった(表1)。

このことは、前項でも述べたとおり(図27 lane 29)、通常群29-日齢のサンプルが明確な外勤蜂のパターンであることと対照的な結果であり、下咽頭腺の機能転換が単に日齢の進行に伴って生じているのではないことを示している。

さらに、day -32 またはC に示したように、正常なコロニーの内勤蜂の割合に着目すると、その割合もほぼ80-90%であり、day28-

から61までのサンプルは、正常なコロニーと同様の値であった。
このことは、このコロニーでは、下咽頭腺の機能転換が単に日齢の
進行に伴わないのみならず、コロニー全体として、内勤蜂型の下咽
頭腺を持つ働き蜂の割合を通常群と同程度に保つよう何らかの制御
されていることを示している。

以上の結果から、下咽頭腺の細胞機能の転換は単に日齢によるの
ではなく、コロニーの状況に依存することが初めて明らかになった。
すなわち、このことは、働き蜂の行動が、やはりコロニーの状況に
依存する（例えば、前節に述べた育児行動を行う働き蜂の存在）こ
とを考えると、下咽頭腺細胞の機能転換は働き蜂の行動に伴って変
化することを明確に示している。

第7節 外勤蜂に育児を強制した際の下咽頭腺の蛋白発現パターンの解析

次に、下咽頭腺の機能の可逆性、すなわち、いったん外勤蜂型になってしまったものが内勤蜂型に戻るのかどうかを調べる目的で、採餌行動をしている働き蜂（外勤蜂）に育児を強制した際に下咽頭腺の蛋白パターンが内勤蜂型に戻るかどうかを調べた。

方法は、まず、幼虫の多く入った巣板から、さなぎを取り除き、この巣板を空の巣箱に入れた。その後、この巣箱に外勤蜂を100匹と、女王蜂を1匹入れた。外勤蜂は、足に花粉だごをつけ、巣に戻ってくるものを、捕えて用いた。巣箱は、出入口を閉じ、他の蜂の混入を防いだ。

4日後、サンプリングのために巣箱を開けると、巣板の中の幼虫は、半数ほどは生育していた。また、不思議なことに、さなぎになる際の幼虫の巣の蓋掛けがなされていなかった。働き蜂は、29匹が生存しており、女王蜂も生存していた。

そこで、これらの働き蜂の下咽頭腺を採取し、その蛋白発現パター

ンを各個体ごとに調べた。解剖の結果、これらの働き蜂の下咽頭腺の形態は、全ての個体で退縮していた。また、その蛋白発現パターンは、SDS-PAGE, CBB染色により26匹中25匹で α -glucosidaseのバンドが検出された(図30A)。ローヤルゼリー蛋白を発現している個体は、2匹であった(図30A lane11, 25)が、これらの個体では、同時に α -glucosidaseも発現が検出された。

すなわち、外勤蜂型の下咽頭腺を持った個体がほとんど(23匹/25匹)であり、内勤蜂型の下咽頭腺を持った個体は存在せず、むしろ、 α -glucosidaseを発現しつつ、ローヤルゼリー蛋白も発現する個体が少数存在する、という結果であった。

コントロールとして、同時にサンプリングした外勤蜂の下咽頭腺の蛋白発現パターンを解析した結果(図30B)は、ほとんど(10匹/11匹)が外勤蜂型であり、1匹の個体が α -glucosidaseと、ローヤルゼリー蛋白をともに発現していた。

したがって、今回の実験群では、コントロール群と比べて、ローヤルゼリー蛋白を発現する個体の割合の増加は検出されなかった。また、下咽頭腺が内勤蜂型に戻った個体も観察されなかった。

ただし、今回の実験群では、群を構成する働き蜂の数が極端に少ないこと、途中で7割ほどの働き蜂が死んでしまったこと、巣箱を密閉してしまったこと、4日しか期間をおかなかったことなど、問題点が多く、この実験のみで下咽頭腺の機能が可逆的であるかどうかは、判断は困難である。詳しくは考察に述べるが、下咽頭腺の機能が完全には可逆的ではなくとも、コロニーの維持は可能であるとも考えることは可能である。そういった点の検討も含め、上記の問題点を改善しつつ解析を進めることが今後の課題である

第8節 考察

本章では、下咽頭腺の機能転換が、単に働き蜂の羽化後の日齢の進行に伴うのではなく、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴って生じることを示した。

すなわち、女王蜂を除き、働き蜂の供給を止めた状態で1~2カ月後の、全ての働き蜂の日齢が30日以上になってしまう場合にも、雄蜂幼虫が存在し育児が必要な場合には、内勤蜂型の下咽頭腺を持つ個体が通常群と同程度（8~9割）存在することを示した。

通常のコロニーでは、働き蜂の分業の移行は、かなり個体差はあるが、内勤蜂から外勤蜂への移行は、だいたい10~20日であるとされている（ただしこれらの知見は行動の観察に基づいたデータであるが）。今回、この実験で解析した個体について、このばらつきの中にはいつってしまったものを偶然サンプリングしてしまったのではないかという懸念に対しては、その可能性はほとんどないと私は考えている。その理由を以下に述べる。

(1) まず、通常群29日齢のサンプルは、数十匹を混ぜてしまった

ものであるが、明らかに外勤蜂のパターンであり、ローヤルゼリー蛋白は検出されない。すなわち、29日齢の時点でほとんど内勤蜂は残っていない。(下咽頭腺の蛋白量は、1匹あたりにすると内勤蜂は外勤蜂の5~10倍もあるので、1匹でも内勤蜂が存在すれば、その影響は大きい)

(2) サンプルングした時期が、最も後のものではday61、すなわち日齢61日以上の働き蜂についての結果であり、10~20日という長さからは3倍以上も離れた時点の結果である。

(3) のべ120匹のランダムにサンプルングした個体を解析している。これは、今回の実験の目的にとって、十分多い数である。

さらに、別の懸念としては、季節による影響の問題がある。ミツバチは、越冬中は、活動が低下し、幼虫がほとんどいなくなり、採餌行動もほとんど行わない。また、晩秋の働き蜂は、越冬するために寿命がのびる。したがって、日齢に伴った分業の進行が大きく乱れている可能性がある。そこで、今回の実験では、この時期を避け、春の活動期におこなった。すなわち、女王蜂を除いた日付は、3月1日であり、day0が、3月22日、実験終了のday61は、5月22日である。さらに別に時期に追試をおこなうべきであるかもしれないが、

実験開始の時点で、ミツバチは通常の活動期の状態が観察されており、おそらく季節という点では今回の実験で問題点はないと考えられる。

本章の結果から、下咽頭腺の機能転換は、働き蜂の行動、すなわちコロニーの状態に依存することが明らかとなったが、では、この下咽頭腺に機能転換をもたらす、コロニーの状態の実体とはいったい何であろうか？

現在のところ、私は、その実体をフェロモンのような、個体間での化学物質のやりとりなのではないかと考えている。このような社会システムは進化の後の方で獲得された以上、現在までに持っている認識の基本的な方法を、そうは大幅に改善することはなしに、多少改編するだけだろうと考えるためである。そのような場合に、個体の行動に非常に大きな影響を与えるものとしては、昆虫ではフェロモンは大きな位置を占めている。哺乳類のような高等動物の場合、脳神経系の高次機能が発達しており、外部の状況を視覚や嗅覚により判断して、反応することは可能であるが、シロアリのように、脳の発達していない昆虫でも獲得可能な昆虫の社会の場合には、判断

という過程を介することなく、ある決まった行動を誘発可能な、フェロモンのようなメカニズムを用いるはずである。

実際に、ミツバチでは、こういった化学物質による行動の制御を、常に行っている例がある。以前にも少しふれたが（第3章考察、第4章第2節）、女王蜂による女王物質の分泌である。女王物質は、女王蜂の存在を他の働き蜂に知らせる物質で、主成分は、9-オキソデセン酸と9-ヒドロキシデセン酸であり、働き蜂の卵巣の発達を抑え、コロニーの秩序を保つ。女王蜂をコロニーから除くと、数時間後に、コロニー内に混乱が生じ、働き蜂が落ちつかなくなることが知られており、すぐに、新女王の育成が始まる。この混乱は女王物質を与えることにより取り直されることがわかっている。

このような例から考えても、例えば幼虫の存在を知らせるフェロモンや、外勤蜂の存在を知らせるフェロモンがあってもおかしくはない。そして、おそらくこれらの物質は、直接的か間接的かは不明であるが、脳に作用し、適した行動を行わせ、末梢器官にも働いて、適した生理状態をもたらすと考えられる。具体的には、おそらく幼虫から分泌されるフェロモンは、働き蜂に働きかけ、脳には、内勤蜂の行動を行う状態に、下咽頭腺にはローヤルゼリー蛋白を合成

する状態に、それぞれ移行させるよう作用すると考えられる。

さて、今回の実験群では、女王蜂を取り除いてしまったが、今回の結果について女王物質の欠乏が与える影響については、明確な判断は困難である。ただし、下咽頭腺の機能転換が、単に働き蜂の羽化後の日齢の進行に伴うのではなく、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴って生じる、という結論には、女王物質の有無は、おそらく影響を与えないであろうと、私は考えている。すなわち、別の実験で、分蜂後、新女王と働き蜂の群が生じた際に、1ヶ月間、幼虫のいない時期が存在した。そのときは、今回とは逆に、幼虫がいないことに合わせて、普段よりも内勤蜂の割合が下がった。この結果は、女王蜂が存在しているにも関わらず、上記の結論を支持するものであるためである。

また、第7節では、下咽頭腺の機能が可逆的かどうかを調べた。その結果、今回の実験では可逆性は示されなかった。Roeschによると、働き蜂を外勤蜂のみにした場合、これらの蜂が育児を行い、下咽頭腺は形態的に発達する、とされている。しかしながら、外勤蜂を選んだ方法に多少の問題があり、このRoeschの実験では、混

入した内勤蜂を観察してしまう可能性が多分にあった。そこで、今回の実験では外勤蜂のみを選ぶ目的で、花粉採取を行っている蜂を選び、コロニーを構築した。

しかしながらこの点が、今回の実験の問題点（第6節参照）につながった可能性がある。通常のコロニーで花粉採取蜂にマーキングを行ったところ、それらの蜂は1週間後にはいなくなってしまった、すなわち、そもそもの余命が短いようである。また、集めるのに手間がかかり、大きなコロニーを作ることができなかった。これらの点は十分に改善すべき点である。

また、もしかすると、下咽頭腺は外勤蜂から内勤蜂の状態へは完全には戻らないのかもしれない。例えば、外勤蜂特有の蛋白を発現したまま、第2章でも述べた、56kDaローヤルゼリー蛋白の翻訳が回復し、幼虫を育てることにより新たに若い蜂が羽化するまで間に合わせるのかもしれない。

少なくとも今回の実験群では、少数のローヤルゼリー蛋白を発現する働き蜂が観察された。また、コントロールに用いた通常の外勤蜂中にも、同程度の割合で検出された。これらは、完全には外勤蜂の下咽頭腺へと、まだ移り変わっていない個体であると考えられる

が、今回の実験群の女王蜂や幼虫は、これらの働き蜂からローヤルゼリーをもらったのかもしれない。正常に育った幼虫について観察すると、幼虫の消化管からは大量の花粉が検出された。もしかすると、これらの働き蜂は下咽頭腺の機能が戻らなくとも、巣内に蓄えて合った花粉を幼虫に与えたの可能性もある。

そもそも、この内勤蜂のみが全て失われるという状態は、自然の状況では生じるとは考えにくく、ミツバチ自体にこういった状況を乗り切るだけの準備が本来なされていないのかもしれない。前半の実験で述べた、女王が失われ働き蜂産卵が生じる事態は十分に生じうることは対照的である。（この場合もいずれはコロニーは滅びてしまうのだが。）

本章では、下咽頭腺の機能転換が、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴って生じる、すなわち、コロニーの状況によって決定されることを明らかにした。

ミツバチは、そのコロニーが超個体と形容されるように、あたかも多細胞生物の各器官に対応するかのように、各個体が分業を行い、コロニーが成立している。したがって、多細胞生物において、役割

の異なる各種のホルモンや、情報伝達物質が存在し、体内の恒常性を保っているかのように、ミツバチにおいても、役割の異なる各個体ごとに独特のフェロモンを分泌し、他の個体の行動や器官の状態を制御することにより、コロニーの状態を最適化している、すなわち、社会性の成立の基盤としていると考えることは、十分に可能である。

第 4 章

図表

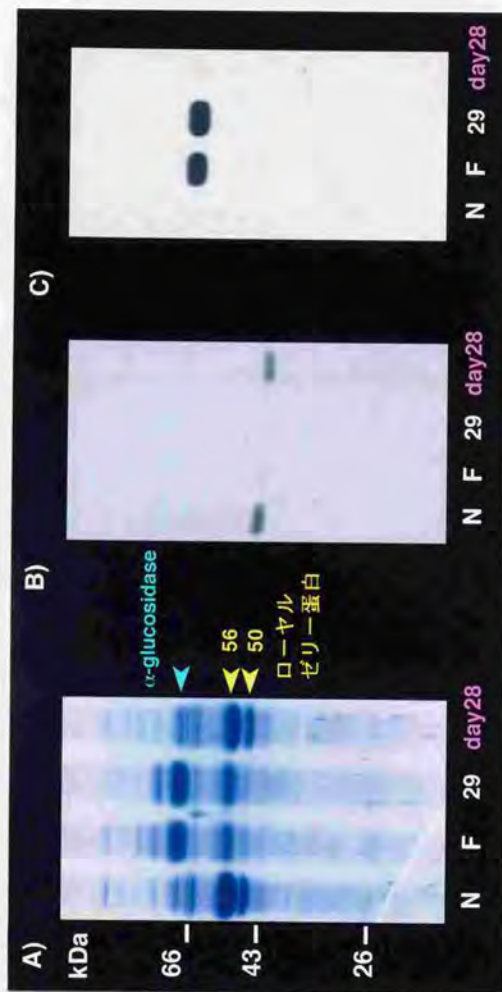


図27 日齢の進んだ働き蜂（28日齢以上）に育児を強いた場合の下咽頭の蛋白発現パターン

図Aは、SDS-PAGE後、CBB染色、図B,Cは、50kDaのローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseに対する抗体を用いたイムノブロット解析の結果を示す。レーンN,Fは通常のコロニーにおける内勤蜂と外勤蜂、Day28のレーンには、今回作成したコロニーでDay28にサンプリングした働き蜂10匹分のサンプル、29と記したレーンは、対照として通常のコロニーの29日齢の働き蜂をそれぞれ示す。

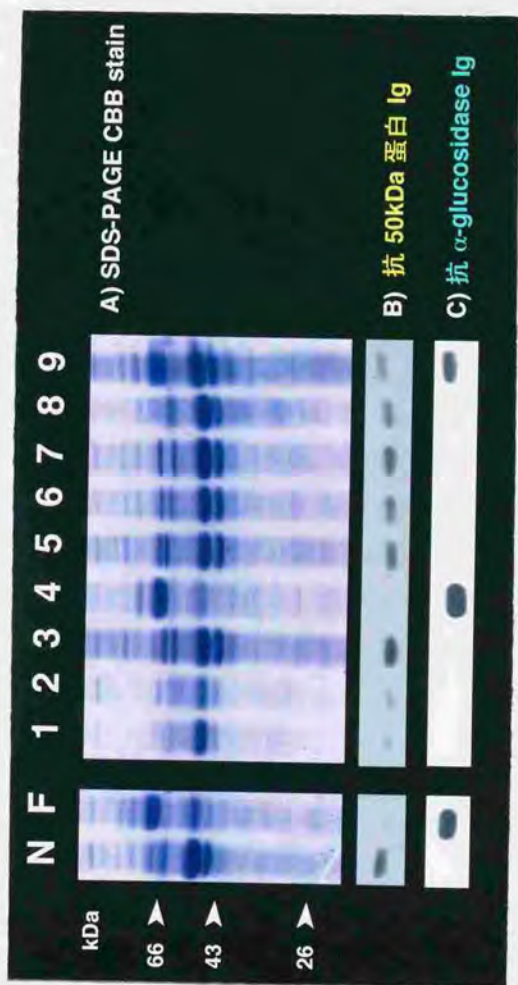


図28 day 28 のランダムに採取した働き蜂各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン

レーンN,Fは通常のコロニーにおける内勤蜂と外勤蜂のコントロールで、右のパネルは9匹の働き蜂の各個体について調べた結果を示す。A)は、SDS-PAGE後、CBB染色、B),C)は、50kDaのローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseに対する抗体を用いたイムノブロット解析の結果を示す。

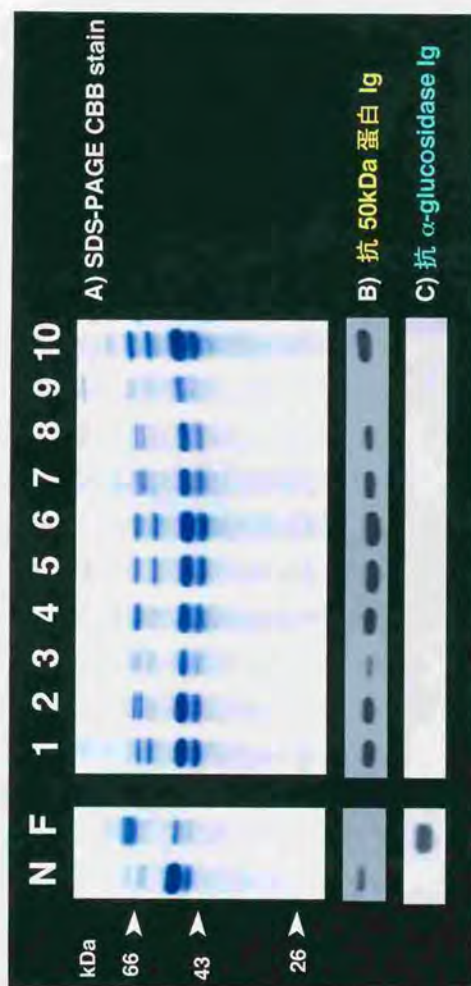


図29 day 47 に内勤蜂の行動をとっていた働き蜂各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン

レーンN,Fは通常のコロニーにおける内勤蜂と外勤蜂のコントロールで、右のパネルは10匹の働き蜂の各個体について調べた結果を示す。A)は、SDS-PAGE後、CBB染色、B)、C)は、50kDaのローヤルゼリー蛋白と α -glucosidaseに対する抗体を用いたイムノブロット解析の結果を示す。

day	内勤蜂	外勤蜂	中間型	内勤蜂の割合(%)
-32	33/40	7/40	0/40	82.5 (実験開始前)
28	27/30	2/30	1/30	90
35	27/30	0/30	3/30	90
47	27/30	2/30	1/30	90
61	24/30	4/30	2/30	80
C	26/28	1/28	1/28	92.9 (別群control)

表1 日齢の進んだ働き蜂に育児を強いた場合に内勤蜂型の下咽頭腺を持つ働き蜂の割合

day -32: 女王蜂を除く前の, C: 別の, それぞれ通常のコロニー

数字の分母は検体数, 分子は内勤蜂, 外勤蜂の発現パターンを示す個体数を表す。

dayは, コロニーからさなぎが観察されなくなってからの日数で, 働き蜂の日齢はこの数よりも大きい。

このコロニーでは, 日齢が進んだ働き蜂からなるにもかかわらず, 内勤蜂型の下咽頭腺を持った個体の割合は通常群と同程度である。

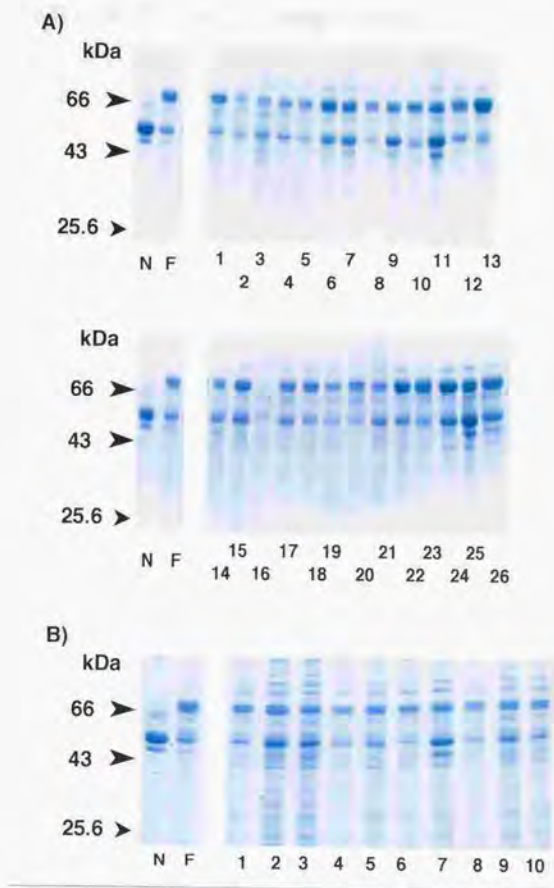


図30 外勤蜂に育児を強いた際の各個体の下咽頭腺の蛋白発現パターン
 レーンN,Fは通常のコロニーにおける内勤蜂と外勤蜂のコントロールで、右
 のパネルは1働き蜂の各個体について調べた結果を示す。A) は外勤蜂に育児
 を強いた場合の各個体、B) は、通常群の外勤蜂各個体、の結果を示す。

第 5 章

下咽頭腺細胞の機能転換に 関する分子機構の解明の試み

第1節 序

前章までに、下咽頭腺の機能転換が単一な細胞レベルで生じること、また単に働き蜂の日齢の進行によるのではなく行動変化に伴って生じることを明らかにした。

では、この細胞機能の変化が、どのようなシグナルにより、下咽頭腺細胞にもたらされるのか、また、その際の細胞内における機能転換の分子機構は、いかなるものであるか、を解明することは重要な問題である。

本章では、最初に、下咽頭腺の機能を制御する体液性因子の探索のためのアッセイ系を構築する目的で、まず下咽頭腺の機能転換が生じる系を組織培養により確立することを試みた。その結果、培養依存に、マーカー蛋白であるローヤルゼリー蛋白や α -glucosidaseの発現が失われた。目的とする器官培養系の確立はできなかったものの、この結果は、内勤蜂または外勤蜂の状態に保つ因子が常に必要とされていることを示しているのかもしれない。

さて、第2章考察で述べたように、外勤蜂特異的に発現する糖代謝酵素、 α -glucosidase、amylase、glucose oxidaseは、それぞれ外勤蜂特異的に発現し、共通の制御を受けている可能性が高い。そこで、下咽頭腺細胞内における機能転換の分子機構を探るには、これら外勤蜂特異的な産物について、その共通の転写制御機構を解析することが常道である。

そこで次に、外勤蜂下咽頭腺特異的産物である糖代謝酵素群の遺伝子制御領域を同定する目的で、これら遺伝子の上流配列を含むクローンの単離を試みた。現時点では、まだクローンは得られていないが、サザンプロット解析により、これらの遺伝子がシングルコピーである可能性が高いことが示された。

本章で述べる結果は内容的にはまだ未完成であるが、動物細胞の分化の可塑性について、また、これまで分子生物学的に解析の困難であった動物の社会性を成立させる機構について、新たな足がかりを与えるものであると考えられる。

第2節 下咽頭腺の組織培養系の試み

下咽頭腺の機能転換をもたらす体液性因子を検索する目的で、まず、下咽頭腺の組織培養系の確立を試みた。

内勤蜂および外勤蜂の下咽頭腺を摘出し、GIM中で培養した。4日間培養後、組織を取り出し、そのホモジネートをSDS-PAGEにより解析した。その結果、培養依存に、ロイヤルゼリー蛋白、または α -glucosidaseの発現が失われた(図31 A,B)。

GIMは、それほど栄養分に富んだ培地ではないので、ロイヤルゼリー蛋白や α -glucosidaseの発現が押さえられたのは栄養不足である可能性を考え、さらに栄養分に富んだ、EX-Cell 400を用いた培養、または、FCSの添加を試みた。しかしながら、この場合も、これら分泌蛋白は発現が維持されなかった(図31 C)。

上記の条件でも、相変わらず栄養不足であるという可能性は残るが、ロイヤルゼリー蛋白や α -glucosidaseの発現を維持するためには、内勤蜂、あるいは外勤蜂でそれぞれ存在すると考えられる体液性の因子からのシグナルを、下咽頭腺細胞が常に受けていなければならないのかもしれない。

第3節 α -glucosidase, amylase, glucose oxidase についてのゲノムサザンプロット解析

外勤蜂特異的に発現する糖代謝酵素群について、遺伝子発現の制御領域の解析のために、まず α -glucosidase, amylase, glucose oxidase の上流領域をコードするゲノムクローンの単離を試みた。

最初に、3種類のcDNAをともに切断する制限酵素の組み合わせを検索し、適切な酵素として、*Sal* I および、*Sal* I と *Xho* I の組み合わせを選び、これをゲノムの切断に用いる制限酵素とした。まず、*Sal* I または、*Sal* I と *Xho* I の組み合わせでゲノムを切断して library を構築し、各cDNAについてこれらの制限酵素の切断部位よりも 5' 側をプローブとして用いれば、各遺伝子の上流域を含むクローンが得られるはずである。

実際には、目的とするクローンの割合を高めるために、あらかじめサザンプロット解析により目的とする断片のサイズを求めておき、次に、制限酵素処理したゲノム断片についてアガロースゲル電気泳動を行い、目的とするサイズの付近を切り出して、ゲルからDNAを抽出して library を構築した (Nicholls, R.D. 1985, Kobayashi,

A. et al. 1989)。

抽出したミツバチのゲノムを *Sal* I または、*Sal* I と *Xho* I で消化後、 α -glucosidase, amylase, glucose oxidase について、cDNA-の *Sal* I と *Xho* I の切断部位よりも5'側をプローブに用いて、それぞれサザンプロット解析を行った。その結果、 α -glucosidase については、*Sal* I 消化により約8kbpの断片が、また、*Sal* I, *Xho* I 消化により約7kbpと約0,5kbpの断片が検出された(図32A)。同様に、amylase については、それぞれ、約9kbp, 約1.5kbp, glucose oxidase については、約4.3kbpと約3kbp, 約1.4kbp, (それぞれ、*Sal* I 消化、*Sal* I, *Xho* I 消化の順に並べてある。) にバンドが検出された(図32B, C)。これらのバンドは、glucose oxidase における約3kbpのバンドを除いて、いずれもサテライトDNAのバンドとは位置が異なった。

amylaseとglucose oxidaseについては、非常に短いサイズに一本のバンドとして検出されているので、おそらくシングルコピーであると考えられる。 α -glucosidase についても、*Sal* I 消化により生じた約8kbpの断片が、*Xho* I 消化により約7kbpと約0,5kbpの断片に分かれたと考えることができ、したがって、この8kbpに複数

のコピーがコードされているのでなければ、シングルコピーであろう。

今回の結果から、*Sal* I と *Xho* I の組み合わせで行ったものが、サザンプロット解析におけるシグナルが明確であったので、*Sal* I、*Xho* I 消化産物について、ゲルより予想サイズ付近をそれぞれ切り出し、vector に組み込んだ。

現在、これら3個のクローンの単離を試みている途中である。

第4節 考察

働き蜂の行動変化にともなう、下咽頭腺の細胞機能の転換は、動物細胞の分化の可塑性、または社会性の分子的基盤の解明にとって、非常に適した材料となりうると考えられる。そこで、次に以下の2点の解明を試みることにした。すなわち、(1) 下咽頭腺の機能を制御する体液性因子の探索、同定、(2) 細胞機能の転換の分子機構の解明、である。

本章ではその第一歩として、まず下咽頭腺の機能転換が生じる系を組織培養により確立することを試みた。また、外勤蜂下咽頭腺特異的産物である糖代謝酵素群の遺伝子制御領域を同定する目的で、これら遺伝子上流配列を含むクローンの単離を試みた。

下咽頭腺の *in vitro* 培養については、培養依存にロイヤルゼリー蛋白も α -glucosidase も発現が失われた。この、培養依存のロイヤルゼリー蛋白も α -glucosidase も発現していない状況は、羽化直後のまだ内勤蜂の機能を持たない下咽頭腺の蛋白パターンに類似していた。このことから内勤蜂、外勤蜂それぞれの状態をもたす物質がなにか必要なのではないかと考えられる。

さて、ここで仮定した下咽頭腺の機能を獲得させる体液性因子であるが、第4章に示したように、下咽頭腺の機能と、蜂の行動が一致することを考えると、この因子は、下咽頭腺だけでなく脳にも作用して、働き蜂の本能行動をも司っている可能性がある。また、それだけではなく他の器官にも作用して、働き蜂の身体全体を内勤蜂、あるいは、外勤蜂の状態にするホルモンである可能性も考えられる。現在までのところ、幼若ホルモンが外勤化に作用する候補物質なのではないかと考えられている (Robinson, G., E. 1985, Sasagawa, H. *et al.* 1988, 1989)。

働き蜂の分業は、加齢のみでなく、幼虫の数や巣の貯密度といった群の状態などの環境による制御も含まれ、今まで分子生物学的な解析は困難であった。もし上記因子が同定されれば、下咽頭腺の機能の転換をマーカーとして用いることにより、今まで解析の困難であった働き蜂の分業について働き蜂の体内での分子メカニズムの解明が予想される。

細胞機能の転換の分子機構の解明のための、糖代謝酵素群の遺伝子制御領域の解析については、 α -glucosidase, amylase, glucose

oxidase の上流を含むクローンについて単離を試みている途中である。その過程におけるサザンプロット解析により、これらの遺伝子はそれぞれゲノム上に、おそらく 1 copy であろうということが示された。

α -glucosidase, amylase は、おそらく唾腺でも存在し、常に発現していると考えられるが、今回の結果から考えると、構造のあまり似ていないサブタイプが存在しており、クロスハイブリダイゼーションが生じなかったのか、共通の遺伝子を用いており組織特異的な制御領域が存在するかのいずれかであろう。

詳しくは、今後の展望の項に述べるが、これら3種類の上流配列に共通の制御領域の同定、および結合因子の検索が今後の課題である。

第 5 章

図表

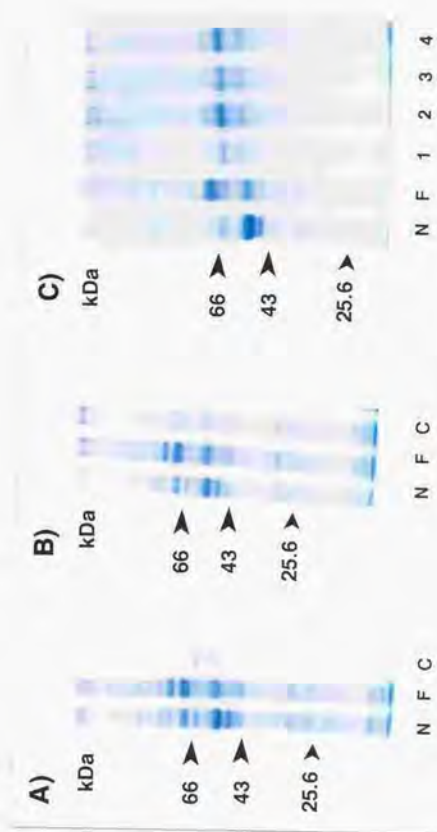


図31 下咽頭腺の *in vitro* 培養後の蛋白発現パターン

A) 内勤蜂, B) 外勤蜂 について、下咽頭腺を培養後のSDS-PAGEの結果を示す。レーンN,Fは内勤蜂と外勤蜂のコントロールで、Cは培養後の結果を示す。また、C)では、培地の検討として、1; GIM、2; GIM + 5%FCS、3; EX-cell 400、4; EX-cell 400 + 5%FCS、をそれぞれ用いた結果を示す。

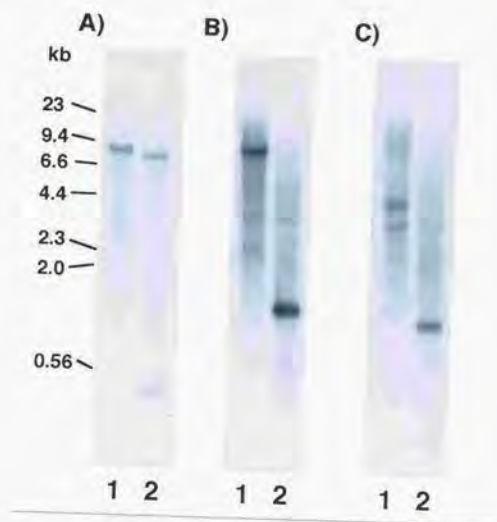


図32 糖代謝酵素遺伝子のゲノムサザンプロット解析
 働き蜂のゲノムDNAを、それぞれ各レーン $10\mu\text{g}$ ずつ用いた。それぞれ、
 (A) α -glucosidase、(B) amylase、(C) glucose oxidase、について
 の結果を示す。それぞれ、レーン1は *Sal* I 消化、レーン2は、*Sal* I と
Xho I 消化の結果を示す。

第6章

総括と展望

第1節 まとめ

本研究の目的は、動物の社会性の分子的基盤を、分業を行う個体の末梢器官の役割に伴う機能の特殊化という視点から明らかにすることであり、また、細胞分化の可塑性について、形態形成の終了した後に器官の機能が変化する際の移行の様式の解析から、新しい可能性を探ることである。

私は、社会性を持つ動物の材料としてミツバチを用い、その頭部分泌器官である下咽頭腺に着目して以下に示す点を明らかにした。

(1) 3種類のローヤルゼリー蛋白群、および、 α -glucosidase、amylase、glucose oxidaseのcDNA cloningを行った。さらに、内勤蜂から外勤蜂への行動変化に伴う、これら遺伝子の発現変化を調べた。その結果、56kDa蛋白遺伝子を除いた、6種類中 5種類の産物について、分業に伴う発現変化が遺伝子発現のレベルで調節されていることがわかった。すなわち、働き蜂の行動変化に伴って、ローヤルゼリー蛋白群から糖代謝酵素群へと、下咽頭腺の遺伝子発現の様式が大きく転換することを明らかにした。このことは、下咽頭腺

の機能が、あたかも乳腺から消化腺へと転換することを示している。

(2) 下咽頭腺で *in situ hybridization* 法をおこない、分泌腺細胞全てで、ローヤルゼリー蛋白遺伝子、および α -glucosidase 遺伝子が発現していることを示した。このことから、働き蜂の加齢にもなう分業の変化に従って、下咽頭腺の個々の細胞が、遺伝子発現の様式を変化させ、細胞機能を転換させていることを示した。すなわち、個々の分泌腺細胞が機能転換することにより、下咽頭腺の機能が変化することを明らかにした。下咽頭腺の機能転換は細胞の脱分化や新生によらずに、器官全体の機能を変化させる点で新しいタイプの移行様式と考えられ、動物細胞の分化の可塑性について新しい可能性を提示するものと思われる。

(3) 日齢の進行した働き蜂と、雄蜂幼虫からなるコロニーを人為的に作製し、これら、日齢の進んだ働き蜂に育児をさせた際の下咽頭腺の蛋白発現を解析することにより、下咽頭腺の細胞機能の転換は単に日齢によるのではなく、コロニーの状況に依存すること、すなわち、下咽頭腺細胞の機能転換は働き蜂の行動に伴って変化する

ことを初めて明らかにした。個体を構成する細胞が、その個体が置かれた集団の環境変化に対応して変化する点で、社会生物学的に非常に興味深い知見である。

以上、下咽頭腺細胞からの解析結果に基づき、細胞自体の機能転換について述べたが、この、現在はあまり一般的とは考えられていない現象も、今後は、形態形成終了後の様々な現象を通じてもっと普遍化され、あるいは、ひょっとすると変身といった概念として脚光を浴びることがあるかもしれない。

第2節 今後の展望

次に今後の課題と展望について述べる。

本研究により、働き蜂の、行動変化に伴う下咽頭腺細胞の機能変化という、新たな現象が明らかにされた。従って、次に解析されるべき、重要な課題としては、どのような因子が下咽頭腺細胞に機能変化をもたらすのか、また、細胞内では、どのようなメカニズムにより機能転換が生じているのか、という2点であろう。

下咽頭腺の機能を制御する体液性因子の探索、同定は、社会性を成り立たせる働き蜂の分業をもたらす分子機構の解明の一端として、また、細胞機能の転換の分子機構の解明は、細胞分化の可塑性についての制御因子の解析として、最初に設定した本研究の目的について、さらに深く追求するものである。

これらについては、第5章で、まだ未完成ながら結果を少し述べたが、まだ研究のスタート地点に立ったばかりである。以後、この2点を主にして、各項目ごとに展望を述べる。

(1) 下咽頭腺の機能を制御する体液性因子の探索、同定

下咽頭腺は体液に浮遊しているため、働き蜂の分業にともなう機能変化は、ホルモンなどの体液性因子により制御されていると考えられる。そこで、この因子を同定するために、以下のような方法を考えている。まず頭部分泌腺の機能変化が生じる系を組織培養により確立する。内勤蜂や外勤蜂の働き蜂の体液や、各種の昆虫ホルモンなどの候補となる物質を添加してローヤルゼリー蛋白や α -glucosidaseなどのマーカー蛋白の発現が維持されたか、または転換したかにより、その活性を検出する。この際、頭部分泌腺のタンパク発現パターンが、内勤蜂型になるもの、および、外勤蜂型になるものの二通りの活性が予想される。この系をアッセイ系として、体液中からの因子の精製、同定を試みる。

さらに、第5章・考察で述べたように、この因子が下咽頭腺の機能変化のみならず、働き蜂の分業も支配する可能性も考えられる。そこで、精製された因子を働き蜂の体内に注入し、内勤蜂から外勤蜂へ、または外勤蜂から内勤蜂への行動の変化をもたらすか否かを調べることも、十分に試みる価値のある実験である。

さて、第4章・考察で、働き蜂の分業の調節は、おそらくフェロモンによるのではないかと述べた。この、フェロモンとして働いている物質が直接、脳と抹消器官に作用し、働き蜂の分業をつかさどっている可能性はあるのかもしれない。

しかし、フェロモンである女王物質については、働き蜂を働き蜂たらしめているともいえる物質であるが、これは、直接作用しているのではなさそうである。すなわち、働き蜂の体内に注入したのでは作用が無く、おそらく脳を介した作用であるらしい。(坂上、1983)

むしろ、注目すべきデータとしては、働き蜂では脳内に存在する神経分泌細胞が、女王蜂や雄蜂に比べて非常に発達しているという報告である。この細胞は、ペプチドホルモンを合成し、分泌するという役割をもつ。一般に、神経分泌細胞から分泌されたペプチドホルモンは、側心体から体液中に放出されるか、側心体を刺激してさらに別のホルモンを分泌させるなどの作用を持つことが知られている。生殖が主な役目である女王蜂や雄蜂とは異なり、働き蜂は様々な分業を行う。したがって、こういったペプチドホルモンが、下咽

頭腺も含めて、働き蜂の体内で分業に応じた行動と身体機能をつかさどっていることは、十分あり得ると考えられる。

(2) 細胞機能の転換の分子機構の解明

下咽頭腺の機能転換は、単一の細胞が脱分化や細胞の新生なしに転換するという点で、また、行動変化にともなうという点で非常に興味深い。この転換には、下咽頭腺細胞を外勤蜂型にする主要部をつかさどるような key factor が存在するのだろうか。

私は、この因子を、転写因子であると仮定し、外勤蜂特異的に発現する糖代謝酵素群の遺伝子発現を制御する、と考えた。その理由として、これら糖代謝酵素が、外勤蜂下咽頭腺にとっての機能分子であり、これらのすべてが遺伝子発現のレベルで調節されているためである。

現在、 α -glucosidase、amylase、glucose oxidaseの上流域を含むゲノムクローニングのスクリーニングを行っている途中であるが、まず、これら上流域の塩基配列を解析し、共通となるモチーフを検索する予定である。

下咽頭腺は培養細胞が確立されていないため、モチーフに結合す

る因子のスクリーニングは困難であるが、近年の遺伝子工学の進歩により one hybrid法などを用いて、直接cDNA clone の単離は可能であろう。

外勤蜂下咽頭腺は、同定された3種類の糖代謝酵素遺伝子の他にも、特異的に発現する糖代謝酵素のような機能分子がおそらく存在すると思われる。その場合には、当然、この分子の上流にも共通の結合配列が存在し、おそらくこの因子が共通に制御するだろうと思われる。

また、一方で、64kDa蛋白と50kDa蛋白の二つのローヤルゼリー蛋白については、この因子が遺伝子の抑制因子として働いている可能性も指摘できる。その場合には、56kDa蛋白遺伝子上流には結合モチーフがなく、64kDa蛋白と50kDa蛋白の両遺伝子上流には結合するということになるのであろうが、もしも、こういった機能まで有するのであれば真の意味で機能転換を決定する因子であるといえそうである。

(3) 働き蜂の老化と分業、下咽頭腺の機能転換について

ここで、話が少しずれてしまうが、本稿の最後に、新たに別の興

味深い問題を提起したいと思う。それは、寿命、老化という、分子生物学にとってまだ未開の魅力的な分野の問題である。

第4章の結果は、下咽頭腺の機能転換は単に働き蜂の日齢に伴ったものではなく、コロニーの状況にしたがう、というものであった。ここで注意して欲しいのは、日齢によらないとっているのであって、老化によっていないとまでは言い切れていない点である。すなわち、下咽頭腺の機能転換は老化現象ではないとは完全には否定しきれない。ここでの実験結果は、普段なら外勤蜂になるはずの日齢でも外勤蜂にならずに内勤蜂のままている、ということであり、むしろ積極的に老化説を採ると、年寄りになるはずの時間が経っても若いままている、ということになる。なぜこのようなことを述べるかという、今回の実験群では、day61の時点で7割程度の働き蜂が生き残っており、寿命がのびる傾向にあったからである。

さて、通常の条件下では、働き蜂の寿命は季節によって異なり、一般には春、夏の活動期に短く、羽化後30~60日であるが、秋の個体は、越冬をするため、150日近くにもなる(Sakagami, Fukuda, 1968)。この越冬蜂の下咽頭腺の状態がどうであるかは

残念ながらほとんどわかっておらず、形態的に発達したものが多いらしいという程度である。

しかし、両者の共通点として、ともに新しい働き蜂の供給がなくなるという点があげられることは重要である。このことは、冬になったから活動が低下した、といったレベルの問題ではなく、おそらくは、コロニーの状況として、新しい蜂の供給が経ると、各個体の寿命が延びはじめる、という驚くべき可能性があるように思われる。このことは、言葉を変えれば、普段の、働き蜂が常に供給されているような状況では、本来もっと寿命が長かったものが、早く死ぬように制御されている、と考えることもできる。(実際、女王蜂の寿命は2~3年である。)

その意義については、不明であり、いまのところ、分子生物学的に着手できそうなとっかかりもまだ持っていないのであるが、非常に興味深い問題であると思われるので、ここに記した。

材料と方法

ミツバチの飼育

ミツバチは、熊谷養蜂より購入したセイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) を用いた。コロニーは、本学部付属薬用植物園に設置した。内勤蜂は、巣の中で幼虫に餌を与えているものを、また、外勤蜂は、花蜜や花粉を採集し、帰巣したものを採集した。

ただし、6日齢と、29日齢の働き蜂は、玉川大学佐々木正巳先生のご協力により、玉川大学で飼育されているセイヨウミツバチを戴いた。すなわち、新たに羽化した日齢0の働き蜂にペイントで印をつけ、群に戻し、29日後に印をつけた蜂を採集したものを用いた。

外勤蜂の捕獲法

基本的には、巣門の前に立ち、捕虫網を振って帰巣する個体を捕らえ、その中から花粉を脚に付けている個体を選んだ。また、ミニコロニーを作成した際に用いた方法は、非常に効率が良かったので以下に記す。外勤蜂を捕らえる際に、まず巣門にハチミツを大量に流す。花粉を採取して戻ってきた蜂は、巣内に戻ろうとするが、巣門付近にはハチミツが流してあるため、体にハチミツが付き身動きが鈍くなる。さらに、巣門付近は、流し込まれたハチミツを運び込

もうと巣内から出てきた蜂でゴった返しているため、容易に巣内に戻る事が出来ない。したがって花粉を採取してきた外勤蜂を容易に捕らえることができた。

下咽頭腺蛋白の調製

ミツバチを氷上で麻酔した後、顕微鏡下で、下咽頭腺を摘出し、buffered insect saline (10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 130 mM NaCl, 5mM KCl and 1mM CaCl) containing 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 ug/ml pepstatin, 100 ug/ml leupeptin 中で、氷上、ホモジナイズした。ホモジネートは、700gで10分間遠心し、その上清を-20℃に保存した (Kubo, *T et al.* 1996)。また、各個体ごとの解析では、サンプル量が非常に少ないために、100 μ lの上記のbuffered insect saline 中でソニファイヤーによりホモジナイズを行った。

SDS-PAGE

SDS-PAGEは、Laemmliの方法 (1970) にしたがって行った。試料は、1% (w/v) SDS, 2% (V/V) 2-mercaptoethanol 中で75℃、20

分加熱し変成させた。分離ゲルは、10%のSDS-ポリアクリルアミドゲルをもちい、電気泳動をおこなった。電気泳動後、ゲルは、Fairbenksらの方法(1971)により染色した。

イムノプロット解析

SDS-PAGEの後、transfer buffer中で電氣的に(70 mA, 16 h) PVDF filter (Millipore)に転写した。フィルターは5% skim milkを含むTBS-Tにて1時間ブロッキングを行った後、affinity purify した抗体を加え1時間反応させた。TBS-Tで洗浄した後、5% skim milkを含むTBS-Tにて1/4,000希釈したペルオキシダーゼ標識2次抗体 (Amersham) と1時間反応させた。洗浄後、ECL (Amersham) を用いた化学発光法によってシグナルをオートラジオグラフィにより検出した。また、抗体のリブローブは、フィルターを100mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl pH 6.7 中にて、50℃、30分インキュベートし、抗体をはがすことにより行った。その後、ブロッキングから再度同様の操作を行った。

抗体による50, 56, 64kDa蛋白のcDNA cloning

セイヨウミツバチ下咽頭腺cDNAライブラリー（入フェージ）を大腸菌（XL1-Blue MRF⁺）に感染させ、プレートにまく。IPTGで飽和したニトロセルロースフィルターにより蛋白を誘導した。その後、3%ゼラチンを含むTBS-Tによりブロッキングを行った（r.t., 30min）。大腸菌のライゼートと1%ゼラチンを含むTBS-Tに、各抗ローヤルゼリー蛋白抗体を加え、これを一次抗体としてフィルターと反応させた。TBS-Tで洗浄した後、1%ゼラチンを含むTBS-Tにより1/1,000希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（Bio-Rad）と1時間反応させた。染色はアルカリフォスファターゼ依存のNBT/BCIPによる発色により行った。得られた陽性クローンは、フェージミドに転換し、アルカリ/SDS法によりプラスミドを調製した。塩基配列の決定には、各種deletion mutantを作製し（Henikoff, S. 1987）、Sanger, F. (1977)らの方法に従って、dye terminator法によりauto-DNA sequencer (ABI)を用いてその塩基配列を決定した。

RT-PCRによる50kDa蛋白cDNA断片の検出

働き蜂下咽頭腺 total RNA を鋳型に、SuperScript Preamplification System (Gibco BRL)を用いてoligo-dT primingによりcDNA合成を行った。そして部分アミノ酸配列から設計した degenerate primerを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をサブクローニングした。このサブクローンの塩基配列を決定して primerに用いた部分よりもさらに内側に、50kDa蛋白の部分アミノ酸配列をコードしていることを確認した。

PCR産物のサブクローニング

PCR産物のサブクローニングは基本的に以下の方法で行った。まず、PCR反応液をアガロースゲル電気泳動後、目的のバンドを切り出す。目的のバンドを含むゲル片を凍結融解後、しみだしてきた溶液を鋳型として、*pfu DNA polymerase* を用いて再度PCRを行う。たいいてい場合は、この操作により、目的とするサイズのバンドのみが充分量、増幅できる。

vector への組み込みは、*Sma I* で切断したpGEM-3Zf(+)に2~5Uの*Sma I* 存在下でDNA ligation kit (Takara) を用いてligation

反応を行った。この方法 (Liu, Z., G. and Schwartz, L., M. 1992) は、self ligation したvector を反応液中の *Sma* I が切断するため、insert の組み込まれる割合が比較的高い。insert 中に *Sma* I による切断部位が含まれる可能性の低い比較的小さい産物には有効な方法である。

50kDa蛋白のcDNA cloning

上で得られたサブクローンのinsert部分をPCRによって増幅し、そのPCR産物をrandom labeling kit (Takara)に従って³²pラベルした。そして、ラベルしたPCR産物をプローブとしてミツパチ下咽頭腺cDNAライブラリーよりplaque hybridization法により cloning-を行った。

plaque hybridization

大腸菌 (XL1-Blue MRF⁺) にcDNAライブラリーを有するファージを感染させ、プレート上で37℃、約10時間培養してplaqueを形成させた。プレートを4℃、1時間冷却後、nylon membrane (NEN, Colony / Plaque Screen) をプレート上にのせ、replica (duplicate)

を作製した。フィルターは0.5 N NaOH、1 M Tris-HCl, pH 7.4、に順次1-2分浸し、その後80℃で完全に乾燥させた。フィルターを2×SSCで濡らし、hybridization solution (0.5M Sodium phosphate pH 7.2, 1mM EDTA, 7% SDS) 中で65℃、約30分間 prehybridizationを行った (Church and Gilbert 1984) 後、プローブを加えて65℃、over night で hybridizationを行った。

0.1% SDS を含む2×SSC中で65℃、15分間フィルターを洗浄後、autoradiography によりシグナルを検出した。

PCRによる α -glucosidaseの cDNA cloning

ファージライブラリーをファージミドに変換し (Short, J. M. *et al.* 1988)、大腸菌に感染させ、プレートにまき、コロニーを得た。シングル化したコロニーをLB培地に懸濁し、これをPCRの templateとして用いた。primerは、 α -glucosidaseの部分アミノ酸配列をもとに作製した。

このうち、予想サイズにバンドが検出されたクローンについて、プラスミドを抽出し、インサートの塩基配列を決定した。

amylaseのcDNA cloning

サブトラクション法は、Clontech PCR-select cDNA subtraction kit を用いた。サブトラクションに用いる鋳型は、total RNAを逆転写し、Clontech capfinder PCR cDNA library construction kit により増幅したものをを用いた。

サブトラクションにより得られたcDNA断片をプローブとし、50kDa蛋白のcDNA cloningの項と同様にして、cloningを行った。

glucose oxidase のcDNA cloning

amylaseのcDNAクローンの一つ、pA15のインサートはリンカーをはさんで2つのcDNA由来であった。後部に挿入された断片は、amylase 由来であり、前部に挿入された断片は、glucose oxidase 由来と考えられたが、poly A を含まなかった。そこで、このglucose oxidase 由来と考えられる配列をプローブとしてplaque hybridization法により1次スクリーニングを行った。上で述べたglucose oxidase 由来配列は、ホモロジー検索から蛋白のN末端をコードする部分を含んでいたため、2次スクリーニングは、蛋白のN末端をコードする部分を含むようなクローンのみを選択するよう

にファージに対して直接PCRをかけることにより (PCRによる α -glucosidaseのcDNA cloningの項を参照) 行った。

ノザンプロット解析

内勤蜂、外勤蜂の下咽頭腺totalRNA (各1 μ g、ただしamylaseのみ各5 μ g) を、50%ホルムアミド、2.2Mホルムアルデヒド存在下で、60°C、7min変成させ、2.2Mホルムアルデヒド、1.2%アガロースゲルにて、電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをアクリジンオレンジで染色し、コントロールとして用いる 18S rRNA の染色像を写真撮影しておく。ゲルからナイロンメンブレンにRNAをトランスファー後、UV照射により、RNAをナイロンメンブレンにクロスリンクした。その後、ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド、5 \times SSC、0.1%SDS、5 \times Denhardt's、50mM Sodium Phosphate、200 μ g/ml ssss DNA) 中でプレハイブリダイゼーション (42°C、O/N) を行い、これに、³²Pラベルしたプローブを加え、42°C、O/Nで、ハイブリダイゼーションを行った。次に、フィルターを、2 \times SSC、0.01%SDS と、0.5 \times SSC、0.01%SDS でそれぞれ、室温、15min 洗浄し、オートラジオグラフィーによ

り検出した。

56kDaローヤルゼリー蛋白の脱糖処理

56kDa蛋白の精製は、内勤蜂の下咽頭腺ホモジネートから C_{18} 逆相HPLCを用いて精製した(Kubo, T. *et al.* 1996)。精製した56kDa蛋白を、1% SDS, 2% 2-mercaptoethanol の入った、0.1M sodium phosphate, pH7.0 中で、100℃ 2min 変性させた。その後、0.5% SDS, 1% 2-ME の入った、50mM sodium phosphate, pH7.0 中で、精製56kDa蛋白0.6 μ gあたり(図4の1レーンあたりの蛋白量)、0.3U または、0.03U の N-glycosidase F (Boehringer Mannheim) により、37℃、50時間、処理した。この反応液を SDS-PAGEにより解析した。

Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization は、基本的に、ショウジョウバエやセンチクバエの成虫原器における方法(Tautz *et al.* 1989, Phillips *et al.* 1990, Poeck *et al.* 1993, Kunieda *et al.* 1997) にしたがった。また、*In situ* hybridization (IRL press) も参考

にした。

下咽頭腺を摘出後、すぐに、4%パラホルムアルデヒド、0.5%トライトン-X100を含むPBSにて、4°C、O/Nで固定した。その後、PBS-Tで3回洗浄（各5分ずつ）し、PBS-Tとメタノールの混液（それぞれ、1:1、1:3）により洗い（各5分ずつ）、メタノールと過酸化水素の混液（5:1, by vol）で1時間脱色した。メタノールで洗った（5min×3）後、メタノールとPBS-Tの混液（それぞれ3:1、1:1、1:3）で洗いPBS-Tで3回洗浄（各5分ずつ）した。proteinase k 処理（30μg/ml, 5 min）を行った後に、2mg/mlのグリシン溶液で1回とPBS-Tで2回洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS-Tにより、組織を再固定した。

ジゴキシゲニンでラベルしたプローブは、PCR DIG labeling kit (Boehringer Mannheim) により、ノザンプロット解析に用いたものと同じシークエンスのものを作成した。

ハイブリダイゼーションは、以下のようにして行った。まず、再固定したサンプルを、PBS-Tとハイブリダイゼーション溶液を1:

1で混ぜた溶液、さらにハイブリダイゼーション溶液でそれぞれ20分ずつ洗った。次にハイブリダイゼーション溶液により55℃、1時間、プレハイブリダイゼーションを行い、その後、ジゴキシゲニンラベルしたDNAプローブを加えたハイブリダイゼーション溶液により55℃、O/Nでハイブリダイゼーションを行った。

検出は、アルカリフォスファターゼをコンジュゲートした抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim) を用いて行った。抗ジゴキシゲニン抗体は、再固定まで行った組織を用いて1時間の前吸収を行った。抗体反応はPBS-Tにて1/5,000希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と1時間反応させることにより行った。その後、PBS-Tで4回洗浄 (各20分ずつ) し、stain溶液 (1mM levamisolを含む) により2回洗浄 (各5分ずつ) した。

染色はアルカリフォスファターゼ依存の基質の分解による発色により行った。発色基質として用いた化学物質は、NBT/BCIP、または蛍光による検出の際には、HNPP/fast red TR (Boehringer Mannheim) を用いた。

無王群の作成および解析

熊谷養蜂より購入したセイヨウミツバチ敬群を用いた。コロニーは、本学部付属薬用植物園に設置し約1ヶ月後に実験を開始した。詳しい観察は第4章第2項を参照。まず女王蜂を取り除いた(1997.3.1)。その後、新しい女王蜂の発生を抑えるため王台をすべて取り除いた(3.14)。3.22には、巢内にさなぎが残っていないことを確認した(day0)。4.19(day28)、4.26(day28)、5.8(day47)、5.22(day61)、にそれぞれサンプリングをおこなった。サンプリングは、巢内から、ランダムにサンプリングと育児行動を行っているものをサンプリングすることの2種類を毎回、行った。

サンプリングした蜂は、下咽頭腺を摘出し、その蛋白発現パターンをSDS-PAGE、イムノブロットにより解析した。

外勤蜂と女王蜂、幼虫からなるミニコロニーの作成

巢板は十分な蜜、花粉を含み、幼虫の存在するものを、正常群より選んだ。羽化による若い働き蜂の混入を防ぐために、さなぎはすべて除いた。女王は、新たに購入したものをを用いた。

外勤蜂は、足に花粉をつけて巣に戻ってくるものを100匹とらえ、

用いた。巣箱にこれらを密閉し(1997.10.5)、4日後(10.9)に働き蜂をサンプリングし、下咽頭腺の蛋白発現パターンをSDS-PAGE、イムノプロットにより解析した。

下咽頭腺の組織培養

当教室の、成虫原基やヘモサイトの培養法に基本的にしたがった。働き蜂成虫を、70%エタノールにより消毒後、下咽頭腺を摘出し、5% FCS、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycinを含むGrace's insect medium (Gibco BRL)、または、EX-cell 400 (Iwaki) 中にて、25°Cで4日間培養した。また、FCSを加える際には、5%になるように加えた。その後、組織をホモジナイズし、蛋白発現パターンをSDS-PAGEにより解析した。

ゲノムDNAの抽出

ゲノムは、働き蜂成虫の頭部、および胸部より抽出した。(腹部は餌として摂取下花粉を消化管内に大量に含むために除いた。) ミツバチ約550匹分の頭部、胸部を、液体窒素により凍結し、乳鉢中で液体窒素存在下で粉末状になるまで砕いた。これを50mM

Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 0.35M Sucrose に懸濁し、500rpm
5 min で遠心して、クチクラなどの固まりを除いた。上清を
5000rpm 5min で遠心し、核画分を沈殿として得た。これを50mM
Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA に懸濁し、終濃度1%となるように
SDSを加え、さらに proteinase k を終濃度200 μ g/ml となるよう
に加え、50°C で1日インキュベートした。

PhOH/CHCl₃ で2回、CHCl₃/IAA で1回、除蛋白を行った後、水
相にエタノールを積層し、ゆっくりと攪拌して、繊維状に析出した
DNAをガラス棒に巻き付けて回収した。

サザンプロット解析

ゲノムDNA 40 μ g を、*Sal* I 120U、または、*Sal* I 120U と *Xho*
I 100U により、切断後、各レーン10 μ g のDNA を、0.8%アガロ
スゲルにて、電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルからナイロンメ
ンブレンに、0.4N NaOHによりDNAをトランスファーした。フィ
ルターを80°Cで乾燥してDNAを固定した後、ハイブリダイゼーシ
ョン溶液 (0.5M Sodium phosphate pH 7.2, 1mM EDTA, 7%SDS) 中
でプレハイブリダイゼーション (65°C, O/N) を行い、これに、

³²Pラベルしたプローブを加え、65°C、O/Nで、ハイブリダイゼーションを行った。次に、フィルターを、2×SSC、0.01%SDS と、0.5×SSC、0.01%SDS でそれぞれ、室温、15min 洗浄し、オートラジオグラフィーにより検出した。

緩衝液の組成

CAPS buffer	10 mM CAPS, 10% methanol, pH 11.0
insect saline	130 mM NaCl, 5.0 mM KCl, and 1.0 mM CaCl ₂
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBS-T	PBS containing 0.1% Tween 20
sample buffer	125 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol
TBS	20 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl
TBS-T	TBS containing 0.1% Tween 20
transfer buffer	192 mM glycine, 25 mM Tris, 20% methanol, 0.02 % SDS

参考文献

参考文献

- Agata, K., Itoh, Y., and Eguchi, G. (1985) *Dev. Growth Differ.* **27**, 506.
- Agata, K., Kobayashi, H., Itoh, Y., Mochii, M., Sawada, K. and Eguchi, G. (1993) *Development* **118**, 1025-30.
- Albert, S., Klaudiny, J. and Simuth, J. (1996) *J. Apic. Res.* **35**, 63-68.
- Boer P. H. and Hickey, D. A. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 8399-8411.
- Chia, W., Howes, G., Martin, M., Meng, Y. B., Moses, K. and Tsubota, S. (1986) *EMBO J.* **5**, 3597-3605.
- Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1991-1995.
- 越後多嘉志 (1973) 化学と生物 **13**, 192-198

- 越後多嘉志、竹中哲夫、(1974) 農化 48, 225-230
- Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Chakraborty S, Schopfer LM, *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3793-3802
- Geber, A., Williamson, P. R., Rex, J. H., Sweeney, E. C. and Bennett, J. E. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 6992-6996.
- Gould, S. J. (1977) *Ever Since Darwin, reflections in natural history* W. W. Norton & Company
- Henikoff, S. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 156-165.
- Henikoff, S., and Wallace, J. C. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 6191-6204.
- Ito, Y., Eguchi, G., (1986) *Dev. Biol.* **115**, 353-362.
- James, A. A., Blackmer, K. and Racioppi, J. V. (1989) *Gene* **75**, 73-83.

- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl and J.-P. Pringault, E. (1997) *Science* **277**, 949-952
- Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S. and Simuth, J. (1994) *J. Apic. Res.* **33**, 105-111.
- Kobayasi, A., Hirai, H., Kubo, T., Ueno, K., Nakanishi, Y. and Natori, S. (1989) *Biochem. Biophys. Acta* **1009**, 244-250
- Krasney, P. A., Carr, C., Cavener, D. R. (1990) *Mol. Biol. Evol.* **7**, 155-177
- Kubo, T., Sasaki, M., Nakamura, J., Sasagawa, H., Ohashi, K., Takeuchi, H., and Natori, S. (1996) *J. Biochem.* **119**, 291-295.
- Kunieda, T., Kurata, S. and Natori, S. (1997) *Dev. Biol.* **183**, 86-94
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.

- Lindauer, M. (1952) *Z. vergl. Physiol.* **34**, 299-345.
- Liu, Z., G. and Schwartz, L., M. (1992) *BioTechniques* **12**, 28-29.
- McGeoch, D. J. (1985) *Virus Res.* **3**, 271-286.
- Moritz, R. F. A., Kryger, P., Allsopp, M. H. (1996) *Nature* **384**, 31.
- Nakai, K. and Kanehisa, M. (1991) *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **11**, 95-110.
- Nicholls, R. D., Hill, A. B. S., Clegg, J. B. and Higgs, D. R. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 7569
- Ohashi, K., Sawata, M., Takeuchi, H., Natori, S. and Kubo, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 380-385.

- Patapoutian, A., Wold, B. J. and Wagner, R. J. (1995) *Science* **270**, 1818-1821
- Phillips, R. G., Roberts, I. J. H., Ingham, P. W., and J. Robert S. Whittle (1990) *Development* **110**, 105-114.
- Plettner, E., Slessor, K. N., Winston, M. L., Robinson, G. E. and Page, R. E. (1993) *J. Insect Physiol.* **39**, 235-240.
- Poeck, B., Hofbauer, A., and Pflugfelder, G. O. (1993) *Development* **117**, 1017-1029.
- Robinson, G. E. (1985) *J. Insect Physiol.* **31**, 277-282.
- Rosch, G. A. (1930) *Z. vergl. Physiol.* **12**, 1-71.
- Sakagami, S. (1953) *Jpn. J. Zool.* **11**, 117-185.
- 坂上昭一 (1983) ミツバチの社会 岩波新書

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sasagawa, H., Kuwahara, Y. (1988) *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1295-1297.
- Sasagawa, H., Sasaki, M. and Okada, I. (1989) *Appl. Ent. Zool.* **24**, 66-77.
- Sasaki, M., Irokawa, T. and Sato, M. (1989) *Bull. Fac. Agr., Tamagawa Univ.* **29**, 11-21.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989) *Chromosoma* **98**, 81-85.
- Vandenbol, M., Durand, P., Bolle, P. A., Dion, C., Portetelle, D. and Hilger, F. (1994) *Yeast* **10**, 1657-1662.

von Heijne, G. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 4683-4690.

Wilkinson, D., G. (1993) *In situ hybridization* IRL press

謝辞

本論文をまとめるに当たり、この研究を行う機会を与えてくださり、研究に対するご理解とご指導を賜りました東京大学薬学系大学院発生細胞化学教室（旧微生物薬品化学教室） 名取俊二教授に心より感謝いたします。

本研究において、直接、ご指導いただきました東京大学薬学系大学院発生細胞化学教室 久保健雄助教授に深く感謝いたします。また、本研究を進めるに当たり、数々の有益な助言を下さいました東京大学薬学部微生物薬品化学教室 倉田祥一郎助手、本間光一助手、小林綾子助手に深く感謝いたします。

久保健雄助教授には、互いに不慣れな、野外でのミツバチの実験用コロニーの取り扱い、といった具体的な事柄から、研究者としてのあり方、研究の独創性といった議論まで幅広い面でお世話になりました。小林綾子助手には、研究者として数歩先を歩く先輩の立場から、本研究についてのみならず研究一般に関して日頃から様々な有益な助言をいただきました。重ねて深くお礼申し上げます。研究上の問題点について様々な議論に応じて下さった、東京大学薬学系大学院発生細胞化学教室の皆様には深く感謝いたします。特に、第1研究室と、博士過程の後半2年間をすごした第3研究室の皆様には、日々の研究生活全般についてお世話になりました。深くお礼を申し上げます。

また、本論文第4章では共同研究者としてお世話になりました、玉川大学農学部 佐々木正巳教授、中村純助手、科学技術振興団さきがけ研究21「知と構成」領域 笹川浩美博士に、深く感謝いたします。さらに、実験のためにミツバチの巣箱を薬用植物園に設置させて下さった、東京大学薬学部付属薬用植物園の折原裕助教授に感謝いたします。

最後に、私の研究生活に理解を示し、精神的に、また、経済的に支援して下さいました両親に深く感謝致します。

1998年3月

大橋 日
日

