

論文の内容の要旨

Analysis of high-temperature sensitive neural activity in the brains of Japanese honeybee workers during the formation of a 'hot defensive bee ball' using immediate early genes

(初期応答遺伝子を用いた熱殺蜂球形成時のニホンミツバチの脳における高温応答性神経活動の解析)

宇賀神 篤

【序論】

動物は、生存競争の中で捕食者に対する様々な防御・攻撃行動を発達させてきた。特に、「天敵」とよばれる特定の捕食者への対抗策としては、種に固有な様々な行動様式が知られている。動物は種進化の過程でこうした適応的行動を獲得したと考えられるが、生態学・行動学的知見に比べ、その神経機構については不明な点が多い。

日本在来のミツバチであるニホンミツバチ(*Apis cerana japonica*)は、天敵のオオスズメバチ(*Vespa mandarinia japonica*)が巣に侵入すると数百匹の働き蜂が殺戮し、「蜂球」とよばれる集団を作り、飛翔筋を震わせて発熱する(図1)。蜂球は30~60分間程維持され、発熱により蜂球内部は46℃の高温に保たれる。オオスズメバチの上限致死温度(約45℃)はニホンミツバチ(約50℃)より低いため、蜂球内でオオスズメバチは死亡する。一方、近縁の外来種であるセイヨウミツバチ(*A. mellifera* L.)では、こうした蜂球形成行動は見られない。従って、熱殺蜂球形成はニホンミツバチに特徴的で、かつ変温動物である昆虫が発熱して天敵に対抗するという非常に稀な防御行動と考えられる。私は卒業研究および修士課程における研究で、初期応答遺伝子 *Acks* を用いて、熱殺蜂球形成中のミツバチの脳では高次中枢であるキノコ体一部の神経細胞(クラス II ケニオン細胞)が顕著に興奮することを示した。博士課程では、これらのケニオン細胞の興奮がどのような感覚刺激により誘導されているのか探索し、蜂球内の46℃という高温に反応して興奮していることを見出した。さらにケニオン細胞の高温応答性をハチ種間で比較するとともに、新規に同定した汎用性初期応答遺伝子 *AmEgr* を用いてケニオン細胞の高温応答性を解析した。

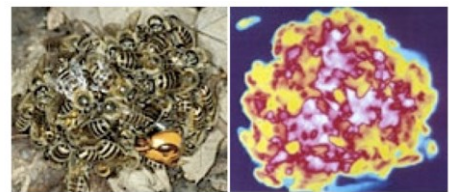


図1. (左)熱殺蜂球 (右)サーモグラフィ像
(http://www.tamagawa.ac.jp/coe/coe/honeybee/bee0_03.htmlより)

【結果】

1. 熱殺蜂球形成中の神経興奮を誘導する感覚刺激の同定

熱殺蜂球形成中のミツバチのキノコ体で見られた神経興奮は、蜂球内の何らかの感覚刺激に反応して誘導されると考えられる。そこでまず、この感覚刺激の同定を試みた。熱殺蜂球の内部は46℃の高温になる。また、蜂球形成中にはミツバチの警報フェロモン成分である酢酸イソアミル(IAA)が放出される。そこで、蜂球形成中の働き蜂

が受容する感覚情報として高温と IAA を想定し、ニホンミツバチの働き蜂を容器に入れ、それぞれの刺激に曝露した。その結果、蜂球内と同様の 46°C の高温に 30 分間曝露することで、熱殺蜂球形成中と類似した、キノコ体のクラス II ケニオン細胞に顕著な Acks 発現細胞の分布が観察された。一方、42°C や IAA への曝露では顕著な Acks の発現は観察されなかった (図 2)。以上から、熱殺蜂球形成時に見られるキノコ体の神経興奮は蜂球内の高温により誘導されることが強く示唆された[1]。

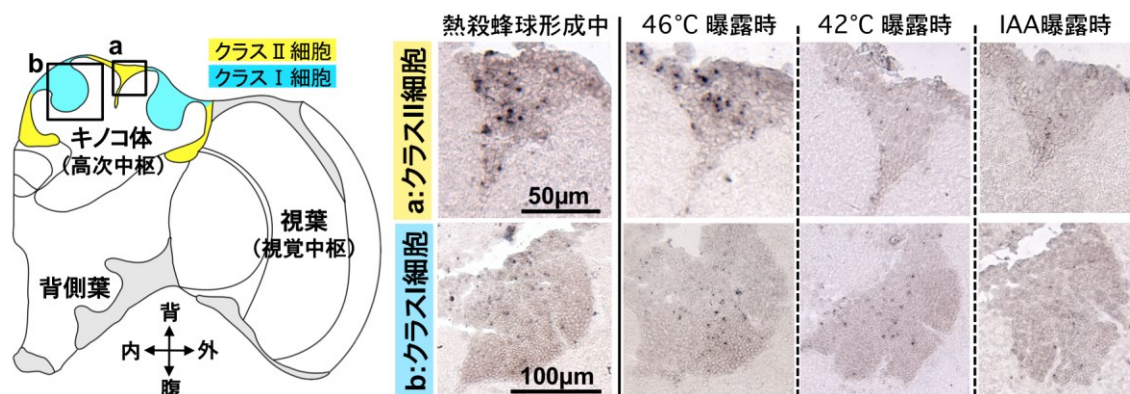


図2. キノコ体ケニオン細胞におけるAcks 発現パターン
(左)ミツバチ右脳半球模式図 (右)左図黒枠内のin situ hybridization像拡大図(黒点がシグナル)

2. 温度選択的高温応答性の解析

①ニホンミツバチとセイヨウミツバチの種間比較

熱殺蜂球内の温度 (46°C) と、キノコ体が応答する温度の相関を調べるため、40°C から 48°C まで 2°C ごとに曝露温度を設定し、キノコ体の神経興奮が何度で誘導されるのか調べた。併せて、このキノコ体の神経興奮を誘導する温度にニホンミツバチとセイヨウミツバチで差があるか検証した。それぞれの温度に働き蜂を曝露した後にキノコ体を摘出し、Acks および kakusei (Acks のセイヨウミツバチホモログ) の発現量を定量的 RT-PCR 法により解析したところ、2 種のミツバチとも 44~46°C の間で有意に発現が上昇し、46°C と 48°C で最大となった (図 3)。さらに、46°C に曝露したセイヨウミツバチ脳での kakusei の発現解析の結果、ニホンミツバチと同様の興奮細胞の分布パターンが観察された。これらのことから、キノコ体のケニオン細胞は 2 種のミツバチで共通に 44~46°C に応答の閾値を持つことが示唆された。

②セイヨウオオマルハナバチでの解析

次に、キノコ体の温度選択的な高温応答性がミツバチ属に固有であるか検証するため、ミツバチ科マルハナバチ属の真社会性ハチであるセイヨウオオマルハナバチ (*Bombus terrestris*) を用いて、ミツバチ同様に高温曝露時のキノコ体における kakusei 発現量を解析した。その結果、ミツバチとは異なり、38~40°C の間で発現上昇が見られ、40°C と 42°C で最大となった (図 3)。

以上より、キノコ体の温度選択的な高温応答性は、少なくともミツバチ科内では保存されていることがわかった。一方で、セイヨウオオマルハナバチの高温応答性の閾値はミツバチ 2 種に比べて約 6°C 低かった。ミツバチとマルハナバチでは通常の生活温度 (巣内温度) に約 6°C の差がある (ミツバチ: 約 33°C、マルハナバチ: 約 27°C)。応答する閾値と巣内温度の相関を考えると、これらのハチのキノコ体の高温応答性細胞は、通常の生活温度から外れた高温時の温度制御に関わる可能性がある。

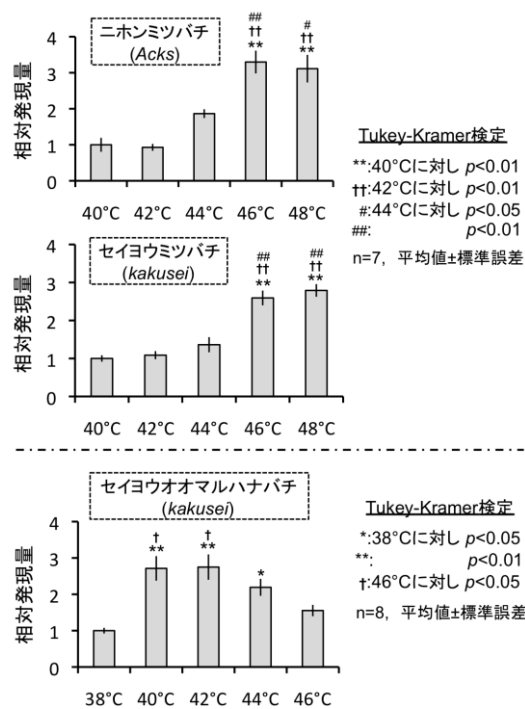


図3. 高温域におけるキノコ体の応答性

3. 汎用性初期応答遺伝子 AmEgr を用いたキノコ体の高温応答性の検証

脊椎動物では、c-fos, c-jun, Egr-1, Arc といった複数の初期応答遺伝子が神経活動の解析に利用されている。これらはいずれも転写因子や細胞質タンパク質をコードする。昆虫では当研究室において、ミツバチから kakusei (および Acks) が初の初期応答遺伝子として同定されてきた[2]。一方で kakusei の転写産物は核局在性の長鎖非翻訳性 RNA であり、神経系での役割は未解明である。そこで私はキノコ体の高温応答性が、頻用される初期応答

遺伝子を指標とした際にも再現されるか検証することを計画した。その結果、抑制性神経伝達物質であるGABA (γ -アミノ酪酸) の受容体阻害剤であるPicrotoxin (PTX) を脳に投与した際に、セイヨウミツバチのキノコ体で *Egr-1* ホモログ (*AmEgr* と命名) が発現上昇することを見出した (図4左)。これは、脊椎動物と昆虫で保存された初期応答遺伝子に関する初の知見である[3]。さらに、46°C 曝露時のセイヨウミツバチ脳における *AmEgr* 発現領域を解析した結果、*kakusei* を用いた際と同様のキノコ体における発現パターンが検出され (図4右)、キノコ体ケニオン細胞の高温応答性が再度、確認された。

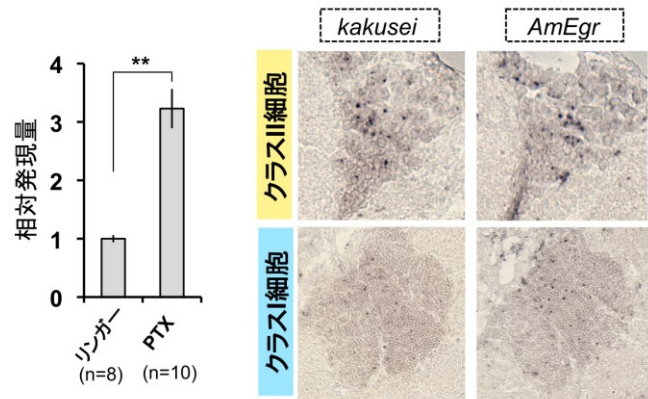


図4. *AmEgr* のキノコ体における発現上昇

(左)PTXの脳への投与時のキノコ体における*AmEgr* 発現量 (**: $p < 0.01$)

(右)46°C曝露時のキノコ体における*kakusei*, *AmEgr* の発現細胞

【まとめ・考察】

本研究では、初期応答遺伝子を用いた実験を通じて、熱殺蜂球形成中の二ホンミツバチ脳のキノコ体では、46°Cの蜂球内温度へ応答した神経興奮が生じていることを明らかにした。さらに、それらのキノコ体の高温応答性細胞に温度選択性が存在すること、およびこの性質がミツバチ科昆虫において保存されることを示唆し、応答する閾値 (ミツバチ: 44-46°C、マルハナバチ: 38-40°C) が巣内温度と相関する可能性を指摘した。これらの高温応答性を示すキノコ体の神経興奮が、生活温度から外れた高温下の体温調節に関わっている可能性が考えられる。二ホンミツバチの熱殺蜂球形成行動時には、この性質が「サーモスタット」として転用され、蜂球内温度が46°Cを超えないように働いている可能性が考えられる。今後は高温感知に関わる神経回路の解明、および、その熱殺蜂球形成時の過熱防止への寄与の検証が課題となる。

【参考文献】

- 1: Ugajin A., Kiya T., Kunieda T., Ono M., Yoshida T., Kubo T. *PLoS ONE* 7 (3), e32902 (2012)
- 2: Kiya T., Kunieda T., Kubo T. *PLoS ONE* 2 (4), e371 (2007)
- 3: Ugajin A., Kunieda T., Kubo T. *FEBS Letters* 587, 3224-3230 (2013)