

ミツバチの女王蜂分化を誘導する因子ロイヤラクチンの発見

鎌倉 昌樹

ミツバチは女王蜂と働き蜂からなる階級社会を形成している。これまでに女王蜂への分化のしくみについてはまったく明らかになっていなかったことから、ミツバチの女王蜂分化誘導機構を解析した結果、ローヤルゼリー中に含まれる成分「ロイヤラクチン」が上皮増殖因子受容体を介して女王蜂への分化を誘導することを新たに見いだした。本稿では、ミツバチのカースト分化とその制御システムについて解説する。

1. はじめに

ミツバチ (*Apis mellifera*) は女王蜂と働き蜂からなる階級社会 (カースト) を形成しており¹⁻⁵⁾、同じ遺伝子型をもつ雌の幼虫のなかでも王台という女王蜂を育てるための部屋で成育した個体は、働き蜂の分泌するローヤルゼリーを摂取して女王蜂へと分化する^{2,3)}。一方、通常の巣房で成育した個体は、ハチミツや花粉などを摂取して働き蜂へと分化する^{2,3)}。このように、ミツバチの発生および分化においては、ローヤルゼリーによるエピジェネティックな調節が行われている^{4,5)}。女王蜂は働き蜂に比べ、体サイズが1.5倍、寿命が20倍であり、1日に2,000個の卵を産むという特徴をもっている^{6,7)}。また、通常の生物個体は大きいものほど発生期間が長くかかるが、女王蜂は体が大きいにもかかわらず早く羽化することも特徴である。筆者が研究をはじめた当時、この女王蜂への分化のしくみについてはまったく明らかになっていなかったが、それまでにローヤルゼリーに含まれるカースト分化に関与する因子の探索は数多く行われてきた。1970年代くらいには、既にその研究がさかんとなりカースト分化誘導因子の探索が広く行われたが同定にはいたらなかった⁸⁾。そんななか、カースト分化を誘導する因子として候補にあがったのはローヤルゼリーに含まれるグルコースとフルクトースであった。一般

の生物学的な概念では糖質が個体の分化を制御することは考えにくい、糖質とカースト分化との関係の報告は数多くなされた⁹⁻¹¹⁾。

一方、これまでにミツバチのみならず膜翅目に属する社会性昆虫のカースト分化の誘導には幼若ホルモンが関与していることが明らかになっている^{12,13)}。働き蜂と女王蜂の幼虫期の幼若ホルモン濃度の変化を測定した結果、4齢期において女王蜂に働き蜂よりも高い濃度が観察されたことから、幼虫に幼若ホルモンを塗布する実験が行われた。その結果、幼若ホルモンをあたえられた幼虫は女王蜂になることがわかった^{12,13)}。この実験により、女王蜂への分化には幼若ホルモンが重要であることが明らかにされた。しかし、女王蜂への分化の際、幼虫の体内において何が幼若ホルモンを増加させるのか、また幼若ホルモンが何に作用しているのかはわかっていなかった。このように、女王蜂への分化において、ローヤルゼリーに含まれる誘導因子や分化誘導機構に関してはどれも断片的なデータのみで、明確な答えが得られないままの状態であった。そこで筆者は、ミツバチの女王蜂への分化誘導機構の解明を試みた。

2. ロイヤラクチンはミツバチのカースト分化を誘導する因子である

ローヤルゼリーに含まれるミツバチのカースト分化誘導因子が見いだせなかった一つの要因として、それまで *in vitro* で女王蜂を飼育する培地の組成はわかっていたが¹⁴⁾、働き蜂を完全に分化させる培地の組成が明らかになっていなかったことがあげられる。働き蜂に分化させる培地がわかっていたら、その培地にローヤルゼリーの成分を添加することにより、個体の表現型に及ぼす影響をはっきりとみ

富山県立大学工学部生物工学科 (〒939-0398 富山県射水市黒河 5180)

Royalactin induces queen differentiation in honeybees
Masaki Kamakura (Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398, Japan)

わけることができるが、その培地が存在しなかったため、カースト分化に対する評価の基準が曖昧なままであった。そこで、まず働き蜂に分化させる培地の組成の探索を行った。

筆者は、ミツバチの研究を開始する以前に、新鮮な (-20°C で保存した) ローヤルゼリーはマウスに対し抗疲労効果を示すが、 40°C で7日間保存したローヤルゼリーではその効果が消失することを明らかにしていた¹⁵⁾。この実験結果をもとに、 40°C で7日間保存したローヤルゼリーを働き蜂を飼育するための培地として利用できるのではないかと考えミツバチのカースト分化に及ぼす影響を検討した。その結果、 40°C で7日間保存したローヤルゼリーは働き蜂を誘導しなかったが、女王蜂への分化の指標が若干減少する傾向がみられた。そこで、 40°C での保存期間をもう少し延長すれば女王蜂への分化の度合いがより減少し働き蜂への分化を誘導できるのではないかと考え、 40°C で7日間、14日間、21日間、30日間保存したローヤルゼリーを作製し、それぞれのサンプルの女王蜂への分化

に対する影響を調べた。その結果、 40°C で30日間保存したローヤルゼリーは、完全な働き蜂に分化させることがわかった。

次に、新鮮なローヤルゼリーと 40°C で30日間保存したローヤルゼリーとの成分組成の違いを調べ、さらに、違いの見いだされた成分について女王蜂への分化に対する影響を観察した。成分分析の結果、ロイヤラクチンと命名した 57 kDa タンパク質^{16~18)}、170 kDa タンパク質、450 kDa タンパク質が 40°C での保存により分解されていることがわかった (図 1A)。170 kDa タンパク質がまったく含まれない加熱されたローヤルゼリーでも、女王蜂への分化に影響をあたえたことから、ロイヤラクチンと 450 kDa タンパク質が女王蜂への分化を誘導する因子として機能する可能性が考えられた。 40°C で30日間保存したローヤルゼリーを含む培地に精製したロイヤラクチンあるいは 450 kDa タンパク質を添加し、ミツバチの幼虫を飼育したところ、ロイヤラクチンだけがミツバチの体サイズの増加、発生期間の短縮、卵巣管の増加を誘導し、女王蜂への分化を促進した¹⁹⁾ (図 1B)。また、同様の効果は大腸菌で発現させた組換えロイヤラクチンでもみられた。さらに、ロイヤラクチンや組換えロイヤラクチンはミツバチの幼若ホルモンの分泌も誘導した。これらの結果から、ロイヤラクチンがローヤルゼリー中に含まれる女王蜂への分化誘導因子であることが明らかとなった¹⁹⁾。

3. ロイヤラクチンはショウジョウバエに対し女王蜂様の表現型を誘導する

次に、ロイヤラクチンの女王蜂への分化誘導における作用機構について解析を行った。ミツバチには保存されている変異体がないため、ロイヤラクチンがカースト分化を誘導する分子メカニズムを個体レベルで詳細に解析することができない。そこで、発生生物学の研究でよく用いられ多数の変異体の存在するショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を、女王蜂への分化誘導機構の解析のためのモデル生物として使えないかと考え、ショウジョウバエに対するローヤルゼリーの影響を調べた。ショウジョウバエにローヤルゼリーだけを食べさせるとすぐに死んでしまったが、培地の組成の変化がショウジョウバエの表現型に及ぼす影響について検討した結果、ショウジョウバエの体サイズを増加させることのできるローヤルゼリーを含有する培地の組成をつきとめることに成功した (図 2)。さらに、ローヤルゼリーの成分がショウジョウバエの表現型に及ぼす影響を検討した結果、ロイヤラクチンがショウジョウバエに対し、女王蜂と同じように、体サイズ、産卵数、寿命の増加や発生期間の短縮を誘導することが明らかとなった¹⁹⁾ (図 2B)。また、ロイヤラクチンによるショウジョウバエの体サイズの増加は、細胞のサイズの増加に起

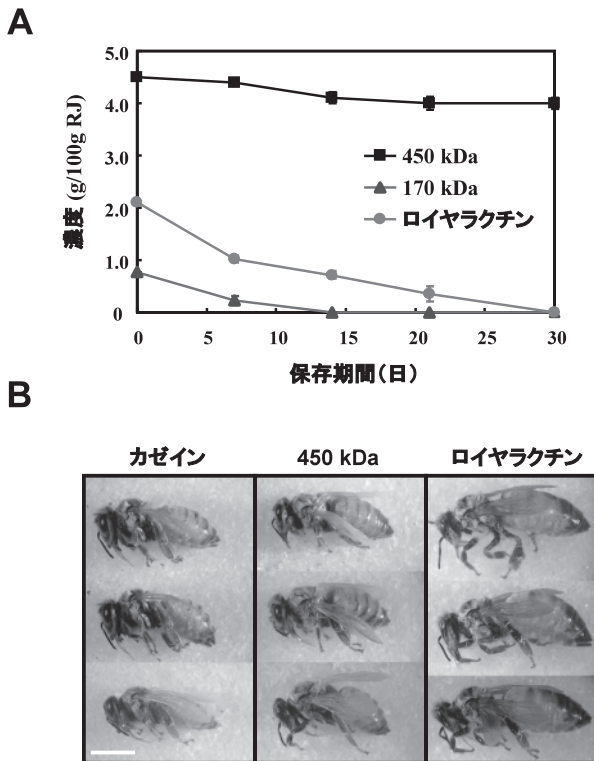


図 1 ロイヤラクチンによる女王蜂分化の誘導

(A) 40°C で30日保存する間のローヤルゼリー (RJ) 中に含まれる 450 kDa タンパク質、170 kDa タンパク質、ロイヤラクチンの濃度変化。

(B) 働き蜂への分化を誘導するローヤルゼリー (40°C で30日間保存) にカゼイン、450 kDa タンパク質、ロイヤラクチンを添加した培地で飼育したミツバチの成虫個体。ロイヤラクチンを摂取した個体のみが女王蜂へ分化した。スケールバー: 5 mm。

[文献 19 より改変]

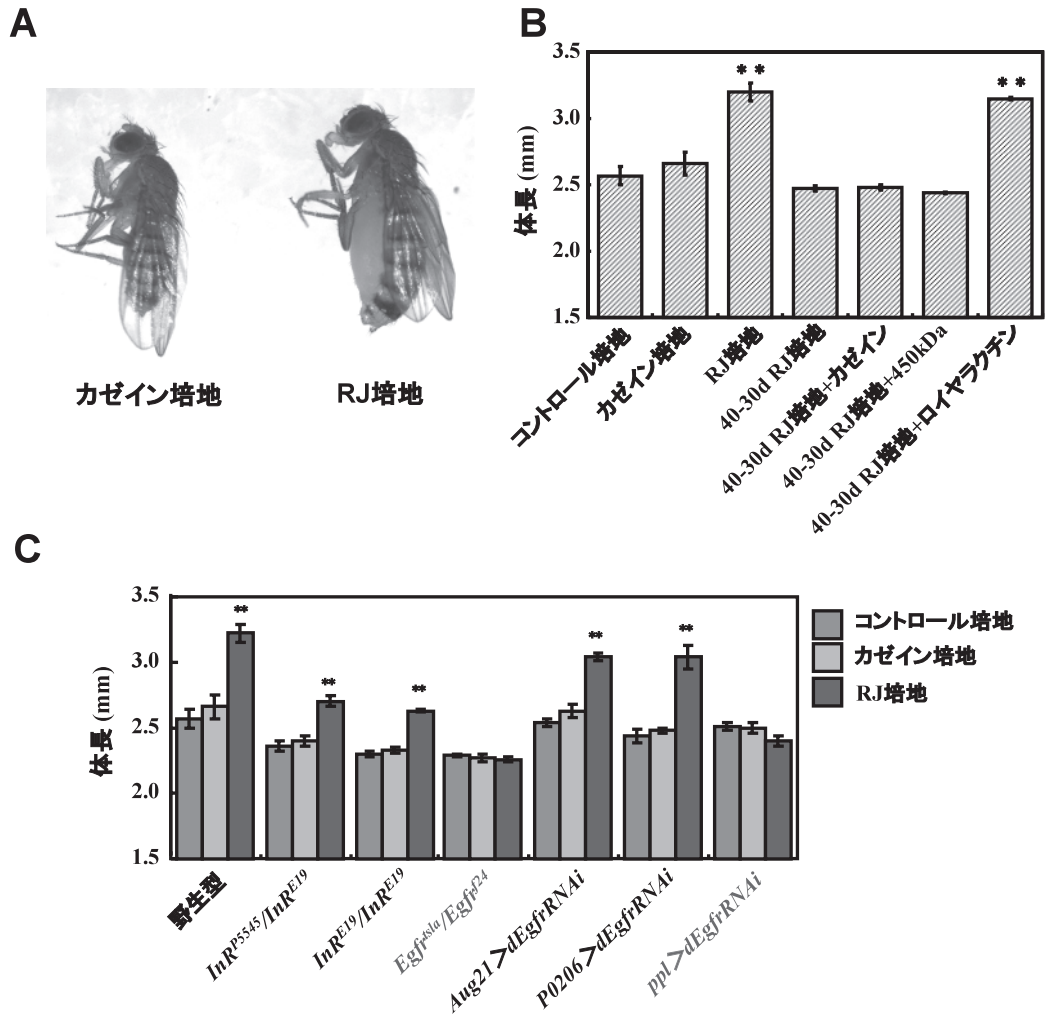


図2 ロイヤラクチンの摂取によるショウジョウバエの女王蜂様表現型の誘導

(A) カゼイン培地 [ローヤルゼリー (RJ) と同等の摂取エネルギーとなるように調整した培地] と RJ 培地を摂取した野生型のショウジョウバエの写真。RJ 培地の摂取により体サイズが増加した。

(B) コントロール培地, カゼイン培地, RJ 培地, 40℃ で 30 日間保存ローヤルゼリー (40-30d RJ) 培地, 40-30d RJ にカゼインを添加した培地, 40-30d RJ に 450 kDa タンパク質を添加した培地, 40-30d RJ にロイヤラクチンを添加した培地で飼育したショウジョウバエの体長の比較。RJ 培地とロイヤラクチンの摂取によりショウジョウバエの体長が増加した。

(C) 野生型, *InR* 変異体 (*InR^{P5545}/InR^{E19}*, *InR^{E19}/InR^{E19}*), *Egfr* 変異体 (*Egfr^{tdo}/Egfr^{tdo}*), アラタ体での *Egfr* の RNAi 系統 (*Aug21 > dEgfrRNAi*), 前胸腺とアラタ体での *Egfr* の RNAi 系統 (*P0206 > dEgfrRNAi*), 脂肪体での *Egfr* の RNAi 系統 (*ppl > dEgfrRNAi*) をコントロール培地, カゼイン培地, RJ 培地で飼育した場合の体長の変化。

(B, C) において, コントロール培地で飼育した系統の値に対して有意に異なる値を** $p < 0.01$ で示した。[文献 19 より改変]

因していることもわかった。これらロイヤラクチンによるショウジョウバエの形態的, 生理的変化は, ロイヤラクチンを摂取した 1 世代だけにみられた。これらのショウジョウバエを用いた飼育実験の結果は, ロイヤラクチンがミツバチのカースト分化誘導因子であることを支持する結果であった。また, これらの結果は, ロイヤラクチンがミツバチだけでなく種を超えショウジョウバエにまで作用し, 同じ遺伝子型をもつ個体をまったく異なる表現型をもつ個体へと誘導するエピジェネティックな因子であることを示して

おり, ミツバチのように生育環境が形質を変化させるという現象が生物に普遍に存在することを強く示唆していた¹⁹⁾。

4. ミツバチのカースト分化はロイヤラクチンが *Egfr* を介して誘導する

ローヤルゼリーを含有する培地で種々のショウジョウバエ変異体を飼育し, ロイヤラクチンによるショウジョウバエの女王蜂様の表現型への変化に関与するシグナルについ

て調べた。まず、ローヤルゼリー含有培地を用いて、ロイヤラクチンによる体サイズの増加と発生期間の短縮に対するシグナル因子の影響について検討した。これまで生物個体の体サイズや寿命などの制御に中心的な役割を担っている因子として、インスリン受容体 (InR) が知られていることから^{20~25)}, *InR* 変異体をローヤルゼリー含有培地で飼育した結果, *InR* 変異体の体サイズは増加し, 発生期間も短縮していた¹⁹⁾ (図 2C)。従って, ロイヤラクチンによる体サイズや発生期間の変化には *InR* は関与していないことがわかった。筆者は, これまでにロイヤラクチンが, ラット初代培養肝細胞の上皮増殖因子受容体 (Egfr) への直接の結合を介して DNA 合成促進作用や抗アポトーシス作用などの EGF 様作用を示すことを明らかにしている^{17,18)}。そこで, *Egfr* 変異体に対するローヤルゼリー含有培地の影響について検討した。その結果, ローヤルゼリーは *Egfr* 変異体の体サイズや発生期間に対して影響を与えなかった¹⁹⁾ (図 2C)。これらの結果から, ロイヤラクチンによる体サイズや発生期間の変化には *Egfr* が関与していることがわかった。次に, ロイヤラクチンがどの組織の *Egfr* に作用してショウジョウバエの体サイズや発生期間を変化させているかを解析した。ショウジョウバエの体サイズの制御には, 前胸腺, アラタ体, 脂肪体が関与していることが明らかになっている^{22,26~28)}。そこで, Gal4/UAS システム²⁹⁾を用いて, 前胸腺, アラタ体, 脂肪体 (哺乳類の肝臓に相当) の各組織の *Egfr* の発現を RNAi により抑制した変異体を作製し, それら変異体に対するローヤルゼリーの影響について検討した。なお, 前胸腺とアラタ体に遺伝子発現を誘導する Gal4 系統として *P0206-Gal4*²⁷⁾を, アラタ体に遺伝子発現を誘導する Gal4 系統として *Aug21-Gal4*²⁷⁾を, 脂肪体に遺伝子発現を誘導する Gal4 系統として *ppl-Gal4*^{21,30)}を用いた。その結果, 脂肪体の *Egfr* の発現を抑制した変異体だけでローヤルゼリーによる体サイズと発生期間の変化が抑制されていた¹⁹⁾ (図 2C)。従って, ロイヤラクチンは脂肪体の *Egfr* に特異的に作用して, ショウジョウバエの体サイズを増加させ, 発生期間を短縮させることが明らかとなった¹⁹⁾。

5. ロイヤラクチンによる脂肪体の *Egfr* シグナルの活性化

次に, 筆者はロイヤラクチンにより活性化された *Egfr* シグナルが, どのように体サイズや発生期間の変化を制御しているかについて検討した。*Egfr* の刺激により, その下流で phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) が活性化され, さらに phosphatidylinositol-dependent kinase 1 (PDK1) と Akt が活性化される。Akt は target of rapamycin (TOR) を活性化し, 活性化した TOR と PDK1 の両者により p70 ribosomal S6 kinase (S6K) が活性化される^{31~34)} (図 3)。

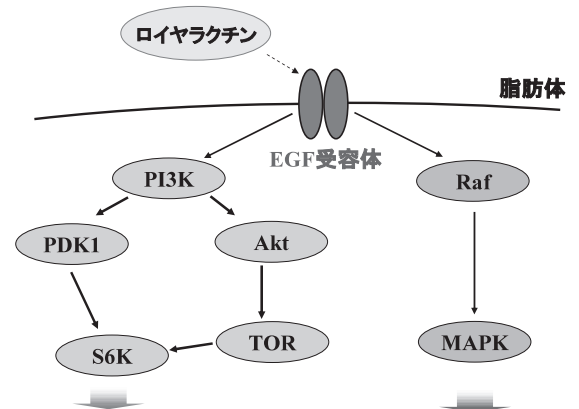


図 3 ロイヤラクチンにより活性化された脂肪体の *Egfr* シグナルとショウジョウバエの表現型との関係

その一方で, *Egfr* は Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化する^{35,36)} (図 3)。同様に, ロイヤラクチンは脂肪体の *Egfr* に作用し, 下流の PDK1 と Akt の活性化を介して S6K を活性化し, その一方で Ras/MAPK 経路を活性化していた¹⁹⁾ (図 3)。また, ミツバチ由来 *Egfr* (AmEgfr)¹⁹⁾ 及びショウジョウバエ由来 *Egfr* (dEgfr)³⁷⁾ を S2 細胞で発現させ, ロイヤラクチン及び分泌型 spitz (s-spitz)³⁷⁾ の AmEgfr 及び dEgfr に及ぼす影響について検討した結果, ロイヤラクチン及び s-spitz は AmEgfr 及び dEgfr のチロシンリン酸化を促進させ, その下流の S6K と MAPK を活性化していた¹⁹⁾。これまで筆者が明らかにしたとおり, ロイヤラクチンはラット初代培養肝細胞の *Egfr* に直接結合することから, ミツバチやショウジョウバエにおいてもロイヤラクチンが脂肪体の *Egfr* に直接作用して, 下流の細胞内シグナルを活性化しているものと推察される。脂肪体において PI3K/PDK1/Akt また, その下流の TOR/S6K の活性を抑制した系統においては, ローヤルゼリーによる体サイズ及び細胞のサイズの増加がみられなかったが, 発生期間の短縮は観察された¹⁹⁾。一方, 脂肪体での MAPK 経路の活性を抑制した系統においては, ローヤルゼリーによる体サイズ及び細胞のサイズの増加はみられたが, 発生期間の短縮が抑制された¹⁹⁾。これらの結果から, ロイヤラクチンによる脂肪体の *Egfr* を介した S6K の活性化が細胞のサイズ及び体サイズ増加に関与し, 一方の MAPK 経路の活性化が発生期間の短縮に関与していることが明らかとなった (図 3)。S6K の loss of function は細胞のサイズを減少させて体サイズを抑制することが報告されており³⁸⁾, 今回の解析結果は, これまでの報告と一致するものであった。

れる脂肪体の Egfr シグナルと、分泌されるホルモンとの位置関係は図 5 のようになる。ローヤルゼリーによるエクジソンの分泌の増加は、脂肪体の Egfr の発現を RNAi により抑制した変異体 ($ppl > dEgfrRNAi$) で抑制され、さらに、脂肪体での MAPK を抑制した変異体 ($ppl > dMKP3$)⁴⁰⁾でも抑制された (図 4A)。しかし、脂肪体の S6K ドミナントネガティブ変異体 ($ppl > dS6KDN$) では、ローヤルゼリーによるエクジソンの分泌の増加に変化はみられなかった (図 4A)。これらの結果から、ロイヤラクチンによる脂肪体の Egfr を介した MAPK の活性化はエクジソンの合成を促進し、発生期間の短縮に関与することが明らかとなった (図 5)。一方、ローヤルゼリーによる幼若ホルモンの分泌の増加、 yp の遺伝子発現の増加、産卵数の増加は、 $ppl > dEgfrRNAi$ で抑制されたが、 $ppl > dS6KDN$ や $ppl > dMKP3$ では、抑制されなかった¹⁹⁾ (図 4B, C)。これまでにエクジソンにより yp の発現が誘導されることが報告されている³⁹⁾。ロイヤラクチンによるエクジソンの分泌増加が抑制される $ppl > dMKP3$ においては、ローヤルゼリーによる yp の遺伝子発現の増加は変化していなかったことから、ロイヤラクチンによる yp 発現の増加にはエクジソンは関与していないものと考えられた。従って、ロイヤラクチンは、Egfr 下流で幼若ホルモンの分泌を促進することで yp の発現を増加させ、産卵数増加を誘導することが明らかとなった (図 5)。幼若ホルモンは、幼若ホルモン受容体である Methoprene tolerant (Met) に作用し

て、種々の遺伝子発現を誘導する^{41,42)}。ロイヤラクチンによる体サイズの増加、発生期間の短縮、幼若ホルモン及びエクジソンの分泌誘導は Met 変異体で抑制されなかったが、ロイヤラクチンによる yp の遺伝子発現や産卵数の増加は Met 変異体で抑制された¹⁹⁾。Met は脂肪体、唾液腺、成虫原基などで発現している⁴²⁾。脂肪体での Met の発現を RNAi により抑制した変異体で、ロイヤラクチンによる yp の遺伝子発現や産卵数の増加が抑制された。これらの結果から、ロイヤラクチンは脂肪体の Egfr を活性化し、体サイズの増加や発生期間の短縮に関与するシグナルと独立した経路を介して幼若ホルモンの分泌を促進させ、脂肪体の Met に作用し yp の発現を増加させることで、産卵数を増加させることが明らかとなった (図 5)。変異体による解析結果から、脂肪体における S6K はロイヤラクチンによる体サイズの増加にのみ関与していることも明らかとなった。一方、ロイヤラクチンによる寿命の延長も Egfr を介していた。Egfr の寿命への関与は今回初めて見いだされた知見である¹⁹⁾。これらショウジョウバエを用いた解析から、ロイヤラクチンによるカースト分化誘導機構は図 5 のような経路が予想された¹⁹⁾。

7. ロイヤラクチンの過剰発現によるショウジョウバエの表現型の変化

ロイヤラクチンのショウジョウバエに対する生理作用をさらに解析するため、Gal4/UAS システムを用いてショウ

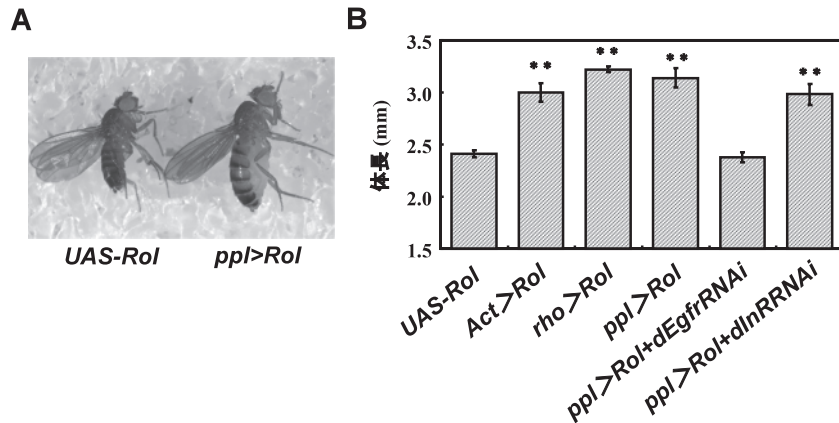


図 6 ロイヤラクチンの過剰発現によるショウジョウバエの女王蜂様表現型の誘導 (A) 脂肪体で Gal4 を発現させる系統 ($ppl-Gal4$) を用いてロイヤラクチンを脂肪体で過剰発現させた系統とコントロール [UAS -ロイヤラクチン (Rol)] 系統の写真。ロイヤラクチンを脂肪体で過剰発現させることで体長が増加した。(B) コントロール ($UAS-Rol$) 系統、全身でロイヤラクチンを過剰発現させた系統 ($Act > Rol$)、Egfr シグナル特異的にロイヤラクチンを過剰発現させた系統 ($rho > Rol$)、脂肪体特異的にロイヤラクチンを過剰発現させた系統 ($ppl > Rol$)、脂肪体特異的にロイヤラクチンを過剰発現させた上で Egfr を RNAi により抑制した系統 ($ppl > Rol + dEgfrRNAi$)、脂肪体特異的にロイヤラクチンを過剰発現させた上でインスリン受容体を RNAi により抑制した系統 ($ppl > Rol + dInRRNAi$) の体長の比較。UAS-Rol の値に対して有意に異なる値を** $p < 0.01$ で示した。[文献 19 より改変]

ジョウバエに対するロイヤラクチンの過剰発現の効果を解析した。なお、広範に遺伝子発現を誘導する Gal4 系統としては Act-Gal4 を、Egfr シグナル特異的に遺伝子発現を誘導する Gal4 系統としては *rhomboid (rho)-Gal4*⁴³⁻⁴⁷ を用いた。その結果、ロイヤラクチンを広範に発現させた形質転換体 (*act>royalactin*)、Egfr シグナル特異的に発現させた形質転換体 (*rho>royalactin*)、脂肪体特異的に発現させた形質転換体 (*ppl>royalactin*) において、女王蜂様の表現型である体サイズ、細胞のサイズの増加、発生期間の短縮、産卵数の増加、寿命の延長がみられた¹⁹⁾ (図 6)。前胸腺やアラタ体でロイヤラクチンを過剰発現させた場合は、体サイズや発生期間に変化がみられなかったことから、ロイヤラクチンをショウジョウバエの体内で発現させた場合においても、ロイヤラクチンが脂肪体特異的に作用していることが明らかとなった。ローヤルゼリーにはロイヤラクチン以外に MRJP2~MRJP5 (MRJP: major royal jelly protein) が含まれていることが報告されている⁴⁸⁾。しかし、ロイヤラクチン以外のローヤルゼリータンパク質 MRJP2~MRJP5 の過剰発現ではロイヤラクチンと同じ効果はみられなかった¹⁹⁾。これらは、ロイヤラクチンがミツバチのカースト分化誘導因子であることを支持する結果であった。ロイヤラクチンを脂肪体特異的に発現させた形質転換体 (*ppl>royalactin*) における体サイズの増加は、InR ではなく Egfr の発現を脂肪体でノックダウンした場合に抑制された (図 6B)。さらに、*ppl>royalactin* における細胞のサイズの増加、発生期間の短縮、産卵数の増加、寿命の延長は、脂肪体での Egfr の発現を RNAi により抑制した場合にすべて阻害された¹⁹⁾。また、ロイヤラクチンの過剰発現により、脂肪体の MAPK と S6K が活性化され、その活性化が Egfr の RNAi によって抑制された¹⁹⁾。これらの結果から、ロイヤラクチンの過剰発現による女王蜂様表現型への変化は、脂肪体の Egfr シグナルを介したものであることが明らかとなった。さらにロイヤラクチンの過剰発現により誘導された女王蜂様表現型と Egfr シグナル、幼若ホルモン、エクジソン、yp の遺伝子発現などとの関係について解析した。その結果、ロイヤラクチンの過剰発現により女王蜂様表現型が誘導された分子メカニズムは、図 5 で示したようなローヤルゼリー含有培地を用いた飼育実験の結果と一致していた¹⁹⁾。

8. ミツバチの RNAi によるカースト分化の抑制

ショウジョウバエを用いた解析から明らかになったロイヤラクチンによる活性化シグナルが、実際にミツバチの女王蜂への分化に関与しているかどうかを確認するため、ミツバチの RNAi 試験を中心に詳細な解析を実施した。ローヤルゼリーを含む女王蜂飼育用の培地にシグナル因子の二本鎖 RNA (dsRNA) を添加してミツバチの幼虫を飼育し、

成虫の表現型を観察することで、シグナル因子の女王蜂分化に対する影響について検討した。その結果、InR の RNAi は女王蜂の体重の増加、発生期間の短縮、卵巣管の数の増加に影響を与えなかった¹⁹⁾ (図 7)。しかし、Egfr の RNAi によるノックダウンにより、体サイズの減少、発生期間の延長、卵巣管の減少がみられ、働き蜂と同じ表現型を示した¹⁹⁾ (図 7)。さらに、ロイヤラクチンはミツバチの脂肪体の Egfr を介して MAPK と S6K を活性化していた。これらの結果は、ロイヤラクチンによる Egfr の活性化がミツバチのカースト分化の誘導に関与していることを示している。ミツバチにおける PI3K, PDK1, TOR, S6K の RNAi はローヤルゼリーにより誘導された体重の増加を抑制したが、他の表現型には影響を及ぼさなかった¹⁹⁾ (図 7)。ロイヤラクチンは、孵化後 3 日目のミツバチの幼虫においてエクジソンの分泌を増加させ、孵化後 4 日目において幼若ホルモンの分泌と yp の前駆体であるビテロゲニンの遺伝子発現を増加させていた¹⁹⁾。ロイヤラクチンによるエクジソンの増加は、Egfr の RNAi と MAPK の阻害剤である PD98059 によって阻害されたが、S6K の RNAi では阻害されなかった¹⁹⁾ (図 5 参照)。PD98059 はロイヤラクチンによる発生期間の短縮を抑制した。ロイヤラクチンによる幼若ホルモン及びビテロゲニンの遺伝子発現の増加は、Egfr の RNAi により抑制されたが、S6K の RNAi や PD98059 では、阻害されなかった¹⁹⁾ (図 5 参照)。このように、ミツバチにおいても、ロイヤラクチンによる Egfr を介した S6K の活性化が女王蜂の体サイズの増加に関与し、一方で、Egfr を経た MAPK の活性化がエクジソンの合成を誘導し、その結果、女王蜂の発生期間を短縮していることが明らかとなった。幼若ホルモンの幼虫への塗布による女王蜂の誘導においては、卵巣の発達のみみられるが体サイズへの影響はないことが報告されている^{49,50)}。従って、ロイヤラクチンによるミツバチの Egfr シグナルを介した幼若ホルモンの分泌の増加は、女王蜂の卵巣発達に関与しているものと考えられる。以上のようなミツバチのカースト分化に関する解析結果は、ショウジョウバエを対象とした解析結果と一致しており、ミツバチにおいてもロイヤラクチンが Egfr シグナルを刺激して女王蜂への分化を誘導していることが明らかとなった¹⁹⁾ (図 5)。

9. ロイヤラクチンの構造と生理機能

ロイヤラクチンは、*mrjp1* 遺伝子の産物であり、57 kDa の単量体からなる糖タンパク質である⁵¹⁾。一方、ミツバチのカースト分化に影響をあたえなかった 450 kDa タンパク質は、MRJP1 が六つ会合したアパルブミンと、そこに 5.5 kDa のアピシミンが会合した多量体タンパク質である⁵²⁾。抗ロイヤラクチン抗体は 450 kDa タンパク質を認識しなかったことや¹⁷⁾、450 kDa タンパク質から MRJP1 やアピシ

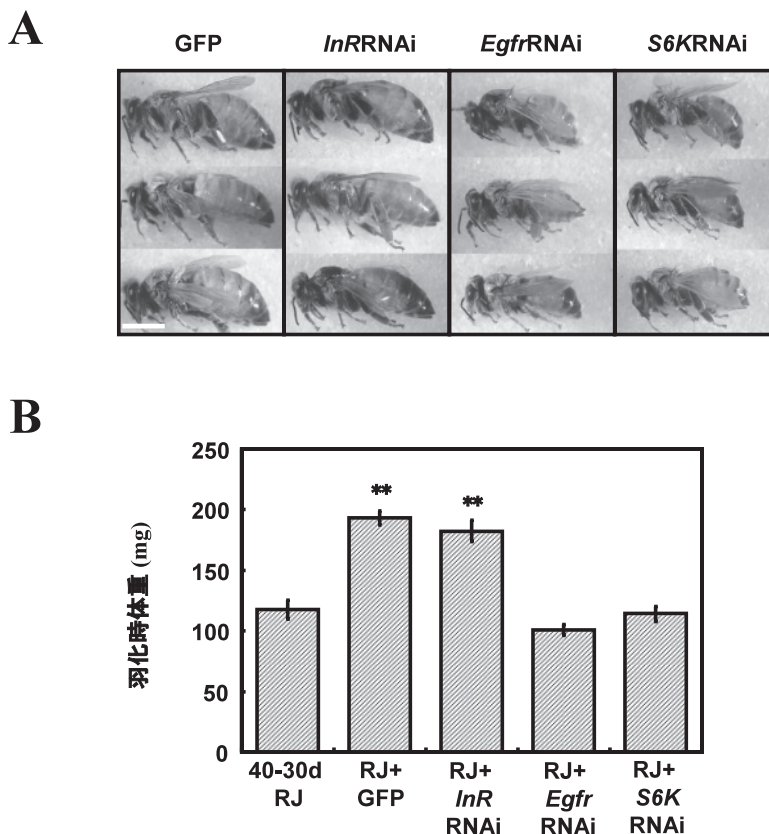


図7 ミツバチの女王蜂飼育における RNAi 試験

(A) GFP (コントロール), *InR*, *Egfr*, *S6K* の dsRNA を含む女王蜂飼育培地で飼育したミツバチの成虫個体。スケールバー：5 mm。

(B) 40℃ で 30 日間保存したローヤルゼリー (40-30d RJ) (働き蜂に誘導) を含む培地, GFP, *InR*, *Egfr*, *S6K* の dsRNA を含む女王蜂飼育培地 [ローヤルゼリー (RJ) 含有] で飼育したミツバチの羽化時体重。40-30d RJ 含有培地で飼育した群の値に対して有意に異なる値を** $p < 0.01$ で示した。[文献 19 より改変]

ミンを遊離させるには界面活性剤が必要であったことから⁵²⁾、ロイヤラクチンと 450 kDa タンパク質はローヤルゼリーにおいてまったく異なるタンパク質として存在していることが示唆された。また、40℃ で 30 日間保存したローヤルゼリーでは 450 kDa タンパク質の 90% が残存していたにもかかわらずミツバチの幼虫を働き蜂へと分化させ、さらに、40℃ で 30 日間保存したローヤルゼリーに精製した 450 kDa タンパク質を加えても幼虫から女王蜂への分化を誘導しなかった。一方、ロイヤラクチンや大腸菌で発現した組換えロイヤラクチンは女王蜂への分化を誘導した。ロイヤラクチンはローヤルゼリーに 2% 含まれているが、40℃ で 30 日間保存したローヤルゼリーにロイヤラクチンを 2% まで添加した場合には、ローヤルゼリーを添加したときと同じ程度まで女王蜂への分化を促進させた。これらの結果から、ローヤルゼリーに含まれる MRJP1 の単量体であるロイヤラクチンのみがミツバチのカースト分化誘導因子として機能することが明らかになった。

筆者はこれまでに、ロイヤラクチンがラット肝細胞の表面の EGF 受容体に直接に結合することにより肝細胞に対し EGF 様の作用を示すことを明らかにしている¹⁸⁾ (未発表データ)。さらに、ロイヤラクチンはミツバチあるいはショウジョウバエに由来する EGF 受容体を発現させた S2 細胞において、EGF 受容体のリン酸化を促進し MAPK や S6K を活性化することも明らかにした。ロイヤラクチンは EGF と 1 次構造において相同性はみられないが、これまでにエリスロポエチンやトロポエチンにおいて、1 次構造のまったく異なるペプチドライブラリーからスクリーニングされたペプチドが天然型のリガンドと同じ生理効果を発揮したことが報告されていることから^{53, 54)}、ロイヤラクチンの EGF 様の作用においてもこのケースが当てはまったものと推察された。

10. お わ り に

このように、筆者は、ミツバチの女王蜂への分化誘導因

子としてロイヤラクチンを見だし、その作用機構を明らかにした。ロイヤラクチンはEgfrの下流においてTORも活性化している。糖質はTORを活性化して細胞の成長に関与することが報告されていることから^{55,56)}、糖質によりカースト分化が誘導されたというこれまでの知見は、ロイヤラクチンの下流のTORを擬似的に活性化したことによりもたらされたものと推察された。ロイヤラクチンがEgfrの下流において幼若ホルモンの分泌誘導も促進することから、今回、明らかにした結果は過去のミツバチのカースト分化について報告された知見をすべて集約するものであった。

これまでに、個体のサイズや寿命の制御における中心はインスリン受容体であるといわれており^{20~25)}、ミツバチのカースト分化の制御においてもインスリン受容体がかかわっているものと考えられていた。しかし、今回の解析により、インスリン受容体ではなくEgfrが女王蜂への分化に重要であることが明らかになり、個体のサイズや寿命の制御における新たなシグナルの存在を明示することができた。これは、個体発生の研究に対し新たな視点を提供するものであり、生物学的に意義のある知見であると考えられる。一方、今回の成果の応用面としては、*in vitro* 飼育系で生育させた女王蜂が実際の女王蜂として機能できれば、女王蜂の安定供給のための新たな飼育法として活用できる可能性がある。さらに、今回の解析により女王蜂と働き蜂との分化のポイントが明らかになったことから、今後さらにミツバチの脳における神経の発生分化の分子機構を解析することで、農業において深刻な問題となっているミツバチが突然失踪する現象（蜂群崩壊症候群）の解明にもつながるものと期待できる。

謝辞

本研究は、筆者が富山県立大学工学部生物工学科にて実施したものである。富山県立大学工学部生物工学科榊利之教授の研究室では自由な環境のもと研究を進めさせていただき深く謝意を表します。本研究を進める上で研究方法などについてご指導賜りました東北大学大学院山元大輔教授、学習院大学安達卓教授、理化学研究所林茂生博士に深く感謝申し上げます。また、実験に用いるミツバチの幼虫を提供下さった羽佐田康幸様、野々垣禎造様にも深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Wilson, E.O. & Holldobler, B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13367–13371.
- 2) Haydak, M.H. (1970) *Ann. Rev. Entomol.*, **15**, 143–156.
- 3) Patel, N.G., Haydak, M.H., & Gochnauer, T.A. (1960) *Nature*, **186**, 633–634.
- 4) Weaver, N. (1957) *Annals Ent. Soc. Am.*, **50**, 283–294.
- 5) Shuel, R.W. & Dixon, S.E. (1960) *Insectes Sociaux*, **7**, 266–282.
- 6) Page, R.E. & Peng, C.Y. (2001) *Exp. Gerontol.*, **36**, 695–711.
- 7) Wheeler, D.E. (1986) *Am. Nat.*, **128**, 13–34.
- 8) Rembold, H., Lackner, B., & Geistbeck, I. (1974) *J. Insect Physiol.*, **20**, 307–314.
- 9) Beetsma, J. (1979) *Bee World*, **60**, 24–39.
- 10) Asencot, M. & Lensky, Y. (1976) *Life Sci.*, **18**, 693–700.
- 11) Ishay, J., Fischl, J., & Rutenberg, A. (1974) *Experientia*, **30**, 1381–1382.
- 12) Bloch, G., Wheeler, D.E., & Robinson, G.E. (2002) in *Hormones, Brain and Behavior* (Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Fahrbach, S.E., Etgen, A.M., & Rubin, R.T. eds.), Vol. 3, pp. 195–235, Academic Press, San Diego, CA.
- 13) Wirtz, P. & Beetsma, J. (1972) *Ent. Exp. Appl.*, **15**, 517–520.
- 14) Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K., & Amdam, G.V. (2007) *PLoS One*, **6**, e509.
- 15) Kamakura, M., Mitani, N., Fukuda, T., & Fukushima, M. (2001) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **47**, 394–401.
- 16) Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M., & Yonekura, M. (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 277–284.
- 17) Kamakura, M., Suenobu, N., & Fukushima, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 865–874.
- 18) Kamakura, M. (2002) *J. Biochem.*, **132**, 911–919.
- 19) Kamakura, M. (2011) *Nature*, **473**, 478–483.
- 20) Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., & Garofalo, R.S. (2001) *Science*, **292**, 107–110.
- 21) Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., & Léopold, P. (2005) *Science*, **310**, 667–670.
- 22) Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., & Léopold, P. (2003) *Cell*, **114**, 739–749.
- 23) Wu, Q. & Brown, M.R. (2006) *Annu. Rev. Entomol.*, **51**, 1–24.
- 24) Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B.F., Beckingham, K., & Hafen, E. (1999) *Cell*, **97**, 865–875.
- 25) Weinkove, D., Neufeld, T.P., Twardzik, T., Waterfield, M.D., & Leivers, S.J. (1999) *Curr. Biol.*, **9**, 1019–1029.
- 26) Caldwell, P.E., Walkiewicz, M., & Stern, M. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1785–1795.
- 27) Mirth, C., Truman, J.W., & Riddiford, L.M. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1796–1807.
- 28) Belgacem, Y.H. & Martin, J.R. (2007) *PLoS One*, **2**, e187.
- 29) Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993) *Development*, **118**, 401–415.
- 30) Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L.C., Tetzlaff, M.T., & Pankratz, M.J. (1999) *Development*, **126**, 5275–5284.
- 31) Navolanic, P.M., Steelman, L.S., & McCubrey, J.A. (2003) *Int. J. Oncol.*, **22**, 237–252.
- 32) LeVe, C.M., Reeder, J.E., & Mooney, R.A. (2004) *Exp. Cell Res.*, **297**, 272–284.
- 33) Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G., & Hafen, E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 15020–15025.
- 34) McManus, E.J. & Alessi, D.R. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, E214–E216.
- 35) Moghal, N. & Sternberg, P.W. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 190–196.
- 36) del Alamo, D., Terriente, J., & Díaz-Benjumea, F.J. (2002) *Development*, **129**, 1975–1982.
- 37) Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R., & Shilo, B.Z.

- (1995) *Genes Dev.*, **9**, 1518–1529.
- 38) Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., & Thomas, G. (1999) *Science*, **285**, 2126–2129.
- 39) Bownes, M. (1994) *Bioessays*, **16**, 745–752.
- 40) Lee, K.S., Kwon, O.Y., Lee, J.H., Kwon, K., Min, K.J., Jung, S.A., Kim, A.K., You, K.H., Tatar, M., & Yu, K. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 468–475.
- 41) Ashok, M., Turner, C., & Wilson, T.G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2761–2766.
- 42) Pursley, S., Ashok, M., & Wilson, T.G. (2000) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 839–845.
- 43) Urban, S. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 3054–3068.
- 44) Guichard, A., Biehs, B., Sturtevant, M.A., Wickline, L., Chacko, J., Howard, K., & Bier, E. (1999) *Development*, **126**, 2663–2676.
- 45) Fuss, B. & Hoch, M. (2002) *Curr. Biol.*, **5**, 171–179.
- 46) Galindo, M.I., Bishop, S.A., & Couso, J.P. (2005) *Dev. Dyn.*, **233**, 1496–1508.
- 47) Lanoue, B.R. & Jacobs, J.R. (1999) *Dev. Genet.*, **25**, 321–330.
- 48) Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J., & Simuth, J. (1998) *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 1020–1030.
- 49) Goewie, E.A. & Beetsma, J. (1976) *Proc. K. Ned. Akad. Wet. C.*, **79**, 466–469.
- 50) Ebert, R. (1980) *J. Comp. Physiol.*, **137**, 7–16.
- 51) Kamakura, M. & Sakaki, T. (2006) *Protein Expr. Purif.*, **45**, 307–314.
- 52) Bilikova, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klaudiny, J., & Simuth, J. (2002) *FEBS Lett.*, **528**, 125–129.
- 53) Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R., Kashyap, A.K., Barbone, F.P., Mulcahy, L.S., Johnson, D.L., Barrett, R.W., Jolliffe, L.K., & Dower, W.J. (1996) *Science*, **273**, 458–464.
- 54) Cwirla, S.E., Balasubramanian, P., Duffin, D.J., Wagstrom, C. R., Gates, C.M., Singer, S.C., Davis, A.M., Tansik, R.L., Mattheakis, L.C., Boytos, C.M., Schatz, P.J., Baccanari, D.P., Wrighton, N.C., Barrett, R.W., & Dower, W.J. (1997) *Science*, **276**, 1696–1699.
- 55) Aguilar, V., Alliouachene, S., Sotiropoulos, A., Sobering, A., Athea, Y., Djouadi, F., Miraux, S., Thiaudiere, E., Foretz, M., Viollet, B., Diolet, P., Bastin, J., Benit, P., Rustin, P., Carling, D., Sandri, M., Ventura-Clapier, R., & Pende, M. (2007) *Cell Metab.*, **5**, 476–487.
- 56) Proud, C.G. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5338–5349.
-