

【研究報告】

発生期のミツバチ脳における初期応答遺伝子 *Egr* の発現解析

宇賀神篤¹・佐々木哲彦²・小野正人³

要約

Zinc finger型転写因子をコードする初期応答遺伝子 *Egr* について、発生期のミツバチ脳を対象とした発現解析を実施した。蛹の初期から中期にかけて、一次視覚中枢である視葉において *Egr* の発現上昇が観察された。脊椎動物では、発生期に *Egr* 相同遺伝子が網膜形成に働くことが知られており、視覚系の発生への寄与に関して進化的保存性が示唆された。

キーワード: *Egr*、初期応答遺伝子、ミツバチ、視覚系形成

緒言

細胞が刺激を受けた際、一部の遺伝子が新規のタンパク質合成を伴わずに急速な発現上昇を示すことが知られている。「初期応答遺伝子 (Immediate early gene: IEG)」と総称されるこれらの遺伝子 (Bahrami and Drabløs 2016) は、特に成体の脳においては、神経細胞の活動に伴って発現し、記憶・学習の成立に重要な役割を果たすと考えられている (Loebrich and Nedivi 2009)。しかし、こうした指摘のほぼ全てが脊椎動物を対象とした研究に依っており、昆虫の IEG に関する研究例は近年までほとんど存在しなかった。我々は2013年に、脊椎動物で研究が進んでいる IEG の一つである *Egr-1* (Knapska and Kaczmarek 2004) に着目し、その相同遺伝子 *Egr* がミツバチ成虫で神経活動依存の発現上昇を示すことを明らかにしている (Ugajin et al. 2013)。これは、脊椎動物と昆虫に共通した IEG に関する世界に先駆けた報告となった。

脊椎動物において IEG の多くは、上述のような完成された神経系の修飾のみならず、神経発生の過程においても様々な役割を果たすことが知られている (West and Greenberg 2011)。*Egr-1* の場合は、大脳皮質の中間層やサブプレート層での発現 (Wells et al. 2011)、および視覚系の発生・発達への寄与が知られている (Fischer et al. 1999; Zhang et al. 2013)。一方、昆虫において神経発

生過程での *Egr* の役割はもちろん発現パターンについても全く不明であった。本稿では、2016年8月に米国科学誌に掲載された、ミツバチの発生期の脳における *Egr* の発現解析 (Ugajin et al. 2016) について概説する。

論文概説

1. 発生期の発現変動

RACE法による全長cDNA配列解析から、3タイプのスプライスバリエーションの存在が明らかになった (図1)。

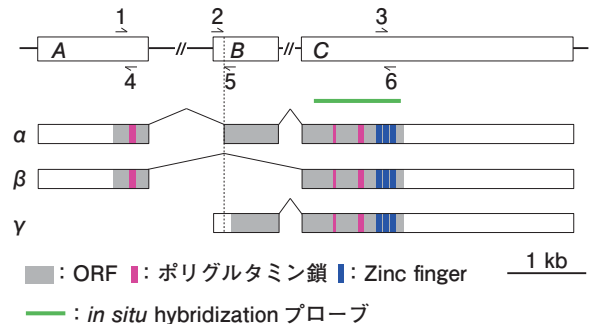


図1 各バリエーションの構造

エキソン上下の数字と矢印はプライマーの番号と向きをそれぞれ示す。

複数の領域に設計したプライマーを用い、発生期 (終齢幼虫・前蛹・蛹1日齢・蛹4日齢・蛹7日齢)、および

¹ JT生命誌研究館 大阪府高槻市紫町1-1

² 玉川大学ミツバチ科学研究センター 東京都町田市玉川学園6-1-1

³ 玉川大学大学院農学研究科 東京都町田市玉川学園6-1-1

責任著者: 宇賀神篤 atsushi.ugajin@brh.co.jp

成虫の脳を対象に、定量的RT-PCRを実施した。発生期にはエクソンA+B+C, A+Cという構造を持つバリエーション α , β が、成虫での神経活動の際にはB+Cからなるバリエーション γ がそれぞれ発現上昇することが明らかとなった (図2)。エクソンA-B間が約20 kbp離れていることから、発生期に発現するバリエーションと成虫の神経活動時に発現するバリエーションは異なるプロモーターやcisエレメントの制御下にあると考えられる。また、発生期バリエーションはタンパク質間相互作用や転写活性化能の強化に寄与するポリグルタミン鎖コード領域を多く有する。発生期と成虫とでは、EGRタンパク質の共役因子や発現調節対象遺伝子にも差異が存在する可能性が考えられる。

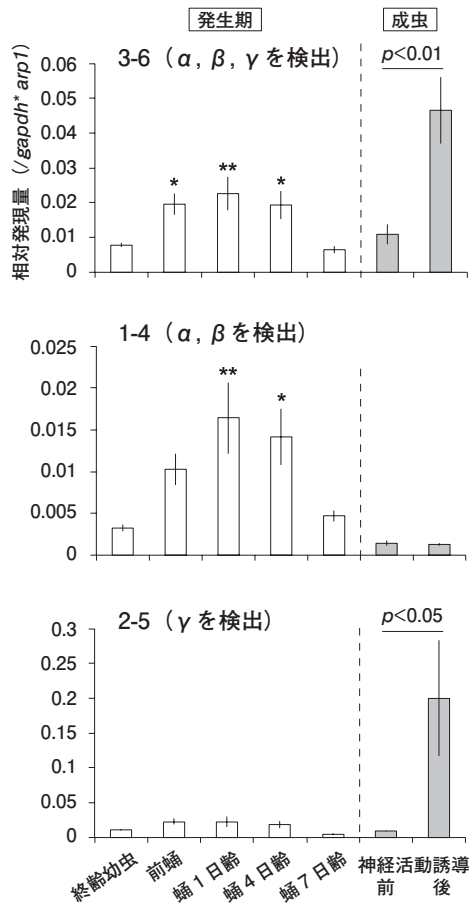


図2 定量的RT-PCRによる脳内Egr発現変動解析

相対発現量は *gapdh* と *arp1* の相乗平均に対して算出。グラフ内の数字の組み合わせは使用したプライマーを表す (図1参照)。各 $n = 6$ 。エラーバーは標準誤差を表す。発生期は終齢幼虫との比較 (Dunnett 検定; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)、成虫は痙攣処理による神経活動誘導前後で比較 (t 検定)。

2. 発現領域の特定

蛹1日齢個体を対象に、エクソンCに設計したプローブによる *in situ* hybridization を実施した結果、視覚情報処理を担う視葉の細胞において明瞭なシグナルが観察された (図3a, b)。

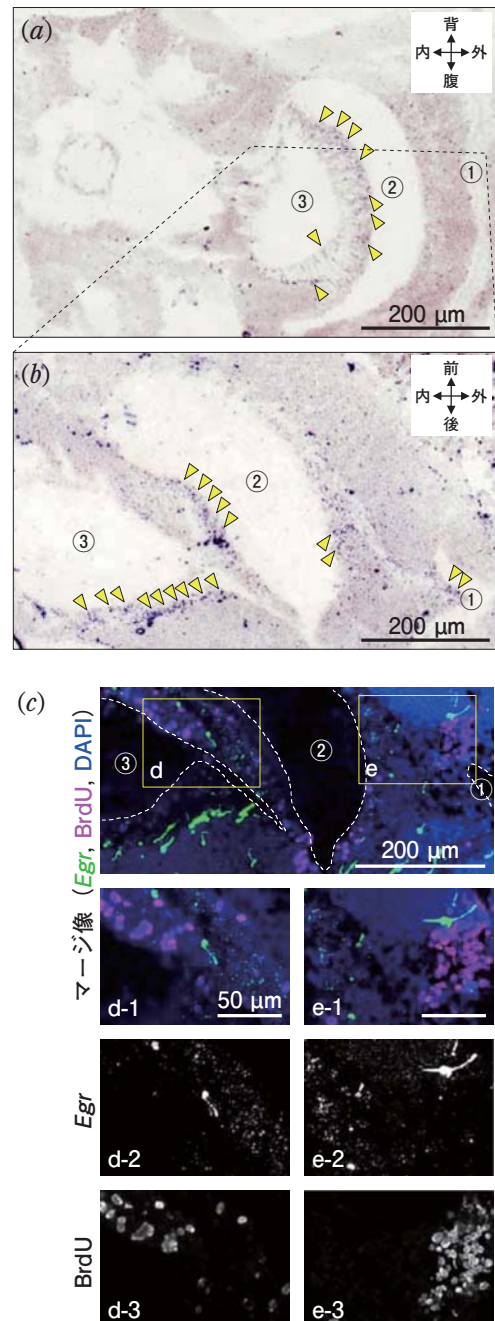


図3 蛹1日齢個体におけるEgr発現細胞の分布

(a) 冠状断面。三層からなる視葉の第二層と第三層の周辺にEgrのシグナルが多数検出される。
 (b) (a)内の点線相当箇所の水平断面。
 (c) EgrとBrdUの蛍光二重染色像。

昆虫の視葉の細胞は、幼虫期から蛹の初期に時系列的に増殖サイクルを離脱して分化を開始し、蛹期を通して投射パターンを構築する (Néric and Desplan 2016)。BrdU投与により増殖細胞を標識した蛹1日齢個体の脳に対し、*Egr*の*in situ* hybridizationとBrdUの免疫組織化学による蛍光二重染色を実施した。*Egr*とBrdUのシグナルが重なることはほとんどなく (図3c)、*Egr*は主に増殖サイクルから離脱・分化した細胞で発現していることが示された。

脊椎動物では、*Egr-1*の神経系における働きとして、初期応答遺伝子としての役割に加え、発生期の網膜形成への寄与が知られている (Zhang et al. 2013)。昆虫の視葉と脊椎動物の網膜は進化的起源を同一にすると考えられており (Sanes and Zipursky 2010)、我々の解析結果は、*Egr*の役割の進化的保存性を強く支持するものである。一方で、成体と発生期でのバリエーションの使い分けは脊椎動物では報告されておらず、昆虫特有の制御機構の存在も示唆される。

おわりに

最近、米国のグループと我々のグループは、それぞれショウジョウバエとミツバチを用いた研究から、脊椎動物と昆虫ではIEGのプロファイルが大きく異なることを見出すとともに、*Egr*が数少ない進化的に保存されたIEGであることを指摘した (Chen et al. 2016; Ugajin et al. 2018)。その詳細な機能や発現制御機構の解明は、神経科学分野のみならず進化生物学的にも意義のある研究課題として今後の展開が期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、北海道大学電子科学研究所の渡邊崇之博士、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの内山博允博士、矢嶋俊介教授と共同で実施したものである。また、日本学術振興会科学研究費補助金の支援を受けた。ここに深く感謝の意を表す。

引用文献

Bahrami, S., Drabløs, F. (2016) Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological*

- Regulation, 62: 37-49.
- Chen, X., Rahman, R., Guo, F., Rosbash, M. (2016) Genome-wide identification of neuronal activity-regulated genes in *Drosophila*. *eLife* 5: e19942.
- Fischer, A. J., McGuire J. J., Schaeffel, F., Stell, W. K. (1999) Light- and focus-dependent expression of the transcription factor ZENK in the chick retina. *Nature Neuroscience*, 2: 706-712.
- Knapska, E., Kaczmarek, L. (2004) A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: *Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?* *Progress in Neurobiology*, 74: 183-211.
- Loeblich, S., Nedivi, E. (2009) The function of activity-regulated genes in the nervous system. *Physiological Reviews*, 89: 1079-1103.
- Néric, N., Desplan, C. (2016) From the eye to the brain: Development of the *Drosophila* visual system. *Current Topics in Developmental Biology*, 116: 247-271.
- Sanes, J. R., Zipursky, S. L. (2010) Design principles of insect and vertebrate visual systems. *Neuron*, 66: 15-36.
- Ugajin, A., Kunieda, T., Kubo, T. (2013) Identification and characterization of an *Egr* ortholog as a neural immediate early gene in the European honeybee (*Apis mellifera* L.). *FEBS Letters*, 587: 3224-3230.
- Ugajin, A., Watanabe, T., Uchiyama, H., Sasaki, T., Yajima, S., Ono, M. (2016) Expression analysis of *Egr-1* ortholog in metamorphic brain of honeybee (*Apis mellifera* L.): Possible evolutionary conservation of roles of *Egr* in eye development in vertebrates and insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478: 1014-1019.
- Ugajin, A., Uchiyama, H., Miyata, T., Sasaki, T., Yajima, S., Ono, M. (2018) Identification and initial characterization of novel neural immediate early genes possibly differentially contributing to foraging-related learning and memory processes in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 27: 154-165.
- Wells, T., Rough, K., Carter, D. A. (2011) Transcription mapping of embryonic rat brain reveals EGR-1 induction in SOX2 + neural progenitor cells. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4: 6.
- West, A. E., Greenberg, M. E. (2011) Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: a005744.
- Zhang, L., Cho, J., Ptak, D., Leung, Y. F. (2013) The role of *egr1* in early zebrafish retinogenesis. *PLoS ONE*, 8: e56108.

Expression Analysis of a Conserved Immediate Early Gene *Egr* in Metamorphic Brain of Honeybee

Atsushi Ugajin¹, Tetsuhiko Sasaki², Masato Ono³

Abstract

Unique genes that are quickly transcribed in response to extracellular stimuli without *de novo* protein synthesis are known as immediate early genes (IEGs). In mature nervous systems of vertebrates, the expression of IEGs is closely associated with neural activity, and over the past three decades, this has been reported to play an essential role in synaptic plasticity, which is thought to be the neural basis of memory and learning. On the other hand, there have been few reports of IEGs in insect species. In 2013, we first identified *AmEgr*, a honeybee homolog of *Egr-1* (also known as *zif268* and *ZENK*), which is one of the best characterized IEGs in vertebrates, and revealed transient and prominent increases in expression after neural activation, suggesting the conserved role of *Egr* homologs in the mature nervous system in both vertebrates and insects (Ugajin et al. 2013). Besides modifying the mature nervous system, various vertebrate IEGs play an important role in neural development. Vertebrates *Egr-1* is known to contribute to the development and growth of the visual system. However, in insects, the expression dynamics of the *Egr-1* homologous gene during neural development remains poorly understood. In the present study, using metamorphic honeybee brains, we performed expression analysis and demonstrated that *AmEgr* was transiently upregulated in the developing brain during early to mid pupal stages. *In situ* hybridization and BrdU immunohistochemistry revealed that *AmEgr* was mainly expressed in post-mitotic cells located at the inner zone of optic lobes. The optic lobe is the primary visual center of insect brain. These findings suggest evolutionarily conserved roles of *Egr* homologs in the development of visual systems in vertebrates and insects.

Keywords: *Egr*, immediate early gene, honeybee, oculanogenesis

¹ JT Biohistory Research Hall, 1-1, Murasaki-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569-1125, Japan

² Honeybee Science Research Center, Tamagawa University, 6-1-1, Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

³ Graduate School of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1, Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan