

## ミツバチの高次行動を支える脳の分子機構の解析

竹内 秀明・上川内 あづさ・  
鹿毛 枝里子・久保 健雄

ミツバチは社会性昆虫であり、個体間分業や個体間コミュニケーションなどの精緻で多彩な本能行動を行う。例えば、花の蜜を見つけて巣に戻った働き蜂は記憶した花の位置をダンス言語を用いて仲間に伝える。このような象徴的言語を用いて、個体間コミュニケーションを行う動物は、ヒトを含む高等霊長類、クジラとイルカの他はほとんど知られていない。しかしながらミツバチの高次行動に関わる脳の分子機構は全く不明であった。さて、キノコ体は昆虫の脳の高次中枢であり、感覚情報を処理・統合し、学習・記憶の中枢として機能すると考えられている。ミツバチのキノコ体は他の昆虫と比較して格段に発達しており、キノコ体の神経回路の複雑化・高度化がミツバチの高度な社会性行動を可能にしたと考えられる。私たちはキノコ体の機能に関わる遺伝子群がミツバチの高次行動を支える脳機能に関わる遺伝子の候補になるのではないかと考え、Differential display法により脳内でキノコ体に選択的に発現する遺伝子を検索した。今回はこれらの遺伝子クローニングの結果について最新の知見を紹介する。

### ミツバチの行動と脳の特徴

ミツバチの行動で特に面白いのは、フリッシュの研究でよく知られている「ダンス言語」である (von Frisch, 1967)。花の蜜を採集して巣に戻った採餌蜂は、記憶した花の位置をダンス言語を用いて仲間に伝える。ダンス言語には餌場までの距離と方向の情報が含まれる。方向を伝えるには太陽の位置を利用し、自分の体内時計と連動させて太陽の運行の分だけ補正してダンスを行う (Winston, 1987)。

しかしながらミツバチのようにコンパクトで単純な脳を持つ昆虫が、どうしてこのような高次行動を行うことができるのか不明である。ちなみにヒトの大脳皮質の神経細胞は約140億個であるが、ミツバチの脳の神経細胞の数は約100万個と桁違いに少ない (Mobbs, 1982)。また、社会性昆虫の中でも、ダンス言語を用いるのはミツバチだけである。例えばマルハナバチは餌場の記憶はできても、仲間にその位置を伝えることはしない (松浦, 1988; Heinrich, 1978)。一方、ショウジョウバエなどの単独性の昆虫では摂食や配偶行動などの単純な本能行動しか観察されない。したがって、ミツバチにおける脳機能と行動の進化は、比較生物学的な観点からも興味深い課題である。

そこで、私たちはミツバチの多彩な高次行動を支える脳機能を分子レベルで解析をしよう

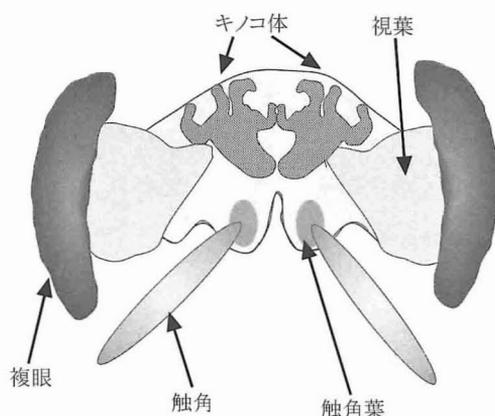


図1 ミツバチの頭部と脳の模式図

キノコ体は左右一対の構造体であり、視覚情報、嗅覚情報などの感覚情報を統合・処理する高次中枢であると考えられている。視葉は複眼からの視覚情報を処理し、触角葉は触角からの嗅覚情報を処理する感覚中枢である。

考え、脳の中でキノコ体と呼ばれる構造体に着目した(図1)。ミツバチの脳では、他の昆虫と比較してキノコ体が容積的にも構造的にも、特徴的に発達している。ミツバチではキノコ体の体積は脳全体の体積は約12%も占めるのに対し、イエバエやバッタではほんの数%にすぎない(Mobbs, 1982)。

様々な昆虫を用いた実験から、キノコ体は感覚情報を処理・統合する中枢であり、学習、記憶の成立に必要な領域であると考えられている。例えば、ショウジョウバエでは、キノコ体を欠損した変異体(*mushroom bodies deranged*, *mushroom bodies miniature*)は匂いと電気ショックを連合させる回避学習が成立しなくなる(Heisenberg et al., 1985)。この回避学習に必要な遺伝子として、*dunce* (cAMP ホスホジエステラーゼ遺伝子)、*rutabaga* ( $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性アデニル酸シクラーゼ遺伝子)、*DCO* (cAMP 依存性プロテインキナーゼ遺伝子 PKA 遺伝子) が同定されているが、これらの遺伝子はキノコ体の神経回路に強く発現している(Davis, 1993)。またミツバチにおいては冷却した細い金属針でキノコ体の電気的活動を抑制すると、匂いと砂糖水とを連合する条件反射が成立しなくなる(Eber, 1980)。

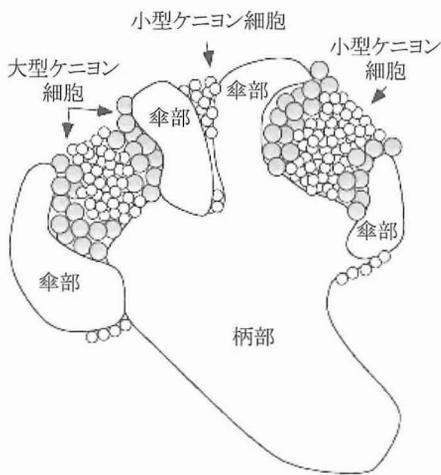


図2 キノコ体の模式図

傘部(ケニオン細胞の樹状突起が集合); 柄部(ケニオン細胞の軸索が集合); ○はケニオン神経の細胞体を示す。

一方でミツバチでは、キノコ体の構造がミツバチの行動に従って変化することも報告されている。例えば、働き蜂では、加齢に従い育児蜂から採餌蜂へ役割が変化するとき、神経細胞体が集合しているキノコ体の皮層の容積が30%も減少し、シナプスが集合しているニューロパイルの容積が15%増大する(Wither, 1993)。さらに働き蜂のキノコ体の容積は女王蜂や雄蜂と比較して大きい(Mobbs, 1982; 佐々木, 1993)。このことから、ミツバチのキノコ体の神経回路は性差、カーストおよび働き蜂の分業によって異なっており、ミツバチの本能行動に関連する可能性が考えられる。

そこで、私たちはミツバチの脳でキノコ体選択的に発現する遺伝子群を単離することにより、ミツバチの社会性行動を制御する遺伝子の候補を同定することを試みた。

### キノコ体は2種類のケニオン細胞(介在神経)から構成される

まず、ミツバチのキノコ体の構造と神経回路について述べてみたい。図2にはミツバチの左側のキノコ体の拡大図を示しているが、一つのキノコ体は2つのカップ型の構造(傘部)を含み、ケニオン細胞の細胞体は傘部の内側とその表層部に集合している。ケニオン細胞は傘部で感覚中枢からの出力神経とシナプスを形成し、柄部に集合している軸索を經由して情報を出力する。また傘部は上部から順に唇部(lip)、襟部(collar)、基底環(basal ring)の3つに領域分けされている(図3)。唇部には触角葉からの出力神経が投射されており、嗅覚情報がこの領域へ入力される。また襟部では視葉からの情報が

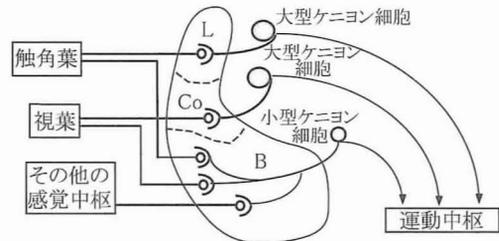


図3 キノコ体の傘部における神経接続の模式図

L, 唇部(lip); Co, 襟部(collar); B, 基底環(basal ring)。

入力される。基底環は様々な感覚情報が入力されるが、その経路については詳しく分かっていない。またミツバチのケニオン細胞は神経細胞体の大きさによって、大型と小型の2種類に分類される。大型ケニオン細胞はカップの唇部で嗅覚情報を受け取るタイプと、襟部で視覚情報を受け取るタイプの二つに分けられる。小型のケニオン細胞はカップの基底環でシナプスを形成するため (Mobbs, 1982), 様々な感覚情報を受け取り、これらの連絡, 統合をしていると予想される。

### Differential display (DD) 法による キノコ体に選択的に発現する遺伝子の検索

私たちは DD 法を用いて、キノコ体と視葉の遺伝子発現パターンを比較することによりキノコ体に選択的に発現する遺伝子の候補を検索することにした。ここで視葉は一般的な神経組織としての対照として用いた。DD 法はいくつかの異なる組織やステージの間で発現量の異なる遺伝子を検索する方法であり、polymerase chain reaction (PCR) を用いるためわずかな組織を材料として実験をスタートできるという利点がある (Liang and Pardee, 1992)。ミツ

バチはキノコ体が大きいため、顕微鏡下で解剖によりキノコ体と視葉を摘出することが可能である。まず約 1000 匹分の働き蜂のキノコ体と視葉から RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。次にこの cDNA を鋳型とし、放射標識したヌクレオチド存在下で PCR 反応を行い、その産物をシークエンスゲルで電気泳動する。この結果、視葉と比較してキノコ体に強く発現する mRNA 由来に増幅された PCR 産物をオートラジオグラム上でバンドとして検出することができる。同定したバンドに含まれる PCR 産物をサブクローニングし、塩基配列を決定することにより、当該の cDNA 断片の塩基配列を知ることができる。

### ミツバチではカルシウムシグナル伝達系に 関わる遺伝子群はキノコ体に強く発現する

DD 法を行った結果、カルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子のひとつであるイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) 受容体遺伝子がキノコ体に強く発現することが明らかになった (図 4A; Kamikouchi et al., 1998)。in situ hybridization により解析した結果を図 4 に示すが、ミツバチの  $IP_3$  受容体遺伝子の mRNA は視葉

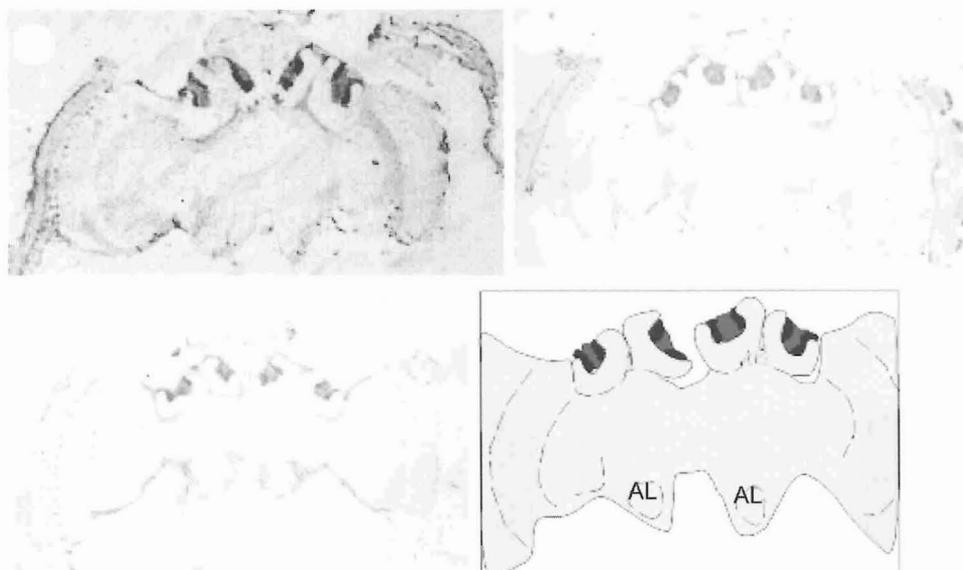


図 4 ミツバチ脳におけるカルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子群の発現パターン  
脳全体の切片を用いて *in situ* hybridization を行った。ジゴキシゲニン標識した RNA プローブをアルカリフォスファターゼの発色反応により検出した。(A)  $IP_3$  受容体遺伝子, (B) CaMKII 遺伝子, (C) PKC 遺伝子, (D) 脳切片の模式図 MB, キノコ体; AL, 触角葉; OL, 視葉 MB, キノコ体; AL, 触角葉; OL, 視葉

や触角葉と比較してキノコ体で強く検出されている。IP<sub>3</sub>受容体は細胞内カルシウムシグナル伝達系に機能する、小胞体の膜タンパク質である。細胞外からのシグナルを受けて放出されたIP<sub>3</sub>に反応して、小胞体内に蓄積されていたカルシウムイオンを細胞内に遊離させることにより、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる働きを持つ (Furuichi et al., 1995)。マウスではIP<sub>3</sub>受容体の1つのサブタイプは小脳のプルキンエ細胞に強く発現しており、IP<sub>3</sub>はLTD (long-term depression) の成立に関係があることから、神経の可塑性に関わることが示唆されている (Finch and Augustine, 1998)。またマウスやショウジョウバエの神経系では細胞内カルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子群は、記憶の成立やシナプスの可塑性に関わることが示されている (Griffith et al., 1993; Silva et al., 1992)。このことから、私たちはミツバチのキノコ体では他の神経組織と比較してカルシウムシグナル伝達系の機能が亢進している可能性を考えた。そこで、カルシウムシグナル伝達系に関わる他の因子としてプロテインキナーゼC (PKC) とCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMKII) 遺伝子に着目し、これらの遺伝子がキノコ体に強く発現するかどうか解析することにした。マウスにおいてはPKCとCaMKIIは海馬で強く発現し、LTP (long-term potentiation) の成立に機能することが示されている (Abeliovich et al., 1993; Silva et al., 1992)。

PKCとCaMKII cDNAはミツバチでは同定

されていなかったため、ショウジョウバエと哺乳類の間で保存されたアミノ酸配列を元にPCRプライマーを設計し、RT-PCRを行うことにより、それぞれのミツバチホモログのcDNA断片を得た。その後、そのcDNA断片をプローブとして*in situ* hybridizationを行い、これらの遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、PKCやCaMKIIの遺伝子もIP<sub>3</sub>受容体遺伝子同様にキノコ体に強く発現することが明らかになった (図4B,C; Kamikouchi et al., 2000)。しかしながらミツバチにおいてPKCとCaMKIIには複数のサブタイプが存在し、各々が領野特異的に発現している可能性がある。よってキノコ体でカルシウムシグナル伝達系の機能が亢進していることを示すためには、PKCやCaMKIIの酵素の比活性がキノコ体では他の領域と比較して高いことを確認する必要がある。そこで、働き蜂から、キノコ体を含む脳上部、視葉、および触角葉を含む脳下部を摘出して粗抽出液を調製し、これらの酵素の比活性を測定した。その結果、キノコ体の粗抽出液のCaMKIIの比活性は視葉、触角葉と比較して1.5倍、2倍であった。一方、キノコ体におけるPKCの比活性は視葉、触角葉のそれぞれ6倍、2.5倍であることが分かった (図5; Kamikouchi et al., 2000)。このように、キノコ体を含む脳領野におけるCaMKIIとPKCは酵素の比活性としても他の領野と比較して高いことが分かった。よってミツバチのキノコ体では、カルシウムシグナル伝達系の機能が亢進しており、神経回路の可塑性が向上している可能

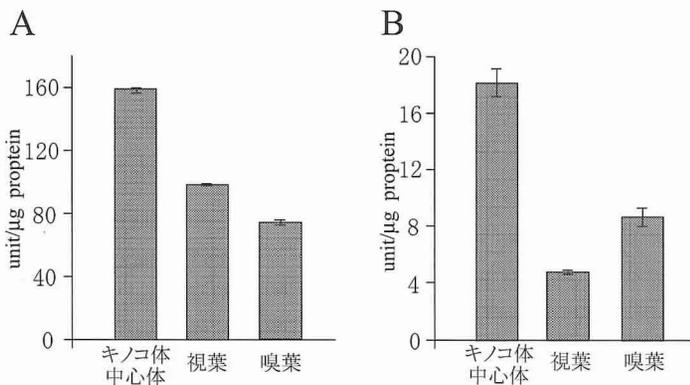


図5 働き蜂の各脳領野におけるCaMKII (A)、PKC (B)の比活性の測定。各々の脳領野を摘出して粗抽出液を調製し、それぞれの酵素に特異的な合成基質を用いて活性を測定した。

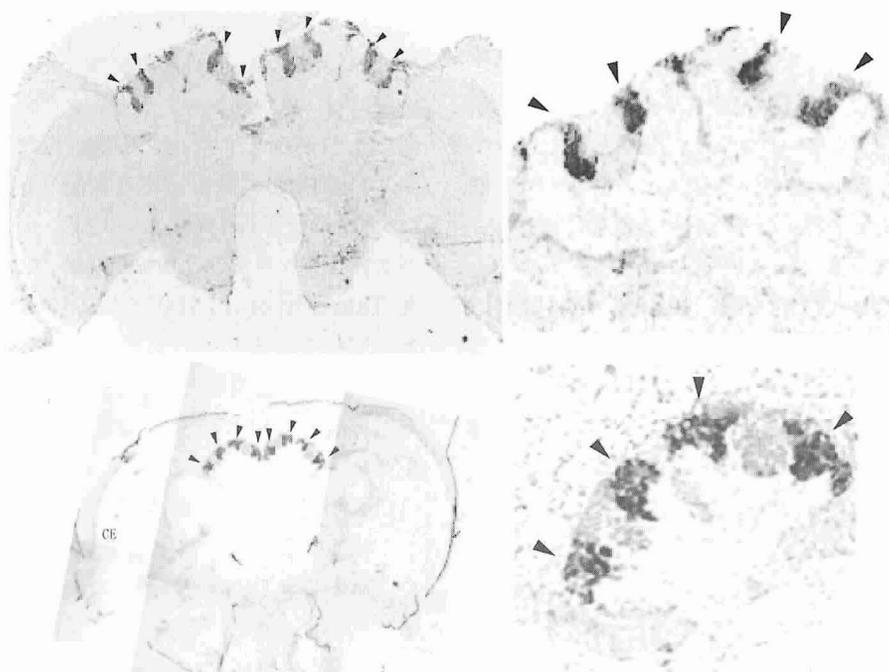


図6 Mblk-1 遺伝子の発現パターン

矢印で発現領域を示す (A) 成虫脳全体の切片を用いた *in situ* hybridization の結果. (B) A のキノコ体の拡大図. (C) 蛹脳全体の切片を用いた *in situ* hybridization の結果. (D) C のキノコ体の拡大図. MB, キノコ体; AL, 触角葉; OL, 視葉; C, キノコ体の傘部; P, キノコ体の柄部; N, 将来ケニオン細胞に分化する神経芽細胞群

性がある. このことから, キノコ体の神経回路は他の神経回路と比較してシナプスの接続強度の変化や再構築が起りやすい可能性が考えられる.

興味深いことにショウジョウバエでは CaMKII 遺伝子はショウジョウバエでは脳の皮質全体にわたって発現する (上川内, 未発表). このことは, カルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子群のキノコ体における発現増強が, ミツバチに固有な現象であることを示唆している. ミツバチの脳進化の過程において, キノコ体の機能が発達するためには, 神経細胞の数の増大という量的な変化だけでなく, 単一の神経細胞においてカルシウムシグナル伝達系の機能が亢進するという質的な変化が必要であった可能性が考えられる.

### 大型ケニオン細胞特異的に発現する Mblk-1 遺伝子は転写因子をコードする

さらに私たちはキノコ体に特異的に発現する新規な遺伝子として Mblk-1 遺伝子 (*Mushroo-*

*m body large-type Kenyon cell-specific protein-1*) を同定し, この遺伝子がキノコ体の中でも大型ケニオン細胞特異的に発現することを明らかにした (図6 A, B; Takeuchi et al., 2001). Mblk-1 転写産物は大型ケニオン細胞の神経細胞体が集中するカップの内側に密着した領域に局限して検出された. また, 働き蜂の身体全体を用いて *in situ* hybridization を行ったが, 胸部や腹部には有意な発現は検出されなかった. これらの結果から, Mblk-1 遺伝子が働き蜂の脳で大型ケニオン細胞に局限して発現することが明らかになった.

女王蜂と雄蜂の脳でも同様に, Mblk-1 遺伝子の発現を解析したが, カーストおよび性差に伴う発現パターンに変化は見られなかった. さらに, Mblk-1 遺伝子の変態期での発現を解析する目的で, 蛹初期の脳の切片を用いて *in situ* hybridization 法を行った. 蛹期には, 将来, 大型ケニオン細胞になる細胞群が, カップ型構造の中央部に位置する神経芽細胞群から発生し, キノコ体の柄の部分の先端に移動し, 集

合して存在する。その結果、Mblk-1 転写産物は、将来大型ケニオンに分化する細胞群に局限して発現し、神経芽細胞群を含めた脳の他の領域では発現していなかった (図 6C, D)。以上の結果は、Mblk-1 遺伝子産物は大型ケニオン細胞の分化およびその細胞機能の維持に関わることを示唆している。

DD 法では目的の遺伝子の数百 bp 程度の cDNA 断片しか得られない。よって Mblk-1 遺伝子がコードするタンパク質の構造を明らかにするためには cDNA クローニングを行って全長 cDNA の配列を決定する必要がある。そこでキノコ体の mRNA を鋳型にしてランダムプライマーを用いて逆転写して cDNA library を作成した。次に DD 法で単離した PCR 断片をプローブとして cDNA クローニングを行った。cDNA の平均サイズは数 kbp であるので、これ以上長い転写産物の全長の cDNA 塩基配列を決定するためには、一回のクローニングで

は終わらない。そこでクローニングにより得られた cDNA の 5' 末端部の配列を元にプローブを作成し、繰り返しスクリーニングを行い、50 個以上の cDNA クローンを単離した。その結果、14400bp に及ぶ cDNA の配列を決定し、Mblk-1 遺伝子は 1598 アミノ酸からなるタンパク質をコードすることを明らかにした (図 6A; Takeuchi et al., 2001)。このアミノ酸配列と相同性のあるタンパク質をデータベース (FASTA) で検索した結果、ショウジョウバエの転写因子 E93 のアミノ酸配列と最も高い相同性を示した (図 6B)。このことから、Mblk-1 は E93 のミツバチホモログであり転写因子として機能すると考えられた。E93 はショウジョウバエの変態期の唾液腺のアポトーシスに関わることが示されているが、神経系における役割は全く分かっていない (Lee et al., 2000)。ミツバチの成虫の脳ではアポトーシスは起きていないことから、Mblk-1 および E93 は多機能性

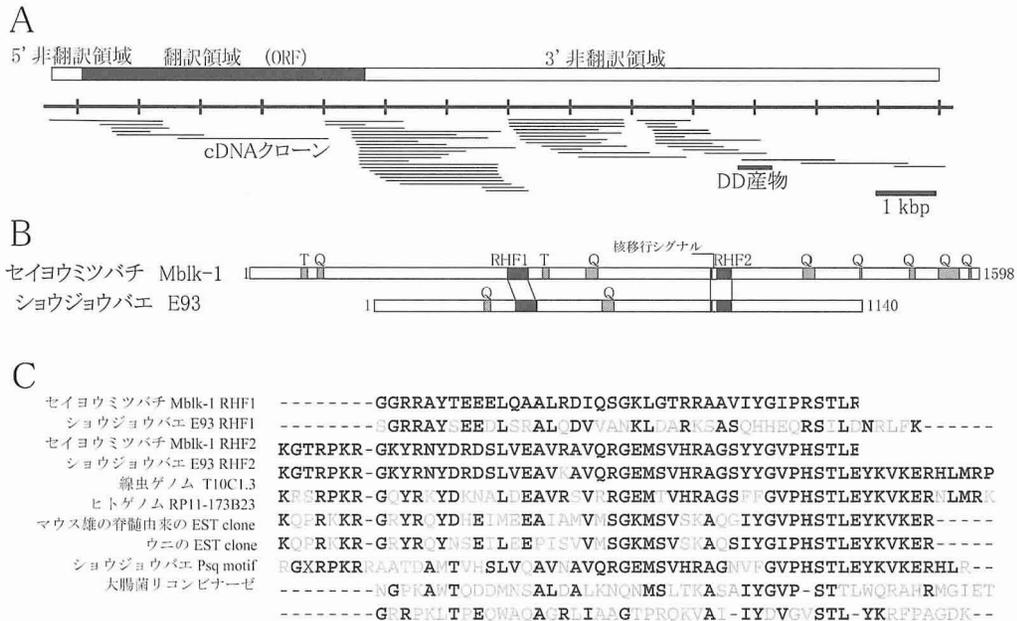


図 7 Mblk-1 遺伝子の cDNA クローニング

(A) 単離した cDNA クローンの位置関係 DD 法で単離した PCR 断片 (DD product) からスタートして cDNA ウォーキングを行い、合計 54 個の cDNA クローンを単離した結果、14kbp におよぶ Mblk-1 cDNA の塩基配列を決定した。上のバーが Mblk-1 のコンセンサス cDNA を示し、下の細い横線は各 cDNA クローンを示す。  
(B) セイヨウミツバチの Mblk-1 とショウジョウバエの E93 の構造の比較。T, スレオニンに富む領域; Q, グルタミン酸に富む領域; RHF, ミツバチとショウジョウバエで特に相同性の高い領域 (C) 様々な種から見つかった RHF ドメインと既知の DNA 結合ドメインの比較。太字はセイヨウミツバチの RHF1 または RHF2 と一致したアミノ酸を示す。

タンパク質であり、神経系では別の生体機能を持つことが予想される。

さらに、Mblk-1 と E93 は RHF1 (region conserved between honeybee and fruit fly) 1-2 と命名した領域では、特に高い相同性を示すことが分かった (図 6C)。61 アミノ酸からなる RHF2 の領域では相同性は 98% に達した。次に RHF1,2 の領域の機能を推定する目的で、この領域と相同性を示す機能ドメインの検索を行った。その結果、RHF1 と 2 はともに、ショウジョウバエの *pipsqueak* タンパク質の Psq motif と有意な相同性を示した。Pipsqueak は、GAGAG consensus motif を認識して結合する DNA 結合蛋白で、転写因子としてショウジョウバエの卵形成や複眼形成などの局面で機能する (Weber et al., 1995; Horowitz et al., 1996)。Psq motif は DNA 結合ドメインであり、原核生物の recombinase の DNA 結合モチーフに相同性を持つ (Lehmann et al., 1998)。従って、Mblk-1 と E93 の RHF1 と 2 はともに DNA 結合 motif と考えられる。さらに、RHF2 と相同性を示すアミノ酸配列は、線虫、ウニ、マウス、ヒトのゲノムデータベース中でも見つかった。マウスの脊髄の EST (Expression sequence tag) のデータベースにも登録されていることから、哺乳類でも中枢神経系に発現すると考えられる。よって、Mblk-1 の構造と神経系における機能は動物一般に広く保存されている可能性がある。Mblk-1 の生体内機能としては、その他の大型ケニオン細胞に強く発現する遺伝子群と関わって機能すると予想される。私たちは IP<sub>3</sub> 受容体と CaMKII はキノコ体の中でも大型ケニオン細胞により強く発現することを見出している (図 4A, B; Kamikouchi et al., 2000)。さらにミツバチでは cAMP 依存性プロテインキナーゼ遺伝子 (PKA 遺伝子) は大型ケニオン細胞に強く発現し、嗅覚連合記憶学習に関わることが示されている (Miller, 2000; Eisenhardt 2001)。以上のように大型ケニオン細胞では、神経系の可塑性に関わる因子群が協調的に発現増強している傾向がある。私たち

は、Mblk-1 が転写因子としてこれらの遺伝子群の発現を亢進しており、キノコ体に脳の高次中枢としての地位を賦与する中心的な役割を果たしているのではないかと予想している。

### ミツバチの脳研究の意義と今後の展望

ここで、ミツバチの脳研究の意義と今後の研究の展望について考察してみたい。私たちはカルシウムシグナル伝達系に関わる遺伝子群および転写因子である Mblk-1 がキノコ体選択的に発現することを示した。今後、これらの遺伝子群とミツバチの行動との関わりを明らかにすることが重要である。昨年、ミツバチにおいて遺伝子導入法が確立し、外来の遺伝子を発現させることが可能になった (Robinson et al., 2000)。私たちは CaMKII や PKC の活性を阻害するペプチドを脳で強制発現することによって、キノコ体の神経回路においてカルシウムシグナル伝達系の機能の阻害できると考えている。これにより、キノコ体での神経回路の可塑性が低下するのか？その時にミツバチの社会性行動にどのような影響が出るのか？といった問いに答えることが可能になる。また、Mblk-1 を強制発現することによって、Mblk-1 が本当に神経系の可塑性に関わる因子群の転写を亢進するのか否かが明らかになると考えられる。また Mblk-1 は線虫からヒトに至るまで広く保存されており、脳機能に関わる新規な遺伝子である可能性がある。私たちはミツバチだけでなく、Mblk-1 の相同遺伝子の機能解析をマウスおよび線虫を用いて行うことにより、Mblk-1 の動物間で保存された機能の解明も目指している。

ミツバチのキノコ体からは脳機能に関与する多くの新規の遺伝子が見つかる可能性があり、私たちは Differential display 法および DNA マイクロアレイ法を用いてミツバチのキノコ体に選択的に発現する遺伝子やこの小文では触れなかったが、ミツバチの行動特異的に発現する遺伝子の網羅的な検索を進めている。何年後には、ミツバチ脳の詳細な分子解剖図が完成し、同定した遺伝子群とミツバチの高次な社会

性行動との関わりが明らかになることと期待している。

(〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1  
 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

#### 謝辞

本研究は一部、生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)の事業として行っている。

#### 引用文献

- Abeliovich, A. et al. 1993. *Cell* 75:1253-1262.  
 Davis, R. L. 1993. *Neuron* 11: 1-14.  
 Eisenhardt, D. 2001. *Insect. Mol. Biol.* 10:173-181.  
 Erber, J. et al. 1980. *Physiol. Entomol.* 5: 343-358.  
 Finch, E. A. and G. J. Augustine. 1998. *Nature* 396:753-756.  
 Frisch, K. von. 1967. *Science* 158:1072-1076.  
 Furuichi, T. and K. Mikoshiba. 1995. *J. Neurochem.* 64:953-960.  
 Griffith, L. C. et al. 1993. *Neuron* 10:501-509.  
 Heisenberg, M. et al. 1985. *J. Neurogenet.* 2:1-30.  
 Horowitz, H. and C. A. 1996. *Development* 122:1859-1871.  
 Lee, C. Y. et al. 2000. *Mol. Cell.* 6:433-443.  
 Lehmann, M. et al. 1998. *J. Biol. Chem.* 273:28504-28508.  
 Kamikouchi, A. et al. 1998. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242:181-186.  
 Kamikouchi, A. et al. 2000. *J. Comp. Neurol.* 417:501-510.  
 Liang, P. and A. B. Pardee. 1992. *Science* 257:967-971.  
 松浦誠. 1998. ミツバチの不思議な社会. pp.153-154.  
 Mobbs, P.G. 1982. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 298:309-354.  
 Mller, U. 1997. *J. Neurobiol.* 33:33-44.  
 Mller, U. 2000. *Neuron* 33:159-168.  
 Robinson, K. O. et al. 2000. *Insect. Mol. Biol.* 9:625-634.  
 佐々木正己. 1993. 社会性昆虫の進化生態学. pp.206-240.  
 Silva, A. J. et al. 1992. *Science* 257:206-211  
 Takeuchi, H. et al. 2001. *Insect. Mol. Biol.* in press.  
 Weber, U. et al. 1995. *EMBO J* 14:6247-6257.  
 Winston, M. L. 1987. *The biology of the honeybee.* Harvard University Press. 281 pp.  
 Withers, G. S. et al. 1993. *Nature* 364:238-240.

HIDEKI TAKEUCHI, AZUMA KAMIKOUCHI, ERIKO

KAGE and TAKEO KUBO. Molecular mechanisms of the highly advanced behaviors in the honeybee. *Honeybee Science* (2001) 22 (3): 113-120. Laboratory of Physiological Chemistry, Department of Biological Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8654 Japan.

Mushroom bodies (MBs) are involved in higher-order sensory processing and olfactory memory in the insect brain. To identify candidate genes involved in the intrinsic function of the honey bee MBs, we searched for genes preferentially expressed therein, using the differential display method. Here we report the expression of some of the genes for proteins involved in the intracellular  $Ca^{2+}$  signal transduction (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ( $IP_3R$ ),  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and protein kinase C (PKC)) is concentrated in the mushroom bodies of the honeybee brain. The CaMKII and  $IP_3R$  gene were expressed preferentially in the large-type Kenyon cells of the mushroom bodies, whereas that for PKC was expressed in both the large and small types of Kenyon cells. Furthermore, the enzymatic activities of CaMKII and PKC were found to be higher in the mushroom bodies/central bodies than in the optic and antennal lobes of the worker bee brain. These results suggest that the function of the intracellular  $Ca^{2+}$  signal transduction is enhanced in the Kenyon cells in comparison to other neuronal cell types in the honeybee brain.

We also identified a novel gene encoding a putative transcription factor (Mblk-1) expressed preferentially in one of two types of intrinsic MB neurons, the large-type Kenyon cells. A putative DNA binding motif of Mblk-1 had significant sequence homology with those encoded by genes from various animal species, suggesting that the functions of these proteins in neural cells are conserved among the animal kingdom. Our finding suggests that Mblk-1 has a role in the transactivation of genes involved in the intrinsic function of the large-type Kenyon cells of honey bee MBs. It might be possible that Mblk-1 participates in transcriptional activation of some genes involved in synaptic plasticity, such as  $IP_3R$ , CaMKII, and PKA, and thereby responsible for the status of MBs as the main association and memory centers of the honey bee brain.