

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06077

研究課題名(和文)ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic mechanism underlying longevity in honeybee.

研究代表者

鎌倉 昌樹 (Kamakura, Masaki)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：60363876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチのRNA-seq解析、さらにGO解析を実施した結果、働き蜂に比べ女王蜂では、エネルギー代謝関連遺伝子群の発現抑制や酸化関連遺伝子の発現増加が、遺伝子発現変動の主なものであり、免疫関連因子の発現変化などは見られなかった。総合的な評価から、女王蜂は働き蜂に比べ効率よくATP生産を行い、無駄にエネルギーを消費することなく寿命を延長させている可能性が示唆された。さらに、これまでに未同定であった幼若ホルモンの受容体であるMethoprene tolerant (Met)の同定を試み、Metとco-factorであるSteroid receptor co-activatorの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、養蜂における女王蜂管理技術の向上に活用できる。また、ミツバチのMetの同定は今後の新たな農薬開発に応用できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted RNA-seq analysis in Queens and Workers. GO analysis revealed that decrease of gene expression in energy metabolism and increase of gene expression in beta-oxidation induce the extension of longevity in Queens. Furthermore, we identified genes of juvenile hormone receptors, Methoprene tolerant and Steroid receptor co-activator in honeybees.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：ミツバチ 寿命 幼若ホルモン 受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、同じ遺伝子型をもつ雌の幼虫のなかでも働き蜂の分泌するローヤルゼリー (RJ) を摂取した個体のみが女王蜂へと分化する。女王蜂は働き蜂に比べ、体サイズが 1.5 倍、寿命が 20 倍 (女王蜂の寿命が 2~3 年であるのに対して働き蜂の寿命は 1 ヶ月である) であり、1 日に 2000 個の卵を産むという特徴をもっている。しかし、これまでにミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構については明らかになっていない。そこで本研究では、ミツバチが寿命を制御している仕組みを明らかにする研究を実施した。

2. 研究の目的

本申請者はこれまでにミツバチの寿命におけるエピジェネティックな制御機構についての解析を行った。女王蜂と働き蜂との間でクロマチン修飾の違いについて解析した結果、ヒストン H3K4 のトリメチル化の割合が働き蜂に比べ女王蜂で減少し、ヒストン H3K27 のトリメチル化の割合が働き蜂に比べ女王蜂で増加していた。さらに、このヒストン修飾の変化は、H3K4 のメチル化酵素や H3K27 の脱メチル化酵素の遺伝子発現の減少に起因していることも明らかとなった。H3K4 のメチル化の抑制と H3K27 の増加は、染色体のヘテロクロマチン化に参与していることから、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行していることが分かった。ヘテロクロマチン化は、遺伝子の転写抑制に働き、寿命延長に参与することが酵母、線虫などの先行研究から明らかになってきている。この女王蜂におけるヘテロクロマチン化は幼虫期ですで見られ、ミツバチの長寿命化と正の相関があることも系統間の解析により明らかになった。そこで本研究では、女王蜂におけるクロマチン修飾の変化が、遺伝子発現にどのような影響を及ぼしているかについて解析を行った。さらに、これまでの本申請者の解析から女王蜂の寿命制御には、幼若ホルモン (JH) が参与している可能性が分かっている。ミツバチにおいてはこれまでに JH の受容体が明らかになっていないことから、ミツバチの JH 受容体である Methoprene tolerant (Met) の同定も実施した。

3. 研究の方法

女王蜂と働き蜂の遺伝子発現変動の解析

(1) 屋外飼育の女王蜂及び働き蜂において、孵化後6日目の幼虫、羽化直後成虫、羽化後1ヶ月、羽化後6ヶ月の成虫のRNAを抽出した。成虫においては、頭部、胸部、腹部からRNAを抽出した。各RNAサンプルからライブラリーを調製し、RNA-seq解析を実施した。

ミツバチにおける Met 及び Steroid receptor co-activator (SRC) の同定

(1) ミツバチ以外の昆虫においては、Metが転写因子として機能するためには、SRCが必要である。ミツバチゲノム中のMetとSRCを同定するため、ショウジョウバエ、カイコ、コクヌストモドキ由来Met及びカイコ、コクヌストモドキ由来SRCの読み枠 (ORF) の配列を基に、ミツバチのゲノムに対するtBlastx解析を実施した。tBlastx解析により同定したミツバチのMet及びSRCの系統樹解析を行った。

(2) 同定されたミツバチのMet及びSRCのORFをpFN11Aベクターにクローニングした。pFN11AはGAL4DNA結合ドメイン (DBD) と融合タンパク質として発現するよう設計されているが、各ベクターからGAL4DBDの部分のみを取り除いて実験に用いた。ショウジョウバエやカイコなどにおいてMetは、*Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* の転写に参与する。そこで、ミツバチ*Kr-h1*のpromoter配列をpGL4.17ベクターに連結させ、HEK293細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによりMet及びSRCの転写因子としての機能を解析した。MetやSRCは、basic helix-loop-helix Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) 転写因子である。他のbHLH-PAS転写因子である*Clock*や*Cycle*などのORFをpFN11Aに連結させたベクターを構築し、これら転写因子のルシフェラーゼアッセイも行った。

(3) ミツバチの*Kr-h1*のpromoter配列中のJH応答エレメント (GCCTCCACGTG) に変異或いは欠損を入れた後のMet及びSRCのルシフェラーゼアッセイ能の変化を解析した。

(4) Met及びSRCをpFN11AとpFN10Aにそれぞれ連結したベクターを構築した。これらのベクターをHEK293で発現させることで、MetやSRCがGAL4DBD或いはVP16との融合タンパク質として発現する。GAL4DBD或いはVP16との融合タンパク質の部分が相互作用するとGAL4DBDとVP16が連動して転写因子として機能することとなる。この融合タンパク質を発現させた細胞にUAS-Luciferaseのベクター (pGL4.31) を形質導入することで、ルシフェラーゼアッセイによりGAL4DBD或いはVP16に連結させたタンパク質同士の相互作用を解析できる。本研究ではこのアッセイによりMetとSRCが転写因子として働く際に相互作用をするかどうかについての解析を実施した。

(5) 幼虫にJHを添加して飼育し、その後の幼虫のRNA抽出し、*Kr-h1*の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで解析した。さらに、JHを添加した時の*Met*及び*SRC*のRNAiを実施し、実際のミツバチにおいて*Kr-h1*の転写因子として*Met*及び*SRC*が機能しているかどうかの解析を行った。

4. 研究成果

女王蜂と働き蜂の遺伝子発現変動の解析

(1) RNA-seq解析後のGO解析の結果、働き蜂に比べ女王蜂では、エネルギー代謝関連遺伝子群の発現抑制やβ酸化関連遺伝子の発現増加が、遺伝子発現変動の主なものであり、免疫関連因子の発現変化などは見られなかった。これらの遺伝子発現変動の中で、低下のものは頭部、胸部、腹部全体で見られ、増加のものは頭部と胸部で見られた。一方、腹部の遺伝子発現変動の増加においては、卵形成や胚発生に関与する遺伝子の発現の増加が主なものであった。エネルギー代謝関連遺伝子群の発現低下により、女王蜂で無駄にエネルギーを使わないようになっている可能性がある。β酸化での反応では、NADHなどの還元力やアセチルCoAが供給される。脂質代謝(β酸化)に関連する遺伝子群の発現増加は、エネルギー代謝が滞らないように十分な還元力を与えるために働き、エネルギー代謝関連遺伝子群の発現低下と相まって、女王蜂が働き蜂に比べエネルギー代謝の効率を高め、効率よくATP生産を行い、無駄にエネルギーを消耗することなく寿命を延長させて可能性が示唆された。

ミツバチにおける *Met* 及び *SRC* の同定

(1) tBlastx 解析により同定したミツバチの *Met* は NCBI において *Clock* としてアノテーションされていた。しかし、NCBI においては、*Clock* がミツバチゲノム上の異なる領域に位置する遺伝子として2つアノテーションされている形となっていた。2つの *Clock* の内、tBlastx 解析で *Met* と同定された遺伝子の転写産物は、系統樹解析の結果、他の昆虫の *Met* に近縁であり、*Clock* ではないことが分かった。一方、2つの *Clock* の内、*Met* として同定されていない方の *Clock* は他の昆虫の *Clock* と近縁であることが分かった。従って、*Met* は *Clock* と間違えてアノテーションされ、結果として2つの *Clock* が存在する形となっていたことが分かった。また、*SRC* と同定された遺伝子の転写産物は、他の昆虫の *SRC* と近縁にあることも分かった。

(2) HEK293 を用いたルシフェラーゼアッセイを行った結果、*Met* 及び *SRC* が2つ同時に発現し、且つ JH が存在した時にルシフェラーゼ活性が見られた。この結果は、*Kr-h1* の転写に *Met* と co-factor として *SRC* が関与していることが明らかとなった。一方、同じ bHLH-PAS 転写因子である *Clock* や *Cycle* のルシフェラーゼ活性は見られなかった。これらの結果から、(1) で示したように、2つの *Clock* の内、一方が *Met* として *Kr-h1* の転写に機能しており、本研究で同定した遺伝子が *Met* で間違いないことが分かった。

(3) ミツバチの *Kr-h1* の promoter 配列中の JH 応答エレメントは、転写開始点 (TSS) の上流と下流に1つずつ合計2つ存在する。この JH 応答エレメントに2つ同時に変異或いは欠損を与えた場合でも、どちらか片方の JH 応答エレメントに変異或いは欠損を与えた場合でも *Met/SRC* によるルシフェラーゼ活性は減少した。その際、TSS の下流の JH 応答エレメントに変異或いは欠損を与えた時にルシフェラーゼ活性の減少は、TSS の上流の JH 応答エレメントに変異或いは欠損を与えた時のそれより大きかった。これらの結果から、*Met/SRC* は JH 応答エレメント (GCCTCCACGTG) に結合して転写因子として機能すること、またその転写活性化には TSS の下流に位置する JH 応答エレメントが深く関与することが明らかとなった。

(4) *Met* 及び *SRC* を GAL4DBD 或いは VP16 の融合タンパク質として HEK293 に発現させ、ルシフェラーゼ活性により *Met* 及び *SRC* の相互作用を解析した結果、*Met*-GAL4DBD 及び *SRC*-VP16 を同時に発現させた場合、また *SRC*-GAL4DBD 及び *Met*-VP16 を同時に発現させた場合にルシフェラーゼ活性が検出できた。これらの結果から、*Met* と *SRC* は両者が相互作用して、転写因子として機能することが明らかとなった。

(5) ミツバチの幼虫の培地に JH を添加した結果、濃度依存的に *Kr-h1* の遺伝子発現が増加した。この JH による *Kr-h1* の転写活性化は、*Met*RNAi 或いは *SRC*RNAi により有意に減少した。これら (1) ~ (5) の結果から、他の昆虫の *Met* 及び *SRC* の ORF の配列を基にした tBlastx 解析を通じて同定したミツバチの *Met* 及び *SRC* は、両者が共に相互作用して JH 応答エレメントに結合して *Kr-h1* の遺伝子発現に関与する転写因子であることが明らかとなった。本研究において、これまで未同定であったミツバチの *Met* 及び *SRC* を同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yosuke Tsuchiya, Mikihiro Hayashi, Katashi Nagamatsu, Takehito Ono, Masaki Kamakura, Takanori Iwata, Tomoki Nakashima	4. 巻 295
2. 論文標題 The key royal jelly component 10-hydroxy-2-decenoic acid protects against bone loss by inhibiting NF- κ B signaling downstream of FFAR4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 12224-12232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鎌倉昌樹
2. 発表標題 みつばち研究を防疫事業に生かす
3. 学会等名 第2回東京農工大学を含む7大学防疫コンソーシアム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌倉昌樹、中岡慎治、福田真嗣
2. 発表標題 ミツバチの寿命制御機構の解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌倉昌樹
2. 発表標題 ミツバチの幼若ホルモン受容体（Methoprene tolerant）のクローニングと機能解析
3. 学会等名 第6回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌倉昌樹
2. 発表標題 ミツバチのカースト分化及び寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析
3. 学会等名 2019年度東京大学臨床研究者育成プログラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌倉昌樹
2. 発表標題 ミツバチのカースト分化及び寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析
3. 学会等名 広島大学日本食・発酵食品の革新的研究開発拠点令和元年度第2回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊倉大騎、砂川純也、白又拓也、中岡慎治、鎌倉昌樹
2. 発表標題 セイヨウミツバチのMulti-omics解析による疾病探索
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂川純也、熊倉大騎、白又拓也、中岡慎治、鎌倉昌樹
2. 発表標題 Virome解析を用いたウイルス普遍性の探索
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡山靖佳、落合信介、堀江哲寛、家崎高志、深澤和也、鎌倉昌樹、池野久美子、永松剛、檜井栄一
2. 発表標題 変形性膝関節症に対するローヤルゼリーの予防効果の検討について
3. 学会等名 第12回 岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡山靖佳、落合信介、堀江哲寛、家崎高志、深澤和也、鎌倉昌樹、池野久美子、永松剛、檜井栄一
2. 発表標題 変形性膝関節症に対するローヤルゼリーの予防効果の検討について
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上和生、山崎英恵、鎌倉昌樹、他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 287
3. 書名 抗疲労・抗ストレス・睡眠改善食品の開発	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミツバチ免疫活性化剤	発明者 鎌倉昌樹、羽佐田祥介、小泉桂一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-155692	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	齋藤 裕 (Saito Yutaka) (60721496)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領 域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関