

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23740

研究課題名(和文) ゲノム編集法によるmKastを介したミツバチ行動制御機構の多階層的な解明

研究課題名(英文) Analyses of mKast functions for regulation of honeybee behavior using genome editing.

研究代表者

河野 大輝 (Kohno, Hiroki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：60846773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：社会性昆虫であるセイヨウミツバチでは、高度な社会性行動を制御する脳の分子神経基盤が古くから研究されてきたが、ミツバチにおける有効な遺伝子操作法の不足から因果関係が証明された例は少ない。本研究では、感覚情報処理を介して成虫脳の高次機能を制御する可能性がある遺伝子mKastに着目し、ゲノム編集法を用いた遺伝子ノックアウトによる機能解析を試みた。この結果、初めてヘテロ変異体女王蜂の作出に成功し、またmKastは発現パターンから予想されてきたいくつかの機能には関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミツバチは多数の個体と群れ(コロニー)を作って生活する社会性昆虫であり、社会性行動研究のモデル生物として知られている。しかし、遺伝子操作した個体は室内に設置したコロニー内で飼育しなければならないという難点があるため、ミツバチでの遺伝子操作技術は未発展である。本研究結果は、社会性行動を司る脳の分子神経基盤の解明に重要な、ミツバチ遺伝学の前進に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：European honeybee is an eusocial insect, and the molecular and neural bases underlying the regulation of honeybee social behavior have been studied for a long time. The lack of efficient genetic tools in this species, however, has been an obstacle to analyze function of genes. This study focused on a gene mKast, which is supposed to regulate higher brain functions of adult honeybee through processing sensory information, and tried to analyze its function by gene knockout using CRISPR/Cas9. This study succeeded to produce heterozygous mutant queens for the first time, and indicated that mKast is not related to the functions predicted from its expression patterns.

研究分野：行動遺伝学

キーワード：セイヨウミツバチ 社会性行動 ゲノム編集 キノコ体 ケニヨン細胞

## 1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫であるセイヨウミツバチ (*Apis mellifera* L.) は、高度な社会性行動を示す。ミツバチの働き蜂は日齢やコロニー状況に応じて役割分担する。また、ダンス言語と呼ばれる記号化コミュニケーションを用いることで餌場の情報を巣仲間へ伝達する。このような社会性行動を制御する脳領域として、記憶・学習や感覚統合を担う昆虫脳の高次中枢であるキノコ体が着目されてきた。ミツバチのキノコ体を構成するケニヨン細胞には遺伝子発現パターンが異なるサブタイプが存在しており、各サブタイプが異なる脳機能や行動制御に関わる可能性が示唆されている(図1)。また、異なる生態を示すハチ目昆虫種を用いた比較解析により、ケニヨン細胞サブタイプの数、ハチ目昆虫の行動の複雑化に伴って増加していることが示唆された(Oya et al. *Sci. Rep.* 2017)。しかし、ミツバチにおいて有効な遺伝子操作法が近年まで存在しなかったことから、各サブタイプの機能は遺伝子発現解析による示唆に留まっている。



## 2. 研究の目的

ミツバチにおける遺伝子操作法としては、トランスポゾン *piggyBac* を用いたトランスジェニックミツバチの作出や(Schultes et al. *PNAS* 2014, Otto et al. *Sci. Rep.* 2018)、ゲノム編集法 CRISPR/Cas9 による変異体作出が近年報告されている(Kohn et al. *Zool. Sci.* 2016, Kohn and Kubo *Sci. Rep.* 2018)。しかし、本研究の計画段階では、トランスジェニックやホモ変異体の働き蜂を作出した報告がなかった。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 法によってホモ変異体働き蜂を作出する実験系の確立を目的の1つとした。また、CRISPR/Cas9 法を用いたノックインが他生物種で多く報告されており、非常に有用な技術であることから、ミツバチにおけるノックイン手法確立も目指した。

変異体ミツバチの作出にあたり、ゲノム編集の標的としてミツバチ成虫の脳選択的に発現する遺伝子 *mKast* を選択した。*mKast* は視葉や触角葉などの一次感覚中枢に加え、キノコ体において「中間型」サブタイプ選択的に発現する。また、成虫脳選択的に発現することから発生致死にならないと予想され、行動制御機構を調べるにあたり有用である。本研究では、ゲノム編集法を用い、*mKast* の行動制御、シグナル伝達制御における機能の同定、さらに発現細胞の脳内投射パターンの同定を計画した。これらを通し、これまでにほとんど明らかになっていない社会性昆虫の脳の高次中枢における行動制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム編集法による *mKast* 変異体ミツバチの作出

ミツバチでは、受精卵が雌蜂(女王蜂や働き蜂)に、未受精卵が雄蜂に発生する。まず、産卵直後の受精卵に CRISPR/Cas9 法により変異導入し、孵化した幼虫を女王蜂のいない無女王蜂群に導入した。無女王蜂群の働き蜂は、大量のローヤルゼリーを導入した幼虫に与え、新女王蜂へと分化させる。羽化した女王蜂に野生型雄蜂由来の精子を用いて人工授精を施し、産まれたヘテロ変異体の幼虫を再度女王蜂へと分化させることでヘテロ変異体女王蜂を作出した。これら女王蜂に CO2 麻酔を施すことで未受精卵産卵を誘導し、変異体雄蜂を作出した。なお、ゲノム編集処理した個体やその子孫は、拡散防止措置 P1A を施した室内に吊した蚊帳の中に設置したコロニーで飼育した。

### (2) *mKast* 変異体雄蜂の機能解析

CRISPR/Cas9 法により作出した *mKast* 変異体雄蜂を用いて、*in situ hybridization* (ISH) や免疫組織化学による組織学的な解析と、嗅覚や視覚との連合学習による行動解析を行った。

### (3) CRISPR/Cas9 によるノックイン法の検討

CRISPR/Cas9 法は、ゲノム上のほとんど任意の箇所を DNA 二本鎖を切断する技術であり、DNA の修復過程で生じるエラーによって遺伝子にフレームシフト変異が生じるとノックアウトが、修復の際に別の配列が切断箇所に挿入されるとノックインが生じる。挿入したい配列(ドナー-DNA)を Cas9 タンパク質とガイド RNA と共にインジェクションすることで、目的の配列を目的の部位に挿入することができる。ドナー-DNA としてプラスミド、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA などを用いる方法が報告されていることから、本研究ではいくつかのドナー-DNA を試し、ミツバチにおいて有効な方法を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム編集法による変異体ミツバチの作出

最近、ドイツのグループがミツバチで高効率にゲノム編集する実験系を開発し、F0世代を用いて調べた性決定システムとカースト二型の関係を *PLOS Biology* 誌に報告している (Roth et al. 2019)。次世代の変異体を作成するにはインジェクションした F0 世代における変異導入率が高い方が都合が良いため、同様の手法を試したところ、遺伝子編集効率を従来の約 10% から大幅に改善することができた (図 2)。そこで、この手法によってゲノム編集を施した個体を女王蜂へと分化させ、野生型の雄蜂由来の精子と人工授精することで、高効率でヘテロ変異体を作成できた。また、これらのヘテロ変異体の幼虫を再度女王蜂へと分化させることで、ヘテロ変異体女王蜂の作出に初めて成功した。本研究ではホモ変異体働き蜂の作出は実現できなかったものの、ミツバチにおける遺伝学の境界を広げられた。

## (2) *mKast* 変異体雄蜂の機能解析

*mKast* はミツバチの発生過程のキノコ体において、中間型サブタイプの分化に関わる可能性があった (Yamane et al. *PLOS ONE* 2017)。そこで、ヘテロ変異体女王蜂由来の *mKast* 変異体雄蜂を用い、キノコ体で発現する遺伝子 *jhdK* の ISH を行った。*jhdK* は各サブタイプで発現強度が異なる (大型 > 小型 > 中間型) ため、この遺伝子の ISH のみで 3 つのサブタイプを可視化できる。ISH の結果、変異体雄蜂でも 3 種類のサブタイプが確認され、先行研究において予想されていた機能は否定された。また、先行研究において作成されていた *anti-mKast* 抗体を用いた免疫組織化学を野生型と変異体の雄蜂で行ったところ、野生型ではキノコ体一部や視葉の視小葉の一部に見られたシグナルが、変異体では消失していたことから、これらの領域で *mKast* が機能していることが示唆された。キノコ体は記憶学習、視葉は視覚情報処理に関わることが知られていることから、変異体雄蜂においてこれらの能力に異常があるか調べたところ、変異体雄蜂は嗅覚連合学習や、視覚 (動き) 連合学習を行うことができた。未だ *mKast* の制御する行動は不明だが、これらの結果から、ミツバチのキノコ体や視葉に役割分担があり、*mKast* はその一部に関わる可能性が考えられた。

## (3) ミツバチにおける、CRISPR/Cas9 によるノックイン法の検討

既に有効性が示されているガイド RNA を用い、ドナー DNA のみを変更して有効なノックイン法を探索した。この結果、効率は低いものの一部の個体においてノックインが生じた場合のみ PCR 増幅されるバンドが検出された。Cas9 タンパク質を注入しなかったコントロールではこのバンドは検出されなかったことから、少なくとも一部の細胞ではノックインが生じた可能性が高い。今後は外来遺伝子を挿入し、タンパク質レベルでノックインが生じたことを確認していく予定である。

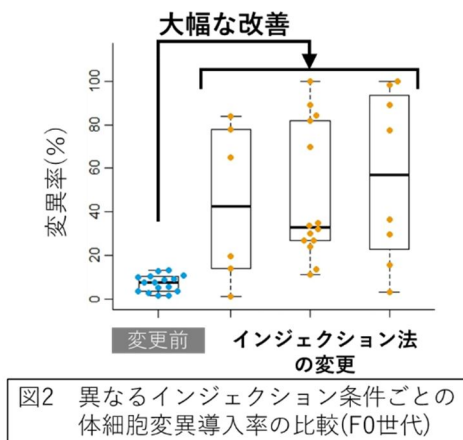


図2 異なるインジェクション条件ごとの体細胞変異導入率の比較(F0世代)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohno H , Kubo T	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetics in the Honey Bee: Achievements and Prospects toward the Functional Analysis of Molecular and Neural Mechanisms Underlying Social Behaviors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects10100348	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 -

1. 著者名 河野 大輝 , 久保 健雄	4. 巻 73
2. 論文標題 ミツバチの社会性行動の分子生物学 遺伝子から探るミツバチの脳の仕組み（特集 ミツバチ新時代）	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 遺伝：生物の科学	6. 最初と最後の頁 596-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai Hitomi, Kunieda Takekazu, Nakamura Korefumi, Matsumura Yasuhiro, Namiki Manami, Kohno Hiroki, Kubo Takeo	4. 巻 10
2. 論文標題 Developmental stage-specific distribution and phosphorylation of Mblk-1, a transcription factor involved in ecdysteroid-signaling in the honey bee brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65327-z	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 -

1. 著者名 松村泰宏、河野大輝、久保健雄	4. 巻 56
2. 論文標題 ミツバチ脳における脱皮ホルモンシグナル関連転写因子Mblk-1の発現解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野大輝
2. 発表標題 ゲノム編集によるミツバチの遺伝子機能解析
3. 学会等名 ミツバチサミット2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------