

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657049

研究課題名(和文)トランスジェニックコオロギを用いた微小脳学習系への新規アプローチ

研究課題名(英文)Novel approaches to insect learning systems using transgenic crickets

研究代表者

水波 誠(Mizunami, Makoto)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30174030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コオロギでの遺伝子改変法を用いた学習実験系の確立に挑戦し、またRNA干渉法(RNAi)による遺伝子発現阻害技術の確立をめざした。前者ではCrispr/Casシステムを用いてタイプ1ドーパミン受容体(DopR1)遺伝子のノックアウト個体の創出を目指し、欠損のあるDopR1遺伝子をヘテロでもつ個体の作出に成功した。現在それらを交配し、ホモでのDopR1欠損個体の作成を進めている。後者では、RNAiによる遺伝子発現阻害実験により、タイプ1ドーパミン受容体(DopR1)が罰学習に関わること、タイプ1オクトパミン受容体(OA1)が報酬学習に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish (1) transgenic techniques and (2) RNA interference (RNAi) methods to study molecular basis of learning in crickets, *Gryllus bimaculatus*. For the former, we successfully obtained heterozygous knockout individuals of type 1 dopamine receptor (DopR1) by using CRISPR/CAS system, and now we are now trying to obtain homozygous DopR1 knockout crickets by inbreeding them. For the latter, we performed RNAi experiments with to types of dopamine receptors (Dop1 and Dop2) and a type of octopamine receptor (OA1) and obtained evidence to show that DopR1 participates in aversive learning and OA1 participates in appetitive conditioning, whereas DA2 participates in neither of them. The results provided convincing evidence that octopamine neurons and dopamine neurons mediate reward and punishment signals, respectively, in associative learning in crickets.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：コオロギ 学習 遺伝子組換え RNA干渉 記憶 遺伝子発現阻害 ドーパミン オクトパミン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、昆虫の脳を「微小脳」という概念でとらえることを提唱し、その構造と機能に関する研究を進めてきた。特に、高度な学習能力をもつコオロギやゴキブリを材料に、微小脳における学習・記憶とそのメカニズムの研究を進め、昆虫の学習(古典的条件付け)が哺乳類とも他の無脊椎動物との異なる独自の方式に基づくことなどを明らかにしつつあった。

当時徳島大学の野地教授らは、トランスポゾンの1種である PiggyBac (ピギーバック) を用いて、世界で初めてトランスジェニックコオロギの作成に成功した。学習・記憶の神経機構を電気生理学や行動薬理学と遺伝子操作技術と組み合わせることで解析できる実験系をコオロギで立ち上げることができれば、種々の画期的な実験が可能になり、この研究分野に大きなブレイクスルーが期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的はコオロギの学習研究に適用可能な遺伝子操作技術を確立することであった。またこれに関連して、より簡便な2重鎖RNAを用いた遺伝子発現阻害技術を確立し、この技術を用いた研究により、学習において罰や報酬情報を伝える伝達物質についての論争に決着をつけることを目指した。

3. 研究の方法

トランスジェニックコオロギの作成: 本研究開始時には、当時最も有望と考えられた PiggyBac および TALEN 法(遺伝子のある特定の部分を切り出すために人工的に作製された酵素を用いた遺伝子改変技術)の導入を念頭において研究を進めたが、これらについては期待したような成果が得られなかった。そこで H25 年度には Crispr/Cas システムを用いたトランスジェニックコオロギの作成を目指す方針に切り替えた。

Crispr/Cas システムとは、原核生物の獲得免疫系として働くシステムを遺伝子改変に応用したもので、数十塩基対の短い反復配列を含む配列である CRISPR (クリスパー) と、ヌクレアーゼやヘリカーゼをコードし CRISPR で作用する CRISPR-associated (Cas) 遺伝子群の組み合わせからなる。このシステムを利用し、タイプ1ドーパミン受容体 DopR1 遺伝子のノックアウト個体を創出することを試みた。研究においては徳島大学工学部の野地教授の支援と協力を得た。

受精卵に Cas9 mRNA と DopR1 遺伝子をノックアウトするための guide RNA をインジェクションし、ふ化した幼虫を成虫までそだてて交配し、数十匹の F1 世代を得た。それらの個体の脚から DNA を抽出し DopR1 欠損についてスクリーニングした。DopR1 の欠損が確認できたヘテロ個体同士を掛け合わせるこ

で、ホモの DopR1 欠損個体の作出をめざした。

RNA 干渉法を用いた罰や報酬情報を伝える伝達物質受容体の同定: タイプ1およびタイプ2ドーパミン受容体遺伝子(DopR1, DopR2) およびタイプ1ドーパミン受容体遺伝子(OA1)の2重鎖RNA(dsRNA)をそれぞれ合成した。合成した dsRNA をマイクロシリンジで成虫コオロギの頭部に血中投与した。投与の2日後に匂いを水または塩水と連合させる報酬学習または罰学習訓練を行った。学習への影響は、コオロギの学習させた匂いおよびコントロールの匂いへの小額肢伸展反応(MER)を計測することで評価した。遺伝子発現への影響は DopR1 dsRNA 投与個体の mRNA を qPCR 法で定量することで評価した。コントロールとして DsRed dsRNA 投与個体を用いた。

4. 研究成果

前者(トランスジェニックコオロギ作成)については、受精卵への Cas9 mRNA と guide RNA をインジェクションした個体を成虫まで育てて掛け合わせさせた F1 個体の中から、ヘテロで DopR1 遺伝子に変異が入ったオス個体を7匹、メス個体4匹を確認することに成功した。現在、さらにそれらの個体の掛け合わせさせた F2 の幼虫を育てつつあり、その中にホモの DopR1 ノックアウト個体がいるかについて約1ヶ月後には確認できる予定である。すなわち本研究の目的であるトランスジェニックコオロギの創出に、明確な見通しを立てることに成功した。ホモでの欠損個体の創出に成功すれば、それらを掛け合わせた F3 個体において、学習への影響について調べることが可能となり、ノックアウトコオロギを用いた学習のメカニズム解明が一気に進むと期待できる。万一ホモが致死であった場合にはヘテロ個体を実験に用いる。

後者(RNAi を用いた研究)については、DopR1 の RNAi 個体は、報酬学習は正常であったが、罰学習の成立はみられなかった。DopR2 の RNAi 個体は報酬学習、罰学習とも正常であった。OA1 の RNAi 個体は罰学習は正常であるが報酬学習が成立しなかった。qPCR による脳内 mRNA の定量により、いずれの RNAi 群においても、コントロール群に比べた mRNA 発現量の減少が確認された。これらのことから、DopR1 受容体は罰学習には関わることが示している。報酬学習には関わらない事、OA1 受容体は報酬学習には関わることが示している。DopR1 受容体はどちらにも関わらないことを示している。これまで代表者はコオロギでの行動薬理実験から、ドーパミンニューロンが学習において報酬情報を担い、オクトパミンニューロンが罰情報を担うと主張してきた。一方、ショウジョウバエでの受容体発現阻害実験からはドーパミンニューロンが報酬情報と罰情報の両方を担うと提案されている。本遺伝子発現阻害実験の結果は、少なくともコオロギにおいては、上記の代表者の主張が正しいことを示している。

今後の課題の1つは、今回のコオロギでの発見が、ミツバチやゴキブリなどの他種の昆虫にも当てはまるのかを明らかにすることである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

Matsumoto Y, Sandoz JC, Devaud JM, Lormant F, Mizunami M, Giurfa M (2014) Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase and calcium/calmodulin-dependent kinase II are required for late but not early long-term memory formation in the honey bee. *Learning & Memory* 21: 272-286. 査読有, doi: 10.1101/lm.032037.113.

Matsumoto Y, Hirashima D, Terao K, Mizunami M. (2013) Roles of NO signaling in long-term memory formation in visual learning in an insect *PLoS One* 8:e68538. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0068538.

Matsumoto Y, Hirashima D, Mizunami M. (2013) Analysis and modeling of neural processes underlying sensory preconditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 101: 103-113. 査読有, doi: 10.1016/j.nlm.2013.01.008.

Matsumoto C.S., Kuramochi T, Matsumoto Y, Watanabe H, Nishino H, Mizunami M. (2013) Participation of NO signaling in formation of long-term memory in salivary conditioning of the cockroach. *Neurosci. Lett.* 541: 4-8. 査読有, doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.010.

Nishino H, Iwasaki M, Kamimura I, Mizunami M. (2012) Divergent and convergent projections to the two parallel olfactory centers from two neighboring, pheromone-receptive glomeruli in the male American cockroach. *J. Comp. Neurol.* 520:3428-3445. 査読有, doi: 10.1002/cne.23111.

Nishino H., Iwasaki M., Yasuyama K., Hongo H., Watanabe H., Mizunami M. (2012) Visual and olfactory input segregation in the mushroom body calyces in a basal neopteran, the American cockroach. *Arthropod Struct. Dev.* 41:3-16. 査読有, doi: 10.1016/j.asd.2011.08.005.

Matsumoto C.S., Matsumoto Y., Watanabe H., Nishino H., and Mizunami M. (2012) Context-dependent olfactory learning monitored by activities of salivary neurons in cockroaches. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97: 30-36. 査読有, doi: 10.1016/j.nlm.2011.08.010.

〔学会発表〕(計19件)

Mizunami M, Intelligence with microbrains: Cognitive processes underlying insect learning. International workshop on animal instinctive and intelligent behaviors. February 20, 2014, Sapporo (invited). Hokkaido Univ. (Sapporo).

寺尾勲太, 松本幸久, 水波誠, コオロギの古典的条件づけにおけるブロッキング、日本動物学会、2013年9月26日、岡山大学(岡山市)

廣鱈翔, 松本幸久, 水波誠, コオロギ古典的条件づけにおける習慣形成とオクトパミンニューロンの関係の解明、日本動物学会、2013年9月26日、岡山市

和久田亮, 中村太郎, 松本幸久, 野地澄晴, 三戸太郎, 水波誠, RNA干渉法によるコオロギの学習・記憶の分子メカニズムの解析、日本動物学会、2013年9月26日、岡山大学(岡山市)

松本幸久, 松本-佐藤千尋, 中野真樹, 服部淳彦, 水波誠, フタホシコオロギの加齢性記憶障害における飼育環境の影響、日本動物学会、2013年9月26日、岡山大学(岡山市)

細野翔平, 松本幸久, 水波誠, MERを用いたゴキブリの学習、日本動物学会、2013年9月26日、岡山大学(岡山市)

寺尾勲太, 松本幸久, 水波誠, コオロギにおけるブロッキング現象の確認、日本動物学会北海道支部会、2013年8月24日、北海道教育大学(札幌市)

細野翔平, 松本幸久, 水波誠, ゴキブリを用いた新しい学習実験系の確立、日本動物学会北海道支部会、2013年8月24日、北海道教育大学(札幌市)

和久田亮, 松本幸久, 水波誠, RNAiによるコオロギの記憶形成に関わる分子機構の解明、日本動物学会北海道支部会、2013年8月24日、北海道教育大学(札幌市)

Mizunami M, Matsumoto Y, Hirashima D, Analysis and modeling of sensory preconditioning in crickets, 日本比較生理生化学会、2013年7月13日、イーグレひめじ(姫路市)

Matsumoto Y, Matsumoto C, Mizunami M. Memory molecules in insects: from behavioral pharmacological studies of olfactory learning in crickets. Symposium: Potential of insect neuroscience. Japanese Society for Neuroscience, (invited), 日本神経科学学会、2012年9月20日、名古屋コンベンションセンター(名古屋市)

廣鱈翔, 松本幸久, 水波誠, コオロギ古典的条件づけにおける習慣形成の行動学的証明、日本動物学会、2012年9月15日、大阪大学(大阪市)

川中子沙織、松本幸久、水波誠、フタホシコオロギの嗅覚学習における PKC シグナルの役割解析、日本動物学会、2012 年 9 月 15 日、大阪大学（大阪市）

廣齋翔、松本幸久、水波誠、コオロギ古典的条件付けにおける習慣形成、日本動物学会北海道支部会、2012 年 8 月 25 日、北海道大学（札幌市）

Mizunami M, Matsumoto Y, Hirashima D. Analysis and modeling of sensory preconditioning in crickets. 10th International Congress of Neuroethology, Maryland, July 19, 2012. Univ. Maryland (USA)

Mizunami M. Roles of aminergic neurons in memory acquisition and retrieval in crickets. International Symposium: Biogenic Amines in Insects, July 7, 2012 Berlin Free University (Germany), (invited).

Matsumoto Y, Matsumoto C, Mizunami M. Olfactory conditioning of mandible elevation response in cricket. 日本比較生理生化学会、総合研究大学院大学（葉山市）2012 年 7 月 7 日

Matsumoto Y, Matsumoto C, Mizunami M. NO-cGMP signaling is involved in age-related memory impairment in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Second International Conference on the Cricket, March 21, 2012, Tokushima Univ. (Tokushima) (invited).

Mizunami M, Takahashi T, Hamada A, Miyawaki K, Matsumoto Y, Mito T, Noji S. Systemic RNA interference for the study of long-term memory formation in the cricket. Second International Conference on the Cricket, March 19, 2012, Tokushima Univ. (Tokushima) (invited)

〔図書〕(計 4 件)

水波誠 (2013) 行動生物学辞典、上田恵介他編、自己受容器などの項目や付録 1 を担当、東京化学同人

水波誠 (2013) 微小脳と巨大脳（項目担当）高校生物教師用指導書（DVD 版）東京書籍

Mizunami M., Matsumoto Y., Watanabe H., Nishino H. (2013) Chapter 41: Olfactory and visual learning in cockroaches and crickets. In: Invertebrate Learning and Memory, eds by R. Menzel and P.R. Benjamin, Springer, pp. 547-558.

松本幸久、水波誠 (2012) マダガスカルゴキブリの飼育（分担執筆）針山孝彦他編、研究者が教える動物飼育 第 2 巻「昆虫とクモの仲間」、共立出版（pp. 31-34）

〔産業財産権〕

該当なし。

〔その他〕

報道関係情報

朝日新聞グローブ、「脳の不思議、鳥や虫の脳もすごい！」2014 年 3 月 16 日（取材協力）

朝日新聞、「トンボの目玉はどうなっている？」2012 年 6 月 9 日（取材協力）

アウトリーチ活動

北海道大学オープンキャンパス、高校生限定プログラム、「昆虫の学習を体験しよう！」2013 年 8 月 5 日、北海道大学（札幌市）

日本生物教育会全国大会実験研修「“脳”をみんなの教材に」講師、2012 年 8 月 4 日 北海道大学（札幌市）

ホームページ情報

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~mizunami/MICROB-2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水波 誠 (MIZUNAMI, Makoto)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30174030

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし