

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450472

研究課題名(和文) ミツバチのカースト分化および脳機能に関するエピジェネティクス

研究課題名(英文) Epigenetics of caste differentiation and brain function in honeybees

研究代表者

佐々木 哲彦 (SASAKI, Tetsuhiko)

玉川大学・学術研究所・教授

研究者番号：60235257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチの雌は幼虫期に与えられる餌の違いによって女王バチと働きバチに分化する。このカースト分化に性決定遺伝子が関与している可能性を検証することを目的として、脂肪体における遺伝子発現解析を行い、transformer 2とdoublesexの発現がカースト間で異なることを示唆する結果を得た。また、働きバチの行動が育児から採餌に変化する際のエピジェネティックな仕組みを調べるため、脳から抽出したDNAのメチル化を解析し、メチル化の状態が変化する439個の遺伝子を同定した。さらに、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を試み、主要ローヤルゼリータンパク質のノックアウトに成功した。

研究成果の概要(英文)：A female larva of honeybee develops into a queen or a worker depending on the diet provided during the larval period. To verify the possibility that sex determination gene is involved in this process of caste differentiation, gene expressions in the fat bodies of adult bees were analyzed. The results suggested that the expressions of two sex determination genes, transformer 2 and doublesex, differ between queen and worker bees. In addition, in order to investigate the epigenetic mechanism underlying the task change of worker bees from nursing to foraging, I analyzed methylation profiles of DNA in the brains of worker bees and identified 439 genes of which methylation patterns change. I also attempted genome editing by CRISPR/Cas9 system and successfully knockout the gene encoding the major royal jelly protein 1.

研究分野：応用昆虫科学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 ミツバチ カースト分化 性決定遺伝子 選択的スプライシング
ゲノム編集 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は細菌から植物、動物まで生物界全体で普遍的に見られ、真核生物ではおもに CpG ジヌクレオチドのシトシンがメチル化される。哺乳類では DNA メチル化はヒストンの修飾とともに、染色体の構造や遺伝子発現を調節し、発生、分化、老化、疾患など、重要な現象に深く関与することが知られている。一方、無脊椎動物の DNA のメチル化については、まだ十分には研究されていない。ミツバチは 2006 年に CpG メチル化が起こることが報告されて以来、昆虫類における DNA メチル化の生物学的意義を探索するための重要なモデル生物とされてきた。ミツバチの雌は、幼虫期に与えられる餌の違いによって女王バチと働きバチに分化する。コロニーを維持するために必要な産卵以外の労働を担う働きバチは、羽化してからの日齢に応じて仕事を変化させ、典型的には、若い働きバチが幼虫の世話などの巣内での仕事に従事し、老齢のハチが花粉や花蜜の採餌を担当する。DNA のメチル化は個体発生における中長期的な遺伝子発現を制御するメカニズムとなり得ることから、女王バチと働きバチのカースト分化や、働きバチの齢差分業に関わっている可能性が考えられ、本研究はこの可能性を検証することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究に先立ち、ミツバチのカースト決定期にあたる孵化後 3 日齢の女王バチと働きバチの幼虫の全組織から抽出した DNA について、バイサルファイトシーケンス法によるメチローム解析を行ったところ、*dosage compensation regulator maleless*, *males absent on the first*, *doublesex (dsx)*, *transformer 2 (tra2)*, *sex lethal homolog* など、幾つかの性決定に関与する遺伝子のメチル化の状態がカースト間で異なることを示唆する結果が得られた。進化的には、カースト分化はメスであるワーカーの不任化であり、性決定関連遺伝子はその分子メカニズムの一部になっている可能性は十分に考えられる。もし女王バチと働きバチで性決定カスケードの遺伝子発現に違いがあるのであれば、最終的にはカスケードの最下流に位置する *dsx* の発現に違いが生じると予想される。転写因子である DSX は、選択的スプライシングによって雌雄で異なるタンパク質が作られ、それぞれが性的二型に関わる遺伝子発

現を制御する。本研究では、女王バチと働きバチの脂肪体における *dsx* の発現をノーザンハイブリダイゼーション法で解析した。また、カースト間での遺伝子発現を網羅的に比較するために RNA シークエンスを行った。

働きバチの齢差分業のエピジェネティックな調節については、若い育児バチと老齢の採餌バチの脳でメチル化の状態が異なる遺伝子を検索するため、昆虫脳の高次中枢であるキノコ体から抽出した DNA を用いて、バイサルファイトシーケンス法によるメチローム解析を行った。

さらにミツバチにおける遺伝子機能を解析するための技術開発として、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を試みた。

3. 研究の方法

(1) ノーザンハイブリダイゼーション法による *dsx* の発現解析

ワーカー巣房で孵化した幼虫を、孵化後 3 日以内にプラスチック製の人工王台に移虫することで女王バチを養成した。女王バチ、働きバチ、雄バチの脂肪体から RNAgents Total RNA Isolation System (Promega) を用いて total RNA を抽出し、Origotex-dT30 mRNA Purification Kit (Takara) で mRNA を濃縮した。プローブには雌雄の mRNA に共通して存在する第一エクソンと第二エクソンにまたがる 1,739 bp の領域を用いた。この領域の cDNA を PCR で増幅し、PCR 産物をクローニングしたプラスミドを鋳型として、PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて Dig 標識したプローブを合成した。DIG アプリケーションマニュアル (Roche) に従ってハイブリダイゼーションを行い、アルカリホスファターゼを結合した抗ジゴキシゲニン抗体と、Lumi-Phos Plus (Wako) を用いてプローブを検出した。

(2) 脂肪体における遺伝子発現解析

2015 年の春に生まれた 3 匹の女王バチを 10 月に解剖し、脂肪体から RNeasy (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。女王バチを回収した 3 群のそれぞれから 3 匹ずつ、計 9 匹の採餌バチからも RNA を抽出した。採餌バチは後脚に花粉団子を付けて巣に戻ってきたハチを巣門の前で捕獲した。3 匹の女王バチと 9 匹の働きバチの RNA をそれぞれプールして RNA シークエンスによる Whole transcriptome 解析に供した。タカラバイオ株式会社の受託解析を利用し、HiSeq システ

ムによる 100 base 両末端解析を行い、セイヨウミツバチ *Apis mellifera* のゲノム assembly Amel_4.5 を参照ゲノムとして既知遺伝子の発現解析を行った。

(3) 働きバチの脳のメチローム解析

育児バチと採餌バチのキノコ体から DNA を抽出し、バイサルファイトシーケンス法によるメチル化の解析を行った。働きバチは羽化後 4 日目ごろから幼虫への給餌などの育児行動をとるようになる。羽化後 24 時間以内のハチの胸部背側に油性ペンでマークして群に戻し、5 日後に回収したものを育児バチとした。採餌バチは、花粉団子を付けて巣に戻ってきたハチを巣門の前で採取した。172 匹の育児バチと 195 匹の採餌バチからキノコ体を摘出して DNA を抽出した。バイサルファイト処理、HiSeq によるシーケンシング、およびリードのレファレンスゲノム Amel_4.5 へのマッピングはオペロンバイオテクノロジー株式会社に委託した。

(4) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

major royal jelly protein 1 遺伝子 (*mrjp1*, NC_007080) をゲノム編集の標的とした。オフターゲットがなく、5'側に protospacer adjacent motif である NGG をもつ 20 塩基の配列を検索し、mRNA (NM_001011579) の 55 番から 74 番の配列に相当する TTG TTT ATG CTG GTA TGC CT を single-guide RNA (sgRNA) の標的とした。この配列を pDR274 (Addgene) にクローニングし、AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit (Epicentre) で転写して sgRNA を調製した。Cas9 の発現ベクターとして pXT7-hCas9 (China Zebrafish Resource Center) を使い、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Transcription Kit (Thermo Fisher Science) で転写して、キャップ構造と Poly(A)をもつ転写産物を得た。

sgRNA と Cas9 mRNA を注入するための産卵直後の卵は、女王バチをプラスチック製の人工採卵器に 3 時間閉じ込めることによって得た。sgRNA と Cas9 mRNA をそれぞれ 50 ng/μl と 1 μg/μl になるよう混合し、Femtojet (Eppendorf) を用いて卵に顕微注入した。ゲノム編集処理を行った個体は、昆虫飼育室に蚊帳 (幅 2.5 m、奥行 2.0 m、高さ 2.0 m) を吊るしたフライトルームを用意し、そこに設置した群に戻して飼育した。フライトルームの室温は 25°C、明暗サイクルは 16L:8D に設定した。

4. 研究成果

(1) ノーザンハイブリダイゼーション法による *dsx* の発現解析

女王バチ、働きバチ、雄バチの脂肪体における *dsx* の発現をノーザンハイブリダイゼーション法で解析したところ、約 8 kb と約 6 kb の 2 本のバンドが検出された。雄バチでの 2 本のバンドは、女王バチや働きバチと比べるとやや分子量が小さく、性特異的なスプライシングを受けていることが示唆され、検出された 2 本のバンドはどちらも *dsx* の転写産物であると考えられた。女王バチと働きバチを比較すると、女王バチでは高分子側のバンドのシグナルが強く、働きバチでは逆に低分子側のシグナルが強くなっており、2 種類のスプライシングバリエーションの量比がカーブ間で異なることが示唆された。

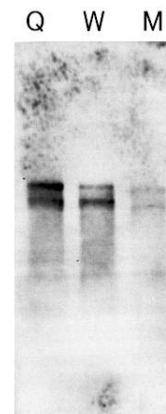


図 1 脂肪体での *dsx* 発現解析

(Q)女王バチ、(W)働きバチ、(M)雄バチ

データベースには、ミツバチの *dsx* の mRNA として 2504 b、2337 b、1992 b および 6215 b の 4 つの配列が登録されている。今回検出された約 6 kb のバンドは 6215 b の配列であると考えられる。2504 b、2337 b および 1992 b の mRNA に対応するシグナルは検出されず、これらのバリエーションの成虫脂肪体での発現量はあまり高くないと考えられた。約 8 kb のバリエーションはデータベースに登録されておらず、配列の決定が望まれる。

(2) 脂肪体における遺伝子発現解析

ミツバチの性決定カスケードの最上流の遺伝子は *complimentary sex determination* (*csd*) で、*csd* がヘテロ接合になっているかどうかの情報が *feminizer* (*fem*) や *tra2* を介して *dsx* のスプライシングに影響する。

表1 セイヨウミツバチの脂肪体における性決定遺伝子の発現

Gene	Transcript	FPKM		Ratio	
		Queen	Worker		
csd	XM_006568423.1	0.29	0.76	0.4	
	XM_006568425.1	0.41	1.40	0.3	
	XM_006568422.1	3.64	5.34	0.7	
	XM_006568424.1	0.32	0.59	0.5	
	XM_006568427.1	0.00	0.11	0.1	
	XM_006568426.1	2.55	2.84	0.9	
fem	NM_001134828.1	42.67	41.42	1.0	
tra2	XM_006564333.1	0.42	0.00	43.1	
	XM_006564332.1	0.00	0.35	0.0	
	XM_006564329.1	0.60	0.74	0.8	
	XM_006564325.1	4.55	3.45	1.3	
	XM_006564323.1	4.80	2.45	2.0	
	XM_006564330.1	0.00	0.06	0.2	
	XM_006564327.1	5.43	0.00	544.3	
	XM_006564331.1	0.40	0.00	40.9	
	XM_006564322.1	0.75	3.41	0.2	
	XM_006564328.1	0.00	2.78	0.0	
	XM_006564324.1	10.26	6.24	1.6	
	XM_006564326.1	7.38	8.31	0.9	
	NM_001265585.1	3.41	0.91	3.7	
	dsx	NM_001134936.1	0.19	0.09	2.0
		NM_001134935.1	8.99	12.60	0.7
NM_001111255.1		0.00	0.00	1.0	
XM_006560013.1		11.69	22.08	0.5	

これらの4つの性決定遺伝子の発現様式を表1に示す。*csd*にはカースト間で発現量に2倍以上の差がある転写産物が3つ存在するが、いずれも発現量の指標となる FPKM 値が低く、必ずしも信頼できるデータとは言えない。*fem*は女王バチ、働きバチともに FPKM 値が40を超えていて、発現量にカースト間で違いは見られなかった。*tra2*には女王バチでのみ発現している転写産物 (XM_006564327.1)があり、*dsx*では最も FPKM 値の高い配列 (XM_006560013.1) の発現比が0.53となっていた。

幼虫の全組織から抽出した DNA で行ったメチローム解析では、*tra2*はカースト間でメチル化の状態が異なることが示唆されている。今回の解析は成虫の脂肪体を用いているが、幼虫期と同様に脂肪体でも *tra2*のメチル化が女王バチと働きバチで異なっている可能性が考えられる。メチル化の違いによって *tra2*の選択的スプライシングのパターンが変化し、その下流の *dsx*の選択的スプライシングが調節を受けるのかもしれない。

表2 育児バチと採餌バチでメチル化度が異なる遺伝子の機能解析 (一部抜粋)

予想される遺伝子の機能	Gene ID
ヒストン修飾	XM_001122948.2
	XM_397232.2
	XM_624611.3
	XM_395512.4
	NM_001171169.1
	XM_392252.4
	XM_395811.4
	XM_003251332.1
	XM_395099.4
	XM_396195.4
クロマチンリモデリング	XM_395718.4
	XM_393008.4
	XM_395593.4
クロマチン凝集	XM_395593.4
	XM_003250561.1
メチル化 DNA	XM_003250561.1
	XM_394892.4
結合タンパク質	XM_395933.4
	XM_003250154.1
ヒストンバリエント	XM_003250154.1
	XM_003251412.1
ヘリカーゼ	XM_394723.4
	XM_003249736.1
	XM_624891.3
	XM_003249285.1
	XM_001122500.2
	XM_624207.3
	XM_001122489.2
	XM_001122722.2

(3) 働きバチの脳のメチローム解析

働きバチのキノコ体 DNA のメチル化をバイサルファイトシーケンス法で解析した。ミツバチゲノム (Amel_4.5) には9,498,691個の CpG サイトが存在し、10本以上のシーケンスリードがマッピングされた CpG サイトは、育児バチでは約76%、採餌バチでは約82%であった。これらの coverage が10以上の CpG サイトを以下の解析に用いた。2項検定によりバックグラウンドレベルより有意に高いメチル化率を示す CpG サイトを特定したところ、育児バチでは42,172個、採餌バチでは55,784個のメチル化サイトが同定された。次いで育児バチと採餌バチでメチル化の程度が異なる CpG サイトを Fisher の正確確率検定により検索したところ、774個の CpG サイトで育児バチと採餌バチで有意差が検出された。1つの遺伝子内に2個以上の有意差のあるサイトが含まれることもあり、遺伝子単位でみると、439個の遺伝子に両方でメチル化の程度が異なる CpG サイトが存在していた。

これらの遺伝子がどのような機能をもつか

を推定するために遺伝子オンロジー解析を行った。顕著な特徴として、ヒストンの修飾、クロマチンリモデリング、クロマチン凝集、メチル化 DNA 結合タンパクなど、エピジェネティックな調節に関与する遺伝子が多く含まれていた。働きバチが育児から採餌へと行動を切り替える過程に、DNA のメチル化というエピジェネティックな仕組みが、他のエピジェネティックな仕組みを制御するという、2段階のエピジェネティクスが作動している可能性が示唆された。

(4) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

major royal jelly protein 1 遺伝子(*mrjp1*) は女王バチの餌であるローヤルゼリーの主要なタンパク質成分の一つをコードしており、働きバチの下咽頭腺で発現する。機能を破壊しても幼虫の発生に影響しないことが期待されるこの遺伝子を標的として、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行った。sgRNA と Cas9 mRNA を顕微注射した 57 卵から 23 匹の幼虫が孵化した。孵化した幼虫を人工王台に移虫し、室内のフライトルームに設置した無王群に預けた。8 日後に人工王台を回収してインキュベーター内で女王バチを羽化させ、最終的に 6 匹の女王バチを得た。ミツバチの女王バチは、未交尾であっても、炭酸ガス麻酔を施すと卵巣を発達させて未受精卵を産むようになる。そこで、羽化後 6 日目と 7 日目に、10 分間の炭酸ガス麻酔を 1 回ずつ行い、これらの未交尾女王バチをフライトルーム内の無王群に戻して産卵させ、2 匹の女王バチに未受精卵を産ませることに成功した。一方の女王バチの子孫からはゲノム編集された個体を見つけることができなかったが、もう一方の女王バチが産んだ雄では、調べた 161 匹のうち、20 匹でゲノム編集が確認された。ミツバチでのゲノム編集に成功した世界初の例である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

Kohno H, Suenami S, Takeuchi H, Sasaki T, Kubo T (2016) Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoolog Sci.*; 33(5): 505-512. doi: 10.2108/zs160043

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. *Biochem Biophys Res Commun.*; 478(2): 1014-1049. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.023

Ugajin A, Matsuo K, Kubo R, Sasaki T, Ono M (2016) Expression profile of the sex determination gene *doublesex* in a gynandromorph of bumblebee, *Bombus ignitus*. *The Science of Nature*; 103(3-4): 17. doi: 10.1007/s00114-016-1342-7

〔学会発表〕 (計 14 件)

宇賀神篤、渡辺崇之、内山博允、佐々木哲彦、矢島俊介、小野正人 (2016) 「蛹期のミツバチ視葉における *Egr-1* 相同遺伝子の一過的発現」日本動物学会第 87 回大会 (11 月 17 日~19 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市)

河野大輝、末次翔太、竹内英明、佐々木哲彦、久保健雄 (2016) 「ミツバチにおける CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術の開発：社会行動に関わる遺伝子の機能解析に向けて」日本動物学会第 87 回大会 (11 月 17 日~19 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市)

佐々木哲彦 (2016) 「ミツバチの分業社会を支える脳内遺伝子発現の調節」日本学術会議公開シンポジウム「昆虫の社会と行動」(9 月 25 日、日本学術会議講堂、東京都港区)

宇賀神篤、内山博允、宮田徹、佐々木哲彦、矢嶋俊介、小野正人 (2016) 「ミツバチにおける新規セリン/スレオニンキナーゼ型初期応答遺伝子の解析」日本昆虫学会第 76 回大会 (3 月 26 日~29 日、大阪府立大学、大阪府堺市)

河野大輝、末次翔太、金子九美、山根篤大、竹内秀明、佐々木哲彦、久保健雄 (2016) 「ミツバチ脳の社会性行動を制御する候補遺伝子 *mKast* の発現解析と、機能解析に向けたゲノム編集法確立の試み」日本昆虫学会第 76 回大会 (3 月 26 日~29 日、大阪府立大学、大阪府堺市)

宇賀神篤、内山博允、宮田徹、佐々木哲彦、矢嶋俊介、小野正人 (2015)「ミツバチにおけるセリン/スレオニンキナーゼをコードする新規初期応答遺伝子の解析」第38回日本分子生物学会(12月1日~12月4日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市)

池田隆、内山郁夫、佐々木哲彦、升井伸治 (2015)「異種生物を利用した新規遺伝子機能解析系」日本動物学会第86回新潟大会(9月17日~19日、新潟コンベンションセンター、新潟県新潟市)

久保健雄、佐々木哲彦 (2015)「ミツバチのダンスコミュニケーションの分子・神経基盤解析に向けたゲノム編集の試み」日本動物学会第86回新潟大会(9月17日~19日、新潟コンベンションセンター、新潟県新潟市)

宇賀神篤、松尾晃史朗、久保良平、佐々木哲彦、小野正人 (2015)「クロマルハナバチのジナンドロモルフに関する解析」日本動物学会第86回新潟大会(9月17日~19日、新潟コンベンションセンター、新潟県新潟市)

坂本典洋、佐々木哲彦 (2015)「セイヨウミツバチの下咽頭腺と脳のメチローム解析」日本応用動物昆虫学会第59回大会(3月26日~28日、山形大学、山形県山形市)

宇賀神篤、佐々木哲彦、小野正人 (2015)「クロヤマアリ帰巣個体における初期応答遺伝子を利用した脳内神経活動の解析」日本応用動物昆虫学会第59回大会(3月26日~28日、山形大学、山形県山形市)

池田隆、内山郁夫、重信修治、佐々木哲彦、升井伸治 (2015)「異種生物を利用した新規遺伝子機能解析系の開発」(3月26日~28日、山形大学、山形県山形市)

Sakamoto H, Ogata N and Sasaki T (2014) Epigenetics of brain development in workers of the European honeybee, *Apis mellifera*. The 17th International Congress of International Union for the Study of Social Insects (July 13-18, Cairns, Australia)

坂本典洋、緒方法親、佐々木哲彦 (2014)「セイヨウミツバチ働きバチの脳におけるDNAメチル化解析」日本応用動物昆虫学会第58

回大会(3月26日~28日、高知大学、高知県高知市)

[その他]

ホームページ等
玉川大学佐々木哲彦研究室
<http://www.tamagawa.jp/graduate/brain/staff/labs/sasaki.html>

玉川大学ミツバチ科学研究センター
http://www.tamagawa.ac.jp/research/honey/contents/hsrc_top.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木哲彦 (SASAKI, Tetsuhiko)
玉川大学・学術研究所・教授
研究者番号: 60235257

(4) 研究協力者 (5名)

坂本洋典 (SAKAMOTO, Hironori)
宇賀神篤 (UGAJIN, Atsushi)
池田隆 (IKEDA, Takashi)
小野正人 (ONO, Masato)
久保健雄 (KUBO, Takeo)