

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14774

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を用いた微小脳学習システムの解析

研究課題名(英文)Analysis of learning systems in the insect microbrain by genome editing

研究代表者

水波 誠 (Mizunami, Makoto)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：30174030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はCRISPR/Cas9法を用いて標的遺伝子をノックアウトしたフタホシコオロギ作成技術を確立し、学習・記憶メカニズム研究を加速させることである。Dop1ドーパミン受容体遺伝子のノックアウト個体を用いた研究により、Dop1は仲間の行動を罰と結びつける罰性の社会学習に関わることがわかった。一方、OA1オクトパミン受容体のノックアウト個体作成を試みたが十分な成果は得られなかった。また遺伝子ノックアウト実験の前段階としてRNAiによってAC1、AC8アデニル酸シクラーゼ、FoxP転写抑制因子の遺伝子発現をノックダウンする実験を行い、これらの分子の学習・記憶への関与について新規知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish techniques to knockout specific genes by using CRISPR/Cas9 methods in the cricket *Gryllus bimaculatus* to accelerate the study of molecular mechanisms of learning and memory. We found, at first, that knockout of Dop1 dopamine receptor gene resulted in impairment of social learning to learn aversive stimulus from the behavior of a conspecific but social learning to find rewarding stimulus by social learning was intact. The results suggest that Dop1 transmit reinforcement signals in aversive social learning. Next, we attempted to establish knockout cricket line with OA1 octopamine receptor but we were not yet successful. In addition, we performed RNAi studies to knockdown genes that code AC1 and AC2 adenylyl cyclase and FoxP transcription repressor. Unexpectedly, no defects in olfactory learning were found in AC1 or AC8 knockdown crickets. It was also unexpected that FoxP knockdown crickets exhibited impairments in long-term memory formation.

研究分野：神経行動学

キーワード：昆虫 オクトパミン ドーパニン 連合学習 社会学習 コオロギ RNA干渉

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、高度な学習能力をもつフタホシコオロギやワモンゴキブリを材料に、昆虫微小脳における学習・記憶とそのメカニズムについての研究を主に行動薬理学的な方法を用いて進め、コオロギの条件付けにおいてオクトパミンニューロンが報酬情報を運びドーパミンニューロンが罰情報を運ぶこと、コオロギの条件付けが哺乳類と同様に「予期誤差学習理論」で説明できること、コオロギには他個体の行動を観察し特定の刺激(匂い)を罰や報酬と結びつけて学習する社会学習の能力があることなどを示すなど、先駆的な成果をあげてきた。それらの研究の更なる展開のためには、学習・記憶において鍵となる役割を果たす分子の研究が必須であり、RNAiによる遺伝子機能ノックダウン、およびCRISPR/Cas9法を用いた遺伝子ノックアウトの技術を用いたコオロギ学習研究を立ち上げてきた。しかし遺伝子ノックダウン、ノックインの成功率は必ずしも十分ではなく、研究進展を阻害する要因となっている。コオロギ遺伝子発現制御の技術を確立させることが現在の大きな課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、フタホシコオロギの遺伝子ノックアウト、ノックインの技術を確立し、それらの技術を用いて作成した遺伝子改変個体を用いた学習、記憶メカニズムの解析を進展させることである。具体的には、CRISPR/Cas9法を用いた遺伝子ノックアウト、ノックインの実験法の確立を目指すとともに、その準備段階としてRNAi法を用いた遺伝子発現阻害実験についても並行して進める。それらにより遺伝子改変技術と行動学、行動薬理学とを組み合わせた新たな学習・記憶メカニズムの研究に新たな道を拓きたい。

### 3. 研究の方法

第一に、報酬学習に関わることが示唆されているオクトパミン受容体 *OA1* のノックアウトコオロギをCRISPR/Cas9法を用いて作成する。コオロギゲノム情報から *OA1* 遺伝子に特異的な20塩基配列を選んでクリスパーRNAの設計に用い、それを組み込んだガイドRNAを合成する。コオロギの卵にCas9 mRNAとガイドRNAをインジェクションし、孵化した幼虫を育ててヘテロ接合の変異個体を選抜、それらを交配してホモ接合の変異系統を得る。

第二に、ドーパミン受容体 *Dop1* についても同様なノックアウト個体作成を行うが、すでにノックアウトに成功した個体を得ており、新規作成するノックアウト個体に加え、それらの個体も実験に利用する。

上記の実験と並行し、遺伝子ノックアウト個体作成のための基礎データを得る目的で、2重鎖RNAを用いたRNAi法を用いた遺伝子ノックダウンの研究を進め、高い効率の遺伝子ノックダウンを実現するための条件を探

る。ノックアウトコオロギ系統の作成には数回の交配が必要で最短でも1年近くかかるので、最適の実験条件を探る試行錯誤の余地が少ない。一方、RNAi法は遺伝子発現阻害が不完全との欠点はあるが、注入後数日で結果が得られるので、遺伝子ノックアウトのための実験条件探索には非常に有効である。2重鎖RNAは成虫コオロギの頭部血リンパ中に注入し、2日または3日後に学習訓練を行う。翌日に記憶テストを行った後にコオロギの脳からmRNAを抽出し、目的遺伝子の脳内発現レベルが、コントロール遺伝子のmRNAを注入した対照群と比べてどの程度低下しているかをmRNA定量により確認する。

### 4. 研究成果

*Dop1* ドーパミン受容体ノックアウトコオロギを用い、*Dop1* がコオロギの社会学習に果たす役割を解析した。研究代表者のこれまでの研究により、オクトパミンニューロンおよびドーパミンニューロンが条件付けにおいてそれぞれ報酬、および罰の情報を運ぶこと、また罰の情報の伝達には *Dop1* ドーパミン受容体に関わることがわかっている。またコオロギは同種他個体が水場にいると水場の匂いを水と結びつける報酬性の社会学習を示すこと、しかし水場に同種他個体の死体があると、その水場の匂いを避けるようになる罰性の社会学習の能力があることもわかっている。今回の研究の結果、新たに *Dop1* ノックアウトコオロギでは、前者の報酬性社会学習は正常にできるが、後者の罰性社会学習はできないことが明らかになった。これは社会学習を成立させる仕組みとして、条件付けのためのニューロン機構がそのまま用いられていることを初めて示唆するもので、社会学習の神経基盤について新規な知見をもたらす成果であった。

コオロギの条件付けにおいて報酬情報の伝達に関わることが示唆されている *OA1* オクトパミン受容体のノックアウト個体のCRISPR/Cas9法を用いた作成を数度にわたって試みたが、変異コオロギ系統の確立には至らなかった。ターゲット配列の見直し、卵へのインジェクション技術の改善などは図ったが、研究期間中には、目的の成果は得られなかった。更に現在も研究継続中である。

RNAi法を用いて *AC1* 及び *AC8* アデニル酸シクラーゼのノックダウンコオロギを作成し、それらの酵素の学習への関与について解析した。アデニル酸シクラーゼは学習に深く関わる酵素で、コオロギには8つのアイソフォームがある。そのうち *AC1* と *AC8* は、カルシウム/カルモジュリンとGタンパク質の両方によって活性化されるという性質があり、これらの分子はショウジョウバエやアメフラシの古典的条件付けにおいては条件刺激と無条件刺激が同時に到達したことを検知する分子として働くことが報告されている。しかし私たちのコオロギでの行動薬理学的な解析

の結果は、上記の報告と必ずしも一致しなかった。そこで RNAi 法を用いて AC1 及び AC8 アデニル酸シクラーゼ遺伝子のノックダウンコオロギの作成し、匂いと水の連合学習への影響について調べた。その結果、これらのコオロギは学習障害を示さないという予想外の結果が得られた。

それらに加えて FoxP (Forkhead box P) と呼ばれる転写制御因子の機能解析を行った。この遺伝子は哺乳類や鳥類において音声学習に関わる遺伝子であるが、コオロギもその遺伝子を持っており、その役割が注目される。RNAi を用いて FoxP 遺伝子の発現をノックダウンすると、匂いと水の連合学習において長期記憶形成に障害が起こることが明らかになった。学習そのものは正常に起こり、また中期記憶も正常であった。更に CRISPR/ Cas9 法を用いた FoxP 遺伝子ノックアウトコオロギの作成の準備実験にも着手している。

CRISPR/ Cas9 法を用いた遺伝子ノックインのための検討を進めたが、クリアすべき技術的な問題があり、必要な実験条件を確立させるには至らなかった。

#### 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6件)

1 Terao K, Mizunami M. (2017) Roles of dopamine neurons in mediating the prediction error in aversive learning in insects. *Sci. Rep.* 7:14694. doi: 10.3389/fphys.2017.01027. 査読有

2 Katoh K, Iwasaki M, Hosono S, Yoritsune, A, Ochiai M, Mizunami M, Nishino H. (2017) Group-housed females promote asexual ootheca production in American cockroaches. *Zool. Lett.* 3:3. doi: 10.1186/s40851-017-0063-x. 査読有

3 Takahashi N, Katoh K, Watanabe H, Nakayama Y, Iwasaki M, Mizunami M, Nishino H. (2017) Complete identification of four calycal giant interneurons supplying mushroom body calyces in an insect brain. *J. Comp. Neurol.* 525:204-230. doi: 10.1002/cne.24108. 査読有

4 Mizunami M, Matsumoto Y. (2017) Roles of octopamine and dopamine neurons for mediating appetitive and aversive signals in Pavlovian conditioning in crickets. *Front. Physiol.* 8, 1027. doi: 10.3389/fphys.2017.01027. 査読有

5 Mizunami M, Matsumoto C-S, Matsumoto Y. (2017) Searching for cognitive processes underlying insect learning. *Jap. J. Anim. Psychol.* 67, 1-10. doi: 10.2502/janip.67.1.5. 査読有

6 Hosono S, Matsumoto Y, Mizunami M. (2016) Interaction of inhibitory and

facilitatory effects of conditioning trials on long-term memory formation. *Learning & Memory* 23:669-678. doi: 10.1101/lm.043513.116. 査読有

[学会発表](計10件)

1 水波誠, コオロギ古典的条件付けにおける習慣形成、シンポジウム講演、ConBio2017, 2017年12月7日(招待講演)

2 Li Yaolong, Takayuki Watanabe, Makoto Mizunami, Roles of a transcription factor FoxP in olfactory learning in cricket. 日本比較生理生化学会、2017年11月25日、福岡大学、福岡市

3 Hiroki Ebina, Makoto Mizunami, Contrasting social learning with live and dead conspecifics in cricket. 日本比較生理生化学会、2017年11月24日、福岡大学、福岡市

4 Makoto Mizunami, Habit formation by extended Pavlovian training in crickets. Naito Conference on decision making in the brain, October 3-6, 2017, Sapporo, Chateraise Gateaux Kingdom

5 水波誠. コオロギの学習研究から何を学ぶか? 日本分子生物学会、2016年12月2日、パシフィコ横浜、横浜市(シンポジウム招待講演)

6 Makoto Mizunami. Searching for cognitive processes involved in insect learning. 日本動物心理学会、2016年11月24日、北海道大学、札幌市(シンポジウム招待講演)

7 Hiroki Ebina and Makoto Mizunami, Different social learning from live and dead conspecifics in crickets. International Congress of Zoology, Nov.17 2016. Okinawa Convention Center, Ginowan, Okinawa,

8 Satomi Katata, Takayuki Watanabe, Taro Mito, Makoto Mizunami, The role of type I adenylyl cyclase AC1 in cricket learning. International Congress of Zoology, Nov.17 2016. Okinawa Convention Center, Ginowan, Okinawa

9 Yoshitaka Hamanaka, Makoto Mizunami. Toward elucidation of neural mechanisms underlying aversive learning in insects. 日本比較生理生化学会、2016年9月4日、玉川大学、町田市、

10 Makoto Mizunami. Studies on structure and function of insect microbrain. 学会賞受賞講演(招待講演) 日本比較生理生化学会、2016年9月3日、玉川大学、町田市、

[図書](計4件)

1 水波誠 (2017) 「微小脳と巨大脳」(分担執筆) 『脳の神秘を探ってみよう 生命科学者 21人の特別授業』朝日新聞出版、pp. 14-23.

2 Matsumoto Y, Matsumoto CS and Mizunami M (2017) Chapter 17: Protocols of the study of learning and Memory. In: The Cricket as a Model Organism: Development, Regeneration, and Behavior. Eds. By Horch HW, Mito T, Popadic A, Ohuchi H, Noji S, Springer, Tokyo.pp.273-284.

3 Mizunami M and Matsumoto Y (2017) Chapter 9: Learning and Memory; In: The Cricket as a Model Organism: Development, Regeneration, and Behavior. Eds. By Horch HW, Mito T, Popadic A, Ohuchi H, Noji S, Springer, Tokyo.pp. 129-140.

4 Taya M, Vonkenburgh EV, Mizunami M, Nomura S. (2016) Bioinspired Actuators and Sensors, Cambridge Univ Press.総ページ数 523 ページ

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

報道関係情報（計 8 件）

1 朝日新聞、「ゴキブリ産卵 促す仲間」  
2017 年 3 月 30 日

2 The Wall Street Journal, Study nods to mystery of roaches. March 21, 2017.

3 Japan Times、online、Cockroach longevity linked to female cohabitation.  
2017 年 3 月 16 日

4 毎日新聞、「愛なくたって生き抜く ゴキブリ雌 3 匹で繁殖加速。2017 年 3 月 15 日朝刊

5 毎日新聞、「ゴキブリ 繁殖に雄いらず 雌 3 匹以上で単為生殖促進。2017 年 3 月 13 日夕刊

6 毎日新聞、コラム「余禄」にて「昆虫-驚異の微小脳、中公新書、水波誠著」を引用。  
2017 年 3 月 1 日朝刊

7 NHK ニュース、急増！「ゲノム編集」課題は 2016 年 11 月 25 日 19 時 4 分より。実験取材とインタビュー

8 NHK ニュース、ゴキブリの脳の抑制性ニューロンの働きについて報道、2016 年 11 月 2 日の 18 時 30 分より。

アウトリーチ活動（計 2 件）

1 動物学会北海道支部会高校生オープンラボへの参加、2017 年 8 月 26 日、北海道大学、

2 バイオミメティクス・市民セミナー、昆虫の学習と微小脳：ヒトの脳のしくみとは違うのか？2017 年 2 月 4 日、北海道大学総合博物館、札幌。

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・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

(4) 研究協力者 なし