

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15839

研究課題名（和文）ノックイン法によるミツバチのキノコ体細胞タイプ特異的な遺伝子操作の実現と機能解明

研究課題名（英文）Development of a knock-in method and functional analysis of Kenyon cell subtypes in the mushroom bodies of the honey bee.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミツバチの社会性行動制御と関連する脳領域として、昆虫脳の高次中枢であるキノコ体に着目した研究が行われてきた。ミツバチのキノコ体は、異なる遺伝子が発現する複数のケニヨン細胞サブタイプから構成されることが分かっているが、各サブタイプの行動制御における機能は不明である。本研究では、細胞種特異的な遺伝子操作を実現するために、ゲノム編集法を用いたノックイン法の確立を試みた。また、サブタイプ選択的に発現する遺伝子のノックアウト個体の解析、および各サブタイプの投射パターンや網羅的遺伝子発現プロファイルを同定し、各サブタイプの機能・生理特性の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミツバチは社会性行動研究のモデル生物として研究されてきたが、その行動特性から遺伝子操作を行うことが長年難しく、いまだ細胞種特異的な遺伝子発現制御がなされた例は無い。本研究は予備的ながら初めてノックイン法の有効性を示した。加えて、継代によるノックアウト働き蜂の作出に初めて成功しており、ミツバチの行動遺伝学に大きく貢献する成果と考える。また、行動進化と関連することが示唆されているキノコ体の生理特性の一端を解明したことで、今後社会性段階の異なるハチ目昆虫との比較解析により、社会性と関連する脳基盤の発見に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mushroom bodies, a higher center of the insect brain, have been studied as a brain region related to social behaviors in the honey bee. The honey bee mushroom bodies are composed of several Kenyon cell subtypes, each of which has distinct gene expression profiles. However, the function of each subtype in behavioral regulation remains to be elucidated. This study tried to establish a knock-in method using CRISPR/Cas9 to realize cell type-specific gene manipulation. I also analyzed functions of the gene which is selectively expressed in a certain subtype by producing its knockout mutants, and identified projection patterns and comprehensive gene expression profiles for each Kenyon cell subtype to reveal some of the functional and physiological characteristics of each subtype.

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*) 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、遺伝子発現プロファイルが異なる4種類のサブタイプ(3種類のクラスIケニヨン細胞と1種類のクラスIIケニヨン細胞)が存在し、各サブタイプが異なる脳機能に関わる可能性が示唆されている(図1)。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選択的に発現する遺伝子の他生物種における機能からの推測に留まっている。

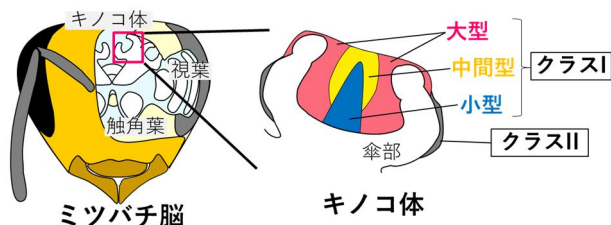


図1 ミツバチ脳とキノコ体の模式図。ケニヨン細胞の細胞体は樹状突起からなる傘部の内側に存在する。

申請者らは、技術的制約を解消するために、世界に先駆けてミツバチにゲノム編集法 CRISPR/Cas9 を適用し、変異体作出法を開発してきた(Kohno *et al.*, *Zool. Sci.* 2016, Kohno and Kubo *Sci. Rep.* 2018)。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が、ハチ目昆虫の行動の複雑化に伴って増加していることを示唆した(Oya *et al.*, *Sci. Rep.* 2017)。しかし、ミツバチでは特定の細胞でのみ遺伝子操作する手法が存在せず、どのような生理的特性をもつ神経細胞の獲得が行動進化に繋がったかは不明である。さらに、ミツバチのキノコ体が行動制御においてどのように機能分担しているかについても不明点が多い。

申請者らは、技術的制約を解消するために、世界に先駆けてミツバチにゲノム編集法 CRISPR/Cas9 を適用し、変異体作出法を開発してきた(Kohno *et al.*, *Zool. Sci.* 2016, Kohno and Kubo *Sci. Rep.* 2018)。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が、ハチ目昆虫の行動の複雑化に伴って増加していることを示唆した(Oya *et al.*, *Sci. Rep.* 2017)。しかし、ミツバチでは特定の細胞でのみ遺伝子操作する手法が存在せず、どのような生理的特性をもつ神経細胞の獲得が行動進化に繋がったかは不明である。さらに、ミツバチのキノコ体が行動制御においてどのように機能分担しているかについても不明点が多い。

2. 研究の目的

ミツバチの各ケニヨン細胞サブタイプの行動制御における機能分担を検証するためには、細胞種特異的な遺伝子操作が必要である。そこで、本研究ではまずミツバチにおいてゲノム編集法を利用したノックイン法を確立することを目的とした。また、これまでにミツバチでは継代飼育によるノックアウト働き蜂の作出は報告されていないことから、「中間型」ケニヨン細胞サブタイプ選択的に発現する *mKast* のノックアウト働き蜂の作出を行い、*mKast* が関わる行動の同定を目指した。将来的には、*mKast* などの既に同定されている各サブタイプのマーカー遺伝子を有効利用し、ノックインによるサブタイプ選択的な遺伝子操作を実現することで、行動制御における機能が明らかになると期待される。また、並行して、各サブタイプの網羅的な遺伝子発現プロファイルと投射パターンを同定することで、各サブタイプの生理機能の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミツバチにおけるノックイン手法の検討

ゲノム編集法を用いたノックイン手法が様々な生物種で報告されている。そこで、これまで確立してきたミツバチにおけるゲノム編集法を用い、ノックイン法の確立を目指した。ドナーDNAを Cas9 タンパク質と sgRNA と共に受精卵にインジェクションし、ゲノムへの挿入の有無を F0 世代から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR により確認した。また、有効性を確認できたドナーDNAについて、インジェクションに用いる DNA 濃度や、産卵からインジェクションするまでの経過時間などを検討し、よりノックイン効率が高い条件を同定した。この条件でインジェクションした個体からタンパク質を抽出し、ドナーDNA 由来のタンパク質が検出されるかを Immunoblot により調べた。

(2) ゲノム編集法による *mKast* ノックアウト変異体働き蜂の作出

インジェクションした個体に高効率に変異導入できるインジェクション条件を適用し、ほぼ100%の細胞がゲノム編集されている女王蜂(F0)を作出した。この女王蜂に CO2 麻酔を施すことで未受精卵産卵を誘導し、変異雄蜂(F1)を作出した。変異雄蜂(F1)由来の精子と、変異体女王蜂(F0)を人工授精することで、*mKast*^{-/-}変異体働き蜂を作出した。

(3) シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq) 解析による各サブタイプの網羅的遺伝子発現プロファイルの同定

働き蜂(育児蜂、採餌蜂)と女王蜂のキノコ体を摘出し、酵素処理により細胞分離した。細胞懸濁液と 10x genomics の chromium を用いてライブラリを調製し、次世代シーケンサーでシーケンシングを行った。なお、これらは「先進ゲノム支援」のご支援により実施した。取得したデータを Cell Ranger および Seurat により解析した。

(4) 神経トレーサーを用いた各サブタイプの投射パターンの解析

氷冷麻酔した働き蜂の頭部クチクラを切開して脳を露出させ、神経トレーサーを充填したガ

ラスキャピラリーをキノコ体に刺入してトレーサーを微量注入した。数時間後に脳を摘出して固定し、薄切した脳切片を用いて各サブタイプでの発現量が異なる遺伝子 *jhdk* の FISH を行った。*jhdk* の FISH とトレーサーの蛍光シグナルを観察し、各サブタイプの形態を同定した。

4. 研究成果

(1) ミツバチにおけるノックイン手法の検討

いくつかの種類のドナーDNA のそれぞれを、Cas9 タンパク質と sgRNA と共に受精卵にインジェクションしたところ、一本鎖 DNA を用いた場合においてノックイン配列の PCR 増幅が確認された(図2)。これらの増幅バンドは、コントロールとして Cas9 タンパク質を抜いてインジェクションした個体では検出されなかったことから、ノックインが生じていると考えられる。また、インジェクション部位や産卵後の時間、インジェクションするドナーDNA 濃度を検討することで、より高効率でノックインが生じた場合の PCR バンドが検出される条件を決定した。

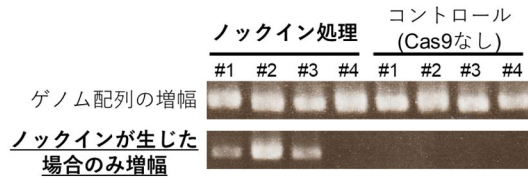


図2 一本鎖DNAをドナーとしたノックインの有効性検証結果。各個体から抽出したDNAを鋳型としたPCRによりドナーDNA由来の配列が増幅されるかを調べた。

ドナーDNA 由来の配列が発現しているかを調べるために、ノックインによって標的遺伝子の末端に HA タグが付加されるように設計したドナーDNA を用いてノックイン処理を施し、F0 個体から抽出したタンパク質を用いて Immunoblot を行った。しかし、これまでにタンパク質レベルではノックインの有効性を確認できていない。この原因として、ノックイン効率が不十分(細胞数、標的遺伝子の発現細胞にノックインが生じていない)な可能性や、標的遺伝子へのノックイン処理により胚致死になってしまっている可能性が考えられる。今後さらなる条件検討により実用化を目指す。

(2) ゲノム編集法による *mKast* ノックアウト変異体働き蜂の作出

mKast を標的としたゲノム編集処理により、ほぼ 100% の細胞に変異導入された女王蜂を作出し、これら F0 女王蜂由来の変異雄蜂と、F0 女王蜂を人工授精することで、継代飼育によるノックアウト働き蜂の作出に初めて成功した。これら *mKast*^{-/-}働き蜂を用いて嗅覚・視覚連合学習を行ったところ、野生型と比べて差は無く、*mKast* や中間型ケニヨン細胞は単純な記憶学習には機能しない可能性が示唆された。大型サブタイプが記憶学習において機能することが示唆されていたことから、ミツバチでは大型サブタイプが(単一の感覚情報の)記憶学習に専門化した役割をもつように機能分担している可能性がある。

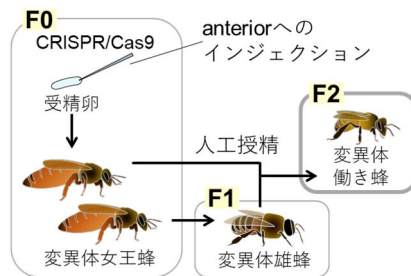


図3 *mKast*^{-/-}変異体働き蜂の作出

(3) シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq) 解析による各サブタイプの網羅的遺伝子発現プロファイルの同定

育児蜂、採餌蜂、女王蜂のキノコ体の scRNA-seq 解析を行い、既知のサブタイプマーカー遺伝子の発現パターンをもとに各細胞がどのサブタイプに属するか分類した。各サブタイプに属する細胞クラスターにおいて特異的に発現する遺伝子を網羅的に同定することができ、エンリッチメント解析によりこれら遺伝子の機能が推測された。また、カースト間で構成細胞種に明確な差が無いことが分かった。

(4) 神経トレーサーを用いた各サブタイプの投射部位の解析

ケニヨン細胞は、キノコ体の傘部と呼ばれる領域に樹状突起を伸ばし、感覚中枢等からの入力を受け取る。また、柄部を通して medial lobe と vertical lobe に軸索を伸ばす。これまでに、一次感覚中枢である触角葉と視葉からの投射ニューロンが、傘部の異なる領域に入力することが知られていた。そこで、キノコ体の傘部または vertical lobe に双方向性の神経トレーサーを微量注入して少数のケニヨン細胞を染色して形態を明らかにし、さらに *jhdk* の FISH によりトレーサーを取り込んだ細胞がどのサブタイプかを判別した。これにより、各サブタイプが入力を受ける感覚情報が明らかになり、初めて神経回路の側面から各サブタイプの機能を示唆できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takayoshi Kuwabara, Hiroki Kohno, Masatsugu Hatakeyama, Takeo Kubo	4. 巻 9
2. 論文標題 Evolutionary dynamics of mushroom body Kenyon cell types in hymenopteran brains from multi-functional type to functionally specialized types.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd4201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.add4201	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 Matsumura Y, To T K, Kunieda T, Kohno H, Kakutani T, Takeo Kubo T	4. 巻 12
2. 論文標題 Mblk-1/E93, an ecdysone related-transcription factor, targets synaptic plasticity-related genes in the honey bee mushroom bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-23329-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 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 2020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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroki Kohno, Takeo Kubo
2. 発表標題 Identification of the pupal stages at which three Kenyon cell subtypes are generated in the mushroom bodies of the honey bee
3. 学会等名 日本発生生物学会第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Kohno, Takeo Kubo
2. 発表標題 Functional analyses of mKast by producing knocked out worker honey bees using CRISPR/Cas9
3. 学会等名 IUSS12022 19th Congress of the International Union for the Study of Social Insects (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayoshi Kuwabara, Hiroki Kohno, Masatsugu Hatakeyama, Takeo Kubo
2. 発表標題 Analysis and exploration of Kenyon cells increased with behavioral evolution in hymenopteran insects
3. 学会等名 IUSS12022 19th Congress of the International Union for the Study of Social Insects (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原嵩佳、河野大輝、久保健雄
2. 発表標題 ミツバチのダンスコミュニケーションに関わる神経細胞種の探索 ~ミツバチとマルハナバチの脳高次中枢の比較scRNA-seq解析~
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原嵩佳、河野大輝、畠山正統、久保健雄
2. 発表標題 行動を司る脳進化の謎へ切り込む ~シンプルな脳を持つハチ目昆虫の種間比較解析より~
3. 学会等名 第7回ユニーク会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Kohno, Takeo Kubo
2. 発表標題 Functional analyses of mKast, which is preferentially expressed in middle-type Kenyon cells in mushroom bodies of the honey bee, by producing knocked-out workers
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院理学系研究科プレスリリース 「ハチ目における脳神経細胞の進化動態の解明 多機能型から機能特化型へ」 https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2023/8416/</p>

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