

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370032

研究課題名(和文) ミツバチ働き蜂の行動と生理状態を連動して制御する内分泌・神経機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the endocrine and neural mechanisms that synergistically regulate the behavior and physiology of the worker honeybees.

研究代表者

久保 健雄 (Kubo, Takeo)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10201469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ミツバチの社会性行動の基盤となる脳神経機構と生理機構の解明を目指した。その結果、脳高次中枢(キノコ体)を形成する大型ケニヨン細胞の細胞特性を明らかにすると共に、新規な「中間型」ケニヨン細胞を発見した。また、採餌蜂では小型ケニヨン細胞と一部の「中間型」ケニヨン細胞が興奮していること、さらにオオスズメバチに対する「熱殺蜂球」を形成しているニホンミツバチの脳では、クラスIIケニヨン細胞が興奮していることを示した。一方、若い働き蜂(育児蜂)が分泌するローヤルゼリーが、3種類の外分泌腺由来のタンパク質の「カクテル」であり、他個体の生理状態に影響しうる細胞増殖因子を含むことを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to unveil brain neural mechanisms and physiological mechanisms that underlie the honeybee social behaviors. Here, we unveiled novel cellular characteristics of the large-type Kenyon cells (KCs) and identified novel 'middle-type' KCs, both of which compose the mushroom bodies, a higher brain center. The neural activities of the small-type and some 'middle-type' KCs are enhanced in the foragers, whereas those of the class II KCs are enhanced in the Japanese worker honeybees that are forming a 'hot defensive bee ball' against the hornets. Furthermore, we showed that the royal jelly that is secreted from young workers (nurse bees) is a cocktail of secretory proteins derived from three exocrine glands and contains cell growth factors that may affect physiological status of the other nest mates.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：ミツバチ 脳 キノコ体 ケニヨン細胞 採餌行動 外分泌 ローヤルゼリー 細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

ミツバチは社会性昆虫であり、働き蜂は羽化後の日齢に伴い、育児から採餌へと年齢分業する。さらに採餌蜂は餌の在処を「ダンスコミュニケーション」により仲間に伝達する。申請者はこうしたミツバチの高次行動を司る分子・神経的基盤を明らかにする目的で、これまでミツバチ脳の「分子的解剖(脳領野選択的、行動依存的に発現する遺伝子の同定)」を実施し、

- (1) 高次中枢(キノコ体)を構成する大型と小型のケニオン細胞が、異なる遺伝子発現プロファイルを持ち、機能分担(大型=記憶・学習、小型=分業制御)する可能性を指摘した。さらに大型と小型のケニオン細胞の境界域に、固有の遺伝子発現プロファイルをもつ「中間型ケニオン細胞」を新たに発見した[未発表]。
- (2) 新規な初期応答遺伝子 *kakusei* の発現を指標に、採餌蜂脳ではキノコ体の中央部のケニオン細胞が興奮していることを示した。このことから、小型+中間型ケニオン細胞が採餌飛行時の情報処理に関わる可能性を指摘した。
- (3) 働き蜂脳ではエクダイソン制御系・情報伝達系遺伝子 (*EcR* や *HR38*, *E74*, *E75*, *BR-C*, *E93/Mblk-1*) がキノコ体選択的に発現することを見出し、キノコ体の神経機能がエクダイソン情報伝達系により制御される可能性を指摘した。

以上の知見は、ミツバチではケニオン細胞が、遺伝子発現プロファイルで区別される機能的モジュールを形成すること、その機能がエクダイソン情報伝達系で制御される可能性を示唆している。

一方、働き蜂の生理状態は分業に伴い、劇的に変化する。下咽頭腺は頭部分泌腺であり、育児蜂では発達して幼虫の餌となるローヤルゼリーの主要タンパク質成分(MRJP)を合成するが、採餌蜂では退縮し、花蜜をハチミツに加工する α -グルコシダーゼなどの糖代謝酵素を合成する。

最近、申請者らは採餌蜂の下咽頭腺ではエクダイソン情報伝達系の機能が亢進しており、エクダイソンの注射により、育児蜂下咽頭腺で選択的に発現する遺伝子(*mrjp* と *buffy*)の発現が抑制される一方で、採餌蜂下咽頭腺で選択的に発現する遺伝子(α -グルコシダーゼと *MMP1*)の発現には影響しないことを見出した。

これまで、幼若ホルモン(JH)が働き蜂の分業の「ペースメーカー」として機能することが知られていたが、この知見は働き蜂の分業における生理状態の変化が、エクダイソンとJHの協調的作用によって生じることを、世

界で初めて示唆するものである。この知見と、前頁のキノコ体におけるエクダイソン制御系・情報伝達系の遺伝子発現に関する知見を総合すると、働き蜂の分業においては、エクダイソンとJHの両者が働き蜂の行動と生理状態を連動して制御する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ミツバチは社会性昆虫であり、そのコロニーは全体として一個体のように振る舞うので「超個体」とも呼ばれる。これはコロニーの中で各個体が固有の役割と生理状態をもつことで実現される。本研究ではミツバチ働き蜂の年齢分業において、働き蜂の生理状態が内分泌系によりどのように調節されるか調べると共に、ミツバチの社会性行動に関連する脳高次中枢(キノコ体)について、そのモジュール構造を構築する神経細胞サブタイプ(大型/中間型/小型ケニオン細胞)の性状(神経投射や遺伝子発現プロファイル)に内分泌系がどのように影響するか調べ、働き蜂の行動と生理状態を連動して制御する内分泌・神経機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ミツバチの働き蜂の分業においてはエクダイソンとJHの両者が働き蜂の行動と生理状態を連動して制御する可能性を検証するため、

- (1) 育児蜂にエクダイソンとJHを単独、さらに両者の混合比を変えて注射し、下咽頭腺での遺伝子発現を指標に、最も効率よく採餌蜂型の生理状態を誘導する条件を検討する。次いで、その条件で働き蜂の行動を観察し、ホルモン投与により、生理状態のみならず行動変化(分業)が生じたか調べる。
- (2) 働き蜂の育児から採餌への分業、エクダイソンやJH注射により、キノコ体の機能的モジュールを形成する3種のケニオン細胞の性状(神経投射パターンと遺伝子発現プロファイル)が変化するか調べる。
- (3) 遺伝子組換えミツバチを作出する目的で、ショウジョウバエで利用されているトランスポゾンの胚への顕微注入法を試みる。

4. 研究成果

平成24年度

- (1) 最初の課題に関して、脳の高次中枢(キノコ体)を形成する「大型ケニオン細胞」で小胞体の Ca^{2+} 輸送・蓄積に関わるタンパ

ク質の遺伝子が選択的に発現することを見いだした〔Uno *et al.*, *Insect Mol Biol* (2012)〕。私たちは既に大型ケニヨン細胞ではCa²⁺情報伝達系の遺伝子が選択的に発現することから「記憶・学習」の座である可能性を提示してきたが、本成果はその概念をさらに支持するのみならず、大型ケニヨン細胞では小胞体自体ではなく、そのカルシウム情報伝達系の機能が特異的に亢進していることを示唆した。

- (2) 天敵のオオスズメバチを取り囲んで熱で蒸し殺す「熱殺蜂球」を形成するニホンミツバチの脳ではキノコ体の「クラスIIケニヨン細胞」が選択的に活動していることを見いだした。この神経活動はニホンミツバチを単に高温に曝すだけで誘導されたことから、蜂球内温度を一定に保つ「サーモスタット」の役割を担うことを示唆した。論文はPLoS ONEに掲載され国内外のメディアで報道される等、大きな反響を呼んだ〔Ugajin *et al.*, *PLoS ONE* (2012)〕。
- (3) 2つ目の課題に関しては、働き蜂頭部の3つの外分泌腺のショットガンプロテオミクスを実施し、若い育児蜂が分泌するローヤルゼリー（RJ）が下咽頭腺だけでなく、3つの外分泌腺に由来する「カクテル」であることを示した。さらにRJには後脳腺や胸部唾液腺に由来する細胞増殖因子が含まれ、これを摂取した他個体の生理状態に影響する可能性を示唆するとともに、老齢の採餌蜂の後脳腺が脂質性フェロモンの合成器官であることを示唆した〔Fujita *et al.*, *J. Proteome Res.* (2012)〕。

平成 25 年度

- (1) 最初の課題に関して、ミツバチの脳領野選択的に発現する遺伝子の解析を通じて、私たちは、ミツバチの脳の高次中枢であるキノコ体が、従来考えられてきた「大型」と「小型」のクラスIケニヨン細胞に加えて、新規に同定した *mKast* (*middle-type Kenyon cell-preferential arrestin related protein*) を選択的に発現する「中間型」のクラスIケニヨン細胞から構成されることを見いだした。
- (2) 私たちがミツバチから同定した非翻訳性RNAをコードする初期応答遺伝子 *kakusei* を用いた解析から、餌を見つけて帰巢した働き蜂（採餌蜂）の脳では、「小型」ケニヨン細胞と一部の「中間型」ケニヨン細胞の神経活動が亢進していることが判明した〔Kaneko *et al.*, *PLoS ONE* (2013)〕
- (3) 上記は、やはり私たちがミツバチから同定した汎用性初期応答遺伝子 *Erg-1* を用

いた解析でも確認された〔Ugajin *et al.*, *FEBS Lett.* (2013)〕。以上の結果は、ミツバチの採餌飛行時には、これら2種類の性質の異なるケニヨン細胞が脳での感覚情報処理に関わることを示唆している。今後は、*mKast* などのケニヨン細胞サブタイプ選択的に発現する遺伝子を利用した遺伝子工学的手法を開発・利用することで、ミツバチの「航空術」のベースとなる神経機構の一端が明らかになると期待される。

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 6 件)

1. Ugajin, A., Kunieda, T., Kubo, T. (2013) Identification and characterization of an Egr ortholog as a neural immediate early gene in the European honeybee (*Apis mellifera* L.). *FEBS Lett.* **587**, 3224. DOI:10.1016/j.febslet.2013.08.014
2. Kaneko, K., Ikeda, T.*, Nagai, M.*, Hori, S.*, Umatani, C., Tadano, H., Ugajin, A., Nakakoka, T., Paul, R. K., Fujiyuki, T., Shirai, K., Kunieda, K., Takeuchi, H. and Kubo, T. (2013) Novel middle-type Kenyon cells in the honeybee brain revealed by area-preferential gene expression analysis. *PLoS ONE* **8**, e71732. *: equal contribution. DOI:10.1371/journal.pone.0071732
3. Kiya, T., Ugajin, A., Kunieda, T. and Kubo, T. (2012) Identification of kakusei, a nuclear non-coding RNA, as an immediate early gene from the honeybee, and its application for neuroethological study. *Intl. J. Mol. Sci.* **13(12)**, 15496-15509. DOI:10.3390/ijms131215496
4. Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Ao-Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M. and Kubo, T. (2012) Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *J. Proteomic Res.* **12(1)**, 404-411. DOI: 10.1021/pr300700e
5. Uno, Y., Fujiyuki, T., Morioka, M. and Kubo, T. (2012) Mushroom body-preferential expression of proteins/genes involved in endoplasmic reticulum Ca²⁺-transport in the worker honeybee (*Apis mellifera* L.) brain. *Insect Mol. Biol.* **22(1)**, 52-61. DOI: 10.1111/imb.12002
6. Ugajin, A., Kiya, T., Kunieda, T., Ono, M., Yoshida, T. and Kubo, T. (2012) Detection of neural activity in the brains of Japanese honeybee workers during the formation of a "hot defensive bee ball". *PLoS ONE* **7(3)**, e32902. DOI: 10.1371/journal.pone.0032902

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 宇賀神 篤、國枝 武和、久保 健雄 “セイヨウミツバチにおける *Egr-1* ホモログの同定と脊椎動物-昆虫間で保存された初期応答遺伝子としての性状解析” 第58回日本応用動物昆虫学会大会、高知 (平成26年3月26~28日)
2. Ugajin, A., Kunieda, T. and Kubo, T. Identification and characterization of an *Egr* ortholog in the European honeybee (*Apis mellifera* L.) as a conserved neural IEG in insects and vertebrates’ 第36回日本分子生物学会年会、神戸 (平成25年12月3~6日)
3. 末次翔太, 竹内秀明, 國枝武和, 久保健雄 Identification of three genes expressed highly selectively in the mushroom bodies in the European honeybee *Apis mellifera* L. brain. 日本動物学会 第84回 岡山大会、岡山大学 津島キャンパス (平成25年9月26~28日)
4. 宇賀神篤、國枝武和、小野正人、久保健雄 “初期応答遺伝子を利用したニホンミツバチとセイヨウミツバチにおける高温曝露時のキノコ体神経活動の解析” 第57回日本応用動物昆虫学会、藤沢 (平成25年3月27~29日)
5. 藤田俊之、秦裕子、近藤裕子、國枝武和、尾山大明、久保健雄 “セイヨウミツバチのローヤルゼリーとその由来外分泌腺のプロテオミクスを用いた解析” 第85回日本生化学会大会 福岡 (平成24年12月14~16日)
6. Fujita, T., Hata, K.-H., Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M. and Kubo, T. Functional characterization of hypopharyngeal gland and salivary glands of the worker honeybees by using proteomics. 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research, Contribution of proteomics technology in agricultural Sciences, Tsukuba, JAPAN Dec. 10, 2012.
7. 久保健雄 “ミツバチの社会性行動を生まみ出す脳と遺伝子の仕組み” “第2回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会、岐阜市ホテルグランベール岐山 (平成24年11月26日) (招待講演)
8. 宇賀神篤、木矢剛智、國枝武和、小野正人、吉田忠晴、久保健雄 “熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ脳内の神経興奮は高温情報処理を反映する” 日本昆虫学会第72回大会、町田 (平成24年9月15~17日)
9. Ugajin, A., Kiya, T., Kunieda, T., Ono, M., Yoshida, T. and Kubo, T. Neural activity in the brains of the Japanese worker honeybees involved in a hot defensive bee ball reflects thermal stimuli processing. 10th International

Congress of Neuroethology (ICN2012), Maryland University, Aug, 5-10, 2012.

10. Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M. and Kubo, T. Analysis of the royal jelly proteome and characterization of the functions of its derivation glands by using proteomics. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 神戸 (平成24年5月28~31日)
11. 宇賀神篤、木矢剛智、國枝武和、小野正人、吉田忠晴、久保健雄 “熱殺蜂球形成時のニホンミツバチ働き蜂の脳の神経興奮は高温情報処理を反映する” 第56回日本応用動物昆虫学会大会、奈良 (平成24年3月27~29日)
12. 久保健雄 “ミツバチの社会性行動を生まみ出す脳と遺伝子の仕組み” 第34回ミツバチ科学研究会玉川学園 玉川大学 (平成24年3月15日) (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

1. Shiota, Y. and Kubo, T. (2013) Ecdysteroids and Honeybee Social Behaviors. In: Hormones and Behavior (Ed: Simonsen, D.) eBook, NOVA Science Publishers., p.135-156.
2. Kubo, T. (2012) Neuroanatomical dissection of the honeybee brain based on temporal and regional gene expression patterns. In: Honeybee neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel (Eds: Galizia, C. G., Eisenhardt, D. and Giulfa, M.). Springer., p.341-357. DOI: 10.1007/978-94-007-2099-2

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/lab.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

久保 健雄 (KUBO, Takeo)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：10201469

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

竹内 秀明 (TAKEUCHI, Hideaki)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：00376534

國枝 武和 (KUNIEDA, Takekazu)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：10463879