

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291068

研究課題名(和文)ミツバチ脳で新規に発見された「中間型」ケニヨン細胞のダンス言語における機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the 'middle-type' Kenyon cells that were newly identified in the honeybee brain in dance communication

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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチ脳のキノコ体を構成するクラスIケニヨン細胞は、大型・中間型(mKastを発現)・小型の3つに分類される。本研究では、これらサブタイプの機能と進化の解析を行った。

1) その結果、mKastは成虫の様々な脳機能に關与することを示唆した。2) 世界で初めて、ミツバチでゲノム編集法を確立した。3) ケニヨン細胞サブタイプは、原始的なハバチ(1つ)から、寄生性のコマユバチ(2つ)、スズメバチ・ミツバチ(3つ)と増えており、行動進化と相關する可能性がある。

本研究結果は中間型ケニヨン細胞の生理機能の理解だけでなく、神経生物学一般の進展にも寄与する、国際的にも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The honeybee mushroom bodies comprise 4 subtypes of class I Kenyon cells (KCs): the large-, middle- and small-type KCs, of which middle-type KCs preferentially express mKast. In the present study, we analyzed the function and evolution of the KC subtypes.

1) mKast was suggested to be involved in various brain functions in adult honeybees. 2) We first succeeded to establish genome-editing technique in the honeybee. 3) The number of KC subtypes increased from 1 in the sawflies to 2 in the parasitic wasps and then 3 in the hornets and honeybees, suggesting its relationship with the evolution of behavioral traits in Hymenopteran insects.

Our findings are internationally of most importance, that contribute not only to the understanding of the function of middle-type KCs but also to the progress of neurobiology in general.

研究分野：動物生理化学

キーワード：ミツバチ 社会性行動 脳 キノコ体 ケニヨン細胞 ゲノム編集 mKast 系統進化

## 1. 研究開始当初の背景

ミツバチは尻振りダンスにより巣仲間へ餌場の情報を伝える。これは動物界でも珍しい記号的コミュニケーションの一例であるが、その分子・神経的基盤には不明な点が多い。代表者らは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、ミツバチ脳高次中枢であるキノコ体が、従来考えられていたクラス I の大型と小型、クラス II の 3 つのケニオン細胞に加え、機能未知の新規遺伝子 *mKast* を発現するクラス I 「中間型」の 4 つのケニオン細胞のサブタイプで構成されることを発見した [Kaneko *et al.* *PLoS ONE* (2013)]。また初期応答遺伝子を用いた解析から採餌蜂では主に、小型と一部の「中間型」ケニオン細胞が活動することを発見した。このことは、これら 2 種類のケニオン細胞サブタイプが採餌飛行時の視覚情報処理に関わることを示唆している。従って、これらケニオン細胞サブタイプの機能解析は、尻振りダンスの分子・神経基盤を理解する上で重要と考えられる。しかしながら *mKast* が「中間型」ケニオン細胞で果たす役割や、「中間型」ケニオン細胞が尻振りダンスなどのミツバチ社会性行動において、どのような機能をもつかについては不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では当初目的として、

- (1) 「中間型」ケニオン細胞の機能を推測する目的で、定量的 RT-PCR 法により、変態期の脳での *mKast* の発現変動と、成虫組織での *mKast* の組織特異的発現を調べる。また抗 *mKast* 抗体を用いた蛍光抗体法により「中間型」ケニオン細胞の神経投射を調べる。
- (2) *mKast* が「中間型」ケニオン細胞固有な分子的特徴を賦与する可能性を検証する目的で、*in vitro* 脳培養系を用いてエレクトロポレーション法により *mKast* を強制発現させた際に、大型や小型ケニオン細胞で選択的に発現する遺伝子が発現抑制されるか調べる。
- (3) 「中間型」ケニオン細胞がハチ目昆虫の進化のどの段階で出現したか調べる目的で、様々な社会性進化段階にあるハチを用いて、*mKast* の *in situ* ハイブリゼーションを行う。
- (4) 尻振りダンスを含めた社会性行動における遺伝子機能を調べる目的で *vivo* モルフォリノや RNAi 法による遺伝子の機能阻害実験に加え、TALEN 法や CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法の確立を試みる、ことを設定した。

このうち、(1)は達成目標に到達したが、(2)についてはエレクトロポレーション法と脳の培養系を組み合わせるプロモーターを同

定する実験系が稼働せず、途中で断念した。(3)についてはまだ完成してはいるが、非常に重要な知見が得られた。(4)については、*vivo* モルフォリノ法を試みたものの、効果的な遺伝子発現阻害は起きなかった。一方、世界で初めて CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子ノックアウト雄蜂の作出に成功した従って、以下の 3. 研究の方法と 4. 研究成果では研究項目(1)と(3)、(4)について述べる。

## 3. 研究の方法

(1) 定量的 RT-PCR 法により、変態期(幼虫後期、蛹中期、蛹後期)の働き蜂脳での *mKast* の発現変動と、成虫組織(脳、脳以外の頭部、胸部、腹部)での *mKast* の組織特異的発現を調べた。またリコンビナント *mKast* に対する特異抗体を作成し、働き蜂脳の凍結切片を用いて蛍光抗体法を行った。

(3) 「中間型」を含む、4 つのケニオン細胞サブタイプがハチ目昆虫の進化のどの段階で出現したか調べる目的で、4 種類の異なる進化段階のハチを用いて *tachykinin-related peptide (Trp)* の *in situ* ハイブリゼーション法を行った。*Trp* は 4 つのケニオン細胞サブタイプで発現強度が異なるので、この一つの発現解析を行うだけで、4 つのケニオン細胞サブタイプの有無を推測できる。用いたハチ目昆虫種は、原始的で植物食のルリチュウレンジハバチ (*Arge similis*)、寄生性のハマキコウラコマユバチ (*Ascogaeter reticulata*)、真社会性のオオスズメバチ (*Vespa mandarinia*)、ミツバチに近縁で営巣するが、社会性はもたないキンケハラナガツチバチ (*Campsomeris prismatica*)、の 4 種類である。

(4) CRISPR/Cas9 による雄蜂のゲノム編集は次のように行った。まず、女王蜂が産んだ受精卵にローヤルゼリー主要タンパク質 1 (MRJP1) 遺伝子を標的とする gRNA と Cas9 mRNA を注入し、奪女王蜂コロニーに導入して女王蜂に分化誘導させた。この女王蜂に一時的炭酸ガス麻酔を施すことにより、未受精卵産卵を誘導した。ハチ目昆虫では未受精卵が雄へと発生するので、羽化した雄蜂の遺伝子配列を読むことで、*mrjp1* がノックアウトされた雄蜂が作成できたか調べた。これらの過程は全て、研究科の機関審査で承認された P1A フライトルーム内で行った。

## 4. 研究成果

(1) 定量的 RTR-PCR の結果、*mKast* は蛹後期から発現を開始し、成虫体部では脳特異的に発現することが判明した。また蛍光抗体法の結果、*mKast* タンパク質はキノコ体の他、視

葉や触角葉、食道下神経節の一部の神経細胞にも局在し、成虫の様々な脳機能に関与することが示唆された [Yamane *et al.* *PLoS ONE* (2017) in press]。

(3) 真社会性のスズメバチと、ミツバチに近縁で営巣するが、社会性は持たないツチバチではミツバチ同様に、大型、「中間型」、小型の、3つのクラスIケニヨン細胞サブタイプが見出されたが、寄生蜂のコマユバチでは2つ、最も原始的で植物食のハバチでは1つのクラスIケニヨン細胞サブタイプしか、見出されなかった(コマユバチとハバチではクラスIとクラスIIサブタイプの区別も困難であった)。このことはハチ目昆虫の行動進化とケニヨン細胞サブタイプの数増加が相関した可能性を示唆している [Ohya *et al.* manuscript in preparation]。

(4) *mrjp1* に対する gRNA と Cas9 mRNA を注入した 57 個の受精卵から、6 匹の女王蜂が羽化し、この内の 2 匹が産卵した。産まれた雄蜂の *mrjp1* の配列を決定したところ、1 匹の女王蜂の産んだ雄蜂 161 匹の内、20 匹にゲノム編集が起きていた。雄蜂は核相 n であるため、変異型精子を用いて野生型女王蜂を人工授精させ、産まれたヘテロ変異体の女王蜂を再び変異型精子で人工授精させることでヘテロとホモ変異体の働き蜂を 1:1 の割合で得ることができる。後段のプロセスは従来の養蜂学の技術を用いて達成可能であるため、今回、ミツバチにおけるゲノム編集の基礎技術が確立できたと判断した [Kohno *et al.* *Zool. Sci.* (2016)]。

この他に、以前に同定されていた、成虫脳でキノコ体全体に選択的に発現する *PLCe* と、大型ケニヨン細胞に選択的に発現する *Syt14* と *dIg5* について、発生過程の脳での発現変動を定量的 RT-PCR 法と *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた。*PLCe* は全ての発生段階を通じてキノコ体全体に「汎キノコ体」選択的に発現したのに対し、*Syt14* と *dIg5* は蛹後期から大型ケニヨン細胞選択的に発現したことから、蛹後期から成虫期にかけてキノコ体固有な機能を持つと推測された [Suenami *et al.* *PLoS ONE* (2016)]。

本研究成果は「中間型」ケニヨン細胞などのケニヨン細胞サブタイプの生理機能の理解のみならず、神経生物学の進展に大きく寄与する、国際的にも重要な成果と考えられる。

## 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9件)

1. Takayanagi-Kiya S, Kiya T, Kunieda T and Kubo T. Mblk-1 Transcription factor family: its roles in various animals

and regulation by NOL4 splice variants in mammals. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 246 (2017) DOI:10.3390/ijms18020246 (査読有)

2. Kohno H, Suenami S, Takeuchi T, Sasaki T, Kubo T. Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zool. Sci.* 33(5), 505-512 (2016) DOI: 10.2108/zs160043 (査読有)
3. Ueno T, Kawasaki K, Kubo T. Single-cohort colonies and hormone treatment of worker honeybees to analyze physiology associated with role and/or endocrine system. *J. Visualized Exp.* (2016) DOI: 10.3791/54240 (査読有)
4. Kaneko K, Suenami S, Kubo T. Gene expression profiles and neural activities of Kenyon cell subtypes in the honeybee brain: Identification of novel 'middle-type' Kenyon cells (review). *Zool. Lett.* 2:14 (2016) DOI: 10.1186/s40851-016-0051-6 (査読有)
5. Suenami S, Paul RK, Takeuchi H, Okude G, Fujiyuki T, Shirai K and Kubo T. Analysis of the differentiation of Kenyon cell subtypes using three mushroom body-preferential genes during metamorphosis in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE* 11(6): e0157841 (2016) DOI:10.1371/journal.pone.0157841 (査読有)
6. Ueno T, Takeuchi H, Kawsaki K, Kubo, T. Changes in the gene expression profiles of the hypopharyngeal gland of worker honeybees in association with worker behavior and hormonal factors. *PLoS ONE* 10(6): e0130206 (2015) DOI: 10.1371/journal.pone.0130206 (査読有)
7. Watanabe T, Kubo T. A new antigenic marker specifically labels a subpopulation of the class II Kenyon cells in the brain of the European honeybee *Apis mellifera*. *Biophysics* 11:73-77 (2015) DOI: 10.2142/biophysics.11.73 (査読有)
8. Takayanagi-Kiya S, Misawa-Hojo K, Kiya T, Kunieda T, Kubo T. Splicing variants of NOL4 differentially regulate the transcription activity of Mlr1 and Mlr2 in cultured cells. *Zool. Sci.* 31:735-740 (2014) DOI: 10.2108/zs140049 (査読有)
9. 金子九美、久保健雄 ミツバチの「尻振りダンス」の分子・神経的基盤の解析 生

化学 86, 589-594 (2014) <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2015/06/86-05-07.pdf> ( 査読無 )

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

1. Suenami S, Okude G, Kubo T. Analysis of the differentiation and function in learning and memory, of the honeybee mushroom bodies using genes expressed in Kenyon cell subtype-preferential manners. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan 2016年11月17~18日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
2. Hiroki K, Shota S, Hideaki T, Tetsuhiko S, Kubo T. Development of essential techniques of CRISPR/Cas9 in the honeybee toward functional analysis of genes in honeybee social behaviors. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan. 2016年11月17~18日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
3. 末次翔太、Rajib Kumar Paul、竹内秀明、奥出絃太、藤幸知子、白井健一、久保健雄 セイヨウミツバチ脳高次中枢キノコ体で顕著に選択的に発現する遺伝子の同定とその成長段階における発現パターンの解析 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 2016年3月28日 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)
4. 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 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・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会 2016年3月28日 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)
5. Suenami S, Paul RK, Fujiyuki T, Shirai K, Kunieda T, Takeuchi H, Kubo T. Promoter analysis of the mushroom body-preferential genes of the honeybee 2014 The 11<sup>th</sup> International Congress for Neuroethology and the 36<sup>th</sup> Japanese Society for Comparative Physiology and Biochemistry 2014年7月29日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

6. Suenami S, Paul RK, Fujiyuki T, Shirai K, Kunieda T, Takeuchi H, Kubo T. Promoter analysis of the mushroom body-preferential genes of the honeybee. International Union for the Study of Social Insects 2014年7月17日 Cairns Convention Centre, Queensland, Australia

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

1. 久保健雄、奥山輝大、上川内あづさ、竹内秀明/共著；太田次郎、赤坂甲治、浅島誠、長田敏行/編集 第6章 社会性昆虫ミツバチの行動分子生物学 新・生命科学シリーズ 動物行動の分子生物学 裳華房 180 (130-174) (2014)

[ その他 ]

ホームページ等

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻  
細胞生理化学研究室  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/saibou/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

久保 健雄 (Takeo Kubo)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号：10201469