

研究報告書

「女王蜂における寿命制御機構の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 鎌倉 昌樹

1. 研究のねらい

これまでの寿命に関する研究は、線虫やショウジョウバエなどのモデル生物を中心に行われているが、これらの動物を用いた解析では、変異などにより本来の寿命を少し変化(20～30%の変化)させるだけの現象を解析の対象としており、寿命というよりは延命という色合いが強い。これでは、生物個体が持つ延命機能を解析することとなるので、本来の寿命の制御メカニズムの解析とはならないものと推察される。従って、真に生物の寿命制御機構を解明するためには、固有の寿命が個体間同士で異なるものを実験対象とし、長寿の個体が短命の個体よりなぜ寿命が長いかを解析することが必要であると考えられる。ミツバチは、女王蜂と働き蜂からなる階級社会(カースト)を形成しているが、働き蜂の寿命は、通常1ヶ月くらいであるのに対し、女王蜂の寿命は2年～3年くらいと20倍以上長く生きる。ミツバチの寿命の分子メカニズムは未だ明らかになっていないことから、この働き蜂と女王蜂の寿命の違いを解析することにより、新たな切り口からの寿命研究を推進することができる。**女王蜂は寿命が長いにも拘らず、働き蜂に比べ体サイズが1.5倍で1日に2000個の卵を産み、従来知られている「生物の寿命が延長する場合は繁殖能が低下する」という原理とは相反して高い生産性や活動能を維持したまま寿命が長いという特徴をもっており、「健康で長生きする」という人類の目標を象徴した生物種と言える。**また、ミツバチの同じ遺伝子型をもつ雌の幼虫のなかでも王台という女王蜂を育てるための部屋で成育した個体のみが、働き蜂の分泌するローヤルゼリー(RJ)を摂取して女王蜂へと分化することから女王蜂の長寿は、エピジェネティックな制御によってもたらされたものである。人類の老化や寿命も生まれた後の生活習慣の違いによってもたらされるものであることから、**ミツバチは人類の寿命や老化の解析に適した生物種であると考えられる。**そこで本研究では、生物における老化・寿命のエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目的として、ミツバチの寿命制御の分子メカニズムを解析する研究を実施した。

2. 研究成果

(1) 概要

ミツバチは、女王蜂と働き蜂からなる階級社会(カースト)を形成しているが、働き蜂の寿命は、通常1ヶ月くらいであるのに対し、女王蜂の寿命は2年～3年くらいと20倍以上長く生きる。ミツバチの寿命の分子メカニズムは未だ明らかになっていないことから、本研究において、生物の老化と恒常性維持機構との関係を明らかにすることを目的として、女王蜂の寿命制御の分子機構の解明を試みた。本研究では、寿命測定とクロマチン修飾の解析を寿命解析のアッセイ系として用いて、寿命制御に関与する因子の探索を試みた。まず、ミツバチ

の寿命の *in vitro* アッセイ系の構築に着手し、外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する方法を確立した。次に、女王蜂と働き蜂におけるクロマチン修飾の違いを組織化学的に解析できる方法を確立し、この方法を用いて両個体間でのクロマチン修飾の違いを解析した結果、ヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾の変化が働き蜂に比べ女王蜂で増加していた。また、クロマチン修飾が見られない系統の女王蜂は寿命が短かった。これらの結果から、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行し、これが女王蜂の長寿命化に関与している可能性が示唆された。次に、女王蜂の寿命制御因子を見出すため、天然で飼育された働き蜂と女王蜂を対象として、トランスクリプトーム解析 (RNA-seq 解析) と染色体の網羅的なメチローム解析を実施し、女王蜂において DNA メチル化による発現制御を受ける遺伝子群を解析した。これまでに、RNA-seq 解析においては、サンプルの RNA 調製、ライブラリー調製、次世代シーケンサーの解析、データ解析を完了した。これまでにミツバチに適したメチローム解析の方法を確立し、これまでにメチローム解析とデータ解析を実施した。また、羽化直後の女王蜂においてヘテロクロマチン化により寿命制御に関与する因子を見出すため、ミツバチの ChIP-seq 解析の方法を確立し、ミツバチの中腸を対象としてクロマチン修飾の抗体を用いた ChIP-seq 解析を現在実施している。これまでの解析結果から、女王蜂では何らかのクロマチン修飾誘導因子の発現によりヘテロクロマチン化が誘導され、そのヘテロクロマチン化により女王蜂の寿命制御に関与する実行因子の発現制御を受け、同実行因子が寿命延長をもたらしているものと考えられる。今後、RNA-seq 解析、メチローム解析、ChIP-seq 解析の結果などから、女王蜂における寿命制御因子を見出したいと考えている。

(2) 詳細

本研究者はこれまでに、女王蜂への分化誘導機構の解析を行った結果、ローヤルゼリー中に含まれる成分である「ロイヤラクチン」というタンパク質が上皮増殖因子受容体 (EGFR) を介して女王蜂の分化を誘導することを明らかにしてきた。しかし、女王蜂における寿命制御機構についてはこれまでに明らかになっていないことから、本研究において、生物の老化と恒常性維持機構との関係を明らかにすることを目的として、女王蜂の寿命制御の分子機構の解明を試みた。線虫やショウジョウバエなどでは、エピジェネティックなクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が寿命に影響を及ぼすことが報告されている。また、これまでにロイヤラクチンによりショウジョウバエの雌の寿命が延長することが明らかになっているが、線虫におけるヘテロクロマチン化による寿命延長には、雌の生殖細胞が深く関わっていることが報告されている。また、EGFR の下流で Sirt1 が発現変動するとの報告もあることから、ロイヤラクチンがメチル化、アセチル化を含めたクロマチン修飾に何らかの影響を及ぼしている可能性もある。そこで本研究では、女王蜂と働き蜂との間でクロマチン修飾の状態にどのような違いがあるのかについて解析するとともに、ミツバチの寿命制御機構の解明のための重要な測定項目としてクロマチン修飾の解析を本研究に取り入れた。本研究では、寿命測定とクロマチン修飾の解析を寿命解析のアッセイ系として用いて、寿命制御に関与する因子の探索を試みた。

研究テーマ A「ミツバチの寿命アッセイ系の構築」

これまでに室内の閉鎖系における寿命アッセイ系が確立されていなかったことから、ミツバ

チの寿命の in vitro アッセイ系の構築に着手した。寿命の in vitro アッセイ系の設計目標は、人工飼育した働き蜂と人工飼育した女王蜂との間で明確な寿命の差が見られるアッセイ系の構築である。人工飼育した女王蜂及び働き蜂において、天然の女王蜂、働き蜂のそれぞれの発生期間を反映した孵化後 16 日～18 日及び孵化後 19 日～21 日の個体の寿命を測定し比較した結果、人工飼育した働き蜂と人工飼育した女王蜂との間で明確な寿命の差が見られた。これにより、人工の働き蜂と人工の女王蜂での寿命アッセイ系を構築することができた。寿命測定の間は、働き蜂と女王蜂に対してローヤルゼリー、花粉、ハチミツを同等に与え、餌による寿命への影響を排除した。さらに、ミツバチの幼虫からの人工飼育の条件や成虫個体の飼育条件において、ミツバチの寿命アッセイ系における最適化も行った。これにより、外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する方法を確立した。

研究テーマ B「ミツバチのクロマチン修飾の解析」

新たに女王蜂成虫と働き蜂成虫の全身(頭部、胸部、腹部)におけるクロマチン修飾の違いを組織化学的に解析できる方法を確立し、この方法を用いて天然飼育で羽化直後の女王蜂と働き蜂におけるクロマチン修飾の違いを解析した。その結果、ヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾の変化が働き蜂に比べ女王蜂で増加していた。また、新たに確立した in vitro 飼育による寿命アッセイ系により天然飼育で羽化直後の女王蜂と働き蜂の寿命を測定した結果、天然女王蜂の寿命は天然の働き蜂の寿命より有意に増加していた。一方、日本に通常に生息する系統に比べ、病気に弱く寿命も比較的短いという性質を有しているイタリアン系統において女王蜂のヘテロクロマチン化が見られず、in vitro 寿命アッセイ系における女王蜂の寿命がイタリアン系統で通常種の系統に比べ有意に短かった。従って、ミツバチのクロマチン修飾の変化は寿命に関連していることが示唆された。これらの結果から、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行し、これが女王蜂の長寿命化に関与している可能性が示唆された。女王蜂は、高い産卵能を維持したまま、長寿命であることから、ゲノム上に遺伝子発現の盛んなユークロマチン領域と生命の維持のために無駄な遺伝子発現が抑えられたヘテロクロマチン領域が存在すると考えられる。女王蜂でヘテロクロマチン化の増加が見られたことから、女王蜂のゲノム上のヘテロクロマチン領域において寿命延長に関与する寿命制御実行因子が抑制的に発現制御を受けているものと考えられた。

研究テーマ C「寿命制御に関与する DNA メチル化による発現制御を受ける因子の探索」

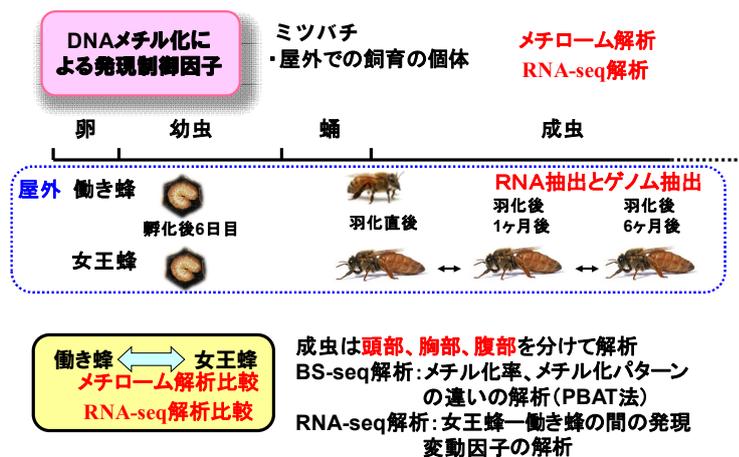
働き蜂と女王蜂を対象として、トランスクリプトーム解析と染色体の網羅的なメチローム解析を実施し、女王蜂において寿命制御に関与する DNA メチル化による発現制御を受ける遺伝子群を解析した。天然の女王蜂と天然の働き蜂を対象としたトランスクリプトーム (RNA-seq) 解析、メチローム (BS-seq) 解析では、女王蜂の幼虫、働き蜂の幼虫、羽化直後の女王蜂、羽化直後の働き蜂、交尾後で羽化 1 か月後の女王蜂、羽化 6 ヶ月後の女王蜂の計 6 ポイントを対象とした(下図参照)、また、成虫については、頭部、胸部、腹部に分けて解析を実施した。これまでに、RNA-seq 解析においては、これらすべてのサンプルの RNA 調製、ライブラリー調製、次世代シーケンサーの解析、データ解析を完了した。クロマチン修飾の違いが見られた羽化直後の女王蜂と働き蜂において遺伝子発現の違いを解析した結果、女王蜂が働き蜂に

比べ、ヘテロクロマチン化の抑制に関与するヒストン修飾酵素の遺伝子発現の低下が見られた。この女王蜂と働き蜂との間の遺伝子発現の変動は、クロマチン修飾の変化と一致するものであり、羽化直後の女王蜂で見られたヘテロクロマチン化は、ヒストン修飾酵素の遺伝子発現の変動によりもたらされたものであることが明らかとなった。現在、取得したデータのさらなる詳細な解析を進めている。一方のミツバチの BS-seq 解析においては、通常のバイサルファイト処理では、工程内に PCR 反応を含むため、PCR がかかりにくい locus においてはメチル化率が実際とは異なってくる問題が発生する可能性があるため、バイサルファイト処理において PCR を含まずランダム

プライマー伸長反応によって鑄型を調製する方法(PBAT 法)を用いて解析した。ミツバチゲノムを対象とした PBAT 法解析でのライブラリ調整の最適化を行い、約 80%のマッピング率での解析ができる条件を見出した。これまでに、BS-seq 解析とデータ解析を実施した。また、羽化直後の

女王蜂においてヘテロクロマチン化により寿命制御に関与する因子を見出すため、ミツバチの ChIP-seq 解析の方法を確立し、ミツバチの中腸を対象としてクロマチン修飾の抗体を用いた ChIP-seq 解析をこれまでに実施した。

次世代シーケンサー解析の実施計画



3. 今後の展開

本研究におけるこれまでの解析から、女王蜂では何らかのクロマチン修飾誘導因子の発現によりヘテロクロマチン化が誘導され、そのヘテロクロマチン化により女王蜂の寿命制御に関与する実行因子の発現制御を受け、同実行因子が寿命延長をもたらしているものと考えられる。今後、幼虫期における RNA-seq 解析と BS-seq 解析の結果や女王蜂分化に重要である EGFR の RNAi 個体の RNA-seq 解析の結果などから、女王蜂のヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾因子を同定する。さらに、RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析の結果から、羽化直後の女王蜂でヘテロクロマチン化を介して発現制御を受ける寿命制御実行因子を見出す。最終的には、同定したクロマチン修飾因子の RNAi により、羽化直後の女王蜂において寿命制御に関与する実行因子の発現変動を反転させ、寿命延長を抑制する因子を見出すことで、女王蜂における寿命制御因子を見出していく予定である。

4. 評価

- (1) 自己評価
(研究者)

本研究において女王蜂が長寿である分子メカニズムについて解析した。本研究において、これまでに見出されていなかった外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する *in vitro* の寿命アッセイ系の構築を達成できた。また、女王蜂が働き蜂よりヘテロクロマチン化が亢進していることを新たに見出した。ミツバチの DNA のメチル化解析はこれまでに他の研究者によってなされているが、クロマチン修飾の変化についてはこれまでにない初めての解析結果である。また、本研究でミツバチでの ChIP-seq 解析についても、その解析方法を新たに確立し、PBAT 法での DNA メチル化の解析もこれまでに報告はなく、本研究で新たに取り組んだ。このように、ミツバチを対象として DNA、RNA、タンパク質を対象として総合的にエピゲノム解析を実施することは、ミツバチに関する研究においてこれまでにない初めての試みであり、研究に関する新規性、独自性は高いものであると考えられる。ただ、当初の計画としては、終了年度までに寿命制御因子を見出す予定であったが、予定通り研究を進めることができなかったことは反省すべき点である。実験が計画より遅れた理由としては、ミツバチはすべてが野生種であり、個体のばらつきや系統による差異も大きく、その対応や調整に時間がかかったことやサンプリングにおいても天候に左右されて同一系統での経時サンプルの取得にも時間がかかったことなどが挙げられる。今後は、これまでの経験を活かし、研究対象としてのミツバチの特性を理解し、合理的に実験を進めるように留意したいと考えている。目標である女王蜂における寿命制御因子の同定に向け、今後も研究を進めていきたいと考えている。また、今後、見出されたミツバチの寿命制御因子の発現と飼育条件との関係を明らかにし、近年寿命が短くなってきているミツバチ(女王蜂、働き蜂)の寿命延長を促進し、野菜や果物の受粉に必要なミツバチの飼育の安定化に貢献していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、ミツバチの女王蜂と働き蜂では同じ遺伝子型を持つにも関わらず、育て方の違いで寿命がそれぞれ2~3年と1ヶ月のように約20倍も異なるため、その違いはエピジェネティックな制御の違いによるとの仮説から検討されている。まずは、対象となるミツバチは実験動物として一般的ではなく、実験室内の飼育条件の検討から始めて寿命の違いを確認した。さらに、遺伝子のエピジェネティックな制御の解析を行うためのミツバチ成虫からのサンプル調整方法についても検討を重ねた。また、ミツバチの成育は季節に依存するため、検討に時間を要したようであるが、検討の準備は整ったようである。その結果、クロマチン修飾の変化は寿命に関連していることが示唆された。次に、DNA メチル化による発現制御を受ける因子の探索を行い、結果を解析中である。残念ながら、本さがけ研究期間中に成果を論文化は出来なかったが、検討条件が整い、今後の解析結果をまとめて論文化することが可能だと考えられる。ロイヤルゼリーの作用機序についてさがけ研究者との共同研究も実施され、研究の幅が広がったと考えられる。今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

0件

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Masaki Kamakura Royalactin induces queen differentiation in honeybees. International congress of international union for the study for social insects(オーストラリア、クイーンズランド) 2014.7.17 招待講演
2. 鎌倉昌樹 ミツバチの女王蜂分化と寿命制御 第15回日本抗加齢医学会総会(日本、福岡) 2015.5.29 招待講演
3. 鎌倉昌樹 ミツバチの女王蜂分化と寿命制御 脳心血管抗加齢研究会 2015(日本、大阪) 2015.11.28 招待講演
4. 鎌倉昌樹 ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析 第130回大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会(FBSコロキウム)(日本、大阪) 2016.2.3 招待講演
5. 鎌倉昌樹 ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析 第88回日本遺伝学会大会(日本、三島) 2016.9.7 招待講演