

数理科学的手法を駆使した生命現象の定量化への挑戦
(宇奈月温泉での合宿)

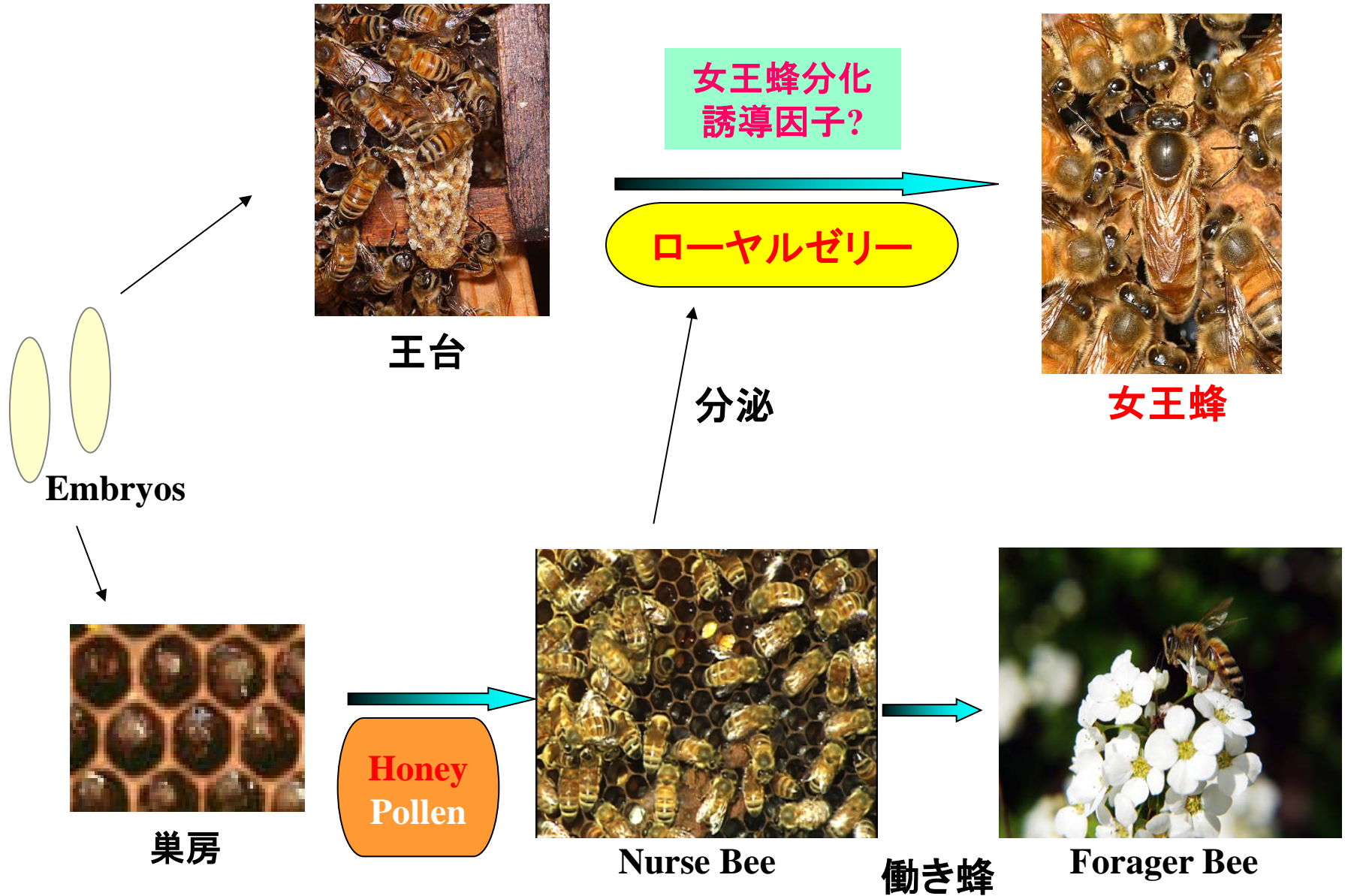
女王蜂における寿命制御機構の解明

2016年3月27日

鎌倉昌樹

(富山県立大学、JSTさきがけ)

ミツバチのカースト分化



女王蜂の特徴



働き蜂

体サイズ	1倍
寿命	1倍
産卵数	0
発生期間	長い



女王蜂

体サイズ	1.5倍
寿命	20倍
産卵数	2000個/日
発生期間	短い

ローヤルゼリー(RJ)の成分組成

水分	66.2%
タンパク質	14.0%
糖質	15.2%
脂質	3.8%
ビタミン	
脂肪酸	
10-ヒドロキシデセン酸	

これまでのカースト分化に関する研究

1970年以降Remboldらを中心としてRJ中のカースト分化誘導因子の同定が試みられる。



部分精製には至ったが同定はできなかった

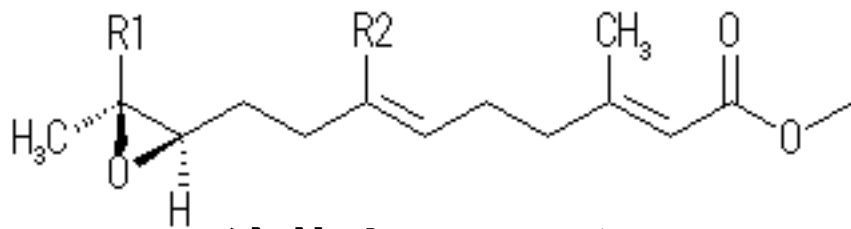


糖質(グルコース、フルクトース)が
カースト分化を誘導する



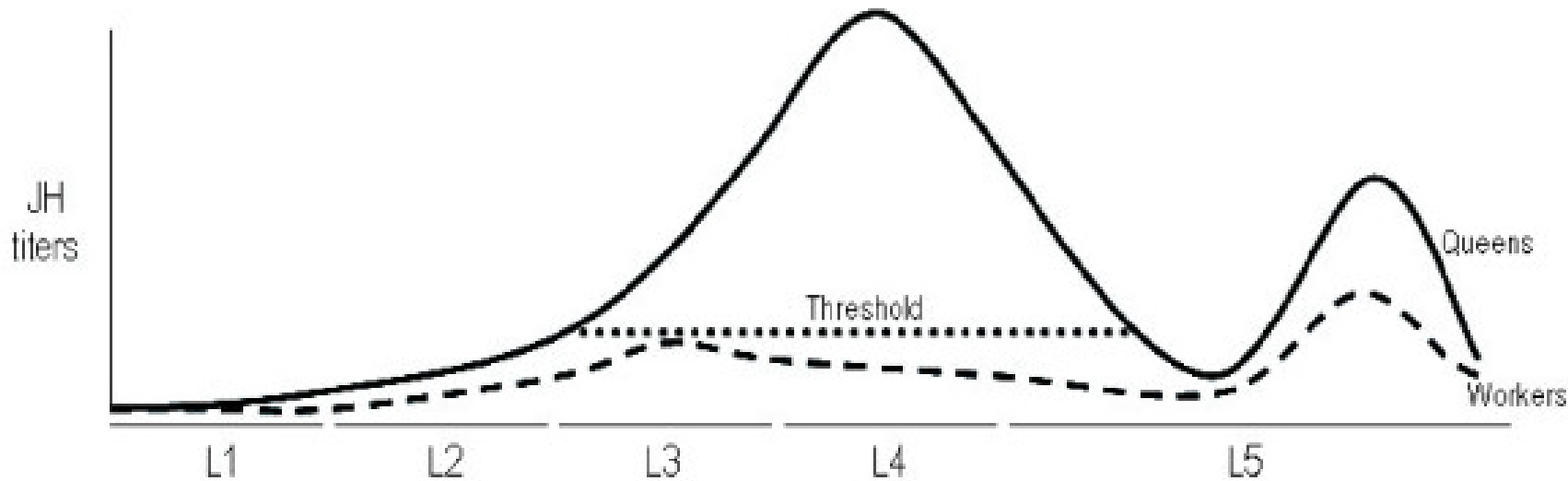
ペプチド性の可能性を報告

幼若ホルモン(JH)は幼虫期に増加し 女王蜂分化を誘導する



幼若ホルモン(JH)

幼虫



L:ミツバチ幼虫

これまでのカースト分化に関する研究



- ・糖質である可能性もある
- ・ペプチド性の可能性もある
- ・JHによる女王蜂の分化誘導

RJ中の女王蜂分化誘導因子や分化誘導メカニズムは未解明のままであった

ミツバチのin vitro飼育系



女王蜂飼育用培地

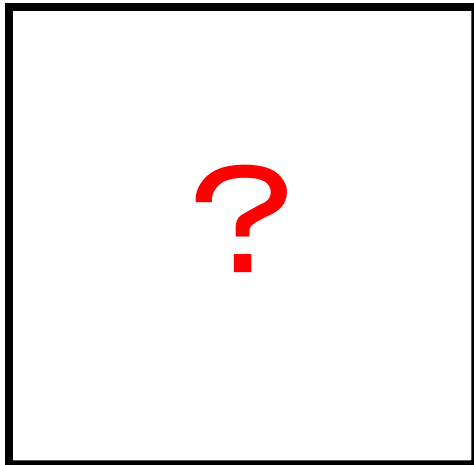
34°C



34°C



女王蜂



働き蜂飼育用培地

34°C



34°C



働き蜂

ローヤルゼリー(RJ)の成分組成

	4°C	40°C30日
水分	66.2%	
タンパク質	14.0%	変化あり
糖質	15.2%	変化なし
脂質	3.8%	変化なし
ビタミン		変化なし
脂肪酸		変化なし
10-ヒドロキシデセン酸		変化なし

ロイヤラクチンと450 kDaタンパク質が減少していた。

ロイヤラクチンは女王蜂分化を誘導する

ミツバチ



コントロール ロイヤラクチン
投与

ロイヤラクチンの女王蜂分化誘導 における作用メカニズムの解析

ミツバチ



保存変異体
がない

身体の変化を
明確に分析
できない



ショウジョウバエ



多数の変異体が
存在する

ハエは遺伝子は約1万5千個で、その70%はヒト遺伝子との相同性を持っている

ロイヤラクチンによるハエの表現型の変化

女王蜂様表現型



Casein

RJ

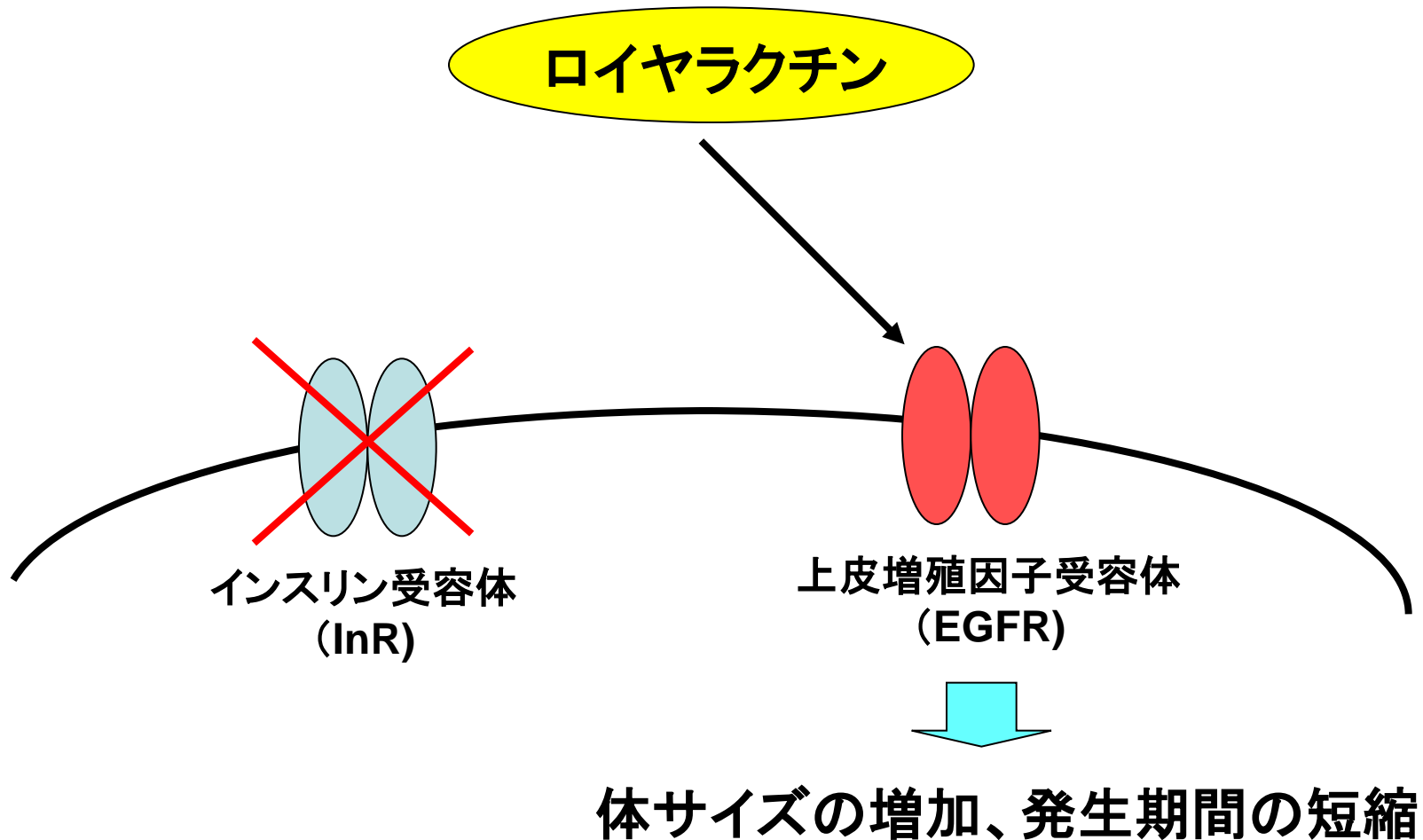
体サイズ	増加
細胞サイズ	増加
寿命	増加
産卵数	増加
発生期間	短縮

インスリン受容体は体サイズ、寿命の制御の司令塔

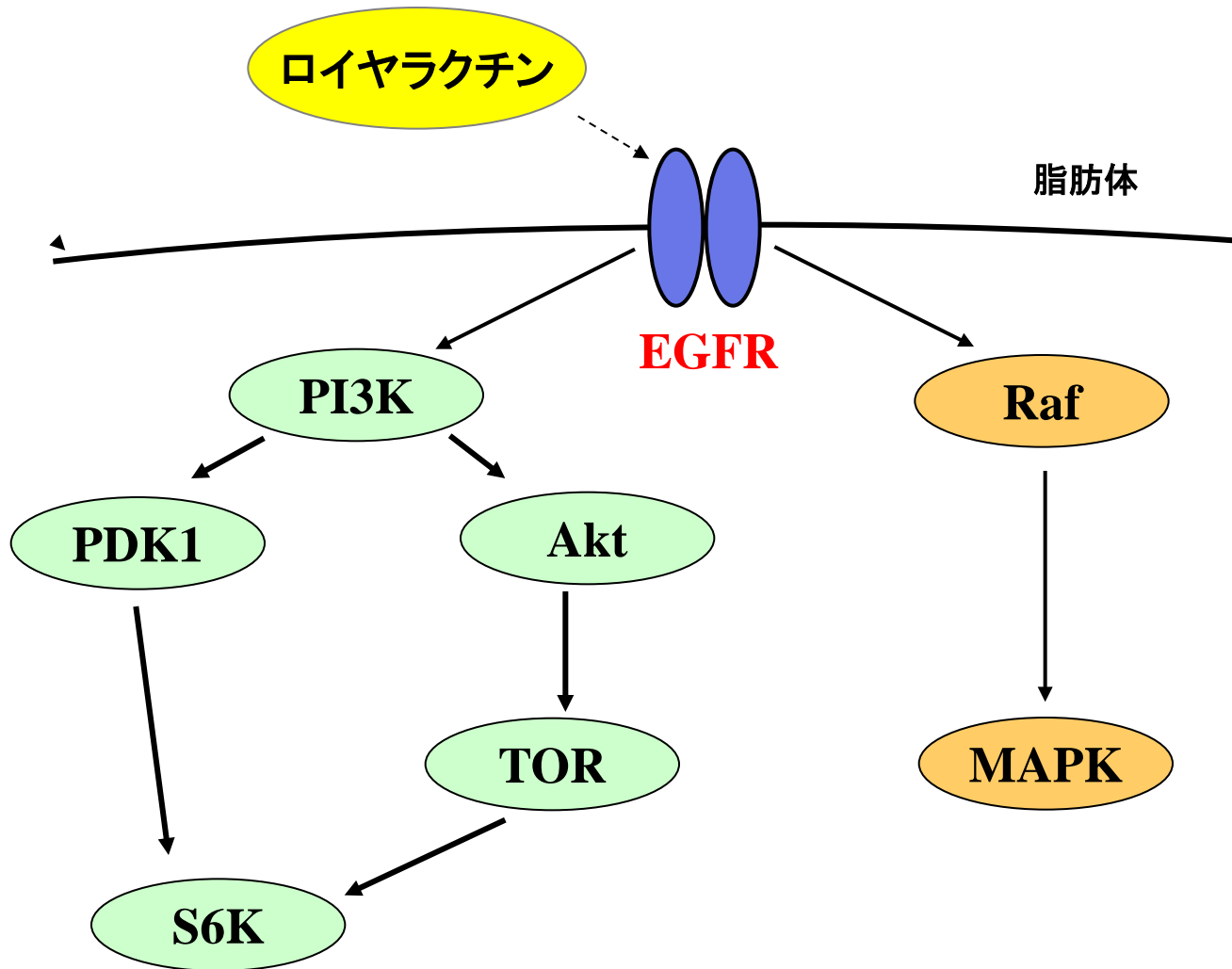


インスリン受容体(InR)変異体

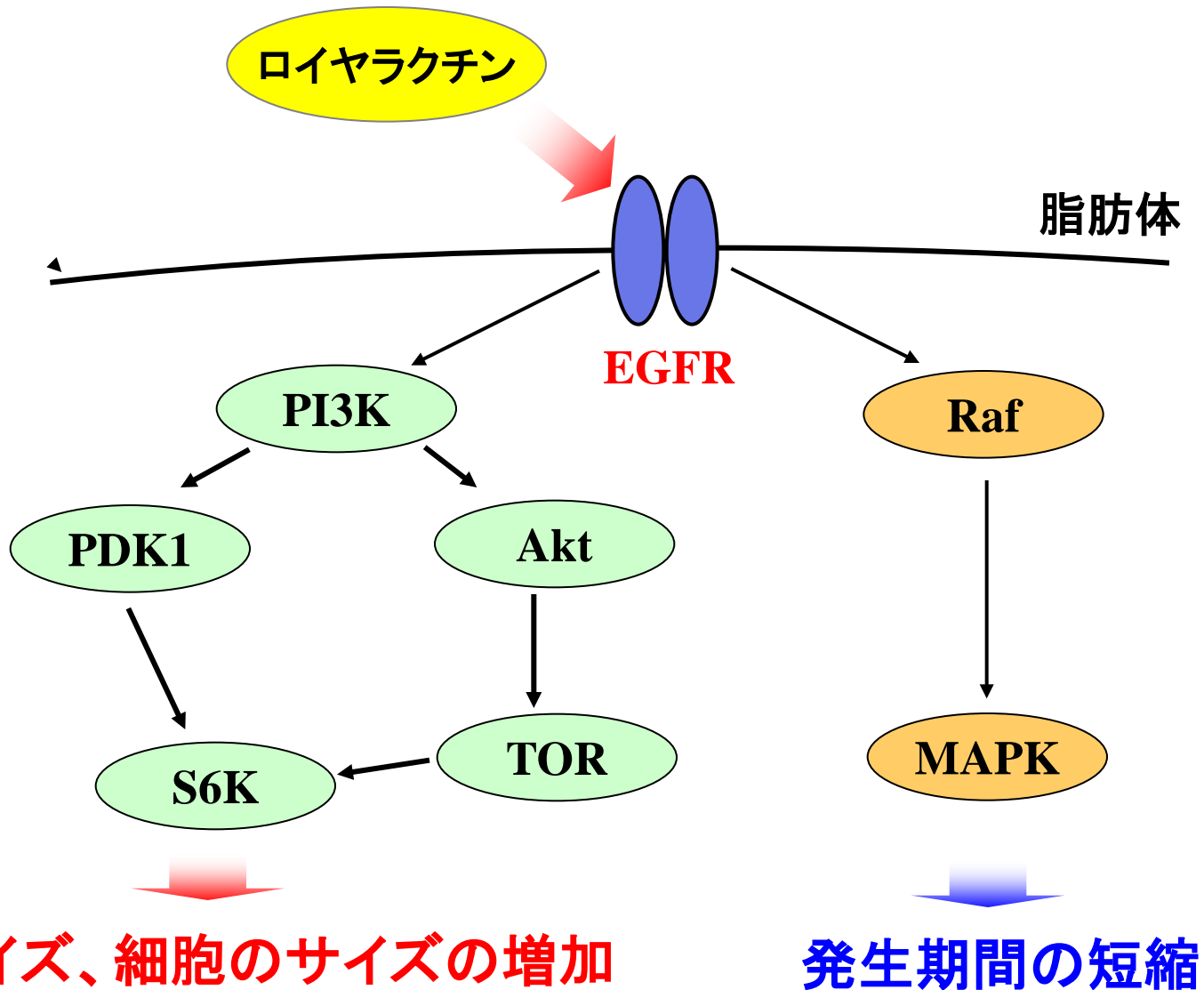
ロイヤラクチンは上皮増殖因子受容体 (EGFR) に作用する



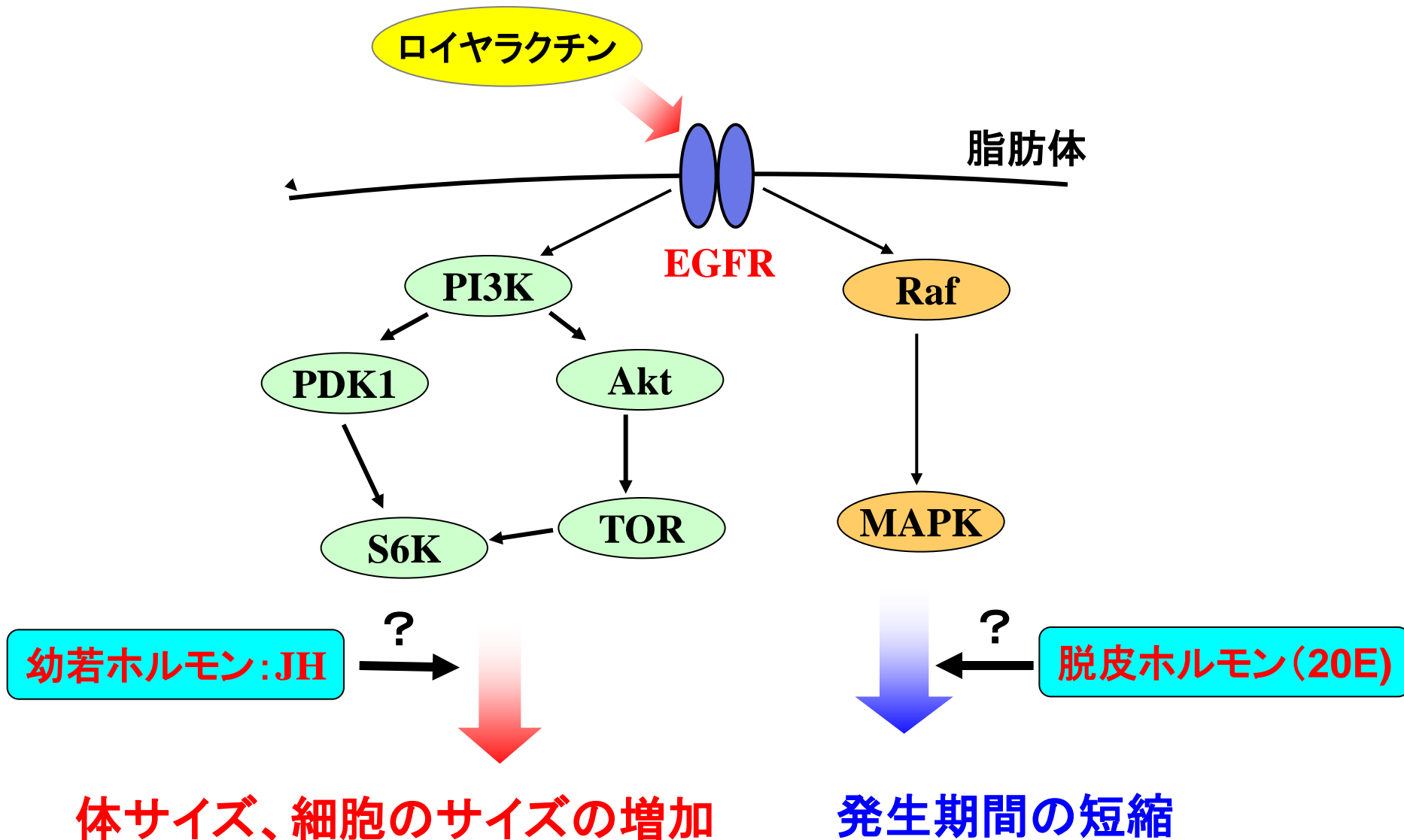
ロイヤラクチンによるEgfrシグナルの活性化



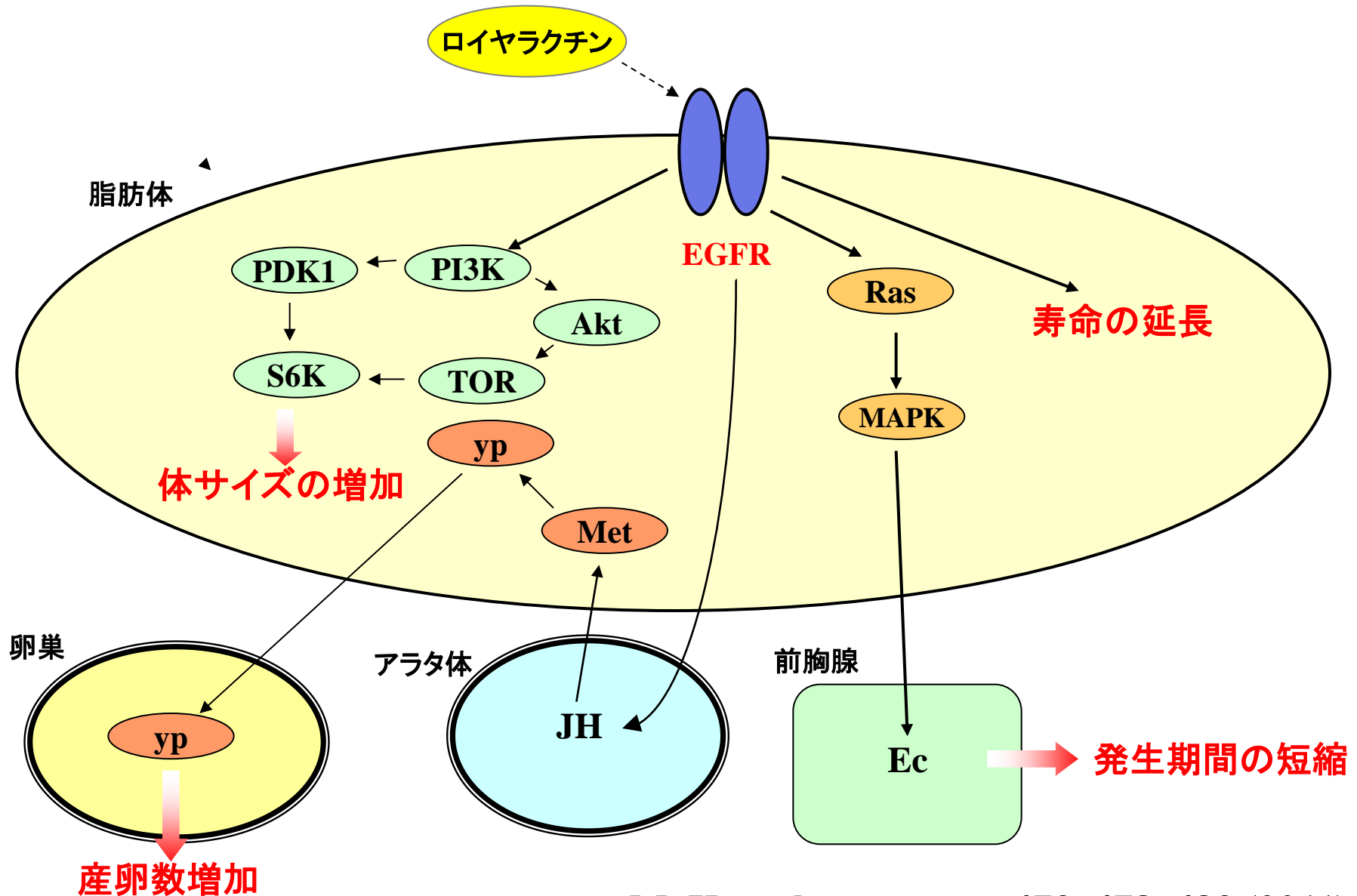
ロイヤラクチンによるEgfrシグナルの活性化



ロイヤラクチンによるEgfrシグナルの活性化

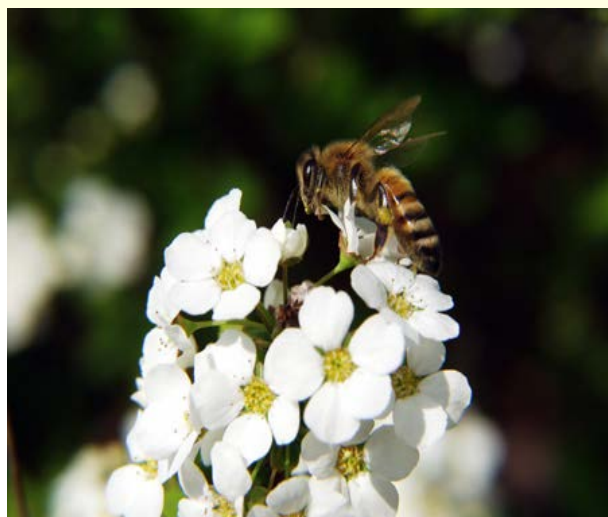


ミツバチのカーコスト分化誘導機構



さががけ「生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」

女王蜂における寿命制御機構の解明



鎌倉昌樹（富山県立大学）

なぜミツバチを用いるのか？

1、働き蜂と女王蜂で寿命が大きく異なる

働き蜂

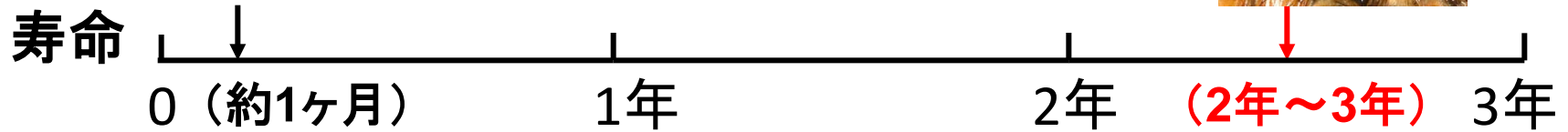


産卵能なし

女王蜂



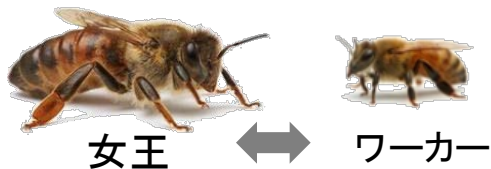
高産卵能
(2000個/日)



高い生産性や活動能を維持したまま長

「健康で長寿」を象徴した生物種

2、寿命の制御は遺伝的要因ではない



女王

ワーカー

遺伝子は同じ

遺伝子発現の違いで
寿命は大きく異なる

エピジェネティック
な寿命制御

「寿命」の
分子基盤解明に
最適の材料

ロイヤラクチンは女王蜂分化を誘導する

ミツバチ



コントロール ロイヤラクチン
投与

ミツバチの女王蜂分化誘導
因子ロイヤラクチンの発見

M. Kamakura 2011, *Nature*

ショウジョウバエ



コントロール

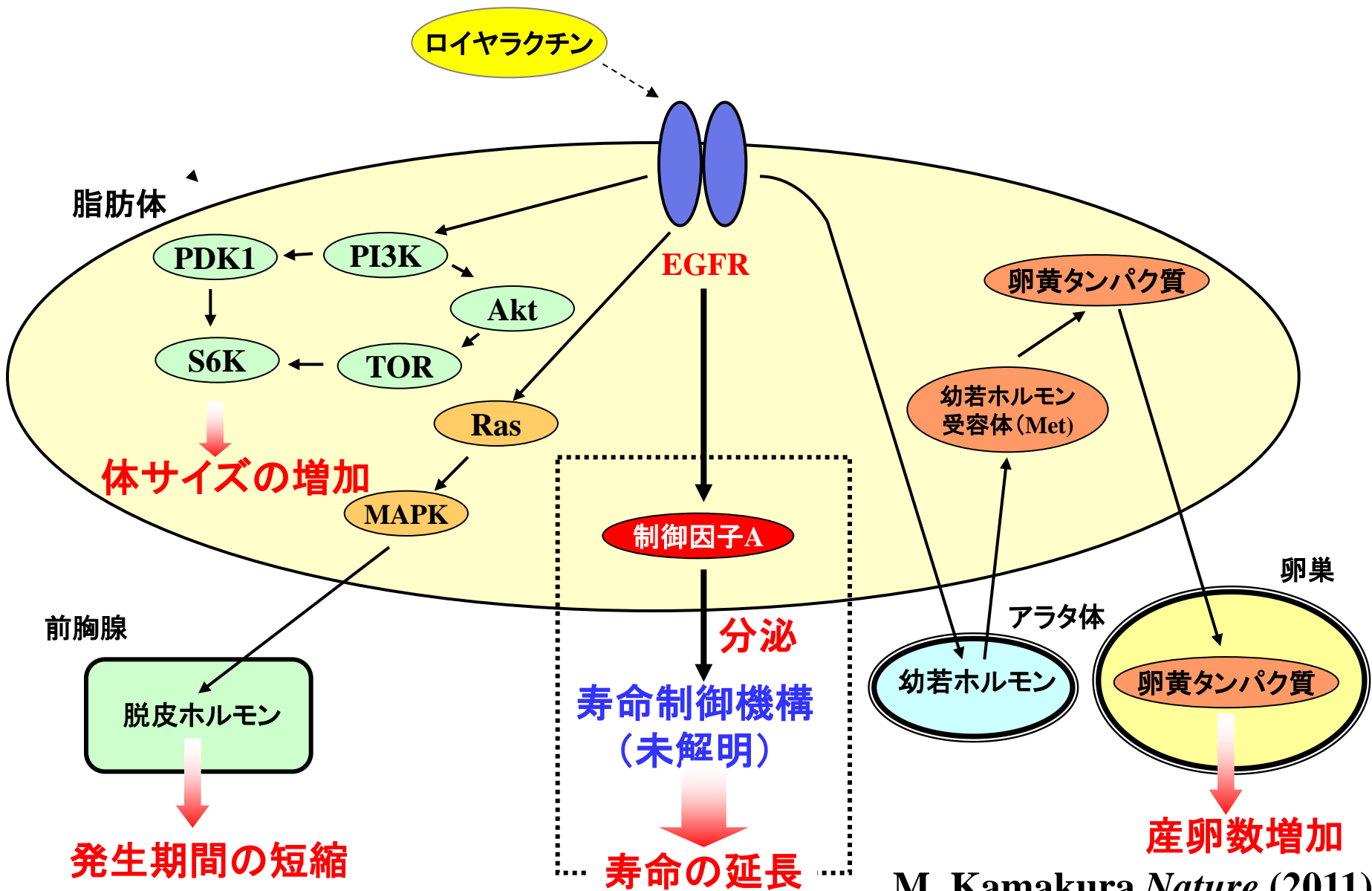
ロイヤラクチン
投与

ロイヤラクチンはショウジョウバエ
に女王蜂様表現型を誘導する



寿命を延長させる

ミツバチのカーラスト分化誘導機構



M. Kamakura *Nature* (2011)

女王蜂の寿命制御因子の探索

① 寿命制御に関与する内分泌性因子

② DNAメチル化による発現制御因子

③ small RNA
クロマチン制御因子

トランスクリプトーム
LC/MS解析

ゲノム・メチローム
トランスクリプトーム

発現変動の解析

クロマチン修飾と寿命への影響を解析



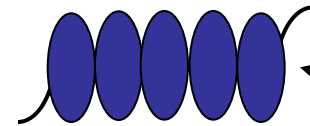
女王蜂

遺伝子は同じ

寿命が
20倍増加



働き蜂

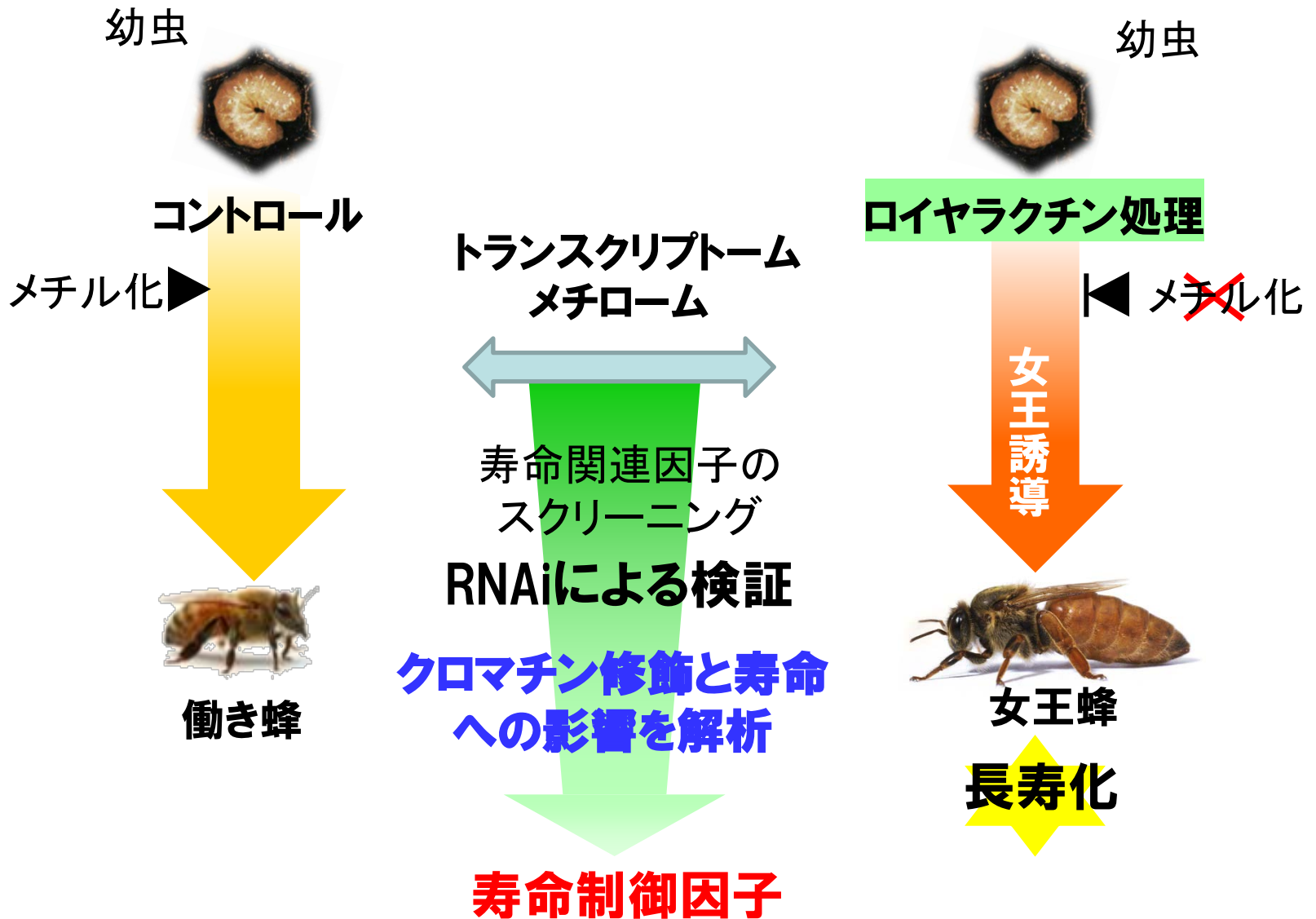


ヌクレオソーム

ヘテロクロマチン 寿命延長

寿命の制御因子と制御機構の解明

②DNAメチル化による発現制御因子の探索



エピジェネティクス

クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学あるいは分子生物学の研究分野である。

遺伝形質の発現はセントラルドグマ仮説で提唱されたようにDNA複製→RNA転写→タンパク質合成→形質発現の経路にしたがってDNA上の遺伝情報が伝達された結果である。言い換えると、セントラルドグマ仮説における形質の変化(遺伝子変異)とはDNA一次配列の変化であり、事実、遺伝子変異の大半はDNA配列の変化に起因することが実証されてきた。

しかしながら、DNA配列の変化を伴うことなく、DNAへの後天的な作用により形質変異が生じる機構も発見されている。近年ではヒトゲノムの解読が完了した上、形質発現の調節機構にも研究の中心が移るにつれてエピジェネティクスが注目を集めるようになった。

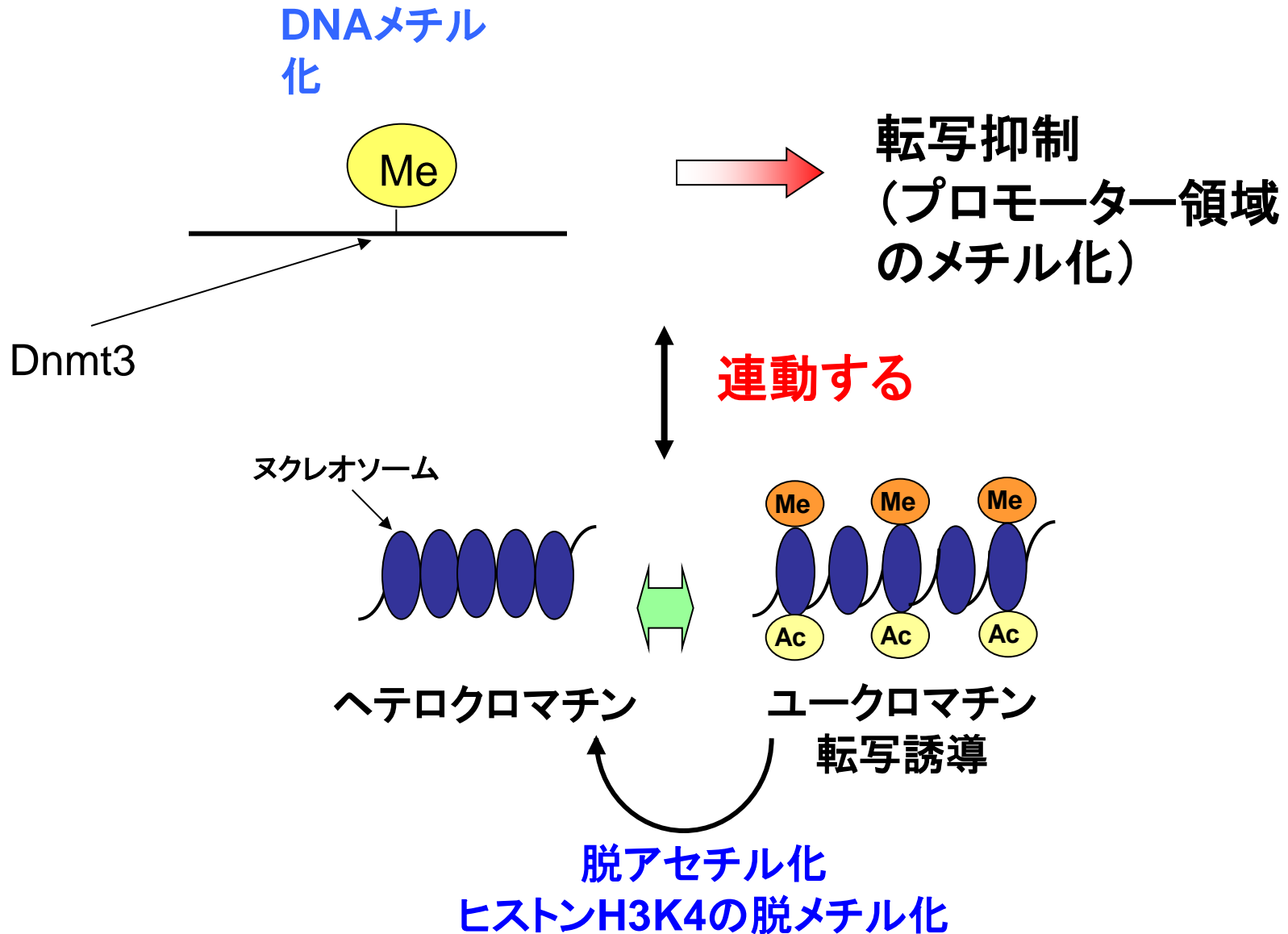
すなわち従来のオペロン仮説による遺伝子発現の制御はあくまでもDNA一次配列変化により変異が発生する。他方、次に示すような機序に基づく発現制御の変異はDNA一次配列変化と独立している事象である。

1、DNA塩基のメチル化による遺伝子発現の変化

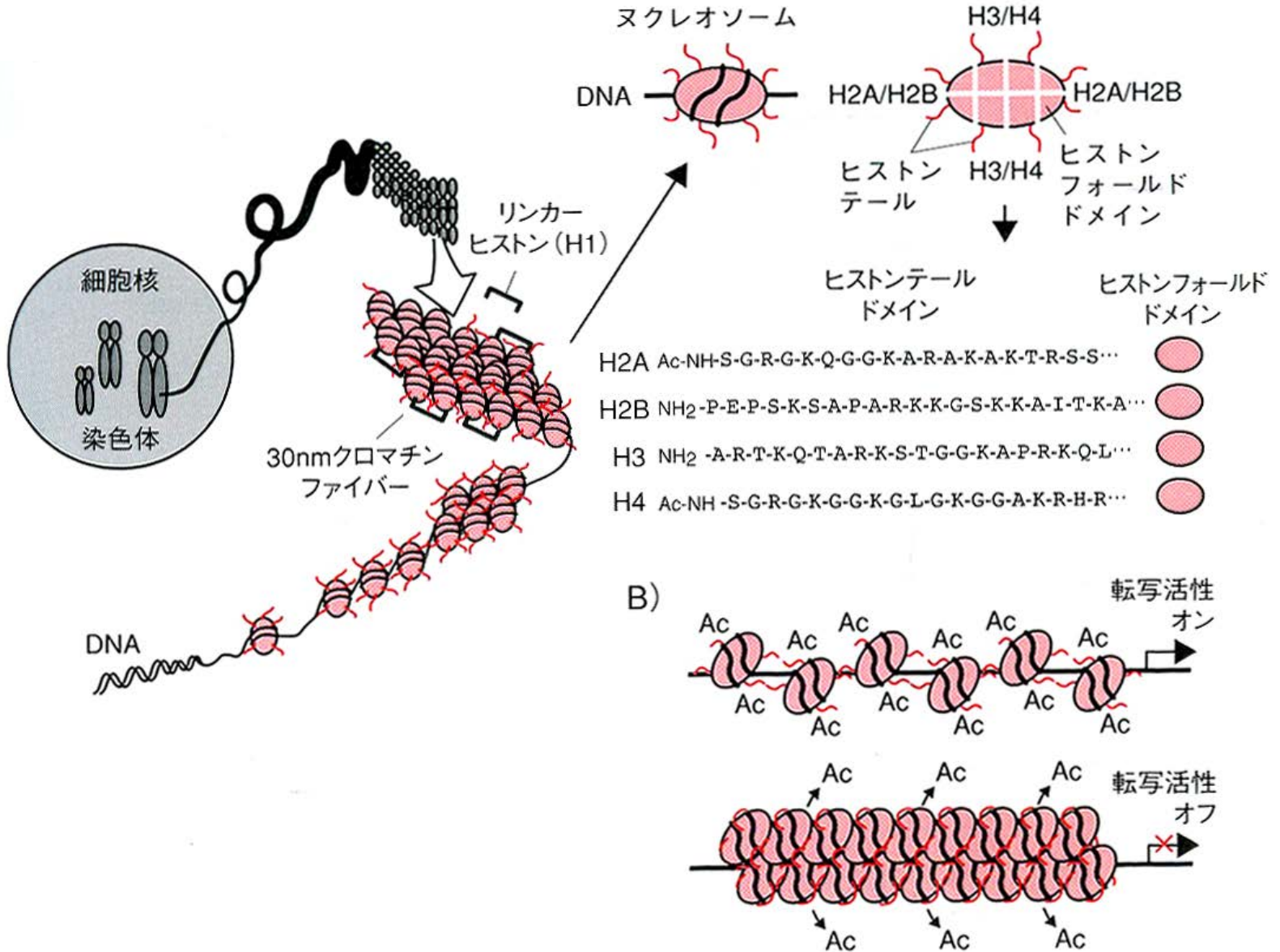
2、ヒストンの化学修飾による遺伝子発現の変化(ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化など)

分子生物学的には、後天的DNA修飾による遺伝発現制御をエピジェネティクスの学問分野では扱う。

DNAメチル化とヒストンのメチル化は連動している



クロマチンの構造と転写活性



ヒストンH3とH4のアセチル化・メチル化部位と修飾酵素

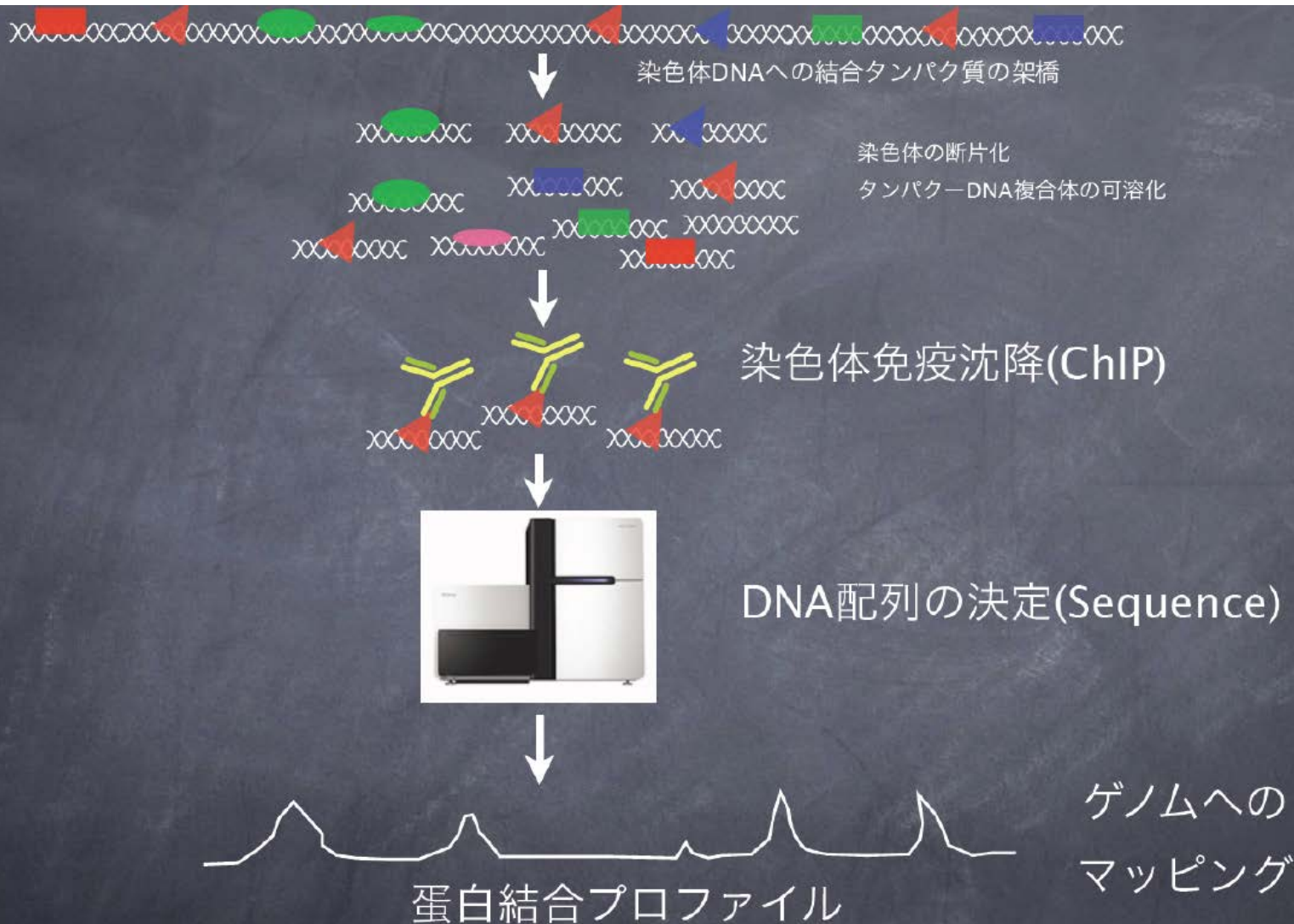
ヒストンH3

残基	修飾	修飾酵素	働き
K4	Me	Set1 (酵母), SET7/9 (ヒト)、Ash1 (ハエ)	転写活性化
K9	Ac	SAGA (酵母)、SRC1 (マウス)	転写活性化
K9	Me	Su(var)3-9 (ハエ)、G9a (ヒト)、EZH2 (ヒト) Ash1 (ハエ)	転写抑制
K14	Ac	Gcn5 (酵母・マウス)	転写活性化
R17	Me	CARM1 (マウス・ヒト)	転写活性化
K27	Me	G9a (マウス)、E(z) (ハエ)、EZH2 (ヒト)	転写抑制
K36	Me	Set2 (酵母)	転写抑制
K79	Me	Dot1 (酵母・ヒト)	テロメア不活性化

ヒストンH4

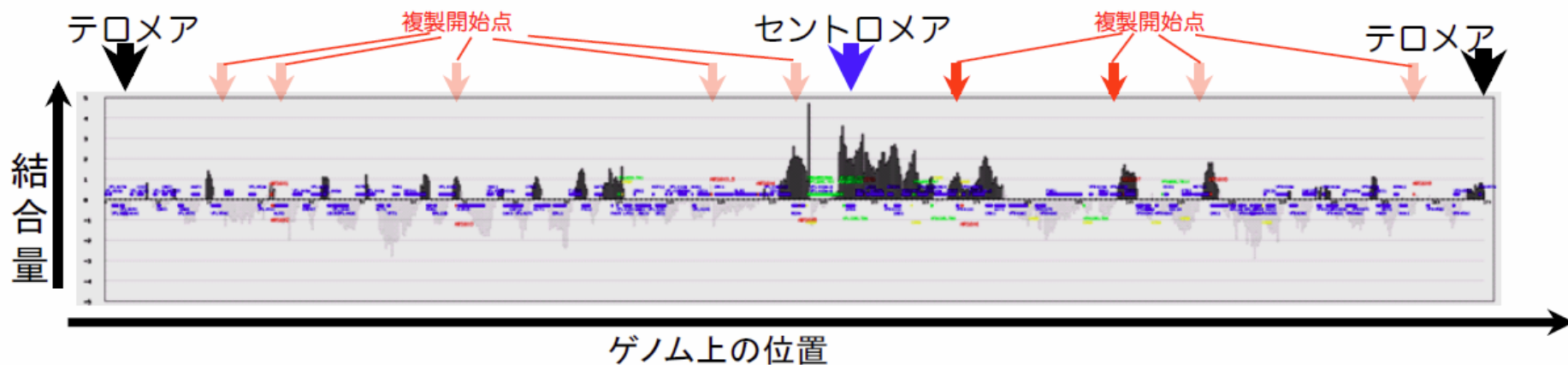
R3 (Me: 転写活性化)、K5 (Ac: 転写活性化)、K8 (Ac: 転写活性化)、
K12 (Ac: ヒストン新生)、K16 (Ac: 転写活性化)、K20 (Me: 転写抑制)

Chip-seq



全ゲノムレベルでタンパク結合位置解明のためのChIP-seq法
タンパクがいつどこでどのように働いているかを知る

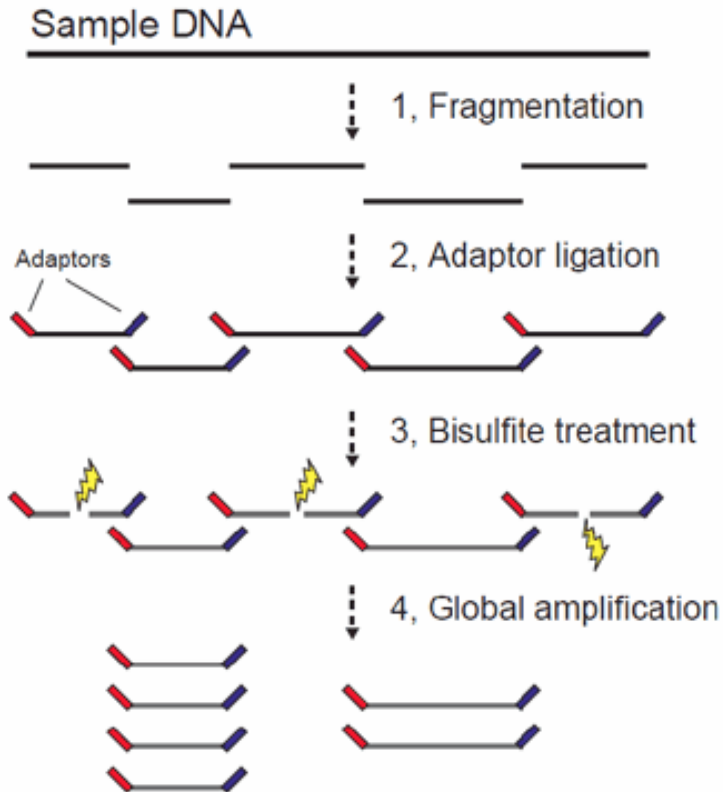
ChIP-seq法によるタンパク質の動態解析 —ゲノムのどの場所にいつ結合するのかを明らかにする—



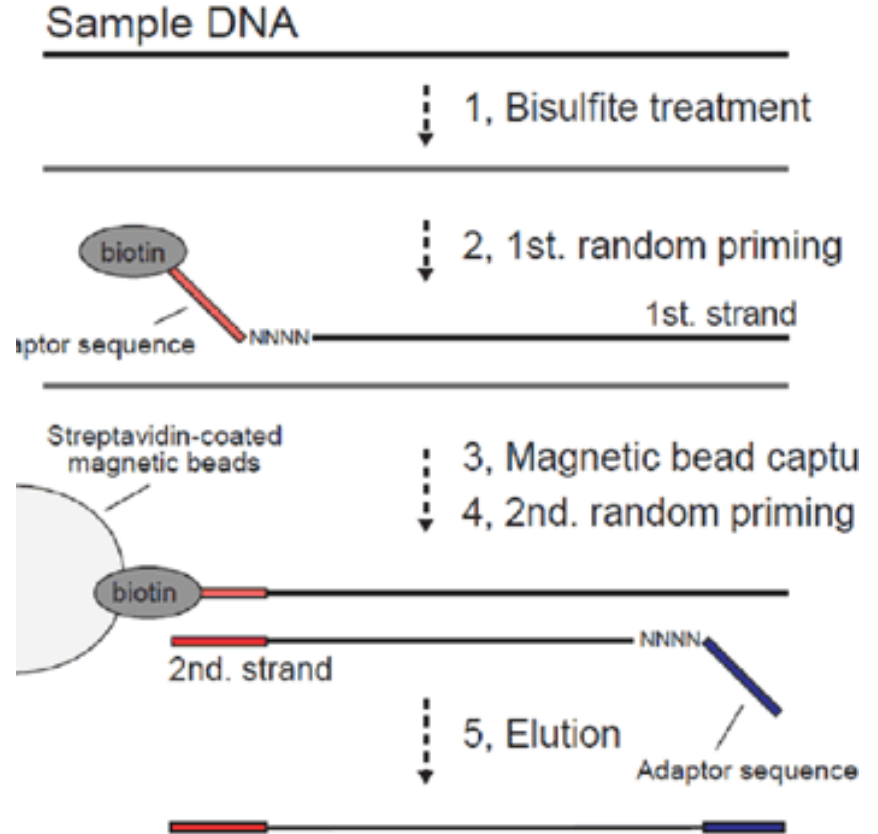
- タンパク質の位置情報は様々な機能情報をもたらす
 - 既知の機能配列との相関。既知の機能タンパク質との相関
 - 例えば二つのタンパク質結合プロファイルが一致する
 - 二つは同じ機能を持つ複合体に帰属する可能性、制御関係にある可能性を示唆
 - 健常と疾患由来細胞におけるタンパク質の振る舞いの違い
 - *分子病態の解明

BS-seqのデータ解析

従来のBS-seq

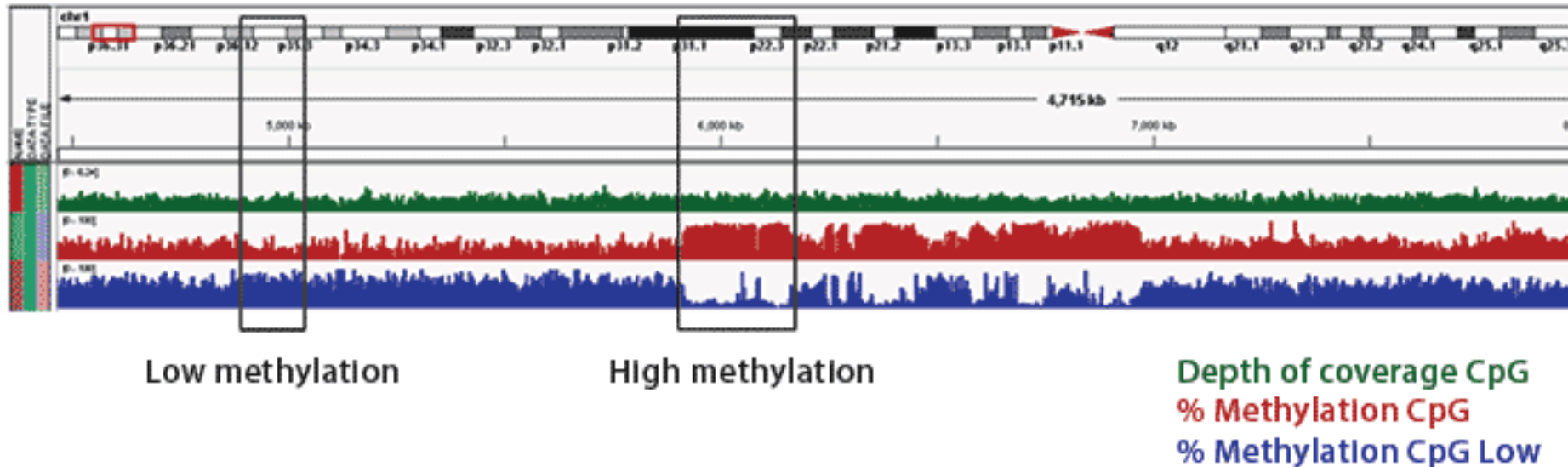


PBAT法によるBS-seq



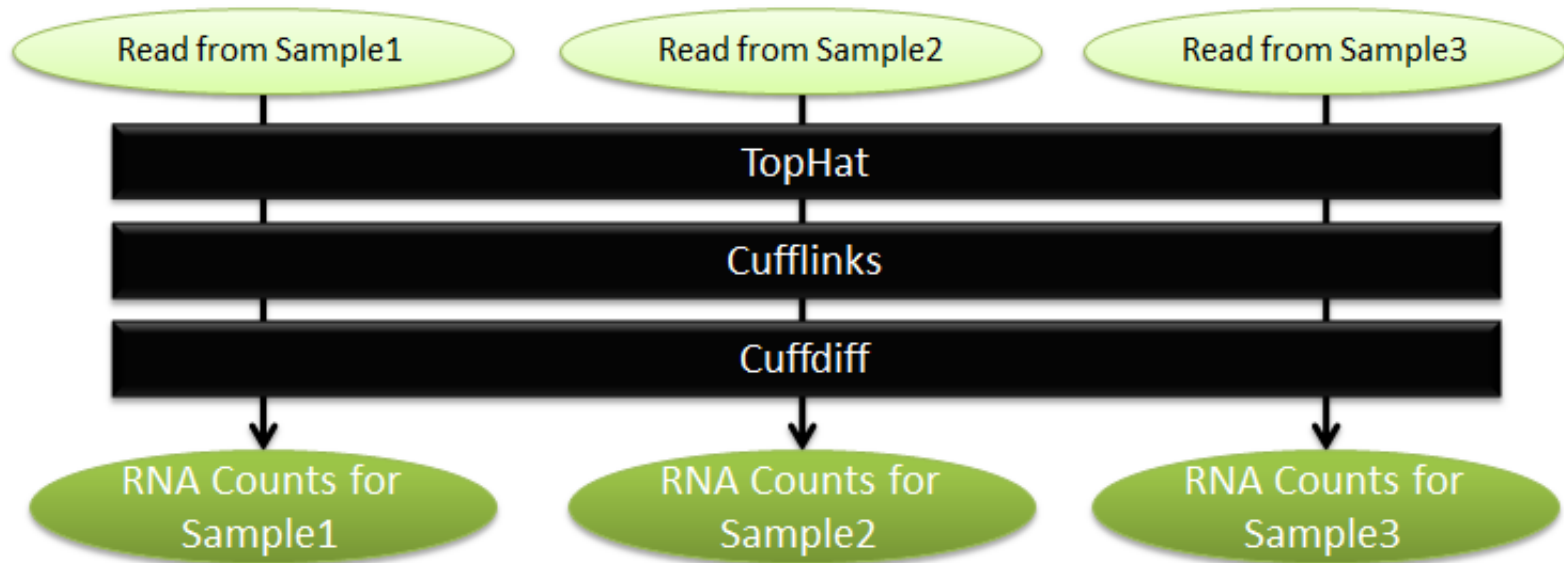
データ解析: Bismark、Seqmonk

BS-seq解析によるゲノム網羅的な高メチル化 および低メチル化領域の検出



<http://jp.illumina.com/products/truseq-dna-methylation.html>

RNA-seqのデータ解析



働き蜂



女王蜂

遺伝子発現の違いを解析する

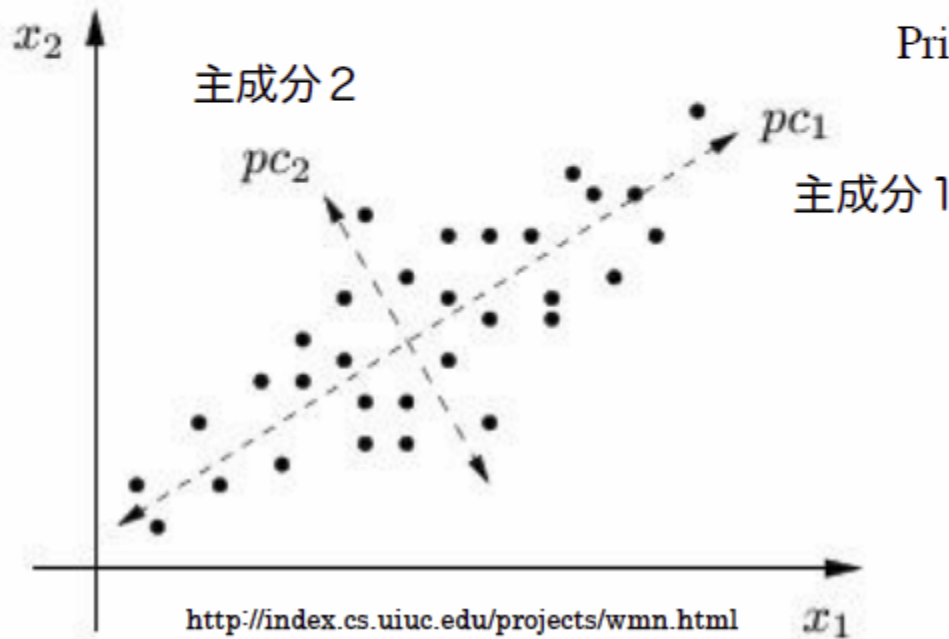
[https://www.subioplatform.com/ja/info_technical/212/ngs-options---mrna-seq-\(de-novo-assembly\)](https://www.subioplatform.com/ja/info_technical/212/ngs-options---mrna-seq-(de-novo-assembly))

主成分分析

Microarray data (m transcripts and n samples)
---> m dimensional n plots.

It's difficult to visualize such high dimensional data...

Principal Component Analysis!

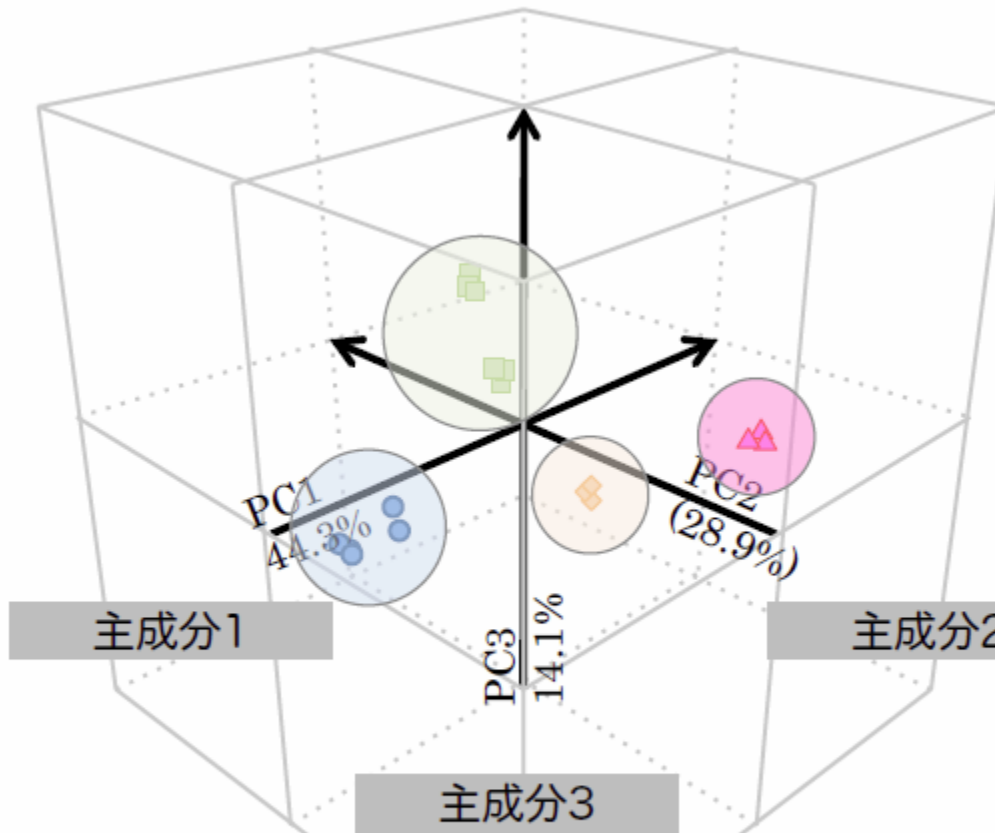


主成分に置き換えること
によって、データ情報
量の節約ができる。

<http://www.sci.shizuoka.ac.jp/scienceceafe/news/20121207.02.pdf>

主成分分析

- DMSO
- T₃
- ◆ T₃ + 4-OH-PCB159
- ▲ T₃ + 4-OH-PCB106



The microarray data were analyzed by PCA by using Subio platform software with the basic plug-in. The three-dimensional plot view of gene expression data is shown with respect to their correlation to the first 3 principal components. Approximately 73.2% variation in the samples was revealed in the first 2 principal components. Each sample used for microarray was plotted with the same symbol for each group (solid circle, DMSO; solid square, T₃; solid diamond, T₃ + 4-OH-PCB159; solid triangle, T₃ + 4-OH-PCB106).

$$44.3 + 28.9 + 14.1 = 87.3$$

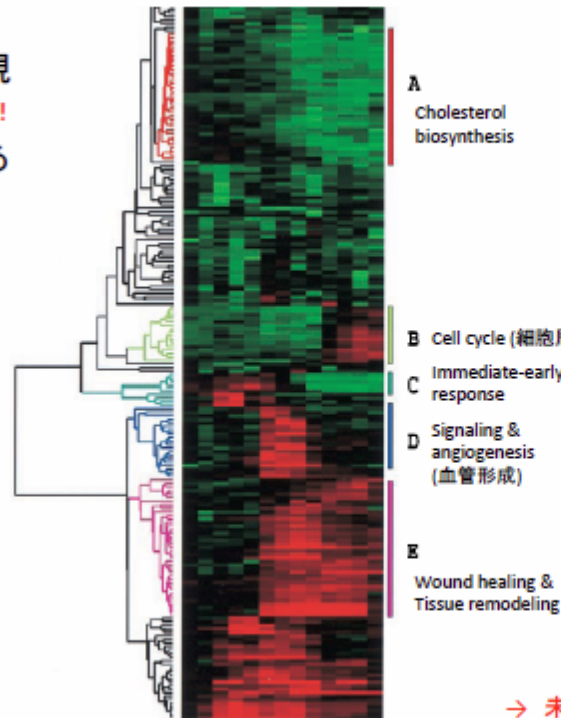
-----> 526次元の情報の87.3%を3次元で表現できたことを意味している。

<http://www.sci.shizuoka.ac.jp/scienceceafe/news/20121207.02.pdf>

階層型クラスタリング

個々の遺伝子の発現データをもとに、遺伝子のグループ分けを行う統計的手法

- 対象間の距離に基づいて、距離の近いものを1つのグループ(クラスタ)に順次まとめていく方法。生成されたクラスタがさらに上位のクラスタにまとめられていくため、分類結果は階層構造をもつものとなる
- 階層構造は、dendrogram (樹形図)とよばれる図によって視覚化される
系統樹でないことに注意！！
- クラスタ間の距離の定義の仕方が異なる、複数の方法がある
- 方法の違い、距離の尺度の違いによって結果が異なる



適用例 (1)

Eisen et al. (1998) PNAS 95: 14863

- 培養され血清による刺激を与えられたヒトの包皮繊維芽細胞における遺伝子発現
- 処理後0, 15, 30分、1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24時間後に計測
- 0分時のデータに対する相対的な発現量を評価
- 既知の遺伝子が多く含まれるクラスタもあったが、同じクラスタに特性が分かっていない遺伝子も含まれていた

→ 未知の遺伝子の機能を推測可能 24

遺伝子発現プロファイルを用いた研究展開

ミツバチの遺伝子発現
プロファイル

寿命の
制御機構

生殖機能
の制御機構

発生期間
の制御機構

ミツバチのエピジェネティック制御による
遺伝発現ネットワークと表現型との関係の解明

謝辞

研究(実験)

- ・富山県立大学工学部生物工学科
嘱託研究員 喜多 知
- ・基礎生物学研究所 重信 秀治

ミツバチのサンプル供給

- ・秋田屋本店(株) 丹羽康徳
- ・(株)ビーはいぶ 羽佐田康幸