

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15067

研究課題名（和文）単為生殖虫を標的としたゲノム編集法の確立とそれに基づく昆虫細胞内共生系の基盤解明

研究課題名（英文）An attempt to develop a method for genome editing in parthenogenetic aphids to analyze the bacteriocyte symbiosis

研究代表者

中鉢 淳（NAKABACHI, Atsushi）

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・准教授

研究者番号：40332267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：アブラムシは悪名高い農業害虫であると同時に、多くの興味深い生命現象を示す重要なモデル生物でもある。本研究では、アブラムシにおける高効率な遺伝子機能解析を実現するため、CRISPR/Cas9システムに基づき、単為生殖虫を標的としたゲノム編集法の確立を目指した。結果として、この試みは奏功しなかったものの、RNA干渉法を改良することで、細菌との共生現象に関わると目されるmRNAの有意な減少と、表現型への影響を確認することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム解析やトランスクリプトーム解析などにより、多様な生命現象に関与すると推察されるアブラムシ遺伝子の知見は蓄積したものの、アブラムシではRNA干渉の効果が低く、遺伝子改変の系も存在せず、その機能解析の進展を妨げていた。先ごろ（2019年4月）有性生殖卵を用いたゲノム編集の成功例が報告され、今後の展開が見込まれるが、多くの時間と労力を要する煩雑な手法であるとの問題が残る。今回のRNA干渉効率の改善は、簡便で効果的な遺伝子機能解析を可能とし、選択性が高く安全な害虫防除法の開発など、アブラムシ研究の発展に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Aphids are notorious agricultural pests and also important models for various interesting biological phenomena. This study was planned to develop an effective method of CRISPR/Cas9-based genome editing in parthenogenetic aphids. Although this attempt did not work, we succeeded in improving the efficiency of RNA interference that targets genes potentially involved in the bacteriocyte symbiosis, observing phenotypic changes.

研究分野：進化学、共生生物学、昆虫学、微生物学、植物保護学

キーワード：アブラムシ 遺伝子機能解析 RNA干渉 共生 菌細胞 プフネラ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

農業害虫として知られるアブラムシは、体腔内に「菌細胞 (bacteriocyte)」と呼ばれる特殊な細胞群を持ち、この細胞質中に、共生細菌ブフネラ (*Buchnera aphidicola*, Gammaproteobacteria) を収納して、両者不可分な共生関係を築いている。本共生系は、環境負荷の低い新規防除法開発の標的として有望であるとともに、異系統生物間の融合進化モデルとしても重要である。研究代表者らの先行研究により、共生系の維持に重要な役割を果たすと目される遺伝子が多数見つかったが、アブラムシでは遺伝子改変の系が確立されておらず、RNA 干渉法の効力も乏しいことから、その機能解析が困難であった。また、CRISPR/Cas9 システムに基づくゲノム編集の試みが様々な昆虫種で開始されていたが、アブラムシは複雑な生活環を持ち、胎生単為生殖が支配的で、卵生有性生殖虫を得るには短日条件による誘導を要し、その産卵数は少なく、それぞれの卵が数ヶ月にわたる「休眠」期間を要するなど、卵を用いた実験系の確立を阻害する独特な要因があった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、多産で、遺伝的背景の揃った多くの個体を容易に増殖させることが可能な胎生単為生殖虫に注目し、その生殖系列を標的として CRISPR/Cas9 システム適用することで、有性生殖卵使用時の問題を回避し、簡便・迅速なゲノム編集法を確立することを目標とした。さらに、同手法に基づき、菌細胞内共生系の維持に重要な役割を果たすと推察される機能未知遺伝子群の機能を解析し、共生系の存立基盤を明らかにすることにより、安全で効果的な新規防除法開発の基盤データを収集することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム編集

胎生単為生殖虫では、有性生殖卵を用いる際の諸問題を回避できる一方、成虫の体内で胚発生が進行するため、適切な時期の生殖細胞に single-guide RNA (sgRNA) や Cas9ヌクレアーゼなどの CRISPR-Cas9 コンポーネントを導入する必要がある。成虫体内の特定の単一細胞を狙ってこれらをインジェクトすることは現実的でないため、発生開始前の生殖細胞への偶発的な取込みを期待しながら成虫体腔内にこれらを打込むことになる。そのため、以下のように生体エレクトロポレーションを併用することで、導入分子の細胞内への取込み効率向上を図った。

#### 生体エレクトロポレーションの条件検討

エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) 単為生殖雌成虫の体腔内に CellTram vario (Eppendorf) システムを用いて、StemMACS eGFP mRNA (Miltenyi Biotech) をインジェクトし、電気パルス発生装置 Cure-Gene (Celliproduce) で、様々な条件の電気パルスを与えた後、蛍光を検出し、卵巣小管内への核酸導入効率の最も高い条件を決定した。

#### RNA 発現プラスミドの構築と RNA 合成

標的遺伝子のガイド配列を設計・合成し、sgRNA 発現プラスミド DR274 (Addgene plasmid 42250) に挿入した。また、Cas9 ORF 単独、および生殖細胞特異的に発現するとされる vasa mRNA の非翻訳領域 (UTR) を Cas9 ORF の両端に連結したものをクローニング (pGEM\_Apvasa1\_Cas9) した。これら RNA 発現用プラスミドと mMessage mMachine T7 Transcription Kit (Life Technologies) を用いて、アブラムシへの投与に用いる sgRNA および Cas9 mRNA を合成した。その後、Cas9 mRNA については、Poly(A) Tailing Kit (Life Technologies) を用いて 3' 末端に Poly(A) Tail を付加した。

#### 単為生殖雌成虫への CRISPR/Cas9 コンポーネント投与

エンドウヒゲナガアブラムシの単為生殖雌成虫に対し、sgRNA と Cas9 mRNA、ないしは pGEM\_Apvasa1\_Cas9 の混合溶液をインジェクト後、(1) で決定した条件の電気パルス刺激を与えた。

#### 変異導入の検証

上記投与虫から産出されたアブラムシ幼虫全頭の触角より個別にゲノム DNA を抽出し、標的配列を含む領域を PCR 増幅ののち、産物を変性・アニーリングし、Guide-it Resolvase (Clontech/TaKaRa) による切断処理後、アガロースゲル電気泳動を行い、切断の有無により変異導入の成否を判定した。

#### (2) RNA 干渉

##### 二本鎖 RNA (dsRNA) の調製

標的遺伝子の一部を PCR 増幅し、精製後の産物を鋳型として、MEGAscript RNAi Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて dsRNA を合成・精製した。

#### 単為生殖雌成虫への dsRNA 投与

調製した dsRNA を単為生殖雌成虫の体腔内に CellTram vario システムを用いてインジェクトし、ゲノム編集の際と同様、電気パルス発生装置 Cure-Gene で電気パルスを与えて細胞内への dsRNA の取込み促進を図った。

#### 定量 RT-PCR による標的 mRNA 量の測定

RNA 干渉処理後の虫体より RNA を抽出し、DNaseI 処理後、cDNA を合成した。これを鋳型とし、Thermal Cycler Dice Real Time System TP860 (TaKaRa) と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて標的遺伝子の cDNA を定量した。校正にはハウスキーピング遺伝子 *RpL7* を用いた。

#### 免疫組織化学

RNA 干渉処理個体およびその次世代虫を対象に、抗標的遺伝子産物抗体、蛍光ラベル二次抗体を用いた免疫組織化学を行い、産物タンパク質の局在を解析した。

## 4. 研究成果

共生関連遺伝子に対応する sgRNA および Cas9 発現プラスミドや Cas9 mRNA をエンドウヒゲナガアブラムシ単為生殖雌成虫の血体腔内にインジェクトし、生体エレクトロポレーションにより細胞内への取込み促進を図った後、次世代虫を用いて標的配列の変化を検証したが、変異の導入は認められず、胎生単為生殖虫を標的とした「簡便・迅速な」ゲノム編集手法の確立は困難であると判断された。また、2019 年 1 月に発表された、エンドウヒゲナガアブラムシを用いた RNA 干渉法の改善に関する文献 [Induction of RNAi Core Machinery's Gene Expression by Exogenous dsRNA and the Effects of Pre-exposure to dsRNA on the Gene Silencing Efficiency in the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Front Physiol.*(2019) 9:1906. doi: 10.3389/fphys.2018.01906] にも触発され、「アブラムシの共生関連遺伝子の働きを何らかの手法で阻害・抑制し、当該遺伝子の機能解析を行う」との本来の目的に立ち返るべく、アブラムシでの低効率が問題となっていた RNA 干渉法の改善に取り組んだ。なお、2019 年 4 月には、アブラムシ有性生殖卵を用いたゲノム編集の成功例 [An Integrated Protocol for Targeted Mutagenesis with CRISPR-Cas9 System in the Pea Aphid. *Insect Biochem Mol Biol* (2019) 110:34-44. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.016] が報告されたが、やはり 1 回の試行に最短で 7 ヶ月を要する煩雑な手法であり、人的資源の制限もあり、これを踏襲するのではなく、RNA 干渉法の改善に注力した。その結果、当該文献 (Front Physiol 2019) の内容を踏まえ、本研究課題独自の改良を複数加えたことで、標的 mRNA の有意な減少を確認し、そのフェノタイプを得ることに成功した。これは、当該遺伝子の機能解明に直結するとともに、アブラムシでの遺伝子機能研究全般に適用可能と期待される、重要な成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakabachi A, Malenovsky I, Gjonov I, Hirose Y   | 4. 巻<br>-              |
| 2. 論文標題<br>16S rRNA Sequencing Detected <i>Proffttella</i> , <i>Liberibacter</i> , <i>Wolbachia</i> , and <i>Diplorickettsia</i> from Relatives of the Asian Citrus Psyllid | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>Microbial Ecology   | 6. 最初と最後の頁<br>-        |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00248-020-01491-z   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |
| 1. 著者名<br>Nakabachi A, Fujikami M   | 4. 巻<br>118            |
| 2. 論文標題<br>Concentration and distribution of diaphorin, and expression of diaphorin synthesis genes during Asian citrus psyllid development                                 | 5. 発行年<br>2019年        |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Insect Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>103931   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jinsphys.2019.103931   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |
| 1. 著者名<br>Nakabachi A, Okamura K  | 4. 巻<br>14(6)          |
| 2. 論文標題<br>Diaphorin, a polyketide produced by a bacterial symbiont of the Asian citrus psyllid, kills various human cancer cells   | 5. 発行年<br>2019年        |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One  | 6. 最初と最後の頁<br>e0218190 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0218190   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |
| 1. 著者名<br>Yamada T, Hamada M, Floreancig P, Nakabachi A   | 4. 巻<br>14(5)          |
| 2. 論文標題<br>Diaphorin, a polyketide synthesized by an intracellular symbiont of the Asian citrus psyllid, is potentially harmful for biological control agents               | 5. 発行年<br>2019年        |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One  | 6. 最初と最後の頁<br>e0216319 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0216319   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Dan H, Ikeda N, Fujikami M, Nakabachi A  | 4. 巻<br>12(12)         |
| 2. 論文標題<br>Behavior of bacteriome symbionts during transovarial transmission and development of the Asian citrus psyllid | 5. 発行年<br>2017年        |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One   | 6. 最初と最後の頁<br>e0189779 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0189779   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>中鉢淳   | 4. 巻<br>54(10)        |
| 2. 論文標題<br>昆虫のオルガネラ様共生細菌たち                                  | 5. 発行年<br>2016年       |
| 3. 雑誌名<br>化学と生物   | 6. 最初と最後の頁<br>753-761 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1271/kagakutoseibutsu.54.753 | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Aoto J, Nakabachi A  |
| 2. 発表標題<br>RNA interference approach to analyze functional role of a gene upregulated in the aphid bacteriocyte |
| 3. 学会等名<br>The Irago Conference 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Horita S, Nakabachi A  |
| 2. 発表標題<br>Functional analysis of Dcitri_1, a gene assumed to play a pivotal role in the bacteriome symbiosis of the Asian citrus psyllid |
| 3. 学会等名<br>The Irago Conference 2019 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>S. Hashimoto and A. Nakabachi   |
| 2. 発表標題<br>Immunochemistry of Dcitr1, an orphan protein highly upregulated in the bacteriome of the Asian citrus psyllid |
| 3. 学会等名<br>The Irago Conference 2018 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳                                |
| 2. 発表標題<br>昆虫-細菌間融合共生系からの有用遺伝子の獲得と応用展開        |
| 3. 学会等名<br>平成30年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会 |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>池田直也、藤上雅也、壇勲興、中鉢淳                    |
| 2. 発表標題<br>ミカンキジラミにおけるオルガネラ様共生細菌2種の感染・胚発生時の動態観察 |
| 3. 学会等名<br>環境微生物系学会合同大会2017                     |
| 4. 発表年<br>2017年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤上雅也、椛嶋克哉、中鉢淳                           |
| 2. 発表標題<br>ミカンキジラミ共生細菌の産生する新規毒性ポリケチド「ディアフォリン」の局在解析 |
| 3. 学会等名<br>環境微生物系学会合同大会2017                        |
| 4. 発表年<br>2017年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山田倫子、濱田雅東、中鉢淳                                |
| 2. 発表標題<br>オルガネラ様共生細菌の産生する新規ポリケチド「ディアフォリン」は真核生物に広く毒性を示す |
| 3. 学会等名<br>環境微生物系学会合同大会2017                             |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳                                |
| 2. 発表標題<br>昆虫-細菌間融合共生系の基盤解析および共生細菌からの有用遺伝子の探索 |
| 3. 学会等名<br>平成29年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会 |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳                                 |
| 2. 発表標題<br>キジラミから見つかったオルガネラ様共生細菌の産生する新規毒性ポリケチド |
| 3. 学会等名<br>第63回トキシシンポジウム(招待講演)                 |
| 4. 発表年<br>2016年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Atsushi Nakabachi  |
| 2. 発表標題<br>Aphid gene of bacterial origin encodes a protein transported to Buchnera |
| 3. 学会等名<br>The XXV International Congress of Entomology(招待講演)(国際学会)                 |
| 4. 発表年<br>2016年   |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳                   |
| 2. 発表標題<br>アブラムシ-プフネラ間共生の理解を目指して |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会第87回沖縄大会        |
| 4. 発表年<br>2016年                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳   |
| 2. 発表標題<br>動物-細菌間融合共生系の基盤解析  |
| 3. 学会等名<br>文部科学省研究大学強化促進事業・豊橋技術科学大学シンポジウム「東三河から世界へ ～産学官連携による新しい価値の創造～」 |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中鉢淳                                |
| 2. 発表標題<br>昆虫-細菌間融合共生系の基盤解析および共生細菌からの有用遺伝子の探索 |
| 3. 学会等名<br>平成28年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会 |
| 4. 発表年<br>2017年                               |

〔図書〕 計1件

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>中鉢淳                     | 4. 発行年<br>2016年             |
| 2. 出版社<br>化学同人                    | 5. 総ページ数<br>281 ( 213-224 ) |
| 3. 書名<br>半翅目昆虫の菌細胞内共生 ( 「共生微生物」 ) |                             |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-



6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|