

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450236

研究課題名(和文)RNA干渉を用いたシロアリ駆除技術の開発

研究課題名(英文)Development of termite control technology by using RNA interference

研究代表者

板倉 修司 (ITAKURA, Shuji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60257988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、幼若ホルモンの運搬と保護に関わるヘキサメリンmRNAの相補配列をもつ2本鎖RNAを遺伝子組換え技術を用いて大量に産生した。この2本鎖RNAをシロアリに経口投与することで、RNA干渉によるヘキサメリンmRNAの切断・分解、タンパク質量の低減の誘導、さらには幼形生殖虫への誘導などシロアリ分化制御を検討した。また、分化制御によって引き起こされる職蟻、兵蟻、ニンフ(将来の翅蟻)の存在割合のアンバランスによるコロニー崩壊の可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study, double-stranded RNA (dsRNA) having complementary sequence of hexamerin mRNA related to juvenile hormone transport and protection was produced in large quantities using genetic recombination technology. By RNA interference (RNAi) using feeding method, we examined decrease in hexamerin mRNA, reduction of hexamerin protein expression, and control of termite caste differentiation. Also, we examined the possibility of colony downfall of termite due to the imbalance of the proportion of workers, soldiers, and nymphs (future alates) caused by differentiation control using RNAi.

研究分野：昆虫生化学 木材保存学

キーワード：RNA干渉 分化制御 幼形生殖虫 シロアリ増殖 コロニー崩壊

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉は真核生物に特異的な機構であり、昆虫では、キイロショウジョウバエ、ミバエ、ネッタシマカなど双翅目、タバコスズメガ、アメリカタバコガ、マツマダラメイガ、ヨトウガなど鱗翅目、ミツバチなど膜翅目、コクヌストモドキ、ネキリムシ、ナミテントウ、コロラドハムシなど鞘翅目、モモアカアブラムシ、トビイロウンカなど半翅目、コオロギなど直翅目、ワモンゴキブリ、シロアリなど網翅目で RNA 干渉による遺伝子発現の抑制が報告されている。

海外では、RNA 干渉を用いたミツバチに病原性を示すウイルスの駆除法の開発が実用化目前まで進んでいる。蜂群崩壊症候群を引き起こす原因の 1 つであるイスラエル急性麻痺ウイルスに対して作用する 2 本鎖 RNA を糖蜜と混合した餌をミツバチに投与し、イスラエル急性麻痺ウイルスを駆除することでミツバチのコロニーを保護する技術が開発されている。この技術に対して、アメリカ食品医薬品局 (FDA) による認証プロセスが進んでいる。このプロセスでは、フロリダ州、ペンシルバニア州、イスラエルで実施した野外試験により、FDA がアメリカにおける広域臨床試験の実施を認可するのに十分な結果が得られており、アメリカの主要な養蜂家の参加のもと、RNA 干渉によるイスラエル急性麻痺ウイルス駆除試験が進行中である。また、イスラエル急性麻痺ウイルスに加えて、Kashmir bee virus ,Black queen cell virus , deformed wing virus などにも有効な RNA 干渉技術も開発され、研究室環境下での有効性の評価が進められている。

申請者の研究グループは、日本の主要な家屋加害シロアリであるヤマトシロアリとイエシロアリを対象とした RNA 干渉実験を継続してきた。具体的には、約 21 塩基長からなる短鎖 2 本鎖 RNA と約 600 塩基長からなる長鎖 2 本鎖 RNA をヤマトシロアリの職蟻とニフ (有翅虫の若虫) に注入し、ヤマトシロアリに対する遺伝子発現抑制効果を比較検討し、ヤマトシロアリでは、短鎖 2 本鎖 RNA と長鎖 2 本鎖 RNA とでは遺伝子発現抑制効果に大きな差はなく、どちらも効率的に標的遺伝子の発現を抑制することを報告した。また、イエシロアリの腸内共生原生生物に対する短鎖 2 本鎖 RNA による RNA 干渉の効果を、標的となる短鎖 2 本鎖 RNA を添加した紙を宿主であるイエシロアリに餌として与え、イエシロアリの腸内へ導入し、後腸に達した時点で共生原生生物の体内にエンドサイトーシスにより取り込ませるといった摂食法により検討した。結果として、共生原生生物のセルラーゼを標的として短鎖 2 本鎖 RNA を投与すると、共生原生生物の細胞膜が破壊されるという現象を見出した。

昆虫に対する RNA 干渉実験では、一般に、500 塩基長以上の長鎖 2 本鎖 RNA を合成し、マイクロインジェクターにより 2 本鎖 RNA を

注入投与する注入法、あるいは昆虫の餌に 2 本鎖 RNA を混合して餌とともに取り込ませる摂食法により投与されることが多いが、申請者の研究グループは約 20 塩基長からなる短鎖 2 本鎖 RNA を用いた場合にも長鎖 2 本鎖 RNA と同程度の遺伝子発現抑制効果があることを見出した。

従来、シロアリの防除駆除には、殺虫機能を有する化学物質を用いる化学的手法、金網や粉碎された石を用いてシロアリの侵入経路に障壁を設置する物理的手法、昆虫に感染するメタリジウム菌などを用いる生物学的手法が用いられてきた。これらの防除駆除法のうち、化学的手法ではシロアリ以外の昆虫や動物にも効果が及ぶ弊害があり、物理的手法では施工の際に生じる不具合によりシロアリの木質構造物への侵入が可能になる場合がある。また、メタリジウム菌によるシロアリ駆除は、研究室レベルで実施する試験では殺蟻効果が認められるものの、実際に加害を受けている木質構造物では有効ではないなど問題がある。

日本国内では、種々の昆虫に対する RNA 干渉実験が多く行われているが、昆虫の防除駆除の視点から進められている RNA 干渉実験は皆無に等しく、海外で進められているイスラエル急性麻痺ウイルスや Kashmir bee virus , Black queen cell virus , deformed wing virus に対する RNA 干渉による駆除技術に対抗できるような研究は行われていない。将来的には RNA 干渉を応用した昆虫防除駆除技術が世界的に普及するものと考えられ、国内でも研究を進める必要がある。

## 2. 研究の目的

RNA 干渉を応用してシロアリ特異的に働く生物学シロアリ防除駆除法を開発することを目的とする。そのために、まずシロアリあるいは共生原生生物のメッセンジャー RNA を標的とした 2 本鎖 RNA を、遺伝子組み換え技術を用いて大量に産生する。この 2 本鎖 RNA とセルロース性基材を混合した餌を作成し、効率的にシロアリに食べさせる摂食投与法を開発する。一度に多くのシロアリに 2 本鎖 RNA を投与し、シロアリに対する有効性を検討する。具体的には、摂食法で投与した場合に起こる標的メッセンジャー RNA 存在量の変化ならびに標的タンパク質量の変動を定量し、マイクロインジェクションによる注入法でシロアリの体腔内に直接 2 本鎖 RNA を投与した場合のメッセンジャー RNA 量とタンパク質量と比較する。

また、摂食法による投与実験では遺伝子組換え体を滅菌した後に 2 本鎖 RNA をシロアリに投与するため、遺伝子組み換え体の完璧な滅菌方法を検討する。

標的遺伝子の種類によっては、シロアリの階級分化に影響する場合があるので、RNA 干渉実験による階級分化への影響についても検討する。

### 3. 研究の方法

これまでの申請者の研究グループの研究により、ヤマトシロアリの Hexamerin 遺伝子の mRNA のうちヤマトシロアリ以外と相同性が低い約 600 塩基鎖長の長鎖配列 (図 1) と約 20 塩基鎖長の短鎖配列 (図 1) を標的配列とし、その標的配列と相補配列からなる 2 本鎖 RNA をマイクロインジェクターを用いた注入法により投与する RNA 干渉実験で、ヤマトシロアリの職蟻とニフで Hexamerin 遺伝子の発現が抑制される事が報告されている。本研究では、Hexamerin に対する RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果が認められている短鎖 2 本鎖 RNA と長鎖 2 本鎖 RNA を、遺伝子組み換え大腸菌を用いて、大量に生産する方法を検討した。具体的な方法として、L4440 プラスミドの *Hind* III と *Sac* II を制限酵素とし、その制限酵素の間に標的配列 DNA (2 本鎖 RNA) をライゲーションした (図 2)。ライゲーションを行ったプラスミドを用いて大腸菌の形質転換を行い、2 本鎖 RNA を調製するための培養方法を検討した。その際使用する宿主大腸菌として、Isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG) 添加で T7 プロモーターからの標的配列 2 本鎖 RNA の誘導が可能な, BL21(DE3) 大腸菌と HT115(DE3) 大腸菌を使用した。

```

1 atgaacactg cctctctgtt cggcagactg gtggcggctt tggctctggg cggctctctt
61 gaccaccatg tagggaagaa agttagcagac aaaccgttcc tcatgaagca gaaaaaacctc
121 ctagggtgtc tccacaggat tcatcaagat aatgatttca aagagcaggt tgatgtgggt
181 aatcaacctg acattgaagc acatatacag aactacaaga atacaaaagt agtgaagaag
241 ttatatacct actacaagaa gggcatgtgt caacgtctgg agccgtttct atgtgtttac
301 aagaactcacc ttgacacagg tatctctctg ttcgagctct tcatatttgc taacgacttc
361 gatactttct acaagactgc ctgtgtggcc cggcagctgt tgaacccctg catgtttctg
421 tattctctca ctgtctggct ccttcaccgc gacgacaga cagatgtcat gatgcccggg
481 cctctcagag tttaccataa cttctctgta gacaggtgta tcatcaaaa ggcctataag
541 tactggatga tgcacgtrtg caaacctgaa catcaacct acatcatccc aatgactaac
601 accatgaaga gcaaggagaa tttgtgtgac taacttjacaq aagacgtggg cttgaagctg
661 ttcaactatg actacccgat gtaactaccc agctgtttca acgttacga gtaacggcaac
721 aagttcgacc gtgcggggga gatgttcttc taactgcaag accagctgta cgtctgctac
781 agcttgagga gaattgocaa cggcatgccc gaagtccagc cctctgttta caacaacccc
841 ctcaagaccg catacaaccc caacctgatg taaccaaccg gccaaagaat gcctccacgc
901 cccagcgaca agctctgtac taactctgac agtcaacca tgcgagacat caagaacctac
961 gaacggaggg tggcggagcc aatgcacttc ggctacgta aggaagaaca cctcaaaatt
1021 cactcaatgt acagagataa taatggcact gactacctag caccagatgt agaagcctcc
1081 taacaactccc ccaactacta ttaactacgt tccctgtttc aotttcaacc catgtgttta
1141 gggcatatga tggatccatg ccaacaagcac gggctcgcac ccagcgcctc ggaacaaccc
1201 gagaagccc tgaaggatg cgcctactac cagctgtaca agcgaatgta ccactttagt
1261 aataagtaga aggcaggctt cctctgctac acgcagcaac agctttgggt cgaagtagtg
1321 acggttgaga atgtgtgatg ttgtaagatg taacagtaaa tggagaactt tgaatttagc
1381 ctggcggcga ccatatattg ggccaaggag gaggatattg taggtgtgaa cttgctattt
1441 cggcagccac gttcgaatca caagccattc accataaga tagaggtcaa cagcggaaag
1501 gacgtcgatg ctagctgtgc ttgtttcttg ggcocaaagc ataatcaact ggaagagaaa
1561 tgggacttga atgagcgagc gcaactcttc gtcgagatgg accgcttccg gcatctattc
1621 ccagctggca agagtgtaat cgaacgcaac tcccaagact cctcaataat tcaacctaca
1681 cccagcagct acagacatt cgtcaagaaa gtgcagagcg cttatgatgg caaaacctac
1741 taactcaatg acaagagcca caactactgc ggattccccg agaactgtct gctgcccacg
1801 ggcagagaag gagggtgagc cttcaacttc taagcaataa tcaagccata cgtcaaaacc
1861 gatgagcag actctggagc tttagactac aaagccttca gctactcggg tctgggcaaa
1921 gaccgcaag atcctgagca tttagactac aaagccttca gctactcggg tctgggcaaa
1981 aaggaacttt acaccacca catgtacttc aaggtgtgac aaattttcca caagaacttc
2041 gaagaagtca gtaactccca ccactagcag aacaatgtga gatttcaacg tcaactotgt
2101 tgaagggaaa tgggttcaat atttcaaac ctaagcgaac tgaactattg caatctgtgt
2161 tctcaacatc ggtgaatata atactcgggt tttctggaat gtgtgtcgtt gtaattctgt
2221 agagtatttg ctaaaatttc gggggagaat actacaacca ttotaaccag aagaagttaag
2281 caccatggtt cccaagaag tggttattca tctacaacaa aaagcggcgc caaattcccc
2341 aagcagtag tcaaacctg saatactgat ggaagatttc aaacttaacg accagttttc
2401 gttgcaatac tgaattcaat atctatgat cgtatttttt ggcttcgacc gatctgttaag
2461 tcaagatgaa tgaactctg cttgtactgg agaatttgaa ctgaactaac ttatacatta
2521 tctgtgagat gttgtatgct aatttttaat agataaaaaa gtgcaataaa aacagaaata
2581 taanaaaaaa aaaaaaaa

```

図1. ヤマトシロアリのヘキサメリン遺伝子  
 囲い: 長鎖dsRNA、下線: 短鎖dsRNA

(1) BL21(DE3)大腸菌を用いた 2 本鎖 RNA の調製

標的配列 (図 1) を融合した L4440 プラスミド (図 2) を用いて形質転換した BL21(DE3) 大腸菌を、アンピシリン添加した LB 液体培地で、37 で 1 晩振とう培養後、IPTG を添加し、37 で任意の時間 (4 時間, 6 時間, 1 晩, 2 晩) 培養を続け、2 本鎖 RNA の誘導を行った。また、BL21(DE3) 大腸菌は 2 本鎖 RNA を

分解する RNase を持つので、RNase 阻害剤として  $Mn^{2+}$  を添加した実験も行った。RNase 阻害剤を添加したサンプルについては、IPTG を添加し、3 時間培養した後、300mM の NaCl と 25mM の  $MnCl_2$  を 1ml ずつ添加しさらに 1 晩培養した。各サンプルとも培養後、SV Total RNA Isolation System (Promega) により RNA を抽出し、30% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを、エチジウムブロマイド水溶液に浸した後、UV を照射して RNA を可視化し観察した。

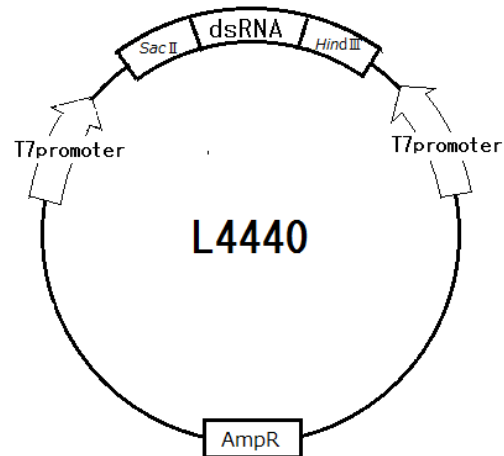


図2. 組み換えプラスミド

(2) HT115(DE3)大腸菌を用いた 2 本鎖 RNA の調製

塩化カルシウム法で HT115(DE3) 大腸菌のコンピテントセルを作成し、長鎖標的配列あるいは短鎖標的配列を融合した L4440 プラスミドによる形質転換を行った。プラスミドを導入した大腸菌をアンピシリン添加した LB 寒天培地で 1 晩培養後、シングルコロニーをアンピシリン添加した LB 液体培地にて 37 で一晩振とう培養した。培養後、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) により大腸菌から抽出したプラスミド DNA の配列をシークエンサーで解析した。

また、形質転換した大腸菌を LB 液体培地中で、IPTG により 2 本鎖 RNA の増幅を誘導した。誘導後、SV Total RNA Isolation System (Promega) により RNA を抽出し、30% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを、エチジウムブロマイド水溶液に浸した後、UV を照射して RNA を可視化し観察した。

(3) 2 本鎖 RNA 誘導後の大腸菌滅菌方法

大腸菌を滅菌するために、90 で 20 分間加熱することによる滅菌方法、70% エタノールによる滅菌方法、-80 で冷凍し常温解凍を行うことによる滅菌方法をそれぞれ検討した。IPTG で 2 本鎖 RNA の増幅を誘導した菌体を滅菌し、菌体から SV Total RNA Isolation System (Promega) により RNA を抽出し、30% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により標的 2 本鎖 RNA の存在を確認した。

(4) 摂食法によるヤマトシロアリへの2本鎖 RNA 含有滅菌大腸菌の投与

シャーレに直径3cmのろ紙を置き、ヤマトシロアリの職蟻を10匹入れた。70%エタノールで滅菌した2本鎖 RNA 含有大腸菌を、50 $\mu$ l の Nuclease-free water で懸濁し、ろ紙に添加した。28の暗所で1か月間飼育し、形態的な変化がないか確認した。Nuclease-free water のみを50 $\mu$ l 添加したサンプルもつくり、これをコントロールとした。また、ヘキサメリン遺伝子の発現量を定量するため、飼育中の1, 2, 4, 6, 8日目にヤマトシロアリの頭と中腸と胴から、それぞれ Total RNA を抽出し、Ct 法を用いたリアルタイム定量 PCR を行った。同様の実験をニフについても行った。

#### 4. 研究成果

(1) BL21(DE3)大腸菌を用いた2本鎖 RNA の調製

泳動後のゲルに UV を照射し、観察を行ったところ、長鎖2本鎖 RNA と短鎖2本鎖 RNA とともに標的鎖長付近にバンドを確認することはできなかった。また、RNase 阻害剤として MnCl<sub>2</sub> を添加したサンプルについても RNA の標的鎖長付近にバンドは確認できなかった。この結果から、まず IPTG 添加後の誘導条件 (IPTG 濃度、培養温度、培養時間など) に問題があったことが考えられる。また、BL21(DE3)大腸菌は *recA* 遺伝子を持っているので、相対的な塩基配列があると、大腸菌の染色体 DNA と導入したプラスミド DNA の組み換えが起こる可能性がある。本実験では、何度も植え継ぎしていたサンプルを使用していたので、大腸菌に導入したプラスミド上の配列の欠失や置換などが起こっていた可能性も原因として考えられる。また、BL21(DE3)大腸菌と HT115(DE3)大腸菌はどちらも *recA* 遺伝子を持つので、実験に使用する際は継代培養していない形質転換後の大腸菌を使用するべきであると考えられる。

(2) HT115(DE3)大腸菌を用いた2本鎖 RNA の調製

シークエンス解析により、長鎖標的配列あるいは短鎖標的配列を融合した L4440 プラスミドによる HT115(DE3)大腸菌の形質転換体から抽出したプラスミドの配列を確認したところ、長鎖2本鎖 RNA と短鎖2本鎖 RNA とともに標的配列の挿入が確認できた。

また、IPTG による2本鎖 RNA 増幅の誘導後に行った電気泳動では、短鎖2本鎖 RNA 標的鎖長付近ならびに長鎖2本鎖 RNA 標的鎖長付近において2本鎖 RNA のバンドを確認することができた。

(3) 2本鎖 RNA 誘導後の大腸菌滅菌方法

滅菌方法に関しては70%エタノールによる滅菌を行ったすべての菌体において滅菌を確認することができた。滅菌後の大腸菌から抽出した RNA を電気泳動した結果、短鎖2本鎖 RNA、長鎖2本鎖 RNA とともに標的鎖長付

近にバンドが観察され、滅菌によって2本鎖 RNA が分解されないことを確認することができた。

(4) 摂食法によるヤマトシロアリへの2本鎖 RNA 含有滅菌大腸菌の投与

現在、2本鎖 RNA を増幅させ70%エタノールによる滅菌処理を行った菌体をろ紙に添加し、このろ紙をヤマトシロアリに摂食させることによる RNA 干渉実験を行っている。また、リアルタイム PCR により2本鎖 RNA 投与時の Hexamerin mRNA の量的変化を定量し、ヤマトシロアリの形態変化との関連を検討している。

これまでに、2本鎖 RNA 含有滅菌大腸菌の摂食法による投与により、ヤマトシロアリのニフの幼形生殖虫 (ニフオイド) への分化が促進されることが明らかになった。幼若ホルモン結合タンパク質である Hexamerin の発現量が低下したことで、幼若ホルモンが受容体に到達できなくなり、成虫形質である幼形生殖虫への分化が促進されたものと考えられる。

#### 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 1 件)

板倉 修司, シロアリ駆除への RNA 干渉技術の応用, 昆虫と自然, 査読無, 50 巻, 2015, 34-37.

[学会発表](計 7 件)

浅井 源二郎, 田中 裕美, 板倉 修司, ヘキサメリン dsRNA によるヤマトシロアリの分化制御, 日本木材保存協会第 33 回年次大会, 2017 年 5 月 23 日, メルパルク東京 (東京都・港区)

浅井 源二郎, 田中 裕美, 板倉 修司, 摂食法を用いた RNA 干渉技術によるヤマトシロアリの分化制御, 第 65 回日本木材学会大会, 2017 年 3 月 19 日, 九州大学 (福岡県・福岡市)

浅井 源二郎, 村林 陽太郎, 田中 裕美, 板倉 修司 2本鎖 RNA によるシロアリ制御, 第 28 回日本環境動物昆虫学会年次大会 2016 年 11 月 12 日, 信州大学 (長野県・上田市)

浅井 源二郎, 村林 陽太郎, 田中 裕美, 板倉 修司, ヤマトシロアリのヘキサメリン dsRNA の大腸菌による大量生産, 日本木材保存協会第 32 回年次大会, 2016 年 5 月 24 日, メルパルク東京 (東京都・港区)

板倉 修司, 服部 一哉, 市田 裕, 田中 裕美, ヤマトシロアリとイエシロアリの microRNA 解析, 日本木材保存協会第 32 回年次大会, 2016 年 5 月 24 日, メルパルク東京

(東京都・港区)

服部 一哉,市田 裕,田中裕美,板倉 修司, ヤマトシロアリの microRNA 解析, 第 64 回日本木材学会大会, 2016 年 3 月 28 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

板倉 修司,辻 美帆,山口 大輔,田中裕美, シロアリに対する RNA 干渉, 第 26 回日本環境動物昆虫学会年次大会, 2014 年 11 月 29 日, 長崎大学 (長崎県・長崎市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板倉 修司 (ITAKURA, Shuji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号: 60257988

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: