

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660274

研究課題名(和文)CRISPR/Casシステムを用いた遺伝子ノックアウト法の吸汁性昆虫への適用

研究課題名(英文)Application of the gene knockout method using CRISPR / Cas system to the hemipteran insect

研究代表者

松本 由記子(Matsumoto, Yukiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域・主任研究員

研究者番号：80414944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：半翅目昆虫ツマグロヨコバイでCRISPR/Cas9を試みた。メス成虫にRNAをインジェクションし、その次世代幼虫でのゲノム改変を期待した。Parental RNAiと同様の手法であり、parental RNAiがヨコバイで有効であることを確認した(Arch Insect Biochem Physiol. 91:152-164)。NcLac1S(唾腺遺伝子)、NcLac2(表皮ラッカーゼ遺伝子)を用いてメス成虫にCRISPR/Cas9を行い、次世代幼虫のゲノムDNAをチェックしたが、残念ながら欠失や改変は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：I tried CRISPR / Cas 9 in *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). RNA was injected into adult females, and genome modification in the next generation larvae was expected. It is the same method as parental RNAi, therefore, parental RNAi method was confirmed to be effective in *N. cincticeps* (Arch Insect Biochem Physiol. 91:152-164.). CRISPR / Cas9 was performed on female adults using NcLac1S (a salivary gene) and NcLac2 (an epidermal laccase gene), and the genomic DNA of the next generation larvae was checked, but unfortunately no deletion or modification was observed.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：CRISPR ツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* Parental RNAi

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 吸汁性昆虫にはアブラムシをはじめ多くの農作物害虫が含まれ、直接的な吸汁害のみならず病原等を媒介して被害を与える。昆虫が吸汁する際に吐出する唾液成分は、植物の防御反応に対抗して吸汁を達成するために必須の機能を持つと考えられる (Hogenhout et al., 2008)。最近では唾腺等の組織で発現している遺伝子のデータベース化が進んでいるが、大半は未知遺伝子であり、これらの機能を確定するには遺伝子ノックアウト技術の活用が不可欠である。

(2) 近年、人工制限酵素 ZFN および TALEN を用いてゲノム上の標的遺伝子を破壊、また DNA を挿入するゲノム編集技術が報告された (Bedell et al., 2012 など)。しかし、これらはペプチドにより DNA 配列を認識するため配列特異性が低く、リコンビナントタンパク質として作る過程が難しいといった問題点があった。ところが最近 CRISPR/Cas システムが開発され標的配列を自由に選び、切断箇所を正確に決められるとの報告がなされた (Sapranaukas et al., 2011)。本システムによる方法は標的遺伝子を簡単に換えられ作成が容易なことから、次世代の遺伝子改変技術として一気に進展する可能性がある。現時点では哺乳類や線虫、キイロショウジョウバエでの適用が報告されているが、非モデル昆虫では報告がない。イネの重要害虫であるツマグロヨコバイでは口針で篩管から吸汁する際に様々なタンパク質を吐出しており (Hattori et al., 2012, 2015 など) 植物側の防御反応に対抗する機能が推測されているが決定的な証明はされていない。

(3) 本課題では、CRISPR/Cas コンストラクトまたはその mRNA の卵へのインジェクション法のほか卵の浸漬法、成虫の生殖腺へのインジェクション法により、吸汁性昆虫で安定的にノックアウトできる方法の確立を目指す。標的遺伝子として、ラッカーゼ-1S を用い、本酵素が介在すると推測される口針鞘 (唾液鞘) の凝固、吸汁行動の電氣的モニタリングを行い、機能を検証する。吸汁性昆虫で人工制限酵素による遺伝子改変技術が確立できれば、唾液タンパク質の機能の解明につながり吸汁阻害による防除法を開発する上で有用である。また、アブラムシやウンカ、ヨコバイ類では殺虫剤抵抗性系統がしばしば問題になり、解毒酵素などの変異が原因することが推測されているが (Bass et al., 2011)、本技術を用いることができれば決定的な証明が可能となる。

## 2. 研究の目的

多くの農業害虫を含む半翅目昆虫において加害性を決定づける唾液の機能解析には

遺伝子ノックアウト法が不可欠である。TALEN など人工制限酵素を使ったノックアウト法が行われつつあるが、それより作成が容易で配列特異性に優れた CRISPR/Cas システムが開発され、モデル生物を中心に使われ始めている。本課題では、このシステムにより吸汁性昆虫であるツマグロヨコバイで安定的に利用できる技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

ツマグロヨコバイ唾腺で特異的に発現しているラッカーゼ-1S (*NcLac1S*) や、体色着色に関与するラッカーゼ 2 (*NcLac2*) を標的遺伝子とした。構築した CRISPR/Cas コンストラクトまたはその mRNA を、5 齢幼虫・羽化直後の成虫に注入し (図 1)、生殖細胞で

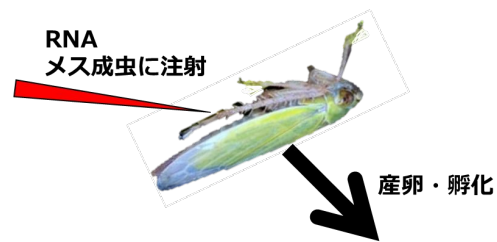


図 1. ツマグロヨコバイメス成虫へのインジェクションイメージ

の遺伝子破壊を期待し次世代の変異個体を判定する、イネに生みつけられた卵を回収し注入、または浸漬処理し、孵化した個体について変異個体を判定する。この方法で変異個体を得ることに成功した場合、交配による後代ノックアウト個体を用いてラッカーゼ活性の消失を確認する。さらに、標的遺伝子のノックインも試みる。上記手法

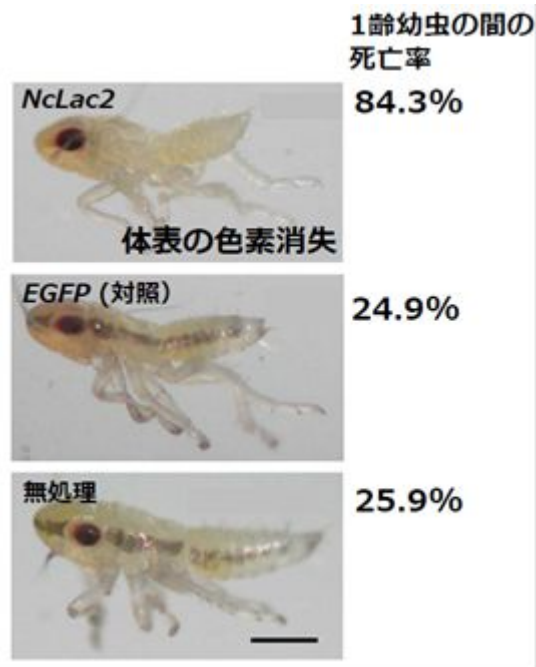
で得られた個体についてラッカーゼ-1S 遺伝子の変異が生じたか否かを判定する。個体のゲノム変異の判定は、標的部位への PCR/CEL 1 法を用いて行う。ゲノム DNA を鋳型に、遺伝子の標的部位を含めた個所で PCR を行い、PCR 産物の加熱による一本鎖化と冷却による再アニーリング後、すべての mismatches 部位を切断する T7 エンドヌクレアーゼ I によって処理する。ゲノム変異が生じていれば mismatches が切断され、ゲノム変異が生じていない場合に比べ電気泳動で短い産物が確認できる。ゲノムの変異は DNA のシーケンシングによっても確認する。

未交尾メス成虫 (羽化 1 日目) に RNA をインジェクションして、4-14 日後に交尾・産卵させた。孵化幼虫を 1-2 齢で 1 頭ずつ回収し、DNA を抽出した。

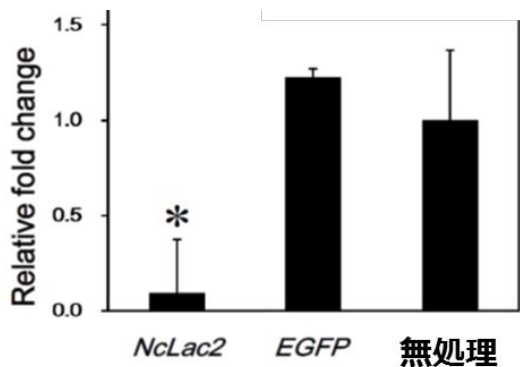
## 4. 研究成果

(1) Parental RNAi の有効性の確認  
Parental RNAi と同じ手法を用いる計画であるため、*NcLac2* 遺伝子 (ツマグロヨコ

バイ表皮で高発現し、表皮の硬化や色素沈着に關与すると考えられるラッカーゼ遺伝子) やそのほかの唾腺遺伝子について parental RNAi が有効であり、遺伝子発現量が減少することを確認した。このとき用いた唾腺遺伝子では表現型に変化が見られなかったが、*NcLac2* 遺伝子の場合、その次世代である孵化幼虫では色素沈着がほ



**図2 ツマグロヨコバイ Parental RNAi の効果 (表現型)**. *NcLac2* 遺伝子は体表の着色や硬化に關与する。ノックダウンされた次世代幼虫では体表の色素が消失・減衰し(体側のライン・触覚など) 2 齢に脱皮する前に大部分が死亡した。孵化幼虫数は対照・無処理と比較して有意差がなかった (bar: 200  $\mu$ m) (Matsumoto and Hattori, 2016)。



**図3 ツマグロヨコバイ parental RNAi の効果 (遺伝子発現量)**. 図2の実験での、孵化幼虫(孵化1日目)での *NcLac2* 発現量の定量. Parental RNAi によって対照の約 11 分の 1 に低下した. ほかの唾腺遺伝子 1 種についても同様の結果を確認した(データ省略) (Matsumoto and Hattori, 2016)。

とんど見られず、かつ 2 齢幼虫になるまでの死亡率が高くなり、表現型が容易に判別できることを確認した (Matsumoto and Hattori, 2016. 図 2, 3. *EGFP*: Enhanced green fluorescent protein). これはほかの昆虫でも確認されているのと同様の結果であった (Arakane et al., 2005 など). ゲノム改変実験に用いれば、表現型から成功しているかのチェックが容易になる可能性があると考えられた。

## (2) CRISPR/Cas9 の試み

*NcLac1S*, *NcLac2* 遺伝子を CRISPR の実験に用いた. *NcLac1S* 遺伝子で 14864 bp, *NcLac2* 遺伝子で 17354 bp のゲノム配列を確認した. ただし *NcLac2* ゲノムでは、最も上流側の配列をどうしても確認できず(理由不明)時間を要した. ある程度確認できたゲノム DNA 配列から、*NcLac1S* および *NcLac2* 遺伝子の上流部位のエキソン-イントロン部位に sgRNA をそれぞれ 2 種類設計して CRISPR の実験を行った. 理由は不明だが、当初使用していたキット (mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit と MAXI script kit) で作成したキャップ・polyA 付加 RNA および sgRNA とともに非常に増幅・収量が悪くなり、何度か試行のあとに別のキット (T7 RiboMAX Express RNAi System) を利用して RNA を作成したため時間を要した. sgRNA, Cas9 mRNA とともに濃度を何通りか変えてインジェクションを行い産卵させ孵化幼虫を回収して個体ごとにゲノム DNA を抽出した. PCR 産物を再アニーリングして T7 エンドヌクレアーゼによりミスマッチチェックしたが、ゲノムでの欠失は確認できなかった. 卵に RNA を打ち込む実験も試みたが、うまくいかなかった。

## <引用文献>

Arakane et al. (2005) Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:11337-11342.  
 Bass et al. (2011) Insect Mol. Biol. 20:763-773.  
 Bedell et al. (2012) Nature 491:114-118.  
 Hattori et al. (2012) Insect Biochem. Mol. Biol. 42: 1-9.  
 Hattori et al. (2015) PLoS One 10: e0123671.  
 Hogenhout et al. (2008) Annu. Rev. Phytopathol. 46: 327-359.  
 Sapranauskas et al. (2011) Nucleic Acids Res. 39: 9275-9282.

## 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)

Matsumoto, Y. and M. Hattori (2016)  
 Gene silencing by parental RNA interference in the green rice

leafhopper, *Nephotettix cincticeps*  
(Hemiptera: Cicadellidae). Arch.  
Insect Biochem. Physiol. 91:152-164.  
DOI: 10.1002/arch.21315. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

松本 由記子、末次 克行、中村 匡  
利、小松 節子、野田 博明、服部 誠  
ツマグロヨコバイ唾液腺のトランスクリ  
プトームおよび唾腺タンパク質のプロテ  
オーム解析.第59回日本応用動物昆虫学  
会.2015.3.28 山形大学(山形県・山形  
市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 由記子 (MATSUMOTO, Yukiko)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制  
御研究領域・主任研究員  
研究者番号: 80414944

### (2) 連携研究者

服部 誠 (HATTORI, Makoto)  
独立行政法人農業生物資源研究所・加害・  
耐虫機構研究ユニット・研究専門員  
研究者番号: 60370673