

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14668

研究課題名(和文)低温で卵態休眠が誘起されるスミアケハダニにおける休眠遺伝子の特定

研究課題名(英文) Identification of genes that induce embryonic diapause of *Eotetranychus smithi* by low temperatures alone

研究代表者

後藤 哲雄 (Gotoh, Tetsuo)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60178449

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)：卵態休眠するスミアケハダニの休眠は、17℃以下の温度のみで誘起される。スミアケハダニの休眠遺伝子を特定するため、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析(RNA-Seq)を行い、休眠卵産下雌において非休眠卵産下雌より有意に高く発現する遺伝子85個を特定した。休眠と遺伝子発現の関係を明らかにするため、効率的なRNAi法の開発を試みた結果、植物の葉の上にdsRNA溶液を塗布して与えることで、遺伝子発現を15日間抑制できた。本手法では、遺伝子1個ずつの発現の抑制に成功した一方、休眠抑制はみられなかった。このことから、候補遺伝子が複合的に休眠に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mite *Eotetranychus smithi* exhibits a facultative diapause that occurs at the egg stage. Diapause was induced by low temperatures alone (<17.5℃) and averted by high temperatures (≥20℃). Transcriptome analysis (RNA-Seq) was conducted to specify the diapause-inducing genes of *E. smithi*. 85 genes with significantly higher expression were revealed in diapause-egg laying females compared to non-diapause-egg laying females. In order to clarify the relationship between diapause induction and gene expression, we developed an efficient RNAi treatment protocol, resulting in the suppression of genes for 15 days by applying dsRNA solution to a host plant leaf. Although gene expression could be successfully controlled using RNAi, diapause induction was not completely blocked in all of the mites with the 'particularly high expression' genes suppressed; all females still laid diapause eggs. Other high expression genes may be involved in dormancy in a complex manner.

研究分野：応用動物学

キーワード：応用動物 遺伝子 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

多くの節足動物は好適な時期に活動し、不適な時期には生存率を上げるため、休眠という適応戦略を獲得している (Tauber et al., 1986; Danks, 1987, 2007; Friberg et al., 2011)。休眠誘起には通常、夜の長さから季節を予測する光周期が重要な役割を担っている。しかし一部の節足動物では、休眠が主に温度で制御されている。例えば、カ的一种 (Friedrich, 1984) やホホアカクロバエ (Nesin et al., 1995; Vinogradova & Reznik, 2013) などであるが、これらの種でも光周期の影響を排除できない。温度のみで制御されているのは、熱帯産のニクバエ (Denlinger, 1974) とカブリダニの一種 *Amblyseius potentillae* (van Houten et al., 1988)、スミスアケハダニ (Gotoh & Kameyama, 2014) である。中でもスミスアケハダニの休眠は、17.5°C 以下で飼育すると休眠率が 100%、20°C 以上では 0% になる。このように極めて明確な温度依存性の休眠反応を持つ節足動物は全く知られていない。

本研究では、休眠個体と非休眠個体について、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行い、両者の発現遺伝子を網羅的に比較して、休眠に関与する候補遺伝子を絞り込む予定である。

申請者のグループは、ハダニ類 52 種について RNA-Seq を行い、得られた各タンパク質コード遺伝子約 300 個の機能解析をナミハダニ全ゲノム情報などに基づいて進めている。これらの情報をベースにするため、温周性制御の休眠に関与する候補遺伝子群の絞り込みは、たとえ光周性制御の休眠に関与する遺伝子群と異なっていたとしても十分に可能である。近年発展が著しい遺伝子発現制御技術の中でも RNAi は最も代表的かつ多数の生物種でその効果が認められている。この「技術」に加えて、「遺伝子情報」も揃いつつあり、非モデル生物における研究例としての意義は大きい。

アケハダニ *Eotetranychus* 属は、雌成虫で休眠する。その中でスミスアケハダニは特異的に卵態休眠することが報告されており (芦原, 2001)、このような例外的な種の存在は休眠態の適応的意義を研究する上で格好の材料であるため、本種の休眠性を検討した (Gotoh & Kameyama, 2014)。その結果、光周期ではなく、温周期 (正確には低温への反応) によって休眠が誘導されることを明らかにした。前述のように明確な温周性を示す温帯の種は他に例がなく、その分子メカニズムの解明では、従来の手法をそのまま踏襲することができない。一方、ナミハダニでは付属肢形成に関与する *Distal-less* 遺伝子のサイレンシングに (Khila & Grbic, 2007)、マダニでは薬剤抵抗性遺伝子探索

(Gordon & Waterhouse, 2007) に RNAi 手法が使われ、その効果が確認されているが、非モデル生物では初めての挑戦になる。従って、本研究では Khile & Grbic (2007) の情報を参考にしながら独自に挑戦する。申請者の強みは、(1) すでに 52 種のハダニについて RNA-Seq を行い、共通する遺伝子約 300 個の抽出を終えていることと、(2) 既得データからさらに各種に特異的な遺伝子の洗い出しが可能であること (種ごとにみると RNA-Seq によって 947~1,829 個の遺伝子を抽出している) である。従って、温周性で休眠が誘導される本種に関わる遺伝子データと光周性で休眠が誘導されるナミハダニの遺伝子データの比較、およびスミスアケハダニの休眠個体と非休眠個体の遺伝子データの比較を直ちに行える状況にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低温暴露のみによって卵態休眠が誘起されるスミスアケハダニ *Eotetranychus smithi* の休眠誘起に関与する遺伝子群を抽出し、遺伝子発現制御技術の一つである RNA 干渉 (RNAi) 処理によって休眠遺伝子を特定することである。本種は 17.5°C 以下では日長に関係なく休眠卵を産下するが、それ以上の温度では非休眠卵を産むという極めて温度依存性の高い休眠反応を示し、温度による休眠誘起種の中では特異的である。この性質は、休眠誘起遺伝子を特定する上で優れており、低温への適応である休眠に関与する遺伝子発現の阻害 (RNAi 処理) によってターゲット遺伝子を探索するのに好適な種である。この際、ナミハダニの全ゲノム情報 (Grbic et al., 2011) から休眠などの環境適応機能に関係している遺伝子群を抽出し、RNA-Seq データと比較する。特定した候補遺伝子群の発現抑制のために RNAi 処理を行い、温度依存性の休眠反応が消失することを指標としてターゲット遺伝子をスクリーニングする。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq)

スミスアケハダニの休眠遺伝子の探索に有効な遺伝子情報を収集するために、次世代シーケンサー (HiSeq 2000, illumina 社) による RNA-Seq を行う。休眠卵を産む雌 (休眠卵産下雌) および非休眠卵を産む雌 (非休眠卵産下雌) のそれぞれについて、雌成虫約 100~300 個体から、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて、Total RNA を抽出する。illumina 社のプロトコルに従って、Total RNA から cDNA を合成し、アダプターを結合させてシーケンスする。

① *de novo* アセンブル(短い DNA 断片配列からコンティグを作る)

次世代シーケンサーによる RNA-Seq で得られた 100bp 程度の断片配列は、互いをつなぎ合わせるによって有用な解析データとなる。本研究では *de novo* アセンブルを行い、100 bp の配列を互いの配列情報に基づいてつなぎ合わせ、長い配列 (コンティグ) を得る。

② コンティグの相同性解析 (BLAST 検索)

得られたコンティグの機能を推定するために、各コンティグの遺伝子領域を特定する必要がある。そこで、2011 年に公開されたナミハダニのタンパク質コード遺伝子のデータベースに対する相同性解析 (BLAST 検索) (Grbic et al., 2011) を行い、各コンティグの遺伝子領域を特定する。

③ 遺伝子の発現解析 (MA-PLOT)

各遺伝子について休眠の関係性を推定するために、休眠卵産下雌における発現量と非休眠卵産下雌における発現量に有意な差がある遺伝子を特定する必要がある。そこで、 \log_2 変換されたシグナル値の差 (M) と \log_2 変換されたシグナル値の平均値 (A) を両軸に用いた MA-PLOT (Dudoit et al., 2002) を用いて、休眠卵産下雌において有意に高く発現する遺伝子を特定する。

(2) 対照遺伝子の探索

RNAi 法による遺伝子の発現抑制の効果を相対定量によって検証するため、休眠・非休眠などに関係なく各個体で安定して発現している対照遺伝子を探索する。探索には、ハダニ類で過去に対照遺伝子として用いられた遺伝子 16 種類 (Yang et al., 2015; Sun et al., 2010) の相同遺伝子を用いる。

(3) RNAi 法の確立

ハダニ類のような微小な節足動物においては、dsRNA の投与においてマイクロインジェクションを用いた場合、インジェクションに伴う傷により生存率が下がることが危惧される。そこで、経口投与による RNAi 法を確立する必要がある。経口投与の手法としては、糖を含んだ人工飼料に dsRNA を加えてパラフィルムで挟み込んで与えるパラフィルム法、飼料であるイチゴの葉を dsRNA 溶液に浮かべて葉を介して dsRNA を摂取させる Floating 法、イチゴの葉表面に dsRNA 溶液を塗布して dsRNA を摂取させる塗布法を試み、それぞれについて遺伝子発現の抑制率およびハダニの生存率を明らかにすることで、最適な手法を確立する。

(4) 休眠遺伝子の探索

MA-PLOT において、休眠卵産下雌において有意に高発現した遺伝子について、dsRNA を合成

する。合成 dsRNA を休眠卵産下雌に投与し、遺伝子発現の抑制を、対照遺伝子を用いた相対定量によって確認する。さらに、相対定量時に発現抑制が確認された期間について、休眠卵産下雌が産んだ卵が休眠卵か非休眠卵かを確認し、休眠への影響の有無を検証することで休眠遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq)

スミスアケハダニ休眠卵産下雌および非休眠卵産下雌について、次世代シーケンサーによる大容量塩基配列解析 (RNA-seq) を行った。それぞれについて *de novo* アセンブリを行い、100 bp のショートリードを繋ぎ合わせた長い配列 (コンティグ) を作成し、数万本のコンティグを得た。これらの *de novo* アセンブリで作成したコンティグを用いて相同性解析 (BLAST 検索) を行い、遺伝子領域の特定を行った。さらに、MA-PLOT の結果から、休眠卵産下雌で有意に高く発現する遺伝子 85 個を特定することに成功した (FDR<0.01)。

(2) 対照遺伝子の探索

スミスアケハダニにおいては、これまでハダニ類で用いられた対照遺伝子のうち、v-ATPase が雌成虫において休眠状態や日齢といった条件に左右されず、安定して発現することを明らかにした。よって、v-ATPase を対照遺伝子として利用した。

(3) RNAi 法の確立

スミスアケハダニにおける経口 RNAi 法が利用できるか検討するため、第一に、糖を含んだ人工飼料に、細胞の生存に必須な V-ATPase の dsRNA を加えてスミスアケハダニに与えたところ、投与個体の多くで消化管の細胞が壊れ、死亡することを確認した。すなわち、スミスアケハダニにおいて経口的な RNAi が有効であることを明らかにした。そこで、パラフィルム法、Floating 法、塗布法の 3 つの方法において RNAi の効果およびハダニの生存率を検討したところ、塗布法がいずれにおいても良好な成果を上げた。すなわち、ハダニ類への塗布法による RNAi の確立に成功した。

(4) 休眠遺伝子の探索

休眠卵産下雌と非休眠卵産下雌の間で発現量の差が大きかった上位 2 遺伝子 (MA-D-5 遺伝子および MA-D18 遺伝子) について、RNAi による発現抑制により、休眠遺伝子である可能性を検証した。それぞれの遺伝子について、ハダニ体内の対象遺伝子の転写産物量を定量 PCR によりモニターしたところ、施用後 0 日目から

1 日目にかけて、発現量の低下が確認でき、3 日目には発現量はほぼ抑制された。その効果は 15 日目まで続いた。すなわち、15 日間にわたる経口 RNAi の効果の持続を確認することに成功した。以降、代表して MA-D-18 遺伝子の結果を示す (図 1)。

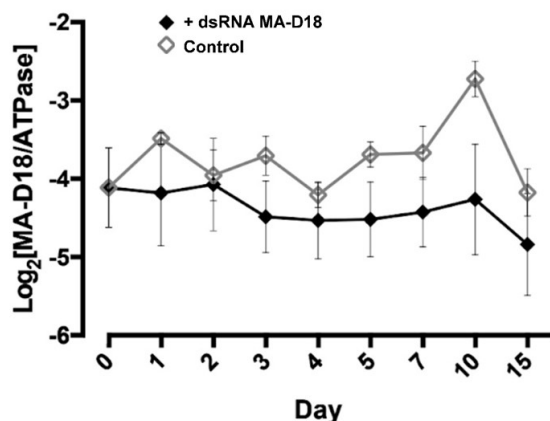


図 1. MA-D18 遺伝子の dsRNA 投与による遺伝子発現の抑制

続いて、それぞれの遺伝子が休眠遺伝子であるかを、産下された卵の休眠性によって判定した。各遺伝子について、発現を抑制したハダニ 30 個体から得られた卵は、その全てが休眠卵であった (図 2)。

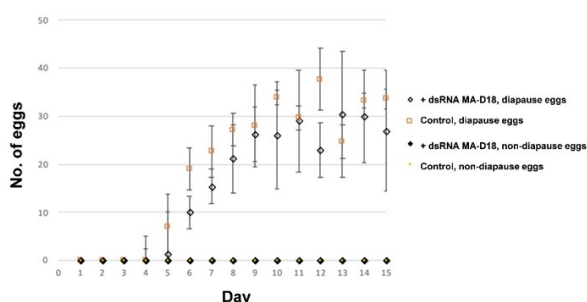


図 2. MA-D18 遺伝子の dsRNA 投与個体の産下卵の休眠、非休眠

すなわち、MA-D18 の発現量を抑制しても産下される卵の休眠は打破されず、MA-D18 は単体では休眠には関与していない遺伝子であることが示された。休眠卵産下雌と非休眠卵産下雌において発現量が異なる他の遺伝子のパスウェイ解析からは、脂肪酸の代謝に関与する acyl-CoA、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase、fatty acyl-CoA reductase、cytochrome P450 monooxygenase などのモチーフが見出されており、これらの遺伝子が複合的に休眠に関与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takano, Y. and T. Gotoh, 『Effects of

temperatures on diapause induction in *Eotetranychus smithi* (Acari: Tetranychidae)』、Ento'17, International Symposium & National Science Meeting “Entomological Networks: Ecology, Behaviour and Evolution”、2017.9.13-14、Newcastle University (Newcastle, UK)

- ② 高野友二郎・後藤哲雄、『スミスアケハダニにおける温度依存性の休眠メカニズム』、日本昆虫学会第 77 回大会大会、2017.9.3、愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市)
- ③ 高野友二郎・後藤哲雄、『スミスアケハダニの休眠誘導における温度周期反応』、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017.3.28-29、東京農工大学(東京都・府中市)
- ④ 高野友二郎・後藤哲雄、『スミスアケハダニ休眠卵における休眠消去後の発育臨界温度と孵化までの日数』、第 25 回日本ダニ学会大会、2016.10.15、北海道立道民活動センターかでの 2・7 (北海道・札幌市)
- ⑤ Takano, Y., Y. Kitashima and T. Gotoh, 『Effect of thermoperiod on diapause induction in *Eotetranychus smithi* (Acari: Tetranychidae)』、The 3rd Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering、2015.11.19、Dusit D2 Chiang Mai Hotel (Chiang Mai, Thailand)
- ⑥ 高野友二郎・後藤哲雄、『冷却期間の長さがスミスアケハダニの休眠卵の休眠消去に及ぼす影響』、第 24 回日本ダニ学会大会、2015.9.13、法政大学市ヶ谷キャンパス(東京都・千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 哲雄 (GOTOH TETSUO)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：60178449

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

なし