

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14669

研究課題名(和文) タバコナジラミのPoIA1遺伝子に特異的なsiRNAを用いた防除法の開発

研究課題名(英文) Control method of Bemisia tabaci using siRNA specific to its PoIA1 gene

研究代表者

中村 郁郎 (Nakamura, Ikuo)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：50207867

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)：タバコナジラミは、吸汁、ウィルスの媒介などで大きな被害を与える害虫である。近年、殺虫剤に抵抗性を持つレースが出現し、その防除が大きな問題となっている。

本研究では、siRNAを利用してタバコナジラミの新たな防除法を開発することを目的とし、タバコナジラミのPoIA1遺伝子の種特異的配列を標的とするsiRNAを生成させるためのベクターを構築した。ウィルスベクターにより導入したタバコ植物では、対照植物に較べてタバコナジラミの卵の孵化が抑制されるという結果を得たが、さらに詳細な解析が必要である。siRNA: small interfering RNAの略で相同性を持つ遺伝子の発現を抑制する。

研究成果の概要(英文)： Tobacco whitefly is an agricultural pest that greatly damages by sucking sap and spreading virus. Recently a race that is resistant to insecticides has emerged, and thus its control becomes a major problem.

In this study, we aimed to develop new control method of tobacco whitefly using siRNA, and constructed vectors for generating siRNA targeting the species-specific sequence of tobacco whitefly PoIA1 gene. In tobacco plants inoculated Agrobacterium containing viral vectors, hatching of tobacco whitefly eggs is significantly inhibited compared with control plants, although more detail analysis will be necessary. N.B. siRNA (small interfering RNA): inhibits expression of gene that contains homologous sequence with siRNA.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：siRNA pest-control PoIA1 tobacco whitefly VIGS HIGS

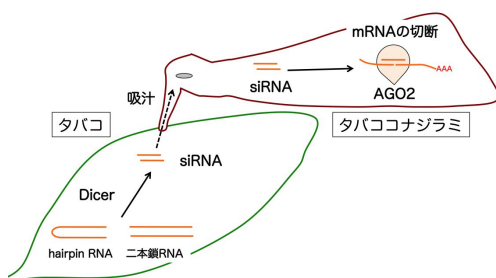
### 1. 研究開始当初の背景

タバココナジラミ (*Bemisia tabaci*) は、世界の農業生産に大きな被害を与えている大害虫である。この害虫は、吸汁による直接的な被害を与えるほか、ウイルスを媒介し、排泄物にすず病菌が繁殖するなど間接的な被害も与えている。また、世代サイクルが28日と短いため、特に温室内では蔓延し大きな被害を引き起している。さらに、殺虫剤に抵抗性を示すレースQが出現しており、その防除が農業現場では大きな問題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、タバココナジラミを防除するために、small interfering RNA (siRNA) を用いた新たな防除法を開発することである。siRNA は、20塩基程の相同な配列を持つ mRNA を特異的に切断するシステムで真核生物に普遍的に存在すると考えられている。そこで、siRNA を用いた防除法を開発するためには、タバココナジラミの遺伝子に相同性があり、宿主の植物の遺伝子には相同性がない塩基配列を見出す必要がある。

私達の研究グループでは、RNAポリメラーゼ I 複合体の最大サブユニット(POLA1) のC末端領域に種に特異的なアミノ酸配列が存在することを見出しているため、この配列をコードしている塩基配列を siRNA の標的とする防除法の開発を試みた。宿主のタバコの葉で siRNA を生成することができれば、吸汁の際にタバココナジラミの体内に取り込まれ、生存に必須な *PolA1* 遺伝子の mRNA を切断することが期待される。



siRNA を用いたコナジラミの防除法

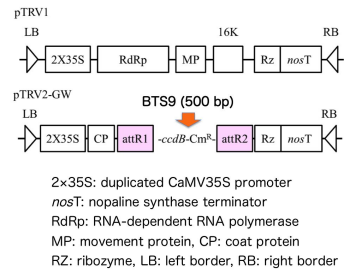
### 3. 研究の方法

タバココナジラミより DNA を抽出し、PCR法により *PolA1* 遺伝子断片を pCR2.1 プラスミドにクローニングした。塩基配列を確認した後、この遺伝子断片 (BTS9, 500 bp) を用いてタバココナジラミの *PolA1* 遺伝子を標的とする siRNA を宿主のタバコで生成させるために下記の2つの方法を用いた。

#### (1) ウィルスベクター法

タバコラットウイルス(TRV)を改変した2つのベクター(pTRV1, pTRV2)を入手し、pTRV2 の外被タンパク遺伝子領域を目的の BTS9 配列と置換し、pTRV1 と pTRV2 を含むあぐるバクテリウムをタバコの葉片に接種すると目的の BTS9 配列を含む二本鎖 RNA が生産されるため、内生のダイサーにより切断されて siRNA が生成されると考えられる。

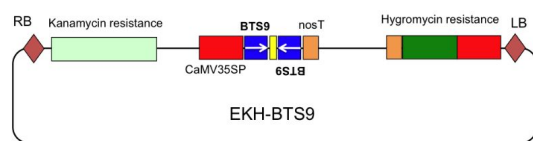
TRV (tobacco rattle virus)



TRV ウィルス改変ベクターの模式図

#### (2) 形質転換体の作出

BTS9 配列をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流に BTS9 断片を逆方向に連結したカセットを構築し、カナマイシンおよびハイグロマイシン抵抗性遺伝子を含むバイナリーベクターの pEKH に組み込んだ。構築した pEKH-BTS9 をアグロバクテリウムに導入して、タバコの葉片に接種して、ハイグロマイシン選抜培地を用いて、タバコの形質転換体を作成した。得られた形質転換体では、BTS9 配列を含むヘアピン RNA が生産されるので、ダイサーにより BTS9 配列を含む siRNA が生成されると考えられる。



タバコの形質転換に用いたベクターの模式図

### 4. 研究成果

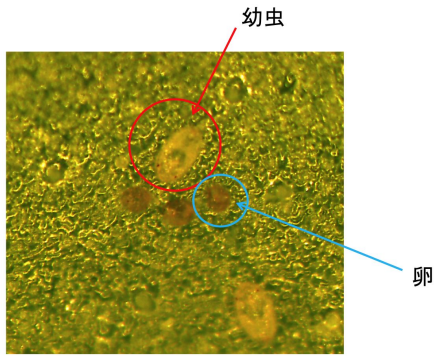
#### (1) ウィルスベクター法

タバコ種子をばらして 45 日目の苗を供試し、pTRV1 および pTRV2 を含むアグロバクテリウムを接種した(VIGS)植物と対照植物をコンテナに入れ、タバココナジラミの成虫を放ち、2週間後にタバココナジラミの孵化幼虫数を観察した。その結果、VIGS 植物における孵化数が対照植物に比べて有意に低いことが観察された。

VIGS: virus induced gene silencing



タバココナジラミを用いたバイオアッセイ



タバココナジラミの卵と孵化した幼虫

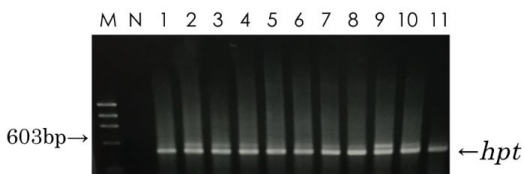
VIGSによるタバココナジラミの孵化への効果

観察数	孵化幼虫数	
	対照個体	VIGS個体
40	6.7 ± 1.8	1.3 ± 0.6
50	19.0 ± 1.2	4.3 ± 0.6
50	16.7 ± 2.0	7.0 ± 1.5

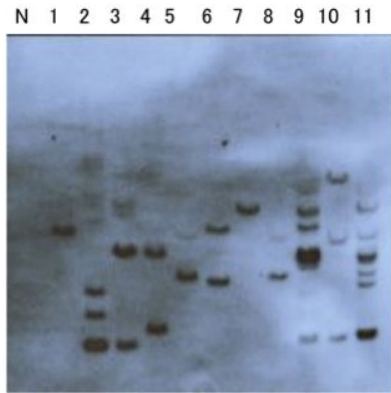
VIGS 処理後の新葉における孵化幼虫と未孵化卵を計測した各3反復、P < 0.05 で有意

(2) 形質転換体の作出

アグロバクテリウム法を用いてハイグロマイシン耐性を示すシュートを選抜し 11 個体の形質転換体を作成した。各個体の葉より DNA を CTAB 法を用いて抽出し、PCR 法によりハイグロマイシン抵抗性遺伝子を増幅したところ、11 個体すべてにおいて、DNA 断片の増幅を確認した。また、サザン法を用いて導入されたハイグロマイシン抵抗性遺伝子のコピー数を確認した結果、1~7 個のバンドが確認できたので、1~7 コピーの遺伝子が導入されていると考えられる。



ハイグロマイシン抵抗性遺伝子の PCR 増幅  
1~11: 形質転換体, N: 対照植物



形質転換体のサザンプロット解析  
1~11: 形質転換体, N: 対照植物

得られたタバコ形質転換体では、BTS9 配列を含むヘアピン RNA が生産されることが予想され、生成された siRNA により host induced gene silencing (HIGS) を経由したタバココナジラミへの抵抗性を付与できると期待されるが、タバココナジラミを用いたバイオアッセイは、研究期間内に実施することができなかった。しかし、ウィルスベクターを用いた VIGS に関する研究では、タバココナジラミを防除できる可能性を示唆する結果を得ているので、今後、1 コピーの導入遺伝子を含んでいる形質転換システム #1 および #8 の自殖後代系統を育成して、タバココナジラミに対する抵抗性を評価する計画である。また、タバコ形質転換体の葉とタバココナジラミの体内において siRNA が生成されていることを証明することも必要であると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中村 郁郎（NAKAMURA, Ikuo）  
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授  
研究者番号：50207867

### (2)研究分担者

井川 智子（IGAWA, Tomoko）  
千葉大学・大学院園芸学研究科・助教  
研究者番号：00360488

### (3)連携研究者

（ ）

研究者番号：

### (4)研究協力者

（ ）