

令和元年6月11日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07632

研究課題名(和文) RNA農薬開発に向けた昆虫のfeeding RNAiの機構解明

研究課題名(英文) Analysis of RNAi mechanism by feeding in insects

研究代表者

田中 良明 (TANAKA, Yoshiaki)

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・主席研究員

研究者番号：90355735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1. トビイロウンカおよびミカンキイロアザミウマで、二本鎖RNA(dsRNA)を食べさせることによるRNA干渉(feeding RNAi)で発育阻害を誘導できる標的遺伝子や投与方法を探索した。アザミウマでは数個の神経ペプチド受容体遺伝子をRNAiで抑制すると弱い発育阻害効果が認められたが、dsRNAの細胞内への取込みや細胞内での輸送を阻害する遺伝子も同時にRNAiで抑制することで致死率が向上した。これらの結果はfeeding RNAiの低効率性改善に貢献し、RNA農薬の実用化に有用な知見である。

2. 神経ペプチドeleveninが、トビイロウンカでは体色の变化に関与することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA干渉は薬剤抵抗性の打破に有望な技術であるが、二本鎖RNAを食べさせて害虫に投与した場合の効果の低さ、特に吸汁性害虫では葉の表面に二本鎖RNAを散布してもほとんど虫体内に摂取されないことから、防除への応用が困難とされてきた。しかし、本課題では、アザミウマ類は葉の表面に散布してもRNA干渉が効くこと、さらに二本鎖RNAの取込みや輸送を阻害する遺伝子を抑制することでRNA干渉の効果を増幅できることが明らかになった。これらの結果は、薬剤抵抗性が問題となっているアザミウマ類の防除にRNA干渉が利用可能であることを示したものとして意義がある。

研究成果の概要(英文)：1. We identified the neuropeptide-receptor genes inducing mortality by feeding RNAi in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* and the thrips *Frankliniella occidentalis*. Application of dsRNA for neuropeptide receptor gene alone induced weak mortality in *F. occidentalis*, but the mortality increased by adding the dsRNAs for genes that are speculated to inhibit the transfection or delivery of dsRNAs. These results provide the basic data for the exploration of RNAi pesticides for sucking pests.

2. The neuropeptide elevenin has not been explored except in *C. elegans*, but we found that RNAi of elevenin and its receptor NIA42 induced dark-body color in *N. lugens*. These results suggest that neuropeptide elevenin is involved in the regulation of melanization through its receptor NIA42. This is the first report of a physiological function for elevenin-like peptides in insects.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：トビイロウンカ アザミウマ 神経ペプチド RNAi 農薬 GPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年農業現場において、ウンカやアザミウマ、コナジラミ、ハダニなどの害虫で多くの化学農薬に対する抵抗性系統の出現が問題となっている。RNA干渉(RNAi)は二本鎖RNA(dsRNA)を投与することにより任意の遺伝子の発現を抑制する技術であり、防除対象の害虫種だけに作用する選択性の高さや薬剤抵抗性出現リスクの低減の可能性などから、既に国内外でRNAiを利用した農薬(RNA農薬)開発が試みられている。RNA農薬の開発には、二本鎖RNA(dsRNA)の経口あるいは経皮投与によりRNAiが効く標的遺伝子を探索することがまず必要である。RNAiの効果が確認されている昆虫種のうち、dsRNAの経口投与によるRNAi(feeding RNAi)が有効な種は、トビイロウンカやゴキブリなど一部の昆虫種で報告されているだけである。また、“どの組織で発現する遺伝子に対してfeeding RNAiが有効か?”という問いに対する回答は未だ見つかっていない。

2. 研究の目的

本課題の目的は、(1)トビイロウンカを材料としてfeeding RNAiが有効な標的遺伝子の発現組織を解明することである。また、および(2)トビイロウンカで得られたデータの普遍性を他害虫種で検証することにより、昆虫種間で共通したfeeding RNAiのメカニズムを解明すること、(3)注射によるRNAiと比較して効果の低いfeeding RNAiの効果を高める方法を検討すること、によりアザミウマ類などの防除に有用なデータを得ることである。

3. 研究の方法

(1) トビイロウンカ神経ペプチドや生体アミンの膜受容体約90個の遺伝子を対象に、皮下注射によりdsRNAを投与した場合と、パラフィルム法によりdsRNAを摂取させた場合とで効果を比較し、feeding RNAiで効果を示す標的遺伝子を探索した。さらに、定量PCRやRNAseqにより遺伝子の発現組織を解析し、どの組織で発現する遺伝子がfeeding RNAiで効果があるかを解明した。

(2) トビイロウンカでfeeding RNAiが有効な遺伝子と相同な遺伝子をアザミウマ類などから同定し、それらの相同遺伝子を標的としたfeeding RNAiがアザミウマ類で有効であるかをパラフィルム法、および葉にdsRNAを塗布して摂食させるリーフディスク法で検証するとともに、feeding RNAiによる致死効果を増幅する方法を探索した。

4. 研究成果

(1) トビイロウンカを用いてfeeding RNAiが有効な標的遺伝子の発現組織を解明するため、神経ペプチドや生体アミンの膜受容体を中心に、約90個の遺伝子を標的として注射とfeedingによるRNAiで発育阻害に有効な遺伝子を探索した。その結果、農薬開発に有望なfeeding RNAiで発育阻害効果がある遺伝子を9個同定した。これらは主に脂肪体や消化管、マルピーギ管で発現する遺伝子であった。

(2) トビイロウンカのfeeding RNAiにより得られた情報を基に、10個の膜受容体遺伝子等についてミカンキイロアザミウマでfeeding RNAiの効果を解析した。その結果、標的遺伝子のdsRNAのみを投与した場合は発育阻害効果が低かった。しかし、消化管内でdsRNAを分解するdsRNaseや細胞内へのdsRNAへの取込みや細胞内での輸送を阻害すると推測される遺伝子のdsRNAを同時に投与すると、発育阻害効果が上昇した。このことから、dsRNAの虫体内での輸送や分解を阻害する遺伝子を抑制することで、feeding RNAiで実用的な致死効果を得られることが期待された。

(3) ミカンキイロアザミウマを用いて、ブロッコリー葉片にdsRNAを塗布して虫に摂食させるリーフディスク法を確立し、パラフィルム法によりdsRNAを投与した場合と比較したところ、リーフディスク法でもパラフィルム法と同等の致死効果が得られた。吸汁性害虫では、葉の表面にdsRNAを散布してもほとんど摂取されないためにRNAiの効果が得られない場合があるが、アザミウマの場合はdsRNAを植物体の表面に散布しても摂取されることが示唆された。

(4) RNAiスクリーニングの過程で、軟体動物や節足動物の一部に存在する神経ペプチドであるEleveninのホモログをトビイロウンカから同定し、培養細胞を用いた機能解析により膜受容体NIA42がEleveninの受容体であることを証明した。EleveninおよびNIA42の遺伝子をRNAiにより抑制すると脱皮後の体色が黒化することから(図1)、Eleveninのシグナルは体色の変化に関与することが明らかになった。Eleveninの生理作用が発見されたのは動物では初めてである。



図1 . NIA42のdsRNAを4齢若虫に注射した個体のメス成虫の体色
左：対照区、右：NIA42のdsRNAを注射.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Uchiyama Hironobu, Maehara Shiori, Ohta Hiroto, Seki Takehito, Tanaka Yoshiaki,
Elevenin regulates the body color through a G protein-coupled receptor *NIA42* in the
brown planthopper *Nilaparvata lugens*. General and Comparative Endocrinology 査読
有、Vol.258、2018、p33-38. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.017.

〔学会発表〕(計4件)

Tanaka Yoshiaki, The mille-pattes/polished rice/tarsal-less (*mlpt/pri/tal*)-like
genes has important role on the development of brown plant hopper *Nilaparvata lugens*.
Invertebrate Neuropeptide Conference 2019、2019.

田中良明、内山博允、関健仁、トビイロウンカおよびアザミウマ類のfeeding RNAiを阻害
する要因の探索. 第62回日本応用動物昆虫学会大会、2018.

内山博允、関健仁、田中良明、トビイロウンカを用いたRNA農薬開発に有用な標的遺伝子の
探索. 第61回日本応用動物昆虫学会大会、2017.

Hironobu Uchiyama, Shiori Maehara, Hiroto Ohta, Takehito Seki, Yoshiaki Tanaka,
A molluscan neuropeptide elevenin regulates the body color via a G proteincoupled
receptor NI-A42 in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. The 28th Conference of
European Comparative Endocrinologists、2016.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕該当なし
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：霜田 政美
ローマ字氏名：SHIMODA Masami

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用部門
部局名：昆虫制御研究領域 昆虫相互作用ユニット
職名：ユニット長
研究者番号(8桁): 80344000

(2)研究協力者 該当なし
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。