

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18661

研究課題名(和文) ハダニRNAiにおけるdsRNAの非侵襲的投与法の開発

研究課題名(英文) RNAi in spider mites based on noninvasive delivery of dsRNA

研究代表者

鈴木 丈詞 (Suzuki, Takeshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60708311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現を抑制するRNA干渉(RNAi)は遺伝子機能解析手法として広く利用されている。RNAiのトリガーとして機能する二本鎖RNA(dsRNA)を害虫種の必須遺伝子の配列にもとづいて合成し、有効成分とする次世代農薬(RNA農薬)の開発が近年注目されている。本研究では、葉肉細胞の内容物を吸汁するナミハダニを対象とし、RNA農薬の開発に向けたdsRNAの経口投与系の構築を試みた。その結果、dsRNAを塗布した葉を摂食させる塗布法や、dsRNA溶液に虫体を浸漬させる浸漬法を開発した。これら手法は簡便かつ効果的に消化管内へdsRNAを輸送し、RNAi誘導による致死効果も確認された。

研究成果の概要(英文)：RNA interference (RNAi) has been widely used for the gene functional analysis in many organisms. Double-stranded RNA (dsRNA) that triggers the RNAi-mediated gene silencing has a potential for controlling a targeted pest species as a next generation of pesticides because of its sequence-specific manner. To assess the potential of RNAi-based pest control approaches in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, two methods for the delivery of dsRNA were developed. These methods are based on mite feeding on dsRNA-coated leaves and mite soaking in a dsRNA solution. The gene targeted for method validation was the Vacuolar-type H⁺-ATPase (TuVATPase) encoding an ATP-driven proton pump located in the tonoplast. In both methods, RNAi induced down-regulation of TuVATPase, mortality and the reduction of fecundity. These methods will lead to large-scale RNAi screens as a first step towards the development of *T. urticae*-specific RNA pesticides.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：RNAi RNA農薬 経口投与 ハダニ

1. 研究開始当初の背景

ナミハダニ (*Tetranychus urticae*) は、1100 種以上の植物 (内 150 種の重要農作物) に寄生する広食性害虫である (Migeon and Dorkeld 2017). 本種は、植物の多様な二次代謝産物に対する解毒代謝機能の獲得によって寄主範囲を広げ、さらに、その機能は農薬に対する急速な抵抗性発達にも寄与している (Dermauw et al. 2013). 本種が抵抗性を示す農薬の有効成分数は、現時点で 95 種類が報告され、この数は昆虫も含めた害虫種の中で最も多い (Mota-Sanchez and Wise 2017). そのため、従来とは異なる作用機作を持つ農薬の開発が求められている.

2011 年に、ナミハダニの全ゲノム塩基配列が解読され (Grbić et al. 2011), そのデータベースが公開された. これによって、遺伝子配列に基づいた本種特異的防除への道が拓けた. その後、ヨーロッパと北米を中心とした研究チームにより、網羅的遺伝子発現解析による防除標的の探索が一斉に始まった (例えば、Dermauw et al. 2013). そして現在、これら研究によって防除標的の候補となった遺伝子の機能解析が注目されている.

遺伝子の機能解析において、近年、最も一般的となった手法が RNAi である. RNAi とは、外部から導入された二本鎖 RNA (dsRNA) が引き金となり、それと相補的な配列を持つ遺伝子の転写産物が分解される現象である (Fire et al. 1998). 通常、dsRNA の投与には、顕微注射法が用いられる.

しかし、本種は成虫でも体長が 0.5 mm 程度であり、そのような微小生物に対する顕微注射には、高度な技術ならびに高額な設備を要する. また、その侵襲性 (刺突) に起因する致死率は高く、効率的な実験遂行を阻害する. これら問題を解決するためには、dsRNA の非侵襲的な投与法を開発する必要がある.

ここで注目されている方法が dsRNA の経口投与である. なぜなら、害虫の生存や増殖に必須な遺伝子 (必須遺伝子) に対する dsRNA を経口投与し、RNAi を介した致死効果が誘導されれば、dsRNA を有効成分とした次世代農薬 (RNA 農薬) に発展する可能性があるからだ.

2. 研究の目的

そこで本研究では、ナミハダニを対象とした RNA 農薬の開発をゴールとし、RNAi の誘導因子である dsRNA を非侵襲的に体内に経口投与する手法の開発を試みた.

3. 研究の方法

dsRNA の非侵襲的な経口投与法として、dsRNA 溶液を塗布した葉を摂食させる手法 (塗布法) と、dsRNA 溶液に虫体を浸漬する手法 (浸漬法) を開発した (Suzuki et al. 2017a). まず、トレーサ色素を用いて、両手法における小分子の体内輸送効果を検証した. 次に、本種の中腸に存在する食細胞の液胞内の pH

を制御し、害虫防除標的として注目されている液胞型プロトン ATPアーゼ (*TuVATPase*) に対して、両手法による RNAi 効果を検証した (Suzuki et al. 2017b).

4. 研究成果

トレーサ色素を用いて、塗布法および浸漬法における小分子の体内輸送効果を検証した結果、いずれの手法でも中腸後方部への所在が確認された (図 1; Suzuki et al. 2017a).

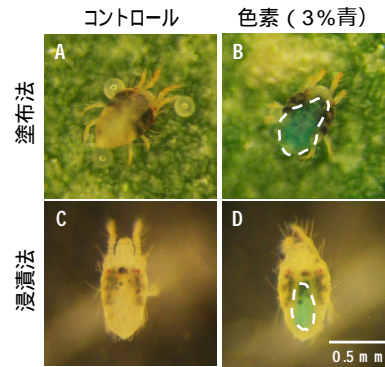


図 1. 塗布法 (A, B) および浸漬法 (C, D) によるトレーサ色素のナミハダニ体内輸送効果の確認. カラーでは白破線に囲われた部分 (中腸) が青色に染まっている.

次に、塗布法および浸漬法を用いて、*TuVATPase* 遺伝子に対する dsRNA を経口投与し、その RNAi 効果を検証した. その結果、塗布法および浸漬法いずれの手法を用いた場合も、*TuVATPase* 遺伝子発現量の低下に加え、体色が黒化した個体が出現した (図 2; Suzuki et al. 2017b). また、この黒色個体の生存率は、コントロール (通常色個体) のそれと比較して有意に低下した.

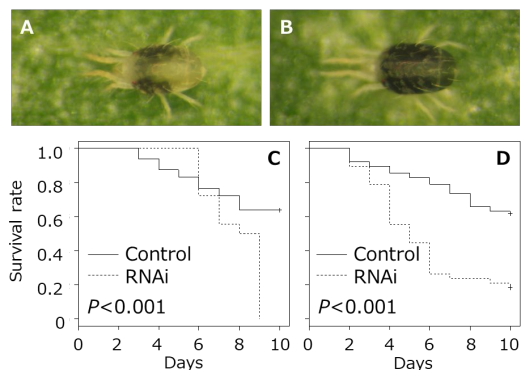


図 2. *TuVATPase* 遺伝子に対する RNAi 効果. コントロール (A) と比較して、RNAi 処理区では体色が黒化した個体が出現した (B). 体色が黒化した個体の生存率は、塗布法 (C) および浸漬法 (D) いずれの場合も、コントロールと比較して、有意に低下した ($n=18-76$; log-rank 検定).

ここで、VATPase とは真核細胞の液胞膜等に存在する酵素であり、ATP のエネルギーを利

用し、プロトン細胞質から液胞内に輸送することで液胞内の酸性状態を維持している (Nelson et al. 2000)。ハダニ類の消化器官には、上皮細胞由来の食球と呼ばれる浮遊細胞があり、口針で吸汁した食物(葉肉細胞の内容物)はこの食球内に取り込まれる(江原・真梶 1996)。また、食球内には液胞があり、これが食物の消化・吸収・排出機能を担っている(江原・真梶 1996)。食球は主に中腸の前方部(ventriculus および左右一対の caeca)に局在し、食物を取り込むと黒化する。通常色個体(図 2A)の背面から確認できる黒色部は、食球によって取り込まれた食物に起因する。RNAi によって *TuVATPase* 遺伝子の発現が抑制され、液胞の機能が低下した結果、食物を取り込んだ食球が中腸に広く蓄積し、体色の黒化(図 2B)が誘導されたと考えられる。

今後は、*TuVATPase* 遺伝子以外にも着目し、塗布法および浸漬法を基盤とした本種の増殖遺伝子の RNAi スクリーニングを実施する。これによって、本種防除に効果的な RNA 農薬の標的候補を選定していく。他方、dsRNA に頑健性を付与する担体についても検討する。具体的には、葉面に降り注ぐ紫外線や、消化液に含まれる核酸分解酵素から dsRNA を保護する担体を探り、RNA 農薬の製剤化を目指す。

<引用文献>

Dermauw et al. (2013) PNAS 110, E113-E122.
Fire et al. (1998) Nature 391, 806-811.
Grbić et al. (2011) Nature 479, 487-492.
Migeon and Dorkeld (2015) Spider Mites Web.
Mota-Sanchez and Wise (2017) Arthropod Pesticide Resistance Database.
Nelson et al. (2000) J Exp Biol 203, 89-95;
江原・真梶 (1996) 植物ダニ学. 419pp. 全国農村教育協会.

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2件、いずれも査読有)

1) Suzuki, T.*, M.A. Nunes*, M.U. España*, H.H. Namin, P. Jin, N. Bensoussan, V. Zhurov, T. Rahman, R. De Clercq, P. Hilson, V. Grbic and M. Grbic (2017b) RNAi-based reverse genetics in the chelicerate model *Tetranychus urticae*: A comparative analysis of five methods for gene silencing. *PLoS ONE* 12, e0180654.
DOI: 10.1371/journal.pone.0180654
*These authors contributed equally

2) Suzuki, T.*, M.U. España*, M.A. Nunes, V. Zhurov, W. Dermauw, M. Osakabe, T. Van Leeuwen, M. Grbic and V. Grbic (2017a) Protocols for the delivery of small molecules to the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*.

PLoS ONE 12, e0180658.

DOI: 10.1371/journal.pone.0180658

*These authors contributed equally

[学会発表](計8件)

1) 山川 颯太, 鈴木 文詞 (2018) ナミハダニが吸汁可能な粒子のサイズ. 第62回日本応用動物昆虫学会大会, 鹿児島, 2018年3月25-27日(ポスター)

2) Abouelmaaty, H.G., N.A. Ghazy, V. Grbic, M. Grbic and T. Suzuki (2018) Foliar application of dsRNA targeting chitinase gene in the spider mite, *Tetranychus urticae*. 第62回日本応用動物昆虫学会大会, 鹿児島, 2018年3月25-27日(口頭)

3) Suzuki, T., N.A. Ghazy, H.G. Abouelmaaty, S. Shibaya, K. Sasaya, S. Yamakawa, A. Takata and A.G. Abouelmaaty (2017) Toward integrated management of *Tetranychus urticae*: RNAi, natural enemies, and behavioural manipulation. 9th Spider Mite Genome Meeting, Logrono, Spain, October 23-25, 2017 (oral; invited)

4) 柴谷 駿, 鈴木 文詞 (2017) ナミハダニへのマイクロインジェクション法の検討. 第61回日本応用動物昆虫学会大会, 小金井, 2017年3月27-29日(ポスター)

5) Suzuki, T., H.G. Abouelmaaty, S. Shibaya and S. Yamakawa. Injection or ingestion of small molecules and particles into the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. 8th Spider Mite Genome Meeting, Logrono, Spain, October 17-19, 2016 (oral; invited)

6) Suzuki, T., M.A. Nunes, M.U. España, H.H. Namin, P. Jin, N. Bensoussan, V. Zhurov, T. Rahman, R. De Clercq, P. Hilson, V. Grbic and M. Grbic (2016) High-throughput platform for RNAi-based reverse genetics in the chelicerate model *Tetranychus urticae*. 8th Spider Mite Genome Meeting, Logrono, Spain, October 17-19, 2016 (oral; invited)

7) Abouelmaaty, H. and T. Suzuki (2016) Foliar application of dsRNA to RNAi-mediated gene silencing in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. 第25回日本ダニ学会大会, 札幌, 2016年10月14-16日(口頭)

8) Suzuki, T., M.U. España, M.A. Nunes, V. Grbic and M. Grbic (2016) RNA interference by soaking in the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. 25th International Congress of Entomology, Orlando, FL, September 25-30, 2016 (oral)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：節足動物の飼育容器及び節足動物の発
育同調方法
発明者：鈴木 丈詞
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-057691
出願年月日：平成 29 年 3 月 23 日
国内外の別：国内

○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
<http://web.tuat.ac.jp/~tszk/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 丈詞 (SUZUKI, Takeshi)
東京農工大学・大学院農学研究院・特任准
教授
研究者番号：60708311

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

Miodrag Grbic
Vojislava Grbic