

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18690

研究課題名(和文) 昆虫で起きるEnvironmental RNAiの分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Dissecting of Environmental RNAi mechanism in insect

研究代表者

宮田 恵多(MIYATA, Keita)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：90736290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、種々の昆虫を用いて口器からdsRNAを摂取することで起こるRNA干渉(e-RNA干渉)メカニズムを明らかにすることを目的として行った。dsRNAを種々の昆虫に経口摂取させたところ、RNA干渉の誘導が認められた種と認められない種に分けられた。RNA干渉が誘導された昆虫は、腸管からdsRNAを吸収していたが、認められなかった種の腸液とdsRNAを混合したところdsRNAは容易に分解されていた。dsRNAの安定性を向上させ経口摂取させたところ部分的なRNA干渉の誘導が認められた。これらの結果から、昆虫がe-RNA干渉を示すには腸管内でのdsRNAの安定性が関与していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA干渉は、外来から二本鎖のRNA(dsRNA)が細胞内に侵入した際、遺伝子の発現が特異的に抑制される現象である。数種類の昆虫がdsRNAを餌と共に摂取することでRNA干渉が起こること(e-RNA干渉)が報告され、害虫防除への応用に注目が集まっている。本研究では、昆虫がdsRNAを餌と共に摂取した際、e-RNA干渉が起こるためにはdsRNAが安定した状態で吸収される必要があることを明らかとした。本研究成果は、化学物質の使用の減少を可能とする可能性を秘めるe-RNA干渉を応用した害虫防除法の確立のために必須のデータある。

研究成果の概要(英文)：RNA interference (RNAi), a phenomenon in which silencing of gene expression is triggered by a double-stranded RNA (dsRNA) molecule, has been established as useful tool for reverse genetics studies in many organisms. RNAi triggered via injection of dsRNA is widely used in many insects. RNAi has been demonstrated in some insects when fed with dsRNA. This discovery indicates the possibility of environmental RNAi (e-RNAi), which can potentially be used in RNAi-based pest management. However, information of insect e-RNAi is a little. In this study, to dissect insect e-RNAi investigated whether several insects display e-RNAi. The result showed some insects did not display e-RNAi, and dsRNA was unstable in those midgut juice. e-RNAi was slightly induced in insect which did not display e-RNAi, when fed improved dsRNA for degradation by midgut juice. These results provide the definitive relation between stability of dsRNA for midgut juice and displaying of robust e-RNAi in insect.

研究分野：分子生物学、食品衛生学

キーワード：RNA干渉 害虫防除

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Fire 博士と Mello 博士らはモデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を用いて、細胞内に二本鎖の RNA (double stranded RNA; dsRNA) が侵入すると、それと相補的な遺伝子の発現の抑制が起こることを 1998 年に報告した<sup>1)</sup>。RNA 干渉は、様々な生物で起こることが判明し、そのメカニズムも明らかとなっている。先ず、体内へ導入された外来の dsRNA は、Dicer というヌクレアーゼにより切断され 21-23 塩基対の低分子 RNA (small interfering RNA: siRNA) となる。その後、siRNA は Argonaute などの種々のタンパク質と会合して RNA induced silencing complex (RISC) を形成する。RISC は、siRNA に相補的な mRNA を特異的に認識、切断することで結果として mRNA の発現の抑制が起こる。この一連の流れが RNAi の基本機構として提唱され、現在、RNA 干渉は様々なモデル生物で逆遺伝学を行う際の安定したツールとして確立されている。

RNA 干渉を起こすに必須の工程である外来 dsRNA の導入は、注射により直接的に体内へ dsRNA を導入する方法が最も一般的である。一方、線虫 *C. elegans* は、dsRNA 導入した部位で RNA 干渉が起こることはもちろん、導入された部位から全身にその影響が伝わる性質 (Systemic RNAi) を有し、さらに、*C. elegans* は外来の dsRNA を腸管から取り込む性質を示す。そのため、dsRNA の現大腸菌の給餌や dsRNA 溶液への浸漬により外来 dsRNA を体内へ導入して RNA 干渉を誘導すること (Environmental RNA 干渉: e-RNA 干渉) が可能である<sup>2, 3)</sup>。これまで e-RNA 干渉は *C. elegans* のみで報告されていたが、近年、数種の昆虫へ dsRNA 発現トランスジェニック植物あるいは dsRNA を含む人工飼料を給餌すると、摂食した昆虫で RNA 干渉が起こることが報告された<sup>4, 5)</sup>。現在、この現象を害虫防除への応用に関する研究が盛んに行われている。すなわち、農作物の栽培や生活環境で人に不利益を及ぼす害虫の餌へ害虫の生存に関わる遺伝子と相補的な配列の dsRNA を混合し、害虫に e-RNA 干渉を誘導することで防除するという考え方である。このアイディアは、従来の農薬 (化学物質) による害虫防除で使用する農薬の削減につながるなど、化学物質のヒト、環境への影響を減らすことにつながるため、現在注目を集めている。しかしながら、昆虫の示す e-RNA 干渉に関する情報は非常に少ないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに e-RNA 干渉を示すことが報告されているオオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) 幼虫をモデル生物に用いて e-RNA 干渉メカニズムを明らかにすることを目的とした。経口的に摂取された dsRNA は、腸管から吸収されることが予想される。本研究では、腸管から吸収された dsRNA が全身で RNA 干渉を誘導するか否かを明らかにすることとした。また、dsRNA と腸管の相互作用を調べることも目的とした。また、これまでに e-RNA 干渉を示すか否かの報告のない、イエシロアリ (*Coptotermes formosanus*)、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) に対して dsRNA を経口的に摂取させ、幅広い種の昆虫で e-RNA 干渉が起こるか否かを調べた。

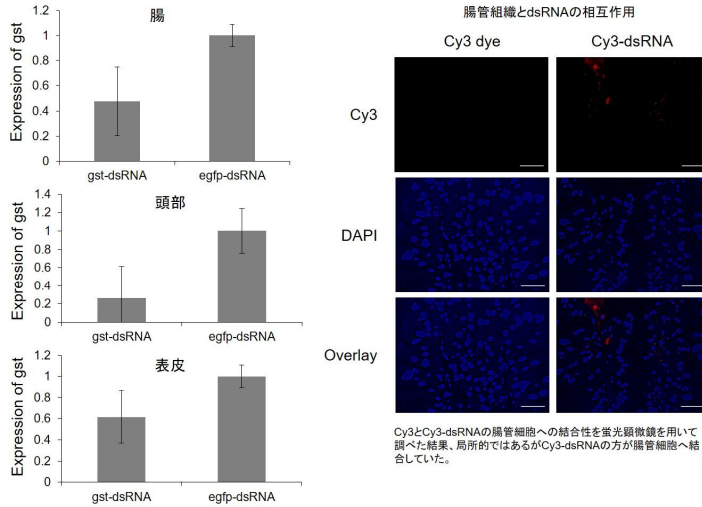
### 3. 研究の方法

オオタバコガ、イエシロアリおよびワモンゴキブリは、住化テクノサービス株式会社から購入したものをを用いた。

- (1) 3 齢オオタバコガ幼虫一頭をプラスチックディッシュ (直径 3.5 cm) で dsRNA 溶液を含んだ人工飼料を与え、その後 RNA を抽出し、リアルタイム PCR で標的遺伝子の発現変動を解析した。また、幼虫から腸管を摘出したホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した。さらに、パラホルムアルデヒドで固定した腸管も用意し、それを用いて凍結切片を作製した。それらの組織切片を用いて dsRNA と腸管との相互作用を解析するために dsRNA を Cy3 でラベルした。組織切片と Cy3 ラベル dsRNA を反応させ、洗浄後、蛍光顕微鏡で腸管組織と dsRNA の相互作用を観察した。
- (2) イエシロアリ (職蟻) は、ディッシュ (直径 3.5 cm) の中へ 15 頭入れた。イエシロアリの入っているディッシュの中に濾紙 (縦 2cm、横 2cm) を入れ、濾紙に 50  $\mu$ l の dsRNA 溶液 (10  $\mu$ g の dsRNA、0.5% ナイルブルー) を染み込ませた後、インキュベーター内でイエシロアリを 3 週間飼育した。なお、ナイルブルーは、イエシロアリが dsRNA を摂取しているか否かを判定するマーカーとするために dsRNA 溶液に混合した。dsRNA を摂取したイエシロアリから RNA を抽出し、リアルタイム PCR により RNA 干渉標的遺伝子の発現変動を解析した。
- (3) ワモンゴキブリの終齢幼虫に dsRNA 溶液をハミルトン製シリンジ (1701RN Neuros Syringe) を用いて腹部から導入した。脱皮後の表現型およびリアルタイム PCR により RNA 干渉が誘導されているか否かを解析した。また、摘出した腸管を PBS に浸し腸液を調整した。調整した腸液と dsRNA を混合し、インキュベート後、アガロースゲル電気泳動解析結果から dsRNA の安定性を評価した。

#### 4. 研究成果

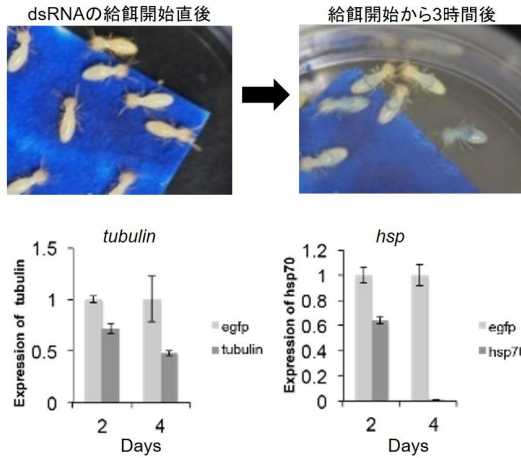
##### (1) オオタバコガ幼虫の示す e-RNA 干渉



dsRNAを含む餌の給餌を開始してから4日後には腸管で標的遺伝子の発現の特異的抑制が起こっていた。dsRNAを摂取した幼虫の各組織(表皮、頭部)での標的遺伝子の発現を調べた結果、上図で示すように標的遺伝子の発現は抑制されていた(n=5-12, p<0.05)。

オオタバコガ幼虫(3令)に dsRNA を含む人工飼料を給餌し、4 日後、腸管での標的遺伝子の発現を調べた結果、標的遺伝子の発現の抑制は起こっていた(図左、n=5、p<0.05)。さらに、腸管の組織切片と Cy3 ラベルした dsRNA を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した結果、dsRNA が腸管上皮に結合していた。さらに、dsRNA を摂取した幼虫の各組織(表皮、頭部)での標的遺伝子の発現を調べた結果、左図で示すように標的遺伝子の発現はコントロールに比べ抑制されていた(n=5~12、p<0.05)。これらの結果から、オオタバコガ幼虫は dsRNA を腸管から吸収し、それによって全身で RNA 干渉が誘導されることが明らかとなった。

##### (2) イエシロアリが示す e-RNA 干渉

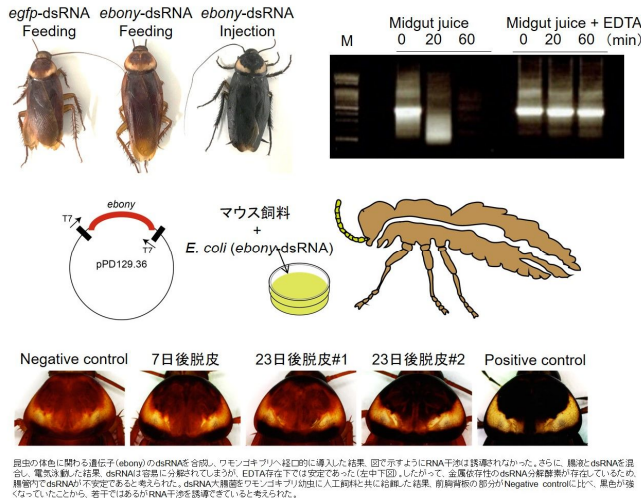


図で示すように餌を摂取したイエシロアリの腸管は青く染色される餌を確実に摂取していることを確認することが出来た。dsRNAを摂取後の標的遺伝子の発現量調べた結果、上図左が示すように、摂取4日後には標的遺伝子の発現は5割以上減少していた。

イエシロアリに dsRNA 溶液とナイルブルーをしみこませた濾紙を飼料として給餌し、経口的 dsRNA の導入を行った。左図で示すように濾紙を摂取したイエシロアリの腸管は青く染色され、濾紙を確実に摂取していることを確認することが出来た。dsRNA を摂取後の標的遺伝子の発現量を調べた結果、上図左が示すように 摂取 4 日後には標的遺伝子 (*tubulin* および *hsp*) の発現は 5 割以上減少していた。したがって、イエシロアリでは e-RNA 干渉が起こることが示唆された。

##### (3) ワモンゴキブリが示す e-RNA 干渉

ワモンゴキブリの体色に関わると考えられる遺伝子 (*ebony*) の dsRNA を合成し、注射で腹部から導入した結果、図で示すように野生型に比べ体色が黒い表現型が現われた。続いて、ワモンゴキブリへ経口的に導入した結果、左上図で示すように RNA 干渉は誘導されなかった。腸液と dsRNA を混合し、電気泳動した結果、dsRNA は容易に分解されていることが認められた。さらに、dsRNA-腸液の混合液に EDTA を添加すると dsRNA の分解は認められなかった。したがって、金属依存性の dsRNA 分解酵素が腸液に存在しているため、腸管内で dsRNA が不安定であることが考えられた。dsRNA の経口的導入により RNA 干渉を誘導するためには dsRNA を腸管内で安定化する必要性が考えられたため、dsRNA を大腸菌に発現させ、その大腸菌をワモンゴキブリに給餌した。その結果、注射により dsRNA を導入した様な表現型は現れなかったが、前胸背板の部分がコントロールに比べ、黒色が強くなっていったことから、若干ではあるが RNA 干渉を誘導できていると考えられた。



本研究の結果から、オオタバコガ、イエシロアリは dsRNA を経口摂取することで RNA 干渉が誘導されたがワモンゴキブリでは RNA 干渉は誘導されなかった。したがって、全ての昆虫が e-RNA 干渉を示すわけではないことが明らかとなった。また、ゴキブリに関しては dsRNA の経口摂取により RNA 干渉を誘導するためには、腸内で dsRNA の安定化が必要であることが考えられた。

(参考文献)

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811
- 2) Hunter CP, Winston WM, Molodowitch C, Feinberg EH, Shih J, Sutherlin M, Wright AJ, Fitzgerald MC (2006) Systemic RNAi in *Caenorhabditis Elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71: 95-100
- 3) William M Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH, Hunter CP (2007) *Caenorhabditis Elegans* SID-2 Is Required for Environmental RNA Interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(25):10565-10570
- 4) Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol*, 25, 1322-1326
- 5) Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol*, 25, 1307-1313

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田恵多、小澤壮太、長谷川浩一
2. 発表標題 RNA干渉を応用した害虫防除システムの検討
3. 学会等名 第34回日本ペストロジ－学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田恵多、小澤壮太、長谷川浩一
2. 発表標題 RNA干渉による害虫防除は有効か？
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----