

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19376

研究課題名(和文) RNAiが簡便なカメムシ培養細胞株の樹立と分散型動原体の研究

研究課題名(英文) Embryonic cell culture for molecular studies of hemipteran diffused kinetochores

研究代表者

二橋 美瑞子(長内美瑞子)(Osanai-Futahashi, Mizuko)

茨城大学・理工学研究科(理学野)・准教授

研究者番号：00422402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核細胞の染色体分配に必要不可欠である動原体複合体の進化の理解を目指し、分散型動原体を持ち、かつ新規動原体構成因子の存在が期待されるカメムシにおいて、胚由来細胞の培養および、動原体構成因子候補遺伝子のRNAi解析を実施した。その結果、安定的にホソヘリカメムシ胚由来細胞の初代培養が可能となる条件を見出し、カメムシ目において初めて動原体構成因子の機能解析と同定に成功した。さらに、動原体構成因子としての機能を喪失したホモログ遺伝子の存在も明らかにした。一連の成果は、カメムシ目における細胞培養及び動原体複合体の構成について重要な知見を与え、新規動原体タンパク質探索の足掛かりとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動原体複合体は真核細胞の染色体分配に必要不可欠である。その構成要素や局在は真核生物において激しく進化しているが、その知見は局在型動原体の生物種に偏っている。本研究は、分散型動原体をもつ生物のグループの一つであるカメムシ目において、全身性RNAiを活用して動原体構成因子の機能解析に成功した世界で初めての事例である。また、本研究により明らかにされた動原体構成因子の知見および、確立された胚由来細胞の初代培養法は、カメムシの新規動原体構成要素やセントロメア配列同定、ひいては比較解析による真核生物の動原体進化の解明につながる重要な足掛かりを与えるものであり、細胞培養法は新規農薬開発への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：The kinetochore is a rapidly evolving critical protein complex which binds the chromosomes and the microtubules to direct chromosome alignment and segregation in eukaryotic cell division. Studies on kinetochores have been mainly from species which the kinetochore assembly occur at a single chromosomal locus. However, kinetochore protein complexes bind along the entire chromosomes in about one third of known species. Although these “diffused kinetochores” have evolved in animals and plants multiple times, most of the molecular knowledge has been obtained from the nematode *C. elegans*. To establish a novel model system for studying the evolution of kinetochore localization and protein complex, embryo-derived cell culture method was established for hemipteran *Riptortus pedestris*, which have diffused kinetochores and presumed to lack many kinetochore components. In addition, we succeeded in functional analyses of kinetochore gene homologs using RNAi in for the first time in hemipterans.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：動原体 培養細胞 カメムシ 昆虫 分散型動原体 細胞分裂 キネトコア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動原体は、真核生物の染色体に必要不可欠な構造の一つであり、細胞分裂の際、複製した染色体を娘細胞に引っ張る紡錘系が結合するタンパク質複合体である。多くの真核生物は、動原体が染色体の一方にある局在型動原体を持つが、一部の真核生物は、動原体が染色体中に散らばっている『分散型動原体』を持つ(図1)。分散型動原体をもつ染色体は切断されても世代を超えて維持される場合がある、減数分裂のみ動原体が局在型に変化する種も存在するなど、興味深い性質がみられる。

分散型動原体は真核生物の進化の過程で10回以上独立に出現しており、全記載種の3割以上を占めると想定されるものの、その分子機構は線虫以外の生物では未解明であった。そこで、本研究では、分散型動原体の研究材料としてカメムシ目昆虫に着目した。カメムシでは、実験生物として極めて有利な性質である二本鎖RNAを体腔中に注入するだけで全身の細胞で遺伝子機能が抑制される「全身性RNAi」応答が引き起こされる(Futahashi et al., 2011 Insect Biochem Mol Biol)。同じく分散型動原体を持つカイコ(チョウ目昆虫)はこの性質を持たないため、胚発生の時期以外ではRNAiによる全身での遺伝子発現抑制はできないことと比べると、カメムシは分散型動原体遺伝子の個体レベルの研究に良い材料であると研究代表者は考えた。

全身性RNAi応答が起きる甲虫コクヌストモドキの胚子から樹立された培養細胞Tc81は、他の昆虫培養細胞と異なり、リポフェクション試薬を使わずとも培地中に二本鎖RNAを加えるだけでRNAiを誘導できる画期的な性質を持つ(Kayukawa et al., 2013 Sci Rep)。コクヌストモドキは局在型動原体を持つため、分散型動原体の解析には利用できないが、全身性RNAi応答能を持つ分散型動原体のカメムシから培養細胞株が樹立できれば、二本鎖RNAを加えるだけでリポフェクション試薬を使わずともRNAiを誘導できる可能性が高く、分散型動原体の有力な研究モデル系となると着想した。

2. 研究の目的

カメムシの培養細胞は市販・ストックセンターで分譲されているものは存在しなかった。そこで、本研究では、カメムシの中でも、個体の入手や飼育も容易であり、悪臭のないホソヘリカメムシからRNAiが簡便な培養細胞株を樹立し、個体と培養細胞を用いてホソヘリカメムシにおける動原体関連遺伝子のRNAiによる機能解析系を立ち上げることにより、分散型動原体研究の新規モデル系を構築することを着想した。

3. 研究の方法

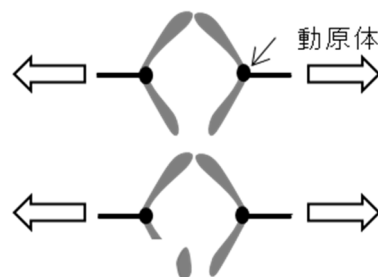
(1) 個体におけるRNAi解析系の確立

一般的に、動原体構成因子の機能阻害は細胞分裂異常を引き起こす。そこで、ホソヘリカメムシの成虫メスに、二本鎖RNA(dsRNA)を注入することで、7つの動原体構成因子のホソヘリカメムシのホモログ候補遺伝子について、細胞分裂が盛んな胚におけるRNAiを用いた機能阻害(parental RNAi)を行い、孵化率の解析及びチューブリン抗体を用いた胚の免疫染色による細胞の状態の解析を行った。さらに、幼虫にもdsRNA投与実験を行い、生存率、体幅、体重の測定を行い、成長の状態を観察した。RNAi解析は連携研究者の二橋亮博士(産業技術総合研究所)の助言の元で実施した。

(2) 培養細胞株の樹立と機能解析系の確立

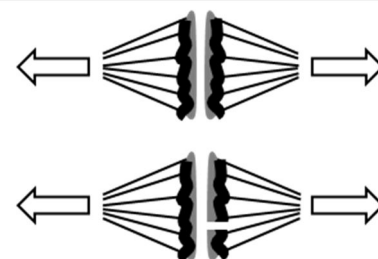
消毒したホソヘリカメムシの卵を培地中でペッスルを用いてつぶし、培地中に出てきた細胞の静置培養を行った。消毒方法、使用する胚の産卵からの時間数、細胞間接着の剥離処理、培地組成を変更した際の細胞の状態を比較し、細胞培養条件を検討した。さらに、新規DNA合成をモ

局在型動原体 (大部分の真核生物)



- 動原体が染色体の一方に局在
- 染色体が切断されると細胞分裂の際に失われる

分散型動原体 (カイコ、カメムシ、線虫など一部の生物)



- 動原体が染色体中に散在
- 切断された染色体も保持

図1: 分裂期後期の分散型動原体と局在型動原体

ニターするため、FaraEdu 取り込み実験を行った。また、微小管の状態と分裂期細胞の染色体を検出するための免疫染色法の確立、RNAi の試み、および RNAi 経路に関わる遺伝子の発現解析、ホソヘリカメムシのアクチン遺伝子上流配列をサブクローニングしたプラスミドを用いたプロモーター活性の検出を試みた。細胞の初代培養は、仁木雄三教授（茨城大学）の助言の元で実施した。

4. 研究成果

(1) 個体における RNAi 解析系の確立

Parental RNAi による胚の RNAi 解析においては、7 つの候補遺伝子のうち、4 つの遺伝子については RNAi により孵化率が抑制された。さらに、これらの胚では間期の細胞が激減しており、細胞分裂異常が示唆された（図2）。parental RNAi による抑制によって、孵化および細胞分裂の阻害が誘導された遺伝子は、幼虫において RNAi による機能阻害を行った場合についても、幼虫の成長、脱皮、成虫への変態を阻害することが判明した。

さらに、動原体構成因子の中でも、染色体の近くに位置し、細胞周期を通じて染色体上に存在すると考えられているインナーキネトコア因子と、分裂期にインナーキネトコア因子の上に結合して微小管との結合を仲介するアウターキネトコア因子では、RNAi による機能阻害の幼虫への影響が異なる傾向が示された。また、精巢の赤い色素の合成経路にかかわる遺伝子の RNAi 実験から、精巢において RNAi の効力があることが示唆された。さらに、終齢幼虫と成虫において腸管及び生殖巣の チューブリンと分裂期特異的リン酸化ヒストン H3 の免疫染色の方法を確立した。また、抗体産生に使用するため、動原体構成因子の部分長を組換えタンパク質として大腸菌で発現、精製し、マウスに免疫した。

(2) 培養細胞株の樹立と機能解析系の確立

使用する胚のステージ、消毒条件、培地組成を検討した結果、再現よく胚由来細胞を培養可能な条件を見出すことに成功した（図3）。さらに、FaraEdu 取り込み実験により DNA の新生鎖合成の検出に成功した。また、部分的にはあるが細胞を一層で培養できる細胞間接着解離条件を見出し、免疫染色により微小管及び分裂期染色体の検出にも成功した（図3）。

培養開始 1 か月程度の細胞をピペティングによりはがし、播きなおしたところ、増殖が見られなかったため、他の継代法を試す必要がある。今後は、継代を試みる際に、数か月～1 年と、より長い期間培養した細胞や、細胞間接着剥離酵素の利用を試みる予定である。

また、細胞分裂に関わる遺伝子の dsRNA を培地中に添加したところ、リポフェクション試薬の有無に寄らず、細胞分裂異常の検出数が非常に少なかった。ただし、標識した siRNA の取り込みや、RNAi 経路関連遺伝子の発現解析の結果から、RNAi が効かないとは言い切れなかったため、長期間培養して細胞倍加スピードが上がってから再実験する予定である。

今回サブクローニングしたホソヘリカメムシのアクチン遺伝子上流配列は、下流につないだ mcherry 遺伝子の発現を十分に誘導しなかったことから、より長い上流配列や、他のハウスキューピング遺伝子上流配列のプロモーター活性を試す必要があると考えられる。

(1) の成果は、カメムシにおける動原体構成因子の機能解析として世界初である。さらに、カメムシでは一部の動原体構成因子が欠落している又は非常に速く進化していると推定されるため、本研究で産生を試みているカメムシの動原体構成因子の抗体を用いて、体細胞、生殖細胞における動原体構成因子の局在解析と比較、未知の動原体構成因子や、動原体が結合する DNA 配列などの同定が行えることが期待される。カメムシの動原体の知見が明らかになれば、カイコや線虫など、独立に分散型動原体を獲得した他の種や、より近縁な局在型動原体の生物種との比較解析により、動原体複合体の進化について画期的な知見がもたらされることが期待される。

また、(2) では完全な培養細胞株の樹立には至っていないものの、今後の培養細胞株樹立や機能解析系の構築への予備的な知見が蓄積された。カメムシの培養細胞株の樹立は農業スクリーニングなどの応用研究にも寄与することが期待される。

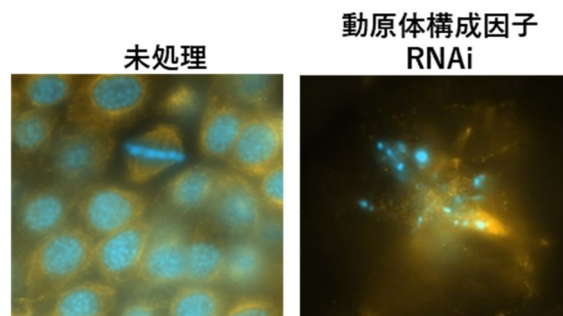


図2: Parental RNAi を利用したホソヘリカメムシの胚における動原体構成因子の機能解析
αチューブリンは橙色(免疫染色)、DNAは水色(DAPI染色)で示す。多くの動原体構成因子のホモログでは間期の細胞が少なく、細胞分裂異常が検出された。

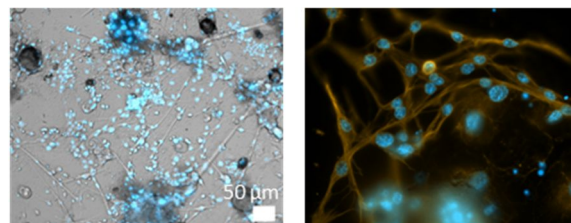


図3: 培養開始後2週間のホソヘリカメムシ胚由来細胞
左は明視野とDAPI(DNA)染色(水色)の重ね合わせ画像、右は微小管の免疫染色(橙色)とDAPI(DNA)染色(水色)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川匠・二橋美瑞子
2. 発表標題 分散型動原体を持つホソヘリカメムシの胚と幼虫における動原体遺伝子の機能解析
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第92回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 遥・八木橋 泰仁・二橋 亮・二橋 美瑞子
2. 発表標題 分散型動原体を持つ4種のトンボにおける胚の免疫染色法の確立およびカイコの個体組織・培養細胞における動原体タンパク質の局在解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川 匠・鈴木 遥・佐藤 良賢・峯岸 桃子・八木橋 泰仁・二橋 美瑞子
2. 発表標題 動原体進化の解明に向けた昆虫の分散型動原体複合体の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉川匠、佐藤良賢、峯岸桃子、二橋美瑞子
2. 発表標題 分散型動原体を持つホソヘリカメムシの胚と幼虫における動原体遺伝子の機能解析系の構築
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第91回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木遥、八木橋泰仁、二橋亮、二橋美瑞子
2. 発表標題 分散型動原体を持つカイコの個体組織における動原体タンパク質の局在解析および四種のトンボにおける胚の免疫染色法の確立
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第91回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二橋 美瑞子・佐藤 良賢・八木橋 泰仁 ・鈴木 遥・峯岸 桃子
2. 発表標題 チョウ目とカメムシ目における分散型動原体構築の要となる遺伝子の機能解析
3. 学会等名 令和2年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木橋 泰仁、星野 みゆき、太田和 瑞基、鈴木遥、二橋 美瑞子
2. 発表標題 分散型動原体をもつカイコの動原体構築にはCENP-Iが鍵となる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣田遥菜、二橋亮、高須陽子、飯塚哲也、内野恵郎、田村俊樹、瀬筒秀樹、二橋美瑞子
2. 発表標題 カイコ蛹期翅高発現遺伝子のRNA-seq解析およびノックインによる遺伝子の空間的発現の解析
3. 学会等名 令和2年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣田遥菜、二橋亮、高須陽子、飯塚哲也、内野恵郎、田村俊樹、瀬筒秀樹、二橋美瑞子
2. 発表標題 カイコ蛹期翅高発現遺伝子の発現パターンの解析およびノックインによる遺伝子の空間的発現の解析
3. 学会等名 第5回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂寄和哉、二橋亮、内山博允、矢嶋俊介、坪田拓也、飯塚哲也、瀬筒秀樹、二橋美瑞子
2. 発表標題 カイコ変異体優性赤蟻Iaの濃色メラニン抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤良賢・峯岸桃子・二橋美瑞子
2. 発表標題 カラムシにおける分散型動原体の機能解析用実験系の構築
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本蚕糸学会 [編]	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 224
3. 書名 カイコの科学	

〔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
連携研究者	仁木 雄三 (Niki Yuzo) (00134164)	茨城大学・理学部・教授 (12101)	
連携研究者	二橋 亮 (Futahashi Ryo) (50549889)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関