

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580077

研究課題名(和文) 昆虫細胞における dsRNA 応答機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of dsRNA mechanism of response in insect cell

研究代表者

LEE JAEMAN (LEE, JAEMAN)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50404083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子解析において、最も有効な手段の一つである遺伝子機能阻害法として、昆虫細胞における効率的な RNAi 誘導システムの確立を目的に、dsRNA の取り込みを向上させる膜タンパク質の導入と昆虫細胞内の dsRNA 応答機構の解析を行った。その結果、線虫由来の膜タンパク質 Sid-1 が最も有効であることを明らかにし、同遺伝子を導入した種々のカイコ培養細胞を樹立した。また、カイコ RNAi 関連因子の同定と機能解析を行い、各因子の機能と各因子間の相互作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to establish efficient RNA interference induction system in insect cells, we introduced several membrane proteins, which have the ability to uptake dsRNA into the cells. Also the cellular responses against dsRNA uptake were analyzed using silkworm cells. As a result, we found that *C. elegans* Sid-1 membrane protein possessed an ability to uptake dsRNA efficiently. Using this protein, several transgenic insect cell lines were successfully established. Furthermore, almost all RNAi related components of silkworm were isolated and characterized.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：RNA interference 遺伝子機能阻害 dsRNA 応答機構

1. 研究開始当初の背景

RNA interference (RNAi)は標的遺伝子の mRNA に対する dsRNA を細胞内に導入することで簡単に遺伝子ノックダウン個体を作製することができる手法で、近年、様々な生物種において、その有効性が注目を集めている。ヒトやマウスなどの哺乳類細胞などでは、長鎖 dsRNA の導入により RNAi を誘導することはできないが、短い siRNA を導入することで配列非特異的な反応を抑え、標的遺伝子のみを発現抑制できる。哺乳類細胞において長鎖 dsRNA を導入することができない大きな理由は、dsRNA に応答する機構が複数存在し、長鎖 dsRNA を細胞に導入した際には、RNAi 経路以外の 2 経路、PKR 経路と RNaseL 経路が主として活性化され、配列非特異的な遺伝子発現抑制(主に翻訳レベル)が起こり細胞は死に至るためである。ところが、昆虫では、長鎖 dsRNA の導入によっても配列特異的な RNAi が誘導される場合があり、必ずしも PKR 経路と RNaseL 経路が活性化されるわけではない。このことはカイコを含む昆虫細胞において、網羅的かつ効率的な RNAi による遺伝子機能解析システムが構築できる可能性があることを示しているが、ショウジョウバエを除く昆虫細胞における dsRNA 応答の分子機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

遺伝子解析において、当該遺伝子の機能を阻害し、その表現型を解析することは最も有効な手段の一つである。RNAi は、従来の遺伝子ノックアウト個体作製法に比べて、導入遺伝子が相同組換えより染色体へ挿入されることに依存しないため、高等真核生物のように相同組換え頻度が低い生物においては特に有用な方法である。しかし、いくつかの成功例はあるものの、哺乳類や昆虫も含めて、個体レベルでの効率的な RNAi 法は確立されているとはいえない。甲虫類などでは、長鎖 dsRNA の導入により効率的に標的遺伝子特異的な全身性 RNAi が誘導されることが知られているが、カイコなどの鱗翅目昆虫では、各組織における dsRNA の取り込みが悪く、長鎖 dsRNA の大量投与のみでは、効率的に全身性 RNAi を引き起こすことはできない。そのため、この問題を解決するには、大きく分けて 2 つの方法が考えられる。1 つは、各組織における dsRNA の取り込みを向上させる方法、もう一つは、昆虫細胞内の dsRNA 応答機構を解明することにより、取込まれた dsRNA が siRNA へとプロセスされ RISC 複合体へ取り込まれる各過程の効率を向上させる方法である。このように、本研究の目的は、dsRNA 応答の分子基盤を理解することを通じて、多くの農業害虫を含む鱗翅目での効率的な RNAi 誘導法の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

線虫や甲虫の一種であるコクヌストモドキは、全身性 RNAi が容易に誘導可能であることが知られている。コクヌストモドキについては、dsRNA を取込む膜タンパク質は同定されていないが、線虫では Sid-1、2 と呼ばれる膜タンパク質が dsRNA の積極的な取り込みを担っていると考えられている。そこで、これらの因子のカイコ培養細胞への導入による dsRNA 取り込み効率の向上、内在性の膜通過、輸送タンパク質を利用した組織への dsRNA 導入機能を有する新規機能ペプチドの合成と dsRNA デリバリー効率の向上を試みた。

本来、RNAi は RNA ウイルスなどの外来 dsRNA に対する生体防御の一経路であると考えられており、細胞には RNAi 以外にも dsRNA に対する防御経路が存在する。哺乳類細胞では dsRNA 応答経路として dsRNA-dependent Protein Kinase K (PKR) による翻訳抑制経路と RNaseL による dsRNA 分解経路が知られており、まだ未知の応答経路が存在する可能性もある。昆虫細胞においてはこれら dsRNA 応答反応についての知見がなく、細胞内で起こる反応を理解しないままに、個々の標的遺伝子に対する dsRNA を導入し遺伝子ノックダウンを試みている。そこで昆虫細胞における siRNA を含む small RNA 関連遺伝子の同定と機能解析を行い、外来 dsRNA の導入により誘導される細胞内の現象を解析した。

4. 研究成果

まず、dsRNA の取り込みを促進する因子の探索については、線虫由来の膜タンパク質 Sid-1~7 遺伝子について、形質転換カイコ培養細胞を作製し、取り込み効率を測定したところ、Sid-2~7 遺伝子の導入は、促進効果が認められなかった。一方、sid-1 を導入については、樹立した多数のカイコ培養細胞の内、BmN4 細胞のみがほぼ 100% の導入効率を示し、非常に低濃度の dsRNA を培地中に添加するだけで、RNAi が誘導できることを示した。また、カイコ以外のヨトウガ Sf9 細胞についても Soaking RNAi 誘導が可能な細胞を樹立した。さらに、BmN4 sid-1 細胞が dsRNA のみならず、dsDNA を取込む能力があることを発見した。カイコ組織への dsRNA の取り込みを促進できる新規機能ペプチドの合成については、カイコ脂肪体において生合成され、体液をへて卵巣に取込まれる 30kDa タンパク質と RNA 結合能を持つ N タンパク質の融合タンパク質を作製・大腸菌発現系を用いて精製した。精製した融合タンパク質は、RNA 結合能を有していた。また、融合タンパク質と N タンパク質結合配列を持つルシフェラーゼ mRNA を結合させた上で、カイコ幼虫に注射したところ、卵巣においてルシフェラーゼ活性が検出された。次いで、同システムにより、内在性遺伝子(カイコ第三白卵遺伝子)を標的とした dsRNA を導入し、RNAi 誘導実験を行ったが、表現型(白卵の産下)は観察されなかった。カイコ細胞において dsRNA の取り込みを促進す

るコクヌストモドキ遺伝子の探索については、現在まで、カイコ培養細胞において dsRNA の取り込みを促進する遺伝子は得られていない。

まず、カイコ RNAi 関連因子の機能解析を行うために、カイコ培養細胞内で長鎖 dsRNA より siRNA を合成する酵素である Dicer および、AGO2、R2D2、TudorSN、Loqs などの RISC を形成する遺伝子群をクローニングし、各因子間の相互作用解析、遺伝子ノックダウンによる機能解析を行った。その結果、Ago2-Dicer-2 および Ago2-R2D2 は主に細胞質で相互作用することが明らかとなり、Ago2-Loqs に関しては同様に細胞質で相互作用していたが、顆粒状の構造を形成していることが明らかになった。特に、TudorSN、Loqs については RNAi 誘導には必須の因子でないことも明らかになった。

カイコ培養細胞内で siRNA、miRNA 経路に関与する遺伝子群の内、RISC 因子でありながら RNAi 誘導には必須の因子でないことを明らかにした Tudor-SN については、その未知機能を推定するために、局在解析、相互作用解析を行った。その結果、同タンパク質が eIF4E、Tia1、Ago1、Ago2 と共に熱誘導により速やかにストレス顆粒を形成すること、Tia1、Ago1、Ago2 は Tudor-SN のストレス顆粒局在に必要であり、そのシグナルは SN2 領域が担っていることを明らかにした。さらに、カイコ Ago1 が脱キャップ酵素 Dcp2 とともに P-body に局在し、miRNA 依存的に mRNA の翻訳抑制を行っていること、F522 と F557 は、翻訳抑制と P-body への局在に必要であることを示した。一方、Loqs は Dcr2 と D2 様顆粒へ共局在し、Ago1、Ago2 と相互作用するが、R2D2 は、D2 様顆粒へ共局在せず、Ago2 とのみ相互作用することを示した。これは、ショウジョウバエとは異なる結果であった。

最後に、カイコ培養細胞において、BmAgo1 と BmAgo2 のノックダウン時に共通して転写量が変化する遺伝子として、macula-like latent virus (BmMLV)、Synaptic ras gtpase activating protein、Bm8 interacting protein を同定した。この中でも、BmMLV は培養細胞に持続感染している RNA ウイルスで、未処理区においても比較的強い転写が認められたが、アルゴノートタンパク質をノックダウンすると顕著な転写の増加が認められた。その他の RNAi 関連遺伝子についてもノックダウンの影響を解析したところ、アルゴノートタンパク質と同様に Dcr1、Dcr2 ノックダウンでは強い BmMLV 転写促進が観察された。また、Loqs、Drosha、Pahsa、R2D2 についても、転写促進が観察された。

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8件)

Hiroaki Mon, Isao Kobayashi, Shinji Ohkubo, Shuichiro Tomita, JaeMan Lee, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, Takahiro Kusakabe, (2012) Effective RNA interference in cultured silkworm cells mediated by overexpression of *Caenorhabditis elegans* SID-1. RNA Biol., 9, 40-46.

JaeMan Lee, Yoshito Kojin, Hiroaki Mon, Tsuneyuki Tatsuke, Yoshitaka Miyagawa, Takahiro Kusakabe, (2012) RNA interference induction by long hairpin dsRNAs expressed from chromosomal DNA of *Bombyx mori* cells. (2012) J. Fac. Agr. Kyushu Univ., in press

Li Zhu, Tsuneyuki Tatsuke, Zhiqing Li, Hiroaki Mon, Jian Xu, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2012) Molecular cloning of *BmTUDOR-SN* and analysis of its role in RNAi pathway in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entomol. Zool., 47, 207-215.

JaeMan Lee, Yoshito Kojin, Hiroaki Mon, Tsuneyuki Tatsuke, Yoshitaka Miyagawa, Takahiro Kusakabe, (2013) Co-expression of *Escherichia coli* RNase III in silkworm cells improves the efficiency of RNA interference induced by long hairpin dsRNAs. Insect Sci. 20, 69-77.

Li Zhu, Yuuki Masaki, Tsuneyuki Tatsuke, Hiroaki Mon, Zhiqing Li, Jian Xu, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2013) A MC motif in silkworm Ago1 are indispensable for translational repression. Insect Mol. Biol. 22, 320-330.

Jian Xu, Yudai Nagata, Y., Hiroaki Mon, Zhiqing Li, Li Zhu, Kazuhiro Iiyama, Takahiro Kusakabe, JaeMan Lee, (2013) Soaking RNAi-mediated modification of Sf9 cells for baculovirus expression system by ectopic expression of *Caenorhabditis elegans* SID-1. Appl. Microbiol. Biotech. 97, 5921-5931.

Li Zhu, Zhiqing Li, Tsuneyuki Tatsuke, Daojun Cheng, Jian Xu, Kaito Yoshimura, Hiroaki Mon, Kazuhiro Iiyama, JaeMan Lee, Qingyou Xia, Takahiro Kusakabe, (2013) Genome-wide identification of Argonaute 1- and Argonaute 2-regulating genes revealed an inhibition of macula-like virus by RNAi pathway in the silkworm. J. Insect Biotechnol. Seric. 82, 19-23.

Li Zhu, Tsuneyuki Tatsuke, Hiroaki Mon, Zhiqing Li, Jian Xu, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2013) Characterization of Tudor-sn-containing granules in the

silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. Mol. Biol. 43, 664-674.

〔学会発表〕(計7件)

Takahiro Kusakabe, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Xu Jian, Li Zhiqing, Soaking RNAi and its application on insect sciences. 2013年5月2日~5月3日、韓国蚕糸学会 本会、大韓民国平昌郡。

吉末真吾、田附常幸、阪下浩介、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコにおける RNAi 経路の解析。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

Li Zhu, Tuneyuki Tatsuke, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, BmTudor-sn interact with BmAgo1 and BmAgo2 not to be involved in RNAi pathway, while to participate in stress granule formation in BmN4 cells. 日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

藤井美江、門宏明、高橋将晃、光延仁志、李在萬、日下部宜宏、カイコ培養細胞NHEJ における修復関連遺伝子ノックダウンの影響。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明・李在萬、日下部宜宏、カイコ培養細胞における N-グリコシル化経路の改変とタンパク質発現系への応用。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

祝力、田附常幸、李志清、門宏明、李在萬、日下部宜宏、Analysis of P-bodies and stress granules in silkworm BmN4 cells. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコ -N-acetylglucosaminidase (BmFDL) のノックダウンが N-グリカン形成に与える影響/Effect of RNAi for BmFDL in the N-glycosylation pathway. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 在萬(リ ジャエマン)

九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：26660271

(2)研究分担者

日下部 宜宏(クサカベ タカヒロ)

九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30253595