

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 5 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780052

研究課題名(和文)高いRNAi効果を示すカイコ系統の作出

研究課題名(英文)Generation of the transgenic silkworm having high ability of RNAi

研究代表者

小林 功(Kobayashi, Isao)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・研究員

研究者番号：70442829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：RNAi効果を向上させることを目的として、SID-1を恒常的に発現するカイコを作出し、dsRNAによるノックダウン効果を検証した。Gal4/UASシステムによってSID-1を発現する遺伝子組換えカイコを作出した。このカイコを用いた皮膚の尿酸蓄積に関与するBmwh3遺伝子に対するRNAi実験から、より長いdsRNAは効果が高いことが明らかとなった。POUM2、Varp、BLOS2、og、Bmok、XDH2などのRNAi実験を行ったが、顕著な効果は見られなかった。アポトーシスに関わるiap遺伝子に対するRNAiでは、SID-1発現カイコのみが高いRNAi効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To enhance RNAi efficiency in silkworm, we generated the transgenic silkworm expressing SID-1 and tested RNAi efficiency. The silkworm expresses SID-1 under the Gal4/UAS system constantly. In the experiment of Bmwh3-RNAi, it was known that longer dsRNA was effective in gene knockdown. Obvious phenomena were observed in RNAi experiments of POUM2, Varp, BLOS2, og, Bmok, and XDH2. The iap-dsRNA induced high knockdown in SID-1-expressing silkworm.

研究分野：分子生物学

キーワード：カイコ RNAi SID-1

1. 研究開始当初の背景

RNAi (RNAi 干渉) は、二本鎖 RNA (dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果、遺伝子発現が抑制される現象である。現在、RNAi は、遺伝子発現抑制法のツールとして確立されており、多くの生物において用いられている。昆虫種においては、ハエ目昆虫のキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では、RNAi に関わる多数の遺伝子が単離されており、RNAi メカニズムの解析が飛躍的に進んでいる。また、遺伝子組換えによる RNAi 系統が体系的に作出されており、現在、遺伝子組換えハエの RNAi 系統数は 1 万を越える。コウチュウ目昆虫のクヌストモドキ *Tribolium castaneum* では、全身性 RNAi の効率が高く、発生時期を問わず dsRNA の注入によって RNAi を誘導させることが可能である。チョウ目昆虫のカイコ *Bombyx mori* においては、dsRNA の注入による RNAi 効果が低いとされている。

2004 年、ホールゲノムショットガンによってチョウ目昆虫のカイコ *Bombyx mori* のゲノムの一部の塩基配列が解読され、2008 年には、さらなる解析によって全ゲノム情報が明らかとなった。応募者らのグループは、その情報を解析し、RNAi メカニズムに必須な遺伝子を多数同定し、カイコにおいて RNAi に必須な RISC などの機能因子が備わっていることを明らかにしている。

カイコにおいて、初期胚や蛹初期における dsRNA の注入による RNAi の成功例はいくつか報告されている (Quan et al., 2003; Ohnishi et al., 2009)。しかしながら、細胞性胚盤葉期以降から幼虫期における RNAi の成功例はほとんどない。初期胚の多核性胚盤葉期では、細胞膜が形成されておらず、蛹初期では、細胞形成の未熟な組織が存在するという特徴がある。一方、細胞性胚盤葉期以降から幼虫期には、成熟した細胞が形成されている。これらのことから、細胞性胚盤葉期以降から幼虫期において、dsRNA の移動が細胞膜によって遮断されるために、細胞内へ dsRNA が輸送されず、RNAi が引き起こされないことが考えられる。

これらのことから、応募者は、RNAi には細胞内へ dsRNA を輸送させることが重要だと考えた。線虫 *Caenorhabditis elegans* において、全身性 RNAi の機能を欠損した変異体の研究から同定された *sid-1* 遺伝子は、dsRNA を輸送するチャネルをコードしている。応募者らのグループは、カイコの培養細胞における高発現システム (Kobayashi et al., 2011) を用いて *sid-1* 遺伝子を発現させることにより、細胞内への dsRNA の取り込みが向上し、それに伴い、RNAi 効果が高くなることを見だしている。この結果を *in vivo* へ応用するために、本研究では、*sid-1* 遺

子を発現する遺伝子組換えカイコを作出し、高い RNAi 効果を示すカイコ系統を選抜する。

2. 研究の目的

本研究では、高い RNAi 効果を示すカイコ系統を作出することを目的とする。RNAi は、遺伝子発現抑制法のツールの 1 つとして、多くの昆虫種において用いられている。しかし、カイコでは、RNAi が遺伝子発現抑制法のツールとして確立されているとは言いがたい。遺伝子組換え技術によって、カイコゲノムに dsRNA の取り込みに関与する *sid-1* 遺伝子を組み込み、*sid-1* を発現する遺伝子組換えカイコを作出する。このカイコを用いて、形態形成やホルモン合成、あるいは体色に関わる遺伝子をターゲットとした網羅的な RNAi を試み、RNAi 効果を検討する。

3. 研究の方法

1 年目は、GAL4-UAS システムに基づいた発現ベクターを改良し、*sid-1* を発現する組換え用ベクターを作製する。作製した組換え用ベクターを用いて、*sid-1* 発現カイコを作出する。2 年目は、幼虫の体色に関わる遺伝子をターゲットにした RNAi を行う。RNAi 効果が認められた遺伝子に絞り、RNAi の実験条件を検討する。3 年目は、形態形成や成長ホルモンに関わる遺伝子群をターゲットにした RNAi を行い、成功例と失敗例の情報を解析する。

4. 研究成果

SID-1 を恒常的に発現する細胞株における RNAi 効果を調べるために、アポトーシス誘導を抑制するタンパク質 inhibitor of apoptosis protein (IAP) の発現抑制を試みた。*iap* 遺伝子の 2 番目のエクソン上の 0.9 kb の DNA 領域を PCR により増幅しクローニングした。その後、*iap* に対する dsRNA を作製し、細胞培養液中に dsRNA 濃度が 1 μ g/ml になるように添加した。通常の細胞 (control cells) では、細胞の形態に変化は見られないが、SID-1 恒常発現株 (SID-1-expressing cells) では、細胞が凝集したり、細胞形状を維持できなくなった。カイコ由来のアクチンプロモーターと NPV 由来の *ie1* プロモーターを組み合わせることにより、従来 of アクチンプロモーターの 100 倍程度高い活性を持つ人工プロモーターを作製した。このプロモーターにより SID-1 を発現するプラスミドを作製した。GAL4-UAS システムの一体化ベクターによる SID-1 発現プラスミドを作製した。コドンの最適化により塩基配列を変換した *sid-1* 遺伝子を作製した。これらのベクターを用いて、SID-1 を発現する組換えカイコを作出した。

A3 プロモーター制御下で Gal4 を発現するカイコと UAS 下流に SID-1 を持つカイコを交配し、Gal4/UAS バイナリー発現システムにより SID-1 を発現するカイコを系統化した。

この2齢幼虫にdsRNAを注入する実験を行った。真皮細胞における尿酸顆粒の蓄積に関わる遺伝子Bmwh3、Varp、BLOS2、og、Bmok、XDH2に対するdsRNAを作製し、500 ng相当のdsRNA溶液をそれぞれ注入した。これらの遺伝子は油蚕の原因遺伝子として知られる。このうち、Bmwh3-dsRNA (2.3 kb)を注入して2日後のカイコの皮膚の一部が油蚕の表現型になった。この表現は5齢まで継続した。RT-PCRによってmRNAの発現量を調べたところ、顕著なBmwh3の発現抑制が観察された。Varp、BLOS2、og、Bmok、XDH2に対するRNAiでは油蚕は現れなかった。

dsRNA の長さを検討した。2.3 kb と 0.14kb の Bmwh3-dsRNA、それと siRNA を作製した。500 ng 相当の dsRNA あるいは siRNA 溶液をそれぞれ 10 頭の 2 齢幼虫に注入した。2.3 kb の Bmwh3-dsRNA では、8 頭の油蚕が出現した。0.14 kb の Bmwh3-dsRNA では、4 頭の油蚕が出現した。siRNA では油蚕は出現しなかった。

dsRNA の注入量を検討した。2.3 kb の Bmwh3-dsRNA を 500ng、50ng、5g になるようにそれぞれ 10 頭の 2 齢カイコに注入した。500ng では 8 頭、50ng では 9 頭、5ng では 6 頭の油蚕が出現した。

カイコの幼虫期における IAP ノックダウン実験を行った。1 μ g の IAP-dsRNA を SID-1 発現カイコ 2 齢幼虫に注入したところ、2 日後には 10 頭中 8 頭が死亡した。SID-1 を発現しないコントロールの幼虫に IAP-dsRNA を注入した場合は、10 頭中 1 頭のみ死亡した。IAP-dsRNA を注入しないコントロールの幼虫では、死亡する個体は現れなかった。アポトーシスに関連すると考えられている IAP2 に対するノックダウン実験を行った。しかしながら、IAP2-dsRNA を作製し、1 μ g 相当を 2 齢幼虫に注入した。SID-1 発現カイコにおいても死亡する個体は現れなかった。SID-1 を発現するカイコ培養細胞において IAP2 ノックダウン実験を行った。IAP2-dsRNA を培地に添加し、細胞の状態を観察したが、特に変化は見られなかった。

POUM2 は幼虫から蛹への変態に関わる遺伝子である。POUM2 の RNAi は蛹化を阻害させることが証明されている(Deng, 2012)。SID-1 発現カイコにおいて POUM2-dsRNA によって蛹化阻害が引き起こされるかどうか調べた。5 齢 7 日の幼虫に 1 頭あたり 10 μ g の POUM2-dsRNA を注入した。しかしながら、dsRNA を注入した 10 頭のうち 9 頭は、正常に蛹になった。非組換えの Daizo 系統を用いて同様に実験を行ったが、10 頭中 9 頭は正常に蛹になった。

カイコ幼虫において協力的な発現活性を持つ hsp70 プロモーターを利用して SID-1 を恒常的に発現させるプラスミドを作製した。このプラスミドをカイコのゲノム DNA 中に組込む実

験を数回行ったが、現時点では組換え体は得られていない。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

小林功・内野恵郎・瀬筒秀樹・田村俊樹・日下部宜宏・富田秀一郎 (2012) カイコにおける遺伝子発現の抑制方法の開発. 日本野蚕学会第 18 回大会

Isao Kobayashi (2012) Enhanced RNAi by SID-1 expression in the silkworm, *Bombyx mori*. 7th International Conference on Wild Silkmoths and Silk, Thailand

小林功、門宏明、内野恵郎、田村俊樹、瀬筒秀樹、日下部宜宏、富田秀一郎

[図書](計 0 件)二本鎖 RNA チャネルタンパク質 SID-1 を利用した RNA 干渉、日本蚕糸学会第 83 回大会 2013

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 功 (KOBAYASHI, isao)

独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット
研究者番号：70442829

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：