

〈一般研究課題〉 RNA interferenceによる新規衛生および
建材害虫防除システムの確立

助成研究者 中部大学 宮田 恵多



RNA interferenceによる新規衛生および 建材害虫防除システムの確立

宮田 恵多
(中部大学)

Establishing of a Novel Control System of Sanitary Insect Pests and Wood Insect Pests by RNAi

Keita Miyata
(Chubu University)

Abstract :

RNA interference (RNAi), a phenomenon in which silencing of gene expression is triggered by a double-stranded RNA (dsRNA) molecule, has been established as powerful and useful tool for reverse genetics-based studies in many organisms. RNAi triggered via microinjection of dsRNA is widely used in reverse genetics studies of 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. In this study, it was investigated whether RNAi could be available to control sanitary insect pests and wood insect pests. The American cockroach (*Periplaneta americana*) and the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*) were employed as model of sanitary insect pests and wood insect pests, respectively. These pest insects showed sensitive RNAi response to injection and/or feeding of dsRNA. Thus, these findings suggested that RNAi has potential to control sanitary insect pests and wood insect pests.

1. はじめに

FireとMelloのグループは、線虫(*Caenorhabditis elegans* : *C. elegans*)にセンスあるいはアンチセンスの一本鎖RNAを導入した場合には、それらに相補的なmRNAの発現に影響を及ぼさないが、

これらを二本鎖RNA (double stranded RNA : dsRNA) として導入した場合にmRNAの特異的発現抑制が起こることを発見した(Fire et al., Nature, 1998)。現在、この現象はRNA interference (RNAi)と呼ばれている。RNAi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、体内へ侵入した外来の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。そのRISCが、構成成分の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、現在の逆遺伝学的研究分野においてRNAiは非常に安定した強力なツールとなっている。

RNAiを誘導する際の重要なステップである” dsRNAの導入” は、注射により直接的に体内へdsRNAを導入する方法が一般的である。一方、*C. elegans*は導入されたdsRNAから誘導されるRNAiを導入された部位から全身へ惹起する性質(Systemic RNAi)を有し、さらに、*C. elegans*は外来のdsRNAを腸管あるいは表皮から取り込むことが可能であるため、給餌や浸漬によりdsRNAを導入してRNAiを誘導すること(Environmental RNAi : e-RNAi)が可能である。2007年にトウモロコシの害虫であるウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) および広食性で様々な農作物の害虫として知られるオオタバコガ (*Helicoverpa armigera*) がdsRNAを発現するように遺伝子組換えされた植物を給餌することでRNAiを誘導することが可能であることが報告され、これまで*C. elegans*の特異な現象であると考えられていたe-RNAiは昆虫でも起こることが示された(Baum et al., Nat Biotechnol, 2007、Mao et al., Nat Biotechnol, 2007)。その後、昆虫のe-RNAiに関する報告が劇的に増加した(Huvenne and Smagghe, J Insect Physiol, 2010)。現在、昆虫のe-RNAiを応用し、害虫防除に使用する化学系薬剤の代わりに害虫が保存している遺伝子に相補的なdsRNAを害虫に摂取させRNAi誘導することで害虫をコントロールするといった革新的な害虫防除法の確立に期待が高まっている(図1)。

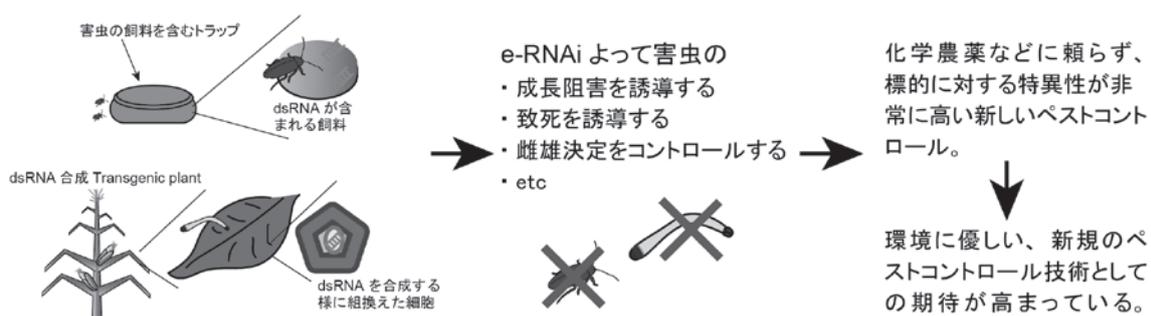


図1. e-RNAiによるpestコントロールのアイデア

この様に害虫駆除への応用に期待が高まっているRNAiを本研究では衛生および建材害虫防除へ応用することを試みた。現在、衛生および建材害虫(ゴキブリやシロアリ等)は、ヒトの目に付かない所に存在しており、最も効果的に駆除する手段は化学系薬剤の使用である。しかしながら、駆除で使用する化学系薬剤の特異性の低さによる標的としていない昆虫への影響や化学系薬剤に過敏なヒトへの影響等が問題視されており、汎用するには注意が必要であるのが現状である。

本研究では、ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) およびイエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) を衛生および建材害虫のモデルに用いて、RNAiがこれらの害虫をコントロールするのに有効であるか否かの検討を行ったので、その成果を報告する。

2. 実験方法

2.1. ワモンゴキブリおよびイエシロアリの飼育

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成虫を実験に用いた。購入したワモンゴキブリは、プラスチックケース (縦30cm、横40cm、高さ30cm) 中で実験に使用するまで室温で飼育した。なお、プラスチックケースの底に蒸留水で湿らせたキムワイプを敷き詰め、キムワイプが乾いたのを確認したら再度蒸留水で湿らせた。また、プラスチックケースの壁には、水で溶解した炭酸カルシウムをワモンゴキブリの脱走防止のために塗った。餌としては、実験動物用ペレットを与えた。

イエシロアリは、住化テクノサービス株式会社から購入した成虫 (職蟻) を実験に用いた。購入したイエシロアリは、実験で使用するまでプラスチックケース (直径10cm、高さ60cm) の中に入れ、インキュベーター内 (温度25℃、湿度70%) で飼育した。なお、蒸留水で湿らせたキムワイプをケースの中に入れることでイエシロアリに水分を与え、餌としてはクロマツの木片を与えた。

2.2. RNAi標的遺伝子のクローニング

ワモンゴキブリおよびイエシロアリにRNAiを誘導する際の標的遺伝子のクローニングを行った。ワモンゴキブリおよびイエシロアリからtotal RNAを抽出し、そのRNAを鋳型にSuperScript III (Invitrogen) を用いてcDNAを合成した。本研究でRNAiの標的とした遺伝子は、細胞骨格の形成に関わっているactin、tubulin、熱ショックタンパク質のHSP70および細胞内で様々な機能を示すことが知られるGAPDHを選択した。それぞれの標的遺伝子を、合成したcDNAを鋳型にPCRで増幅し、pCR2.1-TOPO vector (Life technologies) へクローニングした。dsRNAの合成は、以前、著者らが報告した方法に従って行った (Miyata et al., PLoS One, 2014)。作製したプラスミドを鋳型にクローニングした遺伝子の両末端にT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を付加するように設計したプライマーを用いてPCRを行った。そのPCR産物を鋳型にdsRNAの合成をMEGAscript T7 Transcription Kit (Life technologies) で行い、合成したdsRNAの精製はMEGAclean Transcription Clean-Up Kit (Life technologies) を用いて行った。精製したdsRNAは、-80℃で使用するまで保存した。

2.3. 注射によるdsRNAの導入および表現型解析 (ワモンゴキブリ)

注射によるワモンゴキブリへのdsRNAの導入は、ハミルトン製シリンジ (1701RN Neuros Syringe) を用いて行った。まず、ワモンゴキブリをプラスチックケースの中に入れ、そのケースを氷上に30分間静置した。昆虫は、変温動物であるため、氷上でインキュベートすることで一時的に活動することが出来なくなる。一時的に活動が停止したワモンゴキブリを仰向けに固定し、腹節の部分からハミルトン製シリンジで10 μ lのdsRNA溶液 (10 μ g) を注射した (図2)。dsRNA溶液を注射したワモンゴキブリは、プラスチックケースの中に入れ、インキュベーター内 (温度25℃、湿度

70%)で飼育、観察した。

2.4. 給餌によるdsRNAの導入および表現型解析(イエシロアリ)

イエシロアリへのdsRNAの導入は、図3で示す様に行った。まず、イエシロアリを氷上で静置して一時的に活動を停止させ、ディッシュ(直径3.5cm)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紙(縦2cm、横2cm)を入れ、その紙に50 μ lのdsRNA溶液(10 μ 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。

3. 実験結果および考察

3.1. dsRNAの導入によるワモンゴキブリへの影響

種々の昆虫でRNAiを誘導することで異質な外観の表現型が現れる、あるいは致死が誘導されることが報告されている。例えば、貯蔵害虫であるコクヌストモドキ(*Tribolium castaneum*)のHox遺伝子の一つであるUbxをRNAiでノックダウンすると翅に変異が生じた表現型が現れることが報告されている(Tomoyasu et al., Nature, 2004)。また、ゴキブリ目と近郊にあるバッタ目に属するトノサマバッタ(*Locusta migratoria*)でactinに対してRNAiを誘導すると致死性を示すことが報告されている(Luo et al., Insect Mol Biol, 2013)。この様な報告から、ワモンゴキブリにHox遺伝子や細胞骨格形成等の生存に関わる遺伝子を標的としたRNAiを誘導することで、体の一部に変異が生じて行動が制限される、あるいは致死を誘導できると仮説立て、本研究を実施した。

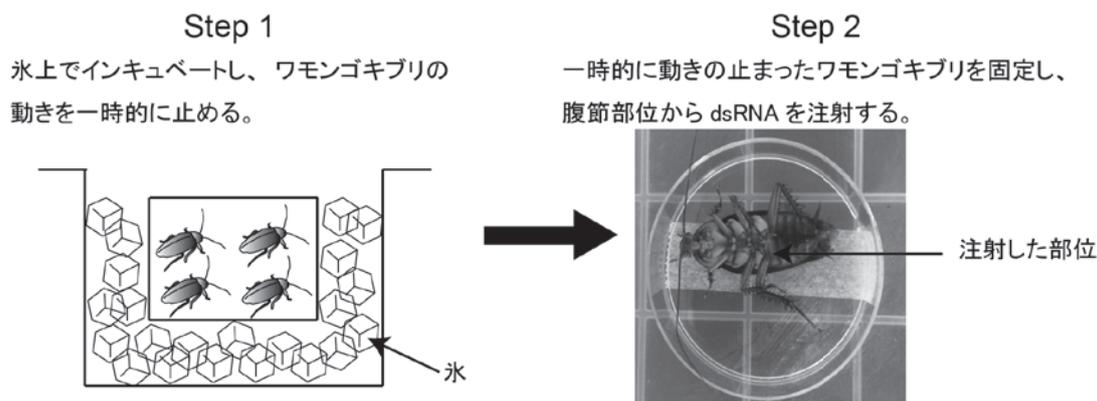


図2. ワモンゴキブリへのdsRNAの導入方法

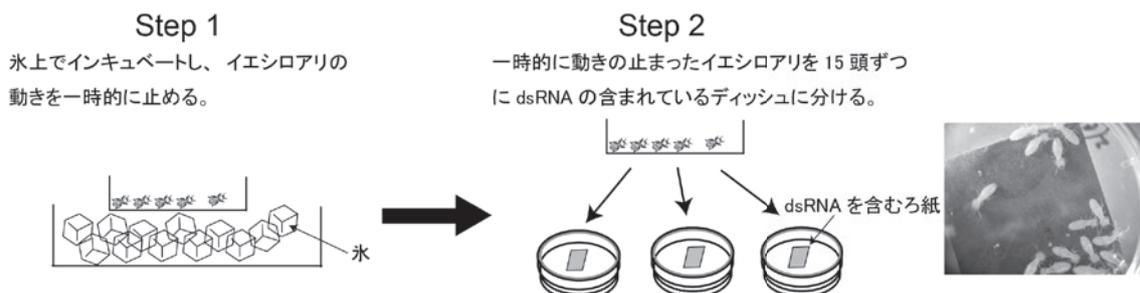


図3. イエシロアリに対するdsRNAの給餌方法

本研究では、注射によりactinおよびGAPDH dsRNAを6頭のワモンゴキブリに導入し、その影響を観察した。ネガティブコントロールには、Green Fluorescent Protein (GFP) dsRNAを導入した。actinおよびGAPDH dsRNAを注射されてから1週間後のワモンゴキブリには変化が認められなかったが、2週間後ではGAPDH dsRNAを注射したワモンゴキブリは50%の致死率を示し、actin dsRNAを注射されたワモンゴキブリは100%の致死率を示した(表1)。この結果からワモンゴキブリのactinに対してRNAiを誘導することで致死を誘導することが可能であることが認められた。

表1. dsRNAを注射されたワモンゴキブリの致死率

	Mortality (%)		
	actin dsRNA	GAPDH dsRNA	egfp dsRNA
1 week	0	0	0
2 weeks	100	50	0

これまでに、ワモンゴキブリのHox遺伝子の一つであるScrをRNAiによりノックダウンすると体の様々な部位に変異が生じた表現型が現れることが報告されている(Hrycaj et al., Dev Biol, 2010)。本研究では、ワモンゴキブリの細胞骨格形成遺伝子をRNAiによりノックダウンすることで致死を誘導することが可能であることを示した。しかしながら、依然としてワモンゴキブリにdsRNAを給餌することでRNAiを誘導することが出来るか否かは不明である。今後、dsRNAの給餌により、注射によりdsRNAを導入した場合と同様のRNAiによる影響が現れるか否かを詳細に調べることで、e-RNAiを衛生害虫の防除へ応用することへの可能性を示すことが出来ると考えられる。

3.2. dsRNAの導入(給餌)によるイエシロアリへの影響

建材害虫として知られている数種のシロアリ目に属する昆虫の中で、日本の多くの地域に生息しているヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) は、湿った木材や土中で特定の巣を作らず生活しており、建築物の木材部位を加害する。一方、ヤマトシロアリと同様に日本の多くの地域に生息しているイエシロアリ (*Coptotermes formosanus*) は、ヤマトシロアリとは対照的に、塊状の巣を作り、コロニーで生活している。近年、ヤマトシロアリにdsRNAを給餌することでRNAiを誘導することが可能であることが報告され(Zhou et al., Insect Biochem Mol Biol. 2008)、e-RNAiをシロアリ目昆虫の防除へ応用出来る可能性が示されている。しかしながら、イエシロアリのe-RNAiに関する報告は未だにない。本研究では、細胞骨格形成に関連しているtubulin、熱ショックタンパク質のHSP70のdsRNAを実験方法で示した様にイエシロアリへ与え、その影響を観察した。

まず、tubulinおよびHSP70 dsRNA溶液を染み込ませた紙を摂取したイエシロアリのtubulinおよびHSP70のmRNA発現レベルをリアルタイムPCRで測定した。図4で示すように、dsRNAを含む紙の給餌を開始後2日目から標的とした遺伝子の発現の抑制が観察され、4日目ではネガティブコントロールに比べ、50%以下にまで標的の発現が抑制されていた。

続いて、dsRNAの給餌によるイエシロアリへの影響を観察した。図5で示すように、dsRNA溶液を染み込ませた紙を摂取したイエシロアリは、1週目では何の変化も観察されなかったが、2週目から致死活性を示し、3週目では著しく高い致死性を示した。

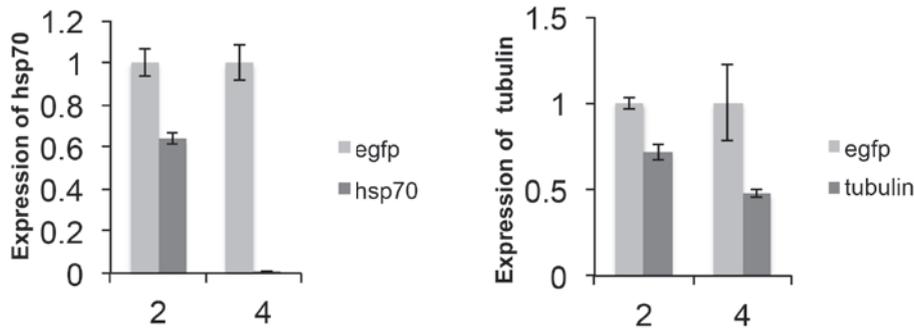


図4. dsRNAの給餌によるmRNAの発現への影響

左が HSP70 dsRNA を給餌したイエシロアリの HSP70 発現量を示し、右が tubulin dsRNA を給餌したイエシロアリの HSP70 発現量を示している。発現量は、ネガティブコントロールの GFP dsRNA を給餌したイエシロアリの発現量を 1 として算出した値を示している。グラフ中の 2 および 4 は、dsRNA の給餌を開始してからの日数を示している。

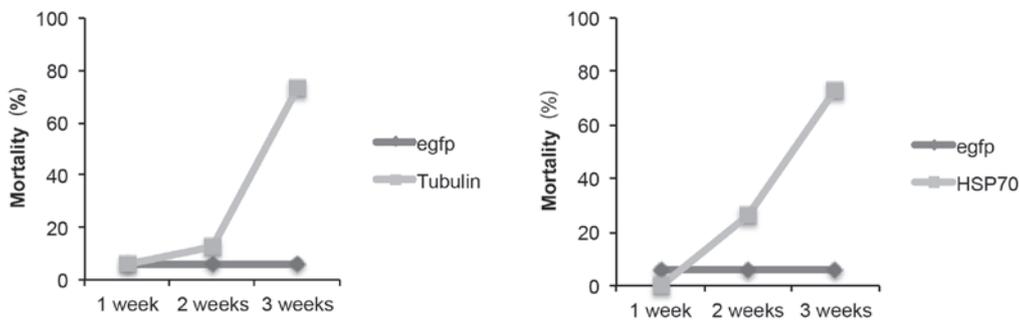


図5. dsRNAを摂取したイエシロアリの致死率

左は tubulin dsRNA を摂取したイエシロアリの致死率を示し、右は HSP70 dsRNA を摂取したイエシロアリの致死率を示す。

以上の結果から、イエシロアリでもヤマトシロアリと同様にe-RNAiを示し、tubulinおよびHSP70を標的としたRNAiがイエシロアリの致死を誘導することを示した。

3.3. イエシロアリのRNAiに対してdsRNAの長さがおよぼす影響

これまで、線虫*C. elegance*をモデルに用いたRNAiメカニズムに関する研究が盛んに行われていたが、近年、昆虫がe-RNAiを示すことなど、昆虫のRNAiメカニズムに関する報告が増えてきている。ゲノム解析が進んでおり、進化発生学の研究分野でモデルに用いられているコクヌストモドキは、*C. elegance*と同様に全身性のRNAi (systemic RNAi) を示し、そのRNAiは、導入するdsRNAの長さによりRNAi効率が変動することが報告されている (Miller et al., PLoS One, 2012)。さらに、以前、著者らはウエスタンコーンルートワームの示すe-RNAiにおいてもdsRNAの長さがRNAi効率に影響を及ぼすことを報告した (Miyata et al., PLoS One, 2014)。本研究成果からイエシロアリがe-RNAiを示すことが認められたが、dsRNAの長さがRNAi効率に影響するか否かは不明である。本研究では、500および100bp HSP70 dsRNAを合成し、それらのdsRNAを用いてイエシロアリのe-RNAiにdsRNAの長さが影響するか調べた。

500および100bp HSP70 dsRNAを実験方法で示した方法でイエシロアリへ給餌し、HSP70 mRNAの発現量への影響をリアルタイムPCRで定量した。その結果、図6で示すように、100bp HSP70 dsRNAを摂取したイエシロアリに比べ500bp HSP70 dsRNAを摂取したイエシロアリのHSP70 mRNAの発現は、劇的に抑制されていた。さらに、dsRNAを摂取したイエシロアリの観察

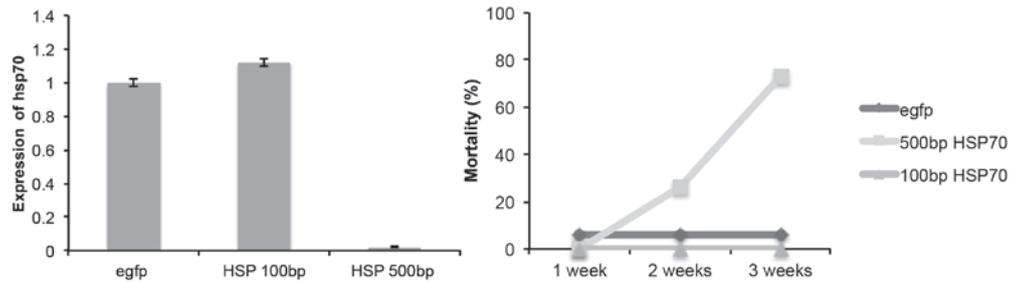


図6. dsRNAの長さがおよぼす影響

左は 100 および 500bp HSP70 dsRNA を給餌開始してから 4 日後の HSP70 mRNA の発現量を示し、右は dsRNA を摂取したイエシロアリの致死率を示す。HSP70 mRNA の発現量は、ネガティブコントロールの値を 1 として算出した値を示している。

を続けた結果、500bp HSP70 dsRNA を摂取したイエシロアリは 3 週間目に高い致死率を示したが、100 HSP70 dsRNA を摂取したイエシロアリの死亡は認められなかった (図6)。

これらの結果から、イエシロアリの示す e-RNAi は、ウエスタンコーンルートワームの e-RNAi と同様に給餌する dsRNA の長さが RNAi 効率に影響することが明らかとなった。また、イエシロアリの防除に e-RNAi を応用するには、長鎖の dsRNA を用いる必要があることが示された。

4. 結論

本研究では、ワモンゴキブリの actin を RNAi によりノックダウンすることで致死を誘導することが可能であることを示した。また、イエシロアリが e-RNAi を示すことが認められ、さらに、その e-RNAi は dsRNA の長さによって効率が変動することが明らかとなった。これらの結果から、衛生および建材害虫の防除に e-RNAi を応用できる可能性を示すことができたと考えられる。しかしながら、本研究で得られた結果では、致死を誘導するまでに 2 週間以上の期間を要してしまい、化学系薬剤を使用した場合とは異なり、即効性がないという結果であった。また、dsRNA を効果的に給餌方法の検討など、現段階では、e-RNAi を衛生および建材害虫の防除へ応用するためには多く課題が残っている。今後、本研究で用いたワモンゴキブリおよびイエシロアリをモデルに衛生および建材害虫の e-RNAi メカニズム解析、最適 dsRNA 給餌方法の検討を進めていくことで、e-RNAi を応用した衛生および建材害虫の防除システムを確立することが可能になると考える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ワモンゴキブリの飼育方法、RNA 抽出方法など、様々な実験手法の指導をして下さった、中部大学応用生物学部環境生物学科の長谷川浩一准教授、中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻博士後期課程の小澤壮太氏 (日本学術振興会特別研究員 DC1)、鹿児島大学連合農学研究科博士後期課程の佐藤一輝氏 (日本学術振興会特別研究員 DC1) に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Fire AI, 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) 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
- 3) 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
- 4) Huvenne H 1, Smaghe G (2010) Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol*, 56, 227-235
- 5) Miyata K, Ramaseshadri P, Zhang Y, Segers G, Bolognesi R, Tomoyasu Y (2014) Establishing an in vivo assay system to identify components involved in environmental RNA interference in the western corn rootworm. *PLoS One*, e101661
- 6) Tomoyasu Y, Wheeler SR, Denell RE (2005) Ultrabithorax is required for membranous wing identity in the beetle *Tribolium castaneum*. *Nature*, 433, 643-647
- 7) Luo Y, Wang X, Wang X, Yu D, Chen B, Kang L (2013) Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Mol Biol*, 22, 574-583
- 8) Hrycaj S, Chesebro J, Popadić A (2010) Functional analysis of Scr during embryonic and post-embryonic development in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Dev Biol*, 341, 324-34
- 9) Zhou X, Wheeler MM, Oi FM, Scharf ME (2008) RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem Mol Biol*, 38, 805-15
- 10) Miller SC, Miyata K, Brown SJ, Tomoyasu Y (2012) Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi, *PLoS One*, e47431