

特集：次世代農業への挑戦—抵抗性機構の解明と環境調和型殺虫剤の開発—

## RNAi を利用した非モデル昆虫での 新規害虫制御ターゲットの探索

名古屋大学大学院生命農学研究科 <sup>みうら</sup>三浦 <sup>けん</sup>健・<sup>よこい</sup>横井 <sup>かける</sup>翔・<sup>かめざき</sup>亀崎 <sup>まさし</sup>将司・<sup>たなか</sup>田中 <sup>としはる</sup>利治

### はじめに

外部から線虫に与えた二本鎖 RNA (dsRNA) が、それと相同性のある遺伝子の発現を抑えるという発見から 10 年余りがすぎた (FIRE et al., 1998)。この RNA 干渉 (RNA interference, 以下 RNAi) は真核生物に広く保存された生命現象であり、始原的にはウイルスに対する防御機構として発達したと考えられている。細胞に外から取り込まれた dsRNA, あるいは細胞内で生じたヘアピン型の RNA は Dicer と呼ばれるヌクレアーゼにより 3' 端が 2 ~ 3 塩基突出した 21 ~ 23 塩基対の小さい dsRNA (siRNA) に分解される。次いで siRNA はそのアンチセンス鎖 (ガイド鎖) が RISC と呼ばれる大きな複合体に取り込まれる。このガイド鎖と塩基対を形成する相同な mRNA が RISC により切断される結果、当該遺伝子の発現抑制がもたらされる。遺伝子ノックアウト技術とは異なり、遺伝子の発現量をゼロにするわけではないので、遺伝子ノックダウンとも呼ばれる。

RNAi は首尾よく機能すれば、任意の遺伝子のノックダウンを行えるので、トランスジェニックシステムの作成が困難で、また有用な変異体のストックをもたない非モデル昆虫の研究において大変有用な研究手法となりつつある。本稿ではまず、多くの文献に見られる様々な昆虫種での RNAi の実施と成否について整理する。次いで我々が行っている、RNAi 技術に基づいた害虫の新規制御ターゲット因子を探る研究について紹介したい。

### I 昆虫個体での RNAi の実施例

RNAi の一連の機序がスタートするには、まず dsRNA が細胞に取り込まれることが必要である。解放血管系をもつ昆虫類の場合は dsRNA 溶液の血体腔への注入が用いられることが多い。残念なことに、最も確立したモデル昆虫であるショウジョウバエの場合、成虫では少数の

成功例があるものの、幼虫では血球以外の組織は細胞外の dsRNA を取り込めないため RNAi が起こらないとされている (MILLER et al., 2008)。したがってショウジョウバエで RNAi を効率的に行うためには、ヘアピン型 RNA を目的の細胞内で発現させるトランスジェニックシステムを作製するなどの労力が必要となる。次いで、重要なチョウ目モデルであるカイコの場合でも、少数の成功例はあるものの、やはり幼虫では RNAi が大変効きにくいとされている (MARCUS, 2005)。一方、コウチュウ目モデルとして最近よく利用されるようになったコクヌストモドキでは、ほぼすべての組織・細胞が外部から dsRNA を取り込み、効率的な RNAi が引き起こされることが知られている。

その他の昆虫種で幼虫期での RNAi 成功例が報告されているのはバッタ、テントウムシ、ニクバエ、カメムシ類等、成虫期での成功例はミツバチ、数種のカ等においてである。また、RNAi の効果が線虫で見られるように、次世代に引き継がれる例も複数の昆虫種で報告されている。紙面の都合でそれぞれ文献は挙げないが、TOMOYASU et al. (2008) によく整理されているので参照されたい。このように RNAi 技術は昆虫にも適用可能であるが、その成否は材料とする昆虫種に大きく依存し、また幼虫での実施は成虫よりさらに困難である場合が多いといえそうである。

さて、害虫防除に関連した研究では、RNAi 技術はまず殺虫剤耐性遺伝子など個々の遺伝子の機能を調べる手段として利用され、次いで siRNA を産生する組換え植物などを用いて、それを食害する昆虫の生存に必須な遺伝子の機能を阻害するという戦略に基づき、防除のツールそのものとして利用しようという試みが始まっている。dsRNA を殺虫剤的に利用する場合、血体腔に注入するのは現実的ではなく、線虫のように経口摂取された dsRNA が RNAi 効果をもたらすことが望ましい。そこで経口 RNAi が試みられ、いくつかの成功例が報告されている (表-1)。これらはいずれも農業・森林害虫あるいは衛生害虫を対象とした実施例である。なお、BAUTISTA et al. (2009) はコナガを用いた我々の研究室での例である。6 例中 5 例が幼虫での実施例であり、さら

A Search of Target Molecules for Pest Management in Non-Model Insects Based on RNA Interference Approaches. By Ken

MIURA, Kakeru YOKOI, Masashi KAMEZAKI and Toshiharu TANAKA

(キーワード: RNA 干渉, ヨトウガ, 免疫, アポトーシス, 寄生バチ)

表-1 昆虫で経口 RNAi が成功したとされる研究例

昆虫種 (目・発育ステージ)	ターゲット遺伝子 (発現組織)	文献
<i>Rhodnius prolixus</i> (カメムシ目・若虫)	ニトロフォリン 2 (唾液腺)	ARAUJO et al. (2006)
<i>Epiphyas postvittana</i> (チョウ目・幼虫)	カルボキシエステラーゼ (消化管) フェロモン結合タンパク質 (触角)	TURNER et al. (2006)
<i>Diabrotica virgifera</i> (コウチュウ目・幼虫) など	V-ATPase サブユニットなど <sup>a)</sup>	BAUM et al. (2007)
<i>Helicoverpa armigera</i> (チョウ目・幼虫)	P-450 モノオキシゲナーゼ (消化管)	MAO et al. (2007)
<i>Glossina morsitans</i> (ハエ目・成虫)	TsetseEP (消化管)	WALSHE et al. (2009)
<i>Plutella xylostella</i> (チョウ目・幼虫)	P-450 モノオキシゲナーゼ (消化管・脂肪体)	BAUTISTA et al. (2009)

<sup>a)</sup> 発現部位は厳密には検討されていない。

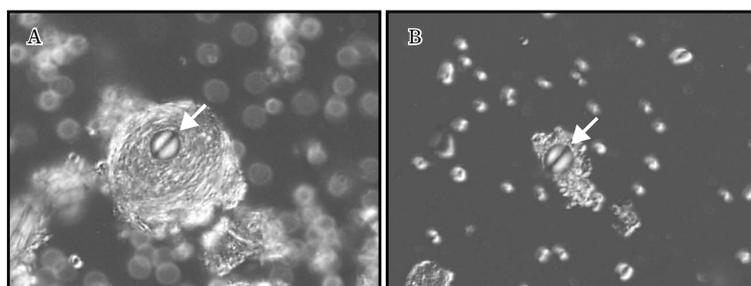


図-1 アワヨトウ *neuroglial* の RNAi による包圍化の減弱

A は負対照の緑色蛍光タンパク質由来配列の dsRNA を注入した個体での、B は *neuroglial* 由来配列の dsRNA を注入した個体での包圍化像。dsRNA の血体腔への注入 48 時間後に、直径  $20\mu\text{m}$  のラテックスビーズ (矢印) を注入し、その 12 時間後の血球による包圍化像を観察した。

にそのうち 3 例が一般に RNAi が困難とされているチョウ目幼虫での例である。また、BAUM et al. (2007) はトウモロコシ、MAO et al. (2007) ではシロイヌナズナとタバコの、いずれも siRNA を産生するトランスジェニック系統を作製して実験に供しており、フィールドでの状況により近いことから注目される。MAO et al. (2007) によると、Dicer 変異体のトランスジェニック植物を利用して siRNA にプロセスされる前の長鎖 dsRNA が昆虫に摂食される系を用いても RNAi 効果がある。したがって、巨大分子である長鎖 dsRNA の中腸細胞への取り込みが囲食膜によってブロックされているのではないようである。

## II アワヨトウの免疫関連因子の RNAi

ここからは我々がやっている最近の研究をいくつか紹介したい。昆虫の免疫系は脊椎動物のそれとは異なり、多様な抗原レセプターに依存しない自然免疫のみで構成され、非自己の認識を行うセンサーから実際の防御を行うエフェクターまで数多くの液性および細胞性の因子から構成されている (LEMAITRE and HOFFMANN, 2007)。ここではエフェクター因子のうち、アワヨトウ (*Pseudaletia*

*separata*) の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着因子・*neuroglial* をノックダウンし、いわば免疫不全の昆虫の作製を試みた研究を紹介する。

*neuroglial* は脊椎動物では神経伸長にかかわる接着因子・*neural adhesion molecule 1* の昆虫ホモログであり、昆虫では異物への接着能をもつ血球種の表面にも発現していることが知られている (CHEN et al., 1997)。アワヨトウ全血球から調製した mRNA を材料として、*neuroglial* の cDNA クローニングを行い、RNAi を用いて細胞性生体防御、特に寄生バチの卵や寄生性線虫等貪食できない大きなサイズの異物に対して血球が示す包圍化での役割について検討した。

*neuroglial* の cDNA 配列に基づいて作製した約 400 塩基対の dsRNA を 1 頭当たり  $1\mu\text{g}$ 、アワヨトウ 5 齢幼虫の血体腔に注入し、その 48 時間後にさらに注入した  $20\mu\text{m}$  径のラテックスビーズに対する血球の反応を観察したところ、血球による包圍化が明瞭に減弱する表現型が得られた (図-1)。このときの *neuroglial* mRNA の接着血球画分におけるノックダウンレベルは約 20% 減少の穏やかなものであった。長鎖の dsRNA は貪食に関与するスカベンジャーレセプター経由で細胞内に取り込ま

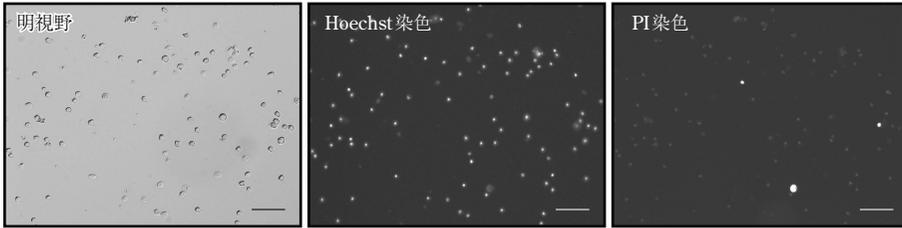
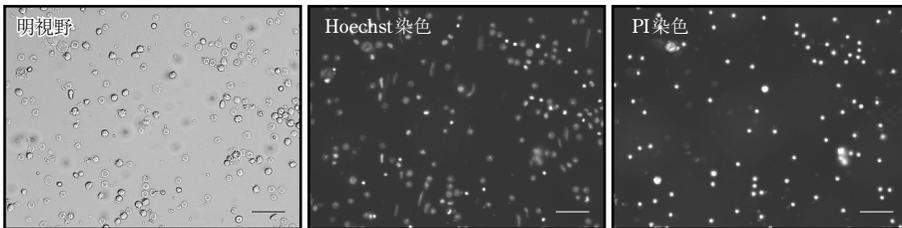
(A) *EGFP* dsRNA注入(B) *IAP* dsRNA注入

図-2 アワヨトウ *IAP* の RNAi による血球での細胞死の誘導

A は緑色蛍光タンパク質の dsRNA を注入した個体から、B は *IAP* 由来配列の dsRNA を注入した個体から調製した血球。Hoechst 33342 は生細胞の細胞膜を通過できる蛍光色素で、すべての細胞の核を染色する。プロピジウムイオダイド (PI) は細胞膜の完全性が失われた後期アポトーシス細胞や死細胞の核を染色する蛍光色素である。バーは 100  $\mu$ m。

れるとされている (ULVILA et al., 2006)。ノックダウン効率が低い割に明瞭な表現型シフトが観察される理由は、包圍化の初期において重要な役割を果たす、スカベンジャーレセプターを有する血球種において効率的なノックダウンが起こっているためと考えられる。

### III アワヨトウのアポトーシス制御関連因子の RNAi

多細胞生物が細胞の社会レベルの恒常性を保ちながら生長・生存するには、細胞の適切な増殖・分化とアポトーシスによる不要細胞の除去が協調して行われることが不可欠である。したがって、本来起こるべきではないアポトーシスを誘導、あるいは実行されるべきアポトーシスを阻害すれば、害虫の生理をかく乱することができると考えられる。ここではアポトーシス阻因子の RNAi により、アワヨトウ血球において人為的なアポトーシス誘導を試みた研究を紹介する。

*IAP* (inhibitor of apoptosis protein) はアポトーシスを実行するプロテアーゼであるカスパーゼに結合し、アポトーシスを阻止するタンパク質である (VAUX and SILKE, 2005)。アワヨトウ血球からクローニングした *IAP* の cDNA 配列をベースに約 600 塩基対の dsRNA を作製して、アワヨトウ 5 齢幼虫の血体腔に 1 頭当たり 2.5  $\mu$ g を注入し、血球でのアポトーシス誘導実験を行った。

図-2 に示すように dsRNA 処理 48 時間後に血球での細胞死の誘導が観察された。*IAP* の mRNA のノックダウンレベルは 50% 程度の減少であった。*IAP* の RNAi により誘導される細胞死の様式は、カスパーゼ活性の上昇と核の断片化を伴うことからアポトーシスであることが明らかになった。

現在までのところ、アワヨトウ幼虫で再現性のある RNAi ができる組織は、血体腔に dsRNA を注入した場合の血球のみであり、シヨウジョウバエ幼虫での例 (MILLER et al., 2008) と似た状況である。

### IV 寄生バチの毒液腺の因子

ギンケハラボソコマユバチ (*Meteorus pulchricornis*) は共生ウイルスをもたず、代わりに毒液腺で作られるウイルス様粒子 (VLP) を宿主制御に用いる寄生バチである。VLP の働きにより、初期には産下されたハチ卵への宿主血球の接着と伸展が阻害され、次に血球でのアポトーシスが誘導される (SUZUKI and TANANA, 2006; SUZUKI et al., 2008)。我々はギンケハラボソコマユバチ毒液腺由来の cDNA ライブラリーのランダムシーケンスを行っており、現在まで約 500 の独立クローンの部分配列を決定した。本稿では詳しくは述べないが、これらの中には膜の融合に関連すると考えられる因子、フェノール酸化酵素の阻害因子と想定されるもの、細胞毒性をも

つと思われる因子、アクチン繊維の制御に関連する低分子量 G タンパク質やその調節因子等、宿主昆虫の血液・血球機能を阻害する可能性をもつ多くの因子が含まれていることが明らかになりつつある。次のステップとして、これら毒液腺の因子のノックダウンを行い、個々の機能を明らかにするとともに、これらの中から害虫防除に有用な新規遺伝子資源の探索を行う予定である。ミツバチでは RNAi の成功例が報告されているので (AMDAM et al., 2003; PATEL et al., 2007), ギンケハラボソコマユバチでも期待したいところである。

## おわりに

昆虫での RNAi 研究のこれまでの流れについて、我々の研究を含め紹介してきた。今日まで多くの研究がなされ、また多くの成果もたらされたが、同時に昆虫種によって、必ずしも類縁関係と相関せずに、RNAi が容易に実施できる種、それが困難、特に幼虫期に困難な種があることが明らかとなってきた。RNAi 実施の困難な、特にショウジョウバエやカイコ等重要なモデル昆虫の幼虫での効率的な RNAi を可能にする新たな方法論の登場が待たれるところである。

害虫管理に RNAi を利用する場合にはいくつかの方法が想定できる。まず経口 RNAi が機能することが前提であるが、物的に安定な修飾を加えた siRNA 自体を殺虫剤として散布すること、また前章までに述べた例にあるように siRNA を産生するトランスジェニック作物の利用も、特に綿や花きなど人の口に入らないものについては将来性があるだろう。部分的に共通の配列をもつ別の遺伝子への影響 (off-target 効果) を考慮しつつ、慎重な計画デザインが求められる。ウイルスや土壤細菌、また寄生バチのような天敵を組換え技術により改変し

て、経口あるいは経皮感染的に dsRNA を導入することも可能であろうが、組換え微生物・生物の利用については社会的なコンセンサス形成が必須であろう。

RNAi は特定の遺伝子の発現レベルを抑えることができるので、種々のウイルス感染症や黄斑変性症等、細胞内での特定の遺伝子の高発現が原因となるヒトの疾病において治療法となりうる可能性を秘めており、実用化に向けての研究は害虫防除分野よりはるかに進んでいる。参考として、ヒトでの RNAi 治療の試みの例とどの相場で治験が進行しているかをまとめた文献を最後に挙げておく (SHREY et al., 2009)。これらヒトを対象とした先行研究から得られる成果が、害虫防除における RNAi の利用にとっても有益な情報をもたらすはずである。

## 引用文献

- 1) AMDAM, G. V. et al. (2003): BMC Biotechnol. 3: 1.
- 2) ARAUJO, R. N. et al. (2006): Insect Biochem. Mol. Biol. 36: 683 ~ 693.
- 3) BAUM, J. A. et al. (2007): Nat. Biotechnol. 25: 1322 ~ 1326.
- 4) BAUTISTA, M. A. et al. (2009): Insect Biochem. Mol. Biol. 39: 38 ~ 46.
- 5) CHEN, C. L. et al. (1997): Dev. Biol. 181: 1 ~ 13.
- 6) FIRE, A. et al. (1998): Nature 391: 806 ~ 811.
- 7) LEMAITRE, B. and J. HOFFMANN (2007): Annu. Rev. Immunol. 25: 697 ~ 743.
- 8) MAO, Y. B. et al. (2007): Nat. Biotechnol. 25: 1307 ~ 1313.
- 9) MARCUS, J. M. (2005): Evol. Dev. 7: 108 ~ 114.
- 10) MILLER, S. C. et al. (2008): Dev. Genes Evol. 218: 505 ~ 510.
- 11) PATEL, A. et al. (2007): PLoS ONE 2: e509.
- 12) SHREY, K. et al. (2009): Biochem. Biophys. Res. Commun. 386: 273 ~ 277.
- 13) SUZUKI, M. and T. TANAKA (2006): J. Insect Physiol. 52: 602 ~ 613.
- 14) ——— et al. (2008): ibid. 54: 1015 ~ 1022.
- 15) TOMOYASU, Y. et al. (2008): Genome Biol. 9: R10.
- 16) TURNER, C. T. et al. (2006): Insect Mol. Biol. 15: 383 ~ 391.
- 17) ULVILA, J. et al. (2006): J. Biol. Chem. 281: 14370 ~ 14375.
- 18) VAUX, D. L. and J. SILKE (2005): Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6: 287 ~ 297.
- 19) WALSH, D. P. et al. (2009): Insect Mol. Biol. 18: 11 ~ 19.

## 発生予察情報・特殊報 (21.10.1 ~ 10.31)

各都道府県から発表された病虫害発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫 (発表都道府県) 発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病虫害。

\*詳しくは各県病虫害防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jpnpn.ne.jp/>) でご確認下さい。

- トマト、ピーマン、トルコギキョウ、キュウリ：アシダラハモグリバエ (岩手県：初) 10/1
- イチジク：イチジクヒトリモドキ (京都府：初) 10/5
- 小麦：コムギ萎縮病 (長野県：初) 10/6
- キク、サツマイモ：アワダチソウウンバイ (石川県：初) 10/5
- ナシ：サクセスキクイムシ (新潟県：初) 10/14
- チャ：ミカントゲコナジラミ (福岡県：初) 9/15
- プラタナス：プラタナスウンバイ (千葉県：初) 10/16
- イチジク：イチジクヒトリモドキ (山口県：初) 10/22

- キク：茎えそ病 (鹿児島県：初) 10/23
- 果菜類、果樹、水稲、大豆等：ミナミアオカメムシ (兵庫県) 10/26
- トマト：黄化葉巻病 (鳥根県：初) 10/27
- ミニトマト：葉かび病菌レース 4.9.11 (三重県：) 10/28
- スイカ：果実汚斑細菌病 (秋田県：初) 10/28
- キュウリ：ホモブシス根腐病 (秋田県：初) 10/28
- ショウガ：青枯病 (栃木県：初) 10/29
- トマト：黄化葉巻病 (滋賀県：初) 10/30