

令和 5 年 4 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06171

研究課題名(和文) シロアリの形態変化におけるマイクロRNA機能解析と増殖個体の養殖飼料としての展開

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNA in morphological changes of termites and use of breeding insects as cultivation feed

研究代表者

板倉 修司 (Itakura, Shuji)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：60257988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：有翅虫の特徴である複眼や翅の形成，幼形生殖虫の特徴である体表の着色やキチン合成への関与が予測される3種類のmiRNA(miR-7-5p, miR-8-3p, miR-12-5p)のinhibitorとmimicをイエシロアリとヤマトシロアリに注入した。
miRNA inhibitor注入で，ヤマトシロアリではnostrin, ribosomal proteinなどのmRNA発現量が増加した。イエシロアリではCYP15A1, JHBP, エクジソン受容体などのmRNA発現量が増加した。
miRNA mimic注入では，両シロアリで注入後5～7日経過後にJHAMTとCYP15A1のmRNA量の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロアリは良質なタンパク質と脂質を含むため，食料や飼料としての活用が期待される。シロアリ1匹の体重は数mgしかなく，また成熟したシロアリの巣の中の個体数は数万匹～百万匹に過ぎないため，巣全体のシロアリを採集したとしても数十g～数kgしか集めることができない。このためシロアリを食料・飼料など生物資源として利用する際には，効率的にシロアリの個体数を増やす必要が生じる。
本研究は，シロアリの分化を制御するmiRNAを見出し，シロアリの幼虫(職蟻)から成虫(幼形生殖虫)への分化誘導を目標としている。本研究では，分化のキーとなる幼若ホルモン生合成に関わる遺伝子を制御するmiRNA候補を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Three types of miRNAs (miR-7-5p, miR-8-3p, miR-12-5p) predicted to be involved in the formation of compound eyes or wings, which are characteristics of alates, in the body coloring, which are characteristics of replacement reproductive, and in the chitin synthesis, were selected as targets. Inhibitors or mimics of the miRNAs were injected into worker caste termites of *Coptotermes formosanus* and *Reticulitermes speratus*.
Injection of miRNA inhibitors increased the expression of mRNAs such as nostrin and ribosomal protein in *R. speratus*. In *C. formosanus*, mRNA expression levels of CYP15A1, JHBP, and ecdysone receptor increased. Injection of miRNA mimic reduced the mRNA levels of JHAMT and CYP15A1 in both *C. formosanus* and *R. speratus* 5-7 days after injection.

研究分野：木材保存学

キーワード：昆虫食 生物資源 シロアリ miRNA miRNA inhibitor miRNA mimic

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象昆虫であるイエシロアリとヤマトシロアリの食品成分分析を実施し、これらのシロアリが食料あるいは飼料として優れた素材となりうることを見出した。また、タカサゴシロアリとタイワンシロアリの栄養価を分析し、イエシロアリとヤマトシロアリの方がタカサゴシロアリとタイワンシロアリより栄養価が優れていることを報告した。

シロアリは木材や紙など人間の食料と競合しない木質材料を餌として生育することが可能である。また、国内での間伐材・林地残材、製材工場残材、建設発生木材の利用率は、順に19%、89%、94%であり、利用率が極端に低い間伐材と林地残材の活用が火急の課題とされている。本研究の遂行によりシロアリ職蟻あるいはニフの産卵階級である幼形生殖虫や有翅虫への誘導技術が確立し、間伐材や林地残材を餌としたシロアリ養殖が実用化できれば、2050年に訪れると予測されている食糧危機の解決策を提供することが可能であるだけでなく、国内の林業の振興にも寄与することができる。

シロアリ体内に存在する短鎖RNAを次世代シーケンサーで解析し、イエシロアリ職蟻から114種類のmiRNA、ヤマトシロアリ職蟻から97種類のmiRNA、ヤマトシロアリのニフから101種類のmiRNA配列を同定した。さらに、イエシロアリとヤマトシロアリの間でmiRNAが保存されていること、職蟻とニフの間でもmiRNAが保存されていることを見出した。この過程で、職蟻あるいはニフから幼形生殖虫への形態変化で重要な働きをされるとされる数種類のmiRNA候補を見出した。これらのmiRNAの機能を明らかにするため、翅の形成やキチン合成を阻害すると予測されるmiR-12-5p、複眼や翅の形成を阻害すると予測されるmiR-7-5pに対するinhibitorを、職蟻とニフに注入し形態変化を観察した。その結果、miR-7-5p inhibitorを注入したヤマトシロアリ職蟻の幼形生殖虫への形態変化、さらに有翅虫や幼形生殖虫の特徴である体表の褐色化、さらにニフから有翅虫への形態変化が観察された。この様に、miR-7-5p inhibitorの注入によりmiR-7-5pの活性を阻害した結果、幼形生殖虫や有翅虫への形態変化が誘発されたことから、miR-7-5pはシロアリの成虫形質の発現を抑制しているmiRNAであることが予測された。また、miR-7-5p inhibitorを注入したシロアリからタンパク質を抽出し、二次元電気泳動で分離したタンパク質をMALDI-TOF-MSで分析し、miR-7-5pが発現を抑制しているタンパク質の同定を試みたが、miR-7-5pが阻害された際にシロアリ体内で発現量が上昇するタンパク質の同定には至らなかった。

次世代シーケンシングによるイエシロアリの全ゲノム解析ならびに遺伝子予測により、12,984種類の予測遺伝子を見出した。この12,984種類の予測遺伝子に対して、miRNA inhibitorを注入したシロアリのRNA-SeqによるmRNA発現量の変動解析を実行することで、miRNA inhibitorの注入により発現量が上昇するmRNAを明らかにすることが可能である。得られた遺伝子情報や実験結果に基づいて、シロアリの職蟻あるいはニフから幼形生殖虫あるいは有翅虫への形態変化の際にシロアリ体内で働くmiRNAの種類と機能を明らかにすることができれば、上述した間伐材や林地残材を餌としたシロアリ養殖において、職蟻あるいはニフの幼形生殖虫や有翅虫への分化を誘導し産卵個体数を増加させることが可能となり、食料あるいは飼料としてシロアリを活用するための基礎技術を確認することができる。

2. 研究の目的

シロアリの職蟻あるいはニフから幼形生殖虫や有翅虫への形態変化の際に作用するmiRNAの種類と機能を明らかにする。有翅虫の特徴である複眼（シロアリの職蟻やニフには複眼は存在せず、有翅虫への形態変化が起こる過程で複眼が形成される）や翅の形成、生殖虫の特徴である体表の着色やキチン合成への関与が予測される3種類のmiRNA(miR-7-5p, miR-8-3p, miR-12-5p)を解析の対象とする。それぞれのmiRNAに対するinhibitorをシロアリに注入し、複眼や翅の形成、体表着色を観察する。これらの形態変化観察と並行して、二次元電気泳動とMALDI-TOF-MSを用いて、miRNA inhibitorの注入によるmiRNAの抑制により発現量が増加しているタンパク質を同定する。得られたペプチドの情報をもとに、発現量が増加したタンパク質をコードする遺伝子を明らかにする。また、RNA-SeqによるmRNA変動解析を実施し、miRNA inhibitorの注入によって、実際にmRNAが増減しているか検討し、miRNAにより制御されている遺伝子であるかどうか検証する。

この基礎研究の成果を応用して、シロアリの個体数を数万～数百万倍に増加させ、養殖漁業用の飼料としてシロアリが適しているか検討する。

3. 研究の方法

鹿児島県で採集した研究室飼育コロニーから採集したヤマトシロアリ職蟻を用いた。10あるいは20 μMのmiR-7 inhibitor (5'-AC CAG UAC CUG AUG UAA UAC UCA-3'), miR-8 inhibitor (5'-AC AAC AAA AUC ACU AGU CUU CCA-3'), miR-12 inhibitor (5'-GA CAU CUU UAC CUG ACA GUA UUA-3')をマイクロインジェクター (Nanoject III, Drummond)を用いて1頭当たり7あるいは35 nLずつ中胸腹板と後胸腹板の間に注入した。28°Cで6日間飼育した後、1匹ずつホモジ

ナイズし, EzApply 2D Kit (ATTO) を用いて可溶性タンパク質と膜タンパク質を精製し, Vivaspin (Sartorius) を用いて 50 倍に濃縮した。A-C58 アガーゲル (pI 5-8) で等電点電気泳動した後, c-PAGE (ゲル濃度: 5-20%, ATTO) で SDS-PAGE を行った。濃いスポットを切り出し, プロトコルに従い autoflex speed (Bruker) を用いて MALDI-TOF/MS 解析を実施した。また, 同様に注入した職蟻を 2 日間飼育した後に, 1 匹ずつ RNeasy Mini Kit (Qiagen) と QIA shredder (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて cDNA を合成し, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて PCR 反応液を調製した。StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて定量 RT-PCR を行った。

飼育コロニーから採集したイエシロアリ職蟻とニンフを用いた。10 μ M の miR-7 inhibitor, miR-8 inhibitor, miR-12 inhibitor をマイクロインジェクター (Nanoject III, Drummond) を用いて 1 頭当たり 7 nL ずつ腹部腹面に注入した (n = 30, 計 120 頭 \times 2 カースト)。28°C で 2 日間飼育した後に, RNeasy Mini Kit (Qiagen) と QIA shredder (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出し, Illumina system による RNA 解析を Novogene で行った。GLC Genomic workbench (Filgen) を用いて転写発現解析を実施した。また, 同様に注入 (n = 10, 計 40 頭 \times 2 カースト) \cdot 6 日間飼育した後, 2 頭ずつホモジナイズし, EzApply 2D Kit (ATTO) を用いて可溶性タンパク質と膜タンパク質を精製し, Vivaspin (Sartorius) を用いて 50 倍に濃縮した。A-C38 アガーゲル (pI 3-8) または A-C58 アガーゲル (pI 5-8) で等電点電気泳動した後, c-PAGE (ゲル濃度: 5-20%, ATTO) で SDS-PAGE を行った。濃いスポットを切り出し, プロトコルに従い autoflex speed (Bruker) を用いて MALDI-TOF/MS 解析を実施した。

miRNA inhibitor の代わりに, miR-7 miRNA mimic (5'-UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU-3'), miR-8 miRNA mimic (5'-UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC-3'), miR-12 miRNA mimic (5'-UGAGUAAUACAUCAGGUACUGGU-3') を, miRNA inhibitors と同様にヤマトシロアリ職蟻とイエシロアリ職蟻に注入した。注入後 1, 2, 3, 5, 7 日間飼育した後に, 1 匹ずつ RNeasy Mini Kit (Qiagen) と QIA shredder (Qiagen) を用いてトータル RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて cDNA を合成し, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて PCR 反応液を調製した。StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて定量 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

二次元電気泳動で分離したヤマトシロアリで発現している可溶性タンパク質と難溶性タンパク質 (膜タンパク質) を, MALDI-TOF/MS で分析し Mascot 検索を行った結果, miR-8 inhibitor 注入で myosin heavy chain, paramyosin, voltage-dependent anion-selective channel-like の発現量が増加した。また, miR-12 inhibitor 注入で myosin heavy chain と paramyosin の発現量が増加した。可溶性タンパク質では β -actin のようなハウスキーピング遺伝子が見つからず, 定量解析ができなかった。定量 RT-PCR の結果, miR7 inhibitor 注入で nostrin と ribosomal protein 遺伝子発現量が, imR-12 inhibitor 注入で ribosomal protein と voltage-dependent anion-selective channel-like 遺伝子発現量が, 顕著に増加していた。二次元電気泳動でタンパク質発現量が増加していた myosin heavy chain と paramyosin 遺伝子の顕著な発現量増加は定量 RT-PCR で検出されなかった。

RNA-seq 解析の結果, 変態に関与する可能性のある遺伝子として, ecdysone-inducible protein E75, 78C, 78EF, nuclear hormone receptor FTZ-F1, broad-complex core protein (9 遺伝子), eclosion hormone, zinc finger protein on ecdysone puffs (2 遺伝子), juvenile hormone-inducible protein (3 遺伝子), juvenile hormone epoxide hydrolase (JHEH), juvenile hormone binding protein (4 遺伝子), juvenile hormone acid O-methyltransferase (JHAMT), juvenile hormone epoxidase (cytochrome P450 15A1) がイエシロアリで発現していた。この中でエクダイン応答遺伝子 broad-complex core protein (2 遺伝子) とエクダインパルス後に誘導される転写因子 nuclear hormone receptor FTZ-F1, また幼若ホルモン合成に関連する juvenile hormone epoxidase (cytochrome P450 15A1) と幼若ホルモン運搬に関与する juvenile hormone binding protein (2 遺伝子), 幼若ホルモンに誘導される juvenile hormone-inducible protein 遺伝子で miRNA inhibitor 注入による mRNA 発現量の増加がみられた。卵形成, 卵成熟, 性フェロモン合成に関与する可能性のある遺伝子として, ecdysone receptor (2 遺伝子), ecdysone receptor EcR/USP, vitellogenin (2 遺伝子), vitellogenin receptor, oocyte zinc finger protein (8 遺伝子), methoprene-tolerant (2 遺伝子), PBAN-type neuropeptide がイエシロアリで発現していた。この中で, 卵形成に必要な ecdysone receptor (2 遺伝子) と ecdysone receptor EcR/USP, 卵黄タンパク質前駆体 vitellogenin, 卵母細胞成熟で機能する oocyte zinc finger protein (3 遺伝子), 卵黄形成と卵母細胞成熟で機能する methoprene-tolerant 遺伝子で miRNA inhibitor 注入による mRNA 発現量の増加がみられた。これらの miRNA inhibitor 注入による mRNA 発現量の増加は, ニンフで顕著であった。

イエシロアリ職蟻とヤマトシロアリ職蟻に microRNA (miR-7, miR-8, miR-12) mimic をマイクロインジェクターで注入し, JHAMT (Juvenile hormone acid methyltransferase), CYP15A1 (cytochrome P450, methyl farnesoate epoxidase), 幼若ホルモンエポキシヒドロラーゼ (JHEH), 幼若ホルモンエステラーゼ (JHE), 幼若ホルモン結合タンパク質 (JHBP) など幼若ホルモンの合

成, 分解や運搬に関わるタンパク質をコードする遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR で測定した結果, ヤマトシロアリ職蟻では, miR-7, miR-8, miR-12 の mimic 注入後, 5~7 日経過後に JHAMT と CYP15A1 の mRNA 発現量の低下が認められ, 特に miR-7 mimic を注入した職蟻では 7 日経過後の JHAMT と CYP15A1 の mRNA 発現量がほぼゼロになった。同様の現象が JHE や JHBP でも観察されたが, JHEH は注入 1~2 日後に発現量がほぼゼロまで低下した後 7 日後には発現量が数倍まで急増した。イエシロアリ職蟻では, miR-7, miR-8, miR-12 の mimic 注入 7 日後に JHAMT と CYP15A1 の mRNA 量の低下が認められ, JHE と JHBP の中にも注入 7 日後に発現量が低下する遺伝子が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shuji Itakura, Yuya Yoshikawa, Yasuhiro Togami, Kiwamu Umezawa	4. 巻 23
2. 論文標題 Draft genome sequence of the termite, <i>Coptotermes formosanus</i> : Genetic insights into the pyruvate dehydrogenase complex of the termite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Asia-Pacific Entomol.	6. 最初と最後の頁 666 - 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aspen.2020.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoyuki Konishi, Daichi Yamamoto, Kiwamu Umezawa, Shuji Itakura	4. 巻 31
2. 論文標題 Hydrogen production by microorganisms in the hindgut of the termite <i>Reticulitermes speratus</i> under anaerobic and aerobic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn. J. Environ. Entomol.	6. 最初と最後の頁 51 - 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11257/jjeez.31.51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 板倉修司	4. 巻 33
2. 論文標題 生物資源としてシロアリを活用するための基礎的研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環動昆	6. 最初と最後の頁 117-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11257/jjeez.33.117	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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 戸上 泰裕, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 イエシロアリの職蟻とニンフにおけるmiRNA機能解析
3. 学会等名 第33回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉垣里菜, 安雲 凧, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 ヤマトシロアリ職蟻のmiRNA機能解析
3. 学会等名 第33回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸上泰裕, 吉川優弥, 梅澤究, 板倉修司
2. 発表標題 イエシロアリの職蟻とニンフのmiRNA発現解析
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸上 泰裕, 吉川 優弥, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 イエシロアリのmiRNA機能解析
3. 学会等名 第32回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 優弥, 戸上 泰裕, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 イエシロアリの薬剤抵抗性関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第32回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸上 泰裕, 吉川 優弥, 中西 慶磨, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 イエシロアリのゲノム解析
3. 学会等名 第36回日本木材保存協会オンライン年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 優弥, 戸上 泰裕, 中西 慶磨, 梅澤 究, 板倉 修司
2. 発表標題 イエシロアリの薬剤抵抗性と抵抗関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第36回日本木材保存協会オンライン年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸上泰裕, 梅澤究, 板倉修司
2. 発表標題 イエシロアリのmicroRNA機能解析
3. 学会等名 第34回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉垣里奈, 梅澤究, 板倉修司
2. 発表標題 ヤマトシロアリのmicroRNA機能解析
3. 学会等名 第34回日本環境動物昆虫学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸上泰裕, 梅澤究, 板倉修司
2. 発表標題 イエシロアリにおけるmiRNAの機能解析
3. 学会等名 第38回日本木材保存協会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉垣里菜, 安雲 凧, 梅澤究, 板倉修司
2. 発表標題 ヤマトシロアリ職蟻のmicroRNA機能解析
3. 学会等名 第38回日本木材保存協会年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 板倉修司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 海青社	5. 総ページ数 254
3. 書名 木材科学講座 4 木材の化学	

〔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

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