

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07219

研究課題名(和文)吸血節足動物に対する哺乳類動物の防御行動の神経制御メカニズム

研究課題名(英文)Defense mechanisms against blood-sucking arthropods in mammalian animals

研究代表者

佐藤 大祐 (SATO, Daisuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00785735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本脳炎に代表される、蚊によって病原体が媒介される人獣共通感染症では、ヒト以外の哺乳類(増幅動物と呼ぶ)で病原体が増幅し、蚊の吸血を介して増幅動物からヒトへの感染が成立する。このような感染症を制圧するためには、病原体のベクターである蚊、病原体に対するヒトの防御機構だけではなく、増幅動物の蚊に対する防御機構の研究が重要である。本研究では哺乳動物の蚊に対する応答を研究するために、蚊の行動パターンを遺伝学的手法により変化させることを目指した。本研究では、変異体作製のための手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Mosquito-borne zoonotic pathogens (e.g. Japanese encephalitis, JE) spread by bite of mosquitoes and infect many species of mammal. Route of infection of mosquito-borne zoonotic pathogens is sucking blood from infected animals (called amplifier), and then another bite to humans. In order to prevent spreading mosquito-borne zoonotic pathogens, research about a) pathogens and mosquitoes, b) defense mechanisms against these pathogens in humans, and c) in amplifier animals. Compared to extensive amount of studies of pathogens and human defense system, defense mechanisms in amplifier animals still remain elusive. In this project, I aimed at elucidating behavioural response of amplifier animals to mosquito by changing behavioural pattern of mosquitoes in a genetic manner. Toward this aim, I tried to develop methods for generation of transgenic and mutant mosquitoes.

研究分野：衛生動物学

キーワード：蚊媒介性感染症

1. 研究開始当初の背景

蚊媒介性感染症では蚊の吸血によって病原体がヒトに感染するが、吸血時に病原体が体内に直接移行するために、病原体を運ぶ蚊に吸血された場合における感染が成立する確率は高い。実際に感染効率も高く、感染効率は基本再生算数と呼ばれる数値で計測されるが、インフルエンザの基本再生算数が 2-3 であるのに対し、蚊媒介性感染症の代表例であるマラリアの基本再生産数は 1-3000 と推定されている (Smith et al., *Plos Biology*, 2007)。そのため、蚊を介した感染症の蔓延を防ぐことは喫緊の課題である。

蚊媒介性病原体のそれぞれの感染経路は独特であるが、蚊媒介性の人獣共通感染症と呼ばれる感染症では、ヒト以外の動物でウイルスが増殖し、最終的にヒトへ感染させる。日本脳炎はこの代表例であり、日本だけではなくアジア全体に見られる (Miller et al., *Plos Neglected Tropical Disease*, 2012)。広く知られている感染経路は、まずブタ体内で日本脳炎ウイルスは増幅し、ブタからブタへと蚊を介して感染が広がる。感染ブタを吸血した蚊がヒトを吸血すると、ブタ体内で増幅した日本脳炎ウイルスがヒトへ感染し、日本脳炎を発症する (Gubler et al., *Fields Virology*)。なお、ブタは日本脳炎を発症しないため、ブタは増幅動物と呼ばれる。人獣共通感染症の理解と予防には病原体、媒介生物である蚊、ヒトの感染防御機構、そして増幅動物の理解が重要である。この中でも増幅動物の蚊に対する応答に関して、著しく研究が進んでいなかった。

2. 研究の目的

日本脳炎の予防はワクチンの接種によってなされているために、国内では発症するケースが少ない。しかしながら病原体は増幅動物中には存在しており、抜本的な制圧にはいたっていない。人獣共通感染症をより予防する上で、増幅動物の感染に対する防御機構の理解が重要である。そのため、哺乳動物が蚊自体、そして蚊による吸血を認識できるのかを調べることをゴールとした。

上記の目的の達成のためには、野生に存在する蚊に対する哺乳動物の応答と、吸血しない蚊に対する哺乳動物の応答を比較することでなされる。特に、比較対象である蚊の外部形態など、吸血行動以外に変化

がない場合、よりその結論は強力なものになるだろう。

本研究では、蚊の行動パターンのみを変化できるような変異体を作成することを目指した。蚊の吸血は、その卵へのタンパク質の供給に必須と考えられており、メスに特異的な行動である。*fruitless* と呼ばれる遺伝子は、ショウジョウバエでは行動の雌雄差を制御する。一方で、*fruitless* は外部形態の性差には影響を与えない。蚊のゲノムにも *fruitless* と相同な遺伝子はコードされており、本研究では蚊の *fruitless* の変異体を作製し、その蚊の吸血行動、そしてそれに対する哺乳動物の応答を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

蚊のゲノムを人為的に操作する手法は既に報告されており、トランスポゾンを用いることによるトランスジェニック蚊の作製や、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、もしくは *Crispr/Cas9* システムによるゲノム編集技術によって変異体を作製することが可能である。本研究では、*fruitless* の変異体の作製を目指し、*Crispr/Cas9* システムを用いた。

蚊における *Crispr/Cas9* システムはショウジョウバエなど他の昆虫と同様の実験系であり、ガイド RNA と Cas9 タンパク質の胚へのインジェクションによって可能である。インジェクションするだけでその遺伝子機能が抑制できるが、本研究では多数の蚊を用いる実験が重要になるため、変異体系統の樹立を目指した。変異体が得られた場合、個々の蚊のジェノタイプを判定できなければならない。そこで、蛍光タンパク質をノックインすることで、変異体の作製を試みた。

4. 研究成果

病原体を媒介する蚊は複数種存在するが、その中でも飼育が容易であり、ジカウイルスやデングウイルスのベクターであるネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) をモデルとして選択した。ショウジョウバエにおいて、*fruitless* mRNA スプライシングパターンの違いによって雌雄で異なるアミノ酸配列のタンパク質が合成され、それが雌雄における神経回路の違いを、そして行動の雌雄差をうみだすと知られている。ネッタイシマカのゲノムにも *fruitless* はあり、過去の報告ではショウジョウバエと同様、スプライシングパ

ターンに雌雄差が見られる (Salvemini et al., *Plos One*, 2013)。まず、研究代表者は、メスおよびオスから mRNA を回収し、過去の文献とは異なるプライマーの組み合わせによって逆転写 PCR を行い、ネッタイシマカ *fruitless* を増幅した。その結果、雌雄における *fruitless* のスプライシングパターンの違いを確認できた(図1)。このことから、*fruitless* の機能は蚊においてもショウジョウバエと同様であり、*fruitless* が行動の性差を生じさせる可能性が示唆された。

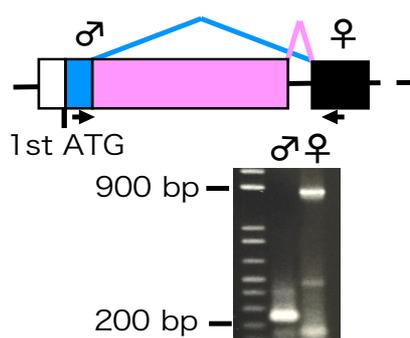


図1. ネッタイシマカ *fruitless* におけるスプライシングパターンの雌雄差

次に Crispr/Cas9 システムを用いて、部位特異的にドナーベクターをノックインすることで、メス特異的、およびオス特異的な mRNA の産生に異常が生じる変異体の作製を計画した。先ほど得られた転写産物をシーケンスすることで雌雄差が生じる部位を決定し、この情報に基づき、メス特異的な転写産物を欠損させるドナーベクター、およびオス特異的なスプライシングを生じさせないドナーベクターをデザインし、構築した。また、ホモロジーアームのデザインを変えることで、複数のドナーベクターを作製した。そのドナーベクターには、ノックインされた個体を簡便に認識できるように、人工的なプロモーターを用いて蛍光タンパク質を発現するデザインにした(図2)。また Crispr/Cas9 システムのための適切なガイド RNA を、先ほどのシーケンス情報を利用して設計した。これらドナーベクターとガイド RNA、そして Cas9 タンパク質を過去の報告にあるプロトコルに沿ってインジェクションした (Kistler et al., *Cell Reports*, 2015)。インジェクションされた個体からドナーベクターのレポーターである蛍光タンパク質が観察されたことから、ベクターおよびインジェクション実験は成功していることが示唆された。しか

しながら、多くの胚にインジェクションしたものの、インジェクション個体と野生型を掛け合わせて得られる次世代の個体の中で蛍光タンパク質を発現するものは一匹もおらず、ノックイン個体は得られなかった。さらに、ドナーベクターやガイド RNA の濃度、複数のガイド RNA を同時にインジェクションするなど試したものの、ノックインされた個体を得ることはできなかった。

ノックインによらず蚊の行動パターンを遺伝学的に変化させるために、別の手法としてトランスジェニックの作製を試みた。PiggyBac トランスポゾンを用いることで、トランスジーンをゲノムに挿入することを試みたが、現在までにトランスジェニック系統は得られていない。

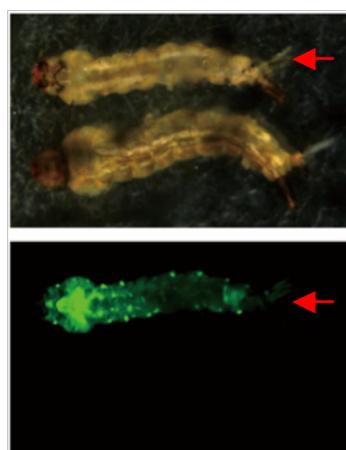


図2. 蛍光タンパク質を発現するネッタイシマカの幼虫 (赤矢印) および野生型

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 0 件)

[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

佐藤 大祐 (SATO, Daisuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00785735