

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14866

研究課題名（和文）病原体媒介蚊の吸血を司る正と負の味覚制御機構

研究課題名（英文）Dual-mode regulation of blood sucking behavior in *Aedes aegypti*

研究代表者

佐久間 知佐子 (Sakuma, Chisako)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10747017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：蚊の吸血は、感染症の病原体伝播の根源となる行動であるため、その分子基盤を理解することは重要である。宿主血液由来のアデノシン三リン酸（ATP）が蚊の吸血を促進することは広く知られていたが、その受容体や責任神経は不明であった。本研究ではネットアイシマカで糖の受容に関わる甘味受容体群の変異体を作製することにより、一部受容体がATPの受容に寄与することを明らかにした。

また、吸血を負に制御する成分（ペプチド）が宿主の血液内にあることを以前明らかにしていたが、このペプチドに吸血阻害効果が確かであることを複数の手法で検証し、さらに吸血直後の蚊の体内においてこのペプチドの検出を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸血行動を制御する分子機構が解明されることは、人為的な蚊の行動操作のための基盤となる。本研究において、吸血の促進および抑制（停止）に関わる分子を明らかにしたことは、今後これらが関与する神経回路の解明や、促進と抑制の切替について理解するための重要な手がかりとなる。また、これら分子の働きを制御する化合物のスクリーニングなども実現可能となる。

また、蚊において吸血促進物質であるATPが、ショウジョウバエやオスの蚊でも味覚受容されることが明らかになったため、蚊のATP受容機構に関して得た知見は、様々な昆虫の摂食の理解に新たな洞察をもたらすことが予想される。

研究成果の概要（英文）：Exploring the molecular mechanism of blood sucking behavior of female mosquitoes is one of the critical steps to fight against vector-borne diseases such as dengue and malaria, since pathogens are transmitted when mosquitoes are gorging on blood. It was widely known that adenosine triphosphate (ATP) derived from host blood promotes mosquito blood feeding, but its receptors and responsible neurons were unknown. In this study, by generating mutants of a group of gustatory receptors involved in sugar perception in *Aedes mosquito*, we showed that some receptors contribute to the perception of ATP.

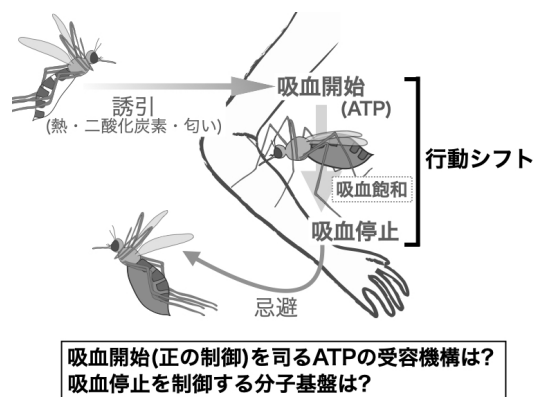
We also identified a substance in the host blood that negatively regulates blood feeding. We further confirmed that the substance has an inhibitory effect on blood feeding.

研究分野：神経行動学

キーワード：蚊 ネットアイシマカ 吸血 味覚 遺伝子編集 味覚受容体 ATP

1. 研究開始当初の背景

マラリア、デング熱および重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) などの疾患は、蚊やマダニなどの病原体媒介節足動物(ベクター)によって媒介される病原体由来の感染症であり、人間や動物に対して世界的に大きな脅威となっている。ベクターが介在するこれらの感染症は、吸血の連鎖行為によって急速に拡大する。そこで感染症の制御のためには、ベクターに関連する生命現象の分子基盤を解明することが重要であり、蚊の吸血行動に注目した。吸血行動は寄生虫やウイルス、細菌の効率的伝播の根源となる行動であり、また数分の吸血行動の前後で蚊が吸血標的に対して誘引と忌避という真逆の行動を示す点で、衛生昆虫学・神経行動学的に興味深い。しかし、吸血前に吸血標的へ誘引される機構の研究は盛んである(Wang et al., *Eur J Neurosci.*, 2009; McBride et al., *Nature*, 2014 など)一方で、吸血開始・吸血飽和状態の感知・吸血停止に関する研究は遅れており、分子基盤の解明が求められている。



研究代表者の以前の研究から、宿主へと誘引された全ての蚊が吸血を開始するのではなく、蚊は口針を宿主の皮膚や膜の中に刺し、血の味を受容した後に吸血の実行を決定する、すなわち吸血実行に味覚制御が重要な働きを担うことが示唆された。吸血を正に制御する物質として、宿主の血液由来のアデノシン三リン酸(ATP)が古くから知られているが、その受容体の実体は長年の謎であった。研究代表者は味覚受容体(Gr)の1つGr5がATP受容体として機能する可能性を発見していた。また宿主の血液に吸血を負に制御する物質も存在すること、さらにそれがペプチドであることを同定していた。以上より、吸血を正負に制御する味覚制御が各々あり、そのバランスによって吸血開始や停止が決定していることが予想された。

2. 研究の目的

本研究では、蚊の吸血を正および負に制御する機構を解明し、両者のスイッチングによる行動シフトの理解を目指す。従来の宿主認識機構(プラス方向)に加え、吸血停止・忌避などのマイナス方向に働く行動の神経基盤を明らかにすることは、擬似的に吸血停止状態を誘導するなど、新たな切り口で蚊行動を操作するための重要な知見となる。

3. 研究の方法

- (1) ショウジョウバエの味覚受容体との配列比較から、ネッタイシマカ Gr5 は糖を認識する甘味受容体のグループに属することが分かる。味覚受容神経では、同じグループの Gr が複数発現して協調的に機能することが多いため、他の甘味受容 Gr 群が Gr5 と共に ATP 受容に寄与するかを、CRISPR/Cas9 法で機能欠損ネッタイシマカを作製することによって検証した。
- (2) 研究代表者の以前の研究より吸血阻害効果を持つと予想されたペプチドについて、吸血阻害効果の検証を以下の2つの手法で行なった。合成したペプチドを吸血促進物質である ATP に添加したもの、さらにペプチドの濃度を特異的に上昇させる薬剤を宿主血液に添加したものをを用いて人工吸血アッセイを行なった。加えて、吸血直後の蚊の体内にこの物質が存在するかを LC-MS/MS で定量した。

4. 研究成果

- (1) CRISPR/Cas9 法による遺伝子編集で、ネッタイシマカ甘味受容体と予想される Gr4, 6, 7, 9, 10, 11, 34 の機能欠損変異体を作製した。Gr9 に関しては変異ホモ個体が成虫になる前に死に至るため行動解析ができなかった。また、Gr10, 11 に関しては変異ホモ個体が脆弱であり、行動解析に至っていない。その他の甘味受容体に関して、変異ホモ個体を用いて ATP や血液の人工吸血アッセイを行なった。Gr4 変異体では Gr5 変異体と同様の異常が観察され、それ以外では Gr 変異体群では顕著な異常は認められなかった。このことより、Gr5 は Gr4 と協調的に ATP 受容を行なっていると考えられた。さらに Gr4 のショウジョウバエ相同体は Gr64f であり、甘味受容神経に常に発現して共受容体として働くことが知られている。ショウジョウバエで Gr64f の機能抑

制を行なってみたところ、ATP 受容に異常が生じた。さらに、ネッタイシマカで *Gr5* と *Gr4* の両方を欠損した変異体の作製を試みたところ、両遺伝子のホモ変異個体になると死に至ったため、*Gr5* と *Gr4* には遺伝学的相互作用があると考えられる。以上より、ネッタイシマカでは、ATP 受容に *Gr5* と *Gr4* が関与しており、*Gr5* は ATP を特異的に認識する役割を持ち、*Gr4* は共受容体として機能することが予測された。

- (2) 吸血阻害効果を持つと予想されたペプチドに関して、合成したものをを用いて人工吸血アッセイを行なったところ、予想通り、ATP による吸血促進効果を打ち消すことが確認できた。さらに、このペプチドの濃度を特異的に上昇させる薬剤を用いて宿主血液を予め処理したものを、蚊に呈示すると吸血率が顕著に減少した。この薬剤を ATP に加えるのみでは、人工吸血率が減少しなかったため、この薬剤の味が吸血抑制効果を持つ可能性は否定できた。さらに限外濾過によって分子量の低いもののみを含む画分を得た際にも、この薬剤処理を行なった血液でのみ吸血阻害効果が見られた。以上より、このペプチドに吸血阻害効果があることを検証できた。

さらに、吸血直後の蚊の体内に、宿主由来のこのペプチドが確かに存在することを LC-MS/MS による定量で明らかにした。同位体ラベルしたペプチドを用いた絶対定量を行なったところ、吸血 5 分後には蚊体内には数百フェムトモルレベルで存在すること、その体内レベルは吸血 5-60 分後ではほぼ変化しないことが明らかになった。また吸血 24 時間後にはこのペプチドは検出されなかった。以上より、このペプチドは吸血直後の時間帯において、吸血阻害効果を示す、すなわち吸血停止に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chisako Sakuma, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Positive and negative regulators in host blood that affect blood-sucking behavior of mosquitoes
3. 学会等名 Japan Drosophila Research Conference 14
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間知佐子, 岩本武夫, 嘉糠洋陸
2. 発表標題 病原体媒介蚊の吸血を正・負に制御する宿主血液成分の同定
3. 学会等名 東京慈恵会医科大学 第138回成医会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間知佐子, 嘉糠洋陸
2. 発表標題 蚊の吸血は宿主血液成分の受容によって正・負に制御される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間知佐子
2. 発表標題 蚊は血の味をどのように味わい満腹になるか? -病原体媒介蚊における味覚認識と飽血機構-
3. 学会等名 広島大学大学院統合生命科学研究科 第21回細胞生物学研究室セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chisako Sakuma
2. 発表標題 Regulators of host blood that affect blood feeding behavior of mosquitoes
3. 学会等名 Symposium for Sensory and Circadian Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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		
その他の国・地域, 台湾	National Health Research Institute		