

令和元年5月26日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08055

研究課題名(和文)蚊の吸血行動を抑制する微生物製剤の創出

研究課題名(英文) Development of a microbial formulation for inducing of mosquito blood feeding suppression

研究代表者

佐藤 朝光 (Satho, Tomomitsu)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：90369025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、疾病媒介蚊への対策の一つとして、吸血行動に至る蚊の数を減らすことを目的とした。まず、蚊に特徴的な宿主探索行動のメカニズムの解明を試みた。そして、ヒトスジシマカの雌成虫の宿主探索行動に、ドパミンだけでなく、オクトパミンが関係することを確認した。また、吸血行動を行う成虫は、トリプシンのような消化酵素を強く発現しており、幼虫や蛹と異なる遺伝子プロファイルである可能性が示された。また、機能の分かっていない遺伝子が数多く発現していることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、ドパミンやオクトパミンなどの生体アミンによって蚊に特徴的な宿主探索行動が制御されることが初めて明らかにされ、蚊の吸血行動のメカニズムの一端が解明されたことが本研究の学術的意義である。また、他の生物種と相同性の低いヒトスジシマカ由来の未知のタンパク質の存在も確認されたことは、蚊に特異的な薬剤の開発にもつながり、媒介蚊対策への貢献を考慮すると社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：This research aims to reduce the number of blood feeding mosquitoes for vector control. First, we elucidate the mechanism of host seeking activity by adult female of *Aedes albopictus* and we confirmed that not only dopamine but also octopamine control the host seeking activity. Subsequently, it was shown that adults mosquitoes strongly expressed digestive enzymes such as trypsin and protein expression profile of adult was different from that of larvae and pupa. Moreover, we confirm that many unknown functions genes are expressed.

研究分野：衛生動物学

キーワード：ヒトスジシマカ 宿主探索行動 生体アミン 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

経済発展に伴ったヒトやモノの移動量の増加は、媒介蚊の移動や感染症の拡大を容易にし、蚊媒介性感染症の危険性を増大させている。代表的な蚊媒介性感染症であるデング熱は、世界人口の約半数が罹患するリスクにさらされていると言われている (WHO: Fact sheet Dengue and severe dengue)。日本も例外ではなく、2014年8月、東京都においてヒトスジシマカが媒介するデング熱が発生した (Seki, N. et al. *Nihon Koshu Eisei Zasshi* 62, 238-250 (2015))。これは、1945年以來の国内感染事例である。さらに、越冬能力を有するヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) での増殖が可能となったチクングニアウイルス (A226V) のように、ウイルス突然変異株の出現は、突如として全く新しい蚊媒介性ウイルス感染症が世界の広範な地域で新興する可能性を一層高めている (Kumar, N. P. et al. *J Gen Virol* 89, 1945-1948 (2008))。このような背景から蚊媒介性ウイルス感染症の対策は、我が国の公衆衛生上、ますます重要な課題の一つとなっている。ワクチンなどの存在しない新興の蚊媒介性ウイルス感染症の予防は、“媒介蚊に刺されないこと”が重要となることから、媒介蚊の制御が急務である。現在、蚊の制御における主要なツールは、殺虫剤及び忌避剤である。殺虫剤は、蚊の繁殖域に散布し、個体数を減らすという比較的簡便なツールであるが、蚊以外の益虫なども殺してしまうため生態系の破壊が危惧されている。一方、忌避剤は、殺虫剤と比較して生態系への影響は少ないが、個人で塗布を行う必要があり、手間と個人の感染症への意識の継続が必要である。したがって、蚊の特性を知り、生態系に悪影響が少ない、散布が可能な新しい蚊の「制御ツール」の創出が望まれている。

本研究は、蚊に特徴的な“雌蚊が吸血対象を探索する行動(宿主探索行動)”に着目した。宿主探索行動を抑制するツールは、吸血行動に至る蚊の数を減らし、蚊媒介性感染症を予防することが期待される。また、このツールは、環境や人体への悪影響を減らすため、蚊と他の生物種で異なる分子を標的とすることが望まれる。これまで野外で採取したヒトスジシマカを用いてトランスクリプトーム解析を行い、868個の塩基配列を決定し、他の生物種と相同性の低い266個の未知の塩基配列を検出している。これは、蚊に特異的なタンパク質が存在することを強く示唆しており、蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とすることで、蚊に選択的で、環境や人体へ悪影響のないツールの創出ができる可能性を示している。しかし、宿主探索行動の制御機構は不明な点が多いため、標的とするタンパク質を選定することはできない。そこで、まず、宿主探索行動の制御機構を明らかにするため、昆虫の中枢において自発運度や睡眠・覚醒、記憶学習といった様々な行動の制御に関与する生体アミンのドパミン (DA) とオクトパミン (OA) に注目した (Yamamoto, S. & Seto, E. S. *Japanese Association for Laboratory Animal Science* 63, 107-119 (2014))。雌蚊において、頭部 DA 量は羽化後徐々に減少する。興味深いことに、この期間、宿主探索行動は増加することから、DA が宿主探索行動を制御する因子の1つであると予想した。 (Andersen, J. P. et al. *Journal of insect physiology* 52, 1163-1170 (2006))。また、ショウジョウバエの性行動は、DA と OA による重複した制御を受ける (Chen, A. et al. *Genetics* 193, 159-176 (2013))。このため、OA は、DA とともに雌蚊の宿主探索行動を制御すると推測された。本研究は、DA と OA が宿主探索行動に及ぼす影響が明らかになることで、蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とした、新しい抑制ツールが創出できると予想された。

2. 研究の目的

本研究は、蚊の宿主探索行動の制御における生体アミンの役割を DA だけでなく、OA なども含め明らかにする。また、得られた知見をもとに蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とした、新しい抑制ツールの創出を目指した。

3. 研究の方法

3-1. ヒトスジシマカの飼育

福岡大学3号館周辺において人囮法で採集したヒトスジシマカを室内で継代飼育し、実験に用いた。継代飼育は、日照時間 light/dark 16h (AM 10:00 ~)/8h (AM 2:00 ~) 湿度 $70 \pm 10\%$ RH、温度 27 ± 2 に設定したインキュベーター内で行われた。幼虫の飼育は、脱塩素した水道水を適量入れたバット (23×33×5cm) を用いて行った。餌は毎日適量を与えた。蛹化した個体は駒込ピペットを用いて回収し、飼育用ケージ (20×20×30cm) 内に移した。餌として 3% スクロースを飼育用ケージ内に静置した。

3-2. 薬剤処置による生存率への影響

雌雄に分離は、蛹期の形態学的違いを基に行った。同日羽化した雌蚊は紙コップに20匹ずつ移した。その後、紙コップの上にコットンを置き、その上に薬剤を1mL滴下した。薬剤は、羽化後0日目から6日目まで毎日与えた。生存率は、羽化後6日目までに死亡した雌蚊を数え、アボットの補正式を用いて補正死亡率を算出した。その後、算出した生存率からシグモイド曲線を作成し、 LC_{50} を得た。シグモイド曲線は、Origin 8.1を使って作成した。L-DOPAは、10mM以上は溶解できなかったことから0、0.3、1、3、10mMを処置した。一方、OAは、0、0.3、1、3、10、30、100、300mMを与えた。各薬剤濃度の検討は、3-6回繰り返した。

3-3. HPLCを用いたDA及びOA量の測定

吸血行動の観察後、雌蚊に氷麻酔を施した。実体顕微鏡下、雌蚊頭部を切り出した。切り出

した雌蚊頭部 1 匹分を HPLC 用ホモジナイズ溶液 50 μ l に入れ、バイオマッシャー（ニッピ）を用いてホモジナイズした。その後、15000rpm、4 $^{\circ}$ C、20min で遠心し、得られた上清は新しい 1.5mL チューブに移した。そして、上清 20 μ l を HPLC に注入し、DA 量と OA 量を測定した。同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各 100 匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3% スクロース（Control 群） 3.5mM L-DOPA（DA 群） 30mM OA（OA 群）を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。羽化後 0、3、6 日目に実験用ケージから雌蚊を回収し、実体顕微鏡下で頭部を切り出した。そして、内部標準を含んだ 0.1M 過塩素酸中でホモジナイズし、その上清中の DA 及び OA 量を、電気化学検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD）で測定した（表 1）。各群は、12 サンプルずつ測定した。

検出器	950mV versus an Ag/AgCl reference electrode	
カラム	EICOM PAK SC-50DS (150 x 3.0 mm; EICOM)	
設定温度	25 $^{\circ}$ C	
流速	0.5 ml/min	
移動相	pH 5.0 0.1M クエン酸-酢酸ナトリウム	80%
	メタノール	20%
	1-ドデカンスルホン酸ナトリウム	130mg
内部標準	3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA)	

表 1. HPLC の測定条件

を行ったとみなし、吸虫管により吸引回収し、カウントした（図 1）。観察終了後、回収した雌蚊を同ケージに戻し、宿主探索行動を示した雌蚊の割合を算出した。同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各 100 匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3% スクロース（Control 群） 3.5mM L-DOPA（DA 群） 30mM OA（OA 群）を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。そして、羽化後 0 日目から 6 日目まで毎日宿主探索行動を観察した。各群は、6 回繰り返し測定した。

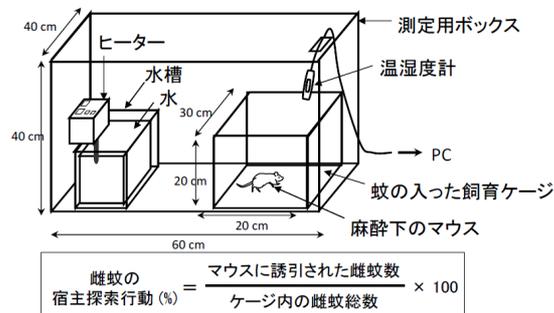


図 1. 宿主探索行動測定装置

assembly を行い、コンティグを作製した。アセンブルは、CLC Genomics Workbench を用いて行った。

4. 研究成果

4-1. 薬剤処置が蚊の生存率に与える影響

L-DOPA を処置した群は、全ての濃度で生存率は低下せず、LC₅₀ は算出できなかった（図 2A）。一方、OA を処置した群の生存率は、30mM から 100mM の間で減少し、LC₅₀ は 39.5mM となった（図 2B）。以上の結果から、L-DOPA 処置濃度は 3.5mM、OA 処置濃度は 30mM とした。また、3% スクロース（Control 群） 3.5mM L-DOPA（DA 群） 30mM OA（OA 群）を実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。羽化後 6 日目までに死亡した雌蚊を数え、アボットの補正式を用いて生存率を求めた。その結果、DA 群の生存率は、100.0%、OA 群の生存率は、99.9%であった。以上の結果から、実験に使用した薬剤処置は蚊の生存率に対して影響はないことが示唆された。

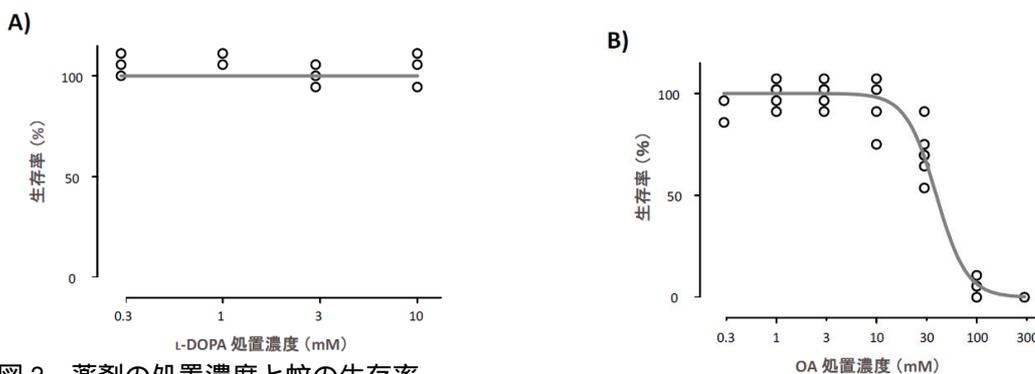


図 2. 薬剤の処置濃度と蚊の生存率

3-4. 宿主探索行動の測定

羽化日を羽化後 0 日目とし、羽化後 0~6 日目まで毎日、1 日に 1 回 PM 7:00（インキュベータ内が明期になって 9 時間後）に行った。また、宿主探索行動は飼育条件と同じ湿度 70 \pm 10% RH、温度 27 \pm 2 $^{\circ}$ C の環境下で行った。実験開始前に、測定装置内に 5 分間、蚊の入った実験用ケージを入れ静置した。その後、麻酔を施した BALB/c 雌マウスと 3% スクロースを実験用ケージ内に 30 分間静置し、観察を行った。観察中、静置したマウスに止まった雌蚊は、宿主探索行動

3-5. 次世代シーケンサーによる発現遺伝子解析

幼虫、蛹、成虫を回収した。回収した組織から ISOGEN を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA は、DNase I で処理後、RNeasy Plus Mini Kit を用いて精製した。次いで、Oligotex TM dT30 <Super> mRNA Purification Kit を用いて mRNA を調製した。mRNA は、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて rRNA 混入率を測定した。mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、GS Junior を用いてシーケンスした。得られた配列は、De novo

4-2. 薬剤処置後の雌蚊頭部の DA・OA 量

Control 群において雌蚊頭部の DA 量は、羽化後 0 日目に高く、その後減少した (day 0: 26.5 ± 2.5 ; day 3: 3.7 ± 0.4 ; day 6: 1.9 ± 0.2 pmol/head)。これに対し、DA 群の DA 量は、Control 群のような減少が見られず、羽化後 3 日目と 6 日目で有意に増加した (day 0: 25.3 ± 2.4 ; day 3: 21.9 ± 6.2 ; day 6: 23.3 ± 4.5 pmol/head)。OA 群の DA 量は、Control 群と同様に羽化後減少し、Control 群と有意な差は見られなかった (day 0: 28.9 ± 1.8 ; day 3: 4.0 ± 0.7 ; day 6: 2.0 ± 0.4 pmol/head、図 3)。次に、雌蚊頭部の OA 量を測定した結果、Control 群と DA 群の OA 量は、羽化後増加する傾向がみられた (Control 群: day 0: 0.29 ± 0.03 ; day 3: 0.75 ± 0.06 ; day 6: 0.86 ± 0.07 pmol/head、DA 群: day 0: 0.32 ± 0.02 ; day 3: 0.60 ± 0.06 ; day 6: 0.73 ± 0.05 pmol/head)。OA 群の OA 量は、Control 群と比べて羽化後 3 日目と 6 日目に有意に増加した (day 0: 0.34 ± 0.03 ; day 3: 61.96 ± 23.34 ; day 6: 102.27 ± 28.52 pmol/head、図 3)。以上のことから、L-DOPA を処置した DA 群でのみ DA 量が増加すること、OA を処置した OA 群でのみ、OA 量が増加することが示唆された。

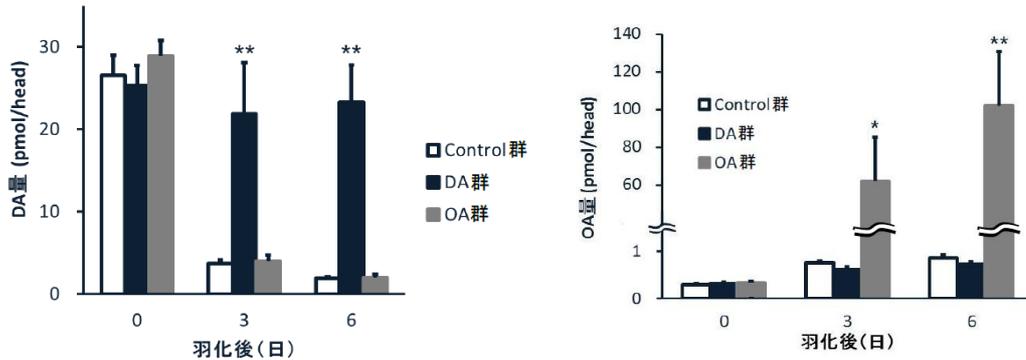


図 3. 薬剤処置後の雌蚊頭部の DA・OA 量

4-3. DA と OA が宿主探索行動に及ぼす影響

Control 群において、雌蚊の宿主探索行動は、羽化後徐々に増加した (Control 群 (vs DA 群): day 0: $0.0 \pm 0.0\%$; day 1: $4.9 \pm 2.6\%$; day 2: $17.2 \pm 3.9\%$; day 3: $25.5 \pm 3.6\%$; day 4: $23.5 \pm 3.9\%$; day 5: $27.1 \pm 3.1\%$; day 6: $35.7 \pm 2.6\%$ 、Control 群 (vs OA 群): day 0: $0.2 \pm 0.2\%$; day 1: $3.2 \pm 1.1\%$; day 2: $16.0 \pm 3.9\%$; day 3: $22.3 \pm 4.1\%$; day 4: $26.4 \pm 1.7\%$; day 5: $35.1 \pm 2.3\%$; day 6: $32.5 \pm 4.0\%$)。これに対し、DA 群と OA 群の宿主探索行動は、Control 群のような増加が見られず、結果として、羽化後 3 日目から 6 日目に有意に減少した (DA 群: day 0: $0.8 \pm 0.4\%$; day 1: $3.7 \pm 1.4\%$; day 2: $10.7 \pm 3.3\%$; day 3: $13.0 \pm 1.8\%$; day 4: $15.1 \pm 3.4\%$; day 5: $16.1 \pm 2.6\%$; day 6: $13.9 \pm 5.1\%$ 、OA 群: day 0: $0.0 \pm 0.0\%$; day 1: $3.9 \pm 1.9\%$; day 2: $13.8 \pm 2.4\%$; day 3: $13.8 \pm 1.7\%$; day 4: $16.2 \pm 2.6\%$; day 5: $14.9 \pm 1.5\%$; day 6: $14.0 \pm 3.6\%$ 、図 4)。以上のことから、DA と OA は雌蚊の宿主探索行動の制御することが示唆された。

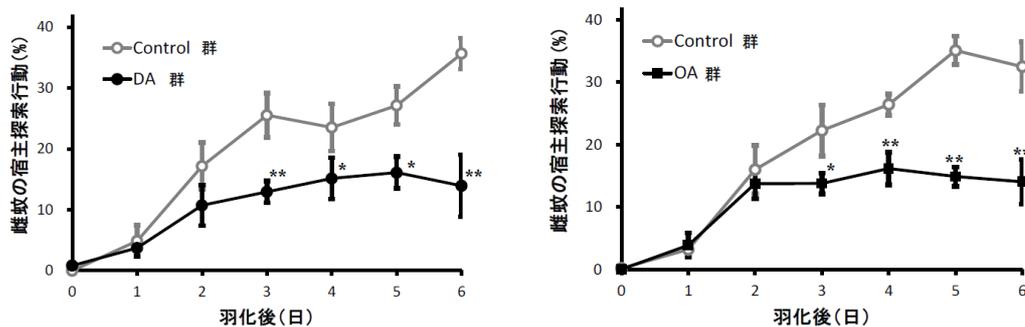


図 4. DA と OA が雌蚊の宿主探索行動に与える影響

3-7. 次世代シーケンサーGS junior を用いたシーケンス

幼虫、蛹、成虫の各ステージのヒトスジシマカの mRNA を回収し、調製した mRNA より、cDNA ライブラリーを作製した。そして、GS junior (Roche 社) を用いて配列の決定を行った。その結果、幼虫、蛹、成虫より 18,119 個、356,511 個、407,511 個の配列が得られた。これら配列を用いてコンティグ配列を作成したところ、幼虫、蛹、成虫より 786 個、12,503 個、17,703 個の配列が得られた。コンティグ配列に対する blast 検索は、80%以上の配列がヒトスジシマカ由来の配列であることを示された。また、幼虫、蛹、成虫の 5.2%、17.2%、14.3%の配列

がヒトスジシマカで検出されていない、もしくは、機能未知の遺伝子であることが示された(図5)。このコンティグ配列を用いて、ヒトスジシマカ DNA マイクロアレイを作製した。

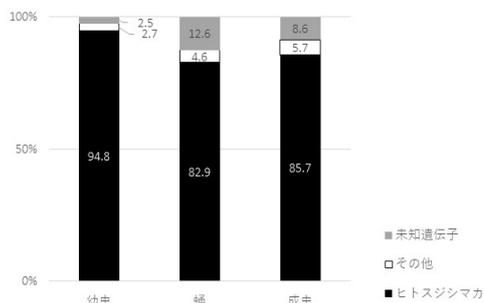


図 5. 蚊の幼虫、蛹、成虫で発現している遺伝子の解析

今後、本研究成果を応用して、蚊に特異的な宿主探索行動に関連する遺伝子を解明し、宿主探索行動を抑制するツールを創出できることが期待された。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

Tomomitsu Satho, Yuki Fukumitsu, Keiichi Irie, Yukihiro Nakashima, Change on mRNA Expression in Growth Process of Adult Female *Aedes albopictus*. Joint International Tropical Medicine Meeting 2015 (Bangkok, Thailand, 2015 年 12 月)

福光由起、佐藤朝光、入江圭一、上田紗織、百武美香、弟子丸正伸、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、ヒトスジシマカマイクロアレイを用いた宿主探索行動を制御する遺伝子の調査、日本昆虫学会第 76 回大会 / 第 60 回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会(大阪府堺市 2016 年 3 月 26-29 日)

佐藤朝光、入江圭一、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、ヒトスジシマカから単離された新しい *Enterococcus* 属細菌について、第 70 回日本寄生虫学会南日本支部大会、第 67 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会(2017 年 11 月 4 日 - 5 日)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大塚 靖

ローマ字氏名: Yasushi Otsuka

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 総合科学域総合研究学系

職名: 准教授

研究者番号: 00244161

(2) 研究分担者

研究分担者氏名: 見明 史雄

ローマ字氏名: Fumio Miake

所属研究機関名: 福岡大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50248522

(3) 研究分担者

研究分担者氏名: 入江 圭一

ローマ字氏名: Keiichi Irie

所属研究機関名: 福岡大学

部局名: 薬学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 50509669

(4) 研究分担者

研究分担者氏名: 佐野 和憲

ローマ字氏名: Kazunori Sano

所属研究機関名: 福岡大学

部局名: 薬学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50534343

(5) 研究分担者

研究分担者氏名: 鹿志毛 信広

ローマ字氏名: Nobuhiro Kashige

所属研究機関名: 福岡大学部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80185751