

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15852

研究課題名(和文) 病原体媒介蚊における吸血前後の行動シフトを司る分子基盤の解明

研究課題名(英文) Dissecting the molecular mechanism of blood sucking behavior of mosquitoes

研究代表者

佐久間 知佐子 (Sakuma, Chisako)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10747017

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)：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。宿主の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ATP受容体候補として働く味覚受容体を明らかにした。また、吸血を負に制御する成分が宿主の血液内に存在することも発見した。加えて、吸血行動を解析するための人工吸血法を改良した。

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。また人工吸血における簡易定量法を開発したことにより、生きたままの蚊で吸血量や割合を定量できるようになったことは、吸血研究の推進に重要である。

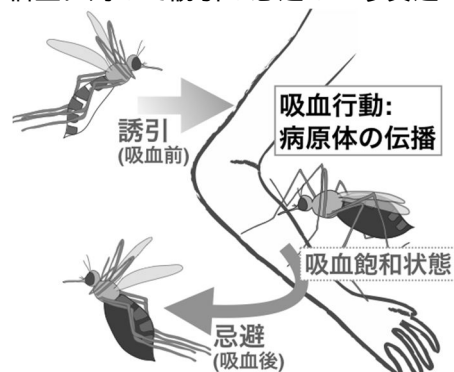
研究成果の概要(英文)：Exploring the molecular mechanism of blood sucking behavior of female mosquitoes is one of the critical steps to fight against vector-borne diseases such as dengue and malaria, since pathogens are transmitted when mosquitoes are gorging on blood. In this study, we tried to identify the receptor for adenine nucleotides in blood that serve as phagostimulants for blood sucking, and identified one gustatory receptor (Gr) is required for the perception of adenosine triphosphate (ATP). During this analysis, we established an easy-to-use method to estimate the amount of solution ingested by mosquitoes by employing the food dye in membrane 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

## 1. 研究開始当初の背景

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。これら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る。吸血行動は寄生虫やウイルス、細菌の効率的な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宿主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、吸血前に宿主へ誘引される機構の研究は盛んである一方で、吸血・吸血飽和状態の感知・吸血後の標的忌避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。また誘引機構に関して、宿主が発する熱・二酸化炭素・匂いが大きな役割を果たすことは解明されている(Wang et al., *Eur J Neurosci.* (2009), Lu et al., *Current Biology* (2007), McBride et al., *Nature* (2014)など)が、嗅覚機能を失った蚊や二酸化炭素の認識が不可能な蚊も、標的を認識できる(DeGennaro et al., *Cell*(2014)など)ことから、これらの要素の相乗効果が示唆されている(McMeniman et al., *Nature* (2013))。このため、現段階では宿主に寄らない蚊を人為的に作出することは困難である。



[行動シフト] 蚊は同じ吸血標的に対して吸血前後で真逆の行動を示す。

## 2. 研究の目的

本研究では、吸血前後における蚊行動シフトの分子基盤の解明を目指す。従来の標的認識機構(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。

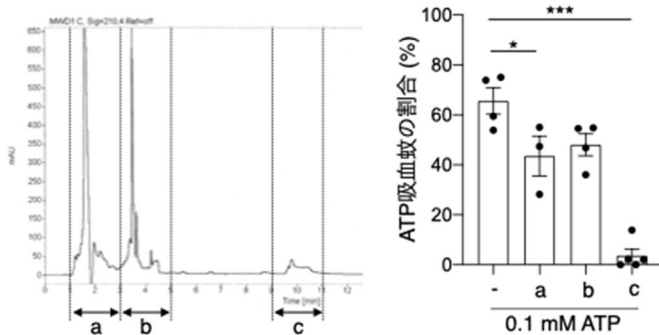
## 3. 研究の方法

- (1) 非吸血性のオスに比して、吸血性のメスの口吻先端で発現の高い味覚受容体(Gr)である Gr5 の変異体作製および機能解析(宿主への誘引アッセイ・人工吸血法およびビデオ撮影による吸血行動の解析)  
吸血率や吸血量を簡便に定量するために、人工吸血法で色素を活用する手法を樹立した
- (2) 吸血停止もしくは抑制を導く血液成分の同定: 宿主血液の画分や LC-MS/MS などによる、吸血促進物質であるアデノシン三リン酸(ATP)の働きを抑制する因子の探索

## 4. 研究成果

- (1) CRISPR/Cas9 法による遺伝子編集で、Gr5 の機能欠損ネッタイシマカを作製した。Gr5 機能欠損ネッタイシマカは宿主へと正常に誘引されるが、その後に引き続く吸血において異常を示し、一定時間を過ぎても吸血を行わない個体が多く観察された。人工吸血法において、血液および ATP 緩衝液を呈示したところ、(擬似)吸血率が顕著に減少した。さらに、ATP の人工吸血実験において、蚊が膜に口針を挿し込み ATP を取り込む様子を高解像度でイメージングしたところ、膜の中に口針を挿入している時間が顕著に長くなっており、味見をしているものの吸血ができない、もしくは異常な時間を要することが明らかとなった。以上より、Gr5 は ATP の受容に貢献していることが示唆された。また、Gr5 のアミノ酸配列を解析したところ、糖を受容する Gr のグループに属しているものの、ショウジョウバエには相同体がなく、他の糖 Gr とは相同性がやや低い傾向にあった。以上より、Gr5 は ATP 受容のために、糖 Gr から派生した Gr の可能性が示唆された。尚、吸血率や吸血量を簡便に定量するために、人工吸血法において無味の食用色素を活用する手法を確立し、論文発表した。

(2) 吸血標的の赤血球由来の **ATP** が重要であることは古くから知られていたが、吸血における血清の働きは着目されていなかった。血清に **ATP** を添加させたものを蚊に擬似吸血させたところ、**ATP** のみの場合に比較して、吸血割合・量が共に減少していることが判明したため、血清中に吸血抑制活性を持つ因子があることが示唆された。この吸血抑制効果は、複数の動物種の血清で確認されたことから、血清に普遍的に吸血抑制因子が存在すると考えられる。血清を煮沸した後に遠心分離して得た上清でも吸血抑制活性があったことから、非タンパク質性の因子であることが予想された。そこで、煮沸血清上清を **HPLC** で分画し、各々の画分を **ATP** に添加して吸血抑制効果を検討した。その結果、一つの画分が顕著な吸血抑制効果を示した。**LC-MS/MS** でこの画分の主成分を同定したところ、ペプチドであることが明らかとなった。このペプチドは哺乳類などの間で広く高度に保存されている分子である。



吸血促進因子であるATPに、HPLC画分a-cを加えると画分cに吸血抑制活性があることが明らかになった。

本研究結果から、蚊は宿主血液に含まれる吸血を促進するシグナルに加え、吸血を抑制するシグナルも感知していることが明らかになった。文脈に応じてそれぞれのシグナルの利用することで、吸血の開始と停止という真逆の行動を起こしていることが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakuma Chisako, Kanuka Hirotaka	4. 巻 49
2. 論文標題 A simple and affordable method for estimating the fluid volume a mosquito sucks using food dyes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-021-00302-6	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chisako Sakuma, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Dual-mode regulation of blood sucking behavior in mosquito
3. 学会等名 分子生物学会 第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間知佐子、嘉糠洋陸
2. 発表標題 蚊の吸血を正に制御する味覚受容体Gr5の機能解析
3. 学会等名 第65回応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chisako Sakuma, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Dissecting the function of TRPL in blood sucking behavior of <i>Aedes aegypti</i>
3. 学会等名 第7回アフリカ開発会議（TICAD7）公式プレイベント、ICREP-NTDs 国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chisako Sakuma, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 The role of Transient-receptor-potential-like (TRPL) in blood sucking behavior of Aedes aegypti
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間知佐子、嘉糠洋陸
2. 発表標題 蚊の吸血を正と負に制御する味覚受容機構の解明
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020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