

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21532

研究課題名（和文）デング・ジカウイルス媒介蚊の越冬戦略の分子基盤

研究課題名（英文）Dissecting molecular mechanism of diapause egg formation in dengue vector mosquito

研究代表者

嘉糠 洋陸（Kanuka, Hirotaka）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトスジシマカの越冬卵形成能力は、温暖な地域に生息する温帯系統だけが獲得した形質であり、東南アジア等に生息している熱帯系統は越冬卵を作ることが出来ない。本研究課題において、遺伝的背景が異なる温帯系統と熱帯系統を比較し、ヒトスジシマカの越冬戦略の背景にある分子メカニズムをRNAseqおよびゲノム編集により解析したところ、概日リズム制御遺伝子、乾燥関連遺伝子、神経ペプチド遺伝子等の関与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

越冬戦略は、生物のニッチ獲得に非常に重要である。哺乳類の冬眠も含めて、生物の越冬についての研究は途上である。研究代表者らの研究を通して、ヒトスジシマカの越冬戦略を遺伝子レベルで解明することは、生物一般の越冬メカニズムを理解するための突破口となることが期待される。加えて、越冬卵形成に関与する分子を標的にした越冬阻害剤の開発等、従来とは異なる病原体媒介蚊制御のための基盤となる可能性がある。

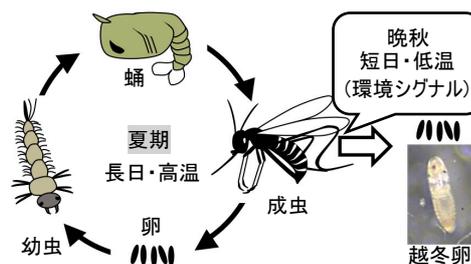
研究成果の概要（英文）：Temperate strains of *Aedes albopictus* that inhabit warmer regions can form overwintering eggs. On the other hand, tropical strains inhabiting Southeast Asia cannot produce overwintering eggs. In this research project, the molecular mechanisms underlying the overwintering strategy of *Aedes albopictus* were analyzed by RNAseq and genome editing by comparing temperate and tropical strains, which have different genetic backgrounds. The results suggest circadian rhythm-regulated genes, desiccation-related genes, and neuropeptide genes may be involved in overwintering egg formation.

研究分野：衛生動物学

キーワード：越冬 蚊 越冬卵 ヤブカ ヒトスジシマカ

1. 研究開始当初の背景

ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) は、様々な病原体を媒介するヤブカの一種であり、アジアに広く生息する。東南アジアなどの熱帯地域に棲むヒトスジシマカは1年を通して卵から成虫までの生活環を繰り返す。一方で、日本など温帯地域に棲む同種は、晩秋に越冬卵を形成することで生存に厳しい冬を生き延び、翌年の初夏に孵化する。興味深いことに、越冬卵形成能力は温帯地域に生息圏を広めた温帯系統だけが獲得した形質であり、東南アジアに生息している熱帯系統は有していない。現在、この越冬卵形成能力をもつ



温帯系統ヒトスジシマカが世界中で分布域を拡大しており、デング熱やジカ熱の原因となるウイルスのベクター (媒介者) として問題となっている。

一部の動物は、越冬する。動物の越冬方法のひとつとして、リスやクマが低代謝状態に入る冬眠がよく知られている。一方で、ヒトスジシマカの越冬方法はそれとは異なる。ヒトスジシマカは夏期には卵から成虫までの生活環を繰り返すが、晩秋の頃に孵化したメスは次の初夏まで孵化しない越冬卵を産む (右図)。越冬卵では、その内部で胚から一齢幼虫にまで発生が進行するが、そこで個体は一旦発育を停止する。越冬卵内の幼虫は通常卵よりも強固な低温・乾燥・飢餓耐性をもち、一時的に生育に適した環境になっても孵化しない。極めて興味深いことに、越冬卵形成能力は、温帯地域に生息するヒトスジシマカ系統だけが獲得した形質である。

現在、ヒトスジシマカは世界で急速にその分布域を拡大している。ヒトスジシマカは、デング・ジカウイルス等の病原体を媒介し、感染症の流行に寄与する危険性をもっている。対策として殺虫剤および殺虫剤塗布型の蚊帳の使用が第一義に行われているが、抵抗性をもつ個体の出現のために分布拡大の防波堤としては不十分であり、従来とは異なるヒトスジシマカ制御のための基盤開発が急務である。

2. 研究の目的

ヒトスジシマカの大規模な分布拡大の背景には、ヒトスジシマカが獲得した越冬卵形成能力がある。これまで越冬卵における遺伝子発現解析が行われ、代謝および細胞周期に関わる遺伝子が越冬卵形成に寄与していることが示唆されている。しかし、分子レベルでのメカニズムの全容解明には至っていない。

そこで、研究代表者らはヒトスジシマカ系統間の差異に着目した。ヒトスジシマカの越冬卵形成能力は、日本など温暖な地域に生息する温帯系統だけが獲得した形質であり、一方で、東南アジアに生息している熱帯系統は越冬卵を作ることが出来ない。そこで本研究課題では、遺伝的背景が異なるこれら2系統を比較し、ヒトスジシマカの越冬戦略の背景にある遺伝的メカニズムの解明を試みた。同時に、奄美・トカラ列島におけるヒトスジシマカ個体群の越冬卵形成能力を調査し、得られた知見が自然界で実際に起こった進化プロセスに適合するか検証した。これらの成果により、越冬卵形成に関与する分子を標的とした越冬阻害剤の開発など、ヒトスジシマカの越冬阻止による駆除・分布拡大防止に資する知見を蓄積することを目指した。

3. 研究の方法

越冬卵の特徴は、親個体が日長・気温をシグナルとして認識することによって越冬卵を形成し、越冬卵内の幼虫は孵化せずに冬の低温・乾燥・飢餓に耐え、次の初夏になると気温・日長の変化などによって孵化が促進されるという3つに分けられる。これらに対応して、それぞれ以下の方法で研究を実施した。

(1) 越冬卵形成と光周性の関係の検証

生物の光周期に対する応答 (光周性) には時計遺伝子群が関与していることがわかっている。研究代表者らは、ヒトスジシマカの越冬卵形成に時計遺伝子群が関連している可能性を考えた。概日リズム発振の主軸となる *cryptochrome (cry)*、*period (per)*、*timeless (tim)* の3つの遺伝子に着目し、ヒトスジシマカ温帯系統を対象に、CRISPR/Cas9 システムによりこれら時計遺伝子のノックアウト (KO) システムを作出した。これらの KO システムを用いて時計遺伝子と越冬卵形成能力の関連を検証した。

(2) 越冬卵形成に関与する遺伝子群の探索

RNA-seq によって温帯系統の越冬卵と熱帯系統の卵 (= 非越冬卵) における胚発生過程の経時的かつ網羅的な遺伝子発現変化を比較した。越冬卵形成能と相関があることが想定される候補遺伝子について、ヒトスジシマカ温帯系統を用いてこれらの遺伝子の KO システムを作出し、越冬卵形

成との相互作用について、検証を試みた。

(3) 越冬卵形成能力の地域性

奄美・トカラ列島におけるヒトスジシマカ個体群の越冬卵形成能を調べる目的で、台湾の190 km 東に位置する西表島でヒトスジシマカの採集を行った。家屋や墓地などにある溜水に生息する幼虫(ボウフラ)を採取し、研究室で飼育して系統化した。それらの系統を越冬条件下で飼育し、産卵させた際の孵化率を調べた。

4. 研究成果

研究代表者らは、マレーシアと日本(広島)でそれぞれ採取されたヒトスジシマカ系統について、短日・低温条件下で飼育後に産卵させ、それらの孵化率を調べた。その結果、マレーシア系統の卵は82%が孵化した。一方で、日本由来系統の卵では1%未満であったことから、越冬卵の形成が確認された。よって、前者はヒトスジシマカの熱帯系統、後者は温帯系統であることが示された(図1)。以下の研究では、この2系統を用いた。

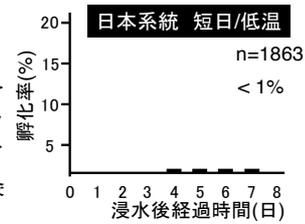


図1 越冬条件下における孵化率の比較

(1) 越冬卵形成と光周性の関係の検証

越冬卵の形成は親個体が短日・低温下で成長することで誘導される。光周期に対する応答(光周性)には概日リズムを司る時計遺伝子群が関与している。多くの昆虫種で、*cryptochrome* (*cry*)、*timeless* (*tim*)、*period* (*per*)の3遺伝子が基盤となって明暗周期に則した遺伝子発現の振動が生み出されているため、研究代表者らは、これら時計遺伝子の振動が日長の感知及び越冬卵形成に関与していると考えた。そこでCRISPR/Cas9システムによって、ヒトスジシマカ温帯系統の時計遺伝子(KO)系統を作出した。*per* KO系統を通常条件と越冬条件とで飼育した後産卵させた卵の孵化率を調べたところ、通常条件・越冬条件共に孵化率の著しい低下が見られた(図2)。*per*は越冬卵の形成よりも、孵化行動の誘起に関連していることが示唆された。

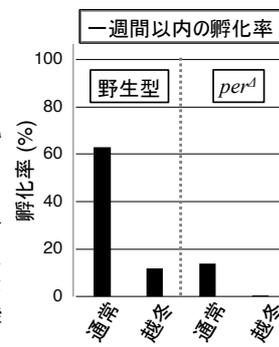


図2 per KO 系統における孵化率の低下

(2) 越冬卵形成に関与する遺伝子群の探索

昆虫の生活史において重要なイベントである脱皮・蛹化のタイミングは神経ペプチドによって調整されている。それゆえ、孵化行動の開始も神経ペプチドによる誘導の可能性がある。研究代表者らは上述のRNA-seqの結果から、非越冬卵で孵化行動が開始される際に発現量の上昇が見られる神経ペプチドを探索した。その結果、温帯系統の越冬卵と比べて熱帯系統の非越冬卵において著しく発現量が上昇していた神経ペプチドは*Capability*(*Capa*)遺伝子のみであることが見出された(図3)。

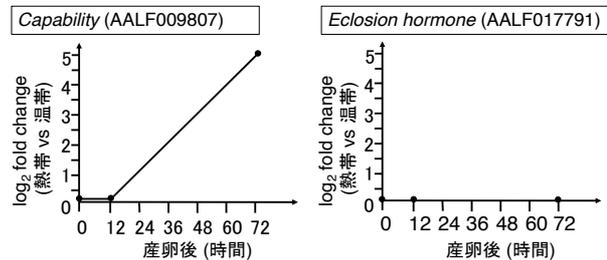


図3 胚発生過程における神経ペプチドの発現量比較例

加えて、ストレス耐性に関与すると考えられる複数の候補遺伝子が発見された。キイロシヨウジョウバエにおいて乾燥ストレスに応答して発現する*Desiccate*(*Desi*)のヒトスジシマカオースログ(AALF012529)の発現量が、温帯系統において顕著に低下していることが明らかになった。

(3) 越冬卵形成能力の地域性

研究代表者らは2017年7月に台湾の190 km 東に位置する西表島でヒトスジシマカの採取を行った。まず、現地にて屋外に放置されたバケツや花瓶に溜まった水から幼虫を採取した。次に、研究室で成虫まで飼育し、2系統が形態的・遺伝的(ミトコンドリアCOI遺伝子を利用)にヒトスジシマカであると同定した。次いで、それらの系統を越冬条件下で飼育後、産卵させた際の孵化率を調べた。その結果、累積孵化率はそれぞれ64%と63%であった(図4)。以上から、西表島のヒトスジシマカ集団の遺伝的背景は熱帯系統だと考えられた。

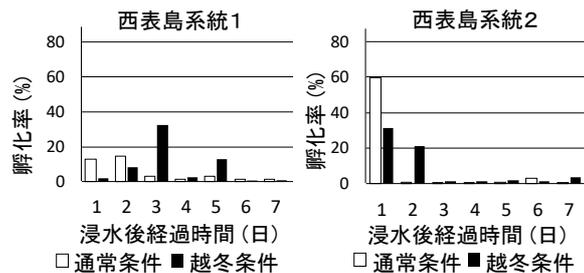


図4 西表島ヒトスジシマカの孵化率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高柳咲乃、岡本直樹、山中直岐、嘉糠洋陸 |
| 2. 発表標題 Dissecting the molecular mechanism of diapause egg formation in Asian tiger mosquito, <i>Aedes albopictus</i> |
| 3. 学会等名 第42回日本比較生理生化学会 |
| 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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 高柳 咲乃 (Takayanagi Sakino) (10794266) | 東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651) | |

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 |
|---------|---------|