

氏 名 かーる ゆき  
**カール 由起**

学位の種類 博士（薬学）

報告番号 甲第 1615 号

学位授与の日付 平成 28 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

**蚊媒介性感染症の予防に向けた雌蚊の宿主探索行動に関する研究**

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	見明 史雄
（副査）	福岡大学	教授	鹿志毛 信広
	福岡大学	准教授	松末 公彦

本研究は、“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。ツールの標的は、蚊に特異的なタンパク質を想定している。しかし、宿主探索行動の制御機構は不明な点が多く、標的となるタンパク質を選定できない。ドパミン（DA）やオクトパミン（OA）等の生体アミンは、神経伝達物質として昆虫の生理現象を調節する<sup>1,2</sup>。そこで、制御機構の解明にむけ、DAとOAに着目した。本研究はDAとOAが宿主探索行動に及ぼす影響を検討した。次いで、それらが宿主探索行動を制御する際に、発現量が変動する遺伝子を確認し、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査した。

## 第1章 DAとOAが宿主探索行動へ及ぼす影響

DAとOAが雌蚊の宿主探索行動に関与することを明らかにするため、頭部DA量とOA量を増加させ宿主探索行動の変化を観察した。

はじめに、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を用いて、L-β-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) またはOAを処置した雌蚊においてDAとOA量が増加することを確認した。次いで、DAとOA量の増加が宿主探索行動へ及ぼす影響を検討した。さらに、雌蚊の宿主探索行動は、交尾や餌の摂取によって影響を受けることから<sup>3</sup>、DAとOA量の増加が交尾率と餌摂取量へ及ぼす影響を検討した。

DAとOA量を測定した結果、薬剤未処置の群（以下Control群）と比較して、L-DOPAを処置した群（以下DA群）でのみDA量が有意に増加すること、OAを処置した群（以下OA群）でのみOA量が有意に増加することを明らかにした（Fig. 1A、1B）。次に、宿主探索行動を測定した結果、Control群は、羽化後0日目から6日目にかけて徐々に増加した。一方、DA群とOA群の宿主探索行動はControl群と比較して羽化後3日目から6日目にかけて有意に減少することを明らかにした（Fig. 1C、1D）。さらに、雌蚊の交尾率と餌摂取量を確認した結果、DA群とOA群の交尾率と餌摂取量はControl群と比較して有意な差はなかった（Fig. 1E、1F）。

以上の結果は、DAとOAの2つの生体アミンが、雌蚊の交尾と餌の摂取に影響を及ぼすことなく、雌蚊の宿主探索行動を制御することを示している。この研究成果は、引用文献4で報告した。さらに、この結果は、宿主探索行動を行う群（薬剤未処置の羽化後6日目の群；以下Control群）と宿主探索行動をしないかあるいは減少した群（薬剤未処置の羽化後0日目の群（以下Newly emerged adult; NEA群）、DA群、OA群）という、宿主探索行動における表現型が異なる群を作製できることを示している。そこで、続く第2章では、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査するため、これら4つの群を用いて、宿主探索行動にあわせて発現量が増減する遺伝子を確認した。

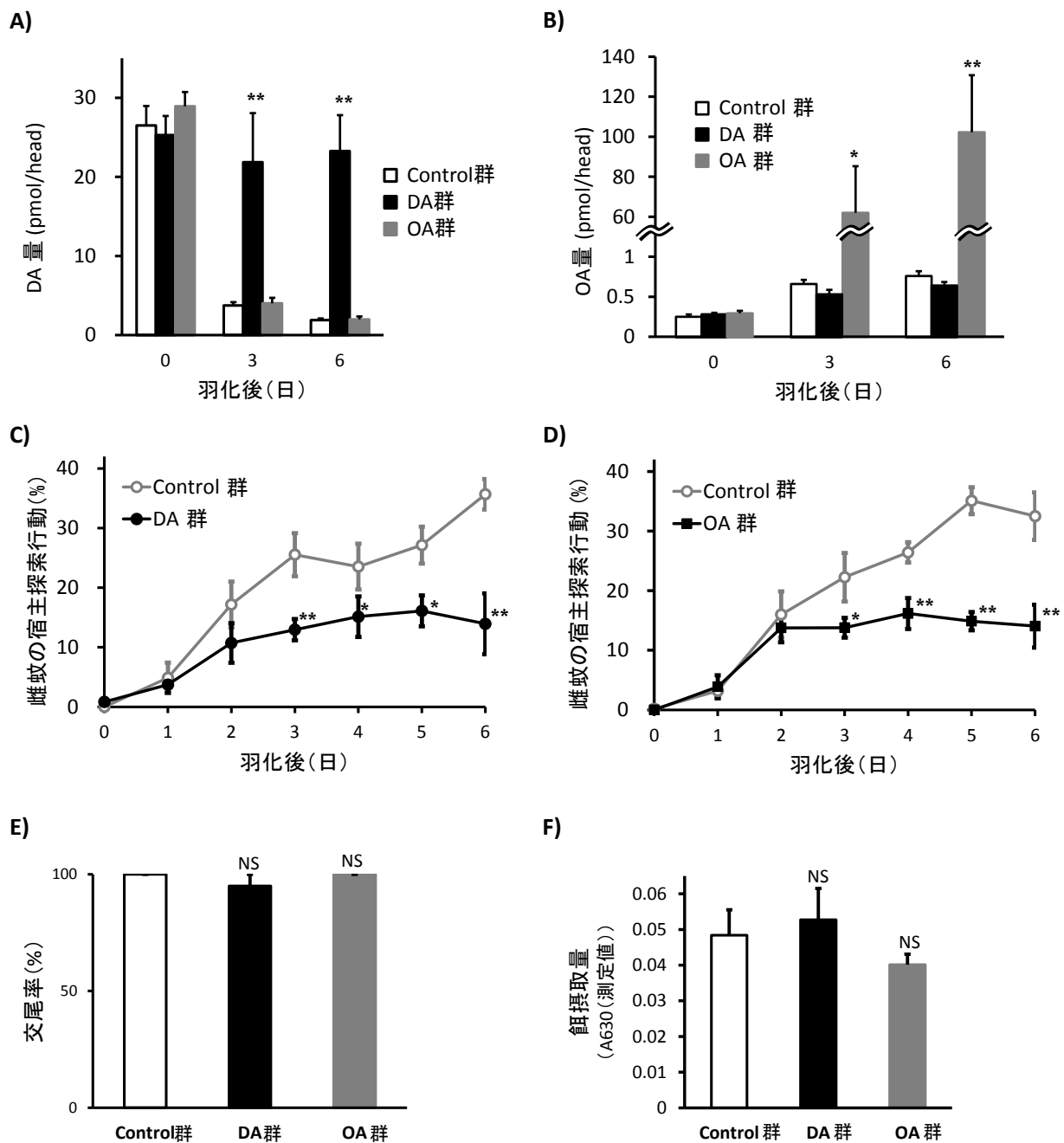


Fig. 1 DAとOAが宿主探索行動へ及ぼす影響

A) DA 量の測定、B) OA量の測定

Two-way ANOVA followed by Student's *t*-test \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (vs Control群)

C) DA 量の増加が宿主探索行動へ与える影響、D) OA量の増加が宿主探索行動へ与える影響

Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (vs Control群)

E) DA量の増加とOA量の増加が雌蚊の交尾へ及ぼす影響

F) DA量の増加とOA量の増加が雌蚊の餌摂取量へ及ぼす影響

One-way ANOVA, <sup>NS</sup> $P > 0.05$  (vs Control 群)

## 第2章 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

ヒトスジシマカマイクロアレイを用いて宿主探索行動にあわせて発現量が増減する遺伝子を確認した。

ネッタイシマカとガンビエハマダラカは、全ゲノム塩基配列が決定され、その後のゲノム解析によって、利用できる転写産物の塩基配列情報は充実している<sup>5</sup>。そして、その情報を基に多数のマイクロアレイが作製されている。近年、ヒトスジシマカにおいて、全ゲノム塩基配列が決定された<sup>6</sup>。しかしながら、利用できるヒトスジシマカ転写産物の情報は限られており、ヒトスジシマカに対応したマイクロアレイは未だ実用化されていない。そこで、本章では、まず、ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースを構築した。データベースの塩基配列は、次世代シーケンサーを用いるほか、PCRダイレクトシーケンス、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) からのダウンロードによって取得した。取得した塩基配列からマイクロアレイ作製に用いるヒトスジシマカ塩基配列群 *Aedes albopictus* Fukuoka version 1.0 (AalbF1.0) を選出した。その後、AalbF1.0 について、blastn 及び tblastx プログラムによる相同性解析を行った。このとき、データベースは、ヒトスジシマカ、ネッタイシマカ、ネッタイエカ、ガンビエハマダラカ、ショウジョウバエのゲノムおよび転写産物を用いた。さらに、次世代シーケンサーで取得したリードを AalbF1.0 の各配列にマッピングし、宿主探索行動を行わない幼虫、蛹、雌成虫羽化後 0 日目と、宿主探索行動を行う雌成虫羽化後 6 日目で発現量が増減する遺伝子を調査した。これら相同性解析および遺伝子発現解析の結果を AalbF1.0 の各配列に付加し、ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベース Expressed sequence tags *Aedes albopictus* Fukuoka version 1.0 (以下 ESTs (AalbF1.0)) を構築した。次に、ESTs (AalbF1.0) を基にヒトスジシマカマイクロアレイを作製し、第1章で作製した宿主探索行動をする群 (Control 群) と、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群 (NEA 群、DA 群、OA 群) で遺伝子の発現量を比較した。

次世代シーケンサーなどを用いて配列を取得した結果、22,335 個の転写産物の塩基配列からなる AalbF1.0 を得た。相同性解析の結果、AalbF1.0 は、1) ヒトスジシマカゲノムプロジェクトで報告のない転写産物の塩基配列 (AalbF1.0 に特徴的な塩基配列)、2) 蚊に特異的な塩基配列、3) 多様な遺伝子由来の転写産物の塩基配列を有することを

Table 1. AalbF1.0の各配列の遺伝子の推定

遺伝子	配列数	AalbF1.0に特徴的な配列数
生体アミン	44	4
感覚器	121	10
概日リズム	29	6
免疫	339	22
代謝	668	54
分解・消化	255	12
酸化還元・ストレス応答	601	60
輸送	626	69
複製・転写・翻訳	597	75
細胞骨格・構造	372	34
リボソーム複合体	486	78
その他の機能	5571	798
機能未知	12507	5155
非タンパク質コード	119	65
計	22,335	6,442

明らかにした (Table 1、Fig. 2)。さらに、次世代シーケンサーで取得したリードを用いた遺伝子発現解析の結果、AalbF1.0 は、宿主探索行動にあわせて発現量が増減する転写産物の塩基配列、雌蚊に特徴的な挙動を示す転写産物の塩基配列を有することを明らかにした。以上の結果は、AalbF1.0 から構築した ESTs (AalbF1.0) が、宿主探

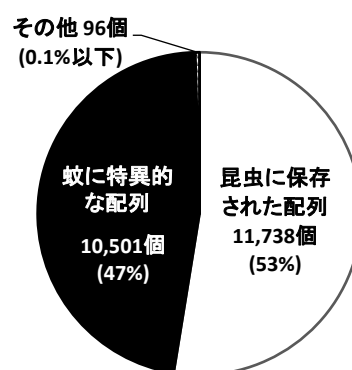


Fig. 2 AalbF1.0 における蚊に特異的な配列の割合

索行動を制御する遺伝子の候補を検出するためのマイクロアレイを作製する上で、有用なデータベースであることを示している。次に、ESTs (AalbF1.0) を基にヒトスジシマカマイクロアレイを作製した。そして、宿主探索行動をする群 (Control 群) と、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群 (NEA 群、DA 群、OA 群) で遺伝子の発現量を比較した。その結果、Control 群に比べて発現増加あるいは減少した転写産物数は、NEA 群が 427 個と 417 個、DA 群が 70 個と 393 個、OA 群が 94 個と 569 個であった (Fig. 3)。さらに、これら発現量に差がみられた遺伝子を NEA 群、DA 群、OA 群間で比較した。その結果、全ての群に共通して、1 個の転写産物の発現量が増加し、300 個の転写産物の発現量が減少していることが明らかとなった (Fig. 3)。これら 301 個の転写産物は、宿主探索行動に合わせて発現量が増減すること、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した NEA 群、DA 群、OA 群で挙動が一致していることより、宿主探索行動を制御する遺伝子を含むことが期待された。また、NEA 群、DA 群、OA 群で発現量が減少した 300 個の転写産物のうち 156 個は、蚊に特異的な転写産物だった。宿主探索行動を抑制するツールの標的は、蚊に特異的なタンパク質を想定している。したがって、これら転写産物のなかにツールの標的となる遺伝子が含まれていることが期待された。吸血後の雌蚊において、宿主探索行動は、減少することが報告されている<sup>7</sup>。興味深いことに、156 個の蚊に特異的な転写産物の中に、吸血後に発現量が減少する遺伝子が 6 個含まれた。この 6 個の遺伝子は、代謝関連遺伝子、分解・消化関連遺伝子、複製・転写・翻訳関連遺伝子、機能未知の遺伝子だった。これら遺伝子は、NEA 群、DA 群、OA 群だけでなく、吸血後の宿主探索行動が減少する時期においても発現量が減少する。従って、これら 6 個の遺伝子は、宿主探索行動を制御する遺伝子であることが強く示唆された。

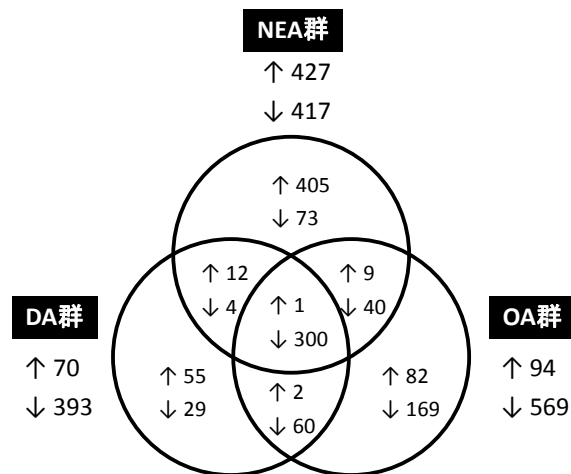


Fig. 3 Control群と比較して、発現量が増減した転写産物の数を示したベン図  
 ↑:発現量が増加した転写産物数、↓:発現量が減少した転写産物数を示す。

本研究は、宿主探索行動制御タンパク質を標的とした、新しい宿主探索行動を抑制するツールの創出を目指した。まず制御機構の解明にむけ、DAとOAに着目した。そして、DAとOAの2つの生体アミンが雌蚊の宿主探索行動を制御することを新たに示した。また、独自のヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースを構築し、ヒトスジシマカマイクロアレイを作製した。そして、マイクロアレイを用いてDAとOAが宿主探索行動を制御する際に発現量が増減する遺伝子の中から、宿主探索行動を制御する遺伝子の候補を選出した。さらに、その候補の中に、宿主探索行動を抑制するツールの標的となる蚊に特異的な遺伝子が含まれることを示した。

今後、これら遺伝子候補の中から宿主探索行動を制御する遺伝子を特定することが課題となるが、これら遺伝子候補の中に宿主探索行動への関与が報告されている遺伝子はなく、新たな宿主探索行動を制御する遺伝子の発見につながる事が予見された。また、蚊媒介性感染症の罹患リスクは、今後ますます増加することが予想される<sup>8</sup>。本研究で使用したヒトスジシマカは、南極を除く全ての大陸に生息することから、蚊媒介性感染症リスクの拡大に寄与する代表的な種であると考えられる<sup>9</sup>。本研究で構築した独自のヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースとヒトスジシマカマイクロアレイは、遺伝子発現解析の基盤として、今後のヒトスジシマカにおける分子生物学的な研究に貢献できることが期待された。

- 1 Roeder, T. Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**, 533-561 (1999).
- 2 Yamamoto, S. & Seto, E. S. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*:  
an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Experimental  
animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **63**, 107-119  
(2014).
- 3 Klowden, M. J. Endogenous factors regulating mosquito host-seeking  
behaviour. *Ciba Foundation symposium* **200**, 212-223 (1996).
- 4 Fukumitsu, Y. *et al.* Elevation of dopamine level reduces host-seeking  
activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors* **5**,  
92 (2012).
- 5 Giraldo-Calderon, G. I. *et al.* VectorBase: an updated bioinformatics resource  
for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases.  
*Nucleic acids research* **43**, D707-713 (2015).
- 6 Chen, X. G. *et al.* Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes  
albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America* **112**, E5907-E5915 (2015).
- 7 Takken, W. *et al.* Inhibition of host-seeking response and olfactory  
responsiveness in *Anopheles gambiae* following blood feeding. *Journal of  
insect physiology* **47**, 303-310 (2001).
- 8 WHO : *Fact sheet Dengue and severe dengue*  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>
- 9 Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical  
and veterinary entomology* **18**, 215-227 (2004).

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。これら感染症は、ウイルスを保有した雌蚊が吸血対象となる宿主を探索し（宿主探索行動）、吸血することで伝播する。

本論文は、蚊媒介性感染症を予防すべく、雌蚊に特徴的な行動である宿主探索行動に着目している。そして、その制御機構を解明するため、生体アミンであるドパミン（DA）とオクトパミン（OA）が宿主探索行動へ及ぼす影響について検討し、その知見に基づいて宿主探索行動を制御する遺伝子を調査している。

第1章では、雌蚊のDA量あるいはOA量を増加させ、宿主探索行動への影響を検討している。そして、DAとOAの2つの生体アミンが雌蚊の宿主探索行動を制御することを示している。さらに、雌蚊の宿主探索行動は、羽化後0日目から6日目にかけて増加すること、雌蚊のDAまたはOA量を増加させると、宿主探索行動が減少することを明らかにし、宿主探索行動をする群（羽化後6日目の群）と宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群（羽化後0日目の群、DA量またはOA量を増加した群）という、宿主探索行動における表現型が異なる4つの群を作製できることを示している。これら、研究成果は、国際学会で発表を行うほか、*Parasites & Vectors* 誌で論文発表を行っている。

第2章では、独自に構築したヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースを基にヒトスジシマカマイクロアレイを作製し、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査している。そして、構築したデータベースは、1) 蚊に特異的な配列を持つ転写産物、2) 多様な遺伝子種に由来する転写産物、3) ヒトスジシマカゲノムプロジェクトで報告のない転写産物の情報を有することを明らかにし、独自のデータベースが構築されたことを示している。続いて、このデータベースを基にヒトスジシマカマイクロアレイを作製し、第1章で作製した宿主探索行動をする群と、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群（羽化後0日目の群、DA量またはOA量を増加した群）で遺伝子の発現量を比較している。その結果、宿主探索行動を制御する遺伝子候補を選出している。

本論文は、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査し、その遺伝子に由来するタンパク質を標的とした宿主探索行動を抑制するツールの創出を目指している。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。現在、蚊媒介性感染症を予防するために使用されている忌避剤は、吸血対象となる宿主を作用点としている。これに対し、本論文は、蚊を作用点とした新しいツールの創出を目指しており、蚊媒介性感染症を予防する新たな戦略への展開が期待される。また、本論文は、独自性のあるヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースを構築し、ヒトスジシマカマイクロアレイを作製している。これらデータベースとマイクロアレイは、ヒトスジシマカにおける遺伝子発現解析の基盤となることが容易に予見され、今後のヒトスジ



シマカに関する研究に大いに貢献できることが期待される。

以上、本論文の結果は新しい知見を含み、学位論文として十分に評価できる。また、業績および公聴会における申請者の質疑応答は、博士（薬学）の学位を授与するのに適切な能力があると判定した。