

平成 27 年度 博士学位論文

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

指導教授
福岡大学大学院

見明 史雄
薬学研究科
薬学専攻

氏名

カール 由起
Yuki Carle

目次

目次	1
第1章 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響	2
緒言	2
第1節 薬剤処置による雌蚊の DA と OA 量の増加	4
第2節 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響	6
第3節 DA と OA が交尾と餌摂取量へ及ぼす影響	9
第4節 小括	11
第2章 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査	13
緒言	13
第1節 ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列の取得	14
第2節 マイクロアレイ作製に用いるヒトスジシマカ塩基配列の選出	20
第3節 ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースの構築とヒトスジシマカ マイクロアレイの作製	23
第4節 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査	31
第5節 小括	38
総括ならびに結論	40
実験の部	42
I. 実験材料	42
II. 実験方法	45
引用文献	69
謝辞	73

第 1 章 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響

緒言

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た。代表的な蚊媒介性感染症であるデング熱は、世界人口の約半数に罹患するリスクがあると言われている¹。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 (Figure 1)²。これは、1945 年以来初となる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) をはじめとした、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た³。これを機に、2010 年、我が国ではチクングニアウイルスによって引き起こされるチクングニア熱が、感染症法 4 類感染症に指定された。このように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。所属する福岡大学微生物薬品化学研究室は、これまで蚊媒介性ウイルス感染症に対する防疫の強化を目的として、ウイルスの早期検出を基盤とする監視体制の強化に尽力してきた^{4,7}。しかし、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、監視体制の強化にあわせて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く、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^{8,9}。雌蚊において、頭部 DA 量は羽化後徐々に減少する¹⁰。興味深いことに、この期間、宿主探索行動は増加する。よって、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。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¹¹。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予想した。

以上のことから、本研究では、まず 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、発現量に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。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。

本章は、DA と OA が宿主探索行動に及ぼす影響を検討した。

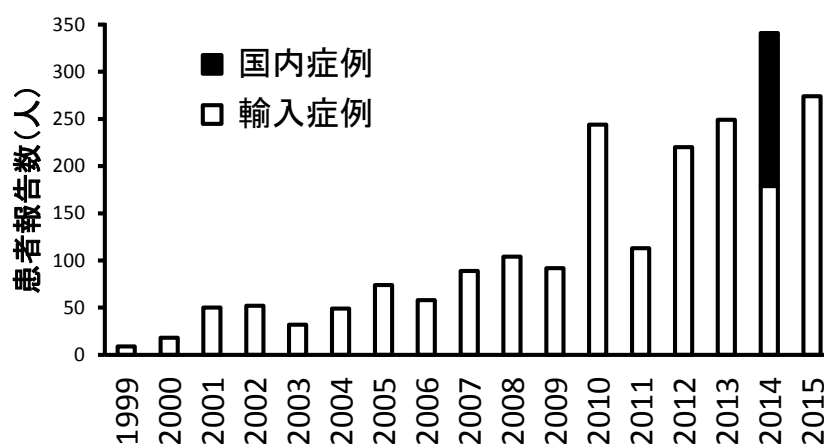


Figure 1. 日本におけるデング熱の患者報告数 (国立感染症研究所)

第1節 薬剤処置による雌蚊の DA と OA 量の増加

本章は、DA と OA が宿主探索行動に影響を及ぼすことを明らかにするため、雌蚊の DA と OA 量を増加させた。ショウジョウバエにおいて、DA の前駆体である L-8-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) を餌のスクロースに混ぜて与え、頭部 DA 量を増加させる方法がある¹²。今回、同様の方法を用いて羽化後の蚊に L-DOPA を与え DA 量の増加を試みた。一方、OA の前駆体であるチラミンは、昆虫において神経伝達物質として働く¹³。このため、前駆体であるチラミンではなく OA を直接与えた。本節は、予備実験（「実験の部 II. 実験方法 3. 薬剤処置による生存率への影響の検討」参照）で決定した 3.5mM L-DOPA と 30mM OA を雌蚊に処置し、雌蚊の DA および OA 量が増加することを確認した。

(a) 実験方法

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（以下 Control 群）、3.5mM L-DOPA（以下 DA 群）、30mM OA（以下 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（Table1）。各群は、12 サンプルずつ測定した。

(b) 実験結果

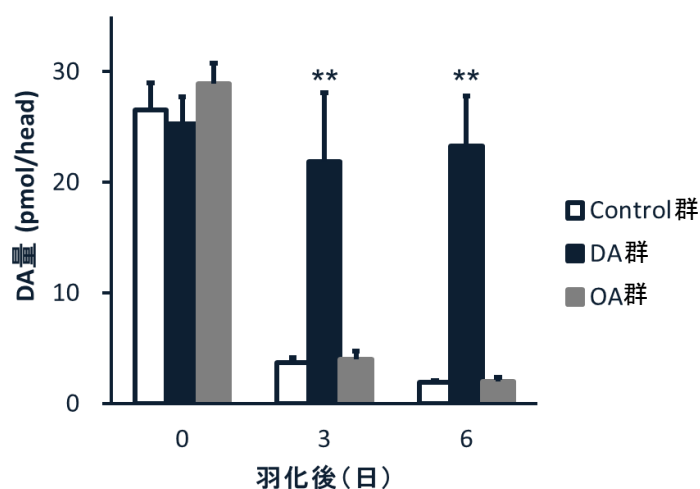
Control 群において雌蚊頭部の DA 量は、羽化後 0 日目に高く、その後減少した（day 0: 26.5 ± 2.5 ; day 3: 3.7 ± 0.4 ; day 6: 1.9 ± 0.2 pmol/head）。これに対し、DA 群の DA 量は、Control 群のような減少が見られず、羽化後 3 日目と 6 日目で有意に増加した（day 0: 25.3 ± 2.4 ; day 3: 21.9 ± 6.2 ; day 6: 23.3 ± 4.5 pmol/head）。OA 群の DA 量は、Control 群と同様に羽化後減少し、Control 群と有意な差は見られなかった（day 0: 28.9 ± 1.8 ; day 3: 4.0 ± 0.7 ; day 6: 2.0 ± 0.4 pmol/head、Figure 2A）。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、羽化後やや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、Figure 2B）。これは、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 量が増加することを示している。

Table 1. HPLC-ECD の測定条件

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°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)		

A)



B)

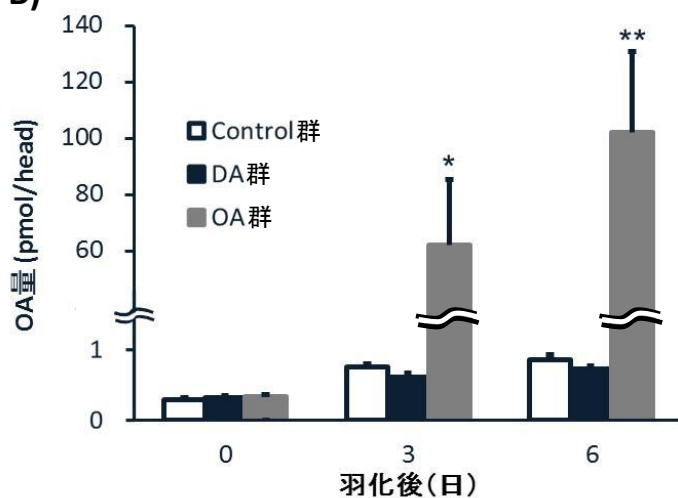


Figure 2. 薬剤処置による雌蚊のDAとOA量の増加
A) DA量の測定、B) OA量の測定
Two-way ANOVA followed by Student's *t*-test,
P* < 0.05, *P* < 0.01 (vs Control 群)

第2節 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響

前節までに、L-DOPA を処置した DA 群で DA 量が増加すること、OA を処置した OA 群で OA 量が増加することを明らかにした。本節では、この DA 群と OA 群における雌蚊の宿主探索行動の変化を観察した。

(a) 実験方法

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（以下 Control 群）、3.5mM L-DOPA（以下 DA 群）、30mM OA（以下 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（Figure 3A）。各群は、6 回繰り返し測定を行った。

(b) 実験結果

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 日目にかけて有意に減少した (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: $14.0 \pm 3.6\%$ 、Figure 3B、3C)。これは、DA と OA が雌蚊の宿主探索行動の制御に関与していることを示している。

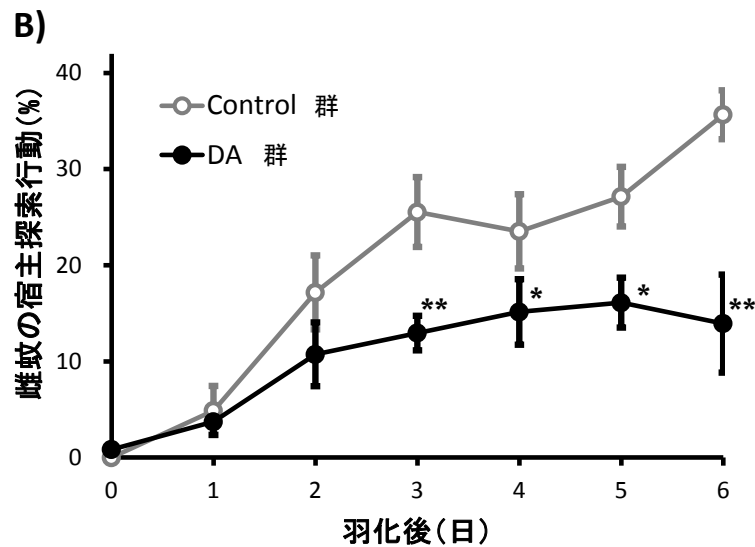
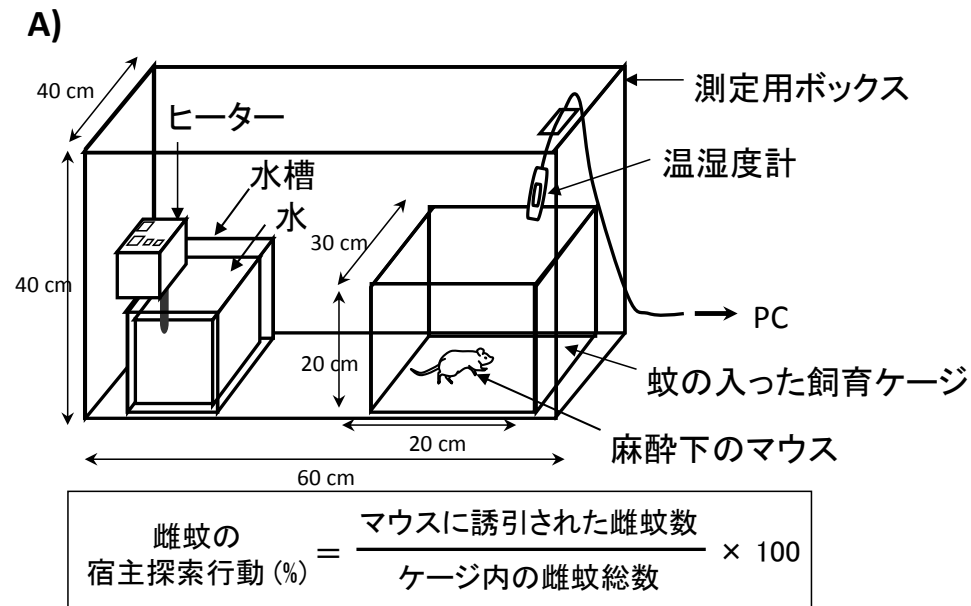


Figure 3. DAとOAが雌蚊の宿主探索行動へ及ぼす影響

A) 宿主探索行動の測定装置と計算式

B) DA 量の増加が宿主探索行動へ及ぼす影響

Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs Control 群)

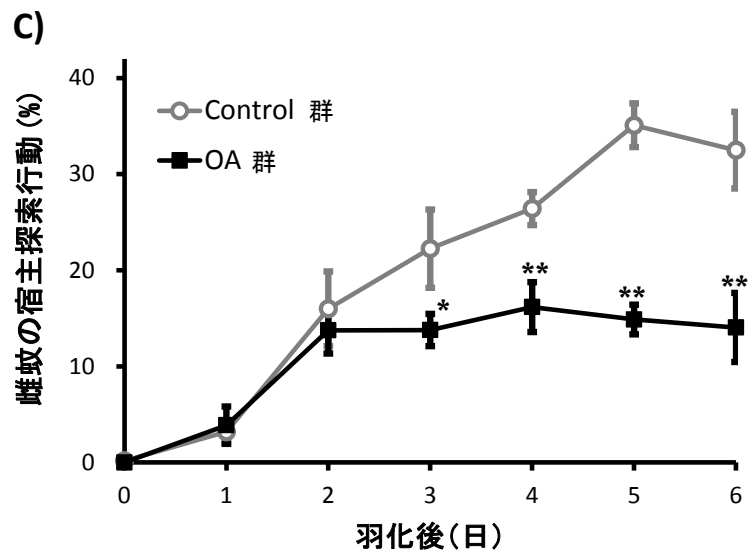


Figure 3. DAとOAが雌蚊の宿主探索行動へ及ぼす影響(続き)
 C) OA量の増加が宿主探索行動へ及ぼす影響
 Two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs Control 群)

第3節 DA と OA が交尾と餌摂取量へ及ぼす影響

宿主探索行動は、雌蚊の交尾や餌摂取状態に影響を受ける¹⁴。そこで、本節では、DA 量 と OA 量の増加が交尾と吸水へ及ぼす影響について検討した。

1. DA と OA が雌蚊の交尾に与える影響

(a) 実験方法

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（以下 Control 群）、3.5mM L-DOPA（以下 DA 群）、30mM OA（以下 OA 群）を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。羽化後 3 日目に実験用ケージから雌蚊を回収し、実体顕微鏡下で貯精嚢を切り出した。そして、正立顕微鏡（400 倍）にて精子の有無を観察した（Figure 4A）。各群 4 回繰り返し観察を行った。

(b) 実験結果

DA 群および OA 群の交尾率は、Control 群の交尾率と比較して有意な差はなかった（Control 群: $100 \pm 0.0\%$ 、DA 群: $95 \pm 5.0\%$ 、OA 群: $100 \pm 0.0\%$ 、Figure 4B）。これは、DA と OA が雌蚊の交尾に影響を及ぼすことなく宿主探索行動を減少することを示している。

2. DA と OA が雌蚊の餌摂取量に与える影響

(a) 実験方法

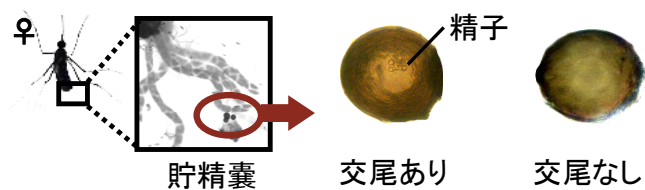
同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各 100 匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3%スクロース（以下 Control 群）、3.5mM L-DOPA（以下 DA 群）、30mM OA（以下 OA 群）を実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。羽化後 2 日目に 0.01 %ブリリアントブルーFCF を混ぜた 3.5mM L-DOPA、30mM OA を実験用ケージ内に設置した。そして、羽化後 3 日目に雌蚊を回収した。回収した雌蚊は、2 匹ずつ PBS に入れホモジナイズした。ホモジナイズ液を遠心し、その上清の吸光度を測定した（波長 630nm）。各群 8 回繰り返し測定を行った。

(b) 実験結果

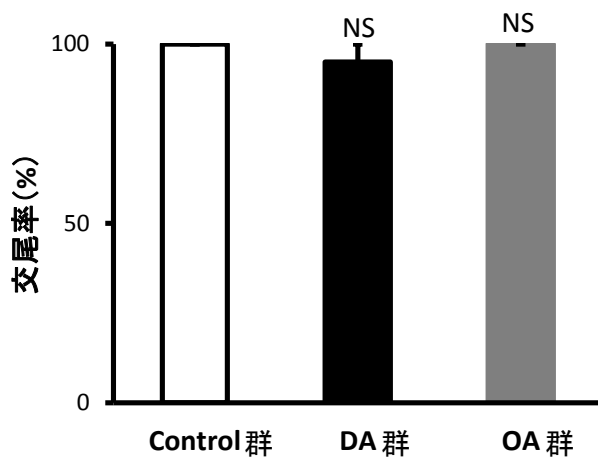
DA 群と OA 群の吸光度は、Control 群と比較して有意な差はなかった（Control 群: 0.048 ± 0.007 、DA 群: 0.053 ± 0.009 、OA 群: 0.040 ± 0.003 、Figure 4C）。これ

は、DA と OA が雌蚊の餌摂取量に影響を及ぼすことなく宿主探索行動を減少することを示している。

A)



B)



C)

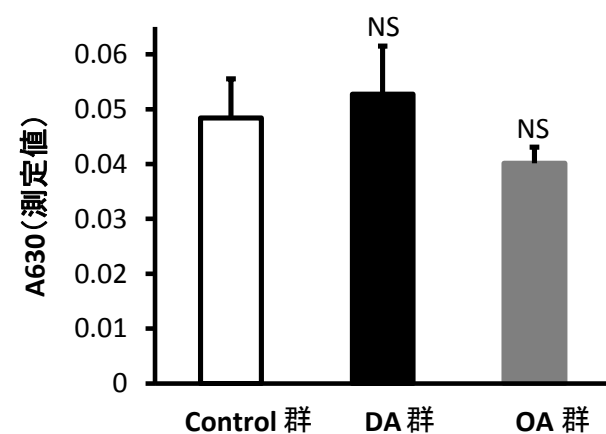


Figure 4. DA とOAが雌蚊の交尾と餌摂取量へ及ぼす影響

A) 雌蚊貯精嚢における精子の確認

B) DA量の増加とOA量の増加が雌蚊の交尾へ及ぼす影響

C) 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, ^{NS} $P > 0.05$ (vs Control 群)

第4節 小括

本章は、DA と OA が宿主探索行動に影響を及ぼすことを明らかにするため、雌蚊の DA 量と OA 量を増加させ、宿主探索行動の変化を観察した。その結果、DA および OA 量を増加させることで、羽化後 3 日目から 6 日目において雌蚊の宿主探索行動が減少することを示した (Figure 3B、3C)。これは、DA と OA によって雌蚊の宿主探索行動が制御されることを示した最初の報告である。この研究成果は、引用文献 15 で報告した。

これまで、雌蚊に DA と OA の枯渇薬である α -methyl-tyrosine (AMT) と 5-HT の枯渇薬である α -methyl-tryptophan を羽化後 3 日目の雌蚊に処置した報告がある¹⁶。その結果、Novak らは、5-HT の枯渇が雌蚊の吸血行動を制御する一方で、DA の枯渇は、宿主探索行動および吸血行動に影響を及ぼさないことを示した。Novak らの報告において、AMT を処置した雌蚊の DA 量は薬剤未処置の雌蚊と比較し、約 50% 程度に抑えられている。本章において、DA 量は羽化後 0 日目に比べ、羽化後 3 日目で十分に減少していることを示した (Figure 2A)。このため、羽化後 3 日目の雌蚊を使って DA 量を減少させたとき、DA の宿主探索行動への影響を観察することが困難だったのかもしれない。なお、Novak らの報告において、OA 量は測定されておらず、AMT による OA 量への影響はわからない。

さらに本章は、DA 量の増加は OA 量を有意に増減しないこと、OA 量の増加も同様に、DA 量を有意に増減しないことを明らかにした。これは、DA と OA による宿主探索行動を制御する機構が、互いに独立して機能していることを示唆している。ショウジョウバエ雄の性行動において、DA と OA が重複した役割を有していることが示されている¹¹。これと同様に DA と OA の重複した役割が雌蚊の宿主探索行動においても存在するのかもしれない。

羽化後、DA 量は減少する。本章は、この時 DA 量を増加させ、DA 量の減少を抑えることで宿主探索行動が減少することを示した。これに対して、OA 量は、羽化後やや増加する傾向が見られた。そして、本章はこの時“さらに”OA 量を増加させることで宿主探索行動が減少することを示した。このように羽化後の DA 量と OA 量の挙動が異なることから、DA と OA による宿主探索行動の制御機構は異なることが示唆された。しかしながら、本章で検討した宿主探索行動、交尾、餌摂取量において DA と OA の効果の違いは見られなかった。よって、DA と OA による宿主探索行動の制御機構の違いについて、更なる検討が必要であると考えられた。

宿主探索行動は、雌蚊の交尾や餌摂取状況に影響を受けることが報告されている¹⁴。しかし、DA と OA を増加した時に観察される宿主探索行動の減少は、交尾や餌摂取量の変化を伴わなかった。これは、DA と OA による宿主探索行動の制御機構が、交尾や

餌摂取量とは異なる制御機構であることを示唆している。

昆虫は、哺乳類と同様に血液脳関門を有することが報告されている¹⁷。また、これまでにショウジョウバエにおいて L-DOPA を餌のスクロースに混ぜて与え、頭部 DA 量を増加させる方法が示されている¹²。そこで、本章は、DA 量を増加するため、L-DOPA を用いた。その結果、雌蚊頭部の DA 量を有意に増加できることを明らかにし、本法が蚊にも利用できることを示した (Figure 2A)。さらに、OA を餌に混ぜて与えることで OA 量が増加することを示し、OA 量を増加する際にも本法が利用できることを示した。

(Figure 2B)。加えて、本法を利用し、忌避剤のように宿主であるマウスに薬剤を塗布するのではなく、直接蚊に薬剤を処置することで、宿主探索行動を制御できることを示した。これは、散布可能な宿主探索行動を抑制するツールを創出できる可能性を示している。

また、本章は、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た (Figure 3B、3C)。そして、宿主探索行動を行う群 (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明らかにした。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。

第2章 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

緒言

本章は、DA と OA が宿主探索行動を制御する際に関わる、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査するため、ヒトスジシマカ DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を試みた。マイクロアレイは、遺伝子の発現解析を行うための有用なツールの一つである。現在、ヒトやマウスなどの哺乳類だけでなく、ショウジョウバエ、線虫、イネなど幅広い生物種において、マイクロアレイが実用化されている¹⁸⁻²²。しかしながら、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おらず、マイクロアレイを実施した報告もない。これまでにネッタイシマカ、ネッタイイエカ、ガンビエハマダラカなどで全ゲノム塩基配列が決定されている²³⁻²⁵。中でもネッタイシマカとガンビエハマダラカは、その後のゲノム解析が精力的に進められ、利用できる転写産物の塩基配列情報は充実している²⁶ (Table 2)。そして、その情報を基にしたマイクロアレイが多数作製され、遺伝子発現解析に用いられている²⁶⁻²⁸。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²⁹。しかし、利用できるヒトスジシマカ転写産物の情報は限られている (Table 2)。

そこで、本章では、第1節から第3節で、マイクロアレイを作製するために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。そして、構築したデータベースを基にマイクロアレイを作製した。第1章で宿主探索行動を行う群（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つの群を作製している。従って、続く第4節では、この4つの群に対し、作製したヒトスジシマカマイクロアレイを用いて、宿主探索行動に合わせて発現量が増減する遺伝子を調査した。

Table 2. 科蚊における全ゲノム塩基配列の決定とゲノム解析の現状

		ヒトスジシマカ	ネッタイシマカ	ガンビエハマダラカ
全ゲノム塩基配列の決定 (引用文献)		Chen, X. G. <i>et al.</i> (2015) ²⁹	Nene, V. <i>et al.</i> (2007) ²³	Holt, R. A. <i>et al.</i> (2002) ²⁴
ゲノムサイズ ²⁶		1,967 Mbp	1,311 Mbp	273 Mbp
遺伝子 ²⁶	総数	17,536 個	17,478 個	13,793 個
	タンパク質コード	?	15,796 個	13,007 個
転写産物 ²⁶	総数	17,536 個	18,840 個	15,656 個
	タンパク質コード	?	17,158 個	14,870 個

第1節 ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列の取得

本節では、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するため、ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列を取得した。塩基配列は、次世代シーケンサーを用いるほか、ダイレクトシーケンス、National Center for Biotechnology Information (NCBI)からのダウンロードにより取得した。

1. 次世代シーケンサーGS junior を用いたシーケンス

(a) 実験方法

発育ステージ、性別、部位の異なる 14 種類のサンプルを回収した (Table 3)。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™-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、次世代シーケンサー GS Junior を用いてシーケンスした。

Table 3. 回収したサンプルの種類とサンプル名

発育ステージ		性別	部位	サンプル名	サンプル名(略称)
幼虫	1 齢	混合	全身	1 st Larva	L1
	2 齢	混合	全身	2 nd Larva	L2
	3 齢	混合	全身	3 rd Larva	L3
	4 齢	混合	全身	4 th Larva	L4
蛹	蛹化後0日目	♀	全身	Pupa day0 female	P0F
		♂	全身	Pupa day0 male	P0M
	蛹化後1日目	♀	全身	Pupa day1 female	P1F
		♂	全身	Pupa day1 male	P1M
成虫	羽化後0日目	♀	全身	Adult day0 female	A0F
		♀	頭部	Adult day0 female head	A0F-H
		♂	頭部	Adult day0 male head	A0M-H
	羽化後6日目	♀	全身	Adult day6 female	A6F
		♀	頭部	Adult day6 female head	A6F-H
		♂	頭部	Adult day6 male head	A6M-H

(b) 実験結果

調製した mRNA の rRNA 混入率は、P0M を除き、すべてのサンプルで 10%前後となった（「実験の部 II. 実験方法 8. 次世代シーケンサーを用いたヒトスジシマカの塩基配列決定」参照、Table S3）。このサンプルを用いて、次世代シーケンサーを用いてシーケンスした。その結果、計 1,046,966 リードを取得した。リード数は、A6F が最も多く、次いで A0F、P1F、P0F と続いた（Table 4）。これは、雌蚊に特徴的な配列を多く得たことを示している。また、総リード数に占める割合は 1%以下であるが、幼虫に由来するリードも得た。これは、幼虫から成虫までに発現する転写産物の配列を得たことを示している。

Table 4. シーケンス結果より得られたリード

サンプル名	Raw リード数 (%総リード数)
L1	4,185 (0.4%)
L2	5,274 (0.5%)
L3	9,317 (0.9%)
L4	7,892 (0.8%)
P0F	117,349 (11.2%)
P0M	45,255 (4.3%)
P1F	167,811(16.0%)
P1M	97,770 (9.3%)
A0F	181,581 (17.3%)
A0F-H	57,193 (5.5%)
A0M-H	32,197 (3.1%)
A6F	223,783 (21.4%)
A6F-H	64,287 (6.1%)
A6M-H	33,072 (3.2%)
計	1,046,966 (100.0%)

2. 次世代シーケンサーから取得したリードの *De novo* assembly

(a) 実験方法

次世代シーケンサーで取得したリードから *De novo* assembly によって、コンティグを作製した。*De novo* assembly を行うプログラムは、アルゴリズムの異なる CLC Genomics Workbench v8.1 (以下 CLC) および MIRA 4.0.2 (以下 MIRA)、を用いた。また、*De novo* assembly に用いるリードの処理方法により、CLC を用いて 1 種類、MIRA を用いて 3 種類のコンティグを作製した(「実験の部 II. 実験方法 8. 次世代シーケンサーを用いたヒトスジシマカの塩基配列決定」参照、Figure S6、Figure S7)。

(b) 実験結果

De novo assembly に使用したリード、および *De novo* assembly の結果を Table 5 に示す。CLC を用いた *De novo* assembly の結果、計 93,946 個の塩基配列 (コンティグ: 34,826 個、シングルトン: 59,120 個) を得た (以下 Sequences (CLC))。MIRA を用いた *De novo* assembly の結果、22,182 個 (以下 Sequences (MIRA1))、21,504 個 (以下 Sequences (MIRA2))、9,060 個 (以下 Sequences (MIRA3)) のコンティグを取得した。

Table 5. CLCとMIRAを用いた*De novo* assembly

	<i>De novo</i> assembly に使用したリード数		平均リード長 (bases)		配列数		平均配列長 (bases)	最小配列長 (bases)	最大配列長 (bases)
	Raw リード	1,046,966	317.58	—	総数	コンティグ	シングルトン		
Sequences (CLC)		797,051	307.82	93,946	34,826	59,120	476.81	100	10,129
Sequences (MIRA1)		380,666	319.51	22,182	—	—	510.53	40	10,591
Sequences (MIRA2)		341,015	315.16	21,504	—	—	506.70	40	8,571
Sequences (MIRA3)		90,391	424.75	9,060	—	—	703.10	40	8,569

3. ダイレクトシーケンスによるヒトスジシマカ DA、OA 関連遺伝子の塩基配列決定

(a) 実験方法

DA 関連遺伝子、OA 関連遺伝子の塩基配列を決定した。雌蚊から Total RNA を抽出し、DNase I 処理と精製を行った後、逆転写して cDNA を調製した。これを鋳型とし、Table S5 に示すプライマーと KOD-Plus- (TOYOBO) を用いて PCR を行った（「実験の部 II. 実験方法 9. ダイレクトシーケンスによるヒトスジシマカ DA、OA 関連遺伝子の塩基配列決定」参照）。PCR は、94°C 2 分の後、[98°C 10 秒、51 - 65°C 30 秒、68°C 1 分] の反応を 40 サイクル行った。PCR 産物は、電気泳動により分離し PCR 産物の長さに一致する箇所のゲルを切り出し、DNA を抽出した。これを鋳型としてダイレクトシーケンスを行った。シーケンサーは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いた。取得した塩基配列は、ネッタシマカおよびショウジョウバエ配列との一致率を確認し、目的の塩基配列が得られていることを確認した。

(b) 実験結果

ダイレクトシーケンスの結果、10 個の DA 関連遺伝子と 6 個の OA 関連遺伝子の配列を得た (Table 6)。配列の一致率は、*VMAT*、*Octb3R* を除き、ショウジョウバエに比べてネッタシマカの方が高かった。*VMAT* と *Octb3R* は、ショウジョウバエの方が高い一致率を示したため、次にガンビエハマダラカの *VMAT* (Accession number: XM_313775)、*Octb3R* (Accession number: XM_312025) と配列の一致率を確認した。その結果、配列の一致率は *VMAT* が 81.5%、*Octb3R* 84.3%であった。ショウジョウバエに比べて高い一致率を示したことから、ヒトスジシマカの *VMAT* と *Octb3R* の塩基配列が得られていると考えた。これらダイレクトシーケンスから得られた配列を、以下 Sequences (PCR) と称した。

4. NCBI に登録されている cDNA 塩基配列の取得

(a) 実験方法

NCBI で公開されているヒトスジシマカ mRNA 配列を取得した。また、上述の「3. ダイレクトシーケンスによる生体アミン関連遺伝子の塩基配列決定」の結果から、生体アミン関連遺伝子はネッタシマカとヒトスジシマカで塩基配列の一致率が高いことが示唆された。そこで、生体アミン関連遺伝子の塩基配列をマイクロアレイへ確実に搭載するため、ネッタシマカの生体アミン関連遺伝子の配列を取得した。

(b) 実験結果

NCBI から、75,289 個のヒトスジシマカ mRNA 塩基配列を取得した。これら配列の由来は、68,133 個が雌蚊の卵母細胞、6,881 個が雌雄蚊の生殖器官に由来した配列であった^{30,31}。また、29 個のネッタイシマカの生体アミン関連遺伝子の配列を取得した。これら NCBI より得た配列を、以下 Sequences (NCBI) と称した。

Table 6. ダイレクトシーケンスで取得した配列

遺伝子名	取得した配列長(bp)	ネッタイシマカ		ショウジョウバエ	
		Accession number	一致率(%)	Accession number	一致率(%)
DA関連遺伝子					
TH	1,102	XM_011495191	94.9	NM_057549	80.7
DDC	1,600	XM_001648213	84.8	NM_165279	70.4
ebony	712	XM_001651413	85.9	NM_079707	59.2
NAT1	1,661	XM_001661350	82.7	NM_206212	48.6
DAT	1,697	XM_001654196	91.2	NM_079039	67.9
VMAT	730	XM_001659463	75.3	NM_001014524	76.3
Dop1	968	JN043502	94.4	NM_057659	76.2
Dop2	1,240	JN043503	93.5	NM_170420	71.9
Dop3	1,183	XM_001648573	95.5	NM_001014758	67.1
DopEcR	821	XM_001654744	95.7	NM_139640	69.1
OA関連遺伝子					
Tdc1	538	XM_001656801	85.7	NM_136382	68.8
Tdc2	445、630	XM_001656807	90.6, 88.6	NM_165483	79.6, 73.7
Tbh	664	XM_001661064	86.4	Z70316	67.8
OAMB	471	XM_001648194	90.3	NM_001275845	68.0
Octb2R	514	XM_001651663	85.6	NM_001316576	64.7
Octb3R	242	XM_001651665	72.0	NM_001038954	76.1

TH: Tyrosine hydroxylase, *DDC*: Dopa decarboxylase, *NAT1*: Dopamine N-acetyltransferase, *DAT*: Dopamine transporter, *VMAT*: Vesicular monoamine transporter, *Dop1*: Dopamine 1-like receptor 1, *Dop2*: Dopamine 1-like receptor 2, *Dop3*: Dopamine 2-like receptor, *DopEcR*: Dopamine/Ecdysteroid receptor, *Tdc1*: Tyrosine decarboxylase 1, *Tdc2*: Tyrosine decarboxylase 2, *Tbh*: Tyramine beta hydroxylase, *OAMB*: Octopamine receptor in mushroom bodies, *Octb2R*: Octopamine beta2 receptor, *Octb3R*: Octopamine beta3 receptor

第2節 マイクロアレイ作製に用いるヒトスジシマカ塩基配列の選出

本節は、Sequences (CLC)、Sequences (MIRA1)、Sequences (MIRA2)、Sequences (MIRA3)、Sequences (PCR)、Sequences (NCBI) 間で重複した配列を除去し、マイクロアレイ作製に用いるヒトスジシマカ塩基配列を選出した。これら、選出した配列群は、ヒトスジシマカ塩基配列群 *Aedes albopictus* Fukuoka version 1.0 (以下 AalbF1.0) と称した。

1. ヒトスジシマカ cDNA 塩基配列内の重複配列の除去と AalbF1.0 の作製

(a) 実験方法

Sequences (CLC)、Sequences (MIRA1)、Sequences (MIRA2)、Sequences (MIRA3) 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、ネッタイシマカ配列を用い、E-value の閾値は 10 とした。ネッタイシマカ配列に相同性のあった配列は、ネッタイシマカ配列に付している Accession number でグループ化し、グループ内で最もビットスコアの高い配列を選出した (以下 Sequences (blast))。ネッタイシマカ配列に対して相同性のない配列は、配列長の長いものから順に 5000 個選出した (以下 Sequences (5000))。

次に、Sequences (NCBI) 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、前述のネッタイシマカ配列を用い、E-value の閾値は 10 とした。ネッタイシマカ配列に対して相同性のあった配列は、ネッタイシマカ配列に付している Accession number でグループ化した。そして、Sequences (blast) に存在しないグループについて、グループ内で最もビットスコアの高い配列を選出した。この選出した配列に Sequences (PCR)を加え、Sequences (PCR+NCBI)とした。最後に、Sequences (blast)、Sequences (5000)、Sequences (PCR+NCBI)を一つにまとめ、AalbF1.0 を作製した (「実験の部 II. 実験方法 11. ヒトスジシマカ cDNA 塩基配列内の重複配列の除去と AalbF1.0 の作製」参照、Figure S8)。

作製した AalbF1.0 は、ゲノム解析により推定されたヒトスジシマカタンパク質コード遺伝子 (AaloF1.1 protein-coding)、ネッタイシマカタンパク質コード遺伝子 (AaegL3.3 protein-coding)、ガンビエハマダラカタンパク質コード遺伝子 (AgamP4.3 protein-coding) に由来する転写産物の配列と配列数および配列長を

比較した。

(b) 実験結果

重複配列を除去した結果、22,335 個の配列からなる AalbF1.0 を作製した (Table 7)。配列数の内訳は、Sequences (blast) が 13,566 個、Sequences (5000) が 5,000 個、Sequences (PCR + NCBI) が 3,769 個だった。AalbF1.0 は、次世代シーケンサーで得た配列 (Sequences (blast) および Sequences (5000)) が、83.1% を占めた。

次に、ゲノム解析により推定された各蚊の転写産物と AalbF1.0 を比較した。その結果、各蚊の転写産物に比べ、AalbF1.0 の配列数は多く、平均長、最小配列長、最大配列長は短かった (Table 7)。AalbF1.0 は、各蚊の転写産物に比べて配列長が短いことから、AalbF1.0 の中に含まれる配列の中には、全長を反映していない転写産物の配列も含まれることが示唆された。

Table 7. AalbF1.0 の配列数と配列長

配列名	種	配列数	平均配列長 (bases)	最小配列長 (bases)	最大配列長 (bases)
AalbF1.0	ヒトスジシマカ	22,335	1,134.98	69	9,953
AaloF1.1 protein-coding	ヒトスジシマカ	17,536	1,381.10	150	32,463
Aaeg3.3 protein-coding	ネッタイシマカ	17,158	1,868.72	105	34,498
AgamP4.3 protein-coding	ガンビエハマダラカ	14,870	1,907.53	99	49,389

2. 昆虫ゲノムに対する相同性検索による AalbF1.0 の評価

(a) 実験方法

AalbF1.0 について、blastn 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、ネッタイイエカ、ガンビエハマダラカ、ショウジョウバエのゲノムを用い、E-value の閾値は $1E-10$ とした。そして、相同性を示した配列数とその配列の一致率から AalbF1.0 がヒトスジシマカに由来する配列であることを評価した。

(b) 実験結果

AalbF1.0 の配列は、ヒトスジシマカゲノムの配列に最も多く相同性を示し、次いでネッタイシマカ、ネッタイイエカと続き、ショウジョウバエに相同性を示した配列は最も少なかった (Table 8)。相同性を示した配列の一致率は、ヒトスジシマカで最も高く、次いでネッタイシマカ、ネッタイイエカと続き、ショウジョウバエ

との一致率は最も低かった。(Figure 5)。ネッタイシマカは、ヒトスジシマカに最も近縁の種であり、次いでネッタイエカ、ガンビエハマダラカ、ショウジョウバエの順に遠縁になる³²。AalbF1.0は、近縁種のゲノムほど相同性を示す配列数が多く、その一致率も高いことから、AalbF1.0は、ヒトスジシマカ由来の配列であることを明らかにした。

Table 8. AalbF1.0 の昆虫ゲノムに対する相同性検索

データベース		相同性を示した 配列数(%)
種	Version	
ヒトスジシマカ	A. albopictus v1.0	22,076 (98.8%)
ネッタイシマカ	AaegL2	21,128 (94.6%)
ネッタイエカ	CulPip1.0	15,036 (67.3%)
ガンビエハマダラカ	AgamP3	11,669 (52.3%)
ショウジョウバエ	Release 6 plus	6,925 (31.0%)

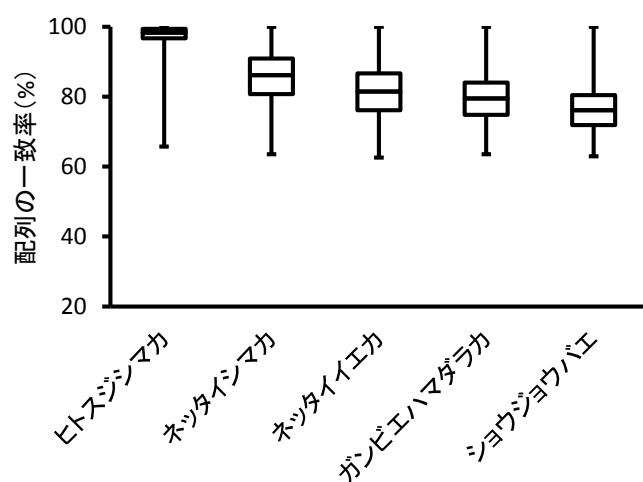


Figure 5. AalbF1.0 の昆虫ゲノムに対する配列の一致率

第3節 ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースの構築と ヒトスジシマカマイクロアレイの作製

本節は、第2章 第2節で作製した AalbF1.0 の各配列にアノテーションを付加することで、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。そして、構築した ESTs (AalbF1.0) を基にマイクロアレイを作製した。

1. 昆虫の転写産物に対する相同性検索

(a) 実験方法

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、ゲノム解析により推定されたヒトスジシマカ転写産物 (以下 AaloF1.1) ネットアイシマカ転写産物 (以下 AaegL3.3)、ネットアイエカ転写産物 (以下 CpipJ2.2)、ガンビエハマダラカ転写産物 (以下 AgamP4.3)、ショウジョウバエ転写産物 (以下 Drmel Release 6 plus) を用い、E-value の閾値は 1E-10 とした。

ゲノム解析により推定されたヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 と本研究で作製した AalbF1.0 が有する配列の違いを明らかにするため、相同性解析の結果を基に、ヒトスジシマカゲノムあるいは他の蚊科の転写産物と相同性を示す一方で、AaloF1.1 と相同性を示さない AalbF1.0 の配列を特定した。

次に、昆虫転写産物 (ネットアイシマカ、ネットアイエカ、ガンビエハマダラカ、ショウジョウバエ) との相同性検索および、ヒトスジシマカゲノムとの相同性検索 (「第2章 第2節 2. 昆虫ゲノムに対する相同性検索による AalbF1.0 の評価」参照) の結果に基づいて、AalbF1.0 の各配列を「蚊に特異的な配列」、「昆虫に保存された配列」、「その他」に分類した。そして、AalbF1.0 が「蚊に特異的な配列」を有することを確認した。

さらに、ネットアイシマカ、ネットアイエカ、ガンビエハマダラカの転写産物との相同性検索の結果に基づいて、AalbF1.0 の各配列の遺伝子を推定した。

(b) 実験結果

相同性を検索した結果、AalbF1.0 は、AaegL3.3 に最も多くの配列が相同性を示し、次いで AaloF1.1 に相同性を示した (Table 9)。続いて、blastn プログラムによる相同性解析で相同性を示した配列について、配列の一致率を確認した。その結

果、一致率は、AaloF1.1 で最も高かった (Figure 6A)。

ヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 に対する相同性検索の結果から、本研究で得た AalbF1.0 の中に、ヒトスジシマカゲノムや他の蚊科の転写産物と相同性を示すにもかかわらず、AaloF1.1 と相同性を示さない 6,442 個の配列が含まれることが明らかとなった。これは、ゲノム解析から推定されたヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 にない配列であり、本研究で作製した AalbF1.0 に特徴的な配列であることを示している。

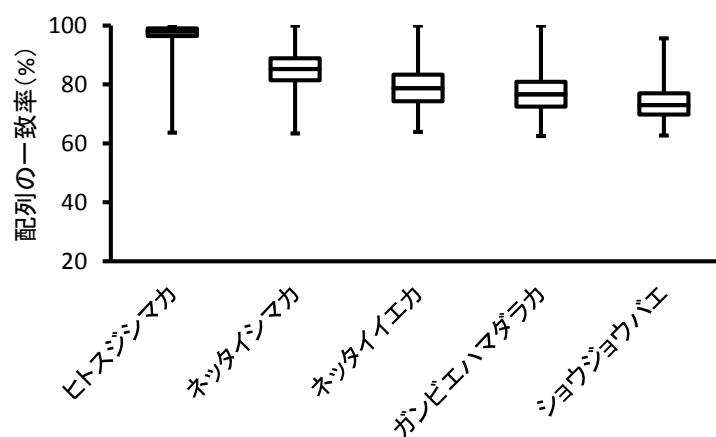
AalbF1.0 の昆虫ゲノムとの相同性は、ヒトスジシマカゲノムに最も多くの配列が相同性を示し、AalbF1.0 を構成する配列のうち 98.8%が相同性を示した (「第 2 章 第 2 節 2. 昆虫ゲノムに対する相同性検索による AalbF1.0 の評価」参照、Table 8)。これに対し、昆虫転写産物との相同性は、ヒトスジシマカよりもネッタイシマカに相同性を示す配列が多く、ヒトスジシマカ転写産物と相同性を示した配列は、AalbF1.0 を構成する配列のうち 70.7%と低かった。この結果から、ヒトスジシマカのゲノム解析から推定された転写産物 AaloF1.1 の情報が、ネッタイシマカ転写産物 AaegL3.3 と比較して不足していることが推察された。そこで、次にヒトスジシマカゲノムとヒトスジシマカ以外の昆虫転写産物 (AaegL3.3、CpipJ2.2、AgamP4.3、Drmel Release 6 plus) との相同性によって AalbF1.0 の配列を分類した。その結果、蚊に特異的な配列は、AalbF1.0 の 47%を占めた (Figure 6B)。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。蚊に特異的な配列の情報を含む ESTs (AalbF1.0) は、ツールの標的となる「蚊に特異的な遺伝子」を探索するアレイを作製する上で有用なヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースとなることが予想された。

続いて、相同性解析の結果から AalbF1.0 の各配列の遺伝子を推定し、その機能毎に配列数をカウントした。その結果、宿主探索行動に関与する感覚器遺伝子のほか、生体アミン、概日リズム、免疫、代謝関連遺伝子など多様な遺伝子に由来する転写産物を取得していることが明らかとなった (Table 10)。ヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 と相同性を示さない AalbF1.0 に特徴的な配列も同様に、多様な遺伝子に由来する転写産物を取得していることが明らかとなった。これは、多様な遺伝子に由来する転写産物の配列情報を有したヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベースが構築されたことを示している。

Table 9. AalbF1.0 の昆虫転写産物に対する相同性検索

データベース		相同を示した 配列数(%)
種	Version	
ヒトスジシマカ	AaloF1.1	15,800 (70.7%)
ネッタイシマカ	AaegL3.3	17,116 (76.6%)
ネッタイイエカ	CpipJ2.2	14,959 (67.0%)
ガンビエハマダラカ	AgamP4.3	14,151 (63.4%)
ショウジョウバエ	Release 6 plus	1,1738 (52.6%)

A)



B)

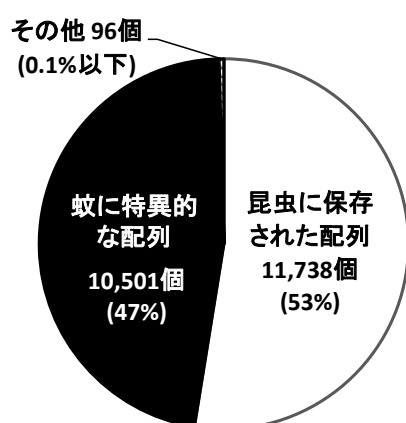


Figure 6. AalbF1.0 の昆虫転写産物に対する相同性

A) 昆虫転写産物に対する配列の一致率

B) 蚊に特異的な配列の割合

Table 10. 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

2. AalbF1.0 に対する次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリードのマッピング

(a) 実験方法

次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリード（「第 2 章 第 1 節 1. 次世代シーケンサーGS junior を用いたシーケンス」参照、Table 4）をサンプル毎に AalbF1.0 にマッピングした。その後、マッピングしたリードの由来サンプルによって AalbF1.0 の配列を分類した。

また、宿主探索行動を行わない L1、L2、L3、L4、P0F、P1F、A0F と宿主探索行動を行う A6F 由来のリードのマッピング結果をそれぞれ比較した。これにより、宿主探索行動に合わせて発現量が増減する転写産物が AalbF1.0 に含まれていることを確認した。

続いて、A0F-H と A6F-H に由来するリードのマッピング結果を比較した。同様に A0M-H と A6M-H に由来するリードのマッピング結果を比較した。これにより、雌蚊と雄蚊において羽化後に発現量が増減する転写産物を選出した。その後、雌蚊と雄蚊で発現量が増減した転写産物を比較し、羽化後の雌蚊に特徴的な挙動を示す転写産物が含まれていることを確認した。

(b) 実験結果

AalbF1.0 の配列にリードをマッピングした。その結果、由来サンプルが 1 種類のみである配列が、AalbF1.0 の配列の約 20%を占めることを明らかにした（Table

11)。これは、AalbF1.0 が各発育ステージに特徴的な配列を有することを示しており、多種多様な遺伝子の転写産物の配列を取得できていることが示唆された。

続いて、宿主探索行動を行わない、L1、L2、L3、L4、P0F、P1F、A0F と宿主探索行動を行う A6F 由来のリードのマッピング結果に基づき、遺伝子発現解析を実施した。その結果、A6F と比較して、L1、L2、L3、L4、P0F、P1F、A0F は多様な遺伝子に由来する転写産物の発現量が増減した (Table 12)。この結果は、AalbF1.0 が宿主探索行動に合わせて発現量が増減する転写産物の配列を含むことを示している。また、雌蚊と雄蚊で羽化後に発現量が増減した転写産物を比較した。その結果、雌蚊で羽化後に発現量が増減する転写産物が増加 245 個、減少 229 個あった。そして、その中に雌に特徴的な挙動を示す転写産物が増加 161 個、減少 167 個あった (Figure 7、Table 13)。宿主探索行動は、雌蚊に特徴的な行動であり、宿主探索行動を制御する遺伝子は、雌蚊に特徴的な挙動を示す可能性が高い。この結果は、AalbF1.0 が、宿主探索行動を制御する遺伝子に由来する転写産物を有することを示唆している。

3. eArray を用いたプローブの設計とヒトスジシマカマイクロアレイの作製

(a) 実験方法

第 2 章 第 3 節 1、2 で得た情報を AalbF1.0 に付加し、ESTs (AalbF1.0) を構築した。そして、ESTs (AalbF1.0) の配列情報に基づき、eArray を用いて、マイクロアレイのプローブを設計した。設計するプローブの長さは、60bp とした。

(b) 実験結果

プローブを設計した結果、38,785 本のプローブ配列を得た。そして、これらプローブを搭載したヒトスジシマカマイクロアレイを作製した。構築した ESTs (AalbF1.0) のデータベース情報と、設計したプローブの配列は、福岡大学薬学部微生物薬品化学教室のデータサーバーに保存した。

Table 11. AalbF1.0 の配列の由来サンプル

発育ステージ		由来サンプル	配列数 (%AalbF1.0)
幼虫	蛹	L1のみ	31 (0.14%)
		L2のみ	45 (0.20%)
		L3のみ	76 (0.34%)
		L4のみ	67 (0.30%)
		L1 -L4 のうち2つ以上	81 (0.36%)
成虫	複数の発育ステージ	P0Fのみ	396 (1.77%)
		P0Mのみ	131 (0.59%)
		P1Fのみ	381 (1.71%)
		P1Mのみ	231 (1.03%)
		P0F, P0M, P1F, P1Mのうち2つ以上	471 (2.11%)
	不明	A0Fのみ	225 (1.01%)
		A0F-Hのみ	284 (1.27%)
		A0M-Hのみ	157 (0.70%)
		A6Fのみ	2,241 (10.03%)
		A6F-Hのみ	334 (1.50%)
		A6M-Hのみ	249 (1.11%)
		A0F, A0F-H, A0M-H,A6F, A6F-H, A6M-Hのうち2つ以上	2,112 (9.46%)
		異なる発育ステージのサンプル2つ以上	10,450 (46.79%)
		不明(リードがマッピングしない)	4,373 (19.58%)
Total		22,335 (100%)	

Table 12. A6Fに比べて発現量が増減した転写産物の数

遺伝子	L1		L2		L3		L4		POF		P1F		A0F	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
生体アミン	2	2	2	2	1	2	0	2	0	2	2	0	1	2
感覚器	1	10	2	10	4	10	4	9	5	9	6	5	3	1
概日リズム	1	1	1	1	0	1	0	1	2	0	1	0	2	1
免疫	8	11	11	9	18	9	17	10	12	6	5	7	7	3
代謝	33	60	25	52	33	46	38	59	20	33	21	26	23	28
分解・消化	17	37	17	35	30	34	24	33	6	26	3	24	5	25
酸化還元・ストレス応答	15	58	31	55	24	52	28	52	21	27	28	21	36	17
輸送	15	66	15	58	17	52	11	60	7	40	23	25	18	25
複製・転写・翻訳	28	50	19	59	10	51	11	59	6	35	4	45	2	41
細胞骨格・構造	19	24	28	23	34	21	37	20	50	5	85	6	45	9
リボソーム複合体	35	65	19	79	19	70	9	85	5	76	0	87	1	80
その他の機能	163	365	174	362	174	321	186	339	120	142	142	165	136	182
機能未知	561	282	552	294	288	256	334	264	289	156	255	163	208	159
非タンパク質コード	13	6	11	7	7	8	14	6	6	8	11	7	25	3
計	911	1037	907	1046	659	933	713	999	549	565	586	581	512	576

Up: A6Fに比べて発現量が増加した転写産物
Down: A6Fに比べて発現量が減少した転写産物



Figure 7. 雌蚊と雄蚊で羽化後に発現量が増減した転写産物の比較
 ↑: 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。
 円が重なっている部位は、A0F-HとA0M-Hで発現量がともに増減した転写産物数を示す。

Table 13. 羽化後に発現量が増減する転写産物の雌雄比較

遺伝子	A0F-H		A0M-H		♂と異なる挙動を示す	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down
生体アミン	2	0	1	0	1	0
感覚器	2	10	1	10	2	3
概日リズム	0	2	1	1	0	2
免疫	2	5	3	2	1	5
代謝	7	4	8	7	5	3
分解・消化	0	0	0	3	0	0
酸化還元・ストレス応答	6	7	6	6	6	5
輸送	13	5	10	9	9	4
複製・転写・翻訳	1	9	3	12	1	7
細胞骨格・構造	30	0	28	3	11	0
リボソーム複合体	0	29	2	15	0	22
その他の機能	63	45	91	82	45	31
機能未知	119	106	214	212	80	81
非タンパク質コード	0	7	5	6	0	4
計	245	229	373	368	161	167

Up: A6F-HあるいはA6M-Hに比べて発現量が増加した転写産物
 Down: A6F-HあるいはA6M-Hに比べて発現量が減少した転写産物

第4節 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

本節は、第1章で得た知見を基に宿主探索行動を行う雌蚊群と、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群を作製した。そして、第2章で作製したヒトスジシマカマイクロアレイを用いて、宿主探索行動を制御する遺伝子を調査した。まず、宿主探索行動にあわせて発現量が増減する遺伝子を特定した。続いて、その中から宿主探索行動を制御する遺伝子の候補を選定した。

1. マイクロアレイ実験の評価

(a) 実験方法

宿主探索行動を制御する遺伝子を調査する前に、作製したヒトスジシマカマイクロアレイによって、遺伝子の発現量を適切に検出できているかを確認した。

第1章で得た知見を基に宿主探索行動を行う雌蚊群と、宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群を作製した。具体的には、薬剤未処置の群を作製し、羽化後0日目（以下 Newly emerged adult; NEA 群）と6日目（以下 Control 群）の雌蚊を回収した。次いで、DA 群と OA 群を作製し、羽化後6日目に雌蚊を回収した（それぞれ以下 DA 群、OA 群）。回収した各群の雌蚊頭部から Total RNA を抽出した。Total RNA は、逆転写およびラベル化を行い、シアニンラベル化 cRNA を調製した。調製した cRNA は、ヒトスジシマカマイクロアレイへハイブリダイゼーションした。その後、プローブ毎に蛍光を検出し、数値化することでシグナル値を得た。シグナル値は quantile 法で正規化し、以降の解析に使用した。ネッタイシマカにおいて、pupal cuticle protein (Vector base Gene ID: AAEL011045)、pupal cuticle protein 78E (Vector base Gene ID: AAEL003259)をコードする遺伝子は、雌蚊の年齢を推定するときに指標となる遺伝子である。そして、これら遺伝子は羽化後発現量が減少することが報告されている³³。そこで、この2つの遺伝子について、ヒトスジシマカマイクロアレイで得られた発現量を確認した。

(b) 実験結果

pupal cuticle protein、pupal cuticle protein 78E の発現量は、Control 群と比べて NEA 群で発現量が増加した (Table 14)。これは、ネッタイシマカにおける発現パターンと一致した。この結果は、本研究で作製したヒトスジシマカマイクロアレイを用いて、遺伝子の発現量を適切に検出できることを示している。

Table 14. マイクロアレイ実験の評価

Vector base Gene ID	Description	シグナル値	
		Control群	NEA群
AAEL003259	pupal cuticle protein 78E	299.3	1267.9
AAEL011045	pupal cuticle protein	76.4	3497.2

2. 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

(a) 実験方法

宿主探索行動に合わせて発現量が増減する遺伝子を調べた。宿主探索行動を行う 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、Control 群）で、各プローブのシグナル値を比較した。そして、Control 群と比較し、発現量が増減した転写産物を遺伝子の機能毎に数えた。

(b) 実験結果

各プローブのシグナル値を比較し、シグナル値の対数から Scatter plot を作成した。その結果、NEA 群は Control 群に比べて、発現量が増加した転写産物と発現量が減少した転写産物の数は同程度だった (Figure 8A)。これに対し、DA 群と OA 群は、Control 群に比べて、発現量が減少した転写産物が多かった (Figure 8B、8C)。そして、Control 群に比べて発現量が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 (Figure 8D)。DA 群と OA 群は、Control 群に比べて、発現量が減少した転写産物が多いことが特徴的であったことから、宿主探索行動を制御する遺伝子は、発現量が減少する転写産物の中に含まれることが予想された。

第 2 章 第 3 節で、次世代シーケンサーで取得したリードを用いて、羽化後 0 日目と羽化後 6 日目の雌成虫で全身 (A0F vs A6F) と頭部 (A0F-H vs A6F-H) における遺伝子の発現量を比較した (「第 2 章 第 3 節 2. AalbF1.0 に対する次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリードのマッピング」参照、Table 12、Table 13)。そこで、次世代シーケンサーで得られた結果とマイクロアレイの結果 (NEA 群 vs Control 群) を比較した。その結果、挙動が一致した転写産物が、全身で 72 個 (発現量増加 : 56 個、発現量減少 : 16 個)、頭部で 55 個 (発現量増加 : 49 個と発現量減少 : 6 個) あることが明らかとなった。マイクロアレイと次世代シーケンサーの両方で発現量の増減を検出した転写産物があることから、マイクロアレイを用いて、宿主探索行動に合わせて発現量が増減する転写産物を検出できていると考えられた。

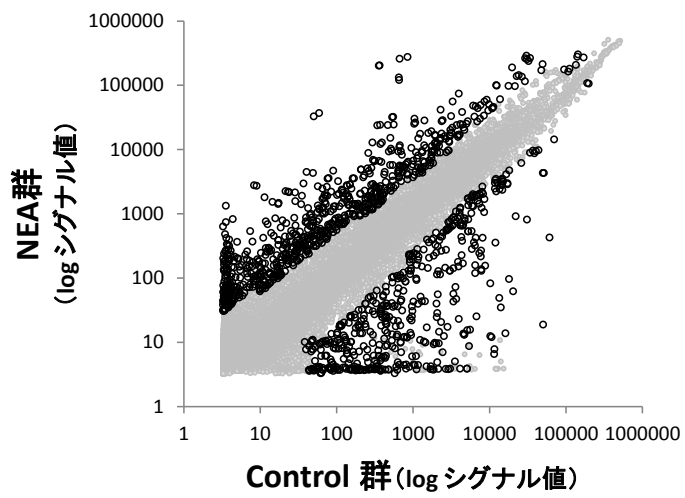
次に、Control 群と比較し、発現量が増減した転写産物を遺伝子の機能毎に調べ

た。その結果、生体アミンを除き、多様な遺伝子に由来する転写産物の発現量が増減した (Table 15)。生体アミン関連遺伝子に由来する転写産物のシグナル値は、マイクロアレイの検出限界以下であるものが多かった。また、シグナル値を計測できた生体アミン関連遺伝子は、発現量の増減基準を満たすものがなかった。したがって、生体アミン関連遺伝子の発現量の変化は、マイクロアレイで検出できないほど小さいことが示唆された。また、NEA 群は、他の群に比べて細胞骨格・構造で発現量が増加していること、OA 群は、他の群に比べて、免疫、代謝、その他の機能、機能未知の遺伝子で発現量が減少していることなど、各群に特徴が見られた。

次に、各群で、宿主探索行動に合わせて発現量が増減した転写産物を比較した。その結果、NEA 群、DA 群、OA 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 (Figure 8D、Table 15)。羽化後 0 日目から羽化後 6 日目にかけて雌蚊の宿主探索行動は増加する。この間、宿主探索行動だけでなく、表皮の硬化や生殖器官の成熟といった生理現象をはじめ、飛翔行動、食物探索行動、交尾行動といった行動の変化がある³³⁻³⁶。このため、NEA 群と Control 群で発現量が増減した転写産物の中に、宿主探索行動を制御する遺伝子だけでなく、その他の生理現象や行動を制御する遺伝子が含まれることが予想された。NEA 群に対し、DA 群と OA 群は、Control 群と同様に羽化後 6 日目にサンプルを回収している。さらに、第 1 章において、DA 群と OA 群は、Control 群と比べて交尾や餌の摂取量に差がないことを明らかにしている。したがって、DA 群あるいは OA 群と Control 群の間で、発現量が増減した転写産物の中に、羽化後に生じる生理現象や行動を制御する遺伝子が含まれる可能性は低いと考えられた。以上のことから、上述の 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、宿主探索行動が減少した 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。

前節で、次世代シーケンサーで取得したリードを用いて、雌に特徴的な挙動を示す転写産物を選出した (「第 2 章 第 3 節 2. AalbF1.0 に対する次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリードのマッピング」参照、Figure 7)。興味深いことに、これら 301 個の転写産物 (発現量増加 : 1 個、発現量減少 : 300 個) の中に、選出した雌に特徴的な転写産物が 2 個含まれていた。この転写産物は、Ribonuclease と機能未知の遺伝子であった。これら遺伝子は、雄蚊と異なる挙動を示すことから、宿主探索行動を制御する遺伝子の候補として特に有力であると考えられた。

A)



B)

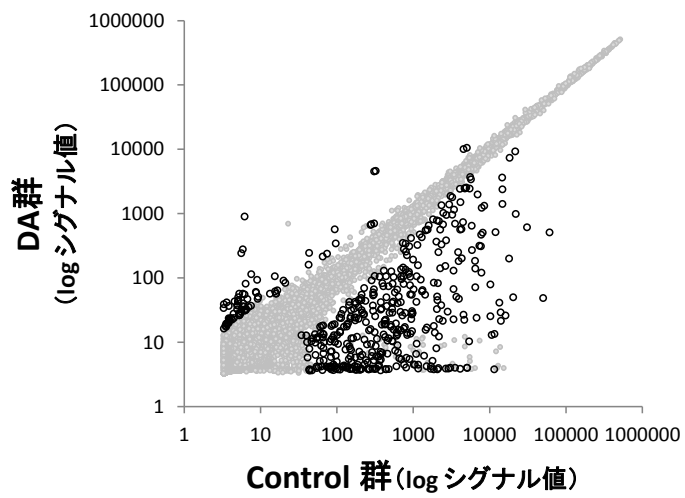


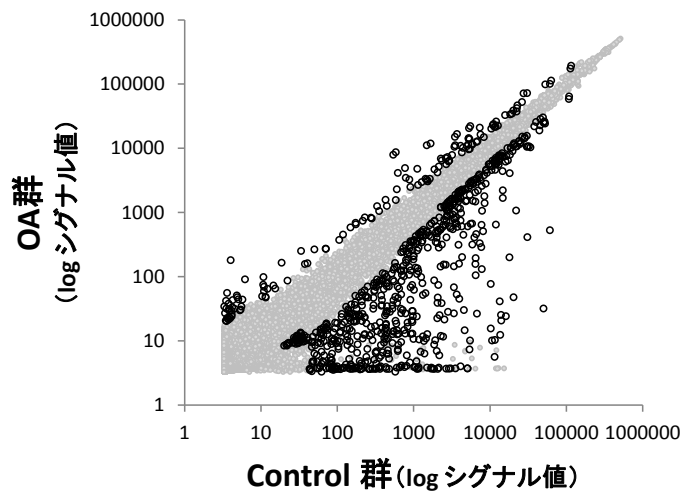
Figure 8. 遺伝子発現量の比較

A) NEA群とControl群のScatter plot

B) DA群とControl群のScatter plot

黒のドットは、Zscoreとratioの値から発現量が増減したと判定した転写産物を示す。

C)



D)

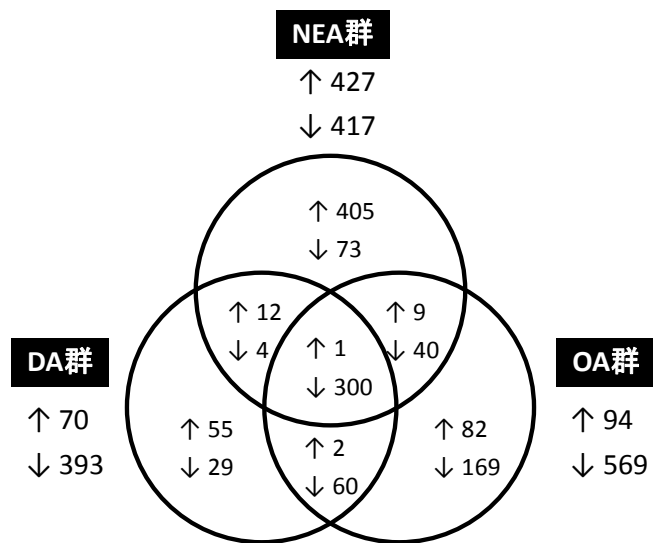


Figure 8. 遺伝子発現量の比較 (続き)

C) OA群とControl群のScatter plot

黒のドットは、Zscoreとratioの値から発現量が増減したと判定した転写産物を示す。

D) Control群と比較して発現量が増減した転写産物数を示したベン図

↑: 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。

円が重なっている部位は、重なっている群で発現量が増減した転写産物数を示す。

Table 15. Control群に比べて発現量が増減した転写産物の数

遺伝子	NEA群		DA群		OA群		NEA・DA・OA群に共通	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
生体アミン	0	0	0	0	0	0	0	0
感覚器	1	7	0	1	0	3	0	1
概日リズム	0	0	0	1	0	1	0	0
免疫	13	14	3	5	4	30	0	4
代謝	10	13	3	15	3	34	0	11
分解・消化	3	12	3	5	1	10	0	4
酸化還元・ストレス応答	13	16	4	12	8	18	0	8
輸送	7	11	0	8	4	14	0	6
複製・転写・翻訳	3	9	0	8	2	8	0	7
細胞骨格・構造	55	1	3	3	1	5	0	0
リボソーム複合体	1	2	1	3	2	4	0	2
その他の機能	74	81	18	91	23	140	1	67
機能未知	247	248	33	241	45	302	0	190
非タンパク質コード	0	3	2	0	1	0	0	0
計	427	417	70	393	94	569	1	300

Up: Control群に比べて発現量が増加した転写産物

Down: Control群に比べて発現量が減少した転写産物

3. 宿主探索行動を抑制するツールの標的となる遺伝子候補の選定

(a) 実験方法

本研究において、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。そこで、NEA 群、DA 群、OA 群に共通した挙動を示す 301 個の転写産物（発現量増加：1 個、発現量減少：300 個）のうち、蚊に特異的な配列をもつ転写産物を選出した。蚊に特異的な配列をもつ転写産物の選出は、ESTs (AalbF1.0) を参照した。

(b) 実験結果

蚊に特異的な配列をもつ転写産物を選出した結果、NEA・DA・OA 群で発現量が増加した 1 個は、昆虫に保存された配列に含まれることが明らかとなった。NEA・DA・OA 群で発現量が減少した 300 個は、蚊に特異的な配列をもつ転写産物が 156 個存在した (Figure 9)。この 156 個の転写産物の中に、宿主探索行動を抑制する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。また、この 156 個の転写産物の中に、次世代シーケンサーの結果から雌蚊に特徴的であることが推測された転写産物が 1 個含まれた。これは、機能未知の遺伝子であった。この遺伝子は、宿主探索行動を制御する遺伝子候補として有力であることから、宿主探索行動を抑制するツールの標的候補になる可能性が高いと考えられた。

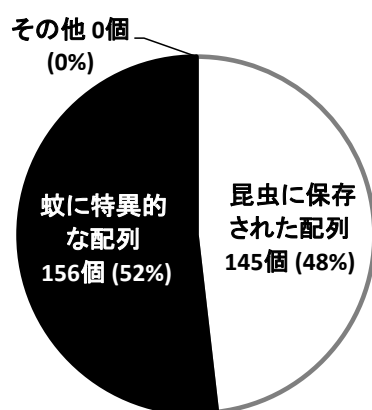


Figure 9. NEA・DA・OA群に特徴的な転写産物に含まれる蚊に特異的な配列をもつ転写産物の割合

第5節 小括

本章では、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た。その結果、宿主探索行動を制御する遺伝子候補を選出した。そして、その中に蚊に特異的な遺伝子があることを明らかにし、蚊に特異的な宿主探索行動を抑制するツールが創出できる可能性を示した。

雌蚊の宿主探索行動は、吸血後に減少する³⁷。ネッタイシマカにおいて、吸血後に発現量が増減する遺伝子のデータベースが構築されている³⁸。興味深いことに、本章で示したツールの標的候補となりうる遺伝子の中に、ネッタイシマカで吸血後に発現量が減少する遺伝子が6個含まれていた。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、宿主探索行動を行わないかあるいは減少する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。

これまでに、宿主探索行動を制御する遺伝子として、匂い結合タンパク質 (Odorant binding protein; OBP) である OBP37 および OBP39 がある³⁹。これらの遺伝子は、Control 群と NEA 群で発現量が増減した転写産物の中に含まれた。しかし、Control 群と DA 群あるいは OA 群で発現量が増減した転写産物の中には含まれなかった。これは、DA と OA による宿主探索行動の制御が OBP37 や OBP39 とは異なる遺伝子によって引き起こされていることを示しており、これまでに報告のない宿主探索行動を制御する遺伝子を明らかにできることが期待された。

本章で選出した、301 個の宿主探索行動を制御する遺伝子候補の中に、宿主探索行動へ関与することが報告されている遺伝子はなかった。今後、これら遺伝子について逆遺伝学的な手法を用いることで、宿主探索行動を制御する遺伝子の特定とその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につながることが期待された。

第1章から、宿主探索行動を制御する機構は DA と OA で異なることが示唆された。このため、DA 群と OA 群でマイクロアレイの結果を比較した (「実験の部 II. 実験方法 17. 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査」参照、Figure S10)。その結果、DA 群で発現量が増減した転写産物は、その大部分が OA 群で発現量が増減した転写産物と重複していることが明らかとなった。したがって、DA と OA による宿主探索行動の制御は、最終的に同じ遺伝子の発現量が増減することで機能することが示唆された。

また、本章では、ヒトスジシマカマイクロアレイを作製することを目的として、22,335 個の配列情報を有する、ヒトスジシマカ転写産物の塩基配列データベース ESTs (AalbF1.0) を構築した。この ESTs (AalbF1.0) は、① ヒトスジシマカゲノム解析から

推定されたヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 にない転写産物を有する、② 蚊に特異的な配列をもつ転写産物を有する、③ 多様な遺伝子由来の転写産物を有するという特徴を持ち、独創的なデータベースであることを示した。さらに、次世代シーケンサーの結果から、ESTs (AalbF1.0) は、宿主探索行動を制御する可能性の高い遺伝子の転写産物情報を有することを示した。以上のことから、このデータベースに基づいて作製したマイクロアレイは、① ゲノムプロジェクトで報告のない遺伝子を検出できる、② ツールの標的となる蚊に特異的な遺伝子を検出できる、③ 多様な遺伝子の発現量を検出できるといった特徴を持つことが期待された。

ヒトスジシマカと近縁種であるネッタイシマカでは、ゲノムプロジェクトで推定された遺伝子や転写産物の情報を基に、これまでに多数のマイクロアレイが作製されている²⁶。本章第2節、第3節で ESTs (AalbF1.0) の配列について、ネッタイシマカゲノムおよび転写産物に対する相同性を検討した。その結果、相同性を示す配列数は多いが、その配列の一致率は、ヒトスジシマカと比較して約 10%程度低かった (Table 8、Table 9、Figure 5、Figure 6A)。マイクロアレイは、塩基配列の相同性を利用して遺伝子の発現量を検出する。このため、本章で作製したヒトスジシマカマイクロアレイは、ネッタイシマカマイクロアレイに比べ、ヒトスジシマカの遺伝子発現量解析に特化したアレイであると考えられた。

総括ならびに結論

本論文は、蚊媒介性感染症の予防を目指し、雌蚊に特徴的な行動である宿主探索行動の制御に着目した。そして、その制御機構を解明するため、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、発現量が増減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。

以下に、本研究で得られた結果を要約して示す。

第1章 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響

- 1) L-DOPA を処置すると DA 量が有意に増加した。
- 2) OA を処置すると OA 量が有意に増加した。
- 3) DA 量あるいは OA 量を増加したとき、雌蚊の宿主探索行動は減少した。
- 4) DA 量あるいは OA 量を増加したとき、雌蚊の交尾率や餌摂取量は増減しなかった。
- 5) 宿主探索行動を行う群と宿主探索行動を行わないかあるいは減少した群という、宿主探索行動における表現型が異なる 4 つの群を作製した。

第2章 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

- 1) 次世代シーケンサーを用いるほか、ダイレクトシーケンス、NCBI からのダウンロードによりヒトスジシマカ転写産物の塩基配列を取得し、マイクロアレイ作製に用いる塩基配列群 AalbF1.0 を選出した。
- 2) AalbF1.0 は、ヒトスジシマカゲノム解析から推定されたヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 にない塩基配列、蚊に特異的な塩基配列、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相同性解析により明らかにした。
- 3) 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が、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析の結果から示唆された。
- 4) AalbF1.0 の各配列に 2)、3) の情報を付加し、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 ESTs (AalbF1.0) を構築した。
- 5) 構築した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た。
- 6) ヒトスジシマカマイクロアレイを用いて、宿主探索行動に合わせて発現量が増減する転写産物を検出した。
- 7) 6) の転写産物の中に、宿主探索行動を行わないか減少した群に共通して発現量が増減する 301 個の転写産物が含まれた。

- 8) 7) の転写産物の中に、宿主探索行動への関与が報告されている遺伝子に由来する転写産物は含まれなかった。
- 9) 7) の転写産物の中に、蚊に特異的な配列を有する転写産物が含まれた。

以上の結果から、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、これら候補遺伝子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。

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¹⁾。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⁴⁰⁾。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。

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可能性があるため、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。これに対し、本研究は、1) 蚊に特異的な遺伝子に由来するタンパク質を標的とし、蚊に選択的である、2) 宿主ではなく蚊を作用点とする、という新しい特性をもったツールの創出を目指している。したがって、本研究は、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。

実験の部

I. 実験材料

1. 使用した蚊

使用したヒトスジシマカは、福岡大学 3 号館裏においてヒューマンバイト法で採集し、室内で継代飼育した。

2. 宿主探索行動の測定に使用したマウス

ペントバルビタール (5 mg/mL) の腹部投与により、麻酔を施した BALB/c 雌マウス (九動株式会社) を用いた。投与量は一回に 200 μ l とした。

3. 試薬

(a) 蚊の幼虫期の餌

マウスのペレットを粉砕したものと乾燥酵母を等量混合した。餌は、室温保存した。

(b) 3% スクロース

スクロース 15 g をイオン交換水で溶解し、500 mL にメスアップした。調製後、冷蔵保存した。

(c) 3.5mM L-8-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

L-DOPA (ナカライテスク) 21 mg を 3%スクロースで溶解し、30 mL にメスアップした。その後、ボルテックスで十分に攪拌して溶解させた。調製後、冷蔵保存した。

(d) 30mM OA

(\pm)-Octopamine hydrochloride (sigma) 170.68mg を 3%スクロースで溶解し、30 mL にメスアップした。その後、ボルテックスで十分に攪拌して溶解させた。調製後、冷蔵保存した。

(e) ペントバルビタール (5 mg/mL)

ペントバルビタール 50 mg を生理食塩水 10 mL に溶かして調製した。

(f) 0.1M Perchloric acid (PCA)

70% PCA (和光純薬) 429.5 μ l を超純水で 50mL にメスアップした。その後、ボルテックスで十分に攪拌した。調製後、室温保存した。

(g) 0.1N 塩酸

500mL 滅菌瓶に超純水 480mL を入れ、濃塩酸 (12N、和光純薬) 4mL を加え十分に攪拌した。調製後、室温保存した。

(h) 0.02M 酢酸

200mL 滅菌瓶に酢酸 (和光純薬) 1.14mL を加え超純水で 200mL にメスアップし、0.1M 酢酸を調製した。次に、50mL チューブに超純水 40mL を入れ、調製した 0.1M 酢酸を 10mL 加え十分に攪拌した。調製した 0.1M 及び 0.02M 酢酸は、室温保存した。

(i) HPLC 用 1ng/ μ l DA、OA、3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) 標準液

50mL チューブに各試薬を 2.5mg に相当する補正した量を入れ、0.1N HCl 25mL でメスアップし十分に攪拌し 100ng/ μ l 標準液を調製した。次に、1.5mL チューブに 0.02M 酢酸を 990 μ l 加えた。そして、100ng/ μ l 標準液を 10 μ l 加えボルテックスで十分に攪拌し 1ng/ μ l 標準液を調製した。調製した 100ng/ μ l 標準液は、遮光して-80℃保存した。1ng/ μ l 標準液は、遮光して冷蔵保存した。

各試薬は、塩化物塩であるため以下のように補正して用いた。

《補正》

	分子量	Free の分子量	2.5mg 相当量
DA	189.64	153.18	3.10mg
OA	189.64	153.18	3.10mg
DHBA	220.06	139.15	3.95mg

(例) DA の場合

$$2.5 \text{ mg DA} \rightarrow 2.5 \times 189.64 / 153.18 = 3.10 \text{ mg DA} \cdot \text{HCl}$$

(j) HPLC 用ホモジナイズ溶液

1.5mL チューブに 0.1 M PCA を 990 μ l 加えた。その後、1ng/ μ l

3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) 10 μ l を加え、ボルテックスで十分に攪拌した。そして、使用するまで冷蔵庫で遮光保存した。HPLC 用ホモジナイズ溶液は、用時調製した

(k) HPLC の移動相

以下の組成で調製した。

0.1M 酢酸ナトリウム-クエン酸溶液 (pH 5.0)	80%
HPLC 用メタノール (ナカライテスク)	20%
1-ドデカンスルホン酸ナトリウム	130mg/L

(l) 0.1M 酢酸ナトリウム-クエン酸溶液 (pH 5.0)

0.1M 酢酸ナトリウム溶液と 0.1M クエン酸溶液を適量混合して pH5.0 に調整した。

(m) 0.1M 酢酸ナトリウム溶液

酢酸ナトリウム・無水 (和光純薬) 8.203 g を超純水で溶解し、1 L にメスアップした。

(n) 0.1M クエン酸溶液

クエン酸・一水和物 (和光純薬) 21.014 g を超純水で溶解し、1 L にメスアップした。

(o) Phosphate Buffered Saline (PBS) (-)

10×PBS (-)を超純水で希釈し、1×PBS (-) にして使用した。10×PBS (-)は以下の組成で調製した。

NaCl	80g
KCl	2g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	36.3g
リン酸二水素カリウム	2.4g
超純水で 1L にメスアップした (10N 塩酸で pH7.4 に合わせた。)	

(p) 0.01 % ブリリアントブルーFCF を混ぜた 3% スクロース、3.5mM L-DOPA、および 30mM OA

ブリリアントブルーFCF を 3% スクロースで溶解し、1% ブリリアントブルーFCF を調製した。50mL チューブに 3% スクロース、3.5mM L-DOPA、30mM OA を 29,700μl 入れた後、1% ブリリアントブルーFCF 300μl を加えボルテックスで十分に攪拌した。各試薬は、用時調製した

II. 実験方法

1. ヒトスジシマカの飼育

採取した蚊は、日照時間 light/dark 16h (AM 10:00～) /8h (AM 2:00～) 湿度 70± 10% RH、温度 27 ± 2℃に設定したインキュベーター内で継代飼育した。継代は、実験に使用した群とは別に、継代用の群を作製した。

(a) 卵の孵化

縦横深さ 23×33×5cm のバットに脱塩素した水道水（水道水を 1 日程インキュベーター内に静置したもの）を適当量入れた。次いで、蚊の卵のついた紙と少量の幼虫用餌をバットに入れ半日～1 日静置した。

(b) 幼虫期～蛹期（1 齢幼虫は卵を水に浸してから半日～1 日で出現する。）

蚊の幼虫期用の餌を毎日適量与えた。蛹化した個体は駒込ピペットを用いて回収した。シャーレの蓋にコットンを敷き、その上に蛹を並べ、飼育用ケージ（20×20×30cm）内に静置した。

(c) 成虫期

羽化した成虫には、餌として 3%スクロースを飼育用ケージ内に静置した。3%スクロースは、小瓶に詰めた綿に 3%スクロースを染み込ませて与えた。

(d) 産卵期

吸血は、雌雄蚊を同ケージに入れ 2 日以上経ってから行った。吸血から 2、3 日後に飼育用ケージ内に卵回収用容器を約 1 日設置し、卵を回収した。卵回収用容器は、茶色い容器に脱塩素した水道水を入れ、容器の内側にキムタオルを巻いたものを用意した。回収した卵は、飼育用ケージの外で更に一日、回収容器に入れたまま静置した。その後、回収容器から卵のついたキムワイプを取り出し、乾燥させた。乾燥した卵は、湿度 70± 10% RH、温度 27 ± 2℃に設定したインキュベーター内で保存した。保存した卵は、3 ヶ月以内に使用した。

2. 実験に使用した蚊の群の作製

蛹期に実体顕微鏡下で尾の形態学的違いを基に雌雄に分離し、紙コップに移してそれぞれ羽化させた（Figure S1）。この時使用した紙コップは、中にコットンを敷き、蛹を並べた後、実験用ケージと同様の布にて蓋をした。同日に羽化した成虫蚊は、吸虫管を用いて雌雄各 100 匹となるように、実験用ケージ（20×20×30cm）に移した。そして、羽化直後から、3%スクロース、3.5mM L-DOPA、30mM OA

を実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。

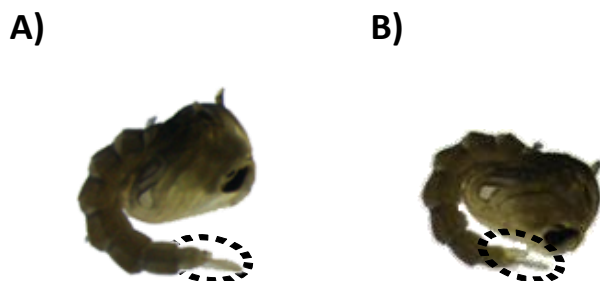


Figure S1. 蛹における雌雄の区別
A) 雌、B) 雄

3. 薬剤処置による生存率への影響の検討

(a) 薬剤処置濃度の決定

(a-1) 実験方法

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。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（補正死亡率 = $\{(\text{薬剤処理区の死亡率}) - (\text{対照区の死亡率})\} / \{100 - (\text{対照区の死亡率})\}$ ）、補正死亡率から生存率を求めた（生存率 = $1 - \text{補正死亡率}$ ）⁴¹。その後、算出した生存率からシグモイド曲線を作成し、LC50 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 回繰り返し行なった。

(a-2) 実験結果

L-DOPA を処置した群は、全ての濃度で死亡率の低化は認められず、LC50 は算出できなかった (Figure S2A)。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 (Figure S2B)。以上の結果から、L-DOPA 処置濃度は 3.5mM、OA 処置濃度は 30mM に決定した。

(b) 薬剤処置による生存率への影響

(b-1) 実験方法

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（以下 Control 群）、3.5mM L-DOPA（以下 DA 群）、30mM OA（以下 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。検討は、6 回繰り返し行った。

(b-2) 実験結果

DA 群の生存率は、100.0%だった。OA 群の生存率は、99.9%だった。以上の結果から、薬剤処置によって生存率への影響はないものとし、以降の実験は、L-DOPA 処置濃度は 3.5mM、OA 処置濃度は 30mM とした。

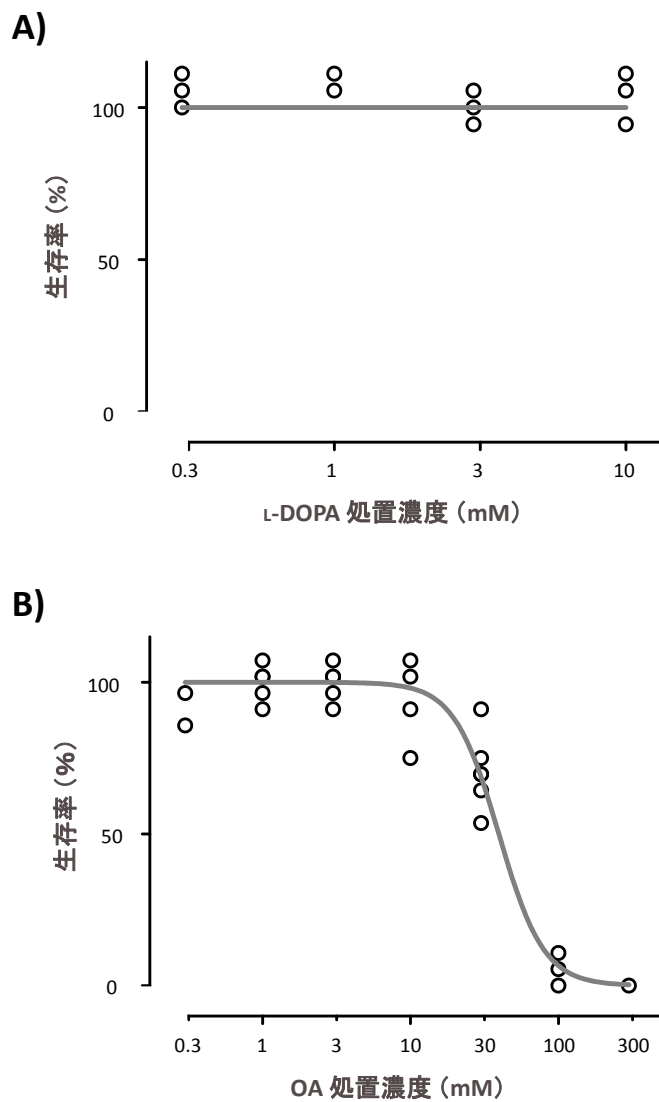


Figure S2. 薬剤処置濃度と生存率の関係
A) L-DOPAの処置、B) OAの処置

4. HPLC を用いた DA 及び OA 量の測定

DA および OA 量の測定は、引用文献^{42,43}を参考にした。

(a) DA・OA 量の測定にむけた検量線の作成

(a-1) 実験方法

1.5mL チューブに 0.02M 酢酸を 980 μ l 加えた。その後、100ng/ μ l DA、OA 標準液を各 10 μ l ずつ加えボルテックスで十分に攪拌し、1ng/ μ l DA・OA 混合標準液を調製した。次いで、新しい 1.5mL チューブに 0.1M PCA を 990 μ l 加えた後、1ng/ μ l DA・OA 混合標準液を 10 μ l 加えて 10pg/ μ l DA・OA 混合標準液を調製した。Table S1 に従い、調製した 10pg/ μ l、1ng/ μ l DA・OA 混合標準液および 1ng/ μ l DHBA 標準液を混合し、10 pg/ μ l DHBA 中に DA と OA が 0、1、2、5、10、20 pg/ μ l となるように検量線用標準液を調製した。検量線用標準液 20 μ l を HPLC に注入した。測定条件は、Table 1 に示す（「第 1 章 第 1 節 薬剤処置による雌蚊の DA と OA 量の増加」参照）。得られたクロマトグラムから DA、OA、DHBA のピーク面積を求め、内部標準法を用いて検量線を作成した。

Table S1. 検量線用標準液の調製

DA・OA濃度 (pg/ μ l)	0	1	2	5	10	20
DA・OA / DHBA 比	0	0.1	0.2	0.5	1	2
1ng/ μ l DA・OA	—	—	—	—	10 μ l	20 μ l
10pg/ μ l DA・OA	—	100 μ l	200 μ l	500 μ l	—	—
1ng/ μ l DHBA	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
0.1 M PCA	990 μ l	890 μ l	790 μ l	490 μ l	980 μ l	970 μ l
Total volume	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

(a-2) 実験結果

DHBA に対するピーク面積比と量比から検量線を作成した結果、良好な直線関係を得た (DA: $R^2 = 0.9983$ 、OA: $R^2 = 0.9949$ 、Figure S3A、3B)。

(b) サンプルの調製と測定

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、パイオマッシャー II (ニッピ) を用いてホモジナイズした。その後、15000rpm、4°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。

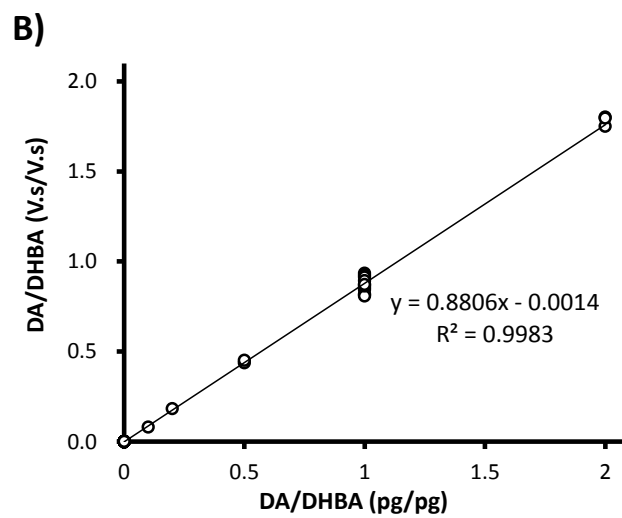
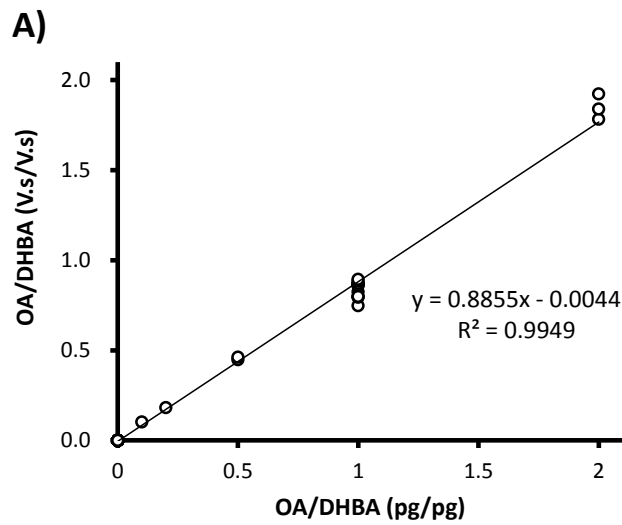


Figure S3. DA・OA量の測定にむけた検量線

A) DA、B) OA

5. 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 $70 \pm 10\% \text{ RH}$ 、温度 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 (「第 1 章 第 2 節 DA と OA が宿主探索行動へ及ぼす影響」参照、Figure 3A)。その後、ペントバル

ビタールにより麻酔を施した 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 (Figure S4)。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 (雌蚊の宿主探索行動 (%) = (マウスに誘引された雌蚊数) / (ケージ内の雌蚊総数) × 100)。



Figure S4. 宿主探索行動の測定

6. 雌蚊の交尾の確認

雌蚊に氷麻酔を施した後、スライドグラス上に適量 (米粒大) の PBS (-) 溶液を滴下し、PBS (-) 上に麻酔下の雌蚊を置いた。そして、実体顕微鏡下、虫ピンを用いて雌蚊の尾部より貯精嚢を取り出した。取り出した貯精嚢は、正立顕微鏡 (400 倍) にて精子の有無を観察した。精子が観察された個体は、交尾ありと判定した。交尾率は、交尾の確認を行った雌蚊数あたりの交尾ありの雌蚊数の百分率として算出した。

7. 餌摂取量の測定

ショウジョウバエにおいて、餌にブリリアントブルーを混ぜて与え、餌摂取量を測定する方法がある⁴⁴。同様の方法を用いて、雌蚊の餌摂取量を測定した。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 2 日目に 0.01 %ブリリアントブルーFCF を混ぜた 3% スクロース、3.5mM L-DOPA、30mM OA を実験用ケージ内にそれぞれ設置した。そして、羽化後 3 日目に雌蚊を回収した。回収

した雌蚊は、2匹ずつ全身を PBS (-) 100 μ l に入れホモジナイズした。ホモジナイズ液は、15000rpm 15min で遠心し、その上清 90 μ l を 96well プレートに移した。そして、Immuno Mini NJ-2300 で吸光度を測定した。波長は、630nm を使用した。

8. 次世代シーケンサーを用いたヒトスジシマカの塩基配列決定

本研究は、次世代シーケンサーGS Junior (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いてシーケンスを行った (Figure S5)。

(a) mRNA の調製

各サンプルは、Table S2 に示す匹数を回収した。そして、適当な匹数ずつ ISOGEN (ニッポンジーン) 1mL に入れた。このとき、幼虫および蛹は、水中から駒込ピペットを用いて回収し、超純水で3回洗浄した後 ISOGEN に入れた。成虫頭部は、氷麻酔下で頭部を切り出し、ISOGEN に入れた。

ISOGEN に入れたサンプルをバイオマッシャー II (ニッピ) を用いてホモジナイズした後、ISOGEN のプロトコールに従い Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA は、DNase I (QIAGEN) で処理した後、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した Total RNA は、Nano drop 2000 (Thermo) を用いて濃度を測定した。次いで、Oligotex -dT30 <Super> mRNA Purification Kit (タカラバイオ) を1-3回繰り返し使用し、mRNA を抽出した。抽出した mRNA は、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technology) を用いて、rRNA の混入率を確認した。

本研究で調製した mRNA の rRNA 混入率を Table S3 に示す。なお、幼虫、蛹、成虫雌全身のサンプルは、mRNA を2回調製した。このうち、成虫雌全身のサンプルのうち1つは、バイオアナライザを使用できなかったため rRNA 混入率は未測定である (Table S3 中で「未」と表示した。)。この mRNA を用いて「第2章 第1節 1. 次世代シーケンサーGS junior を用いたシーケンス」を実施した。

(b) 次世代シーケンサーGS Junior を用いたシーケンス

GS Junior (ロシュ・ダイアグノスティックス) のマニュアルに従い、mRNA から cDNA ライブラリーを作製した。作製したライブラリーは、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technology) を用いてサイズ分布を確認した後、ミニフルオロメーターQUANTIFLUOR™-ST (Promega) を用いて定量した。そして、GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L) (Roche) または GS Junior+ emPCR Kit (Lib-L) (Roche) を用いてエマルジョン PCR を行った。エマルジョン PCR 後、DNA ライブラリービーズを回収し、GS Junior を用いてシーケンスした。

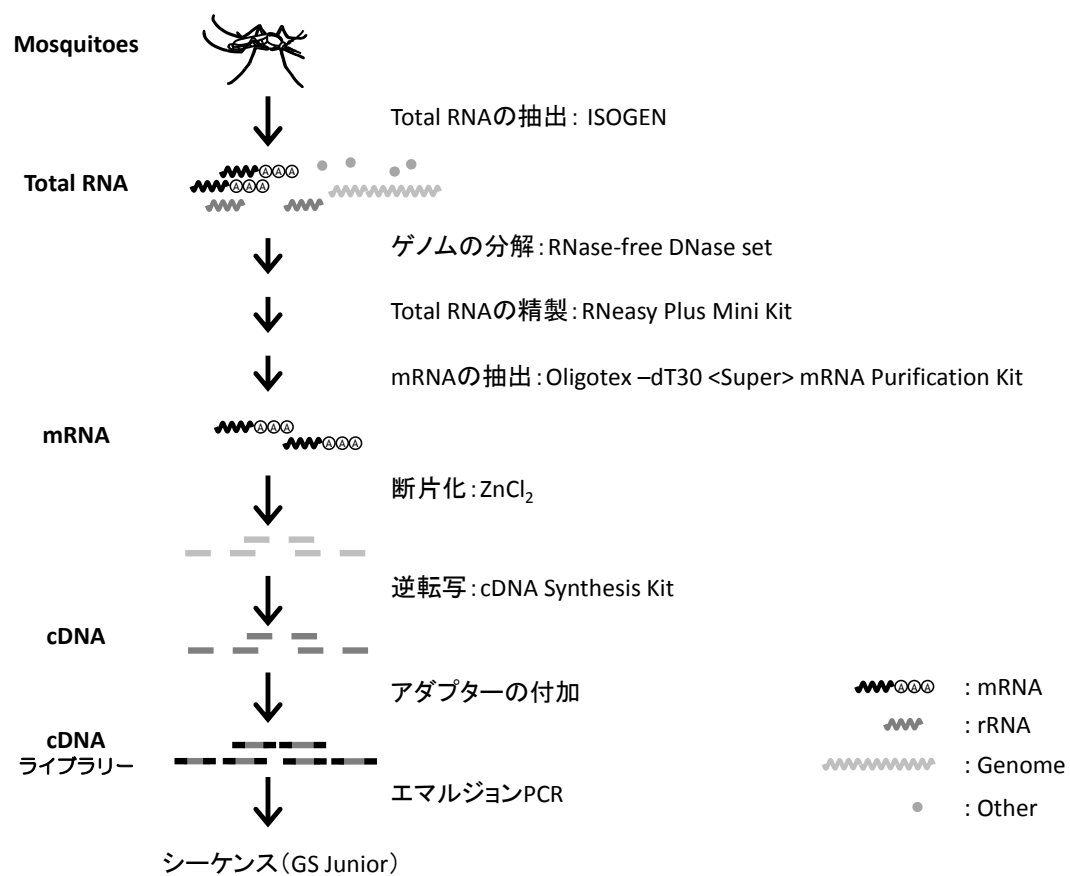


Figure S5. 次世代シーケンサーを用いたシーケンスの流れ

Table S2. シーケンスのために用意したサンプルの種類と匹数

	発育ステージ	性別	部位	サンプル名	サンプル名(略称)	匹数
幼虫	1 齢	混合	全身	1 st Larva	L1	2000
	2 齢	混合	全身	2 nd Larva	L2	400
	3 齢	混合	全身	3 rd Larva	L3	100
	4 齢	混合	全身	4 th Larva	L4	100
蛹	蛹化後0日目	♀	全身	Pupa day0 female	P0F	100
		♂	全身	Pupa day0 male	P0M	100
	蛹化後1日目	♀	全身	Pupa day1 female	P1F	100
		♂	全身	Pupa day1 male	P1M	100
成虫	羽化後0日目	♀	全身	Adult day0 female	A0F	30-90
		♀	頭部	Adult day0 female head	A0F-H	650
		♂	頭部	Adult day0 male head	A0M-H	1020
	羽化後6日目	♀	全身	Adult day6 female	A6F	30-90
		♀	頭部	Adult day6 female head	A6F-H	650
		♂	頭部	Adult day6 male head	A6M-H	1020

Table S3. シーケンスのために調製したmRNAのrRNA混入率

サンプル名	rRNA混入率(%)
L1	2.9、3.1
L2	3.6、5.6
L3	3.4、4.8
L4	3.0、6.6
P0F	5.4、5.6
P0M	6.5、22.5
P1F	6.6、12.8
P1M	6.4、7.6
A0F	未、11.5
A0F-H	10.9
A0M-H	11.1
A6F	2.9
A6F-H	5.9
A6M-H	4.7

(c) 次世代シーケンサーから取得したリードの *De novo* assembly

De novo assembly を行うプログラムは、CLC Genomics Workbench v8.1 (以下 CLC) および MIRA 4.0.2 (以下 MIRA)、Newbler、CAP3、SeqMan NGen と様々なものが存在するが⁴⁵、本実験では、アルゴリズムの異なる CLC Genomics Workbench v8.1 と MIRA 4.0.2 の 2 つのプログラムを用いた。

CLC Genomics Workbench v8.1 を用いた *De novo* assembly

次世代シーケンサーを用いて取得したリードに対し、CLC Genomics Workbench v8.1 の Remove duplicate reads ツールを使用してエマルジョン PCR の過程で PCR が異常にかかった重複配列を除去した。次いで、クオリティスコアおよびリードの配列長を基にトリミングを行った (Trim using quality scores Limit = 0.05、リードの 5'および 3'末端から除去した塩基数 = 15、除去したリード配列の断片長 < 30)。トリミング後のリードは、*De novo* assembly ツールを使用して *De novo* assembly を実行した (Word size = 21、Bubble size = 307、Minimum contig length = 100) (Figure S6)。これら一連の流れは、CLC user manual を参考にした。*De novo* assembly 後に出力されたコンティグとシングルトンを以下 Sequences (CLC) と称した。

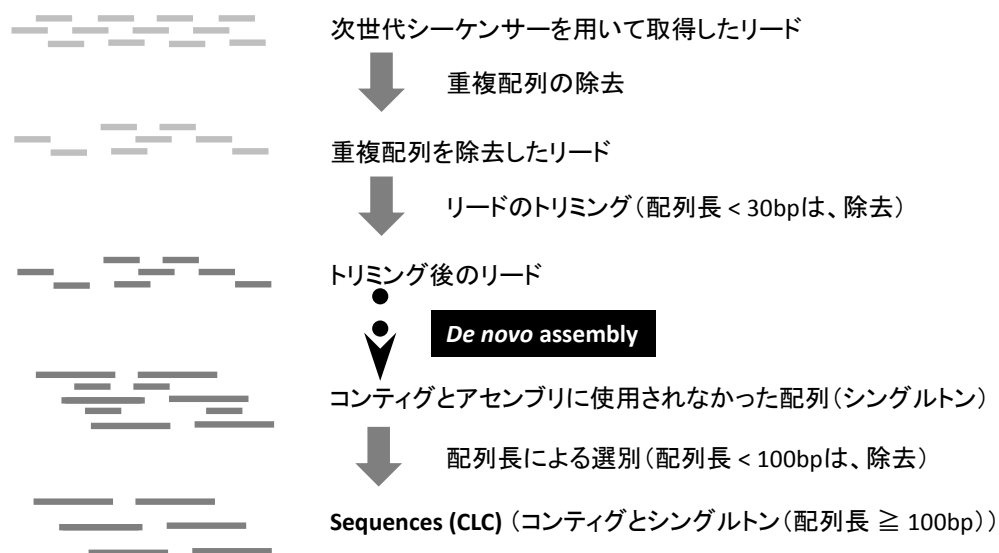


Figure S6. CLC Genomics Workbench v8.1を用いた*De novo* assembly

MIRA4.0.2 を用いた *De novo* assembly

MIRA 3rd party tool の sff_extract 0.3.0 を使用して、次世代シーケンサーを用いて取得したリードから、アダプターのタグ配列のシーケンスにおいて 3 塩基以上

シーケンスエラーを呈している配列を除去した（処理 1）。次いで、処理 1 後のリードについて、**blastn** 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、ネッタイシマカ **rRNA** およびミトコンドリアに由来する塩基配列を用い、**E-value** の閾値は 10 とした。そして、ネッタイシマカ **rRNA** およびミトコンドリアと相同性がある配列を除去した（処理 2）。最後に、ネッタイシマカ **rRNA** およびミトコンドリアの配列が特に多く含まれていた、羽化後 0 日目の雌蚊全身及び蛹全身サンプル（蛹化後 0、1 日目の雌雄）のリードを処理 2 後のリードから除いた（処理 3）。これら処理 1–3 を施したリードは、**MIRA4.0.2** を使用して *De novo assembly* を実行した（Figure S7）。このとき、リードは、リード長 ≥ 40 、クオリティースコア ≥ 20 を使用した。パラメーターは、**GS Junior** をはじめとしたロシュ・ダイアグノスティックスの **454 Sequencing Systems** に推奨された値を設定した（Table S4）。*De novo assembly* 後に出力されたコンティグを以下 **Sequences (MIRA1)**（処理 1 のリードを使用）、**Sequences (MIRA2)**（処理 2 のリードを使用）、**Sequences (MIRA3)**（処理 3 のリードを使用）と称した。

Table S4. **MIRA4.0.2** で設定したパラメーター

設定項目	パラメーター
AS (Assembly options)	nop (Number of passes) = 5 ardct (Coverage threshold) = 2
SK (Parameters for SKIM algorithm)	not (Number of threads) = 32 bph (Bases per hash) = 21 mmhr (Max megahub ratio) = 0
HS (Parameters for Hash Statistics)	mnr (Mask nasty repeats) = yes
CO (Contig parameters)	asir (Assume SNP instead of repeats) = no
CL (Clipping options)	msvs ? msvsmfg(Max front gap) = 8 msvsmeg(Max end gap)=12
AL (Align parameters for Smith-Waterman align)	mo(Minimum overlap)=20

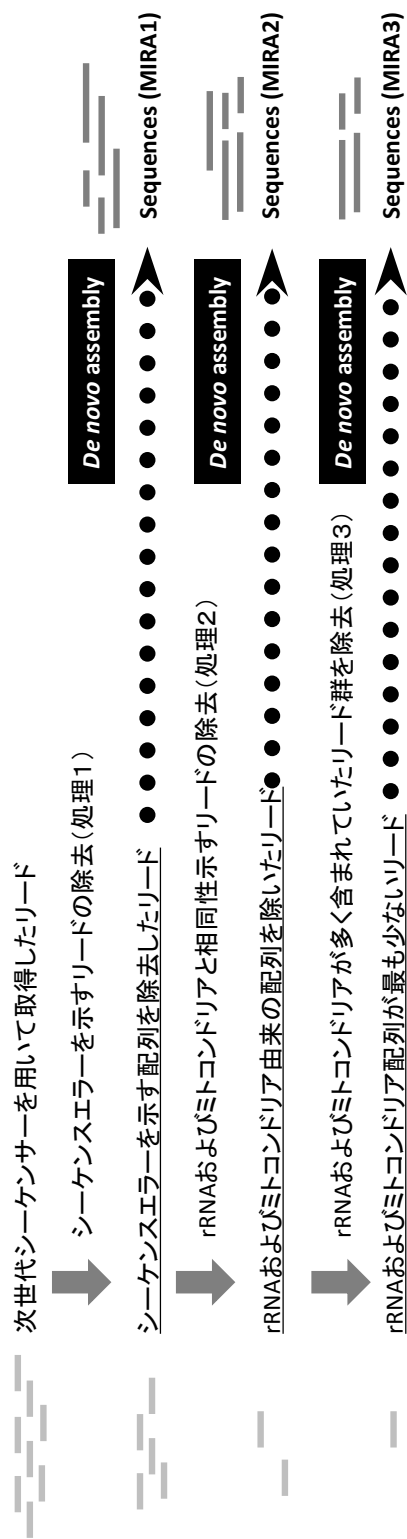


Figure S7. MIRA4.0.2を用いた*De novo* assembly

9. ダイレクトシーケンスによるヒトスジシマカ DA、OA 関連遺伝子の塩基配列決定

(a) ヒトスジシマカ cDNA の調製

氷麻酔下の雌蚊を ISOGEN (ニッポンジーン) に入れ、バイオマッシャー II (ニッピ) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズ後、ISOGEN のプロトコールに従い Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA は、DNase I (QIAGEN) で処理した後、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した Total RNA は、Nano drop 2000 (Thermo) を用いて濃度を測定した後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写し cDNA を調製した。

(b) 標的遺伝子の PCR を用いた増幅と PCR 増幅後の DNA の抽出

作製した cDNA を鋳型として KOD-Plus- (TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C 2 分の後、[98°C 10 秒、51 - 65°C 30 秒、68°C 1 分] の反応を 40 サイクル行った。PCR で使用したプライマーは、プライマー設計ソフト

(Primer3Plus) を用いて設計した (Table S5)。PCR 産物は、2%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、0.1 mg/ml エチジウムブロマイド溶液で染色した。紫外線下で DNA の検出を行い、各遺伝子の断片長に位置する増幅産物のゲルを切り出した。そして、MonoFas DNA purification Kit (GL Sciences)を用いて、ゲルから DNA を抽出した。

(c) ダイレクトシーケンス

抽出した DNA を鋳型として BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンス PCR を行った。シーケンス PCR は、96°C 1 分の後、[96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分] を 25 サイクル行った。シーケンス PCR 後、Ethanol/EDTA/Sodium Acetate 沈殿法により精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンスした。取得した塩基配列は、Geneious 6.1.6 を用いてコンセンサス塩基配列を作製した⁴⁶。

(d) 相同性解析

作製したコンセンサス塩基配列は、ネッタイシマカ遺伝子およびショウジョウバエ遺伝子の塩基配列に対してアライメントを行い、配列の一致率を確認した。このとき、Geneious 6.1.6 を用いた⁴⁶。

Table S5. ダイレクトシーケンスで使したPCRプライマー

遺伝子	プライマー名	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>TH</i>	Aalb TH_1	GACGTATCCTGAAGGCTGTCGA	GTCGGGTTCTGGTGTGTGGTAT
	Aalb TH_2	ACCGAAACCGAGAACAAGACCT	TCTGTGTTGAGCTGTGACACCA
<i>DDC</i>	Aalb DDC_1	ATCCAAACATGCCAGTCCCAGA	GGCGTAGAAAGGAATGAGGCCT
	Aalb DDC_2	ACGTCCAACCAATCCCCTCAT	GCTTCACTCAGGTCGTTGCTTC
	Aalb DDC_3	CGGCCGATTTCGTTCAACTCAA	GCAGCAATACGATTTTGCACAA
<i>NAT1</i>	Aalb NAT1_1	TAGTCTTCCGTCGTCGATTT	GCAATTTCAAGACTTCTCGGC
	Aalb NAT1_2	TTGGGTCGTATGGCTTCGAAGA	GCTTCTCCGGGTCGAAAACCTG
	Aalb NAT1_3	CTGATGATCCCCAGCAAAGCT	TCGTTTCATCGTAGCAGCTATTCCA
<i>ebony</i>	Aalb ebony_1	TCAGGTCATTGGACGCTCTACG	GGGTTAGCGGACTGGTGTAGT
<i>DAT</i>	Aalb DAT_1	CGCAACATCGAAACTGGCAA	GCGCTTTTGTCCAGTTCCAG
	Aalb DAT_2	CGATCCTTTGCAAACCGTTCGA	CAGCCGGATACACCACAAACAC
	Aalb DAT_3	GTGTTTTTCTCGTTGGGACCGG	GCGGGATCATGATCATGGAGG
<i>VMAT</i>	Aalb VMAT_1	AGAGCATTGCAGGGTATTGGGT	CACCAACATCCACTCGAAACCG
<i>Dop1</i>	Aalb Dop1	TTTCTCTCCGTAGCCGGTAA	GGCGGATACCTGTTTCGAGAT
<i>Dop2</i>	Aalb Dop2_1	AATAATGCAACTGACTTCTAC	GATATACGTCTGCTCGCAAGAG
	Aalb Dop2_2	ACGTGGTTCTTCGGTGAAGA	GTTTTGGCGGCCCTTCTTCTC
<i>Dop3</i>	Aalb Dop3_1	TGAACGGAGCGTGGACGTT	AGGGAATCTGCGTTGTCTGTT
	Aalb Dop3_2	ATTTATGTTGGCCACGGTCGTG	GACGAAGCTGTTTCATGTAGCCG
<i>DopEcR</i>	Aalb DopEcR_1	TCATCTTAGCGGTGCGCCATC	TCGGATTGGCCAGATTCTCG
	Aalb DopEcR_2	ACGTGCTATGTCCGATCGTC	TAGCCGGCCCTTGTTTAC
<i>Tdc1</i>	Aalb Tdc1_1	CGCATTCTTCGATCGAGAAGGC	GCTCGTAGGTGACACAAAACCG
<i>Tdc2</i>	Aalb Tdc2_1	GCAACTATCTGGAACGTTGGAGC	ACGGATGCTGCTGCTTGAGATA
	Aalb Tdc2_2	ATCGACTACGCCGATTCTGTTCA	GCAGATCCGGGAGTTTTTGGTG
<i>Tbh</i>	Aalb Tbh_1	CGGTGGAACGACGATTGGTG	CACGCACATCTCATCGCTGATC
<i>OAMB</i>	Aalb OAMB_1	TGCTGGCCATCCTCATCTTCAT	GAACAGCATCACGAACATGGGG
<i>Octb2R</i>	Aalb Octb2R_1	TCCTTCATGTGTGACGTGTGGA	GGGTTTCGTGCAGCCTTATGTTT
<i>Octb3R</i>	Aalb Octb3R_1	TTTGGACCGTTTATGTGCGACG	ACATCTCCGGGTTGTCCTTGAG

Table S5. ダイレクトシーケンスで使用したPCRプライマー(続き)

TH: Tyrosine hydroxylase, DDC: Dopa decarboxylase, NAT1: Dopamine N-acetyltransferase, DAT: Dopamine transporter, VMAT: Vesicular monoamine transporter, Dop1: Dopamine 1-like receptor 1, Dop2: Dopamine 1-like receptor 2, Dop3: Dopamine 2-like receptor, DopEcR: Dopamine/Ecdysteroid receptor, Tdc1: Tyrosine decarboxylase 1, Tdc2: Tyrosine decarboxylase 2, Tbh: Tyramine beta hydroxylase, OAMB: Octopamine receptor in mushroom bodies, Octb2R: Octopamine beta2 receptor, Octb3R: Octopamine beta3 receptor

10. National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されているヒトスジシマカ cDNA 塩基配列の取得

NCBI で公開されているヒトスジシマカ mRNA 配列を取得した

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/>)。加えて、3. ダイレクトシーケンスによる生体アミン関連遺伝子の塩基配列決定の結果から、生体アミン関連遺伝子はネッタイシマカとヒトスジシマカで塩基配列の一致率が高いことが示唆された。そこで、生体アミン関連の遺伝子を補うため、ネッタイシマカの生体アミン関連遺伝子の配列を取得した。取得した生体アミン関連遺伝子の Vector base の Gene ID を以下に示す。

DA 関連遺伝子 (12 個) : AAEL017098、AAEL014373、
AAEL014238、AAEL012952、
AAEL011088、AAEL010106、
AAEL008816、AAEL005834、
AAEL005793、AAEL003920、
AAEL002740、AAEL000266

OA 関連遺伝子 (8 個) : AAEL003462、AAEL006844、
AAEL005952、AAEL010856、
AAEL005945、AAEL018302、
AAEL014224、AAEL016990

セロトニン関連遺伝子 (9 個) : AAEL002717、AAEL005581、
AAEL008360、AAEL011844、
AAEL015553、AAEL016993、
AAEL017120、AAEL017162、
AAEL009573

11. ヒトスジシマカ cDNA 塩基配列内の重複配列の除去と AalbF1.0 の作製

次世代シーケンサーによるシーケンス、ダイレクトシーケンス、NCBI からのダウンロードによって取得した配列について、重複した配列を除去し、ヒトスジシマカ塩基配列群 (*Aedes albopictus* Fukuoka version 1.0; AalbF1.0) を作製した。

Sequences (CLC)、Sequences (MIRA1)、Sequences (MIRA2)、Sequences (MIRA3) 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、ネッタイシマカ配列を用い、E-value の閾値は 10 とした。相同性のあった配列は、ネッタイシマカ配列の Accession number によってグループ化し、グループ内で最もビットスコアの高い配列を選出した (以下 Sequences (blast))。ネッタイシマカ配列に対して相同性のなかった配列は、配列長の長いものから順に 5000 個選出した (以下 Sequences (5000))。

次に、Sequences (NCBI) 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、前述のネッタイシマカ配列を用い、E-value の閾値は 10 とした。相同性のあった配列は、ネッタイシマカ配列に付している Accession number によってグループ化した。そして、Sequences (blast) に存在しないグループについて、グループ内で最もビットスコアの高い配列を選出した。この選出した配列に、Sequences (PCR)を加え、Sequences (PCR+NCBI)とした。最後に、Sequences (blast)、Sequences (5000)、Sequences (PCR+NCBI)を一つにまとめ、AalbF1.0 を作製した (Figure S8)。

12. 昆虫ゲノムに対する相同性検索による AalbF1.0 の評価

AalbF1.0 について、blastn 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、ネッタイイエカ、ガンビエハマダラカ、ショウジョウバエのゲノム塩基配列を用い、E-value の閾値は 1E-10 とした。使用した昆虫ゲノム塩基配列は、NCBI から取得した (Table S6)。

各昆虫ゲノムに相同性を示した AalbF1.0 の配列数と配列の一致率を算出した。そして、AalbF1.0 の配列が、1) ヒトスジシマカゲノムの配列に最も多く相同性を示すこと、2) 相同性を示した配列はヒトスジシマカゲノムの配列と最も配列の一致率が高いことを確認し、AalbF1.0 がヒトスジシマカに由来する配列であることを評価した。

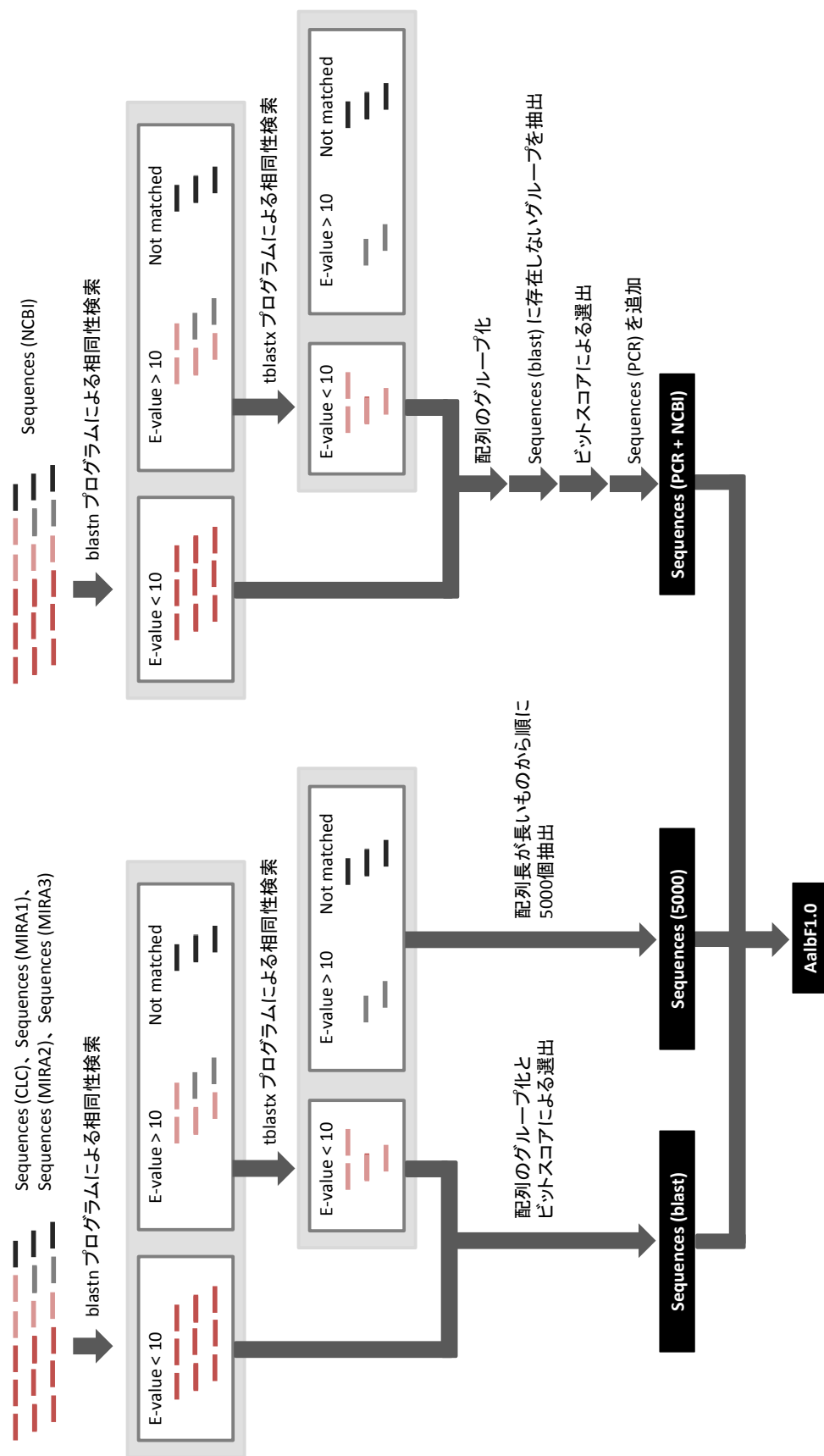


Figure S8. AalbF1.0の作製

Table S6. 相同性検索で使した昆虫ゲノム

種	Source	Version
ヒトスジシマカ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/45?genome_assembly_id=258452	A. albopictus v1.0
ネッタイシマカ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/44?genome_assembly_id=226612	AaegL2
ネッタイイエカ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/393?genome_assembly_id=28760	CulPip1.0
ガンビエハマダラカ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/46?genome_assembly_id=22679	AgamP3
ショウジョウバエ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/47?genome_assembly_id=204923	Release 6 plus

13. AalbF1.0 へのアノテーション付加

(a) 昆虫転写産物に対する相同性検索

(a-1) AalbF1.0 が保有する「AalbF1.0 に特徴的な配列」の確認

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、ゲノム解析により推定されたヒトスジシマカ転写産物（以下 AaloF1.1）ネッタイシマカ転写産物（以下 AaegL3.3）、ネッタイイエカ転写産物（以下 CpipJ2.2）、ガンビエハマダラカ転写産物（以下 AgamP4.3）、ショウジョウバエ転写産物（以下 Drmel Release 6 plus）を用い、E-value の閾値は $1E-10$ とした。蚊の転写産物の配列は、Vectorbase から取得し²⁶、ショウジョウバエの転写産物は、NCBI から取得した（Table S7）。相同性検索の結果から、ヒトスジシマカゲノムあるいは、他の蚊科の転写産物と相同性を示す一方で、AaloF1.1 と相同性を示さない配列を特定し、これを AalbF1.0 に特徴的な配列とした。これにより、ゲノム解析により推定されたヒトスジシマカ転写産物 AaloF1.1 と本研究で作製した AalbF1.0 が有する配列の違いを検討した。

(a-2) AalbF1.0 が保有する「蚊に特異的な配列」の確認

ヒトスジシマカのゲノム解析から推定された転写産物 AaloF1.1 の情報は、ネッタイシマカ転写産物 AaegL3.3 と比較して不足していることが推測された（「第2章 第3節 1. 昆虫の転写産物に対する相同性検索」参照）。そこで、ヒトスジシマカ以外の昆虫転写産物（AaegL3.3、CpipJ2.2、AgamP4.3、Drmel Release 6 plus）と、ヒトスジシマカゲノムとの相同性解析の結果に基づいて配列を分類した（Figure S9）。そして、AalbF1.0 が保有する「蚊に特異的な配列」を確認した。

(a-3) AalbF1.0 の各配列の遺伝子の推定

ネットアイシマカ、ネットアイエカ、ガンビエハマダラカの転写産物との相同性検索の結果に基づいて、AalbF1.0 の各配列の遺伝子を推定した。そして、AalbF1.0 の各配列を遺伝子の機能によって、生体アミン関連遺伝子、感覚器関連遺伝子、概日リズム関連遺伝子、免疫関連遺伝子、代謝関連遺伝子、分解・消化関連遺伝子、酸化還元・ストレス応答関連遺伝子、輸送関連遺伝子、複製・転写・翻訳関連遺伝子、細胞骨格・構造関連遺伝子、リボソーム複合体関連遺伝子、その他の機能の遺伝子、機能未知遺伝子、非タンパク質コード遺伝子に分類した。

Table S7. 相同性検索で使した昆虫転写産物

種	Source	Version
ヒトスジシマカ	https://www.vectorbase.org/transcriptomes	AaloF1.1
ネットアイシマカ	https://www.vectorbase.org/transcriptomes	AaegL3.3
ネットアイエカ	https://www.vectorbase.org/transcriptomes	CpipJ2.2
ガンビエハマダラカ	https://www.vectorbase.org/transcriptomes	AgamP4.3
ショウジョウバエ	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/47?genome_assembly_id=204923	Release 6 plus

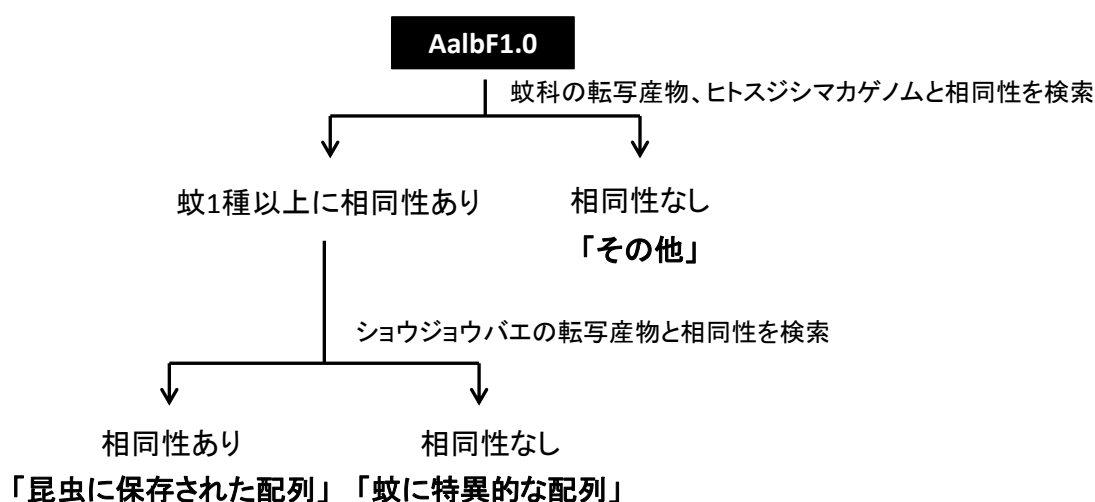


Figure S9. 相同性結果に基づく配列の分類

(b) 次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリードのマッピング

(b-1) AalbF1.0 に含まれる各配列の由来サンプルの確認

次世代シーケンサーで取得した 14 種類のサンプルに由来するリード（第 2 章 第 1 節 1. 次世代シーケンサーGS junior を用いたシーケンスを参照）をトリミングした（実験の部 II. 実験方法 8. (c) 次世代シーケンサーから取得したリードの *De novo assembly* を参照）。そして、トリミング後のリードをサンプル毎に AalbF1.0 にマッピングした。その後、AalbF1.0 の各配列を「由来サンプルが 1 種類のみである配列（L1 のみ、L2 のみ、L3 のみ、L4 のみ、P0F のみ、P0M のみ、P1F のみ、P1M のみ、A0F のみ、A0F-H のみ、A0M-H のみ、A6F のみ、A6F-H のみ、A6M-H のみ）」、「由来サンプルが複数の配列（L1 -L4 のうち 2 つ以上、P0F, P0M, P1F, P1M のうち 2 つ以上、A0F, A0F-H, A0M-H, A6F, A6F-H, A6M-H のうち 2 つ以上、異なる発育ステージのサンプル 2 つ以上）」、「由来サンプルが不明な配列（リードがマッピングしない配列）」に分類した。AalbF1.0 に対するリードのマッピングは、CLC Genomics Workbench v8.1 を用いた。

(b-2) AalbF1.0 が保有する「宿主探索行動に合わせて発現量が増減する転写産物」の確認

宿主探索行動を行わない L1、L2、L3、L4、P0F、P1F、A0F と宿主探索行動を行う A6F 由来のリードのマッピング結果をそれぞれ比較した。AalbF1.0 の各配列に特異的にマッピングしたリードの数をカウントし、算出された値に 0.01 を加えた。その後、quantile 法で正規化し、以降の遺伝子発現解析に使用した。発現量の増減は、Kal's Z-test によって得られた P-value と Proportions fold change によって判定した。P-value < 0.05 かつ |Proportions fold change| ≥ 1.5 を満たす転写産物を発現量が増減したと判定した。

(b-3) AalbF1.0 が保有する「雌蚊に特徴的な挙動を示す転写産物」の確認

A0F-H と A6F-H 由来のリードのマッピング結果を比較した。同様に A0M-H と A6M-H 由来のリードのマッピング結果を比較した。これにより、雌蚊と雄蚊において羽化後に発現量が増減する転写産物を選出した。その後、雌蚊と雄蚊で発現量が増減した転写産物を比較し、雄蚊と異なる挙動を示す転写産物を確認した。解析方法及び発現量の判定は、(b-2) と同様に行った。

14. マイクロアレイプローブの設計

実験の部 II. 実験方法 13 で得た情報を AalbF1.0 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（以下 Expressed sequence tags *Aedes*

albopictus Fukuoka version 1.0; ESTs (AalbF1.0))を構築した。そして、ESTs (AalbF1.0) の配列情報に基づき、eArray

(<http://www.genomics.agilent.com/en/Custom-Design-Tools/eArray/?cid=AG-P-T-122&tabId=AG-PR-1047>) を用いて、マイクロアレイのプローブを設計した。設計するプローブの長さは、60bp とした。構築した ESTs (AalbF1.0)のデータベース情報と、設計したプローブの配列は、福岡大学微生物薬品化学教室のデータサーバーに保存した。

15. マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

(a) 群の作製

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、3.5mM L-DOPA、30mM OA を実験用ケージ内に設置し、自由飲水させた。

3%スクロースを設置した実験用ケージから、羽化後 0 日目 (以下 Newly emerged adult; NEA 群) と 6 日目 (以下 Control 群) の雌蚊を回収した。次いで、3.5mM L-DOPA と 30mM OA を設置した実験用ケージから、羽化後 6 日目にそれぞれ雌蚊を回収した (それぞれ以下 DA 群、OA 群)。

(b) マイクロアレイに用いるサンプルの調製

各群の雌蚊頭部から ISOGEN を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA は、DNase I で処理した後、RNeasy Plus Mini Kit を用いて精製した。精製した Total RNA は、その後、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit, one-color を用いて逆転写およびラベル化を行い、シアニンラベル化 cRNA を調製した。

(c) ハイブリダイゼーションとシグナル値の取得

調製した cRNA は、ヒトスジシマカマイクロアレイへハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、Agilent 社のプロトコールに従った。その後、プローブ毎に蛍光を検出し、数値化してシグナル値を得た。取得したシグナル値は、quantile 法で正規化し、以降の遺伝子発現解析に使用した。発現量の増減は、シグナル値から算出した Zscore と ratio によって判定した。Zscore \geq 2.0 かつ ratio \geq 1.5 を満たす転写産物を発現量増加、あるいは、Zscore \leq -2.0 かつ ratio \leq 0.66 を満たす転写産物を発現量減少と判定した。

(d) マイクロアレイ実験の評価

ネッタイシマカとガンビエハマダラカにおいて、pupal cuticle protein (Vector

base Gene ID: AAEL011045)、pupal cuticle protein 78E (Vector base Gene ID: AAEL003259)をコードする遺伝子は、雌蚊の年齢を推定するときに指標となる遺伝子として報告されている³³。これら遺伝子は羽化後発現量が減少することが報告されている。そこで、この遺伝子について、ヒトスジシマカマイクロアレイで得られた発現量を確認した。そして、Control 群と比べて羽化直後の NEA 群で発現量が高いことを確認することで、作製したヒトスジシマカマイクロアレイによって、遺伝子の発現量を適切に検出できていると評価した。

(e) 宿主探索行動を制御する遺伝子の調査

(e-1) 宿主探索行動にあわせて発現量が増減する転写産物の把握

宿主探索行動を行う群 (Control 群) と宿主探索行動を行わないか減少した群 (NEA 群、DA 群、OA 群) で、シグナル値を比較した。発現量の増減は、シグナル値から算出した Zscore と ratio によって判定した。Zscore \geq 2.0 かつ ratio \geq 1.5 を満たす転写産物を発現量増加、Zscore \leq -2.0 かつ ratio \leq 0.66 を満たす転写産物を発現量減少と判定した。Control 群と比較し、発現量が増減した転写産物は、ESTs (AalbF1.0) の情報を基に遺伝子の機能毎に分類した。

また、第 1 章で DA と OA による制御機構が異なることが示唆されたため、遺伝子の機能毎に DA 群、OA 群で発現量に差がみられた転写産物を比較した (Figure S10)。その結果、OA 群は、免疫、代謝、その他の機能、機能未知の遺伝子に由来する転写産物で DA 群と異なる転写産物の発現変化が見られた。対して、DA 群は、その他の機能、機能未知の遺伝子に由来する転写産物で OA 群と異なる転写産物の発現変化が見られた。これら発現パターンの違いは、DA 量の増加と OA 量の増加にそれぞれ特徴的なパターンかもしれない。このように、発現パターンが異なる一方で、DA 群で発現量が増減した転写産物は、その大部分が OA 群で発現量が増減した転写産物と重複していた。これについて、以下、「第 2 章 第 5 節 小括」で述べることとする。

(e-2) 宿主探索行動を制御する候補遺伝子の選出

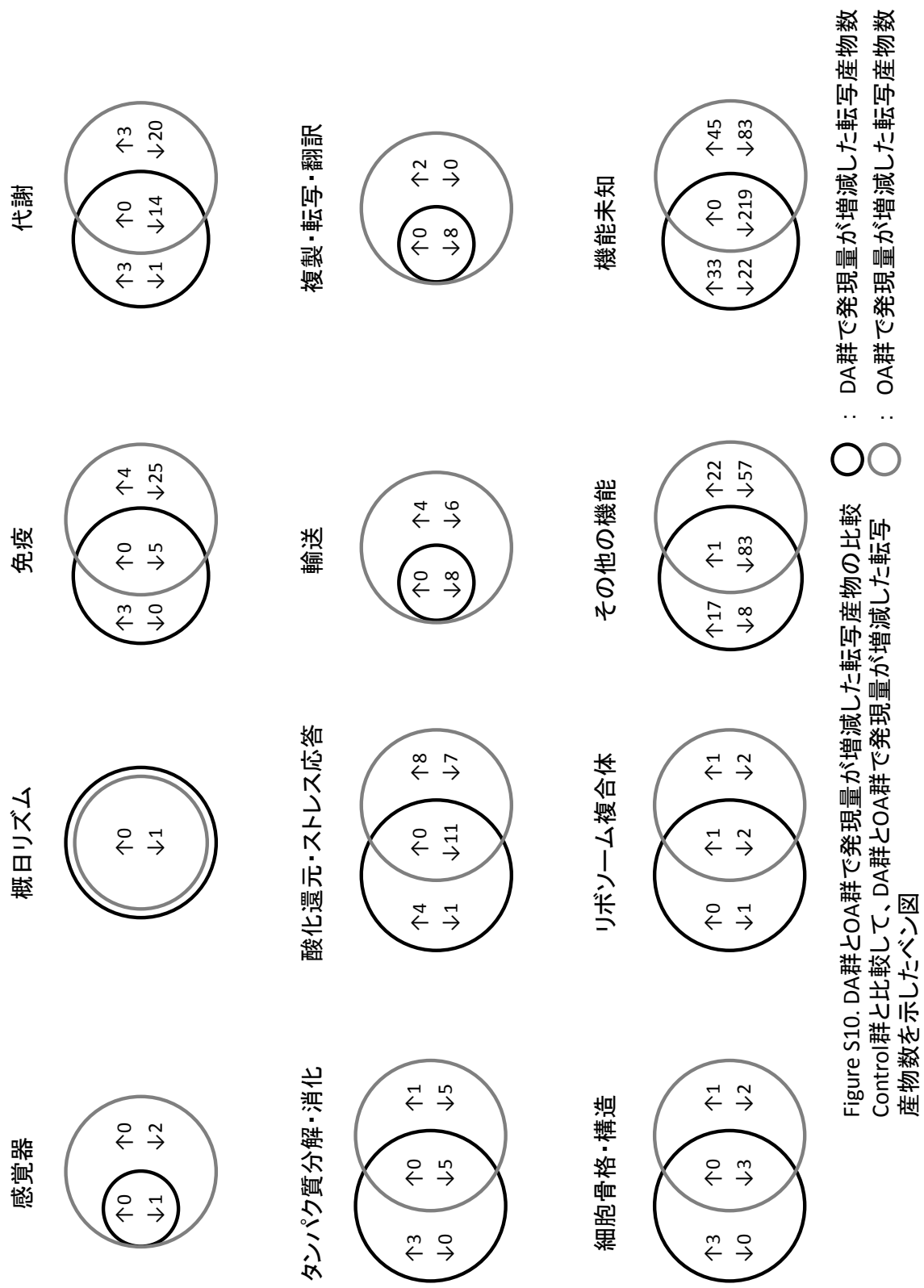
(e-1) で発現量に差がみられた転写産物を NEA 群、DA 群、OA 群間で比較した。そして、NEA 群、DA 群、OA 群の全ての群で、発現量が増加または減少した転写産物を確認した。

(e-3) 宿主探索行動を抑制するツールの標的となる遺伝子の選定

NEA 群、DA 群、OA 群の全ての群で、共通した挙動を示す転写産物の中から、蚊に特異的な配列を有する転写産物を選定した。蚊に特異的な配列をもつ転写産物の選出は、ESTs (AalbF1.0) を参照した。

16. 統計処理

各実験で使⽤した統計⽅法は、各 **Figure** に付した。なお、危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした。



引用文献

- 1 WHO : *Fact sheet Dengue and severe dengue*,
 <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>
- 2 Seki, N. *et al.* [An autochthonous outbreak of dengue type 1 in Tokyo, Japan 2014].
 Nihon Koshu Eisei Zasshi **62**, 238-250 (2015).
- 3 Kumar, N. P. *et al.* A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak
 in Kerala, India. *J Gen Virol* **89**, 1945-1948 (2008).
- 4 Kuwata, R. *et al.* Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated
 from *Culex* mosquitoes in Vietnam. *Archives of virology* **158**, 2273-2284 (2013).
- 5 Isawa, H. *et al.* Identification and molecular characterization of a new
 nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan.
 Virus research **155**, 147-155 (2011).
- 6 Yamao, T. *et al.* Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an
 improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0).
 Archives of virology **154**, 153-158 (2009).
- 7 Kihara, Y. *et al.* Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected
 in the field. *Journal of virological methods* **146**, 372-374 (2007).
- 8 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).
- 9 Roeder, T. Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**, 533-561 (1999).
- 10 Andersen, J. P. *et al.* Dopamine levels in the mosquito *Aedes aegypti* during adult
 development, following blood feeding and in response to heat stress. *Journal of*
 insect physiology **52**, 1163-1170 (2006).
- 11 Chen, A. *et al.* Dispensable, redundant, complementary, and cooperative roles of
 dopamine, octopamine, and serotonin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **193**,
 159-176 (2013).
- 12 Riemensperger, T. *et al.* Behavioral consequences of dopamine deficiency in the
 Drosophila central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
 of the United States of America **108**, 834-839 (2011).
- 13 Nagaya, Y. *et al.* A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in
 Drosophila melanogaster. *Neurosci Lett* **329**, 324-328 (2002).
- 14 Klowden, M. J. Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour.
 Ciba Foundation symposium **200**, 212-223 (1996).

- 15 Fukumitsu, Y. *et al.* Elevation of dopamine level reduces host-seeking activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors* **5**, 92 (2012).
- 16 Novak, M. G. & Rowley, W. A. Serotonin depletion affects blood-feeding but not host-seeking ability in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* **31**, 600-606 (1994).
- 17 Mayer, F. *et al.* Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrier chemoprotective mechanisms in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 3538-3550 (2009).
- 18 Maekawa, M. *et al.* Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* **474**, 225-U268 (2011).
- 19 Huang, P. *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* **475**, 386-389 (2011).
- 20 Tomita, J. *et al.* The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *PloS one* **10**, e0128101 (2015).
- 21 Sinha, A. & Rae, R. A functional genomic screen for evolutionarily conserved genes required for lifespan and immunity in germline-deficient *C. elegans*. *PloS one* **9**, e101970 (2014).
- 22 Sato, Y. *et al.* RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in *japonica* rice grown under natural field conditions. *Nucleic acids research* **39**, D1141-1148 (2011).
- 23 Nene, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**, 1718-1723 (2007).
- 24 Holt, R. A. *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-149 (2002).
- 25 Arensburger, P. *et al.* Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* **330**, 86-88 (2010).
- 26 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).
- 27 Harker, B. W. *et al.* Stage-specific transcription during development of *Aedes aegypti*. *BMC developmental biology* **13**, 29 (2013).
- 28 Das, S. & Dimopoulos, G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC physiology* **8**, 23 (2008).
- 29 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).
- 30 Poelchau, M. F. *et al.* A *de novo* transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes*

- albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC genomics* **12**, 619 (2011).
- 31 Boes, K. E. *et al.* Identification and characterization of seminal fluid proteins in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases* **8**, e2946 (2014).
 - 32 Harbach, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, 591-638 (2007).
 - 33 Cook, P. E. *et al.* The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18060-18065 (2006).
 - 34 Clements, A. N. *The Biology of Mosquitoes, Volume 2: Sensory Reception and Behaviour*. Vol. 2 (CABI; First edition (June 1, 1999)).
 - 35 Rowley, W. A. & Graham, C. L. The effect of age on the flight performance of female *Aedes aegypti* mosquitos. *Journal of insect physiology* **14**, 719-728 (1968).
 - 36 Bohbot, J. D. *et al.* Functional Development of the Octenol Response in *Aedes aegypti*. *Front Physiol* **4**, 39 (2013).
 - 37 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).
 - 38 Dissanayake, S. N. *et al.* aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC research notes* **3**, 248 (2010).
 - 39 Deng, Y. *et al.* Molecular and Functional Characterization of Odorant-Binding Protein Genes in an Invasive Vector Mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS one* **8**, e68836 (2013).
 - 40 Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology* **18**, 215-227 (2004).
 - 41 Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *Journal of the American Mosquito Control Association* **3**, 302-303 (1987).
 - 42 Hardie, S. L. & Hirsh, J. An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult *Drosophila* brain extracts by high performance liquid chromatography. *Journal of neuroscience methods* **153**, 243-249 (2006).
 - 43 Aonuma, H. & Watanabe, T. Changes in the content of brain biogenic amine associated with early colony establishment in the Queen of the ant, *Formica japonica*. *PloS one* **7**, e43377 (2012).
 - 44 Burke, C. J. & Waddell, S. Remembering nutrient quality of sugar in *Drosophila*. *Current biology : CB* **21**, 746-750 (2011).

- 45 Kumar, S. & Blaxter, M. L. Comparing *de novo* assemblers for 454 transcriptome data. *BMC genomics* **11**, 571 (2010).
- 46 Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647-1649 (2012).

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を頂き、終始丁寧なご指導ならびに御鞭撻を受け賜りました 福岡大学薬学部 微生物薬品化学教室 見明 史雄 教授、鹿志毛 信広 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の執筆において、貴重な御助言を頂きました 福岡大学薬学部 衛生化学教室 松末 公彦 准教授に深く感謝致します。

本研究の遂行および執筆において、多くのご支援とご指導を賜りました 福岡大学薬学部 微生物薬品化学教室 佐藤 朝光 助教、中島 幸彦 助教、生体機能制御学教室 三島 健一 教授、入江 圭一 助教、福岡大学理学部 弟子丸 正伸 准教授、北海道大学 電子科学研究所 青沼 仁志 准教授、Universiti Sains Malaysia Ahmad Abu Hassan 教授、University Malaysia Sarawak Hamady Dieng 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、筆者を特別研究員として採用し、経済的に支えてくださいました 日本学術振興会に深く感謝致します。

また、様々な形で本研究にご協力を頂きました、本研究室の元大学院生 奥野 隆啓 博士、タンジナ シャーミン 博士、平松 征洋 博士、そして、大学院生として同志である、上田 紗織 女史、百武 美香 女史、さらに本研究室の学部生 米村 敦子 女史、奥田 晶子 女史、村上 義也 氏をはじめとする微生物薬品化学教室の学生諸氏に対して謝意を表します。

最後に、学生生活を温かく見守り、精神的、経済的に支えてくださった家族に感謝いたします。