

# 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

カール 由起

微生物薬品化学教室

## Investigation of host-seeking behavior in female mosquitoes toward the prevention of mosquito-borne diseases.

Yuki Carle

Department of Microbiology

### Abstract

In order to prevent the expansion of mosquito-borne diseases, it is important to understand how female mosquitoes modulate their host-seeking behavior. In invertebrates, it is well known that behavior undergoes extensive regulations by biogenic amines, such as dopamine (DA) or octopamine (OA). The aim of this study was to examine how alterations in DA or OA levels affect the host-seeking behavior, and how the gene expression changes in response to these alterations in the adult female mosquito *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*).

After emerging, mosquitoes were divided into three groups: one treated with  $L$ - $\beta$ -3,4-dihydroxyphenylalanine, a precursor of DA (DA group); one treated with OA (OA group); and another untreated (control group). We measured the levels of DA and OA in the head of mosquitoes; an elevation of DA level was observed in the DA group without any elevation of OA level compared to in the control group, and an elevation of OA level was observed in the OA group without any elevation of DA level. The control group showed a gradual increase of host-seeking behavior over the 6-days experimental period. In contrast, there was no such increase in the DA and OA groups, and these groups had a significant lower level of host-seeking behavior than that of control group between day 3 and 6 post-emergence. A custom microarray for *Ae. albopictus* was made based on 22,335 sequences that were obtained from a cDNA library made using mainly next-generation sequencing. We carried out a microarray-based analysis of the transcriptional changes induced in the groups showing a diminished (DA and OA groups) or a lack of (newly emerged mosquitoes) host-seeking behavior. Therefore, we compared the transcripts from the control group (control group at 6 days after emerging) with those from the DA group, the OA group as well as those from newly emerged adults (NEA group). Compared to the control group, we detected 70 upregulated transcripts and 393 downregulated transcripts in the DA group, 94 upregulated transcripts and 569 downregulated transcripts in the OA group and 427 upregulated transcripts and 417 downregulated transcripts in the NEA group. Interestingly, 301 transcripts including 156 mosquito specific transcripts were found in common in the groups showing a diminished or a lack of host-seeking behavior.

To resume, our results indicate that an elevation of DA or OA levels reduces host-seeking behavior in adult female mosquito *Ae. albopictus*. After identifying the expression profile associated with a diminution or a lack of host-seeking behavior, we found 156 mosquito specific transcripts that might be involved in this diminution and that might be the target for future investigations.

**Key words:** Host-seeking behavior, Dopamine, Octopamine, *Aedes albopictus*, Microarray

## 【緒言】

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。

## 【実験方法】

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、 $L$ - $\beta$ -3,4-dihydroxyphenylalanine ( $L$ -DOPA) またはOAを処置した雌のヒトスジシマカにおいてDA量とOA量が増加することを確認した。次いで、DA量と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量と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。

続いて、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>4</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>5</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、雄成虫、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、宿主探索行動を行う群と宿主探索行動をしないかあるいは減少した群で遺伝子の発現量を比較した。

## 【結果】

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)。

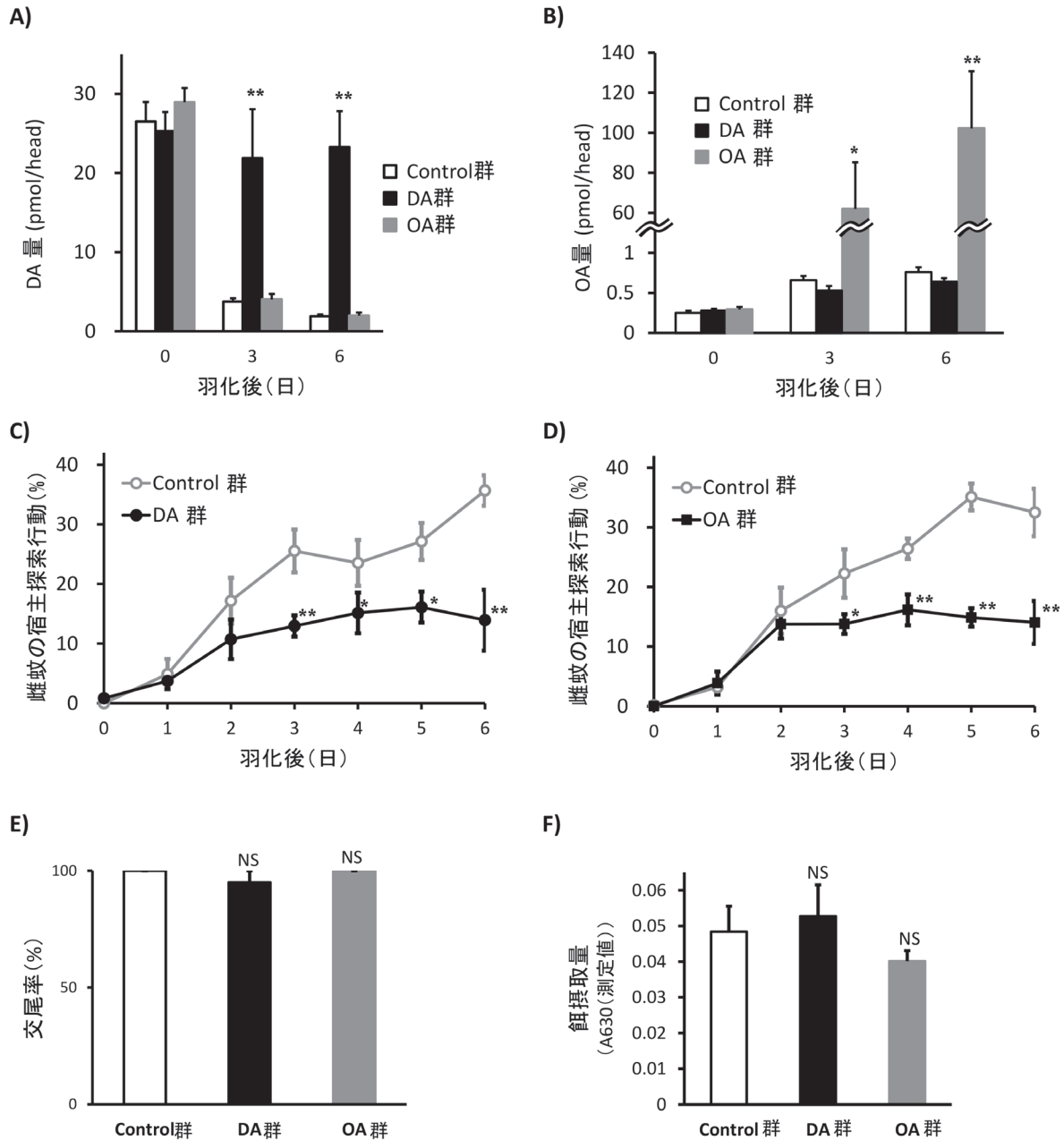


Fig. 1 Effect of DA and OA treatments on host-seeking behavior

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)

Table 1. Functional annotation of AalbF1.0

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

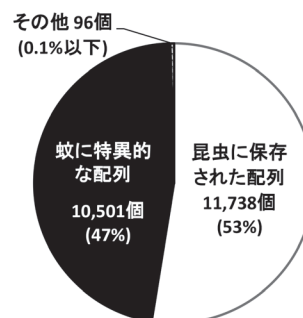


Fig. 2 Ratio of transcripts specific to mosquito in AalbF1.0

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、羽化後の宿主探索行動の変化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。

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（薬剤未処置の羽化後6日目の群；以下Control群）と、宿主探索行動を行わ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）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）。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。

### 【考察】

Fig. 1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。さらに、この結果は、宿主探索行動を行う群（Control群）と宿主探索行動をしないかあるいは減少した群（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。

Table 1, Fig. 2は、AalbF1.0から構築したESTs (AalbF1.0) が、宿主探索行動を制御する遺伝子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。そして、作成したマイクロアレイを用いて検出した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（Fig. 3）。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。NEA群、DA群、OA群で発現量が減少した300個

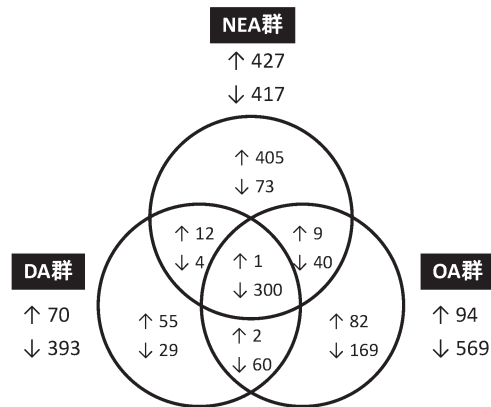


Fig. 3 Venn diagrams showing the number of transcripts that were identified within the groups and potentially implied in a diminished or a lack of host-seeking behavior  
 ↑: 発現量が増加した転写産物数、↓: 発現量が減少した転写産物数を示す。

の転写産物のなかに156個の蚊に特異的な転写産物が含まれており、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>6</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。

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>7</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>8</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。

#### 【参考文献】

- 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 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).
- 5 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).
- 6 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).
- 7 WHO : Fact sheet Dengue and severe dengue  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>
- 8 Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Medical and veterinary entomology 18, 215-227 (2004).