

96. デング熱媒介蚊の吸血行動の解明と社会医学的应用

佐久間 知佐子

東京慈恵会医科大学 熱帯医学講座

Key words : 吸血行動, 味覚受容体, ATP, ショウジョウバエ, ネットアイシマカ

緒 言

マラリア、デング熱および重症熱性血小板減少症候群（SFTS）などの疾患は、蚊やマダニなどの病原体媒介節足動物（ベクター）によって媒介される病原体由来の感染症であり、人間や動物に対して世界的に大きな脅威となっている。これら感染症の制御のためには、ベクターに関連する生命現象の分子基盤を解明することが重要である。特に吸血行動は病原体がヒトや動物へと伝播する根源となる行動であるため、その分子機序の理解が急務である。吸血は「吸血標的への誘引→吸血開始→吸血飽和状態→吸血停止→逃避」という連続的な過程の遂行により達成される。最初のステップである吸血標的への誘引機構の研究は蚊の嗅覚を中心に盛んであり、吸血標的が発する熱・二酸化炭素・匂いが大きな役割を果たすことや虫除け剤として広く用いられる DEET 等の忌避誘導の仕組みが明らかになっている。しかし、これらの要素は相乗的に作用しているため、嗅覚機能を失った蚊や二酸化炭素の認識が不可能な蚊も、標的を認識できることが報告されている。そこで本研究においては、標的への誘引に引き続く吸血行動、特に吸血開始の分子基盤の理解を目指した。

方法および結果

1. 蚊と同じ双翅目のショウジョウバエを用いた ATP 受容体の探索

1) ショウジョウバエは味覚二択テストにおいて ATP を嗜好する

蚊が吸血を開始するためには血液を感知することが重要であり、血液中の ATP が主要な役割を果たすことが報告されていた^{1,2)}。実際、緑に着色した ATP 緩衝液を蚊に擬似吸血させたところ、蚊が血液と認識し中腸が満たされる様子が観察された（図 1）。一方、アデノシンや ATP と同じプリン塩基を基調としたリボヌクレオチドである GTP は蚊によって吸血されなかった。すなわち蚊は ATP を特異的に認識し、吸血開始の情報を伝達・処理していると予測される。そこで ATP を認識する受容体を探索し、その受容体を発現する神経を明らかにすることを目指した。この知見は従来とは異なる概念の忌避剤などの開発に将来的に応用することができると期待される。



図 1. ATP 緩衝液を擬似吸血したネッタイシマカ

人工吸血をしていないネッタイシマカ (左) と緑に着色した ATP 緩衝液 (1 mM ATP, 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃) を人工吸血させたネッタイシマカ (右)。血液と同様に ATP 緩衝液を中腸へと取り込み腹部が緑色になっている様子が観察された。

哺乳類で ATP の受容を担う P2X 受容体の相同体は蚊や蚊と同じ双翅目であるショウジョウバエのゲノムから脱落している。そこで一般的に液性因子の受容に寄与する味覚受容体 (Gr) 群に着目した。Gr はヤブカ属ネッタイシマカでは 79 遺伝子あると予測されており³⁾、遺伝学的手法の発達していないネッタイシマカで ATP 受容体探索を行うのは困難である。そこで Gr RNAi ライブラリーが存在する双翅目のショウジョウバエにおいて ATP 受容に関わる Gr の探索を試みることを着想し、その前段階として非吸血昆虫であるショウジョウバエも ATP を嗜好するかをテストした。

ショウジョウバエの味覚テストの確立した系として二択テストがある。飢餓状態の野生型ショウジョウバエに 2 mM スクロースと 1 mM ATP を選択させたところ、ショウジョウバエの多くは 1 mM ATP を選択した (図 2 中央)。一方、2 mM スクロースと 1 mM アデノシンを選択させたところ、2 mM スクロースを選択した (図 2 左)。よって蚊と同様にショウジョウバエも ATP を嗜好し、アデノシンは摂取しないことが判明した。この系において Gr RNAi を発現させてスクリーニングをする際に、ATP への嗜好が頑強である方が異常を見出しやすい。そこで、2 mM スクロースと 1 mM ATP に 2 mM スクロースを混ぜたものを選択させたところ、1 mM ATP を単独で与えた際に比べて、1 mM ATP + 2 mM スクロースへの嗜好度が顕著に高くなった (図 2 右)。以上より、スクリーニングには 2 mM スクロースと 1 mM ATP + 2 mM スクロースの二択テストを用いることにした。

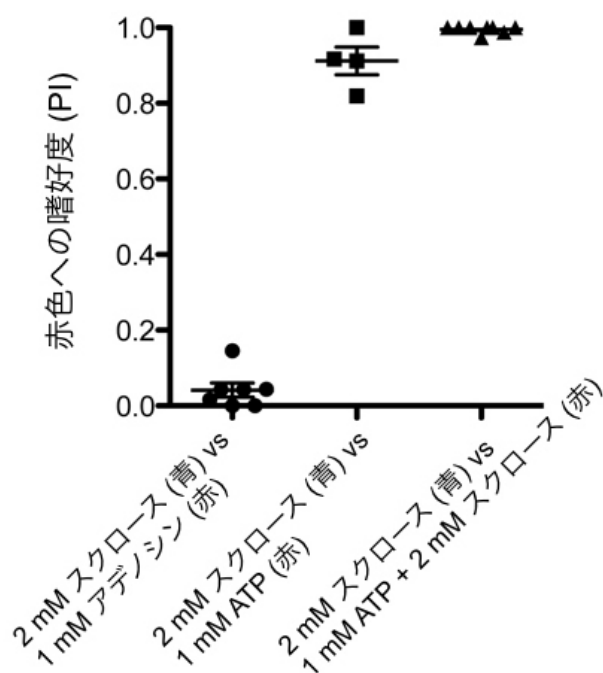


図 2. 野生型ショウジョウバエにおける味覚 2 択テスト

2 mM スクロースを青に、アデノシン、ATP、ATP + スクロースを赤に着色し、飢餓したショウジョウバエに暗所で選択させ、2.5 時間後に腹部の色が赤、青、紫である個体数を数えた。赤色への嗜好度 (PI) は $(N_{\text{赤}} + N_{\text{紫}} / 2) / N_{\text{赤} + \text{紫} + \text{青}}$ で算出した。ショウジョウバエはスクロースとアデノシンではスクロースを、ATP とスクロースでは ATP を嗜好することが判明した。また ATP にスクロースを混ぜたものは ATP 単独に比べ嗜好度がより高いことが分かる。平均値と SEM (エラーバー) が示されている。

2) ATP 受容体の役割を担う Gr の探索

神経に特異的に発現を誘導させる *elav-Gal4* と、ショウジョウバエの 53 個の *Gr* 遺伝子に対する RNAi を *Gal4* のターゲット配列である UAS に連結したもの (UAS-Gr RNAi) 116 系統とを交配させ、次世代の個体において A) 1 mM ATP + 2 mM スクロースと 2 mM スクロースの二択テスト、B) 1 mM アデノシンと 2 mM スクロースの二択テストを行った。対照群として、RNAi 発現系統と遺伝学的な背景が同一になるように *elav-Gal4* と UAS-GFP を交配したものをを用いた。A) の二択テストでは遺伝学的対照群に比べて ATP への嗜好度 (Preference Index, PI) が低くなる *Gr*-RNAi 系統が多数得られた (図 3A)。このうち遺伝学的対照群の PI の最小値である 0.4 より PI が低くなるものとして 17 *Gr* 遺伝子に対する RNAi が得られ、うち 4 遺伝子がネッタイシマカにも保存されていた。B) の二択テストでは、遺伝学的対照群の PI の最大値 0.2 より PI が高くなるものとして 7 *Gr* 遺伝子に対する RNAi 系統が得られ、うち 1 遺伝子がネッタイシマカに保存されていた (図 3B)。以上より、ATP やアデノシンの感知に Gr が関与することが示唆された。

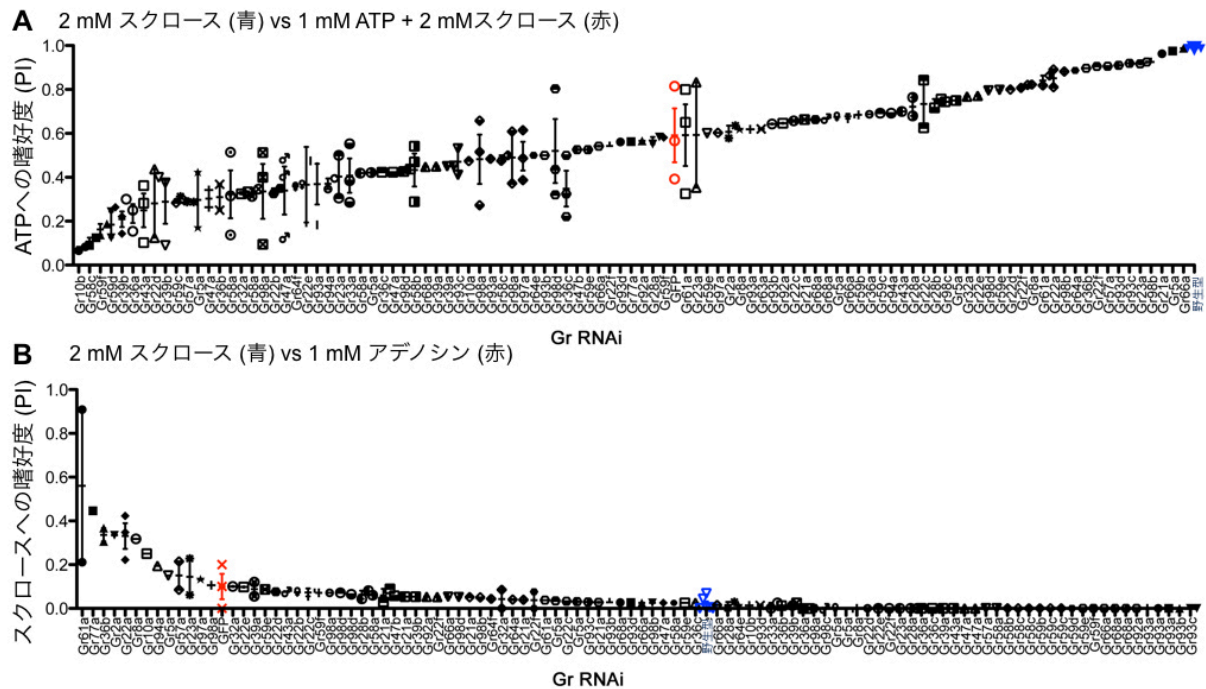


図3. *Gr*-RNAiの一部は神経に発現させることにより ATP やアデノシン嗜好に異常が生じた
 (A) 神経において *Gr*-RNAi を一つずつ発現させ、2 mM スクロースと 1 mM ATP + 2 mM スクロースを選択させた。野生型 (青) ではほぼ全ての個体が ATP を嗜好するのに対し、遺伝学的対照群 (赤) では ATP への PI が 0.4~0.8 であった。PI が 0.4 以下になったものに関しては生物学的反復を行った。反復実験を行ったものに関しては平均と SEM (エラーバー) が示してある。(B) (A) と同様の味覚 2 択テストを 2 mM スクロースと 1 mM アデノシンで行った。遺伝学的対照群 (赤) では PI が 0~0.2 であった。

2. ネットアイシマカ口吻で発現に雌雄差がある Gr5 は吸血開始を制御する

吸血昆虫には雌雄共に吸血を行うものもあるが、蚊は産卵期のメスのみが吸血を行い、口吻の構造もオスとメスでは異なる。そこで上記のショウジョウバエにおける *Gr* のスクリーニングと並行して、蚊の口吻で発現に雌雄差のある *Gr* に着目した。このような性質を持った *Gr* は ATP もしくは他の血液成分の感知に関与している可能性がある。ネットアイシマカ成虫のオスとメスの口吻先端を用いて行った RNA-seq 解析⁴⁾で、オスに比べメスで顕著に発現が高い *Gr* として *Gr5* が報告されていた。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いることによりネットアイシマカにおいて *Gr5* の機能欠損変異体の作製を試みた。*Gr5* の 2 番目のエキソンに眼が光るマーカー (3×P3 プロモーターに DsRed タンパク質を直結させたもの) をノックインさせ (図 4A、B)、目的の遺伝子座が正しく遺伝子編集されていることを PCR (図 4C) およびシーケンスにより確認した。

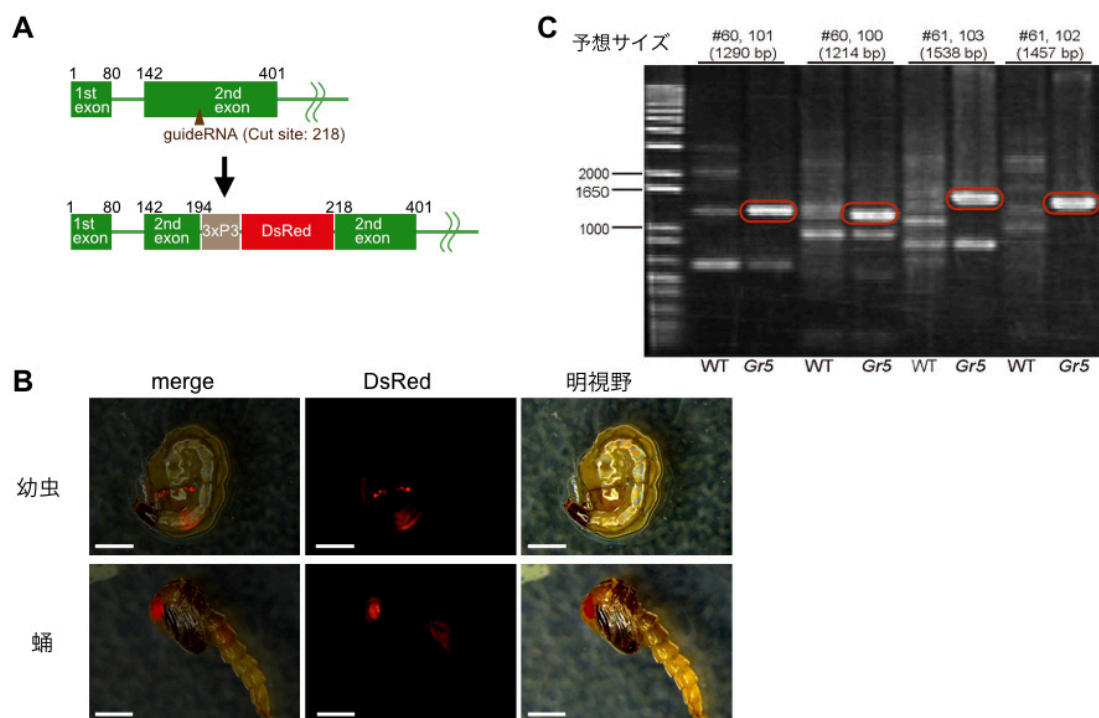


図 4. *Gr5* 機能欠損ネッタイシマカ

(A) *Gr5* 機能欠損ネッタイシマカの作製手法。眼が光るマーカー（3×P3-DsRed）を2番目のエキソンにノックインした。(B) 眼が光る *Gr5* 変異体の幼虫と蛹の写真。(C) 3×P3-DsRed が目的の遺伝子座にノックインされていることをPCRによって確認した。スケールバーは1 mm。

この変異体と野生型を用いてマウスへの誘引度を10分間観察したところ、マウスへの誘引度に大きな差はなかった。ところが興味深いことに吸血開始から40分後に、野生型ネッタイシマカの多く ($n = 22/34$, 64.7%) は吸血を終えマウスへの誘引度が下がっているのに対し、*Gr5* 機能欠損ネッタイシマカは継続してマウスへと誘引されており (図5)、吸血率も低かった ($n = 6/31$, 19.4%)。一方、吸血対象へ針を刺すプロービングと呼ばれる現象は *Gr5* 機能欠損ネッタイシマカにおいても野生型と同様に観察された。以上より、*Gr5* 機能欠損ネッタイシマカは吸血標的への誘引と血液探索行動は正常であり、それに引き続く吸血開始に異常がみられることが見出された。マウスと蚊を同じケージに入れ、30秒毎に写真を取得することにより、マウスの体表にいる蚊の匹数をカウントした。その割合を棒グラフで示す。マウスと蚊を同じケージに入れてから最初の10分はマウスへの誘引度に野生型と変異体で大差はなかった。一方、40分後にはマウスの体表へと誘引されている *Gr5* 変異体の割合が野生型に比べ増加した。野生型では40分までに吸血が進みマウスへ誘引が抑制される一方、*Gr5* 変異体では吸血ができないためにマウス体表でマウスを刺す行為（プロービング）を続ける様子が観察された。

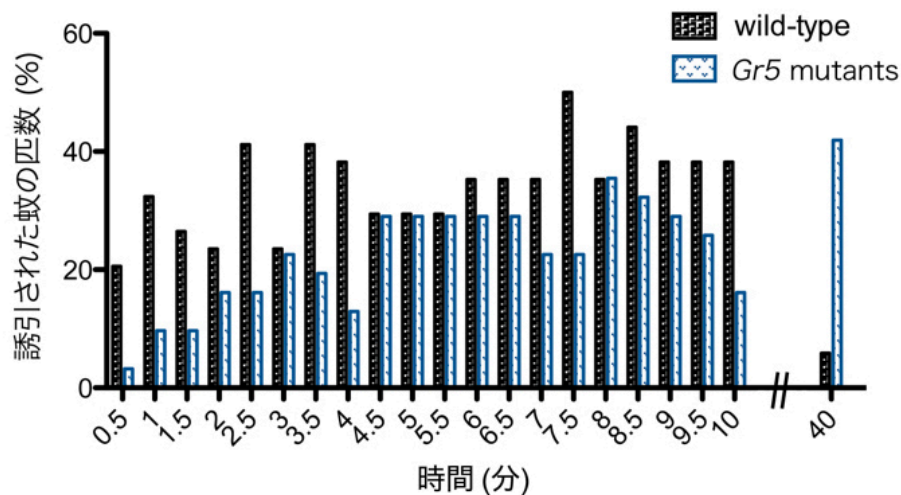


図 5. Gr5 機能欠損ネッタイシマカは吸血異常を示す

マウスと蚊を同じケージに入れ、30 秒毎に写真を取得することにより、マウスの体表にいる蚊の匹数をカウントした。その割合を棒グラフで示す。マウスと蚊を同じケージに入れてから最初の 10 分はマウスへの誘引度に野生型と変異体で大差はなかった。一方、40 分後にはマウスの体表へと誘引されている *Gr5* 変異体の割合が野生型に比べ増加した。野生型では 40 分までに吸血が進みマウスへ誘引が抑制される一方、*Gr5* 変異体では吸血ができないうえにマウス体表でマウスを刺す行為（プロービング）を続ける様子が観察された。

考 察

本研究結果より、ショウジョウバエは ATP を感知することが可能であり、蚊同様に ATP への嗜好性があることが判明した。興味深いことに今回 ATP 感知への関与が示唆された Gr 群は同じファミリーに属しているものが多く、またその Gr ファミリーに対する味覚研究はそれほど進んでいない。ショウジョウバエが Gr を介して ATP を感知する分子機構についてさらなる研究を進めることはショウジョウバエ味覚研究に新たな洞察をもたらすことが期待される。

また今回スクリーニングによって得られた ATP 受容体候補 Gr のネッタイシマカ相同体群に関しては、現在 CRISPR/Cas9 法によって機能欠損変異体を作製中であり、ATP 嗜好に異常が生じるか今後の解析が待たれる。また、*Gr5* 機能欠損ネッタイシマカの吸血開始異常の表現型は大変興味深く、蚊が Gr を介して摂取する液体の味を吟味していることを示唆する。今後、*Gr5* が発現する神経を同定し、さらにはその神経が構成する神経回路を解明することは、将来的に蚊の吸血行動を制御する端緒になると同時に公衆衛生学の学術基盤となることが予想される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学熱帯医学講座の嘉糠洋陸である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Hosoi T. Identification of Blood Components Which Induce Gorging of the Mosquito. *J Insect physiol.* 1959 3:191-218
- 2) Galun R, Avi-Dor Y, Bar-Zeev M. Feeding Response in *Aedes aegypti*: Stimulation by Adenosine Triphosphate. *Science*. 1963 Dec 27;142 (3600) :1674-5. doi: 10.1126/science.142.3600.1674 PubMed PMID: 17834375
- 3) Kent LB, Walden KKO, Robertson HM. The Gr Family of Candidate Gustatory and Olfactory Receptors in the Yellow-Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Chem Senses* 2008 Jan;33 (1) :79-93. doi: 10.1093/chemse/bjm067 PubMed PMID: 17928357

- 4) Sparks JT, Vinyard BT, Dickens JC. Gustatory receptor expression in the labella and tarsi of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2013 Dec;43 (12) :1161-71. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.10.005. PubMed PMID: 24157615