

アカイエカ種群の南九州での集団遺伝的解析

研究分担者 大塚 靖（鹿児島大学 国際島嶼教育研究センター）

研究要旨

アカイエカ種群は日本においてはアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) , チカイエカ (*Culex pipiens form molestus*) , ネットタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。これらアカイエカ種群の種はウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、主要な媒介蚊となる可能性が指摘されており、これらの種の分布を正確に知っておくことが重要となってくる。これら 3 種は形態だけでなく遺伝的にも近似しており、それらの九州地方南部（熊本県、宮崎県、鹿児島県）の地理分布を DNA レベルで検討することが難しかった。そこで、まずアセチルコリンエステラーゼ領域の種特異的プライマーセットでこれら集団を調べてみると、チカイエカは全てヘテロで検出できるが、アカイエカと思われる個体には 12.5~26.0% のネットタイエカのハプロタイプが含まれていた。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いてアカイエカの集団間の変異を調べた。8つの領域について検討した結果、日本産アカイエカにはネットタイエカのハプロタイプとしたのが領域によって 3.1~19.4% 含まれていた。前年度までに行った北部九州と比べると、鹿児島県では若干ネットタイエカ頻度が高いが、集団的に有意な差にはならなかった。これらの結果は、九州一帯のアカイエカは一定の割合のネットタイエカと同じタイプをもっていることを示している。アカイエカとネットタイエカの違いを明らかにするためには、奄美から大隅諸島などのアカイエカとネットタイエカの境界地域で遺伝的な変異だけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要がある。

A. 研究目的

アカイエカ種群は日本においてはアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) , チカイエカ (*Culex pipiens form molestus*) , ネットタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。アカイエカ種群はウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、主要な媒介蚊となる可能性が指摘されており、それらの分布を正確に知って置くことが重要となっている。しかし、この3種は形態では非常に似ており、特に雌成虫での同定は難しい。これらのアカイエカ種群は遺伝的にも近似しており、種分類でよく使われるミトコンドリア領域の配列は極めて近く、ミトコンドリア領域で正確に3種を分けることは難しい。近年、マイクロサテライトを用いた解析により

Culex pipiens pipiens , チカイエカ, ネットタイエカの遺伝的違いや地理的分布を調べている (Fonseca *et al.*, 2004, Fenseca *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2008) 。

九州地方のアカイエカ種群の分布に関しては、本来ネットタイエカは日本では南西諸島にのみに分布しているとされるが、九州本土にも生息（または飛来）しているのではないかとの考えもあるので、アカイエカ種群の正確な分布を調べる必要がある。前年度は北部九州で調査を行ったので、今年度は南九州において、マイクロサテライトを用いてアカイエカ種群の遺伝的構成を調べ、アカイエカとネットタイエカとの遺伝的違いや、九州本土でのネットタイエカの分布の検討を行った。

B. 研究方法

1. アカイエカ種群の採集

熊本県(2ヶ所), 宮崎県(6ヶ所), 鹿児島県(12ヶ所)の合計20ヶ所で, Ovitrap または雨水マス等からの幼虫・蛹を採集し, 実験室で成虫とした。一部の成虫は無吸血産卵の有無を確かめるため実験室で飼育した。さらに一部の雄の外部生殖器の形態を確認した。成虫からQIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kitを使用して84個体(熊本県, 8個体; 宮崎県, 24個体; 鹿児島県, 52個体)からDNAを抽出した。

2. アセチルコリンエステラーゼ領域を利用した種の鑑別

Kasai *et al.* (2008)により, 種特異的プライマーでPCRを使うことによって3種の鑑別する方法が開発されている。F1457-B1246Sのユニバーサルプライマーセットで増幅を確認した後, アカイエカはACEpall2, チカイエカはACEpip2, ネットアイエカACE quinの種特異的プライマーとB1246SでPCR増幅を行った。PCRのサイクルは94 5分の後, 94 30秒, 55 30秒, 72 1分を35サイクル行った後72 5分で行った。PCR産物を電気泳動しその増幅の有無を確認した。

3. マイクロサテライトによる鑑別

解析に使用した領域はFonseca *et al.* (1998), Keyghobadi *et al.* (2004), Smith *et al.* (2005)でこれまでに使われている5領域(CxqGT4, CxqGT6b, CxpGT4, CxpGT12, CxpGT51)を使用した。日本産アカイエカ種群に有効なマイクロサテライト領域をさらに得るために, Lian *et al.* (2001)が考案した ligation-mediated suppression PCRを利用して新規のマイクロサテライト領域を確立した。CpAC009(5'-GGTTC CTCGTCGATG TTGTT-3', R:5'-TTGTTCTGTCCTCAACTTGTC A-3'), CpAC012(F:5'-GTGCCACCTCAAG TGTCAGA-3', R:5'-TCCGATGTTTCATTGG

TTCC-3'), Cp4b007(F:5'-ATTGAATGGTTT-3', 5'-TCGAAAACCCACCTTGATGT-3') 3つの領域についても解析を行った。まずPCRを以下の条件で行った。20 µlに0.5U *Ex Taq*, 1x *Ex Taq* buffer, 2mM MgCl₂, 0.2mMのそれぞれのプライマー, 1µlの抽出DNAを加え, 96 5分の後, 96 30秒, 54 30秒, 72 30秒を35回繰り返し, 最後に72 5分で増幅を行なった。片方のプライマーの5'側は蛍光色素(6-FAM/VIC/NED/PET)で標識している。Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzerでフラグメント解析を行い, それぞれのPCR産物の長さを調べた。新規の長さの産物が出た場合はクローニングして配列を確認した。集団間の違いはそれぞれの領域のハプロタイプの頻度の違いからAMOVAでarlequin3.5 (Excoffier and Lischer, 2010)を用いて検討した。

C. 研究結果

1. アセチルコリンエステラーゼ領域を利用した検討

九州南部の熊本県, 宮崎県, 鹿児島県から81個体についてDNAを抽出し, アセチルコリンエステラーゼ領域のPCR法で種の鑑別を行った。鹿児島県の4個体はチカイエカハプロタイプのホモとなった。これらのうちの人系統は研究室で飼育しており, 無吸血産卵をしており, 無吸血産卵を確認している。その他のアカイエカと思われる個体のうち47匹がアカイエカハプロタイプのホモ, 30個体がアカイエカとネットアイエカハプロタイプのヘテロ, 3個体がネットアイエカハプロタイプのホモであった。アカイエカの中でネットアイエカハプロタイプの頻度は20.3%だった。ネットアイエカがホモだった個体はすべて鹿児島県から採集された個体であった(表1)。

2. マイクロサテライト領域を利用した検討

チカイエカ3個体についてはマイクロサ

テライトにおいてもコントロールとほぼ同じチカイエカハプロタイプ(98.0%)を示した。アカイエカ80個体の結果を表2と図1に示す。判断できないハプロタイプがそれぞれの領域で1.9~58.2%存在した。特に CppAC099, CppA012, CPP4b007の3つの領域に関しては34.0~58.2%と著しく高かった。またすべての領域においてのネットアイエカのハプロタイプが存在し、その頻度は3.1~19.4%であった。また、アセチルコリンエステラーゼの領域でネットアイエカのハプロタイプがホモであった個体については、マイクロサテライトの解析ではネットアイエカのハプロタイプ頻度は6.3~18.8%であった。

3. 集団間の違いについて

アカイエカのなかにネットアイエカのハプロタイプはアセチルコリンエステラーゼと8つのマイクロサテライト領域全てで見られ、熊本県、宮崎県、鹿児島県それぞれの県の集団で見られた。鹿児島県の集団でのネットアイエカのハプロタイプの頻度が他の県に比べて少し低い、AMOVAでは有意な差は見られなかった。

D. 考察

アカイエカにはネットアイエカのハプロタイプが一定の割合で含まれていることは、アセチルコリンエステラーゼ領域の解析でアカイエカの雄がすべてネットアイエカのハプロタイプを持つことなどから、予想はされていた(Kasai *et al.*, 2008)。今回北九州のアカイエカは調べた全ての領域でネットアイエカのハプロタイプを持つことが明らかとなった。前年度は同じく北部九州を調べたが、そこでも今回同様ネットアイエカのハプロタイプを持っていた。今回の地域間の比較では有意にはならなかったが、鹿児島の集団ネットアイエカのハプロタイプの頻度が高かった。また、今回のマイクロサテライトの解析では、CppAC099,

CppA012, CPP4b007の3つの領域では判別不能のハプロタイプが高頻度で出現した。この3つは西宮のアカイエカ系統をもとに作成したものである。これらは多くの候補から、大分と福岡のアカイエカの個体で有効なものを選抜して選ばれたものである。前年度はこの3つの領域を福岡県、長崎県、大分県で調べたときは判別不能のハプロタイプの頻度は0.6~7.0%と低かったのも、検証した地域によるものかもしれない。これらの結果はこのマイクロサテライト領域の有効性が失われるものの、地域によってアカイエカの遺伝変異が存在することをほのめかす結果となった。それらをふまえて、今後地域間の変異をさらに広域で検証が必要と思われる。また、日本では沖縄にはネットアイエカのみが生息しているので、九州と沖縄の間でどのように変化しているのに興味がある。これまで、鹿児島にはネットアイエカが既に生息しているのではないかとされていた。しかし今回の調査ではネットアイエカは確認されなかった。しかし温暖な条件などが整えば、生息の可能性もあるので今後の調査が必要である。今回の方法は日本のアカイエカ集団間での変異をみつけることができることから、今後の集団遺伝的解析に有効であると思われる。

E. 結論

アセチルコリンエステラーゼ領域のPCRやマイクロサテライト領域の解析で、南九州のアカイエカにはネットアイエカのハプロタイプが一定の割合で含まれていることが分かった。ここで示した解析方法はアカイエカの集団遺伝的解析を行うのに有効であるとともに、今後各地のアカイエカ遺伝情報を集めることによって、ネットアイエカをPCRやマイクロサテライト法などの分子的手法での同定を確実にすることができる。アカイエカとネットアイエカの違いを明らかにするためには、奄美から大隅諸島などのアカイエカとネットアイエカの境界

地域で遺伝的な変異だけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大塚靖．アカイエカ種群の九州地域の集団遺伝的解析 .第67回日本衛生動物学会 ,2015年3月，金沢市

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 アカイエカ内のアセチルコリンエステラーゼ領域の各ハプロタイプ数と頻度

	n	homo		hetero	frequencies	
		Cpp	Cq	Cpp/Cq	Cpp	Cq
Kumamoto	8	6	0	2	0.875	0.125
Miyazaki	24	15	0	9	0.813	0.188
Kagoshima	48	26	3	19	0.740	0.260
Total	80	47	3	30	0.775	0.225

Cpp : アカイエカハプロタイプ, Cq : ネットアイエカハプロタイプ
 チカイエカと検出された 3 個体は除いている .frequencies はアカイエカの 80 個体中の頻度を表す .

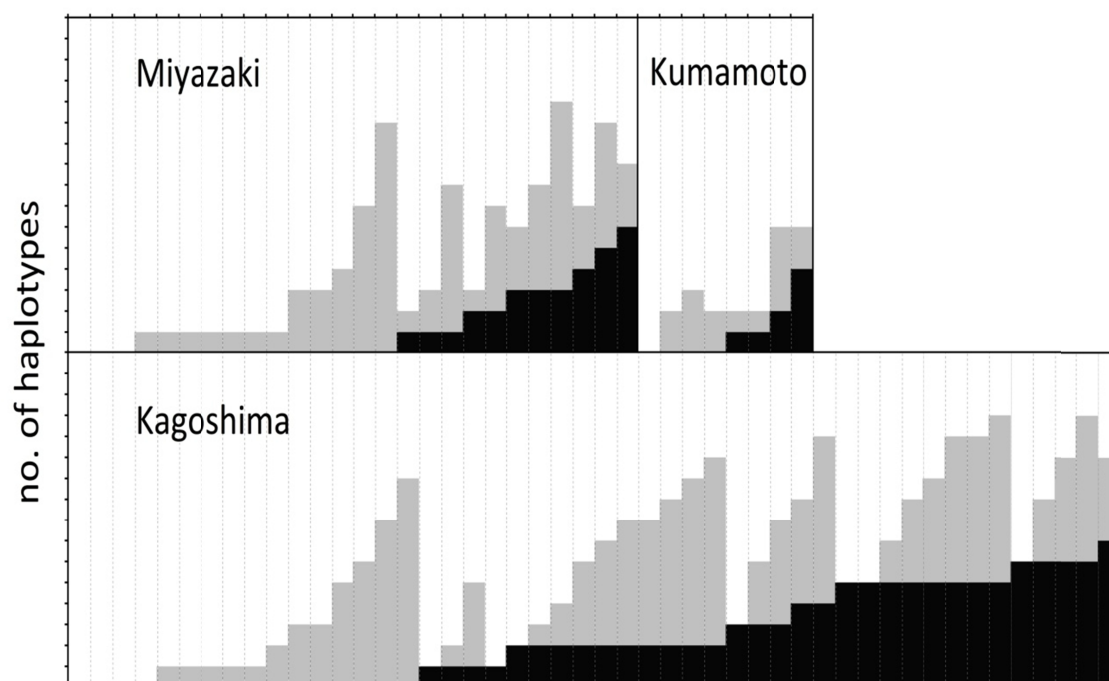


図 1 マイクロサテライト 8 領域の頻度分布

熊本, 宮崎, 鹿児島各個体の頻度分布 . 黒がネットアイエカハプロタイプ, 白がアカイエカハプロタイプ, グレイが判別不能 . 点線で区切られたタテのボックスが一つの個体を表す . 一つのボックスが 16 等分 (8 領域 x 2 倍体) されており, 領域にかかわらず, ネットアイエカのハプロタイプは下に置かれている .

表2 マイクロサテライト8領域の各ハプロタイプ数と頻度

	n	CxqGT4			CxqGT6b			CxpGT4			CxpGT12		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Kumamoto	8	12	0	4	14	2	0	16	0	0	12	3	1
Miyazaki	24	43	4	1	45	3	0	45	2	1	41	6	1
Kagoshima	48	73	14	9	80	11	5	76	18	2	56	17	23
Total	80	128	18	14	139	16	5	137	20	3	109	26	25
frequencies		0.800	0.113	0.088	0.869	0.100	0.031	0.856	0.125	0.019	0.681	0.163	0.156

	n	CxpGT51			CppAC009			CppAC012			Cpp4b007		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Kumamoto	8	15	0	1	14	1	3	12	0	4	11	2	3
Miyazaki	24	40	6	2	31	4	13	14	3	31	12	5	31
Kagoshima	48	79	13	4	48	9	39	31	6	57	42	24	30
Total	80	134	19	7	93	14	55	57	9	92	65	31	64
frequencies		0.838	0.119	0.044	0.574	0.086	0.340	0.361	0.057	0.582	0.406	0.194	0.400

Cpp : アカイエカハプロタイプ, Cq : ネットタイエカハプロタイプ, nd : 判別不能
チカイエカ 3 個体を除いたアカイエカ 80 個体のみ頻度を表す . Frequencies は Total でのハプロタイプの頻度を表す .