

アカイエカ種群の九州での集団遺伝的解析

分担研究者 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たら、日本産アカイエカにはネットタイエカのハプロタイプが21.4%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九州のアカイエカ種群の集団間の変異を調べてみた。5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6.3~11.6%含まれていた。これらら合わせて6つの領域の遺伝子頻度の違いから九州の集団間を比較したところ、鹿児島県のアカイエカ集団はネットタイエカのハプロタイプの割合がやや多かったが、有意な差はとはならなかった。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。そこでマイクロサテライトを用いて九州地方のアカイエカ種群の遺伝的構成を知り、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調査を行った。

B. 研究方法

1. アカイエカ種群の採集

福岡県（5ヶ所），長崎県（4ヶ所），大分県（8ヶ所），熊本県（2ヶ所），宮崎県（6ヶ所），鹿児島県（12ヶ所）の合計37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164個体（福岡県，26個体：長崎県，15個体：大分県，40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，ネツタイエカACCequin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検索した．国立感染症研究所で継代飼育して

いるアカイエカ西宮系統から抽出したDNAをEcoRVで切断し，そのDNA断片にアダプター(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3' と3'末端をアミノ基で修飾した5'-ACCAGCC-3')を付加した(CA)_nのおよび(TACA)_nのマイクロサテライト領域を増幅するために(CA)₁₀およびDB(TACA)₆TA, BV(ACAT)₆A, VB(CATA)₆, BD(ATAC)₆A 混合プライマー(Yuskianti *et al.*, 2012)とアダプターの一部配列からなるプライマーAPI(5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3')を用いてPCRを行った．

PCR条件はLian *et al.* (2001) に従った．増幅したPCR産物をクローニングにして，得られた組み換え体の配列を決定した．決定した配列から特異的プライマーを2個設計し，アダプターに含まれるAPI, AP2(5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3')でNested PCRを行い隣接領域の塩基配列を決定した．これらのマイクロサテライトの両側の配列からプライマーを設定し，日本産のアカイエカ，チカイエカ，ネツタイエカでPCR増幅出来るかを調べ，3種で反復数に違いがあるかを確認していった．使用したアカイエカ，チカイエカは国立感染症研究所で継代飼育されている西宮，新宿系統をそれぞれ使用した．ネツタイエカは琉球大学で継代飼育されている系統を使用した．その結果CppAC009(5'-GGTTCCTCGTCGATGTGTT-3', R:5'-TTGTTTCGTCCAACCTTGCCA-3'), CppAC012(F:5'-GTGCC ACCTCAAGTGTCAGA-3', R: 5'-TCCGA TGTTTCATTGTTCC-3'), Cpp4b007(F: 5'-ATTGAATGGTTTCCAATGT-3', R: 5'-TCGAAAACCCACCTTGATGT-3')の3つ領域が有効であることがわかった．合わせて8つの領域でマイクロサテライトの解析を行った．まずPCRを以下の条件で行った．20 μlに0.5U *Ex Taq*, 1 × *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

九州北部の福岡県、長崎県、大分県、熊本県、宮崎県、鹿児島県から164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(図1, 表1)。大分県の2個体と鹿児島県の3個体はチカイエカハプロタイプのホモとなった。これら系統のうち飼育をして無吸血産卵するかどうかを確認した3系統に関しては、全てを無吸血産卵した。またPCRでチカイエカと判定されたすべての個体は雄の外部生殖器の形態もチカイエカであった。この系統以外で飼育をして無吸血産卵するかどうかを確認した系統では、無吸血産卵は行わず、それらの雄の外部生殖器の形態はアカイエカであった。アカイエカ159個体のうち95匹がアカイエカハプロタイプのホモ、60個体がアカイエカとネッタイエカハプロタイプのヘテロ、4個体がネッタイエカハプロタイプのホモであった。4個体のうち1個体は大分県、3個体は鹿児島県で採集された。アカイエカの中でネッタイエカハプロタイプの頻度は全体の平均で22.5%だった。最も高かったのは大分県(26.3%)、最も低かったのは福岡県だった(9.6%)だった。

2. マイクロサテライト領域を利用した検討

チカイエカ5個体についてはマイクロサテライト8領域においてもコントロールと同じチカイエカハプロタイプを示した。アカイエカ159個体においてマイクロサテライト8領域でその遺伝子頻度を調べた。しかし、CppAC00, CppAC012, Cpp4b007の3領域は北部九州(福岡県, 長崎県, 大分県)では判別不明のハプロタイプの頻度が0.9~7.0%であったが、南九州(熊本県, 宮崎県, 鹿児島県)では34.0~58.2%と極めて高い値をしめした。よって、集団間の比較には残りのCxqGT4, CxqGT6b, CxpGT4, CxpGT12, CxpGT51の5つの領域について行うことにした(表2, 図2)。これらの領域では判断できないハプロタイプの頻度は1.9~9.4%であった。またすべての領域においてのネッタイエカのハプロタイプが存在し、その頻度は6.3~11.6%であった。5領域全体で地域別ネッタイエカのハプロタイプの頻度をみると、鹿児島県が15.2%で最も高く、福岡県が4.2%で最も低かった。

3. 集団間の違いについて

アカイエカのなかにネッタ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5つのマイクロサテライト領域全てで見られ、九州すべての地域で見られた。鹿児島県がネッタイエカのハプロタイプの頻度が他の県に比べて少し高く、福岡県が少し低い。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タ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タ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、九州のアカイエカは調べた全ての領域でネッ

タイイエカのハプロタイプを持つことが明らかとなった。地域間の比較では有意にはならなかったが、鹿児島県の集団ネットアイエカのハプロタイプの頻度が高く、福岡で低かった。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。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。この結果はこの3つ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か興味がある。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と言われていた。しかし今回の調査では九州内に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出来ることから、今後の集団遺伝的解析に有効であると思われる。

今回の採集ではチカイエカの頻度が少なかった(3.0%)。これは、採集方法が市街地でのOvitrapや雨水ますからの幼虫・蛹採集だったからかもしれない。今回は結果に出さなかったが、ライトトラップで採集した雌成虫をアセチルコリンエステラーゼのPCRで判別すると23.2%(26/112)であった。チカイエカを調べる際は採集方法が重要であると同じく、アカイエカに関しても採集

方法による違いの検討も必要であると思われる。

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、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大会, 2015年3月, 金沢市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

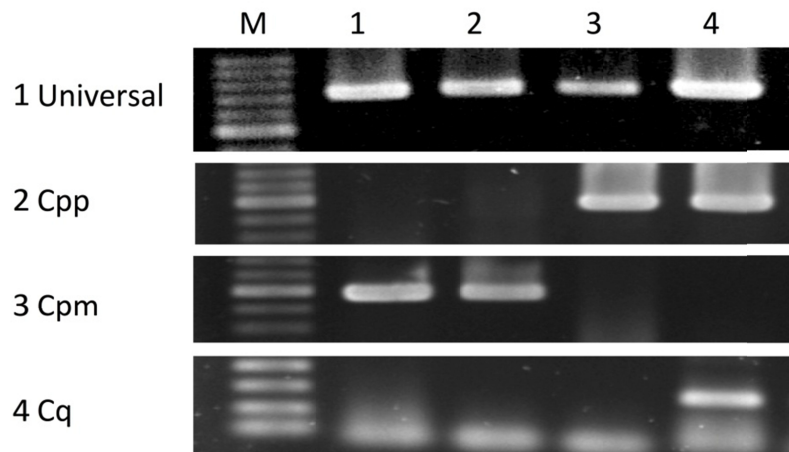


図1 アセチルコリンエステラーゼ領域による PCR

上段から 1.ユニバーサルプライマーセット (Universal), 2.アカイエカ種特異的プライマーセット (Cpp), 3.チカイエカ種特異的プライマーセット (Cpm), 4.ネッタイエカ種特異的プライマーセット (Cq)それぞれを使って行った PCR の泳動結果 . M : マーカー , 1 と 2 はチカイエカのホモ . サンプル 3 はネッタイエカのホモ , 4 はアカイエカとネッタイエカのヘテロ .

表1 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 |
| Fukuoka | 26 | 21 | 0 | 5 | 0.904 | 0.096 |
| Nagasaki | 15 | 8 | 0 | 7 | 0.767 | 0.233 |
| Oita | 38 | 19 | 1 | 18 | 0.737 | 0.263 |
| 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 | 159 | 95 | 4 | 60 | 0.786 | 0.214 |

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

大分で2個体と鹿児島で3個体はチカイエカと検出されたが, それはこの表には含まれていない. frequencies はアカイエカの79個体中の頻度を表している.

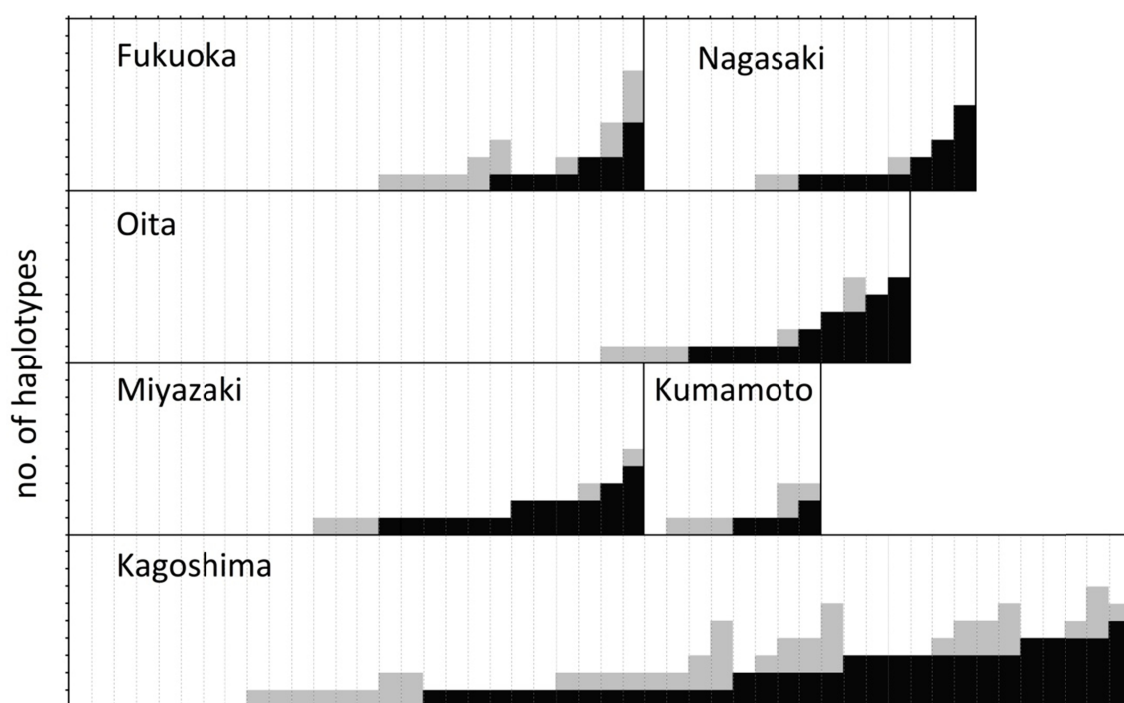


図2 マイクロサテライト5領域の頻度分布

九州(福岡, 長崎, 大分, 熊本, 宮崎, 鹿児島)の各個体の頻度分布. 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10等分(5領域x2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5領域の各ハプロタイプ数と頻度

| | n | CxqGT4 | | | CxqGT6b | | | CxpGT4 | | | CxpGT12 | | | CxpGT51 | | |
|-------------|-----|--------|-------|-------|---------|-------|-------|--------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | Cpp | Cq | nd | Cpp | Cq | nd | Cpp | Cq | nd | Cpp | Cq | nd | Cpp | Cq | nd |
| Fukuoka | 26 | 49 | 0 | 3 | 42 | 5 | 5 | 48 | 3 | 1 | 45 | 3 | 4 | 51 | 0 | 1 |
| Nagasaki | 15 | 25 | 5 | 0 | 25 | 5 | 0 | 27 | 3 | 0 | 28 | 1 | 1 | 27 | 1 | 2 |
| Oita | 38 | 69 | 6 | 1 | 67 | 9 | 0 | 74 | 0 | 2 | 69 | 7 | 0 | 72 | 0 | 4 |
| Kumamoto | 8 | 12 | 0 | 4 | 14 | 2 | 0 | 16 | 0 | 0 | 12 | 3 | 1 | 15 | 0 | 1 |
| Miyazaki | 24 | 43 | 4 | 1 | 45 | 3 | 0 | 45 | 2 | 1 | 41 | 6 | 1 | 40 | 6 | 2 |
| Kagoshima | 48 | 73 | 14 | 9 | 80 | 11 | 5 | 76 | 18 | 2 | 56 | 17 | 23 | 79 | 13 | 4 |
| Total | 159 | 271 | 29 | 18 | 273 | 35 | 10 | 286 | 26 | 6 | 251 | 37 | 30 | 284 | 20 | 14 |
| frequencies | | 0.852 | 0.091 | 0.057 | 0.858 | 0.110 | 0.031 | 0.899 | 0.082 | 0.019 | 0.789 | 0.116 | 0.094 | 0.893 | 0.063 | 0.044 |

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, nd : 判別不能
チカイエカを除いたアカイエカ 159 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 .

表3 マイクロサテライト5領域をまとめた県別の数と頻度

| | n | no. of haplotypes | | | frequency | | |
|-------------|-----|-------------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | Cpp | Cq | nd | Cpp | Cq | nd |
| Fukuoka | 26 | 235 | 11 | 14 | 0.904 | 0.042 | 0.054 |
| Nagasaki | 15 | 132 | 15 | 3 | 0.880 | 0.100 | 0.020 |
| Oita | 38 | 351 | 22 | 7 | 0.924 | 0.058 | 0.018 |
| Kumamoto | 8 | 69 | 5 | 6 | 0.863 | 0.063 | 0.075 |
| Miyazaki | 24 | 214 | 21 | 5 | 0.892 | 0.088 | 0.021 |
| Kagoshima | 48 | 364 | 73 | 43 | 0.758 | 0.152 | 0.090 |
| Total | 159 | 1365 | 147 | 78 | | | |
| frequencies | | 0.858 | 0.092 | 0.049 | | | |

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, nd : 判別不能