

ハマダラカの中腸内細菌による  
新たなベクターコントロール法開発に関する基礎的研究

箱崎 純

Studies on the development of the new vector control method  
using midgut bacterium of *Anopheles stephensi*

Jun HAKOZAKI

## 目 次

序 論	-----	1
・ 蚊の生活環		
・ 蚊の繁殖		
・ ベクターとなる蚊		
・ ハマダラカの繁殖		
・ ハマダラカの中腸内細菌		
・ マラリア		
・ <i>Plasmodium</i> 属原虫の生活環		
・ マラリア制御に向けたベクターコントロールの課題		
・ 本研究の目的		
第一章 ハマダラカの中腸内細菌が卵巣内の卵成熟に与える 影響の解析	-----	10
・ 材料と方法		
・ 結果		
・ 考察		
・ 図表		
第二章 ハマダラカ中腸からの <i>Methylobacterium</i> sp. 分離および卵成熟抑 制物質の特定	-----	24
・ 材料と方法		
・ 結果		
・ 考察		
・ 図表		

第三章	<i>Methylobacterium</i> sp.による卵成熟抑制の機序解明に向けた	
検討	-----	40
	・ 材料と方法	
	・ 結果	
	・ 考察	
	・ 図表	
総括	-----	53
要約	-----	54
参考文献	-----	58
謝辞	-----	77

## 序論

### 蚊の生活環

蚊は 2 亜科 44 属 約 3,500 種存在している [92]。生活環は卵、幼虫、蛹、成虫から成り立っており、完全変態をする昆虫である [47]。

蚊の幼虫および蛹は水中で生活する。幼虫は藻類や微生物などを食べて成長のための栄養を獲得する [19]。幼虫は 1 ～ 2 週間で 4 回脱皮をして蛹になる。蛹は活発に運動をするが、食事はしない。蛹の期間は約 2 日間であり、その後羽化して成虫になる。

蚊は成虫になると地上で生活する。成虫の主食は雌雄ともに花の蜜や樹液であり、糖分を得ている [37, 84, 104]。雄成虫はどの種の蚊でも吸血をしないが、雌成虫においては、約 2,500 種が産卵に向けて卵を成熟させるために吸血をする [37]。吸血する蚊はほとんどの種がヒトを吸血するが、例えば *Culex* 属の *Cx. pipiens* のように、哺乳類よりも鳥類を好んで吸血する蚊種もいる [72, 78]。吸血のピークとなる時間帯も蚊の種によって異なる。*Aedes* 属蚊は吸血のピークは日の出後の夜明けの時間帯である [121]。*Culex* 属蚊は吸血のピークが午前中と夕方の 2 回ある種もいれば、夜間に吸血ピークを迎える種もいる [113]。*Anopheles* 属蚊（ハマダラカ）の吸血のピークは真夜中から明け方までの時間帯である [43]。

### 蚊の繁殖

蚊は羽化後数日間で性成熟をする。蚊の雌成虫の羽化直後の卵巣内では、卵胞が未熟な状態である [28, 83]。羽化後 9 ～ 12 時間で、アラタ体によって合成が促進される幼若ホルモン・Juvenile hormone が、

黄体形成前の卵巣を発達させる [54]。羽化後 48～72 時間で卵黄形成前の成熟した卵胞になると、その後卵巣および卵胞は休止期に入り、吸血後になってから卵巣の卵胞内に卵黄が形成される [28, 83]。雄成虫では、羽化後約 0～5 日で精子形成が完了する [71]。

性成熟をした雌雄の蚊は、羽化後 3～7 日で最も交尾をするようになる [70]。蚊の交尾は一生涯に一度である [53, 81, 110]。卵成熟のために吸血が必要な蚊は、交尾行動が引き金となって吸血源となる動物を探索する [63]。

吸血後の蚊の雌成虫の体内では、卵巣が卵黄形成前の休止期の状態から変化して、卵黄が形成されるようになる。血液消化や各種ホルモン分泌により、脂肪体卵黄前駆体タンパク質であるビテロジェニン (Vg) が合成される [4, 48, 49]。その後、Vg が卵母細胞に取り込まれることで卵内に卵黄が充満すると、卵成熟は完了する [95]。

卵成熟過程において、卵内に卵黄が蓄えられていく過程で卵形態は変化し、それぞれの卵形態は以下の Christopher's stages により分類される [24]。まず、吸血前の卵黄が含まれていない状態の卵胞は stages I-II と定義される。卵内に卵黄が半分ほど蓄えられ、球形になった卵は stage III である。その後卵の形態が球形から楕円形に変化すると stage IVa となり、楕円形で最大サイズになった卵は stage IVb である。最終的に成熟が完了し、産卵の準備が整った卵は stage V である。

成熟が完了した蚊の卵は通常、水中または水面に産出される。卵孵化については、産卵後 48 時間以内に孵化するタイプと、乾燥に強く水から出ても長期間生存し休眠状態に入るタイプがある [27]。さらに、卵塊をなして産出されるタイプと、各卵が個別に産出されるタイプにも分けられる [27]。

### 蚊の中腸内細菌

蚊の腸は解剖学的な特徴から、前腸、中腸前部、中腸後部、後腸に分かれている。前腸は咽頭、腹部憩室、背側憩室から成り立つ。腹部憩室および背側憩室は、筋肉質のクチクラで覆われており、食餌した糖분을貯蔵して中腸に放出する [27]。中腸前部は糖분을消化して、中腸後部では吸血した血液を消化する [52]。後腸は、中腸とマルピーギ管から受け取った排泄物を排出する [27]。

蚊の中腸内には多数の細菌が存在しており、栄養供給、消化、生殖機能、発生、免疫応答機能および病原体に対する感受性など、多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている [33, 40]。蚊の中腸内細菌は主に環境から獲得され [105, 115]、その組成には食べた餌の内容が直接関わっている [91, 116]。よって食性の異なる幼虫と成虫では腸内細菌の組成が大きく異なる [5, 58]。さらに、吸血をする雌成虫としない雄成虫の間でも腸内細菌の組成が異なり [5]、雌成虫では吸血前と吸血後でも組成が変化する [18]。さらに、蚊の中腸内細菌の組成は、蚊の種類や、栄養状態、発生段階、そして生息地域によっても大きく異なる [9, 34, 74, 79, 85, 107, 108]。蚊の中腸内細菌の組成を解析するために、16S rRNA 領域の配列決定が行われる [88]。

### ベクターとなる蚊

蚊の吸血は卵成熟のみならず、病原体の媒介にも関与している。*Aedes* 属蚊、*Culex* 属蚊、*Anopheles* 属蚊（ハマダラカ）の数百種類は吸血により、ヒトに病気を引き起こす各種病原体のベクターとなる。

蚊媒介性感染症による死亡者は、毎年約 70 万人にもものぼる [122]。

*Aedes* 属蚊は、*Ae. aegypti*（ネッタイシマカ）と *Ae. albopictus*（ヒトスジシマカ）が、黄熱病 [111]、チクングニア熱 [60]、デング熱の原因病原体となるウイルスを媒介する [51, 76]。*Culex* 属蚊は主に *Cx. modestus* と *Cx. pipiens* が、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎、西部ウマ脳炎、リフトバレー熱ウイルス、ヒトのリンパ系フィラリア症を引き起こす線虫など、様々な病原体を媒介する [2, 8, 25, 36, 77]。*Anopheles* 属蚊においては約 40 種が、ヒトにマラリアを引き起こす *Plasmodium* 属原虫を媒介する [61]。2021 年においては、マラリアによって約 60 万人が死亡した [124]。このことから、マラリアによる死亡者は、蚊媒介性感染症の死亡者のうち最も多くを占めている。

#### ハマダラカの繁殖

ハマダラカは 465 種存在している [50]。ハマダラカはヒトからの吸血を好むが、鳥類や爬虫類も吸血する [10, 123]。ハマダラカは夜間吸血性である [43]。ハマダラカが吸血をすると、次のような卵成熟過程が開始する。吸血後の中腸内では、トリプシン、アミノペプチダーゼなどの酵素によって血液中のタンパク質がアミノ酸に消化される [17]。血液消化と並行してホルモンも分泌され、吸血後数時間で脳からインスリン様ペプチド (ILP) 3 および ILP4 が分泌され [56, 98]、同時期に卵巣エクジステロイド生成ホルモン (OEH) も放出される [21]。その後、ステロイドホルモンであるエクジソンが卵巣上皮から脂肪体に分泌される [6]。アミノ酸とステロイドホルモンのエクジソンが脂肪体に輸送されると、卵黄前駆タンパク質であるビテ



ロジェニン (Vg) が合成される。Vgが脂肪体から卵巣に取り込まれて卵内に卵黄タンパク質が充満することによって、卵成熟が完了する [82]。ハマダラカにおいては、吸血後 12 時間で卵は stage III に達する。その後、吸血後 24 時間で stage IVa に、吸血後 36 時間で stage IVb に達する。吸血後 48 時間で、卵巣内の卵成熟が完了し、浮嚢が形成され、産卵の準備が整った stage V に達する。

ハマダラカの卵は水面に 1 つずつ個別に産み付けられ、乾燥すると卵は死んでしまう。よってハマダラカの卵は、産卵から 2 日以内に卵孵化する [127]。ハマダラカの卵に形成された浮嚢の形は種によって異なるため、産出された卵の浮嚢を観察することで種同定が可能である [68]。ハマダラカの幼虫は、池やダム、沼などの、流れが遅く水がきれいな場所に生息している [101]。

#### ハマダラカの中腸内細菌

ハマダラカの中腸内細菌は、*Plasmodium* 属原虫の媒介時に与える影響が多数報告されている [7, 26, 31, 32, 45]。抗生物質の摂取によって中腸内から細菌が除去された *An. gambiae* は、熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* 感染中に複数の免疫遺伝子の発現量が減少することで、オーシストおよびオーカイネート数が著しく増加する [32]。*An. stephensi* の中腸内の *Serratia marcescens* は、細菌が放出する抗原虫因子の作用により、ネズミマラリア原虫 *P. berghei* のオーカイネートの中腸内侵入を妨げる [7]。

さらにハマダラカの中腸内細菌は、幼虫発育や生殖にも影響を与えることが報告されている。ハマダラカ幼虫の餌中に細菌量が増えると、幼虫の成長と発育が早まる [66]。*An. gambiae* では、*Asaia* 属菌を

腸内に保有する幼虫は、保有しない幼虫よりも蛹期に達するまでの時間が短くなる [75]。さらに、抗生物質テトラサイクリンを与えることで中腸が無菌になった *An. stephensi* は生殖能力が低下することや [97]、*An. gambiae* の雌成虫の中腸内細菌である *Enterobacter cloacae* および *Serratia marcescens* は産出された卵の孵化率を増加させることが報告されている [35]。

## マラリア

マラリアは、年間 2 億 4,700 万人が感染し、約 60 万人が死亡する疾病である [124]。マラリアの感染者および死亡者のほとんどは、サハラ以南のアフリカの子どもである [124]。症状としては、はじめに疲労、頭痛、関節痛、筋肉痛、腹痛、胸痛などが 2 ～ 3 日間続き、その後子どもや免疫力の低下した人では、40°C もの高熱が出る [11]。マラリア感染者における重症度は、病原体となる原虫の種類、患者の年齢や遺伝的体質、民族性、原虫感染への免疫力、抗マラリア薬への曝露歴などによって異なる [29, 87]。

ヒトのマラリア病原体は *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* の 5 種類であり、*An. gambiae* をはじめとする約 40 種のハマダラカによって媒介される [61]。ヒトにおけるマラリアの主な感染経路は、原虫に感染したハマダラカによる吸血、感染血の輸血、感染血に汚染された注射針の使用、感染した母親から胎児へ経胎盤感染が挙げられる [11]。

世界中で *Plasmodium* 属原虫は約 250 種報告されており、その中にはサル、コウモリ、トカゲ、鳥類、爬虫類などにマラリアを引き起こすものも含まれる。鳥類や爬虫類に感染する *Plasmodium* 属原虫は、ハ

マダラカではない他属の蚊や、他の吸血昆虫によって媒介される [86]。 *Plasmodium* 属原虫は宿主特異性が強く、通常それぞれの宿主種にのみ感染する。しかし、 *P. knowlesi* のように、ヒトとサルのどちらにもマラリアを引き起こすような原虫種もみられる [106]。

### *Plasmodium* 属原虫の生活環

ヒトに感染する *Plasmodium* 属原虫は、ハマダラカ体内で有性生殖を行い、ヒト体内で無性生殖を行う。ハマダラカが *Plasmodium* 属原虫に感染した血液を吸血すると、蚊体内で原虫の配偶子母細胞であるガメートサイトが、配偶子である雄ガメートおよび雌ガメートへと変化する。雌雄ガメートサイトそれぞれが中腸内腔で受精すると、接合子であるザイゴートになる [14]。ザイゴートはその後、運動性のあるオーキネートへと分化する。オーキネートは蚊の中腸上皮の表面へ移動後、オーシストへの発育を完了する [12, 42, 102]。オーシスト内では、数 1,000 個のスποロゾイトが形成され、スποロゾイトは蚊の唾液腺に侵入する。

唾液腺にスποロゾイトが侵入したハマダラカが新たにヒトを吸血することで、スποロゾイトが脊椎動物の血液中に侵入して、マラリアの新たな感染が成立する [38, 62]。ヒトの血液内に侵入したスποロゾイトは肝臓に移動後、肝細胞に侵入し、そこで数千倍に増殖する [1]。その際、多数分裂により形成されるのがメロゾイトである [90]。メロゾイトは血液中に放出され [106]、赤血球内で 1 つのメロゾイトが無性生殖をして、8 ～ 64 個の新しいメロゾイトに分裂する [41]。一部のメロゾイトは、有性生殖のための gametocyte ガメートサイトと呼ばれる次の発生段階に分化する [59]。ガメートサイト形成

により、ヒト体内での *Plasmodium* 属原虫の生活環は完了する。

#### マラリア制御に向けたベクターコントロールの課題

蚊媒介性感染症による死者のうち、マラリアによる死者は約 9 割を占めている [122, 124]。マラリアの発生率を減少させるためには、ベクターとなるハマダラカの発生をコントロールし、ヒトがハマダラカに刺されないよう対策することが最も効果的であると報告されてきた [15]。これに則り、様々な方法でマラリア対策としてのハマダラカに対するベクターコントロールが試みられてきた。

かつて殺虫剤が開発される前は、幼虫の発育場所となる水場の埋め立てや、住宅環境の改善によりドアや窓からの蚊の侵入防止に重点が置かれてきた。その後、DDT やディルドリンなどの化合物が生産されて殺虫剤として屋内外で使用できるようになると、夜間吸血性であるハマダラカに就寝中に吸血されることを防ぐために、殺虫剤を浸み込ませた蚊帳 (LLIN) が使用されるようになった [120]。さらに 21 世紀になると、持続性が高い LLIN の使用と屋内への殺虫剤の噴霧 (IRS) がなされるようになった。その結果、マラリアの患者数、死者数は大幅に減少した [15]。

しかし昨今、殺虫剤に抵抗性を有するハマダラカの出現が問題になっている [30, 93, 118]。殺虫剤抵抗性蚊の幼虫は、生息密度の低下により栄養を多く利用できる。そのため、幼虫は通常よりも大きく成長することができ、その結果、より多くの次世代蚊の繁栄により殺虫剤抵抗性蚊のさらなる増加へとつながる [118]。よって現在、マラリアの対策として殺虫剤に替わるベクターコントロール法の開発が望まれている。

## 本研究の目的

ハマダラカの中腸内細菌が、宿主の生殖能力や産出された卵の孵化率、*Plasmodium* 属原虫の媒介能に影響を与えることから [7, 32, 35, 97]、近年では中腸内細菌を応用したベクターコントロール法開発が期待されている。本研究では卵成熟が、新たな蚊の発生に直接つながること、原虫媒介や産卵と同様に吸血によって開始することに着目した。そのため、ハマダラカ *An. stephensi* の中腸内細菌が卵成熟にも影響を与えると仮説を立てて、検討を行った。第一章においては、中腸内細菌が卵巣内の卵成熟に与える影響を検討するために、抗生物質の摂取により中腸内細菌の組成および量を変化させた蚊の吸血後の卵巣を観察した。第二章では、卵成熟を抑制する中腸内細菌の分離および菌由来の卵成熟抑制物質の特定を行った。さらに第三章では、中腸内細菌による卵成熟抑制の機序解明に向けた検討も試みた。本研究の結果から、ハマダラカの中腸内細菌による卵成熟抑制現象を応用した、新たなベクターコントロール法開発の可能性が考えられた。

## 第一章 ハマダラカの中腸内細菌が卵巣内の卵成熟に与える影響の解析

昆虫の腸内には多数の細菌が存在する。様々な昆虫種において、腸内細菌が宿主の栄養や消化、生殖に影響を与えることが報告されている [20, 64, 114]。シロアリは炭素が豊富で窒素が少ない餌を食べるため、後腸内に存在するスピロヘータが窒素を供給している [20]。蛾の一種である Velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) の腸内細菌は、消化酵素であるプロテアーゼ、セリンプロテイナーゼ、およびリパーゼの活性に関与している [117]。テントウムシの一種 *Henosepilachna vigintioctopunctata* の腸内細菌である *Acinetobacter soli*、*Ac. ursingii*、*Moraxella osloensis* および *Empedobacter brevis* は、卵巣と精巣の発達を促進する [64]。

蚊の中腸内細菌も、宿主の栄養供給や消化、生殖機能、成長、免疫反応、病原体に対する感受性などに影響を与えている [33, 40]。

*Anopheles* 属蚊（ハマダラカ）は約 40 種が、ヒトにマラリアを引き起こす *Plasmodium* 属原虫を媒介する [61]。よってハマダラカの中腸内細菌については、主に原虫の媒介能に与える影響が数多く報告されている [7, 26, 31, 32, 45]。抗生物質を摂取させることによって中腸内の細菌を除去した *An. gambiae* が *P. falciparum* に感染すると、複数の免疫遺伝子の発現量が減少することにより、蚊体内での原虫数が増加する [32]。*An. stephensi* の中腸内細菌 *Serratia marcescens* は、細菌が放出する抗原虫因子の作用により *P. berghei* の中腸内への侵入を妨げる [7]。

ハマダラカの中腸内細菌は、*Plasmodium* 属原虫感染時のみならず、宿主である蚊そのものにも影響を与えている。例えば、餌中の細菌

量増加によりハマダラカの幼虫の中腸内細菌が増えると、幼虫の成長と発育が早まる [66]。 *An. stephensi* においては、*Asaia* 属菌を腸内に保有する幼虫は、蛹期に達するまでの時間が短くなる [75]。さらに、ハマダラカの中腸内細菌が産卵数や卵孵化率にも影響を与えると報告されている。*An. gambiae* の中腸内細菌である *Enterobacter cloacae* および *Serratia marcescens* は、宿主が産出した卵の孵化率を増加させる [35]。*An. coluzzii* の中腸内細菌である *Chromobacterium violaceum* は、産卵数と孵化率を低下させる [44]。

蚊では多くの種で、卵成熟のために吸血を必要とする [37]。ハマダラカも卵成熟のために吸血を必要とする種である。吸血後の卵巣内における卵の発育ステージは、Christopher's Stages に基づいて分類される [24]。吸血前のハマダラカの卵巣内の卵胞には、卵黄が含まれていない (stages I-II)。吸血後、時間の経過とともに卵黄が徐々に卵内に蓄積してき、吸血後 12 時間で卵は球形の stage III に達する。その後、卵の形態は球形から徐々に楕円形に変化し、吸血後 24 時間で stage IVa に達する。吸血後 36 時間になると、卵は最大サイズの stage IVb に達する。吸血後 48 時間で、卵巣内の卵成熟が完了し、浮嚢が形成され、産卵の準備が整った stage V に達する。吸血後 72 時間に達すると、卵巣内で成熟した卵が、産出される。

ハマダラカの中腸内細菌は、蚊体内における *Plasmodium* 属原虫の有性生殖時や産卵に影響を与える [7, 26, 31, 32, 44, 45]。ハマダラカ体内における *Plasmodium* 属原虫の有性生殖は、蚊が原虫に感染したヒトを吸血することで開始する [12, 14, 42, 102]。ハマダラカの産卵も、卵成熟のために行われる吸血により開始する。このことから本研究では、*An. stephensi* の中腸内細菌が原虫感染や産卵と同じく吸血

によって開始する卵巣内における卵成熟にも影響を与えると仮説を立て、検討を行った。ハマダラカの中腸内細菌に関する研究において、細菌の組成や量を変化させるために、抗生物質を添加したスクロースを経口摂取させる手法が用いられる [7, 35]。よって本研究においても、抗生物質ストレプトマイシン (ST) およびカナマイシン (KM)、ペニシリン (PC) を一定期間摂取させた *An. stephensi* について、吸血後の卵巣を観察した。抗生物質の選定理由は、抗菌スペクトルの違いである。ST および KM は抗菌スペクトルが広いアミノグリコシド系抗生物質であり、グラム陽性菌と陰性菌の両方をターゲットとする [46]。一方 PC は、ブドウ球菌や連鎖球菌、肺炎球菌などのグラム陽性菌や炭疽菌に対して抗菌活性を持つ [65]。それぞれを単剤で 10% スクロースに添加したものを *An. stephensi* に与えて、その後に吸血をさせてから卵巣を観察して、中腸内細菌が卵成熟に与える影響を検討した。



## 材料と方法

### ・蚊の系統と飼育方法

本研究では、MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center) から譲り受けたハマダラカ *Anopheles stephensi* STE2 strain を用いた。成虫は 19°C、相対湿度 80%、暗期：明期が 12 時間：12 時間の環境下で、10% スクロースを与えて飼育した。スクロースに浸した綿を成虫用の飼育箱に設置して給餌した。幼虫は 27°C、相対湿度 80%、暗期：明期が 12 時間：12 時間の環境下で、Tetrafin fish food (Spectrum Brands Japan Inc., Tokyo, Japan) を与えて飼育した。

### ・蚊の抗生物質摂取方法

蚊の中腸内細菌の組成および量を変化させるために、雌成虫に以下の条件で抗生物質を摂取させた (Fig. 1)。ペニシリン (PC, 0.63 mg / ml, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)、ストレプトマイシン (ST, 0.155 mg / ml, Meiji Seika Pharma) またはカナマイシン (KM, 0.5 mg / ml, Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を添加した 10% スクロースを、羽化日から 2 週間与えた蚊の群をそれぞれ、PC/2wks group、ST/2wks group および KM/2wks group とした。ST または KM 添加 10% スクロースを 7 日齢の成虫に 1 週間与えた蚊の群は、ST/1wk group または KM/1wk group とした。羽化から吸血までに 10% スクロースのみを与えた蚊を Control group とした。

### ・蚊の吸血

Control group の蚊および各種抗生物質摂取蚊への吸血は、12～24 時間の絶食を経てから行った。各群につき、Medetomidine (0.75 mg / kg,

Domitor® ; Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan), Midazolam (4.0 mg / kg, Maruishi Pharmaceutical, Osaka, Japan), および Butorphanol (5.0 mg / kg, Vetorphale® ; Meiji Seika Pharma) で麻酔した ICR マウス (Charles River, Kanagawa, Japan) を 1 匹吸血させた。吸血後の雌成虫は 27°C、相対湿度 80%、明期：暗期が 12 時間：12 時間の環境下で飼育した。

#### ・蚊の卵巣形態観察

吸血後 2 日目の蚊にクロロホルム (Fujifilm Wako Pure Chemical) で麻酔をかけた後、滅菌 PBS 中で実体顕微鏡 (Leica Microsystems Ltd, M205 FA, Germany) 下で解剖をした。卵巣内の卵の成熟度を Christopher's Stages に従って判別した [24]。解剖時に stage IVb または stage V であった卵を成熟卵と定義した。中腸の外貌から吸血済みであると確認された蚊の数および、卵巣内に成熟卵のみを形成した蚊の数を数えた。成熟卵巣率は卵巣内に成熟卵のみを形成した蚊の数を吸血済みと確認された蚊の数で割って算出した。1 回の実験につき 20 匹以上の蚊を解剖し、各グループを 3 回以上実験した。

#### ・クローンライブラリー法による中腸内細菌の組成解析

Control group、PC/2wks group、ST/2wks group、KM/2wks group、ST/1wk group の各群から、吸血後 2 日目に 3 個体ずつ中腸を採取した。Quick – gDNA™ MiniPrep (Zymo Research, Orange, CA, USA) を用いて、吸血後 2 日目の中腸 3 個を 1 サンプルとしてゲノム DNA を抽出した。DNA の濃度と純度は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を使用して測定した。

中腸から抽出した DNA について細菌の 16S rDNA の部分配列 (466 bp)

を増幅するために、プライマー (331F: 5'- TCCTACGGGAGGCAGCAGT -3' および 797R: 5'- GGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT -3') を用いた [80]。PCR 反応物は 0.5  $\mu$ M プライマー、400  $\mu$ M dNTPs、および 0.625 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Grainer Japan, Tokyo, Japan) で調整した。PCR 条件は 94°C 5 分で変性した後、94°C 1 分、55°C 1 分のアニーリング、72°C 2 分の伸長反応を 30 サイクルとした。

PCR 産物は TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、TOPO ベクターにライゲーションした。ライゲーション混合物を加えた High-efficiency DH5 $\alpha$  competent cell (CosmoBio, Tokyo, Japan) を、Ampicillin sodium (Fujifilm Wako Pure Chemical) および X-gal (Fujifilm Wako Pure Chemical) を含む LB 寒天培地上に塗布し、16 時間形質転換反応を行った。

形質転換後、各群それぞれを塗布した LB 寒天培地上から 30 ~ 40 個の白色コロニーが得られた。得られた白色コロニーについて、Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) を用いてプラスミド DNA を抽出した。精製したプラスミド DNA のシーケンス解析は Fasmac (Kanagawa, Japan) に外注した。

#### ・統計解析

成熟卵巣率は、3 つの独立した実験による平均値  $\pm$  標準誤差で示した。成熟卵形成率の統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA, USA) により Tukey の多重比較検定による一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて行った。p < 0.05 を統計的に有意とした。

## 結果

### ・抗生物質摂取蚊の卵巣形態観察結果

蚊の中腸内細菌叢の破綻が卵成熟にどのような影響を与えるか検討するために、PC/2wks、ST/2wks または KM/2wks group を吸血後 2 日目に解剖して卵巣を観察した。その結果、Control group および PC/2wks group の蚊のほとんどは、卵巣内が stage IVb-V の卵で満たされていた (Fig. 2a)。一方、ST/2wks group および KM/2wks group の半数以上の蚊は、卵巣内に stage V の成熟卵と stage I-II の未成熟卵が混在していた (Fig. 2b)。

### ・抗生物質摂取蚊の成熟卵巣率の算出結果

ST または KM 摂取蚊の中腸内細菌叢が卵成熟に影響を与えると考えられたため、PC/2wks group、ST/2wks group および KM/2wks group の成熟卵巣率を比較した (Fig. 3a)。その結果、成熟卵巣率は各群間で有意差があった (ANOVA :  $p=0.0148$ )。また、ST/2wks group および KM/2wks group の成熟卵巣率は、Control group と比較して有意に減少していた。

加えて、ST および KM の 2 週間未満の摂取が卵成熟に及ぼす影響についても検討した。その結果、ST/1wk group および KM/1wk group の成熟卵巣率は Control group と比較して差がなかった (Fig. 3b)。

### ・クローンライブラリー法による中腸内細菌の組成解析

ST/2wks group と KM/2wks group の卵成熟抑制への中腸内細菌の関与を調べるために、吸血後 2 日目に採取した中腸内細菌の組成をクローンライブラリー法によって解析した。PCR によって増幅された細菌の 16S rDNA 領域の部分配列を解析した結果、卵成熟が抑制されなか

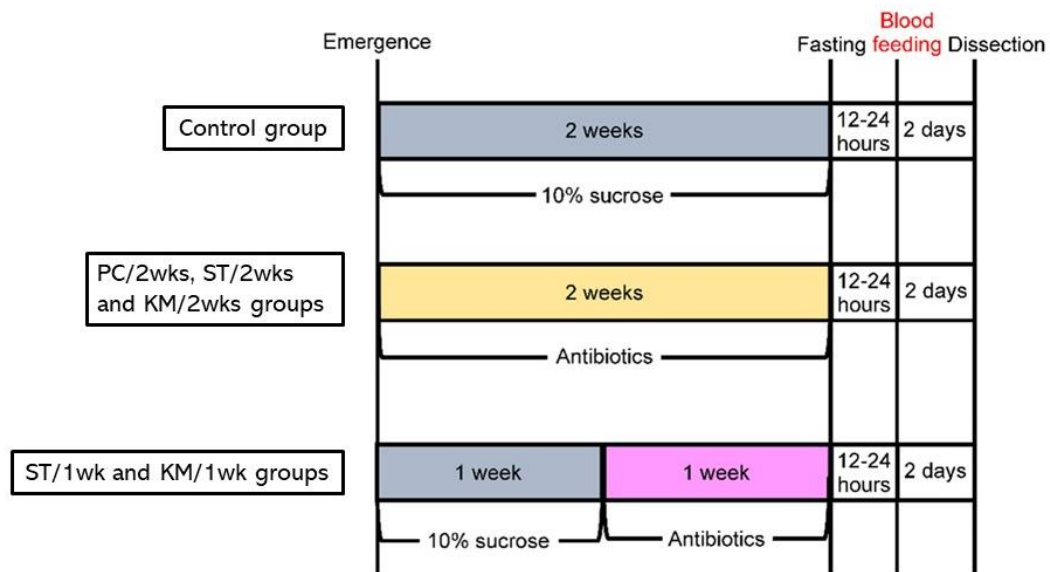
った Control group および PC/2wks は *Asaia* sp. が優勢であった。一方で、卵成熟が抑制された ST/2wks group および KM/2wks group は、Control group の組成とは著しく異なっていた。加えて、ST/2wks group と KM/2wks group で *Methylobacterium* sp. が優勢であった (Table 1)。

## 考 察

本章により、STまたは KM を添加したスクロースを羽化日から 2 週間経口摂取した蚊は、卵巣内に成熟卵と未熟卵が混在しており、卵成熟が抑制されることが示された。さらに、STまたは KM を 2 週間摂取した蚊では共通して、中腸内で *Methylobacterium* sp. が優勢であった。よって、中腸内で *Methylobacterium* sp. の割合が優勢になることが、卵成熟を阻害することが示唆された。

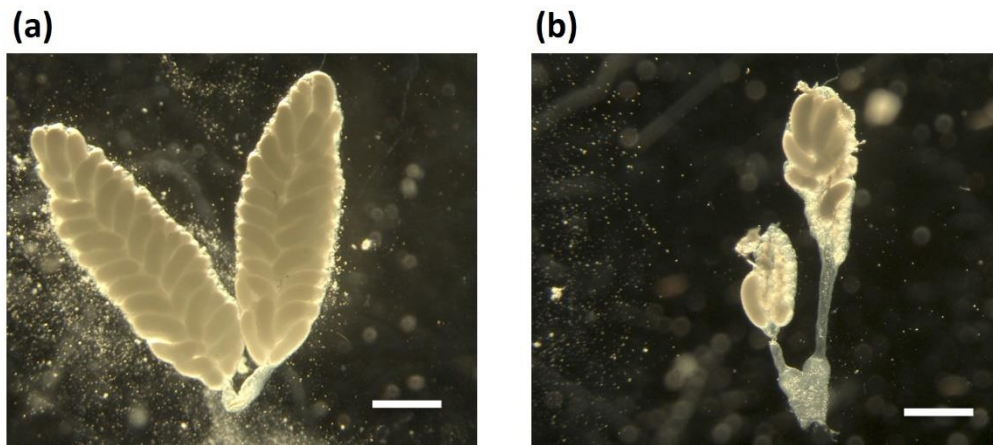
*Methylobacterium* sp. は、寒天ディスク拡散法による抗生物質感受性試験で、STおよび KM に感受性であることが報告されている [13, 117]。STおよび KM は殺菌的に作用する抗生物質である。しかし、本研究においてクローンライブラリー法により中腸内細菌の組成を解析した結果、STまたは KM を 2 週間摂取した蚊と、STを 1 週間摂取した蚊において、*Methylobacterium* sp. が検出された。このことから、本研究で用いた濃度の STおよび KM は *Methylobacterium* sp. を殺菌できない可能性が考えられた。またクローンライブラリー法により、STを 1 週間摂取した蚊よりも、STを 2 週間摂取した蚊の中腸内のほうがより多く *Methylobacterium* sp. が検出されたことから、STが長期間作用した中腸内では *Methylobacterium* sp. が耐性を獲得している可能性も考えられた。本研究では、クローンライブラリー法に供したコロニー数が 30～40 個であった。しかし、クローンライブラリー法においてさらにより多くのコロニーについて解析を行う、または中腸内細菌の組成を次世代シーケンスにより解析する、などの手法を行った場合は、STを 1 週間摂取した蚊の中腸内から検出される *Methylobacterium* sp. の割合も変化する可能性が考えられた。

*An. stephensi* の幼虫に抗生物質を摂取させることにより腸内から *Asaia* sp. を排除すると、幼虫の発育が遅延する [23]。 *An. gambiae* と *An. chuzzii* においては、吸血後 8 日目の中腸内で *Asaia* sp. の割合が高くなる [107]。よって *Asaia* sp. は *Anopheles* 属蚊の幼虫発育および吸血後の過程に必要な腸内細菌の一種であると考えられる。中腸内細菌の組成を解析した結果、Control group は *Asaia* sp. が優勢だったが、卵成熟が抑制された ST/2wks および KM/2wks の中腸内では *Asaia* sp. が優勢ではなくなっていた。この結果から、ST/2wks および KM/2wks の中腸内における *Asaia* sp. の割合低下が卵成熟抑制の原因である可能性も考えられた。しかし、卵成熟が抑制されなかった ST/1wk の中腸内でも *Asaia* sp. の割合が著しく低かったことから、*Asaia* sp. の割合に関係なく *Methylobacterium* sp. が卵成熟を抑制すると考察した。



**Figure 1. Schedule of breeding mosquitoes fed with antibiotics.**



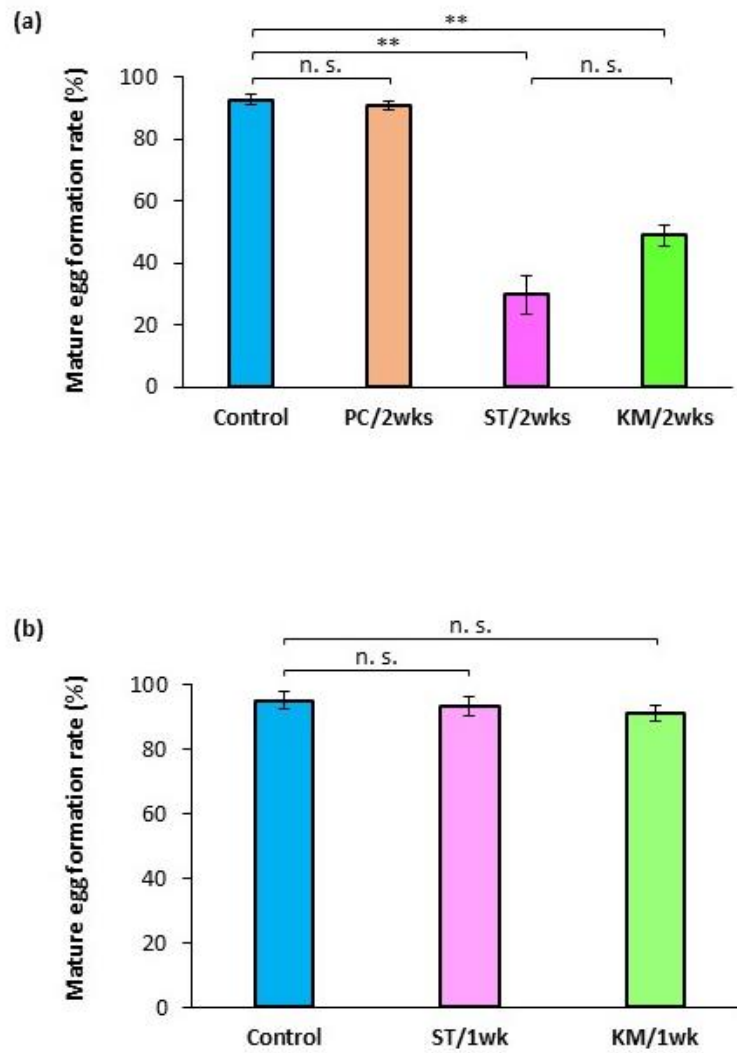


**Figure 2. Images of dissected ovaries in mosquitoes fed with antibiotics.**

(a) Image of dissected ovaries formed only mature eggs at 2 days after blood feeding.

(b) Image of dissected ovaries formed mature and immature eggs at 2 days after blood feeding.

Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3. Evaluation of egg maturation rate in mosquitoes fed with antibiotics.**

(a) Mature egg formation rate (the number of female mosquitoes that formed only mature eggs /the number of post-blood feeding females) of control, ST/2wks, PC/2wks, and KM/2wks groups.

(b) Mature egg formation rate in control, ST/1wk and KM / 1wk groups.

\*\*  $p < 0.01$

**Table 1. Results of preliminary identification of bacterial genus from midgut at 2 days  
after blood feeding by clone library method**

Group	Bacterial genus	No. of clones sequenced	Total clones sequenced
Control	<i>Asaia</i> sp.	23	44
	<i>Serratia</i> sp.	11	
	<i>Mycobacterium</i> sp.	4	
	<i>Brevundimonas</i> sp.	3	
	<i>Enterobactor</i> sp.	1	
	<i>Streptococcus</i> sp.	1	
	<i>Rhodococcus</i> sp.	1	
PC/2wks	<i>Asaia</i> sp.	26	32
	<i>Mycobacterium</i> sp.	5	
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1	
ST/2wks	<i>Brevundimonas</i> sp.	12	33
	<i>Methylobacterium</i> sp.	11	
	<i>Rhodococcus</i> sp.	4	
	<i>Moraxella</i> sp.	2	
	<i>Cutibacterium</i> sp.	2	
	<i>Undibacterium</i> sp.	1	
	<i>Mycobacterium</i> sp.	1	
KM/2wks	<i>Methylobacterium</i> sp.	24	27
	<i>Rhodococcus</i> sp.	2	
	<i>Cutibacterium</i> sp.	1	
ST/1wk	<i>Streptococcus</i> sp.	4	20
	<i>Rhodococcus</i> sp.	9	
	<i>Mycobacterium</i> sp.	3	
	<i>Methylobacterium</i> sp.	2	
	<i>Asaia</i> sp.	2	

## 第二章 ハマダラカ中腸からの *Methylobacterium* sp. 分離および卵成熟抑制物質の特定

蚊は地球上に約3,500種存在し [92]、完全変態をする昆虫である [47]。蚊の食性は、水中に生息している幼虫と地上に生息している成虫とで大きく異なる。自然界において幼虫は藻類や微生物などを食べて成長のための栄養を獲得する [19]。成虫の主食は花の蜜や樹液であり、糖分を得る [84, 104]。加えて雌成虫は、一部の種が産卵に向けて卵を成熟させるために吸血をする [37]。

蚊の中腸内には多数の細菌が存在しており、それらは主に環境から獲得される [105, 115]。蚊の中腸内細菌の組成や量には、蚊の食餌内容が直接関与することがわかっており [91, 116]、食性の異なる幼虫と成虫では腸内細菌の組成が大きく異なることが報告されている [5, 58]。さらに、吸血をする雌成虫と吸血をしない雄成虫の間でも腸内細菌の組成が異なり [5]、雌成虫では吸血前と吸血後でも組成が変化する [18]。本論文の第一章にて、ハマダラカ *An. stephensi* に抗生物質 ST または KM を添加した 10% スクロースを 2 週間経口摂取させ、吸血後 2 日目に解剖した結果、卵成熟の抑制が確認された。ST または KM を 2 週間与えた蚊の吸血後 2 日目の中腸内細菌の組成を解析した結果、*Methylobacterium* sp. が優勢だった。

*Methylobacterium* sp. に属する細菌は、植物の葉の表面や土壌、塵、淡水など様々な自然環境中から分離される [94, 112]。*Methylobacterium* sp. はハマダラカの体内にも存在しており、*An. culicifacies* では腸内および唾液腺に存在する [99]。*An. gambiae* と *An. coluzzii* では羽化日、吸血後 1 日目、吸血後 8 日目において、中腸、唾液腺および卵巣中の細菌叢

のうちほぼ均等の割合を占める [107] 。

*Anopheles* 属のハマダラカのうち、約 40 種がマラリアを引き起こす *Plasmodium* 属原虫を媒介し [61]、マラリアの死者は年間約 60 万人にも のぼる [124]。マラリアの対策として、ベクターであるハマダラカの 発生をコントロールすることが最も効果的であると報告されている [15]。そのために主に行われてきたのが、殺虫剤の使用である。殺 虫剤を蚊帳に浸み込ませたり [120]、屋内へ噴霧したりすることで [15]、マラリアの患者数、死者数を大幅に減少させてきた。しかし 昨今、殺虫剤に抵抗性を有する蚊の出現が問題になっている [30, 67, 93, 119]。したがって、殺虫剤に頼らない、新たなベクターコント ロール法を開発する必要がある。

ネッタイシマカにおいては、共生細菌 *Wolbachia* が宿主のウイルス 伝播を阻止することが報告されている [3]。野生のハマダラカにおい ても、*Wolbachia* が産卵に影響を与えることと、*Plasmodium* 属原虫に負 の影響を与えることが報告されている [100]。*Methylobacterium* sp. は環境 中に存在する細菌であること [94, 112]、第一章にて *An. stephensi* の吸 血後の卵巣内卵成熟を抑制することが示唆されたことから、本菌を 用いたハマダラカの新たなベクターコントロール法の可能性が考え られた。その第一歩として、*Methylobacterium* sp. 由来の卵成熟抑制物質 の特定に向けた検討を行った。

## 材料と方法

### ・蚊の系統と飼育方法

MR4 から譲り受けた *Anopheles stephensi* STE2 strain を用いた。幼虫および成虫は、第一章に記載した条件下で飼育した。

### ・ *Methylobacterium* sp. の分離

*Methylobacterium* sp. の分離は既報を参考に、Reasoner 2 Agar (R2A) 培地上において属特異的なピンク色のコロニーを形成すること目安として行った [39]。吸血の直前または直後に採取した ST/2wks group の 3 つの中腸を、100  $\mu$ l の滅菌 PBS 中でホモジナイズした。ホモジナイズ後の懸濁液を、R2A 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 上に塗布し、プレートを 30°C で 5 日間培養した。加えて、当研究室で 10% スクロースの調整と幼虫飼育に使用している水（飼育水）100  $\mu$ l も R2A 培地上に塗布し、30°C で 5 日間培養した。

培養後の R2A 培地上に形成されたピンク色のコロニーについて、16S rDNA 全長のシーケンス解析はMacrogen Japan (Tokyo, Japan)に外注した。PCR には、プライマー (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' および 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') を使用した。PCR 産物の配列決定には、プライマー (518F: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' および 800R: 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') を使用した。また、16S rDNA の部分配列 (466 bp) を増幅するために、プライマー (331F: 5'-TCC TAC GGG AGG CAGCAG T-3' および 797R: 5'-GGG ACT ACC AGG GTA TCT AATCCT GTT-3') を用いて PCR を行った [80]。PCR 反応物は 0.5  $\mu$ M プライマー、400  $\mu$ M dNTPs、および 0.625 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Grainer Japan,

Tokyo, Japan) で調整した。PCR 条件は 94°C 5 分で変性した後、94°C 1 分、55°C 1 分のアニーリング、72°C 2 分の伸長反応を 30 サイクルとした。16S rDNA の部分配列 (466 bp) のシーケンス解析は Fasmac に外注した。それぞれ決定した 16S rDNA 配列は、BLAST を使用して GenBank nucleotide database (NCBI) に登録されている配列と比較した。

- ・ ST/2wks 蚊の中腸内の 16S rDNA および *Methylobacterium* sp. の定量

ST/2wks 蚊の卵成熟抑制が、中腸内での *Methylobacterium* sp. の増加によるものかを検討した。方法として、中腸内の細菌量および *Methylobacterium* sp. 量をリアルタイム PCR により定量した。

無処置蚊および ST/2wks group の蚊をそれぞれ 10 匹ずつ吸血後 2 日目に解剖して中腸を採取し、DNA を抽出した。中腸 1 つを 1 サンプルとして、各サンプルを、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム、100 mM NaCl、および 10 mM EDTA からなる DNA 抽出バッファー 500  $\mu$ l でホモジナイズした。Proteinase K (10 mg/ml, Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を加え、55°C で一晩インキュベートした。その後、Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (Nippon Gene, Toyama, Japan) を使用してタンパク質を除去後、エタノール沈殿を行って DNA を抽出した。DNA の濃度と純度は NanoDrop を使用して測定した。

抽出した DNA を用いて、リアルタイム PCR を行った。KOD SYBR® qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) を使用して、DNA 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M 遺伝子特異的プライマー (Forward and Reverse) を各 0.2  $\mu$ l、超純水 3.4  $\mu$ l、ROX 0.2  $\mu$ l、SYBR-green 5  $\mu$ l を含む全 10  $\mu$ l の反応液を調整した。StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して、98°C で 2 分間の反応後、98°C 10 秒、60°C 10 秒、および 68°C 30 秒の反応を

40 サイクル行った。 *An. stephensi* リボソームタンパク質 S7 (AsRpS7) を内在性コントロールとして、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法により定量した [96]。

AsRpS7 Forward/Reverse primers (F: 5'-CCTGGATAAGAACCAGCAGA-3' および R: 5'-GGCCAGTCAGCTTCTTGTA-3') は、登録済みの配列 (GenBank accession number : AF539918) に基づいて設計した。細菌 16S rDNA の部分配列 (466bp) を標的とするプライマー (331F: 5'-TCCTACGGGAGGGCAGCAGT-3' および 797R: 5'-GGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3') を用いて [80]、無処置蚊および ST/2wks group の中腸内における細菌量を定量した。ST/2wks の中腸から分離した *Methylobacterium* sp. の 16S rDNA 配列に基づいて設計されたプライマー (F: 5'-TAATACGAAGGGGGCTAGCGTT-3' および R: 5'-GTCCCAGTATCGAAGGCCATT-3') を使用して、*Methylobacterium* sp. を定量した。

- ・ *Methylobacterium* sp. の生菌懸濁液の調整方法

飼育水および ST/2wks の吸血直後の中腸由来の *Methylobacterium* sp. を、それぞれ滅菌 10% スクロースに  $OD_{600nm}=0.04\sim0.08$  で懸濁して生菌懸濁液を調整した。調整した生菌懸濁液 100  $\mu$ l を R2A 培地上に塗布し 37°C 2 日間の培養後、培地上にピンク色のコロニーが形成されたことから、懸濁液中での菌の生存を確認した。

- ・ *Methylobacterium* sp. の死菌懸濁液の調整方法

上記の方法で調整した *Methylobacterium* sp. の生菌懸濁液について、100°C で 10 分間加熱することで死菌懸濁液を調製した。調製した死菌懸濁液は、R2A 培地に塗布し 37°C で 2 日間インキュベートして細菌が生存および増殖しないことを確認した。



・ *Methylobacterium* sp. の加熱上清・沈殿の調整方法

*Methylobacterium* sp. の死菌懸濁液を10,000×gで10分間遠心分離して (CF15RX, Hitachi, Tokyo, Japan)、得られた上清を加熱上清とした。残った沈殿を滅菌 10% スクロースでピペッティングして洗浄し、10,000×gで10分間遠心分離し、上清を廃棄した。この洗浄工程を2回繰り返し、残った沈殿を滅菌 10% スクロースに懸濁して加熱沈殿とした。

・ *Methylobacterium* sp. の生菌または死菌懸濁液、加熱上清・沈殿の経口摂取方法

羽化後7日間10%スクロースを与えてから、3日間ST添加10%スクロースを与えた後に、生菌懸濁液または死菌懸濁液を3日間経口摂取させた蚊を生菌摂取蚊 (*Methylobacterium* sp. group) または死菌摂取蚊 (Boiled *Methylobacterium* sp. group) とした。また、10%スクロースを羽化後10日間与えてから、加熱上清または加熱沈殿を3日間与えた蚊を加熱上清摂取蚊 (Boiled supernatant group) または加熱沈殿摂取蚊 (Boiled precipitation group) とした。羽化から絶食まで10%スクロースのみを与えた蚊を無処置蚊とした (Fig. 4)。滅菌した脱脂綿に、調整した生菌懸濁液または死菌懸濁液、加熱上清、加熱沈殿を浸み込ませ、それぞれを滅菌したチューブにセットして、飼育箱に入れた。

各群、12~24時間の絶食後、第一章と同様の方法で麻酔をかけたICRマウスで吸血させた。また、吸血後2日目卵巣を Christopher's Stages に従って判別し [24]、第一章と同様の方法で成熟卵巣率を算出した。

- ・統計解析

成熟卵巣率は、3つの独立した実験による平均値 ± 標準誤差で示した。成熟卵形成率の統計解析は、GraphPad Prism ソフトウェアにより Tukey の多重比較検定による一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて行った。  $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

## 結果

- ・ ST/2wks の吸血後の中腸および飼育水からの *Methylobacterium* sp. 分離

第一章でのクローンライブラリー法による中腸内細菌の組成解析の結果、卵成熟が抑制された ST/2wks および KM/2wks group の蚊の中腸内では *Methylobacterium* sp. が優勢であることが明らかとなった (Table 1)。そこで本章では、本菌の卵成熟への影響を検討した。

はじめに、ST/2wks の中腸および飼育水から *Methylobacterium* sp. の分離を試みた。その結果、ST/2wks の吸血前の中腸をホモジナイズした懸濁液を塗布した R2A 培地上には、ピンク色のコロニーが形成されなかった。一方、ST/2wks の吸血直後の中腸をホモジナイズした懸濁液を塗布した R2A 培地上には、ピンク色のコロニーが 3 株形成されていた。加えて、飼育水を塗布した R2A 培地上にも、ピンク色のコロニーが 1 株形成されていた。

次に、合計 4 株のピンク色のコロニーについて、菌種を同定するために、細菌の 16S rDNA 領域の配列を解析した。ST/2wks の吸血後の中腸から分離された 3 株のコロニーは全て、16S rDNA 領域の全長配列が同じであり、*Methylobacterium fujisawaense* 16S rDNA, partial sequence, strain z100a (accession number: AB698695.1) と相同性が 99.9% であった。飼育水から分離された 1 株のコロニーは、16S rDNA 領域の部分配列 (466 bp) が、*Methylobacterium* sp. strain 2A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (accession number: MG818293.1) と相同性が 100% であった。さらに、ST/2wks の吸血直後の中腸由来および飼育水由来の *Methylobacterium* sp. の 16S rDNA 領域の配列を比較した結果、相同性が 98.5% だった。よって、ST/2wks の吸血直後の中腸と飼育水からは、それぞれ別種の *Methylobacterium* sp. が

分離されたと考えられた。本論文では、ST/2wksの中腸由来の *Methylobacterium* sp. のうち1株を Mg 株、飼育水由来の *Methylobacterium* sp. を Wt 株と名付け、記載した。

・リアルタイム PCR による ST/2wks 蚊の中腸内の細菌量および *Methylobacterium* sp. の定量結果

ST/2wks 蚊および無処置蚊の吸血後2日目の中腸内における細菌量を比較するために、16S rDNA 量をリアルタイム PCR により定量した。その結果、ST/2wks 蚊の中腸内における 16S rDNA 量は無処置蚊の約 1/50 に減少していた ( $p=0.0879$  ; Fig. 5a)。吸血後2日目の中腸内における *Methylobacterium* sp. 量も同様にリアルタイム PCR により定量した結果、ST/2wks 蚊で無処置蚊の約2.8倍に増加していた ( $p=0.026$  ; Fig. 5b)。

・ *Methylobacterium* sp. (Mg 株および Wt 株) の生菌懸濁液を経口摂取した蚊の成熟卵巣率の算出結果

分離した *Methylobacterium* sp. の Mg 株と Wt 株について、それぞれの生菌懸濁液を経口摂取させた蚊の吸血後2日目の卵巣を観察した。その結果、*Methylobacterium* sp. の両株ともに生菌摂取蚊は、無処置蚊と比較して成熟卵巣率が低下していた。そして、*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌摂取蚊は、*Methylobacterium* sp. (Wt 株) の生菌摂取蚊よりも卵成熟が低下していた (Fig. 6)。

・ *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の死菌懸濁液を経口摂取した蚊の成熟卵巣率の算出結果

ハマダラカの中腸内細菌である *Methylobacterium* sp. (Mg 株) は、死菌

も卵成熟を抑制するのかを検討した。*Methylobacterium* sp. (Mg株) の死菌懸濁液を3日間経口摂取させた死菌摂取蚊の、吸血後2日目の卵巣を観察して成熟卵巣率を比較した。その結果、無処置蚊、*Methylobacterium* sp. (Mg株) の生菌摂取蚊および死菌摂取蚊の間で成熟卵巣率は有意差があった(ANOVA:  $p=0.0004$ )。死菌摂取蚊の成熟卵巣率は無処置蚊よりも有意に低下していたが、生菌摂取蚊の成熟卵巣率との間に有意差はなかった (Fig. 7a)。

さらに、加熱上清摂取蚊および加熱沈殿摂取蚊の成熟卵巣率も算出した。その結果、各群間で成熟卵巣率が有意に異なっていた (ANOVA:  $p=0.0092$ )。そして、加熱上清摂取蚊および加熱沈殿摂取蚊の成熟卵巣率は無処置蚊よりも有意に低下しており、加熱上清摂取蚊の成熟卵巣率のほうがより低下していた (Fig. 7b)。

## 考 察

第一章においてハマダラカ *An. stephensi* の卵成熟を抑制す可能性が考えられた *Methylobacterium* sp. について、本章で飼育水および ST/2wks の吸血後の中腸からそれぞれ分離することができた。これまでに、*Methylobacterium* sp. は *An. culicifacies* の中腸内および唾液腺に存在すること [99]、*An. gambiae* と *An. coluzzii* の中腸、唾液腺および卵巣中に存在することが報告されている [107]。よって、既報と併せて本章による研究結果から、*Methylobacterium* sp. がハマダラカの体内に常在している菌であることが改めて確認できた。

第一章におけるクローンライブラリー法による解析により、ST/2wks の中腸内での *Methylobacterium* sp. の量または割合の増加が卵成熟を抑制することが示唆されていた。本章では、ST/2wks の中腸から分離した *Methylobacterium* sp. の 16S rDNA 領域の配列に基づいて作製したプライマーを用いて、リアルタイム PCR により *Methylobacterium* sp. 量を定量した。その結果、ST/2wks の吸血後 2 日目の中腸内において、細菌量の指標となる 16S rDNA 量は無処置蚊と比較して減少していたが、*Methylobacterium* sp. の量は無処置蚊よりも有意に増加していた。よって、中腸内での *Methylobacterium* sp. 量の増加が卵成熟を抑制することが示唆された。さらに、ST に感受性であると報告されている *Methylobacterium* sp. が [13, 117]、ST/2wks の中腸内で耐性を獲得した可能性が考えられた。

飼育水および ST/2wks の吸血後の中腸から分離した *Methylobacterium* sp. の Wt 株および Mg 株の懸濁液を、それぞれ蚊に経口摂取させた。その結果、飼育水由来の Wt 株よりも中腸由来の Mg 株がより卵成熟を抑制することが確認できた。Wt 株と Mg 株のそれぞれの 16S rDNA 配

列を比較解析した結果、相同性が 98.5 % であったため、2 株は別種と考えられた。よって、種の相異が卵成熟抑制の度合いの差につながったと考えられた。

*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の死菌懸濁液および加熱上清を摂取させた蚊で卵成熟が抑制された。このことから、*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の死菌によって分泌される耐熱性の物質が卵成熟を抑制する可能性が考えられた。よって今後は、*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の加熱上清を抽出し、卵成熟抑制の原因となる化合物を同定したいと考えている。*Methylobacterium* sp. はストレス環境下において Biofilm を形成することが報告されている [125, 126]。よって、ST および KM が与えられたハマダラカの中腸内では、*Methylobacterium* sp. がストレスを受けて Biofilm を形成したと考えられた。今後、抽出物および化合物を絞り込む際には、Biofilm 中に含まれる物質も候補とすることを考えている。

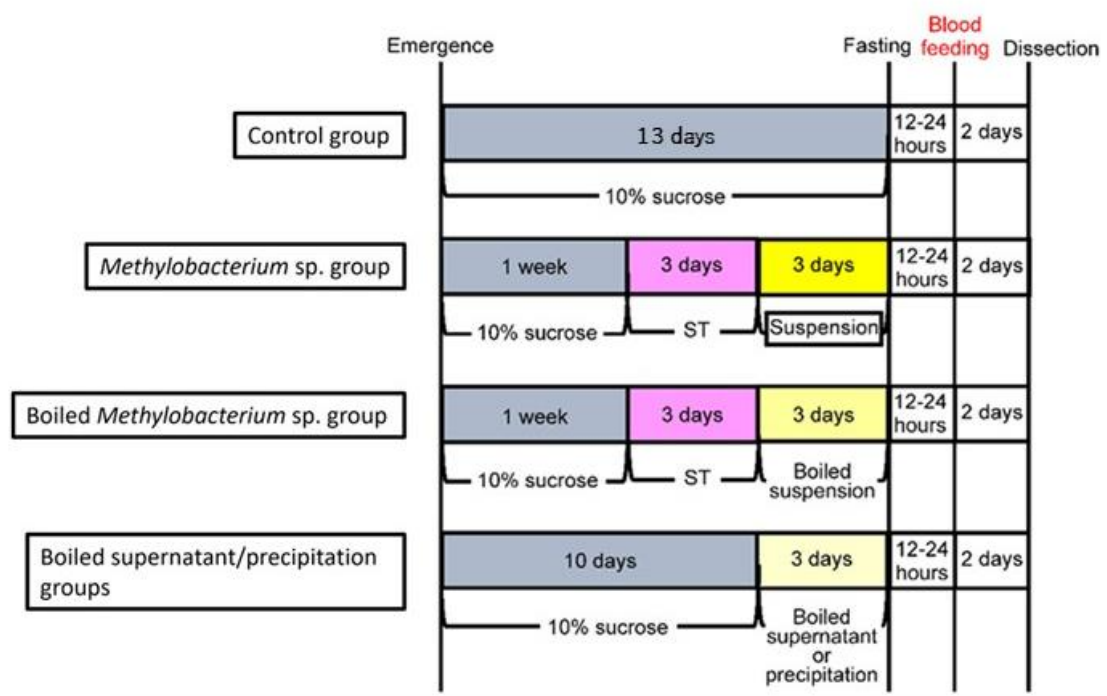
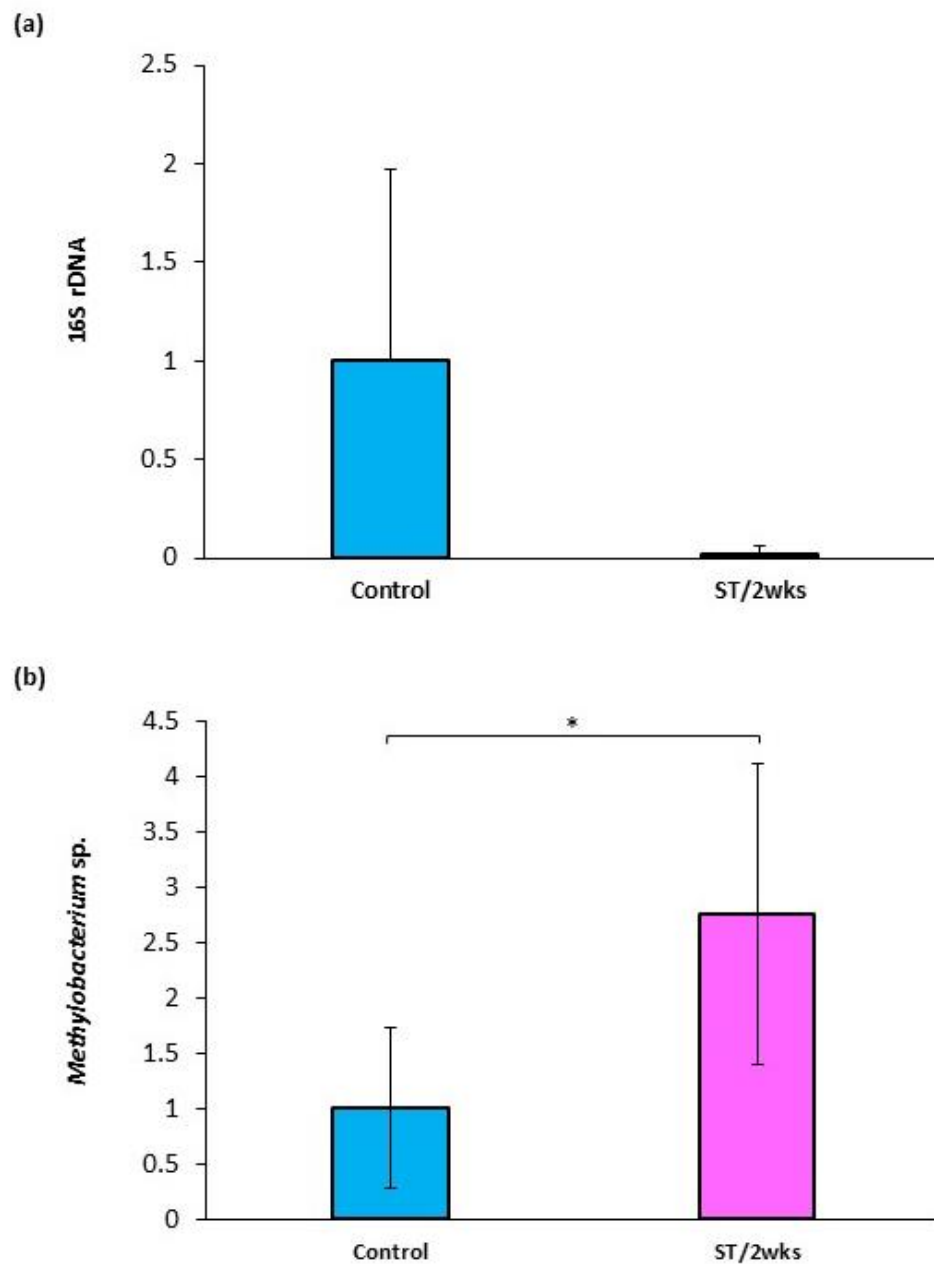


Figure 4. Schedule of breeding mosquitoes fed with *Methylobacterium* sp.



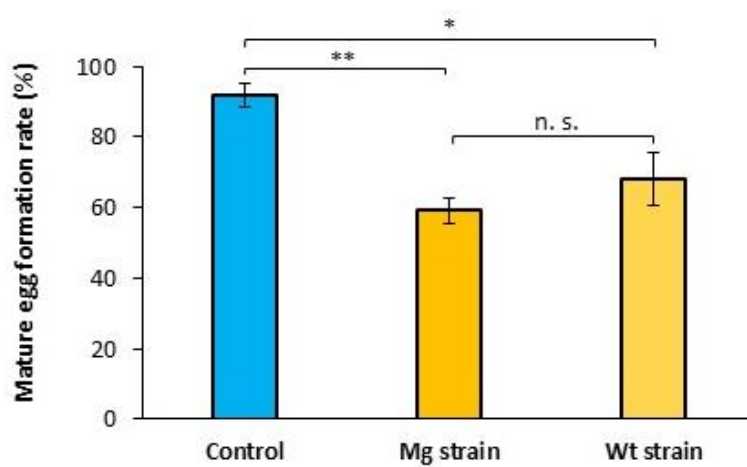


**Figure 5. Quantification of the bacterial load and *Methylobacterium* sp. in midguts of control and ST/2wks groups at 2 days after blood feeding using real-time PCR.**

(a) Quantification of the bacterial 16S rDNA.

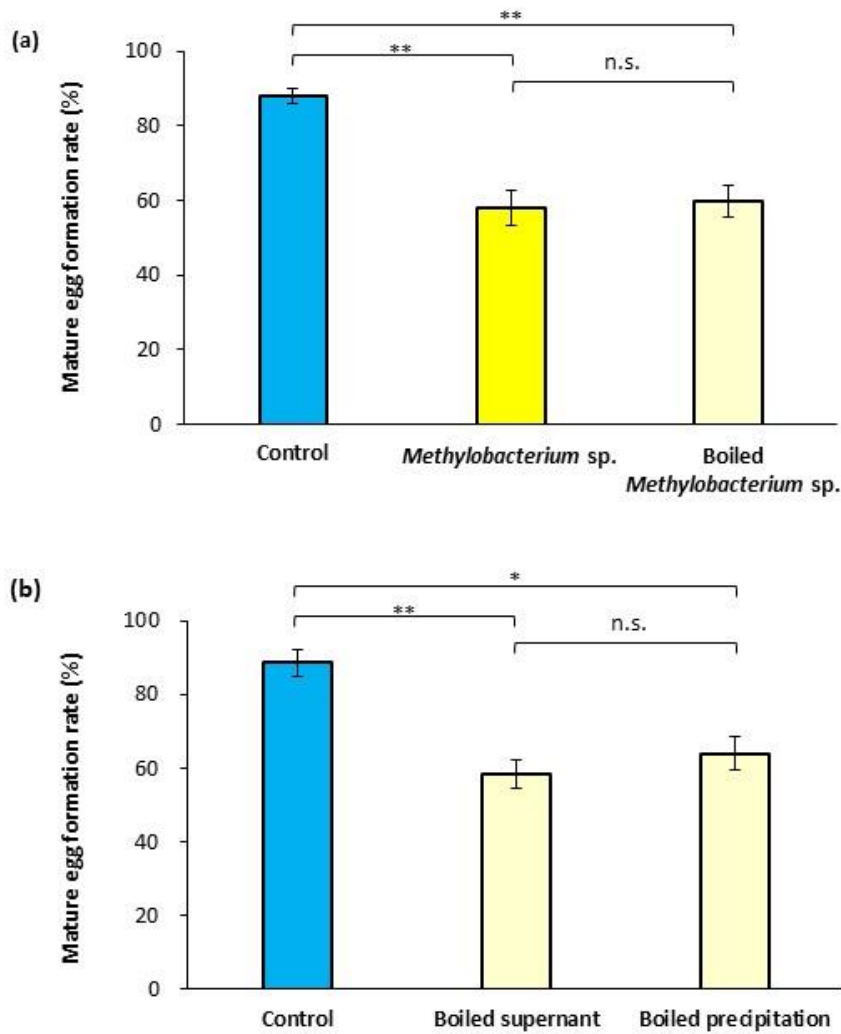
(b) Quantification of *Methylobacterium* sp.

\*  $0.01 < p < 0.05$



**Figure 6. Evaluation of egg maturation rate in mosquitoes fed with suspension of *Methylobacterium* sp.**

\*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 7. Evaluation of egg maturation rate in mosquitoes fed with boiled**

***Methylobacterium* sp.**

(a) Mature egg formation rate of mosquitoes fed with suspension of *Methylobacterium* sp. or boiled *Methylobacterium* sp. suspension.

(b) Mature egg formation rate of mosquitoes fed with supernatant and precipitate of boiled *Methylobacterium* sp. suspension.

\* $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

### 第三章 *Methylobacterium* sp.による卵成熟抑制の機序解明に向けた検討

蚊は多くの種が、卵成熟のために吸血を必要とする [37]。吸血により、*Aedes* 属蚊、*Culex* 属蚊、*Anopheles* 属蚊（ハマダラカ）の数種類は各種病原体を媒介する。*Aedes* 属蚊の *Ae. aegypti* および *Ae. albopictus* は、黄熱病、デング熱、チクングニア熱、フィラリア症の病原体を媒介する [51, 60, 76, 109, 111]。*Culex* 属蚊は鳥類および哺乳類の動物を吸血することで [73, 78, 89]、ウエストナイル熱、日本脳炎、東部ウマ脳炎、西部ウマ脳炎、リフトバレー熱、ヒトのリンパ系フィラリア症などの病原体を媒介する [2, 8, 16, 25, 36, 77]。ハマダラカは約 40 種が、ヒトのマラリアの病原体 *Plasmodium* 属原虫を媒介する [61]。

マラリアは、年間約 60 万人が死亡する疾病である [124]。マラリア制御に向けて、ベクターであるハマダラカの発生をコントロールすることが最も効果的であると報告されている [15]。そのためこれまで、殺虫剤が広く使用されてきた [120]。マラリア流行地における殺虫剤含有蚊帳の使用や、屋内での殺虫剤の噴霧により、マラリアの患者数、死者数は大幅に減少した [15]。しかし昨今、殺虫剤抵抗性蚊の出現が問題になっており [30, 118]、殺虫剤に替わる新たなベクターコントロール法の開発が望まれている。

蚊の中腸内には細菌が多数存在している。蚊の中腸内細菌は、栄養供給、消化、生殖機能、発生、免疫応答機能、病原体に対する感受性など、多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている [33]。ハマダラカの中腸内細菌については、主に *Plasmodium* 属原虫の媒介時に与える影響が多数報告されている [7, 26, 31, 32, 45]。

*An. stephensi* においては、中腸内の *Serratia marcescens* が放出する抗原虫

因子の作用により、ネズミマラリア原虫 *P. berghei* のオーカイネートの中腸内への侵入が妨げられる [7]。さらにハマダラカの中腸内細菌は、幼虫発育や生殖にも影響を与える [35, 66, 75, 97]。本研究では、第一章および第二章の検討によって、ハマダラカ *An. stephensi* の中腸内細菌である *Methylobacterium* sp. が吸血後の卵巣内における卵成熟を抑制することを明らかにした。*Methylobacterium* sp. は環境中に広く常在する細菌であり [94, 112]、第二章の検討により *Methylobacterium* sp. 由来の耐熱性の物質が卵成熟抑制の原因物質であると示唆されたことから、本菌を応用した新たなベクターコントロール法開発の可能性が見出された。

ハマダラカの卵成熟は吸血により開始する。卵黄タンパク質前駆体・Vgが脂肪体から卵巣に入り、卵内に卵黄タンパク質が充満することによって、吸血後2日目に卵成熟が完了する [82]。Vgの合成には、中腸内での血液消化と、種々のホルモン分泌が必要となる。ハマダラカにおいては血液消化の過程で、トリプシン、アミノペプチダーゼなどの酵素によって血中タンパク質がアミノ酸に分解される [17]。*An. stephensi* においては血液消化と並行して、吸血後数時間で ILP3 と ILP4 が脳から分泌される [56, 98]。さらに、ILP3 および ILP4 と同時期に、OEH も脳から放出される [21]。脳から分泌される ILP3、ILP4 および OEH の作用により、ステロイドホルモンであるエクジソンが卵巣上皮から分泌され、脂肪体に作用する [6]。血液消化によって得られたアミノ酸とエクジソンが脂肪体に供給されると、Vg合成が開始する。これらを踏まえて本章では、*Methylobacterium* sp. による卵成熟抑制の機序解明に向けて、本菌の血液消化、ILP3、ILP4 および Vg への影響を検討した。

## 材料と方法

### ・蚊の系統と飼育方法

MR4 から譲り受けた *Anopheles stephensi* STE2 strain を用いた。幼虫および成虫は、第一章に記載した条件下で飼育した。*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌摂取蚊は第二章に記載した方法で飼育した。

### ・蚊体内における *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の定量

*Methylobacterium* sp. (Mg 株) により卵成熟が抑制された蚊体内において、菌が多く存在する部位について検討した。方法として、マルピーギ管、中腸、卵巣における *Methylobacterium* sp. 量 (Mg 株) を、リアルタイム PCR により定量した。

無処置蚊および *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌摂取蚊について、吸血後 2 日目に蚊 1 匹ずつを滅菌 PBS 中で解剖して、卵巣形態を観察した。その際、無処置蚊のうち卵巣内に成熟卵のみが形成されていた蚊 5 匹、*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌摂取蚊のうち卵巣内に成熟卵のみが形成されていた蚊 (mature egg group) 5 匹、生菌摂取蚊のうち卵巣内に未成熟卵が混在していた蚊 (immature egg group) 5 匹について、中腸、卵巣、マルピーギ管をそれぞれ採取した。採取した臓器は 1 個体分ずつ、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム、100 mM NaCl および 10 mM EDTA を含む DNA 抽出バッファー 500  $\mu$ l 中でホモジナイズした。そこにプロテイナーゼ K を加え、55°C で 16 時間インキュベートした。Phenol : chloroform : isoamyl alcohol を使用してタンパク質を除去後、エタノール沈殿を行って DNA を抽出した。

抽出した DNA を用いて、リアルタイム PCR により *Methylobacterium* sp.

の定量を行った。KOD SYBR® qPCR Mix を使用して、DNA 1 µl、10 µM 遺伝子特異的プライマー (Forward and Reverse) を各 0.2 µl、超純水 3.4 µl、ROX 0.2 µl、SYBR-green 5 µl を含む全 10 µl の反応液を調整した。StepOnePlus™ Real-Time PCR System を使用して、98°C で 2 分間の反応後、98°C 10 秒、60°C 10 秒、および 68°C 30 秒の反応を 40 サイクル行った。AsRpS7 を内在性コンロールとして、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法により定量した [96]。

AsRpS7 Forward/Reverse primers (F: 5'-CCTGGATAAGAACCAGCAGA-3' および R: 5'-GGCCAGTCAGCTTCTTGTA-3') は、登録済みの配列 (GeneBank accession number : AF539918) に基づいて設計した。また、*Methylobacterium* sp. (Mg 株) の 16S rDNA 配列に基づいて設計されたプライマー、(F: 5'-TAATACGAAGGGGGCTAGCGTT-3' および R: 5'-GTCCCAGTATCGAAGGCCATT-3') を使用して、*Methylobacterium* sp. を定量した。

- ・吸血後の中腸内におけるタンパク質量の定量

無処置蚊および生菌摂取蚊を吸血後 24 時間、36 時間目に解剖し、中腸を採取した。100 µl の滅菌蒸留水中で中腸をホモジナイズした。ウシ血清アルブミンを標準溶液として使用して、Coomassie blue (BioRad, CA, USA) を用いた Bradford 法により、タンパク質量を定量した [69]。各群の中腸をそれぞれの時間につき 10 個ずつ使用した。

- ・リアルタイム PCR による ILP3 および ILP4、Vg の mRNA 発現量解析

TRIzol (Ambion, TX, USA) を使用して、Control group および生菌摂取蚊の吸血直前、吸血後 6 時間、24 時間、48 時間の蚊から RNA を抽出した。各群、各時間において 10 匹ずつの蚊から RNA を抽出した。RNA の濃度と純度は、NanoDrop を使用して測定した。cDNA 合成には、

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo)を用いた。

KOD SYBR® qPCR Mix を使用して、cDNA 1 µl、10 µM 遺伝子特異的プライマー (Forward and Reverse) を各 0.2 µl、超純水 3.4 µl、ROX 0.2 µl、SYBR-green 5 µl を含む全 10 µl の反応液を調整した。StepOnePlus™ Real-Time PCR System を使用して、98°C で 2 分間の反応後、98°C 10 秒、65°C 10 秒、および 68°C 30 秒の反応を 40 サイクル行った。

AsRpS7 Forward/Reverse primers (F: 5'-CCTGGATAAGAACCAGCAGA-3' および R: 5'-GGCCAGTCAGCTTCTTGTA-3') を用いた。ILP3 mRNA 発現量の比較解析には既報を参考に、primer (F: 5'-GCGCGTCGATCTACAGTTTGA-3' および R: 5'-GGTCGTGTCCGTCTTCATGA-3') を、ILP4 mRNA 発現量の比較解析には primer (F: 5'-GAGTTGACATCACAGTGGTTTAGGA-3' および R: 5'-TCGCATCCGTG CCTAATG-3') を使用した [56]。Vg mRNA 発現量の比較解析には、AsVg1 primer (F: 5'-CAACATCATGTCCAAGTCGGAGGTGA-3' および R: 5'-CTT GAAGCTTTCGTGCTCTTCCTCCG-3') を使用した [22]。

#### ・統計解析

*Methylobacterium* sp. の定量解析、中腸内のタンパク質量の比較解析、ILP3、ILP4 および Vg の mRNA 発現量の比較解析には、GraphPad Prism software による Mann-Whitney U 検定を用いた。p<0.05 を統計的に有意とした。



## 結果

- ・ マルピーギ管、中腸および卵巣における *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の定量結果

マルピーギ管における *Methylobacterium* sp. の量は (Fig. 8a)、mature egg group で無処置蚊よりも増加傾向にあったが ( $p = 0.09$ )、immature egg group では無処置蚊との間に有意差はなかった ( $p = 0.57$ )。また、mature egg group と immature egg group の間で有意差はなかった ( $p > 0.99$ )。中腸における *Methylobacterium* sp. の量については (Fig. 8b)、mature egg group で無処置蚊よりも増加傾向にあった ( $p = 0.19$ )。Immature egg group は無処置蚊と比較して有意に増加しており ( $p = 0.01$ )、mature egg group との間には有意差がなかった ( $p = 0.27$ )。卵巣における *Methylobacterium* sp. の量は (Fig. 8c)、mature egg group と無処置蚊の間で差はなかった ( $p > 0.99$ )。Immature egg group では、無処置蚊との間で減少傾向が見られ ( $p = 0.13$ )、mature egg group との間にも減少傾向が見られた ( $p = 0.18$ )。

- ・ *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌懸濁液を摂取した蚊の中腸内タンパク質量の定量結果

*Methylobacterium* sp. が中腸内での血液消化に影響を与えるかを検討するために、生菌摂取蚊と無処置蚊の中腸内タンパク質量を比較した (Fig. 9)。その結果、吸血後 24 時間の中腸内のタンパク質量は、無処置蚊で  $151.7 \pm 44.0 \mu\text{g}$ 、生菌摂取蚊で  $185.9 \pm 47.4 \mu\text{g}$  であり、生菌摂取蚊で増加傾向にあった ( $p = 0.11$ )。一方、吸血後 36 時間の中腸内タンパク質量は、無処置蚊で  $25.2 \pm 9.5 \mu\text{g}$ 、生菌摂取蚊で  $22.2 \pm 6.6 \mu\text{g}$  であり、両群間で差はなかった ( $p = 0.75$ )。

- ・ *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌懸濁液を摂取した蚊の ILP3 および ILP4 mRNA 発現量の解析結果

*Methylobacterium* sp. が、吸血後数時間で脳から分泌されて卵成熟に関与する ILP3 および ILP4 に影響を与えるかを検討した。生菌摂取蚊および無処置蚊それぞれの、吸血前、吸血後 6 時間の頭胸部および腹部、吸血後 24 時間、吸血後 48 時間における ILP3 および ILP4 mRNA 発現量をリアルタイム PCR により比較解析した。その結果、ILP3 mRNA および ILP4 mRNA はどちらも生菌摂取蚊と無処置蚊の間で発現量に有意な差はなかった (Fig. 10a and 10b)。

- ・ *Methylobacterium* sp. (Mg 株) の生菌懸濁液を摂取した蚊の Vg mRNA 発現量の解析結果

*Methylobacterium* sp. の Vg への影響を検討した。生菌摂取蚊および無処置蚊の吸血前、吸血後 6 時間、24 時間、48 時間における Vg mRNA 発現量をリアルタイム PCR により比較解析した。その結果、Vg mRNA 発現量は生菌摂取蚊および無処置蚊ともに、吸血前と比較して吸血後 6 時間、24 時間と徐々に増加しており、吸血後 48 時間での発現量は吸血後 24 時間での発現量よりも減少していた (Fig. 11)。なお、吸血後 24 時間においては、生菌摂取蚊の Vg mRNA 発現量は無処置蚊と比較して有意に減少していた ( $p=0.035$ )。さらに、吸血後 6 時間においても、生菌摂取蚊の Vg mRNA 発現量は無処置蚊よりも減少傾向にあった ( $p=0.1$ )。

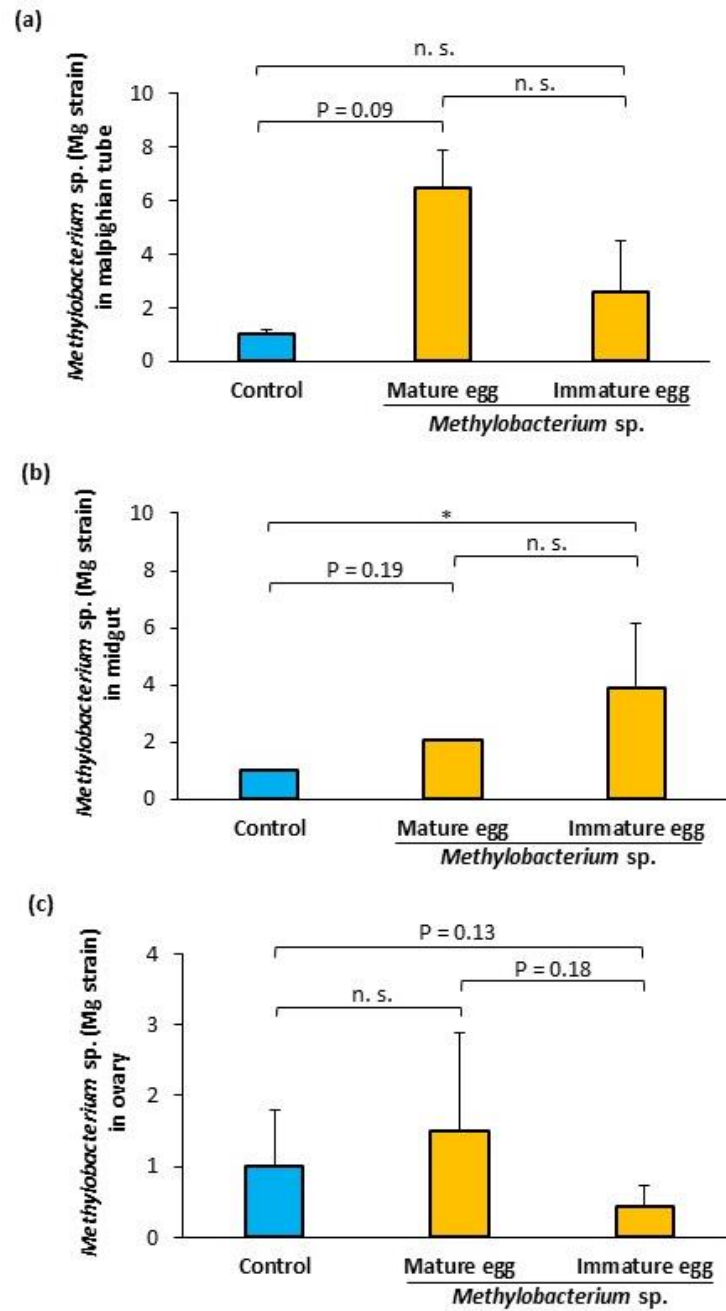
## 考 察

本章では、*Methylobacterium* sp. による卵成熟抑制の機序解明に向けた検討を行った。はじめに、蚊体内での *Methylobacterium* sp. の存在部位と卵成熟との関連性を確認した。マルピーギ管における *Methylobacterium* sp. 量は、生菌摂取蚊のうち成熟卵のみを卵巣内に形成していた蚊は無処置蚊よりも増加傾向にあった。一方、中腸における *Methylobacterium* sp. 量は、無処置蚊よりも生菌摂取蚊のうち卵巣内に成熟卵と未成熟卵が混在していた蚊で有意に増加していた。よって、*Methylobacterium* sp. の生菌懸濁液を経口摂取後、菌が排出器官であるマルピーギ管に中腸から排出された蚊は卵成熟が抑制されないと考えられた。加えて、中腸内に菌がより多く留まった蚊ほど卵成熟が抑制されることも示唆された。今後、*Methylobacterium* sp. を応用利用したベクターコントロール法の確立に向けて、本菌のより有効な蚊への摂取方法・作用方法などを検討する必要がある。その際には、*Methylobacterium* sp. が中腸内により多く存在するような条件を探索すべきだと考えている。

ハマダラカの血液消化の過程において、トリプシン、アミノペプチダーゼなどの酵素によって、血中タンパク質がアミノ酸へ分解される [17]。中腸内での *Methylobacterium* sp. の存在が、消化酵素そのものや、消化酵素の作用促進をする細菌などに影響を与えるのではないかと考えられたため中腸内のタンパク質量を比較した。しかし、生菌摂取蚊と無処置蚊の間でタンパク質量に差はみられなかった。よって、本菌は血液消化に関わる酵素の作用は変化させず、血液消化に影響を与えないと考えられた。

ハマダラカの卵成熟過程において、卵黄タンパク質の前駆体であるビテロジェニン (Vg) が脂肪体から卵巣に取り込まれることで、卵内に卵黄タンパク質であるビテリン (Vn) が充満して、卵成熟が完了する [82]。本章の検討により、無処置蚊と比較して、生菌摂取蚊の Vg mRNA 発現量が減少することが確認された。このことから、*Methylobacterium* sp. は卵巣へ取り込まれる Vg 量または卵黄タンパク質・ビテリン (Vn) の合成量を減少させ、卵成熟を抑制することが示唆された。ハマダラカにおいては、卵巣内の Vn 量の減少により産卵数が減少する [57]。よって今後、*Methylobacterium* sp. による卵成熟抑制の機序の詳細をさらに検討する際には、Vg mRNA 発現量の減少による、脂肪体での Vg 合成量および卵巣での Vn 合成量への影響を検討する必要があると考えられた。また、生菌摂取蚊の ILP3 および ILP4 の mRNA 発現量減少は確認されなかったことから、生菌摂取蚊の Vg mRNA 発現量減少は、OEH またはエクジステロイドホルモンの合成量減少が原因である可能性も考えられた。よって今後、*Methylobacterium* sp. が OEH およびエクジステロイドホルモンに与える影響も検討する必要があると考えられた。

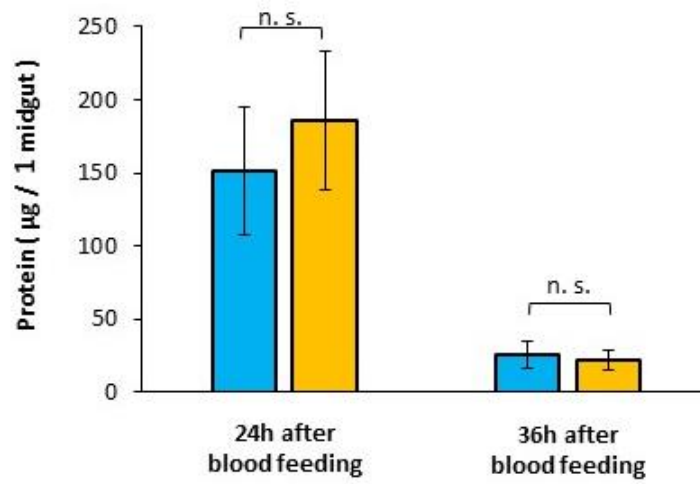
卵成熟過程における卵胞のアポトーシスによって、卵巣への Vg 取り込みが阻害される [55]。よって今後、卵巣内の Vn 量測定と並行して、生菌摂取蚊のうち卵成熟が抑制された蚊の卵巣の組織切片について TUNEL 法などを試みて、卵胞のアポトーシスの有無を検討する必要も考えられた。



**Figure 8. Quantification of *Methylobacterium* sp. using real-time PCR.**

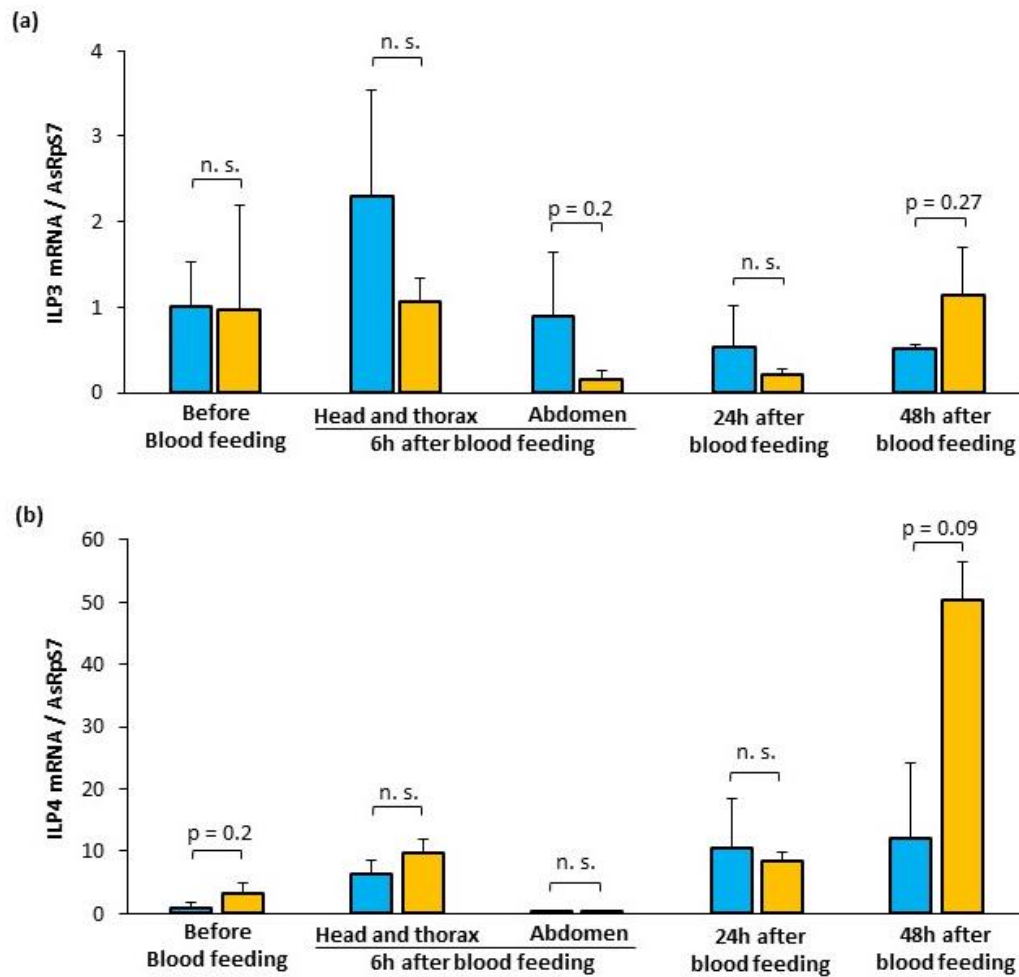
(a)Malpighian tubules, (b)midguts and (c) ovaries at 2 days after blood feeding.

\*0.01 < p < 0.05



**Figure 9. Protein content of midgut 24h and 36h after blood feeding.**

Blue : Control group, orange : *Methylobacterium* sp. group

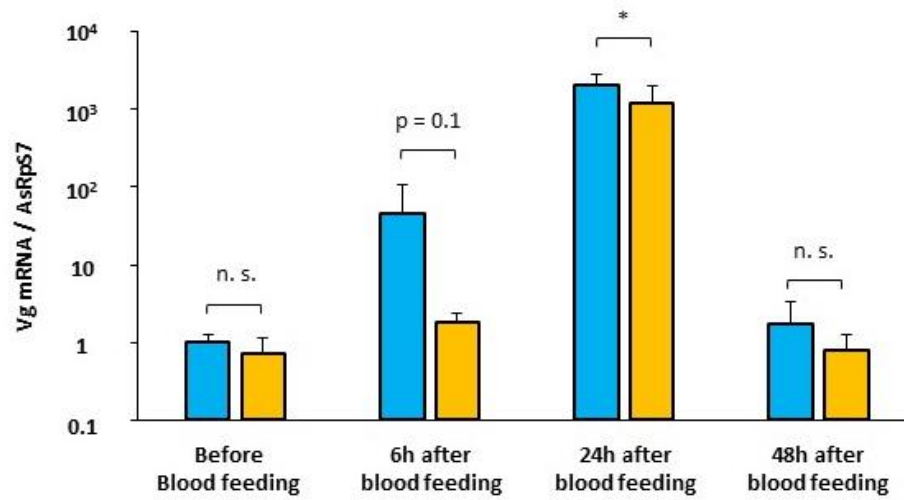


**Figure 10. Relative ILP3 and ILP4 mRNA expression level by real-time PCR.**

(a) Relative expression of ILP3 mRNA before and after blood feeding.

(b) Relative expression of ILP4 mRNA before and after blood feeding.

Blue : Control group, orange : *Methylobacterium* sp. group



**Figure 11. Relative Vg mRNA expression level by real-time PCR.**

Blue : Control group, orange : *Methylobacterium* sp. group

\*0.01 < p < 0.05



## 総括

本研究では、ハマダラカの中腸内細菌 *Methylobacterium* sp. が卵巣内の卵成熟を抑制することを初めて明らかにした。加えて、卵成熟抑制の原因物質が本菌由来の耐熱性物質であり、卵成熟過程においてVgの脂肪体における合成および卵巣への取り込みに影響を与えている可能性が考えられた。*Methylobacterium* sp. は環境中に存在する細菌であることから、本研究成果は殺虫剤と比較して環境への負荷が少ない新たなベクターコントロール法の開発の第一歩となったといえる。今後、*Methylobacterium* sp. によるハマダラカの卵成熟抑制の機序を解明し、さらに卵成熟抑制の原因物質を同定することで、中腸内細菌による卵成熟抑制現象を応用した、より効果的なベクターコントロール法開発にさらに一步近づくことができると考えられる。ひいては、殺虫剤抵抗性蚊の出現や環境中への殺虫剤残留などの問題解決や、他のベクター蚊に対するベクターコントロール法としての応用も期待できる。

## 要約

蚊は地球上に約3,500種存在する昆虫であり、そのうち約2,500種類が吸血をする。吸血後の蚊においては卵成熟に向けて、中腸内の血液消化と脳や卵巣からのホルモン分泌により、卵内に卵黄が蓄えられる。卵成熟が完了すると、産卵、卵孵化、幼虫発育、成虫の羽化を経ることで、新たな蚊が発生する。

吸血性の蚊である *Anopheles* 属蚊（ハマダラカ）は、約40種がヒトのマラリアの病原体 *Plasmodium* 属原虫を媒介する。マラリアは有効なワクチンが未だに開発されておらず、年間2億4,700万人が感染し約40万人が死亡する疾病である。マラリア制御に向けて、WHOはベクターとなるハマダラカそのものの発生コントロールを推奨しており、これまでに殺虫剤が広く使用されてきた。しかしながら、殺虫剤抵抗性蚊の出現や環境中への殺虫剤残留が問題となり、殺虫剤に替わる新たなベクターコントロール法の開発が求められている。

ハマダラカにおいて産卵数、卵孵化率、幼虫発育、原虫の媒介能に影響を与える中腸内細菌が報告されている。そのため近年、中腸内細菌を利用したベクターコントロール法の開発が期待されている。本研究は、ハマダラカの中腸内細菌が卵成熟にも影響を与えると仮説を立てて実施した。第一章では、ハマダラカの中腸内細菌が卵成熟に与える影響を解析した。第二章では、卵成熟を抑制する中腸内細菌を分離して、卵成熟抑制の原因物質の特定を試みた。第三章では、中腸内細菌による卵成熟抑制の機序解明も試みた。

ハマダラカに抗生物質添加スクロースを摂取させると、中腸内細菌の数や組成が変化することが報告されている。これを踏まえて第一章でははじめに、羽化後のハマダラカに抗生物質ストレプトマイシン (ST)、カナマイシン (KM) またはペニシリン (PC) を添加したスクロースを 2 週間摂取させ、それぞれを ST/2wks 群、KM/2wks 群または PC/2wks 群とした。各群の蚊を吸血後 2 日目に解剖した結果、ST/2wks 群および KM/2wks 群の蚊は、多くが卵巣内に成熟卵と未成熟卵が混在しており卵成熟が抑制されていた。加えて、ST または KM を 1 週間摂取させた蚊についても吸血後 2 日目の卵巣を観察したが、卵成熟抑制は確認されなかった。

卵巣の形態観察結果を踏まえて、各群の吸血後の中腸内細菌の組成をクローンライブラリー法により解析した。その結果、無処置蚊および卵成熟が抑制されなかった PC/2wks 群の中腸内では、*Asaia* sp. が優勢であった。一方、卵成熟が抑制された ST/2wks 群および KM/2wks 群の中腸内では *Methylobacterium* sp. が優勢だった。よって第一章の検討により、*Methylobacterium* sp. は卵巣内の卵成熟に影響を与える可能性が考えられた。

第二章では最初に、*Methylobacterium* sp. の分離を試みた。当研究室で使用している蚊の飼育水および ST/2wks 群の吸血後の中腸をそれぞれ R2A 培地に塗布し培養した。培養後、R2A 培地上にて *Methylobacterium* sp. 特有のピンク色のコロニーが、飼育水からは 1 株、ST/2wks 群の中腸からは 3 株分離できた。分離した計 4 株について 16S rDNA 配列を解析した結果、飼育水由来の菌と中腸由来の菌は配列が異なっており（相同性 98.5%）、中腸由来の 3 株は全て同じ配列だった。飼育

水および中腸由来の *Methylobacterium* sp. それぞれの懸濁液（生菌懸濁液）を蚊に経口摂取させて、吸血後 2 日目の卵巣を観察した結果、中腸由来の生菌摂取蚊でより卵成熟が抑制されていた。続いて、中腸由来の生菌懸濁液を加熱した死菌懸濁液を経口摂取させた蚊についても吸血後 2 日目に卵巣を観察した結果、生菌摂取蚊と同様に卵成熟が抑制されていた。さらに、死菌懸濁液の上清を経口摂取させた蚊についても同様の検討を行った結果、卵成熟抑制が確認された。よって第二章の検討により、ハマダラカの中腸内細菌 *Methylobacterium* sp. 由来の耐熱性物質が卵成熟を抑制する可能性が示唆された。

第三章ではまず、ハマダラカ体内における *Methylobacterium* sp. の存在部位と卵成熟抑制の関連性を検討した。無処置蚊および生菌摂取蚊を吸血後 2 日目に解剖して卵巣内の卵の形態を観察後、中腸、マルピーギ管および卵巣から DNA を抽出して、リアルタイム PCR により *Methylobacterium* sp. 量を比較解析した。その結果、生菌摂取蚊のうち卵巣内に未成熟卵と成熟卵が混在していた蚊は無処置蚊と比較して、中腸内の *Methylobacterium* sp. 量が増加していた。一方、マルピーギ管および卵巣での *Methylobacterium* sp. の量は、無処置蚊と差がなかった。よって、*Methylobacterium* sp. が中腸に多く存在することが卵成熟を抑制すると考えられた。次に、中腸内の *Methylobacterium* sp. による血液消化への影響を検討した。生菌摂取蚊と無処置蚊における吸血後の中腸内タンパク質量を比較した結果、両群間で差はみられなかった。よって、本菌は血液消化には影響を与えないと考えられた。次に、吸血後に分泌されるインスリン様ペプチド (ILP) と、卵黄前駆タンパク質 (Vg) への影響を検討した。リアルタイム PCR により無処置蚊および

生菌摂取蚊の ILP と Vg の mRNA 発現量を定量した結果、ILP mRNA 発現量に差はみられなかった。Vg mRNA については、*Methylobacterium* sp. が吸血後 24 時間における発現量を減少させた。よって第三章の検討によって、*Methylobacterium* sp. は Vg 合成に影響を与える可能性が考えられた。

本研究では、ハマダラカの中腸内細菌 *Methylobacterium* sp. が卵巣内の卵成熟を抑制することを初めて明らかにした。加えて、卵成熟抑制の原因物質が本菌由来の耐熱性物質であり、Vg の合成に影響を与えて卵成熟を抑制する可能性が考えられた。今後は、*Methylobacterium* sp. によるハマダラカの卵成熟抑制の機序を解明し、さらに卵成熟抑制の原因物質を同定する必要がある。*Methylobacterium* sp. によるハマダラカの卵成熟抑制現象を応用することにより、将来的に殺虫剤抵抗性蚊や環境中への殺虫剤残留などの問題を解決しうる、新たなマラリアベクターコントロール法開発ができることを確信する。

## 参考文献

1. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* **12**: 220-224.
2. Amraoui F, Krida G, Bouattour A, Rhim A, Daaboub J, Harrat Z, Boubidi SC, Tijane M, Sarih M, Failloux AB. 2012. *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley fever viruses in the Maghreb region. *PLoS One* **7**: e36757.
3. Ant TH, Herd CS, Geoghegan V, Hoffmann AA, Sinkins SP. 2018. The *Wolbachia* strain wAu provides highly efficient virus transmission blocking in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* **14**: e1006815.
4. Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 661-675.
5. Bacot AW. 1911. XX. On the persistence of bacilli in the gut of an insect during metamorphosis. *Trans R Entomol Soc Lond* **59**: 497-500.
6. Bai H, Gelman DB, Palli SR. 2010. Mode of action of Methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito. *Anopheles Gambiae. Pest Manag Sci* **66**: 936-943.

7. Bando H, Okado K, Guelbeogo WM, Badolo A, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Xuan X, Sagnon N, Kanuka H. 2013. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity. *Sci Rep* **3**: 1641.
8. Barba M, Fairbanks EL, Daly J. 2019. Equine viral encephalitis: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med (Auckl)* **10**: 99-110.
9. Bascuñán P, Niño-García JP, Galeano-Castañeda Y, Serre D, Correa MM. 2018. Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. *Microbiome* **6**: 1-12.
10. Bashir K, Tunoo N, Ahmed TU, Howlader AJ. 2012. Blood-feeding patterns of *Anopheles* mosquitoes in a malaria-endemic area of Bangladesh. *Parasites Vectors* **5**: 1-10.
11. Basu S, Sahi PK. 2017. Malaria: an update. *Indian J Pediatr* **84**: 521-528.
12. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. 2005. Spreading the seeds of million-murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends Parasitol* **21**: 573-580.
13. Bauer AW. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* **45**: 149-158.
14. Bennink S, Kiesow MJ, Pradel G. 2016. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. *Cell Microbiol* **18**: 905-918.

15. Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle K, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, Lindgren F, Cohen JM, Murray CLJ, Smith DL, Hay SI, Cibulskis RE, Gething PW. 2015. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**: 207-211.
  
16. Bhattacharya S, Basu P, Sajal Bhattacharya C. 2016. The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. *J Entomol Zool Stud* **4**: 73-81.
  
17. Billingsley PF, Hecker H. 1991. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. *J Med Entomol* **28**: 865-871.
  
18. Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen, R, Morlais I. 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog* **8**: e1002742.
  
19. Bond JG, Arredondo-Jiménez JJ, Rodríguez MH, Quiroz-Martínez H, Williams T. 2005. Oviposition habitat selection for a predator refuge and food source in a mosquito. *Ecol Entomol* **30**: 255-263.
  
20. Breznak JA. 2000. Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood and litter-feeding termites. In: Abe T, Bignell DE, Higashi M, (ed) *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. *Kluwer Academic Publishers Dordrecht* 209-232.



21. Brown MR, Cao C. 2001. Distribution of ovary ecdysteroidogenic hormone I in the nervous system and gut of mosquitoes. *J Insect Sci* **1**: 3.
22. Chen XG, Marinotti O, Whitman L, Jasinskiene N, James AA. 2007. The *Anopheles gambiae* vitellogenin gene (VGT2) promoter directs persistent accumulation of a reporter gene product in transgenic *Anopheles stephensi* following multiple bloodmeals. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 1118-1124.
23. Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, Ulissi U, Crotti E, Daffanchio D, Bandi C, Favia G. 2012. Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of Asaia bacterial symbionts. *BMC Microbiol* **12**: 1-8.
24. Christophers SR. 1911. The development of the egg follicle in anophelines. *Paludisme* **2**: 73-88.
25. Ciota AT. 2017. West Nile virus and its vectors. *Curr Opin Insect Sci* **22**: 28-36.
26. Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. 2010. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol* **34**: 387-395.
27. Clements AN. 1992. The biology of mosquitoes. Development, nutrition, and reproduction, Vol. 1, Chapman and Hall, London.

28. Clifton ME, Noriega FG. 2011. Nutrient limitation results in juvenile hormone-mediated resorption of previtellogenic ovarian follicles in mosquitoes. *J Insect Physiol* **57**: 1274-1281.
29. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. 2010. Malaria in children. *Lancet* **375**: 1468-1481.
30. Deletre E, Martin T, Duménil C, Chandre F. 2019. Insecticide resistance modifies mosquito response to DEET and natural repellents. *Parasites Vectors* **12**: 1-10.
31. Dennison NJ, Saraiva RG, Cirimotich CM, Mlambo G, Mongodin EF, Dimopoulos G. 2016. Functional genomic analyses of *Enterobacter*, *Anopheles* and *Plasmodium* reciprocal interactions that impact vector competence. *Malar J* **15**: 1-15.
32. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* **5**: e1000423.
33. Douas AE. 2011. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe* **10**: 359-367.
34. Duguma D, Hall MW, Smartt CT, Debboun M, Neufeld JD. 2019. Microbiota variations in *Culex nigripalpus* disease vector mosquito of West Nile virus and Saint Louis Encephalitis from different geographic origins. *PeerJ* **6**: e6168.

35. Ezemuoka LC, Akorli EA, Aboagye-Antwi F, Akorli J. 2020. Mosquito midgut *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* affect the fitness of adult female *Anopheles gambiae* sl. *PLoS One* **15**: e0238931.
36. Famakinde DO. 2018. Mosquitoes and the lymphatic filarial parasites: research trends and budding roadmaps to future disease eradication. *Trop Med Infect Dis* **3**: 4.
37. Foster WA. 1995. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. *Ann Rev Entomol* **40**: 443-474.
38. Frischknecht F, Matuschewski K. 2017. Plasmodium sporozoite biology. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**: a025478.
39. Furuhashi K, Kato Y, Goto K, Hara M, Yoshida SI, Fukuyama M. 2006. Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol Immunol* **50**: 11-17.
40. Gaio AdO., Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PF, Lemos FJ. 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit Vectors* **4**: 105.
41. Gerald N, Mahajan B, Kumar S. 2011. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell* **10**: 474-482.

42. Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. 2000. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today* **16**: 196-201.
43. Gillies MT, De Meillon B. 1968. The Anophelinae of Africa South of the Sahara. *Publ Sth Afr Inst Med Res* **54**: 1-343.
44. Gnambani EJ, Bilgo E, Sanou A, Dabiré RK, Diabaté A. 2020. Infection of highly insecticide-resistant malaria vector *Anopheles coluzzii* with entomopathogenic bacteria *Chromobacterium violaceum* reduces its survival, blood feeding propensity and fecundity. *Malar J* **19**: 352.
45. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE. 2003. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J Med Entomol* **40**: 371-374.
46. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. 2010. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C539-C548.
47. Grimaldi D, Engel MS. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
48. Hansen IA, Attardo GM, Park JH, Peng Q, Raikhel AS. 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10626-10631.

49. Hansen IA, Attardo GM, Rodriguez SD, Drake LL. 2014. Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Front Physiol* **5**: 103.
50. Harbach RE. 2000. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* **1668**: 591-637.
51. Harrington LC, Edman JD, Scott TW. 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol* **38**: 411-422.
52. Hecker H. 1977. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). *Cell Tissue Res* **184**: 321-341.
53. Helinski MEH, Valerio L, Facchinelli L, Scott TW, Ramsey J, Harrington LC. 2012. Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. *Am J Trop Med Hyg* **86**: 635-641.
54. Hernández-Martínez S, Cardoso-Jaime V, Nouzova M, Michalkova V, Ramirez CE, Fernandez-Lima F, Noriega FG. 2019. Juvenile hormone controls ovarian development in female *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Sci Rep* **9**: 2127.
55. Hopwood JA, Ahmed AM, Polwart A, WilliamsGT, Hurd H. 2001. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. *J Exp Biol* **204**: 2773-2780.

56. Hun LV, Luckhart S, Riehle MA. 2019. Increased Akt signaling in the fat body of *Anopheles stephensi* extends lifespan and increases lifetime fecundity through modulation of insulin-like peptides. *J Insect Physiol* **118**: 103932.
57. Jahan N, Hurd H. 1998. Effect of *Plasmodium yoelii* nigeriensis (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. *J Med Entmol* **35**: 956-961.
58. Johnston PR, Rolff J. 2015. Host and symbiont jointly control gut microbiota during complete metamorphosis. *PLoS Pathog* **11**: e1005246.
59. Josling GA, Llinás M. 2015. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol* **13**: 573-587.
60. Khongwicht S, Chansaenroj J, Chirathaworn C, Poovorawan Y. 2021. Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *J Biomed Sci* **28**: 84.
61. Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs JA. 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* **70**: 486-498.
62. Lee AH, Symington LS, Fidock DA. 2014. DNA repair mechanisms and their biological roles in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**: 469-486.

63. Lee JJ, Klowden MJ. 1999. A male accessory gland protein that modulates female mosquito (Diptera: Culicidae) host-seeking behavior. *J Am Mosq Control Assoc* **15**: 4-7.
  
64. Li H, Zhao C, Yang Y, Zhou Z, Qi J, Li C. 2021. The influence of gut microbiota on the fecundity of *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J Insect Sci* **21**: 4.
  
65. Lima LM, da Silva BNM, Barbosa G, Barreiro EJ. 2020.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **208**: 112829.
  
66. Linenberg I, Christophides GK, Gendrin M. 2016. Larval diet affects mosquito development and permissiveness to *Plasmodium* infection. *Sci Rep* **6**: 38230.
  
67. Liu N. 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol* **60**: 537-559.
  
68. Lounibos LP, Duzak D, Linley UJR, Lourenço-de-Oliveira R. 1997. Egg Structures of *Anopheles fluminensis* and *Anopheles shannoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92**: 221-232.
  
69. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

70. Mahmood F, Reisen WK. 1982. *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): changes in male mating competence and reproductive system morphology associated with aging and mating. *J Med Entomol* 19: 573-588.
71. Mahmood F, Reisen WK. 1994. *Anopheles culicifacies*: effects of age on the male reproductive system and mating ability of virgin adult mosquitoes. *Med Vet Entomol* 8: 31-37.
72. Martínez-de la Puente J, Muñoz J, Capelli G, Montarsi F, Soriguer R, Arnoldi D, Rizzoli A, Figuerola J. 2015. Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy. *Malar J* 14: 32.
73. Martínez-de la Puente J, Ruiz S, Soriguer R, Figuerola J. 2013. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector *Anopheles atroparvus*. *Malar J* 12: 1-6.
74. Minard G, Tran FH, Tran Van V, Fournier C, Potier P, Roiz D, Mavingui P, Valiente Moro C. 2018. Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape *Ae. albopictus* bacterial microbiota. *PLoS One* 13: e0194521.
75. Mitra E, Stathopoulos S, Siden-Kiamos I, Christophides GK, Louis C. 2013. *Asaia* accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathog Glob Health* 107: 305-311.



76. Muller DA, Depelsenaire AC, Young PR. 2017. Clinical laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis* **215**: S89-S95.
  
77. Mulvey P, Duong V, Boyer S, Burgess G, Williams DT, Dussart P, Horwood PF. 2021. The ecology and evolution of Japanese encephalitis virus. *Pathogens* **10**: 1534.
  
78. Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, Vázquez A, Figuerola J. 2012. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in South-West Spain. *PLoS One* **7**: e39549.
  
79. Muturi EJ, Lagos-Kutz D, Dunlap C, Ramirez JL, Rooney AP, Hartman GL, Fields C, Rendon G, Kim CH. 2018. Mosquito microbiota cluster by host sampling location. *Parasit Vectors* **11**: 1-12.
  
80. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol Read* **148**: 257-266.
  
81. Nguyen T, Cables JL. 1977. Sexual receptivity in females and insemination power in males of *Culex pipiens* autogenicus (Diptera: Culicidae): Rigorous monogamy case and possible polygamy case (in French). *C R Hebd Seances Acad Sci Ser D* **284**: 929-931.
  
82. Nirmala X, Marinotti O, Sandoval JM, Phin S, Gakhar S, Jasinskiene N, James AA. 2006. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene, AsVg1, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 694-700.

83. Noriega FG. 2014. Juvenile hormone biosynthesis in insects: What is new, what do we know, and what questions remain?. *Int Sch Res* 967361.
84. Noriega FK. 2004. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 687-693.
85. Novakova E, Woodhams DC, Rodríguez-Ruano SM, Brucker RM, Leff JW, Maharaj A, Amir A, Knight R, Scott J. 2017. Mosquito microbiome dynamics, a background for prevalence and seasonality of West Nile virus. *Front Microbiol* **8**: 526.
86. Perkins SL. 2014. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order haemosporida. *J Parasitol* **100**: 11-25.
87. Phillips A, Bassett P, Szeki S, Newman S, Pasvol G. 2009. Risk factors for severe disease in adults with falciparum malaria. *Clin Infect Dis* **48**: 871-878.
88. Pidiyar Vj, Jangid K, Patole MS, Shouche YS. 2004. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *Am J Trop Med Hyg* **70**: 597-603.
89. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. 2008. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res* **103**: 45-53.

90. Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* **4**: 849-856.
91. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. 2009. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* **9**: 96.
92. Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, Besansky NJ. 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol Biol* **9**: 298.
93. Rubert A, Guillon-Grammatico L, Chandenier J, Dimier-Poisson I, Desoubreux G. 2016. Insecticide resistance in *Anopheles* mosquitoes: additional obstacles in the battle against malaria. *Med S Trop* **26**: 423-431.
94. Sanders JW, Martin JW, Hooke M, and Hooke J. 2000. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* **30**: 936-938.
95. Sappington TW, Kokoza VA, Cho WL, Raikhel AS. 1996. Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8934-8939.

96. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108.
97. Sharma A, Dhayal D, Singh OP, Adak T, Bhatnagar RK. 2013. Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Acta Tropica* **128**: 41-47.
98. Sharma A, Nuss AB, Gulia-Nuss M. 2019. Insulin-like peptide signaling in mosquitoes: The road behind and the road ahead. *Front Endocrinol* **10**: 166.
99. Sharma P, Sharma S, Maurya RK, De TD, Thomas T, Lata S, Shingh N, Pandey KC, Valecha N, Dixit R. 2014. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. *Parasit Vectors* **7**: 1-7.
100. Shaw WR, Marcenac P, Childs LM, Buckee CO, Baldini F, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabaté A, Catteruccia F. 2016. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nat Commun* **7**: 11772.
101. Shililu J, Ghebremeskel T, Seulu F, Mengistu S, Fekadu H, Zerom M, Mehari Z, Ghebregziabihier A, Sintasath D, Bretas G, Mbogo C, Githure J, Brantly E, Novak R, Beier JC. 2003. Laral habitat diversity and ecology of anopheline larvae in Eritrea. *J Med Entomol* **40**: 921-929.

102. Sinden RE, Dawes EJ, Alavi Y, Waldock J, Finney O, Mendoza J, Butcher GA, Andrews L, Hill AV, Gilbert SC, Basáñez MG. 2007. Progression of *Plasmodium berghei* through *Anopheles stephensi* is density-dependent. *PLoS Pathog* **3**: e195.
103. Singh B, Daneshvar C. 2013. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev* **26**: 165-184.
104. Smith SM, Gadawski RM. 1994. Nectar feeding by the early-spring mosquito *Aedes provocans*. *Med Vet Entomol* **8**: 201-213.
105. Strand MR. 2018. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr Opin Insect Sci* **28**: 59-65.
106. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313**: 1287-1290.
107. Tchioffo MT, Boissiere A, Abate L, Nsango SE, Bayibeki AN, Awono-Ambene PH, Christen R, Gimonneau G, Morlais I. 2016. Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia. *Front Microbiol* **6**: 1500.
108. Telang A, Skinner J, Nemitz RZ, McClure AM. 2018. Metagenome and culture-based methods reveal candidate bacterial mutualists in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **55**: 1170-1181.

109. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. 2016. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **95**: 1169-1173.
110. Tripet F, Tour YT, Dolo G, Lanzaro GC. 2003. Frequency of multiple inseminations in field-collected *Anopheles gambiae* females revealed by DNA analysis of transferred sperm. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 1-5.
111. Tuells J, Henao-Martínez AF, Franco-Paredes C. 2022. Yellow fever: a perennial threat. *Arch Med Res* **53**: 649-57.
112. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Nemec A, Kämpfer P, Wauters G. 2011. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In: Manual of clinical microbiology, 10th ed. (Versalovic J. ed.), ASM Press, Washington.
113. Veronesi R, Gentile G, Carrieri M, Maccagnani B, Stermieri L, Bellini R. 2012. Seasonal pattern of daily activity of *Aedes caspius*, *Aedes detritus*, *Culex modestus*, and *Culex pipiens* in the Po Delta of northern Italy and significance for vector - borne disease risk assessment. *J Vector Ecol* **37**: 49-61.
114. Visôto LE, Oliveira MGA, Guedes RNC, Ribon AOB, Good-God PIV. 2009. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *J Insect Physiol* **55**: 185-191.

115. Wang S, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M. 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* **357**: 1399-1402.
116. Wang Y, Gilbreath TM, Kukutla P, Yan G, Xu J. 2011. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* **6**: e24767.
117. Waturangi DE, Francisca I, Susanto CO. 2011. Genetic diversity of methylotrophic bacteria from human mouth based on amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *Hay J of Biosci* **18**: 77-81.
118. Weathered J, Hammill E. 2019. Adaptation to agricultural pesticides may allow mosquitoes to avoid predators and colonize novel ecosystems. *Oecologia* **190**: 219-227.
119. Weetman D, Kamgang B, Badolo A, Moyes CL, Shearer FM, Coulibaly M, Pinto J, Lambrechts L, McCall PJ. 2018. *Aedes* mosquitoes and *Aedes*-borne arboviruses in Africa: current and future threats. *Int J Environ Res Public Health* **15**: 220.
120. Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, Lindsay SW. 2020. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis* **14**: 1-31.
121. World Health Organization. 2003. Guidelines for dengue surveillance and mosquito control. 2nd ed. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific. 2003.

122. World Health Organization. 2017. Global vector control response 2017-2030. WHO Press; 2017.
123. World Health Organization. World malaria report 2019, 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721> [accessed on December 26, 2023].
124. World Health Organization. World malaria report 2022, 2022. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> [accessed on December 26, 2023].
125. Xu FF, Morohoshi T, Wang WZ, Yamaguchi Y, Liang Y, Ikeda T. 2014. Evaluation of intraspecies interactions in biofilm formation by *Methylobacterium* species isolated from pink-pigmented household biofilms. *Microbes Environ* **29**: 388-392.
126. Yano T, Kubota H, Hanai J, Hitomi J, Tokuda H. 2013. Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes Environ* **28**: 87-95.
127. Yaro AS, Dao A, Adamou A, Crawford JE, Ribeiro JMC, Gwadz R, Traoré SF, Lehmann T. 2006. The distribution of hatching time in *Anopheles gambiae*. *Malar J* **5**: 19.



## 謝 辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり終始熱心な御指導をして頂き、また丁寧な御校閲を賜りました北里大学獣医学部獣医学科 獣医寄生虫学研究室 筏井宏実 准教授に深い感謝の意を表します。

本研究の遂行に際して、終始懇切なる御指導をして頂き、温かく見守ってくださいました北里大学獣医学部獣医学科 獣医寄生虫学研究室 草木迫浩大 助教に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に際して、適切な御指導を賜り、多くの御助力を賜りました北里大学獣医学部獣医学科 獣医微生物学研究室 田邊太志 教授、東北大学大学院農学研究科 西山啓太 准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行に関しまして御助言を賜りました北里大学獣医学部獣医学科 獣医生化学研究室 吉川泰永 准教授、北里大学獣医学部動物資源科学科 細胞分子機能学研究室 山本裕司 講師、北里大学獣医学部獣医学科 獣医寄生虫学研究室 工藤上 元教授に深く感謝申し上げます。

実験遂行にあたり、蚊の飼育管理への御助力およびマウスの飼育管理をしてくださいました北里大学獣医学部獣医学科 獣医寄生虫学研究室 田中舞 技術員に心より感謝致します。また、実験遂行に際し多大なる御協力を頂きました北里大学獣医学部獣医学科 獣医寄生虫学研究室 2018年度卒業生 野々垣雄介氏に深く感謝申し上げます。

本研究に関する多数のご助言および実験へのご協力をしていただき、研究室生活を共に励まし合った北里大学獣医学部獣医学科 獣

医寄生虫学研究室 大学院生 中村咲蓮さん、中山和彦さん、原口麻子さん、研究生 上原子勇一さん、ハサヌデイン大学 医学部 寄生虫学研究室 Hajar Hasan さんに厚くお礼申し上げます。そして、学生生活を支えてくれた家族に心から感謝しております。

最後に、主査をお引き受けくださった北里大学獣医学部獣医学科 人獣共通感染症学研究室 胡東良 教授、副査をお引き受けくださった動物資源科学科 細胞分子機能学研究室 向井孝夫 教授、帯広畜産大学 原虫病研究センター 福本晋也 准教授、北里大学獣医学部獣医学科 獣医生理学研究室 寺島涼太 講師に深く感謝申し上げます。