

## 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

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

獣医寄生虫学 箱崎 純

蚊の多くの種は、卵成熟に必要な養分を得るために吸血を行う。吸血後の卵成熟過程は、中腸内での血液消化と同時に、インスリン様ペプチド (ILP) やエクジステロイドなどのホルモンが分泌されることで、脂肪体での卵黄タンパク質前駆体・ビテロジェニン (Vg) 合成に至る。続いて、卵巣がVgを取り込むことにより卵内に卵黄タンパク質が蓄積し、卵成熟が完了する。

マラリアの原因となる*Plasmodium*原虫のベクターである*Anopheles*属蚊 (ハマダラカ) も、卵成熟のために吸血を行う。マラリアの対策にはベクターとなるハマダラカのコントロールが重要と考えられており、これまで主に殺虫剤が使用されてきた。しかし昨今、薬剤耐性蚊の出現や環境中への薬剤残留が問題視されており、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望まれている。

ハマダラカの中腸内細菌による、原虫媒介能や産卵数、卵孵化率への影響は報告されている。しかしながら、卵巣内の卵成熟への影響は報告されていない。そこで本研究の第1章において、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を検討した。第2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。第1章および第2章の結果から、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の可能性が考えられたため、第3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。

#### 1. 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

ハマダラカに抗生物質添加スクロースを与えて飼育すると、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、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。なお、STまたはKMを1週間摂取させた蚊について吸血後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、卵成熟抑制が確認された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、*Methylobacterium* sp.が卵巣内の卵成熟に影響を与える可能性が考えられた (*Appl. Entomol. Zool.* 2023)。

## 2. ハマダラカの中腸内からの*Methylobacterium* sp.分離および卵成熟抑制物質の特定

中腸内細菌の組成解析の結果に基づき、*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群の吸血後の中腸内をそれぞれ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群の中腸内からは3株分離できた。分離した計4株について、16S rDNA配列を解析して菌種同定を行った結果、飼育水由来の菌と中腸内由来の菌は別種であり、中腸内由来の3株は全て同じ配列だった。*Methylobacterium* sp.の2菌種それぞれの懸濁液（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結果、中腸内由来*Methylobacterium* sp.の生菌摂取蚊でより卵成熟が抑制されていた。続いて、中腸内由来*Methylobacterium* sp.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ところ、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。以上より、ハマダラカの中腸内細菌である*Methylobacterium* sp.由来の耐熱性物質が卵成熟を抑制する可能性が考えられた (*Appl. Entomol. Zool.* 2023)。

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

ハマダラカの中腸内における*Methylobacterium* sp.の存在が、卵成熟を抑制するのかを検討した。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を抽出した。リアルタイムPCRにより、各部位の*Methylobacterium* sp.の量を比較した結果、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、中腸内で*Methylobacterium* sp.の量が有意に増加していた。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、中腸内に存在する*Methylobacterium* sp.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。次にホルモン分泌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。その結果、ILP mRNA発現量に差はなかった。Vg mRNAについては、*Methylobacterium* sp.が吸血後24時間目における発現量に影響を与

えることが確認された。よって、*Methylobacterium* sp.はVgの合成または取り込みに関する何らかの因子に影響を与える可能性が考えられたため、引き続き検討を行っている（投稿準備中）。

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に影響を与えている可能性が考えられた。よって本研究により、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の可能性が見出された。今後、*Methylobacterium* sp.によるハマダラカの卵成熟抑制の機序が解明され、さらに卵成熟抑制の原因物質が同定されれば、殺虫剤耐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。