特 集 第71回日本衛生動物学会大会シンポジウム 特別寄稿文

ハマダラカにおける吸血及びマラリア媒介機構の研究

山本大介*

自治医科大学感染・免疫学講座医動物学部門（〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1）

（受領：2019年7月1日；登載決定：2019年8月20日）

A study of blood feeding behavior and malaria parasite infection in anopheline mosquitoes

Daisuke S. YAMAMOTO*

*Corresponding author: daisukey@jichi.ac.jp

Division of Medical Zoology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke Tochigi 329-0498, Japan

(Received: 1 July 2019; Accepted: 20 August 2019)

ハマダラカはマラリアを媒介する衛生害虫であり，病原体であるマラリア原虫の媒介に不可欠な蚊の吸血行動やその後の血液消化，マラリア原虫感染などのメカニズムの解析は，ベクター対策及びマラリア対策にとって重要である．蚊は吸血する際に，まず皮下の抹消血管を探り当てるプロービング行動を行い，血管を感知した後，血管に口針を挿入し吸血を行う．蚊の唾液には血小板凝集阻害因子，血液凝固阻害因子のような抗止血作用を持つ物質や，血管拡張作用物質，抗炎症作用物質などが含まれており，吸血時に唾液を分泌することで効率を高めている．また，蚊を含む吸血昆虫の唾液には，宿主免疫などに影響を及ぼすことで病原体の感染に関与することを示唆する例も報告されている．ハマダラカにおいても唾液腺及び唾液の研究が進められているが，蚊と宿主の両方での実際の唾液の機能についてはまだ不明瞭な点が多い．また，蚊における吸血は，卵巣発育のために雌のみが行う現象であり，吸血や血液消化，病原体感染に関わる唾液腺や中腸などの組織では，遺伝子の発現が性とリンクしているものもあると考えられる．このため，蚊において，性決定カスケードの下流で，吸血や病原体感染などに関わる分子がどのような制御を受けているかは興味深い問題である．我々はハマダラカにおいて，分子生物学的手法に加えて遺伝子組換えやゲノム編集などの遺伝子操作技術も利用して吸血，生殖，病原体媒介などのメカニズムの解明を進めている．

我々はハマダラカにおいて，吸血や病原体媒介時における唾液の機能を個体レベルで解析することを目的に，雌の唾液腺の破壊を行なった（Yamamoto et al., 2016）．破壊する方法として，唾液腺特異的に細胞死を誘導する手法を用いた．細胞死を誘導するエフェクターとして用いたのはマウスの *Bax* (*B-cell leukaemia/lymphoma 2-associated X gene*) 遺伝子である．*Bax* タンパク質は哺乳類において *Bcl-2* ファミリーに属する．*Bax* タンパク質はミトコンドリア外膜上で重合し，ポア（孔）を形成することでアポトーシスを誘導する機能が

あることが知られている．昆虫において，カイコガ *Bombyx mori* やキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* でマウスの *Bax* 遺伝子 (*mBax*) を人為的に発現させると，発現した細胞で細胞死を誘導できることが知られている（Sumitani et al., 2015）．我々は *mBax* をハマダラカの雌唾液腺特異的に機能するプロモーターと組み合わせて，ステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) のゲノムに組み込んだ遺伝子組換え系統（AAPP-*mBax* 系統）を作出した（図1）．この系統の雌は羽化後1日からすでに唾液腺の lobe（葉）が潰れてお

図1. 唾液腺を破壊した遺伝子組換えハマダラカ．
(a) 羽化後1週間の野生型と遺伝子組換え蚊（AAPP-*mBax*）の雌唾液腺．スケールバー：100 μm．(b) 羽化後1日の雌唾液腺抽出物のSDS-PAGE像．

図2. 唾液腺を破壊したハマダラカにおける吸血実験 (Yamamoto et al., 2016).

(a) プロービング時間. 麻酔したマウスに対して7分以内に吸血を開始した個体を示した. (b) 麻酔したマウスを30分間提示後の中腸における血液量の比較. ヘモグロビン量を吸光度により測定した数値で示した. (c) ネズミマラリア感染血液吸血後の中腸におけるオオシスト数の比較.

り, 野生型と比較して唾液腺に含まれるタンパク質が顕著に少ない. そこで, 唾液の減少が吸血行動にどの様に影響を及ぼすかプロービング時間 (最初に口器を皮膚に挿入してから吸血開始までに要する時間) を調べたところ, 野生型に比べて有意に長くなっていることがわかった. 一方で, 一旦吸血を始めると, その吸血量は野生型と同等であった (図2a, b). これらの結果は, ハマダラカにおいて唾液が吸血の初期に特に重要であることを示唆している. また, 吸血したAAPP-mBax系統の雌は産卵数や寿命の長さにおいては野生型と同等であり, 唾液の減少による影響は見られなかった.

次に, ネズミマラリア *Plasmodium berghei* モデルを用いてマラリア感染実験を行なった. その結果, AAPP-mBax系統の雌では中腸におけるオオシスト数が非常に少ないことがわかった (図2c). また, 唾液腺にスポロゾイトを保有する個体数も非常に少なく, 非感染のマウスに吸血させても感染した個体は見られなかった. このことは唾液の減少が蚊のマラリア感染に影響を及ぼしていることを示している. では, どうして唾液の減少によりマラリア感染 (オオシスト形成) が抑制されたのか? 我々は, 吸血時に放出された唾液がマラリア原虫の生殖母体から生殖体への分化に関与していることを可能性の一つとして考えている. ハマダラカ体内での生殖母体から生殖体への分化には, 蚊由来の活性化因子が重要なことが知られている. この活性化因子は唾液腺に多く含まれることから, 吸血中あるいは吸血後に中腸と一緒に取り込まれた後に生殖母体の活性化に関わっているのかもしれない. 実際に, 我々はAAPP-mBax系統の雌唾液腺では雄性生殖母体に対する活性化因子の含有量が非常に少ないことを確認している. 今後はAAPP-mBax系統の雌体内で生殖母体から生殖体への分化が起こっているかどうか調べる必要がある.

我々が今回用いた *mBax* による細胞死誘導技術は, ハマダラカの特定の細胞や組織を破壊して機能を解析する研究ツールとして非常に有用である. 最近, 我々は, ハマダラカの精巢特異的プロモーターを利用して精巣で *mBax* を発現させることにより, 精子ができない蚊を作出しており, 雄の生殖機能の解析に成功している (Yamamoto et al., 2019). 今後は他の組織にも応用し, 吸血やマラリア媒介だけでなくハマダラカにおける様々な現象の研究を進めていきたい. また, 我々はハマダラカの性分化機構が, 生殖に加え吸血に関わる生命現象ともどのようにリンクしているか調べる目的で, ハマダラカ性分化遺伝子の機能解析も進めている. 今後は, 性分化遺伝子が欠損した蚊で吸血や血液消化にどのような影響が出るか調べるとともに, 遺伝子群の発現変動を調べることで, 吸血に関わる生命現象に重要な遺伝子の同定を行う予定である.

文 献

- Sumitani, M., Sakurai, T., Kasashima, K., Kobayashi, S., Uchino, K., Kanzaki, R., Tamura, T. and Sezutsu, H. 2015. Establishment of a specific cell death induction system in *Bombyx mori* by a transgene with the conserved apoptotic regulator, mouse Bcl-2-associated X protein (mouse Bax). *Insect Mol. Biol.*, 24: 671–680.
- Yamamoto, D. S., Sumitani, M., Kasashima, K., Sezutsu, H. and Matsuoka, H. 2016. Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells. *PLoS Pathog.*, 12: e1005872.
- Yamamoto, D. S., Sumitani, M., Kasashima, K., Sezutsu, H., Matsuoka, H. and Kato, H. 2019. A synthetic male-specific sterilization system using the mammalian pro-apoptotic factor in a malaria vector mosquito. *Sci. Rep.*, 9: 8160.