

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03462

研究課題名（和文）真菌・細菌・細胞内共生微生物による病原体媒介蚊のパラトランスジェネシス

研究課題名（英文）Paratransgenesis of disease vector mosquito by fungi, bacteria, and cellular symbiont

研究代表者

嘉糠 洋陸（Kanuka, Hirotaka）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：蚊は、吸血によりウイルスや原虫等の病原体をヒトに媒介し、デング熱やマラリアなどの感染症を引き起こす。微生物の介在により昆虫の性質を間接的に改変するパラトランスジェネシスにおいて、蚊に感染する昆虫ウイルス・真菌・細菌など他種の微生物が、蚊と病原体の間にある相互作用のバランスに影響を与えつる仕組みの一端（ウイルス免疫応答の惹起、細菌の蚊集団内拡散、真菌病原性因子の同定）を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた研究成果から、宿主・病原体・媒介者の自然界でのライフサイクルの中で、媒介蚊が病原体と究極のバランスを取るための仕組み等が明らかになり、蚊に共存して介在する他者微生物もひとつの生命システムと捉える知見を提供した。それらの微生物の存在を利用し、そのバランスを敢えて崩すパラトランスジェネシスにより、蚊媒介性感染症制御に向けた新たな研究基盤とする独創性は高く、大きな波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Mosquitoes transmit pathogens such as viruses and protozoa to humans through blood-sucking, causing infectious diseases such as dengue fever and malaria. In paratransgenesis, in which insect properties are indirectly modified by microbial intervention, we have identified the detailed mechanisms by which other species of microorganisms, such as insect viruses, fungi, and bacteria that infect mosquitoes, can affect the balance of interactions between mosquitoes and pathogens (induction of viral immune responses, the spread of bacteria within mosquito populations, and identification of fungal pathogenicity factors).

研究分野：衛生動物学

キーワード：蚊 病原体 感染症 パラトランスジェネシス 細菌 真菌 ウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蚊は、吸血性の節足動物である。マラリア・フィラリア・デング熱・日本脳炎・ジカ熱等の疾患は、ハマダラカやヤブカ、イエコ属の蚊によって媒介される感染症であり、人間や動物に対して世界規模で大きな脅威となっている。これらのウイルスや寄生虫(原虫および蠕虫)疾患の感染拡大の可能性は常に脅威であり、それらに関わる基盤研究の重要性は年々増している。病原体媒介蚊を生物学的に俯瞰すると、極めて興味深い生命現象が見出される。それは、病原体を体内に有するにも拘わらず、蚊自身は病気(含む致死)にならないという点である。感染者から吸血により、蚊の体内に取り込まれたウイルスや寄生虫は、蚊の腸管や唾液腺細胞などに侵入し、増殖または分化する。その数は総じて少ないが、感染成立後はそれらの病原体数がゼロになることはなく、動物宿主での「持続感染または慢性感染」のような状態が維持される。蚊は自身の適応度(フィットネス・コスト)を下げず、一方で病原体は蚊と共存するために、蚊-病原体相互作用のバランスが整えられたと考えられ、ひいてはそれが、現在も蚊が病原体媒介能を維持し続けている根源と指摘できる。病原体の増加と排除、そして受容の拮抗を感染コンピテンシー(病原体感受性)と捉えれば、蚊の感染コンピテンシーは低レベルで維持されていると考えられる。

### 2. 研究の目的

近年、蚊に存在もしくは感染しうる、病原体以外の微生物群(真菌、細菌、細胞内共生微生物等)が、蚊の感染コンピテンシーを制御するという現象が徐々に明らかになってきた。加えて、それらの微生物は、蚊の生理・行動・生殖にも影響を及ぼすことも判明した。この蚊と病原体の相互作用に関与する第三者的微生物は、病原体媒介蚊のパラトランスジェネシスを大いに発展させる可能性を持つ。パラトランスジェネシスとは、1992年に Beard らが提唱したもので、病原体媒介節足動物に存在する共生微生物を遺伝子レベルで人為的に改変することで、媒介能を制御するという試みである。研究代表者らは、広義のパラトランスジェネシスとして、多種多様な微生物の特性を活用し、蚊などの病原体媒介節足動物の性質(媒介能・生理・生殖・行動他)を多角的に変えるメリットを提唱している。そのためには、蚊の個体・集団レベルの視点から、三者間相互作用の包括的な理解が必須となる。

本研究課題は、ハマダラカおよびネッタイシマカ等の病原体媒介蚊を対象として、第三者的微生物による媒介蚊のコンピテンシー制御の分子基盤を解明することを目的とした。これにより、「蚊・病原体・他種微生物」の三者間相互作用の普遍的理解と、パラトランスジェネシスによる病原体媒介蚊制御の基盤構築を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) vDNA を介した蚊とアルボウイルスの相互関係の解析

ウイルスゲノムを鋳型とした DNA (vDNA) による昆虫の免疫調節が知られている。vDNA を解析する目的で、第三者微生物のモデルとして、多くの昆虫種に感染するフロックハウスウイルス(FHV)を用いた。病原体媒介性のネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) と非媒介性のショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を対象に、微量注入による FHV 感染実験をおこなった。FHV 感染による致死性およびウイルス増殖効率を検討した。vDNA の検出には、PCR 法を用いた。並行して、ショウジョウバエ由来の S2 細胞とヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) 由来の C6/36 細胞を用いた FHV 感染実験をおこなった。

#### (2) セラチア菌の蚊集団内での拡散様式の解析

多鞭毛型セラチア菌 (*Serratia marcescens*) の蚊集団における挙動を調べる目的で、ネッタイシマカおよびステフェンシハマダラカ (*Anopheles stephensi*) を用いた。研究代表者らが同定したセラチア菌株 (HB3) に、蛍光タンパク質 GFP を発現する遺伝子を導入し、イメージングを可能にした。蚊成虫は網ケージ (約 30 cm 四方) 内で、蚊幼虫は水を張ったパッド (29 cm × 23 cm × 4.5 cm) 内で飼育した。成虫には 10% スクロース溶液を与えた。蚊個体のセラチア菌の保菌状況について、共焦点レーザー顕微鏡および蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。必要に応じて、飼育環境中のセラチア菌の有無を LB 寒天培地を用いた培養により判別した。

#### (3) ボーベリア属真菌の病原性因子の同定と解析

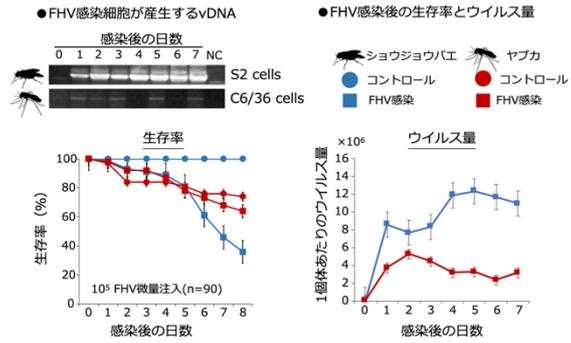
蚊類由来の昆虫寄生菌約 400 菌株の菌株ライブラリーを用いて、ステフェンシハマダラカの致死性を指標にスクリーニングを実施して得た複数のボーベリア属 (*Beauveria*) 真菌等を用いた。B60-2 株 (*Beauveria pseudobassiana*)、B29-15 株 (*Beauveria bassiana*) に加え、ポコニア属真菌の B9-3-1 株 (*Pochonia bulbillosa*) も実験に使用した。蚊への接種方法は、附節局所的に昆虫寄生菌を接種することによる。濾紙に分生子懸濁液を滴下し 30 分間その上を歩行させ、飼育チャンバーへ移し、27° C、80%RH 条件下で飼育することで、各種実験に供した。

### 4. 研究成果

(1) vDNA を介した蚊とアルボウイルスの相互関係の解析

蚊媒介性のウイルスは、総じて ssRNA(+) をゲノムとし、増殖に DNA を必要としない。しかし近年、節足動物体内において、ウイルスゲノムを鋳型とした DNA (vDNA) の産生が報告された。この vDNA が、ヤブカにおけるアルボウイルスの持続感染を制御する免疫調節因子と仮定し、昆虫ウイルスである FHV をモデルとして解析をおこなった。FHV ゲノム中の vDNA 産生可能配列を同定する目的で、ヤブカ細胞およびショウジョウバエ細胞にそれぞれ FHV を感染させ、培養細胞から抽出した DNA をテンプレートに各種プライマーを用いて PCR を実施した。その結果、ゲノム中の様々な部位から vDNA が産生され、その検出程度に差が生じた。ショウジョウバエ細胞ではその産生量が著しく多い一方で、ヤブカ細胞では少なかった (図 1)。微量注入により FHV を感染させたショウジョウバエとネッタイシマカを対象にした解析から、個体レベルにおいても vDNA が産生されること、その効率はショウジョウバエよりもネッタイシマカのほうが低いこと等が明らかになった。vDNA 産生量は、FHV のウイルス量および昆虫の致死率との間に正の相関が認められた。以上の結果から、ウイルスの vDNA は、昆虫細胞内の免疫応答を負に調節する可能性が示唆された。

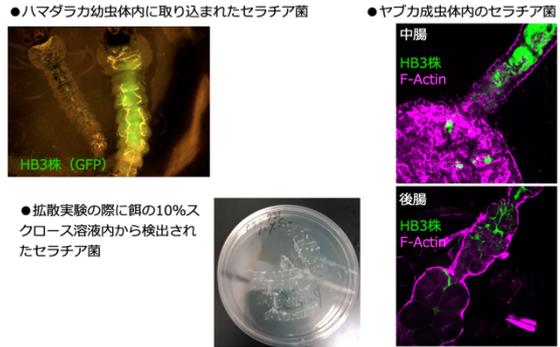
図1 vDNAを介した蚊とウイルスの相互関係の解析



(2) セラチア菌の蚊集団内での拡散様式の解析

研究代表者らは、ハマダラカ体内でマラリア原虫 (*Plasmodium* 属) が中腸に侵入・通過する際、中腸ルーメン側に多鞭毛型セラチア菌 (*Serratia marcescens*) が存在すると、マラリア原虫の中腸への侵入が阻害されることを見出している。パラトランスジェネシスは、蚊媒介性感染症の制御法としての社会実装を指向するものであり、その性質上、蚊集団内に第三者微生物が何らかの方式によって拡散することが必要となる。研究代表者らは、セラチア菌 (HB3 株) を腸管内に導入したネッタイシマカを、ケージ内の未感染ネッタイシマカ集団内に放飼したところ、同集団の個体の多くがセラチア菌に感染することを確認した。また、次世代の全ての個体が後腸内にセラチア菌を有しており、セラチア菌が効率的に集団内に拡散することを明らかにした (図 2)。このセラチア菌の拡散は、雄成虫、雌成虫のどちらが起点になっても起こることも判明した。GFP 発現セラチア菌 (HB3 株) を用いて、ハマダラカに対して同様の検討をおこなったところ、幼虫期に腸内に多数の菌体が存在することが確認され、セラチア菌の拡散様式は主に水が媒体になっている可能性が示唆された。

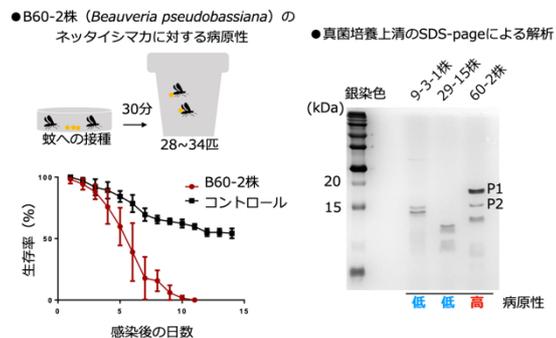
図2 セラチア菌の蚊集団内での拡散様式の解析



(3) ボーベリア属真菌の病原性因子の同定と解析

真菌には、蚊類に寄生し致死を誘導する昆虫寄生菌が存在する。昆虫寄生菌による蚊防除の有効性が報告されて以来、昆虫寄生菌は蚊類パラトランスジェネシス用の微生物資材として認識されている。日本国内および西アフリカのブルキナファソで採取した蚊類からの昆虫寄生菌分離を実施し、マラリア原虫媒介蚊を標的とする、蚊類由来の昆虫寄生菌に特化した 400 菌株に上る菌株ライブラリを構築した。このライブラリを用いて蚊の致死性を指標にスクリーニングを実施したところ、ボーベリア属 (*Beauveria*) の真菌が複数株同定された。これらのうち、最も病原性の高い菌株 (60-2 株) を対象に解析した結果、この株は、ハマダラカの頭部において集中的に増殖し早期致死を引き起こすこと、雌成虫において吸血行動の著しい減弱が誘導されること、ネッタイシマカに対しても高い致死性を示すことなどを明らかにした。真菌の培養上清調整と、それを用いた蚊腹腔への微量注入実験から、この高病原性の 60-2 株は、感染時に分泌性因子を介して蚊に致死を誘導することが判明した。病原性の低い株を対照として用いて、培養上清から 60-2 株が特異的に分泌する約 16 kDa および約 24 kDa の 2 つのタンパク質の精製に成功した (図 3)。

図3 ボーベリア属真菌の病原性因子の同定と解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Badoilo A, Sombie A, Pignatelli PM, Sanon A, Yameogo F, Wangrawa DW, Sanon A, Kanuka H, McCall PJ, Weetman D.	4. 巻 13
2. 論文標題 Insecticide resistance levels and mechanisms in Aedes aegypti populations in and around Ouagadougou, Burkina Faso	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis	6. 最初と最後の頁 e0007439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0007439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Long KC, Kanuka H [44人中23番目], Akbari OS.	4. 巻 370
2. 論文標題 Core commitments for field trials of gene drive organisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abd1908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakuma Chisako, Kanuka Hirotaka	4. 巻 49
2. 論文標題 A simple and affordable method for estimating the fluid volume a mosquito sucks using food dyes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-021-00302-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大手 学 (Ote Manabu) (20386717)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師  (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	相内 大吾  (Aiuchi Daigo)  (50552783)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授     (10105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関