

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05668

研究課題名(和文) 昆虫寄生菌によるハマダラカ行動制御機構の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of behavioral manipulation on anopheline infected with entomopathogenic fungus

研究代表者

相内 大吾 (Aiuchi, Daigo)

帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・准教授

研究者番号：50552783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：当初は、血体腔内への培養濾液のインジェクションによる毒性の評価を実施し、3kDa以上の分子サイズの画分に致死性が認められた。また、インジェクション蚊での行動変化も観察された。しかし、保有菌株の感染性の変化により、経口投与による実験系に変更して研究を進めた。菌培養濾液は、経口投与でも毒性を発揮することが明らかとなり、菌培養濾液中になんらかの致死因子が含まれることが考えられた。経口投与においても、3kDa以下の分子サイズで毒性が認められた。一方、培養条件を変えて生育させた供試菌株のトランスクリプトーム解析を実施し、合計3755の発現変動遺伝子を検出した。こちらに関しても、解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ハマダラカの宿主探索行動や吸血行動などを抑制する、昆虫寄生菌の行動制御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした。特に昆虫寄生菌の培養液中に産出される代謝産物の比較解析と行動解析の組み合わせにより、行動制御関連因子および遺伝子を同定することを目指した。これらの作用機構を応用することにより、菌の代謝産物を用いたベクターコントロールによる感染症低減技術の確立につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Initially, toxicity of fungal culture filtrate was evaluated by injection to hemocoel of Anopheline, and toxicity was observed in fractions of higher than 3kDa molecular size. However, due to the changes in fungal phenotype infectivity to mosquitoes, fungal application method was changed to oral administration method on this research. It was shown that the fungal culture filtrate has toxicity even by oral administration, and it was expected that some lethal factors were contained in the fungal culture filtrate. Even in the oral administration, toxicity was observed in molecular size of less than 3kDa. On the other hand, transcriptome analysis was done by comparing gene expression on the fungal isolate which was cultured under different conditions, and changes in gene expression was detected in a total of 3755 genes.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫寄生菌 ハマダラカ バクターコントロール

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、ハマダラカの宿主探索行動や吸血行動などを抑制する、昆虫寄生菌の行動制御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした。自然界では、寄生者が宿主の行動を操作する行動制御という生物現象が知られている。これまでに申請者は、ハマダラカにおいて、昆虫寄生菌の感染により、感染症の媒介に必須である各種行動が制御されることを明らかにした。本研究課題では、昆虫寄生菌の異なる培養方法を用いることで、この行動制御の発現を人為的にコントロールし、昆虫寄生菌の培養液中に産出される代謝産物の比較解析と行動解析の組み合わせにより、行動制御関連因子および遺伝子を同定することを目指した。

### 2. 研究の目的

自然界では、寄生者の生存率や繁殖率を向上するために動物宿主の行動をコントロールする現象(行動制御)が、ウイルスやバクテリア、真菌、原虫、捕食寄生者(寄生蜂など)、線虫等の寄生者で見られる。このような宿主行動制御の分子機構を明らかにすることは、寄生者の寄生戦略における進化的なバックグラウンドを明らかにするのに加え、宿主-寄生者間の分子生物学的・生化学的相互作用を俯瞰することで、宿主行動の発現やその形質に重要な因子の特定につながるものと期待された。これまでの申請者の研究で、ハマダラカは*B. bassiana* 60-2の感染により、次世代を生産するための吸血宿主を探し出す鍵となる誘引源に対し反応性を失い、目前に吸血源が存在しても吸血行動がとれないことを明らかにしている。また、これらの一連の行動が病原体の伝播においても必須の行動となる。このようなハマダラカの行動を制御する*B. bassiana*側の因子とその機能を明らかにすることは、全く新しい戦略に基づくハマダラカ防除技術の確立に貢献することが期待された。さらに、ハマダラカ側の吸血行動や病原体伝播に関連する行動学的形質の理解が深まり、蚊の行動を直接攻撃するような新規薬剤の開発などに発展するポテンシャルを有する。以上のような背景から、本研究課題では、ハマダラカにおける病原体伝播に必須の行動を制御する、*B. bassiana* 60-2の行動制御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者は、*B. bassiana* 60-2の培養条件を変更することで、病原性や行動制御の発現をコントロールする手法を見出し、通常のCzapek-Dox液体培地(CD)で*B. bassiana* 60-2を培養し、その培養液をハマダラカにインジェクションしても殺虫効果と行動制御効果が現れない。しかし、酵母エキス加用Czapek-Dox液体培地(CDY)を用いて培養することで、ハマダラカへの殺虫効果と行動制御効果が発現することを見出した。本研究課題では、CDおよびCDY内で培養した*B. bassiana* 60-2の培養液を用いて比較解析を実施した。

培養濾液のSDS-PAGEで検出された18 kDaおよび16 kDaの*B. bassiana* 60-2特異的なタンパク質について、リコンビナントタンパク質を作成した。両タンパク質コード領域のcDNAから、それぞれ620bpおよび580bpの標的遺伝子を特定し、T7プロモーター配列を含むプラスミドベクター(pT7 Blue)にこれらのPCR産物をTAクローニングした。さらに、標的遺伝子領域を制限酵素処理により切り出し、発現ベクターのpRSET-Cに組み込んだ。これを大腸菌 BL21 Star (DE3)株に形質転換し、PCRにより両遺伝子の発現を確認した。これらリコンビナントタンパクをハマダラカの血体腔内にインジェクションした。

*B. bassiana* 60-2の培養濾液をインジェクションしたハマダラカの吸血行動率と吸血量、産卵数を評価した。加えて、3 kDaのろ過膜で限外濾過した培養濾液をハマダラカの血体腔内にインジ

エクシオンした。

B. bassiana60-2が、ハマダラカに対する経皮感染力を失っていることが明らかとなった。感染力を回復させるため虫体連続培養を実施したが、感染力は回復せず、新たな投与方法を検討した。その結果、B. bassiana 60-2は経口投与で病原性を発現することが明らかとなり、経口投与による感染実験法の確立を進めた。さらに、菌培養濾液の経口投与でも毒性が確認されたことから、培養濾液中になんらかの致死因子が含まれることが考えられ、その毒性は、血体腔インジェクションと同様、菌の培養条件によってコントロール可能であることを見出した。

培養濾液を3.5kDaの透析チューブによるバッファー交換を行なって経口投与し、より分子サイズの小さい化合物が疑われたことから、液体クロマトグラフィーによる分子サイズごとの画分の経口投与を実施した。一方、培養条件を変えて生育させたB. bassiana 60-2間のRNAseqによるトランスクリプトーム解析を実施した。

#### 4. 研究成果

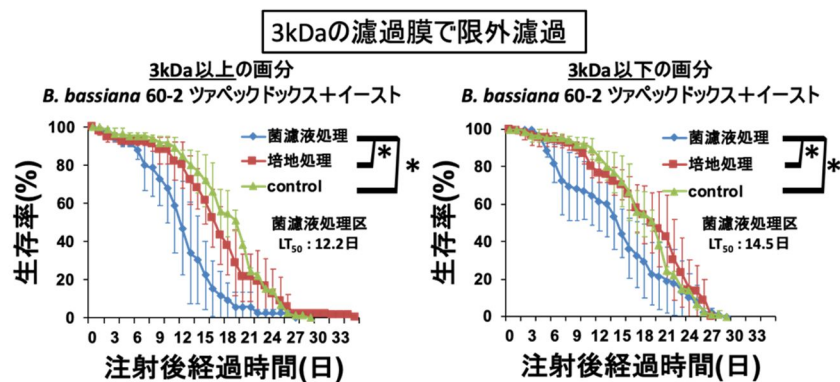
3kDaのろ過膜で限外濾過した培養濾液をインジェクションしたところ、3kDa以上の画分では、半数致死日数が12.2日と対照区および培地処理区に対して有意に短い値を示した。一方、3kDa以下の画分のインジェクションでは、弱い致死性を示した。このことから、当該菌株では、3kDa以上の化合物が主体となり、3kDa以下の低分子化合物も複合的に作用することで致死性を発現していることが明らかとなった。

また、これら培養濾液をSDS-PAGEにかけたところ、18kDaおよび16kDaにB. bassiana 60-2特異的なバンドが検出された。これらのアミノ酸

配列解析を行ったところ、18kDaが物質同定されていないタンパク質様の化合物であり、16kDaが細胞壁のマノプロテインであることが明らかになった。これらB. bassiana 60-2特異的なタンパク質について、リコンビナントタンパクを作成して、ハマダラカにインジェクションしたが致死性を示さなかった。

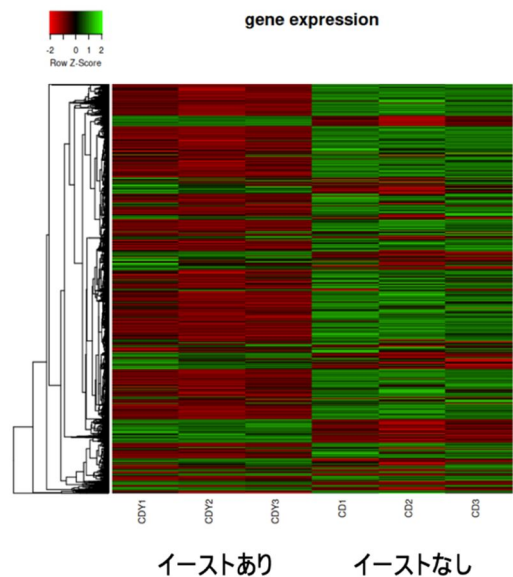
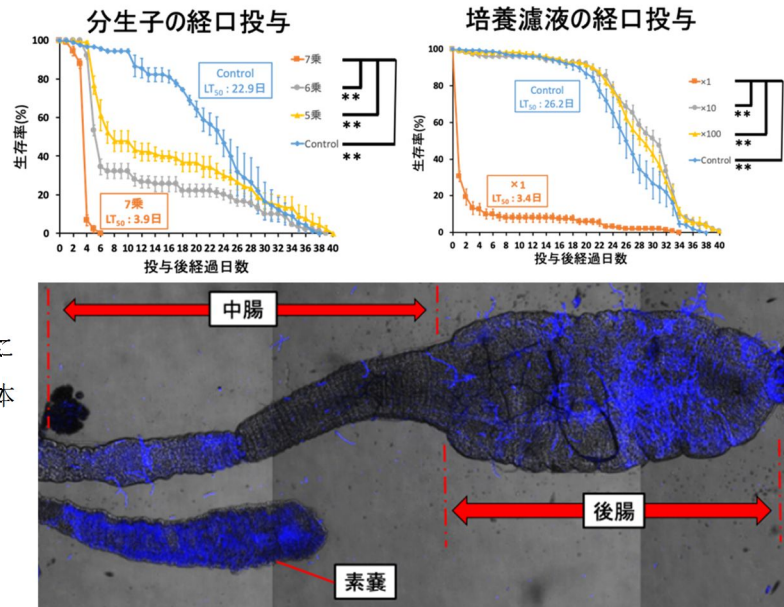
B. bassiana 60-2の培養濾液をインジェクションしたハマダラカの吸血行動率と吸血量、産卵数を評価したところ、インジェクション直後の個体で産卵数が23%減少し、培養濾液中に産卵に影響を与える因子が含まれることも明らかとなった。

これまでB. bassiana 60-2の高病原性を確認した後、培養濾液を用いた研究に集中していたため、B. bassianaの感染実験を長きにわたって実施していなかった。令和2年度、新たに感染実験を実施したところ、B. bassiana 60-2はハマダラカに対する経皮感染力を失っていることが明らかとなった。感染力を回復させるため虫体連続培養を実施したが、感染力は回復せず、新たな投与方法を検討した。その結果、B. bassiana 60-2は経口投与では病原性を発現することが明らかとなり、



経口投与による感染実験法の確立を進めた。B. bassiana 60-2経口投与個体の解剖と蛍光顕微鏡観察により、ハマダラカの後腸および素囊に菌体が多く存在し、これらの器官から感染が起こることを明らかにした。これまで昆虫寄生菌の経口毒性に関する知見は少なく、これ自体が重要な発見につながった。さらに、培養濾液の経口投与でも毒性が確認されたことから、培養濾液中になんらかの致死因子が含まれることが考えられ、その毒性は菌の培養条件によってコントロール可能であることを見出した。培養条件は、血体腔インジェクションと同様にツアペックドックス培地にイースト抽出物を入れるかどうかでコントロールすることができる。イースト抽出物入培地を用いた培養濾液をSDS-PAGEにかけたところ、特異的なバンドが検出されたことから、3.5kDaの透析チューブによるバッファー交換を行なって経口投与したが、毒性が失われたため、より分子サイズの小さい化合物が疑われた。現在、液体クロマトグラフィーによる物質同定を進めている。一方、培養条件を変えることで培養濾液の毒性をコントロールすることができることから、培養条件を変化させて培養したB. bassiana 60-2間のトランスクリプトーム解析を実施し、合計3755の発現変動遺伝子を検出した。こちらに関して、解析を進めている。

## B. bassianaの経口感染と経口毒性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 D. Aiuchi, R. Hatanaka, M. Koike and H. Kanuka	4. 巻 150
2. 論文標題 Comparison of infection dynamics using two strains of <i>Beauveria bassiana</i> which have different virulence in <i>Anopheles stephensi</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants / West Palaearctic Regional Section Bulletins	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川翔真, 小池正徳, 嘉糠洋陸, 相内大吾
2. 発表標題 <i>Anopheles stephensi</i> に対する <i>Beauveria bassiana</i> 分生子および菌培養濾液の経口投与による致死性と感染動態
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 D. Aiuchi, R. Hatanaka, M. Koike, H. Kanuka
2. 発表標題 Comparison of infection dynamics using two strains of <i>Beauveria bassiana</i> which has different virulence in <i>Anopheles stephensi</i> .
3. 学会等名 The 52nd annual meeting of the Society for invertebrate Pathology & 17th Meeting of the IOBC-Working Group "Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests". (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相内大吾
2. 発表標題 ベクターとしての死：昆虫寄生菌で病原体の伝搬を封じ込める
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会. The World of Entomoparasitic Fungi ~ めくるめく昆虫寄生菌の世界 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相内大吾
2. 発表標題 昆虫寄生菌による感染症媒介昆虫の行動制御
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Matsuzaki, M. Koike, H. Kanuka, and D. Aiuchi
2. 発表標題 The lethality of <i>Beauveria bassiana</i> s.l. secondary metabolites on <i>Anopheles stephensi</i>
3. 学会等名 The 51st annual meeting of the Society for invertebrate Pathology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相内大吾
2. 発表標題 昆虫寄生菌による感染症ベクターの行動制御
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎優, 小池正徳, 嘉糠洋陸, 相内大吾
2. 発表標題 <i>Anopheles stephensi</i> に対する昆虫寄生菌二次代謝産物の致死性とその性状
3. 学会等名 第70回日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畑中良太, 松崎優, 小池正徳, 嘉糠洋陸, 相内大吾
2. 発表標題 病原力の異なるBeauveria bassiana 2系統を用いたハマダラカ体内での感染動態の比較
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎優, Chen Xinyue, 畑中良太, 小池正徳, 嘉糠洋陸, 相内大吾
2. 発表標題 Beauveria bassiana s.l.二次代謝産物の致死性因子の性状
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ハマダラカに対する昆虫寄生菌由来の二次代謝産物	発明者 相内大吾, 松崎優	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-42104	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
連携研究者	嘉糠 洋陸  (Kanuka Hirota)  (50342770)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	

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1件

国際研究集会	開催年 null年
--------	--------------

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		
ブルキナファソ	ワガドゥグ大学	国立マラリア研究・研修センター	