

Real-time PCR 法によるネッタイシマカに感染した共生細菌ボルバキアの濃度定量

愛媛大学大学院 賛助会員 鈴木貴大 愛媛大学大学院 非会員 Jerica Isabel Llige Reyse
愛媛大学沿岸環境科学研究センター 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

近年、熱帯感染症が世界的な問題となっている。中でもデング熱は近年注目を集めており、最も重要な蚊媒介疾患の一つとされている。本実験の調査地であるフィリピンのマニラ首都圏においても、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) をはじめとする蚊が媒介するデングウイルスによる被害が相次いでいる。

デング熱の対策として、媒介蚊の個体数を減らすための発生源の抑制、育成環境の除去、寄生虫や天敵を用いた蚊の個体群の抑制などが行われているが、いずれも顕著な結果は得られていない。また、デング熱の発生地域はアフリカなどの発展途上国で多く見られるため、現段階で医療分野を充実させることは現実的ではない。

そこで近年、デング熱の抑制として注目を集めているのが、ボルバキアという共生細菌である。ボルバキアは節足動物やフィラリア線虫の体内に生息する共生細菌の一種であり、昆虫では高頻度でその存在が確認されている。注目されているボルバキアの特徴として、蚊を宿主とした場合に、蚊のデング熱感染能力を制御する役割を持っていることが挙げられる。ボルバキアに寄生されている媒介蚊がデングウイルスに感染した場合、ウイルスは蚊の体内で増殖せず唾液腺まで拡がらないため、人を吸血した際にウイルスを媒介しない。

ボルバキアがネッタイシマカに自然感染することや、ボルバキアは5つのグループの遺伝系統に分類されること、蚊体内のボルバキア密度が高ければ高いほどデングウイルス密度は低くなることは明らかになっているが、デングウイルスの抑制効果を発揮するのにボルバキア量はどれほど必要なのか、どの遺伝系統のボルバキアがネッタイシマカに自然感染しやすいのかといった詳細は明らかになっていない。蚊の個体ごとのボルバキア感染濃度の差や、感染しているボルバキアの遺伝系統と感染濃度の関係性が判明すれば、より効果的にボルバキアを持つかを増やすことができ、デング熱の抑制の効率化が期待できる。そこで本研究では、1) ネッタイシマカの成虫で感染しているボルバキアを定量し、個体間にどれほどの差があるのかを調べること、2) ボルバキアの遺伝系統によってボルバキア濃度が異なるという仮説を立て、遺伝系統が感染濃度に影響するのかどうかを調べることを目的とする。

2. 研究方法

2-1. 使用サンプル

2014年から2015年にかけてフィリピンのマニラ首都圏で採取された、ネッタイシマカ453個体分のDNAサンプルを用いる。提供者により、サンプルのDNA抽出、ボルバキアの遺伝系統の特定はすでに終わっている。

2-2. Real-time PCR 法

Real-time PCR 法とは、対象遺伝子の増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、サンプルに含まれる増幅対象領域のDNA量を測定することができるものである。本研究では、ボルバキアの遺伝子領域(16s マーカー)と、ネッタイシマカの遺伝子領域(RPS17 マーカー)を対象領域とする。また、蚊の個体ごとの体格差を考慮するために蛍光光度計でDNAサンプルに含まれる二本鎖DNAの測定を行う。

2-3. 遺伝系統の特定

ボルバキアの塩基配列データと、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) というツールを用いて、検出されたボルバキアの遺伝系統が5つの系統のうちのどれに該当するのかを調べる。

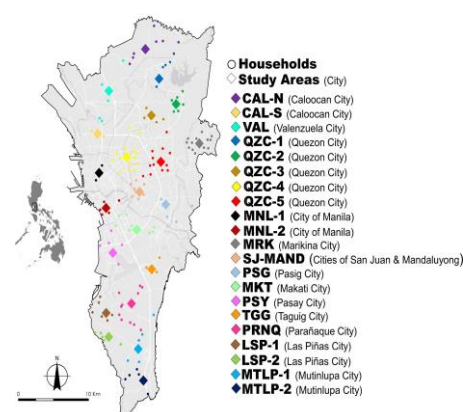


図.1 サンプル採取地点

3. 結果

16s データのみで算出したボルバキア濃度では、最小濃度を示したサンプルを基準とした場合、 3.590×10^3 倍の差があった。16s データを RPS17 データで割った場合、16s データを二本鎖 DNA 濃度で割った場合のボルバキア濃度では、最小濃度を示したサンプルを基準とした場合、それぞれ 9.219×10^6 倍、 7.289×10^5 倍の差があった。(図. 2)

ボルバキアの塩基配列データから、*Aedes aegypti* 系統と *Culex pipiens* 系統の 2 つの遺伝系統が確認された。遺伝系統ごとに平均濃度を比較した結果、16s データのみの場合、RPS17 データを考慮した場合、二本鎖 DNA 濃度を考慮した場合のいずれにおいても *Aedes aegypti* 系統の方が *Culex pipiens* 系統よりも高かったが、t 検定を行った結果、16s データのみの場合は有意差があり、RPS17 データ、二本鎖 DNA 濃度を考慮した場合は有意差がなかった。(図. 3)

16sデータのみを使用したボルバキア濃度の比較



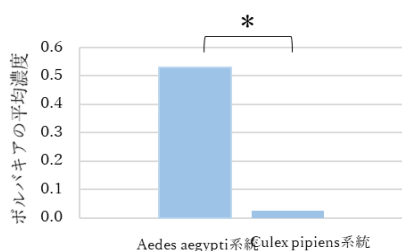
16sデータをRPS17データで割った場合のボルバキア濃度の比較



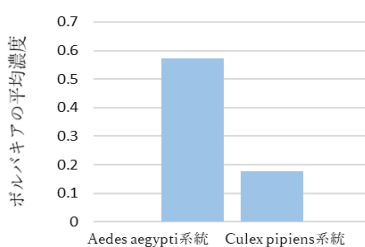
16sデータを二本鎖DNA濃度で割った場合のボルバキア濃度の比較



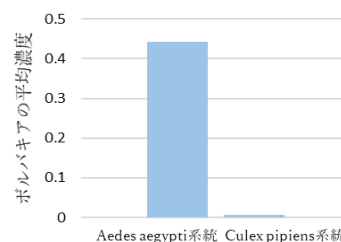
図. 2 ボルバキア濃度の比較



16sデータのみを使用して算出した
ボルバキアの平均濃度



RPS17データを考慮した
ボルバキアの平均濃度



二本鎖DNA濃度を考慮した
ボルバキアの平均濃度

図. 3 ボルバキア遺伝系統と平均濃度の関係

4. 考察

Real-time PCR でボルバキアが存在が確認されたとしても、蚊の個体間に最大 9.219×10^6 倍の濃度差があることが分かった。この結果と、ボルバキア濃度とデングウイルス抑制効果には関係性があるということから、PCR によってボルバキアが存在が確認されたとしても、その個体にデングウイルスの抑制効果があるとは限らないと言える。また、ボルバキアの 2 つの遺伝系統 (*Aedes aegypti*, *Culex pipiens*) において、遺伝系統によってボルバキア濃度が異なるという仮説は棄却されなかったことから、この 2 つの遺伝系統においては、遺伝系統によってボルバキアの感染濃度が左右されるとは言えないことが確認された。

5. 終わりに

蚊の DNA サンプルからボルバキア濃度を算出し、個体間で比較することで最大 9.219×10^6 倍の濃度差があることが分かった。また、ボルバキアの 2 つの遺伝系統 (*Aedes aegypti*, *Culex pipiens*) においては、遺伝系統によってボルバキアの感染濃度が左右されるとは言えなかった。

6. 参考文献

- Gerard Terradas, Scott L. Allen, Stephan F. Chenoweth & Elizabeth A. McGaw. Family level variation in Wolbachia-mediated dengue virus blocking in *Aedes aegypti*. 2017. *Parasites & vectors* 10-662
- Thaddeus M. Carvajal, Kazuki Hashimoto, Divina M Amalin, Reza Kurniawan Harnandika, and Kozo Watanabe. Detection of Wolbachia in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines. 2019. *Parasites & vectors* 12-361