

## ステフェンスハマダラカにおける成熟未受精卵の人為的賦活

山本 大介・畠山 正統・松岡 裕之

Daisuke S. YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Masatsugu HATAKEYAMA<sup>2)</sup> and Hiroyuki MATSUOKA<sup>1)</sup>:  
Analysis of the Artificial Egg Activation in *Anopheles stephensi* (Diptera, Culicidae)\*

<sup>1)</sup> Division of Medical Zoology, Department of Infection and Immunity, Jichi Medical University, Yakushiji 3311–1, Shimotsuke, Tochigi 329–0498, Japan

<sup>2)</sup> Insect Growth Regulation Research Unit, Division of Insect Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1–2, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan

E-mail: daisukey@jichi.ac.jp (DSY)

ハマダラカは世界三大感染症の一つであるマラリアを媒介することで知られている。マラリアの病原体であるマラリア原虫はハマダラカ体内に寄生しており、ハマダラカが人を刺すとマラリア原虫が唾液とともに体内に注入される。従って、マラリア原虫のハマダラカ体内での増殖・生育を抑制できれば、マラリア伝播を阻止出来ると考えられる。実用化されたマラリアワクチンがない現状において、近年トランスジェニック技術を用いてハマダラカ体内でマラリア原虫に対するエフェクター分子を発現させることで原虫の感染性や増殖を阻害し、マラリア伝播を阻止する方法が注目されており、有用な可能性のあるトランスジェニックハマダラカの系統が多数作られてきた (Ito *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2007; Kokoza *et al.*, 2010)。しかしながら実験室内において、これらの多数のトランスジェニック系統を全て安定的に維持することには相当な労力とコストがかかることが問題になってきており、今後は簡便な系統保存技術の開発が望まれている。

現在、他の生物種で行われている簡便な系統保存技術の一つに、精子の凍結保存とそれを利用した顕微授精が知られている。昆虫では唯一カブラハバチにおいて卵細胞質内精子注入法 (ICSI 法) による人工授精が可能であり、トランスジェニック系統の凍結保存精子を用いた人工授精も行われている (Sawa and Oishi 1989b; Hatakeyama and Sumitani 2005)。カブラハバチ以外の昆虫において ICSI 法による人工授精ができない理由の一つに、卵の人為的賦活、すなわち卵減数分裂の再開・母性 mRNA の翻訳開始などを人為的にコントロールできないことが考えられる。これに対して、カブラハバチでは成熟未授精卵を蒸留水に浸すことによる人為的賦活の技術が確立されており (Sawa and Oishi 1989a)、ICSI 法を可能にした要因の一つであると考えられている。そこで我々はハマダラカの一種であるステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) において ICSI 法を確立することを目指し、

まず卵の人為的賦活を試みた。

ハマダラカの未交尾の雌を吸血させたのちに、カブラハバチの卵の人為的賦活法に倣い、解剖して得た成熟未授精卵を蒸留水中に浸したところ、ほぼ全ての卵で産卵された卵と同様の黒い着色が見られた。しかし、これらの卵は孵化しなかった。卵の着色は NaCl の濃度に依存しており、NaCl 濃度が濃いと着色は見られなかった。さらに、成熟未授精卵を蒸留水に浸したのち、卵の核を DAPI 染色により観察したところ、減数分裂の再開した像が見られた。また、減数分裂の再開に伴い不活性化されることが知られている卵内の MEK-MAPK pathway (Ivanovska *et al.* 2004; Yamamoto *et al.* 2008) を調べたところ、蒸留水に浸すと約20分で卵内の MEK および MAPK は不活性化していた。これらの結果は蒸留水に浸されることによってハマダラカ卵が賦活されたことを示唆している。

### 引用文献

- Hatakeyama, M. and M. Sumitani (2005) Preservation of a transgenic strain of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) by artificial fertilization using cryopreserved sperm. *Insect Molecular Biology*, 14, 105–109.
- Ivanovska, I., E. Lee, K.M. Kwan, D.D. Fenger, and T.L. Orr-Weaver (2004) The *Drosophila* Mos ortholog is not essential for meiosis. *Current Biology*, 14, 75–80.
- Ito, J., A. Ghosh, L.A. Moreira, E.A. Wimmer, and M. Jacobs-Lorena (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417, 452–455.
- Kokoza, V., A. Ahmed, S. Woon Shin, N. Okafor, Z. Zou and A.S. Raikhel (2010) Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8111–8116.
- Sawa, M. and K. Oishi (1989a) Studies on the sawfly, *Athalia rosae* (Insecta, Hymenoptera, Tenthredinidae). 2. Experimental activation of mature unfertilized eggs. *Zoological Science*, 6, 549–556.
- Sawa, M. and K. Oishi (1989b) Studies on the sawfly, *Athalia rosae* (Insecta, Hymenoptera, Tenthredinidae). 3. Fertilization by sperm injection. *Zoological Science*, 6, 557–563.
- Yamamoto, D.S., K. Tachibana, M. Sumitani, J.M. Lee and M. Hatakeyama (2008) Involvement of Mos-MEK-MAPK pathway in cytoskeletal factor

\* Abstract of paper read at the 47th Annual Meeting of the Arthropodan Embryological Society of Japan, June 10–11, 2011 (Biwako, Shiga).

(CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, *Athalia rosae*.  
*Mechanisms of Development*, 125, 996–1008.  
Yoshida, S., Y. Shimada, D. Kondoh, Y. Kouzuma, A.K. Ghosh, M. Jacobs-Lorena

and R.E. Sinden (2007) Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathogens*, 3, e192.