

# シナハマダラカ群とチョウセンハマダラカ のアイソザイム・パターン

長島義介・\*関川弘雄

Isozyme Patterns in *Anopheles sinensis*

Group and *An. koreicus*

by

Yoshisuke Nagasima and Hiroho Sekikawa<sup>\*</sup>

## はじめに

わが国においてマラリア伝播蚊として知られるハマダラカ類については、古くから形態・生態・分布など多くの研究がなされ、蚊の種類によりマラリア伝播能に大きな差があることが認められている。これまでハマダラカ類の分類は光学顕微鏡による形態的特徴を基に行われてきたが、各発育ステージの形態が酷似するため種の鑑別が困難で、遺伝学的には区別されるが形態的には区別しがたい隠蔽種あるいは同胞種と呼ばれる種類もあり、未だ分類学的に混乱が生じている。

近年、WHOなどにより進められて来たマラリア絶滅計画は挫折し、新たな防除計画が模索状態にあつて、マラリア対策には対蚊種防遏 (specise sanitation) の理論が再評価されるようになり、ハマダラカの分類学的研究は非常に重要な課題となってきた。そしてその研究は従来の手法に加え、電子顕微鏡による超微形態、唾腺染色体の形質差や交雑による妊性の度合から系統を推察する細胞遺伝学、さらに電気泳動による酵素変異体 (isozyme) の泳動像 (zymogram pattern) の相違から種や属の独立性や類縁性を測る生化学的な検証など多方面からの追求が行われるようになった。

かかる状況にあつて、筆者等は本邦産シナハマダラカ群 (*sinensis* group) を中心に各ステージの形態や生態、分布に関する諸般の調査研究を行い報告してきた。今回は、電気泳動像 (zymogram) が種の分類に応用できるかどうかを検討するため、本邦に生息するシナハマダラカ *Anopheles sinensis* Wiedemann, 1828 (以下 *sinensis*)、オオツルハマダラカ *An. lesteri* Baisas et Hu, 1936 (以下 *lesteri*)、エセシナハマダラカ *An. sineroides* Yamada, 1924 (以下 *sineroides*)、チョウセンハマダラカ *An. koreicus* Yamada et Watanabe, 1918 (以下 *koreicus*)、ヤマトハマダラカ *An. lindesaii japonicus* Yamada, 1918 (以下 *japonicus*) の5種について電気泳動を行い得られたザイモグラム・パターンの比較を行うと共に、分類学的に論議の多い *sineroides* のザイモグラム・パターンが前記4種の何れの種のパターンに近似しているか否かの検討を試みたので、その知見を報告する。

## 材料と方法

供試材料としては、現地で採集した吸血雌蚊を実験室に持帰り、個別に産卵管に分離し、産下し

\* 新潟大学医学部医動物学教室

た卵と成虫を光顕下で種を同定し、ポリ容器内で飼育した4令幼虫を用いたが、*koreicus* と *japonicus* は、幼虫の鑑別が容易なので野外水域より採集した若令幼虫を4令まで飼育して実験に供した。供試蚊の産地と個体数は下記に示した。

種名	北海道		秋田県	岩手県	新潟県	
	剣淵	深川	大内	岩泉	弥彦	角田
<i>* sinensis</i> group						
<i>* Anopheles sinensis</i>				17		
<i>* Anopheles lesteri</i>	11	13	13			
<i>* Anopheles sineroides</i>	6			23		
<i>Anopheles koreicus</i>				18		
<i>Anopheles l. japonicus</i>					9	5

本検査は、ポリアクリルアミド polyacrylamide の5%ゲル平板(厚さ1mm)を用いた電気泳動法(Tukamoto, 1984)で行った。電気泳動には島津理科機器の電気泳動装置MI-I型を用いた水平泳動法で行い、実験時に発生するジュール熱を冷却するために、ゲル板の下を冷水が循環するように装置を改造した。ゲル板の両端(7cm)には140Vの定電圧(20V/cm)をかけ、試料の先端が試料溝より50mm泳動したザイモグラムについて検討した。試料の作製に当たっては、氷上に置いた赤血球凝集反応用の硬質ホールプレートの各ホールに、蒸溜水で洗った4令幼虫を生きたまま1個体ずつ入れ、30 $\mu$ lの蒸溜水を加え、ガラスのホモジナイザー棒を用いて素早く(30~60秒)摩り潰した。その後全量をマイクロヘマトクリット・チューブに吸い取ってヘマトクリット遠心器で1万Gで5分間遠心分離し、その上澄液を試料とした。各試料溝には約6 $\mu$ lの試料を定量ピペットで加えた。対象酵素は、塚本の実験結果から、活用バンドの出現が最も顕著で種の比較が有効と思われたロイシンアミノペプチダーゼ leucine aminopeptidase (以下LAP) と非特異性エステラーゼ non-specific esterases (以下Est) の2種類とした。なお原則としてLAPの実験に当たっては1日絶食させた幼虫、Estの実験では摂食10分後の幼虫を用いた。また泳動率 relative mobility (以下Rf.) は、泳動後発色させた酵素活性バンドの位置と試料溝からバンドまでの距離を不連続緩衝液による泳動の先端までの距離で割った値をパーセントで示した。

## 成 績

### 1) LAP

*sinensis*, *lesteri*, *sineroides* のLAP泳動像(図1, a)は、通常2本の活性の強い主要バンドが出現するが、そのいずれか1本のバンドが欠ける個体も10%に観察された。バンドのRf.は80, 70であった。*lesteri*は、産地の異なる個体(北海道深川, 剣淵, 秋田県大内)を同一ゲル板(図10)で比較泳動したが、いずれもRf.は80, 70で、産地による相違は見られなかった。その他いずれの種も微弱バンドが2~3本出現するが、Rf.70より陽極側にあるバンドは細く線状で、陰極側のもの

のは幅広く活性度が低い傾向がみられた。これら微弱バンドの出現は不安定で同一種でも出現する個体としない個体があった。一方、*koreicus* (図8) と *japonicus* (図9) では、通常3本の主要バンドが出現し、1本は泳動が速く Rf. 100 で他の2本は *sinensis* group と同じ Rf. 80, 70 であった。これらのバンドのうち1~2本のバンドが欠如する個体が20%に見られた。*koreicus* は、最も泳動度の大きいバンドが Rf. 94 を示す個体 (図12) が多く観察された。また微弱バンドの出現状況では *sinensis* group と同じ傾向が観察された。各種の代表的ザイモグラム・パターンは模式図 (図2) と写真図 (5~13) に示した。

## 2) Est

本酵素の場合は、ロイシンアミノペプチダーゼに比べ多くのアイソザイム多形が観察 (模式図3) された。何れの種においても Rf. 70 より陽極側に1mm前後の幅を有するバンドが2~5本みられる。そのうち、3本のバンドは比較的活性度が高く、そのバンドの陰極側に中程度の活性を呈する2本のバンドが観察された (図1, b)。Rf. 70 以下に1~2本の活性度の低い幅広いバンドが出現する個体もあるが、その出現は同一種内や同一個体群内でも不安定であった。*sinensis* group の *sinensis*, *lesteri*, *sineroides* は、通常活性の高い3本 (図21) の主要バンドがみられた。それらのうち、*sineroides* のザイモグラムが最も安定し、主要バンドの代表的 Rf. は100, 84, 74 で、Rf. 70 以下に1~2本の微細バンドが観察されることが多い。*lesteri* では産地の異なる (北海道釧路剣淵, 北見深川, 秋田県大内) 個体を同一ゲル板上で泳動したが、アイソザイム・パターンや主要バンドの Rf. には差がみられなかった。*sineroides* と *lesteri* では良く似たアイソザイム・パターンが観察されたが、その Rf. には差 (図1, b, 図20) がみられた。*sinensis* は *lesteri* や *sineroides* より、より多くのアイソザイム多形を示し、主バンドが不鮮明になることが多い。これに対し、*koreicus* (図17) と *japonicus* (図18) のザイモグラムは若干異なり、両種とも最も速く泳動する活性度の高いバンドは2本に分離する傾向が見られると共に、最先端のバンドはそれ以上泳動させても停滞 (Rf. 96, 94) する傾向がみられた。また、両種とも Rf. 70 付近に1本の活性のやや強いバンドと中程度の活性を呈するバンドが2本出現することが多かった。また Rf. 70 以下の陰極側に活性の低い微弱バンドが1~2本観察された。各種の代表的アイソザイム・パターンは模式図 (図3) と写真図 (14~22) に示した。

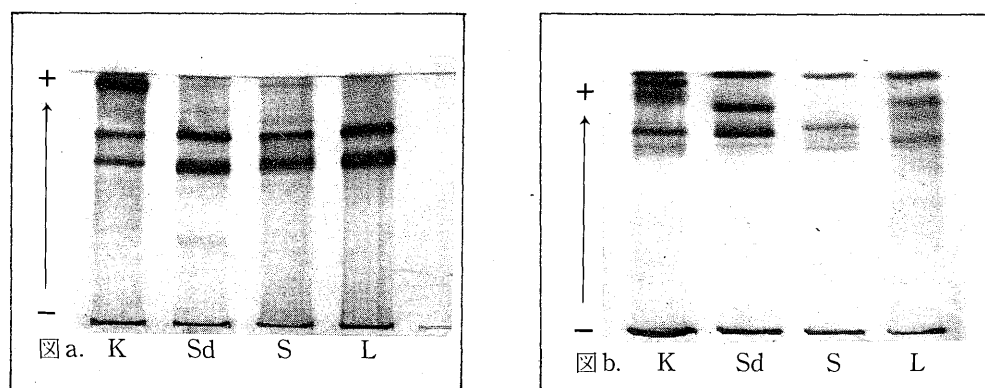
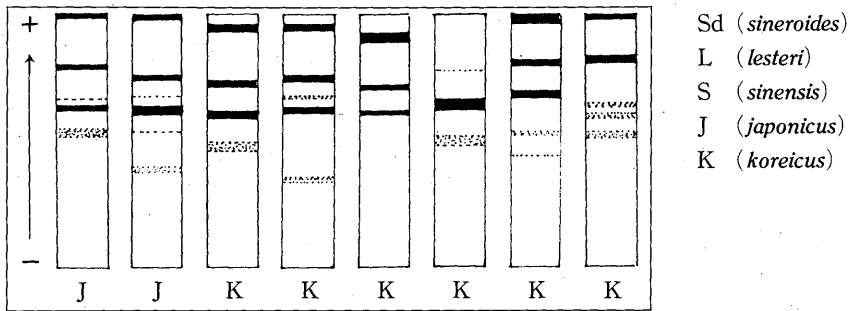
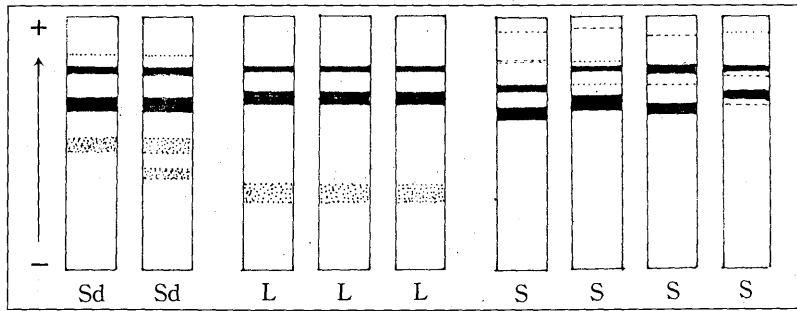


図1. 同一ゲル板上で電気泳動をしたハマダラカ5種4令幼虫のザイモグラム

図aは Leucine aminopeptidase, 図bは Non-specific esterases のザイモグラムであり、両酵素の各種試料は同一幼虫個体から得たものである。

K (*koreicus*), Sd (*sineroides*), S (*sinensis*), L (*lesteri*)



Sd (*sineroides*)  
 L (*lesteri*)  
 S (*sinensis*)  
 J (*japonicus*)  
 K (*koreicus*)

図2. 各種ハマダラカのLAPアイソザイム・パターン模式図

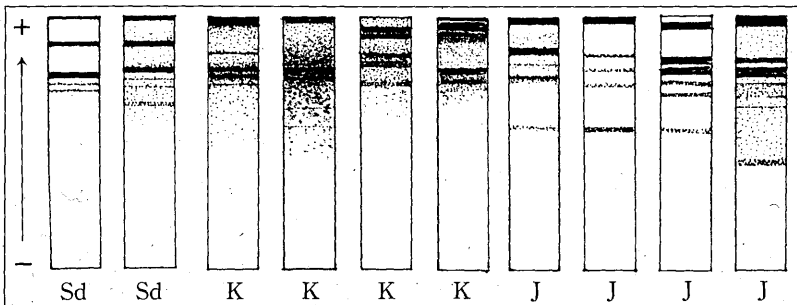
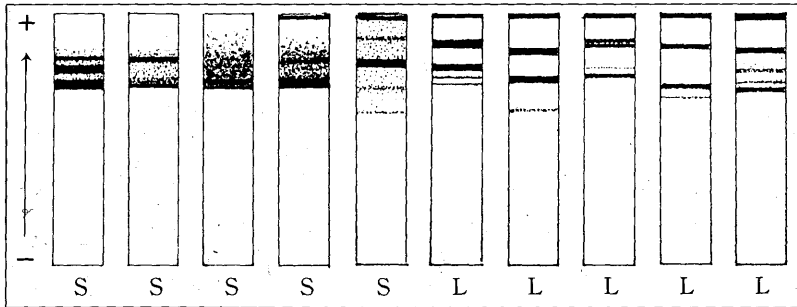


図3. 各種ハマダラカのEstアイソザイム・パターン模式図

## 考 察

本邦に生息するハマダラカ属について Otsuru and Ohmori (1960)<sup>18</sup> は、形態が酷似している *sinensis*, *lesteri*, *sineroides*, *yatsushiroensis* (ヤツシロハマダラカ) を一括してシナハマダラカ種群 (*sinensis* sibling species group)<sup>15</sup> として取り扱った。その後、細胞遺伝学的方面から研究を行った小熊・神田 (1970) は、唾腺染色体 (多糸染色体) の構造上 (縞模様) の相違から、*koreicus* は *sinensis* や *japonicus* よりも *sineroides* に染色体像が似ているとし、ハマダラカ属は *sinensis*, *lesteri*, *yatsushiroensis* に含まれる群、*sineroides*, *koreicus* に含まれる群、および *japonicus* の群は別なものであるとした。従って *sineroides* に関する分類学的見解は未だ混乱が生じている。かかる状況のなかで、近年アイソザイムのザイモグラムの相違によって種を同定し、系統的な類縁関係を追跡しようとする総合的な試みが塚本 (1984)<sup>17</sup> によって行われている。そこで筆者ら (1986) は、本邦に生息する前記 *Anopheles* 属 5 種のザイモグラム・パターンについて検査するとともに、*sineroides* のザイモグラム・パターンが何れの種のパターンに近似しているか否かを比較検討してみることにした。本実験で 4 令幼虫を用いた理由は、塚本が指摘し筆者らも確認したように、各ステージにおける活性バンドの出現は図 4 に示した如く 4 令幼虫において最も顕著であったからである。ザイモグラム・パターンが類似することはタンパク質の一次構造が似ていることを意味するので、遺伝的に近縁な種類とみなされる。本研究で検討した 2 酵素のうち LAP は *sinensis* group のいずれの種も主要活性バンドは Rf. 80, 70 の 2 本であり、主要活性バンドが 3 本の *koreicus*, *japonicus* 及びオオハマハマダラカ (*Anopheles saperoi*)<sup>17</sup> とは明らかに異なっている。一方、Est では、各種とも LAP より多くのアイソザイム多形が観察されたが、やはり *sinensis* group と *koreicus*, *japonicus* の間には差が認められた。このことは、*sinensis* group が遺伝的に近縁であることを示唆するものであろう。特に *sinensis* より *koreicus* に近い (小熊・神田) とされる *sineroides* の 2 酵素のザイモグラム・パターンが *sinensis* に酷似していることは、外部形態の類似とあいまって、本種がより *sinensis* group に近縁であることを示唆するものと考えられる。しかし、僅か 2 種類の酵素から種の類縁性を推定することは危険であり、今後他の酵素についても検討を進め、また多くの種の各地個体群について精査する必要がある。なお、Est のザイモグラム・パターンに多くのアイソザイム多形がみられることは、本酵素が種の遺伝子的特性をよく反映していると思われるので、この酵素の解析は、近似種間の類縁関係を判断するに役立つと考えられる。ところで、今回の Est のバンドの分離が不明瞭なものが少なくなかった。この原因は恐らく塚本が指摘

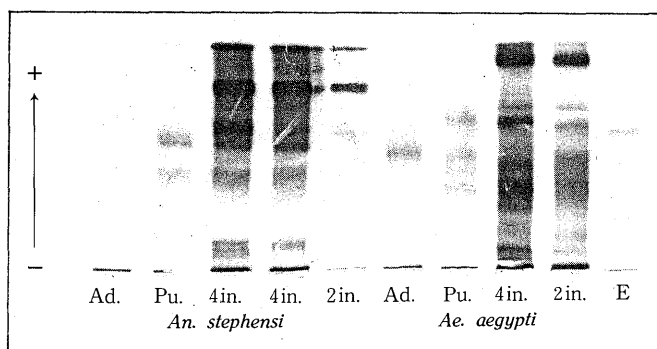


図 4. *Anopheles stephensi* と *Aedes aegypti* の各ステージにおける LAP ザイモグラム  
Ad (成虫), Pu (蛹), 4in (4 令用中), 2in (2 令幼虫), E (卵)  
(試料は塚本から供与を受けた)

しているようにゲル濃度が低いためと推測されるので、今後は6%程度にゲル濃度を変えて再検討することが必要と考える。

## 結 論

*sinensis*, *lesteri*, *sineroides*, *koreicus*, *japonicus* 5種の類縁関係を生化学的に調べるためにロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) と非特異性エステラーゼ (Est) の2酵素を用い、アイソザイムに関する電気泳動実験を試みた。その結果 LAP のザイモグラム・パターンは、*sinensis* group の内では互いに酷似し、*koreicus* や *japonicus* とは明瞭に異なっていた。Est の場合は、ロイシンアミノペプチダーゼよりも多くのアイソザイム多形が観察されたが、その代表的なアイソザイム・パターンは種に対応すると共に、*sinensis* group に属する種では他のハマダラカよりも近似したアイソザイム・パターンが観察された。このことは、*sinensis* group が生化学的にも近縁な種で構成されていることを示唆するものとする。特に唾腺染色体の構造から *koreicus* に近縁とみなされている *sineroides* のザイモグラム・パターンは *sinensis* に酷似していることが確認された。このことは、*sineroides* を形態学的観点から *sinensis* group として取り扱った Otsuru and Ohmori<sup>13</sup> の見解とあいまって、*sineroides* がより系統的に *sinensis* group に近縁な種であることを示唆するものとする。

## 謝 辞

本研究に当たりアイソザイムの電気泳動実験のご指導を戴き、また *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* の各ステージをご供与下さった産業医科大学医動物学教室の塚本増久教授、実験に際しご便宜を賜った新潟大学医学部第一生化学教室の緒方規矩雄教授に深く感謝の意を表わします。また本論文の執筆に当たりご助言いただいた琉球大学医学部寄生虫学教室の長谷川英男博士に厚くお礼を申し上げます。

## 引 用 文 献

1. 長島義介・大鶴正満・関川弘雄・中村靖人・岸本高男 (1977) : 走査電子顕微鏡による *A. s.* と *A. l.* の pupal trumpet の微細構造. 衛生動物, 28: 62.
2. 長島義介・大鶴正満 (1978) : 日本産シナハマダラカ群の卵の形態比較. 衛生動物, 29: 24.
3. 長島義介・大鶴正満 (1978) : SEMによる *Anopheles koreicus* と *Anopheles lindesaiti japonicus* 卵の構造について. 衛生動物, 29: 51.
4. 長島義介・大鶴正満・中村靖人 (1979) : 北海道東北部におけるハマダラカの調査成績. 衛生動物, 30: 12.
5. 長島義介・大鶴正満 (1979) : 岩手県岩泉町における *Anopheles koreicus* の観察. 衛生動物, 30: 58.
6. 長島義介・大鶴正満 (1980) : シナハマダラカ近似群の卵微細構造について. 衛生動物, 31: 154.
7. 長島義介・関川弘雄・大鶴正満・林 和木 (1982) : 本邦並びに台湾産 *Anopheles sinensis* の humeral cross vein 上の鱗片数について. 衛生動物, 33: 270.
8. 長島義介・関川弘雄・大鶴正満 (1983) : 本邦産 *Anopheles lesteri* の変異. 衛生動物, 34: 114.
9. 長島義介 (1985) : 走査電子顕微鏡で観察したハマダラカ卵の表面構造. 新潟青陵女子短期大学研究報告, 15: 13~25.
10. 長島義介・関川弘雄 (1986) : 走査電子顕微鏡で観察したハマダラカ5種の卵表面構造. 新潟青陵女子

短期大学研究報告, 16; 23~34.

11. 長島義介・関川弘雄・大鶴正満 (1986): チョウセンハマダラカの季節型決定要因としての日長, 衛生動物, 37; 253~255.
12. 長島義介・関川弘雄 (1986): 本邦産ハマダラカ5種のアイソザイム・パターン. 衛生動物, 37: 275.
13. Otsuru, M. and Y. Ohmori (1960): Malaria studies in Japan after World War II. Part. II. The research for *Anopheles sinensis* sibling species group. Jap. J. Exp. Med., 30: 33~65.
14. 大鶴正満・長島義介・中村靖人・岸本高男 (1976): 沖縄産シナハマダラカ群の卵型調査. 衛生動物, 27; 301~303.
15. 小熊 譲, 神田棟蔵 (1978): *Anopheles koreicus* の唾腺染色体地図. 衛生動物, 21: 114.
16. Tsukamoto, M. (1984): Technical notes on acrylamide gel electrophoresis used for comparing isozymes of mosquito larvae, J. UOEH., 6: 193~204.
17. 塚本増久 (1984): 日本の蚊におけるアイソザイムの地理的分布と生息環境による変異の系統分類学的研究. 昭和58・59年度科学研究補助金, 一般研究(C), 研究成果報告書, 産業医科大学医動物学教室, 32pp. 福岡.

## シナハマダラカ群とチョウセンハマダラカの幼虫期におけるアイソザイム・パターン

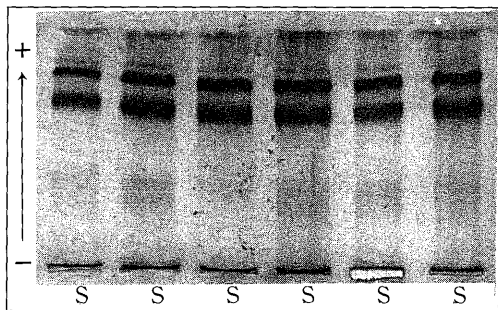


図5. *Anopheles sinensis* の LAP ザイモグラム  
(岩手県岩泉个体群)

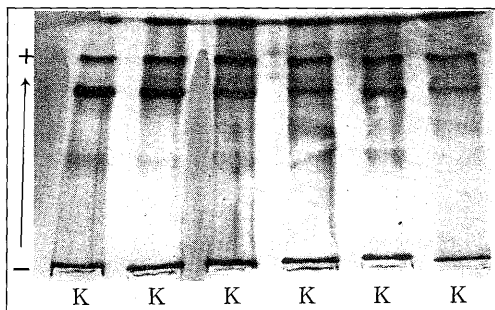


図8. *Anopheles koreicus* の LAP ザイモグラム  
(岩手県岩泉産)

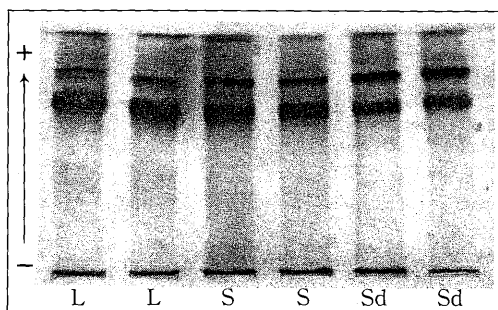


図6. *Anopheles* 3種の同一ゲル板における  
LAP ザイモグラム  
*lesteri* (秋田県大内産), *sinesis. sine-*  
*roides* (岩手県岩泉産)

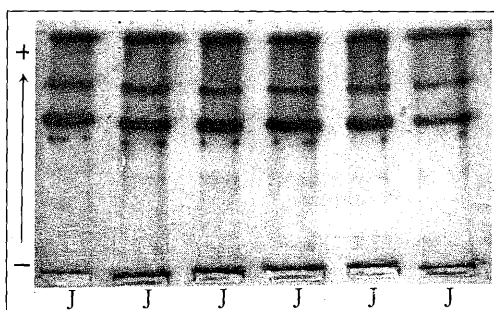


図9. *Anopheles lindesaii japonicus* の LAP  
ザイモグラム (新潟県弥彦産)

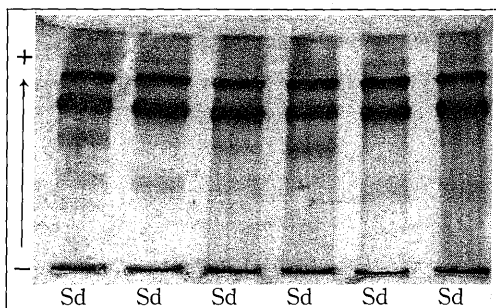


図7. *Anopheles sineroides* の LAP ザイモグ  
ラム (岩手県岩泉産)

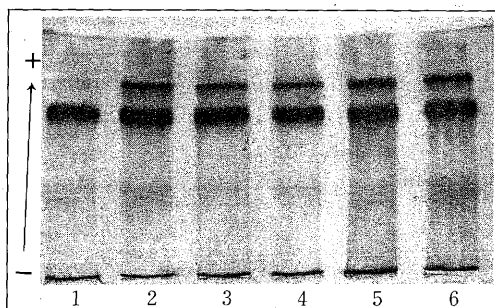


図10. *Anopheles lesteri* の LAP ザイモグラム  
1, 2 (北海道深川産)  
3, 4 (北海道剣淵産)  
5, 6 (秋田県大内産)



シナハマダラカ群とチョウセンハマダラカの幼虫期におけるアイソザイム・パターン

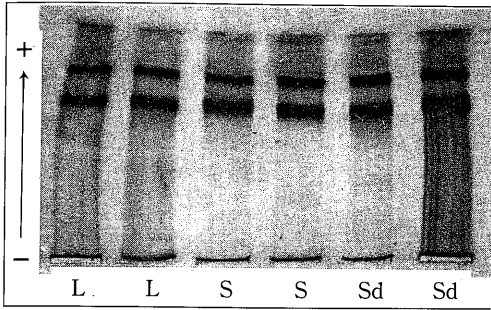


図11. *Anopheles* 3種のLAP ザイモグラム  
 L (*lesteri*, 秋田県大内産)  
 S (*sinensis*, 岩手県岩泉産)  
 Sd (*sineroides*, 岩手県岩泉産)

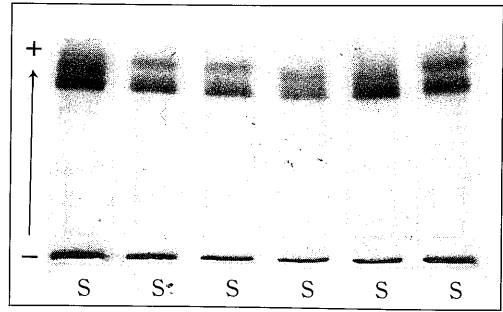


図14. *Anopheles sinensis* のEst ザイモグラム  
 (岩手県岩泉産)

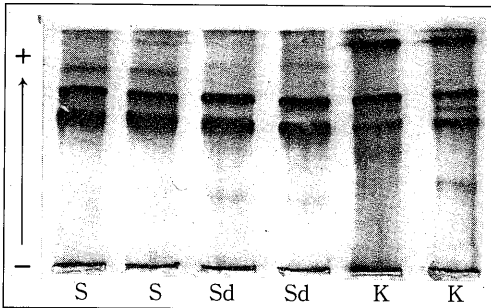


図12. *Anopheles* 3種のLAP ザイモグラム  
 S (*sinensis*), Sd (*sineroides*), K (*koreicus*)  
 岩手県岩泉産

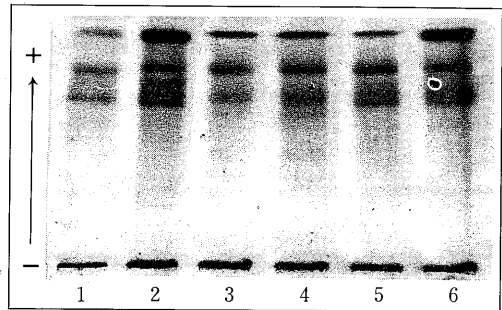


図15. *Anopheles lesteri* のEst ザイモグラム  
 1, 2 (北海道深川産)  
 3, 4 (北海道剣淵産)  
 5, 6 (秋田県大内産)

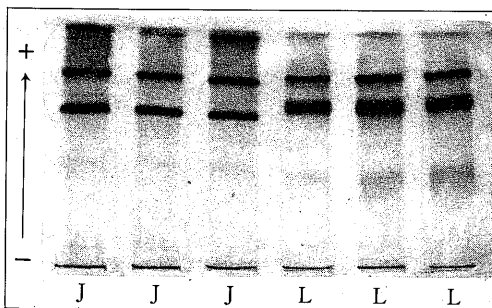


図13. *Anopheles* 2種のLAP ザイモグラム  
 J (*japonicus*, 新潟県弥彦産)  
 L (*lesteri*, 北海道剣淵産)

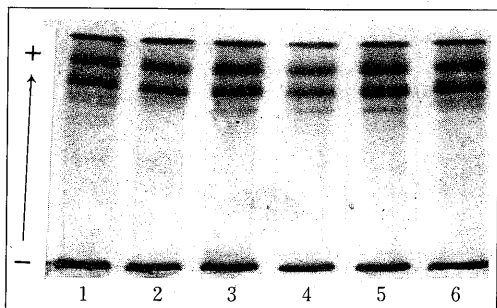


図16. *Anopheles sineroides* のEst ザイモグラム  
 (岩手県岩泉産)

## シナハマダラカ群とチョウセンハマダラカの幼虫期におけるアイソザイム・パターン

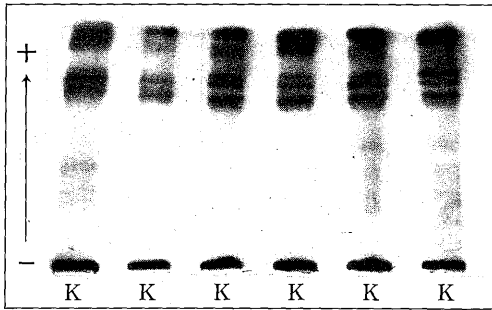


図17. *Anopheles koreicus* のEst ザイモグラム  
岩手県岩泉産

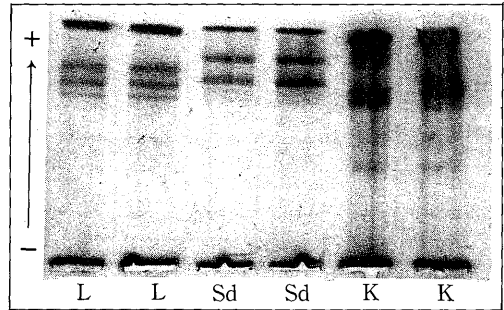


図20. *Anopheles* 3種のEst ザイモグラム  
L (*lesteri*, 秋田県大内産)  
Sd (*sineroides*, 岩手県岩泉産)  
K (*koreicus*, 岩手県岩泉産)

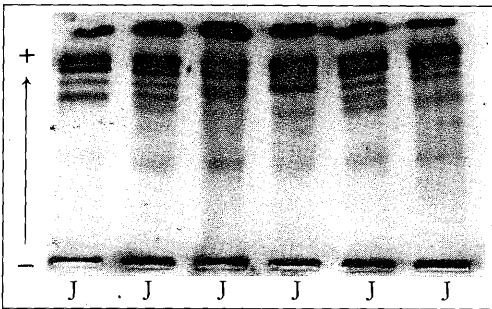


図18. *Anopheles lindesaii japonicus* のEst  
ザイモグラム  
新潟県弥彦産

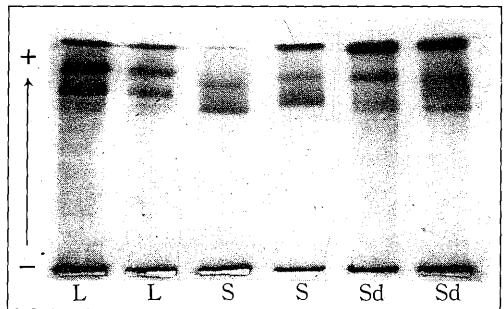


図21. *Anopheles* 3種のEst ザイモグラム  
L (*lesteri*, 秋田県大内産)  
S (*sinensis*, 岩手県岩泉産)  
Sd (*sineroides*, 岩手県岩泉産)

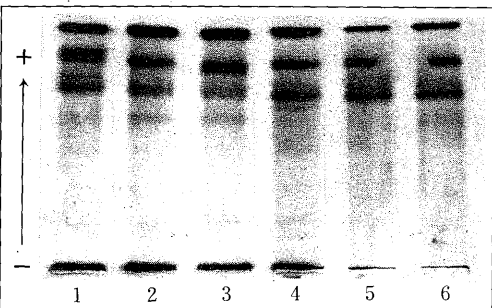


図19. *Anopheles lesteri* のEst ザイモグラム  
1～3, (秋田県大内産)  
4～6, (北海道深川産)

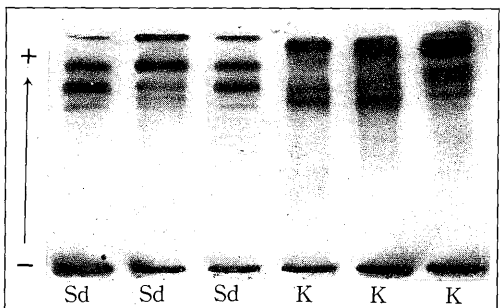


図22. *Anopheles* 2種のEst ザイモグラム  
Sd (*sineroides*, 岩手県岩泉産)  
K (*koreicus*, 岩手県岩泉産)