

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14896

研究課題名(和文) 線虫はいかにして宿主を見つけ出すか 光遺伝学的手法を用いた神経-行動相関の解明

研究課題名(英文) How does the nematode find its host? -Optogenetics-based approach to the nervous-behavior system

研究代表者

竹内 祐子 (Takeuchi-Kaneko, Yuko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80452283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌食性線虫 *Caenorhabditis japonica* とベニツチカメムシの間にみられる種特異的随伴関係が情報伝達物質を介したケミカルコミュニケーションに基づく宿主認識に起因すると仮定し、そのメカニズム解明を目指した。

選好性試験の結果から、本線虫は宿主虫体表面のヘキサン抽出物に含まれる物質を宿主認識に利用していることが明らかになり、GC-MS分析により、その候補物質を絞り込んだ。また、本線虫はモデル生物 *C. elegans* の誘引物質である benzaldehyde に対しても強い誘引行動を示し、類似した神経回路を有し利用している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An entomophilic nematode *Caenorhabditis japonica* has a species-specific relationship with its carrier bug *Parastrachia japonensis*. We hypothesized that this relationship is based on a chemical communication via semiochemical and conducted several experiments to clarify the mechanism in detail.

Results obtained in preference tests showed that *C. japonica* uses semiochemical(s) contained in hexane extract of the host insect for host recognition, of which list has been narrowed by GC-MS analysis. Also, *C. japonica* was strongly attracted to benzaldehyde, which is known as one of the attractants for *C. elegans*. This suggests that *C. japonica* may equip and utilize a neural network similar to that of *C. elegans*.

研究分野：植物病原線虫をはじめとする線虫を用いた遺伝学的研究

キーワード：化学生態学 昆虫便乗性線虫 ベニツチカメムシ ジャンプ行動

1. 研究開始当初の背景

細菌食性線虫 *Caenorhabditis japonica* は亜社会性昆虫ベニツチカメムシ (*Parastrachia japonensis*, 以下ベニツチ) にのみ特異的に随伴した生活史をもつ昆虫便乗性線虫であり、1年の大半は耐久型幼虫 (摂食の必要がない発育休止ステージ; Dauer Larvae (DL)) が宿主昆虫の翅下や体節間に付着して過ごすことで、外環境からの保護と移動を享受している。宿主昆虫の営巣シーズンになると離脱して土壤中で増殖し、宿主昆虫の次世代誕生に伴い再び便乗する。この二者における便乗関係は極めて種特異性が高く、自然環境で同所的に生息するツチカメムシ等の他種昆虫には便乗しない。宿主選択には体サイズ等の物理的要因でなく化学的要因がキーになっており、なかでも気相に放出される揮発性シグナルではなく宿主体表成分のヘキササン抽出物中に誘引源が存在する可能性が高い (研究協力者業績, Okumura & Yoshiga 2013, J. Exp. Biol.)。しかし、研究開始時点において誘引物質は特定されておらず、その受容神経-探索行動を結ぶメカニズムについても詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上記のような背景から、*C. japonica* - ベニツチ間にみられる種特異的便乗関係が情報伝達物質を介したケミカルコミュニケーションに基づく宿主認識に起因するものであると仮定した。線虫がいかにして宿主昆虫を認識し、便乗関係を成立させているのかという問いに対して、化学・行動生態学・分子生物学を組み合わせた多面的アプローチにより迫ることで、線虫における昆虫便乗性を総合的に理解することを目指して実験を行った。

3. 研究の方法

(1) *C. japonica* における化学物質を介したベニツチ選好性の確認

C. japonica が便乗対象である宿主昆虫ベニツチを認識する際に利用しているベニツチ特異的な化学シグナルを特定する予備段階として、ベニツチの成長ステージによる誘引性の違いを検証した。*C. japonica* 耐久型幼虫 (DL) はベニツチの成長ステージ、性比に関わらず宿主と認識して行動選択を行うが、実際の自然条件下では、便乗行動を行う際の DL の選択肢は子育て中のベニツチ雌親とその子供たちである幼虫の二択である。そこで、抱卵中のベニツチ雌親を準備し、幼虫の孵化・成長を待って、DL にベニツチの雌成虫と幼虫を選択させる選好試験を行った。同一シャーレ内で NGM 培地上にベニツチの雌成虫 1 頭と幼虫 20 頭を導入して逃避しないように固定し、両者の中間点に *C. japonica* の DL 約 1,000 頭を接種した後、24 時間後に両者に便乗した頭数を計測した。

また、両者の体表面のヘキササン抽出物を用

いて選好試験を行った。50 頭の DL を接種してベニツチ雌成虫及び幼虫のヘキササン抽出物に対する走性を確認するとともに、定着後の分散抑制効果の有無を試験した。

(2) ベニツチ体表物質の化学分析

自然条件下で *C. japonica* の便乗行動が生じる 6 月に産卵保護中のベニツチ母親虫と卵塊を採取し、飼育後に母親虫 (=雌成虫) と幼虫各々より得た体表ヘキササン抽出物を GC-MS 分析に供し、結果を比較した。

(3) *C. japonica* 誘引源の探索

ベニツチ特異的候補物質のスクリーニング

実験 (2) で特定されたベニツチ特異的候補物質が *C. japonica* における宿主認識のキューとして作用するか否か明らかにするために、線虫の化学走性を試験するバイオアッセイを行った。バイオアッセイには、ベニツチのヘキササン抽出物の GC-MS 分析で同定された 4 種のベニツチ特異的物質にベニツチ幼虫特異的な benzophenone を加えた 5 種類の化合物を使用した。化学走性試験及び分散抑制試験はいずれも 6 cm シャーレ内の NGM 培地上で行い、前者は対象物質とコントロール物質の中間点に、後者は対象物質上に直接線虫 DL を接種してその後の線虫の移動経過を観察することで行った。対象物質 5 種の 0.01、0.1、1、10 $\mu\text{l/ml}$ ヘキササン希釈液、種特異的物質 4 種の混合溶液 (ベニツチのヘキササン抽出物中での各物質の濃度比に合わせて調整; (E)-2-hexenal: (E)-2-octenal: octadecane: octylphthalate = 4.3:3.7:0.7:18.2)、ベニツチのヘキササン抽出物、そしてコントロールとしてヘキササンを 9 μl 培地上に添加し、約 30 頭の線虫 DL を接種した後 10 分おきに計 1 時間線虫数の変動を追跡調査した。

C. elegans 誘引物質のスクリーニング

誘引物質が特定された場合にどの感覚神経が応答しているかを解明するために、化学神経応答機構が既に明らかになっている同属のモデル生物 *Caenorhabditis elegans* の誘引物質に対する *C. japonica* の化学走性を試験することで、両種の類似性を調査した。*C. elegans* に対する代表的な誘引物質である benzaldehyde、diacetyl、isoamylalcohol を 100% ethanol でそれぞれ 1/800、1/4000、1/400 に希釈したものを、9 cm NGM プレートの中心から約 4 cm の 1 か所に 4 μl 添加し、そのスポットから対角線上に対照区としてエタノールを添加した。*C. japonica* はドッグフード培地で培養した DL より白金線ピッカーで回収して得たニクテイション中の個体を、コントロールの *C. elegans* (N2 系統) は大腸菌を撤いた NGM 培地上で生育した well-fed adults をそれぞれ使用した。両線虫をプレートの中心に置き、30 分間自由に行動させた後、プレートの蓋にクロロホルムを約 0.4 ml 滴下し、

培地を逆に乗せて線虫を殺し計数を行った。誘引効果はCI値 [Chemoattraction Index = (誘引物質上の頭数 - 対照区の頭数) / 全接種頭数] に加えて、区画を細分化することで正確な分散位置を評価した。

(4) ジャンプ行動

C. japonica が宿主であるベニツチを探索する際、体を持ち上げるニクテイション行動が観察される。この行動は宿主との接触面積を増加させたり、周辺環境を確認しやすくするなど重要な役割を担う。本線虫は特に運動活性が高く、顕微鏡下でニクテイション行動からのジャンプ行動が観察されたため、ハイスピードカメラ (FASTCAM Mini AX200 Type, Photron) による詳細な解析を行った。*C. japonica* はドッグフード培地で培養した DL 個体を供した。

4. 研究成果

(1) *C. japonica* における化学物質を介したベニツチ選好性の確認

C. japonica の DL におけるベニツチの雌成虫及び幼虫に対する便乗行動を試験した結果、やや幼虫に対する選好性が認められたものの統計的に有意ではなく、親子いずれにも誘引され便乗することが確認された。また、両者の体表を洗浄して得たヘキササン抽出物に対する行動試験では、DL は自然条件下でより宿主に適したベニツチ幼虫からのヘキササン抽出物により強く誘引され (図 1)、より長く留まる (=分散しない) ことが明らかになった。

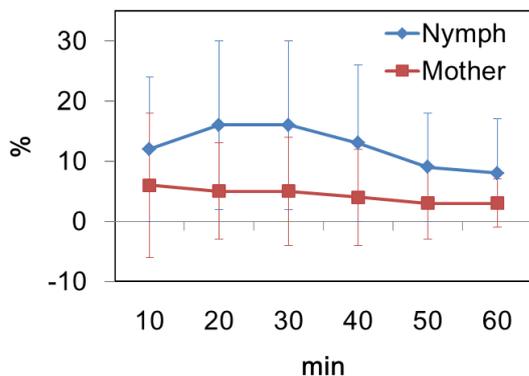


図 1. ベニツチの雌成虫と幼虫のヘキササン抽出物を用いた選好性試験。*C. japonica* の耐久型幼虫は、ベニツチ幼虫のヘキササン抽出物により強く誘引された。

(2) ベニツチ体表物質の化学分析

線虫の便乗活性に違いがみられるベニツチの幼虫と雌成虫について、体表成分のヘキササン抽出物を GC-MS にて分析し、両者の化学組成を比較した。その結果、長鎖の脂肪酸やアルデヒドに特徴的な物質が複数検出され、octadecane、(E)-2-hexenal、(E)-2-octenal、Di-n-octylphthalate の 4 種についてはベニツチ特異的な物質であった。また、DL の便乗対象として好適な幼虫においてのみ検出され

る物質も複数認められた (benzophenone、hexadecanoic acid、9-octadecenoic acid、octadecanoic acid、10,12-octadecadiynoic acid、octadecanal)。

(3) *C. japonica* 誘引源の探索

ベニツチ特異的候補物質のスクリーニング

ベニツチ種特異的及びベニツチ幼虫特異的な候補物質を対象に *C. japonica* 誘引活性をもつ物質を探索するバイオアッセイを行った結果、1 μ l/ml (E)-2-hexenal や 1 μ l/ml octadecane などいくつかの物質において弱誘引活性の認められる濃度が存在しており、*C. japonica* が宿主特異的物質として認識している可能性が示唆されたが、いずれもベニツチのヘキササン抽出物そのものにおける誘引活性には届かず、単独で明確な誘引活性を示す物質はなかった (図 2)。また、ベニツチのヘキササン抽出物内の成分比を反映した混合物についても、いずれの濃度においても明確な誘引活性は認められなかった。

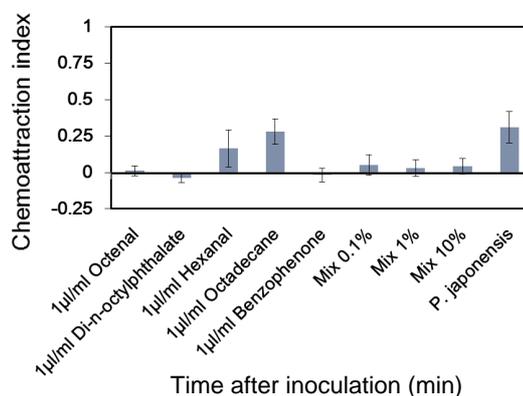


図 2. ベニツチ特異的誘引源を探索するバイオアッセイ。濃度 1 μ l/ml、接種 60 分後の結果を示す。(E)-2-hexenal と octadecane に弱い誘引活性が認められた。

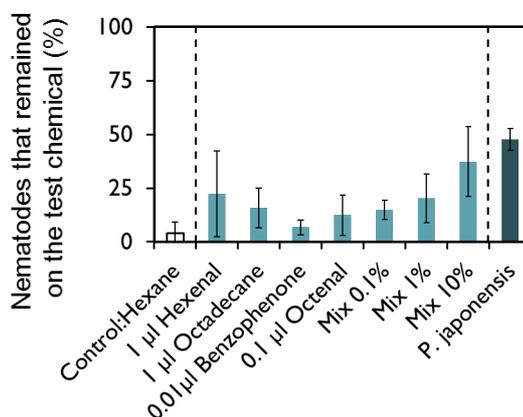


図 3. ベニツチ特異的物質の線虫に対する分散抑制効果。濃度 1 μ l/ml、接種 60 分後の結果を示す。ベニツチ特異的な候補物質 4 種の混合溶液上に多数の *C. japonica* 耐久型幼虫が留まったが、単独で有意な分散抑制効果を示す物質は認められなかった。

分散抑制効果については、候補物質の混合溶液において多数の線虫の残留が認められたが、単独で明確な効果を示す物質は確認できなかった (図 3)。

C. elegans 誘引物質のスクリーニング

同属近縁種 *C. elegans* の誘引物質 3 種に対する *C. japonica* の化学走性試験を行ったところ、benzaldehyde において有意な誘引行動が観察され (図 4)、他の 2 物質についても統計的に有意ではないものの軽度の誘引効果が認められた。このことから、*C. japonica* も *C. elegans* と同様に benzaldehyde を受容する AWC 神経を介した類似の神経回路を有し、利用している可能性が示唆された。

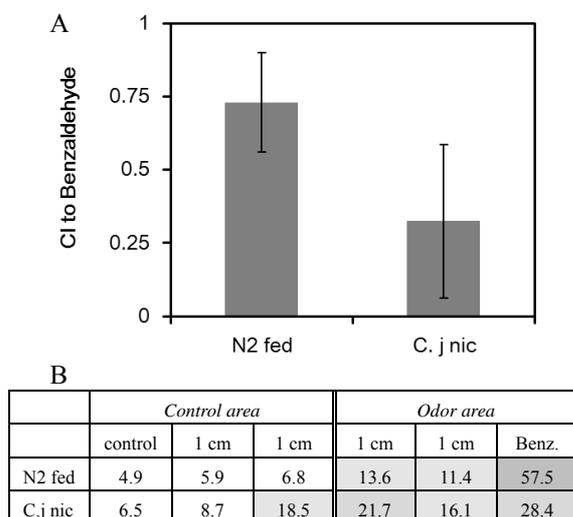


図 4. Benzaldehyde に対する *C. elegans* (N2) 及び *C. japonica* 耐久型幼虫の誘引活性。A は CI 値、B は分散後の各区画における線虫の割合 (%) を示す。両線虫種とも強い誘引反応を示した。

また、光遺伝学を応用した本線虫変異体作出に先立ち、本線虫種における遺伝子導入操作プロトコルの確立を試みた。実験開始当初、*C. elegans* の配列情報をそのまま本線虫への遺伝子導入に応用していたが、予想と異なる箇所に蛍光が観察され続けたことから、現在は別の *C. elegans* 用プライマーや新たに設計した *C. japonica* 特異的プライマーを用いてベクター構築～遺伝子導入を試みている。

(4) ジャンプ行動

ハイスピードカメラを用いた詳細な観察の結果 (10,000 fps)、これまで報告されていた線虫ジャンプ時の体の使い方とは異なり、*C. japonica* にはループ状の姿勢をとらない複数のジャンプパターンが存在することが確認された。昆虫便乗性線虫におけるジャンプ行動の報告は本研究が最初となる。

上記以外の副次的成果としては、ベニツチ試料採集の際に採集されたベニツチ生息環境及び周囲の土壌節足動物から線虫分離を

行い、ベニツチ便乗線虫種相を明らかにした。その結果、線虫による便乗開始時にはベニツチ便乗線虫種相は複数種で構成されているものの、時間の経過と共に *C. japonica* 以外の線虫種が死亡していき、最終的には *C. japonica* 一種のみとなることが確認された。また、この過程で、土壌、植物遺体を主要な生息場所とする多数の *Caenorhabditis* 属線虫株を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4 件)

奥村 悦子・竹内 祐子・杉 琢磨. 昆虫嗜好性線虫 *Caenorhabditis japonica* の宿主探索行動における新型ジャンプ行動の発見. 日本線虫学会第 24 回大会, 2016 年 9 月 14 日, 東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

Etsuko Okumura, Yuko Takeuchi-Kaneko, Takuma Sugi. Discovery of a new jumping behaviour for host-finding of an entomophilic nematode *Caenorhabditis japonica*. European Society of Nematologists 32nd Symposium, 2016 年 8 月 30 日, プラガ (ポルトガル)

奥村 悦子・竹内 祐子・杉 拓磨. *C. elegans* 誘引物質に対する *C. japonica* の誘引反応. 日本線虫学会第 23 回大会, 2015 年 9 月 2 日, 中部大学三浦記念会館 (愛知県名古屋)

Etsuko Okumura, Rika Ozawa, Yuko Takeuchi. Behaviors to fatty acid derived from the host bug in *Caenorhabditis japonica*. Society of Nematologists Fifty-fourth Annual Meeting, 2015 年 7 月 21 日, イーストランニング (アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 祐子 (TAKEUCHI-KANEKO, Yuko)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 80452283

(2) 研究分担者

杉 拓磨 (SUGI, Takuma)
滋賀医科大学・神経難病研究センター・特任准教授
研究者番号: 70571305

神崎 菜摘 (KANZAKI, Natsumi)
国立研究開発法人 森林総合研究所・主任研究員
研究者番号: 70435585

小澤 理香 (OZAWA, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員
研究者番号： 90597725

(3) 連携研究者

竹内 綾子 (TAKEUCHI, Ayako)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号： 00378704

(4) 研究協力者

奥村 悦子 (OKUMURA, Etsuko)
京都大学・大学院農学研究科・研究員