

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658051

研究課題名(和文)新規線虫病原体の探索

研究課題名(英文) Search for the novel nematode pathogens

研究代表者

吉賀 豊司 (Yoshiga, Toyoshi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：00312231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：線虫に感染するウイルスを中心に、新規線虫病原体を検出するシステムを構築し、それらの単離・同定を行うことを目的として研究を行った。無菌培養した*C. elegans*をベイトとして病原体の検出を試みたところ、尾部や陰門の形態的な変化を伴う線虫を検出できたが、病原体による形態的変異であるとは断定できなかった。一方、長鎖二本鎖RNAに注目して線虫のスクリーニングを行った結果、合計で3種類の線虫から長鎖二本鎖RNAを検出し、これらは新規線虫ウイルスである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Survey of novel pathogens and parasites against nematodes were conducted using different approaches. Using *C. elegans* strains as a bait, nematode pathogens were screened. Some nematodes with morphological abnormal at the posterior part or vulva were seen but they seems not to be infected pathogens. On the other hands, different species and isolates of nematodes were screened using long chain double-stranded RNA (dsRNA) as a marker, and long chain dsRNA were detected from 3 nematode isolates, which suggests the possibility of discovery of novel types of nematode viruses.

研究分野：線虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：線虫 ウイルス 病理 病原体

1. 研究開始当初の背景

モデル生物である線虫 *C. elegans* において発見され、2006 年のノーベル医学・生理学賞受賞につながった RNA 干渉は広く生物界に見られる現象で、ウイルス感染に対する生物の防御システムの一つである。このようなシステムを線虫が維持していることから線虫に感染するウイルスの存在は予想されるものの、現在まで線虫の透過電子顕微鏡像においてウイルス粒子らしき構造物の報告は存在するが、実際に線虫ウイルスを単離・同定したという報告は、研究を開始した当初にはなく、線虫のウイルス感染に関する論文としては、動物ウイルス *Flock house virus* や *vaccinia virus*, *vesicular stomatitis virus* を人為的に感染させた *C. elegans* でウイルスの複製が確認されたという報告のみであった。

ウイルスは、細菌、アメーバ、カビなどの微生物から昆虫、植物からほ乳類に至るまで様々な生物から見つかっているが、地球上に普遍的に存在し、動物の中で最も個体数が多く、また非常に多様である線虫からはまだ見つかっていなかった。

線虫は、線虫は地球上の様々な場所に生息し、個体数や種数においても地球上で最も繁栄する生物群の一つであり、多様で新規のウイルスが存在しても決して不思議ではない。このような線虫ウイルスの単離に成功できれば、ウイルスの分類、体系や進化のみならず生物学的にも非常に重要な研究となる。また応用的にも、動物寄生性や植物寄生性線虫特異的なウイルスを探索することによってこれらの防除などにつかえる可能性があるほか、農学だけでなくさまざまな分野への波及効果も大きいと考えられる。

本研究を開始した直後の 2011 年に細菌食性の *Caenorhabditis* 属の 2 種の線虫から線虫ウイルスが発見され、次いで植物寄生性線虫のダイズシストセンチュウのゲノムからウイルス様の配列があることが明らかとなり、実際に線虫ウイルスの存在が証明された。

2. 研究の目的

本研究では、ほとんど研究の進んでいない線虫ウイルスやその他の新規の線虫病原体の種類やそれらの病原微生物と線虫との相互作用を明らかにするとともに、ウイルスを用いた寄生性線虫の防除や線虫の機能開発のための基礎的知見を得るための最初のステップとして、線虫ウイルスを中心とする新規線虫病原体を検出する複数のシステムを構築することを目指した。また、その方法によって得られた病原体の同定および線虫に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

線虫ウイルスおよび新規病原体を検出するために、本研究では主に 3 つの方法を新たに考案し、それらを用いて新規線虫病原体の探索を行った。

(1) 線虫の形態、行動、生存、増殖に基づく検出

無脊椎動物では、特に昆虫ウイルスにおいて研究が進んでいるが、それらは飼育中の昆虫の死亡や異常から見つかったことが多い。そのため、野外から分離した線虫を培養し、形態、行動、生存、増殖に基づいて DNA ウイルスや RNA ウイルスの探索を中心に、行い新たな病原微生物の検出を試みた。実際には、以下の手順でスクリーニングを行った。

土壌中からベールマン法によって分離した線虫のうちの 1 種類の線虫を寒天培地上に移し、線虫を培養した。

線虫の生育や状態を観察し、異常個体を検出した。

線虫の増殖や生育に異常が見られれば、それを集め、病徴などをもとに他個体への感染性を明らかにするとともに、病原体の特定を行った。このスクリーニングによって、ウイルスの他、細菌、微胞子虫、菌類、などの検出が期待された。

(2) ベイト法によるウイルスの検出

野外から分離した線虫の破砕液に接触させ、感染させる方法を考案し、検出を試みた。

非無菌ベイト法

特定の線虫を餌（ベイト）として病原体を探索する方法として考案したものである。破砕によって線虫に感染していると思われる微生物を細胞内から放出させ、そこにベイトとなる線虫を添加することによって、微生物を線虫への感染を試みた。ベイト線虫として、後々の解析のしやすさや培養のしやすさを考え、モデル生物である *C. elegans* を用いた。特に、感受性の高い系統として、RNA 干渉の効かない変異体である *rde-1* 変異体を用いた。

無菌ベイト法

非無菌状態では他の微生物の混入も予想され、また、細菌食性線虫の餌として用いる大腸菌の影響も予想される。特にウイルスに絞ってより繊細な条件下で検出を行うために、線虫の無菌培養系を確立し、無菌で培養したベイト線虫に野外から分離した線虫の破砕液上清のフィルターろ過液を添加し、病原体を検出する方法を考案した。

野外から分離した線虫を破砕し、その遠心上清を 0.22 μm 滅菌フィルターに通し、ろ液を無菌のベイト線虫懸濁液に添加した。無菌線虫として *C. elegans* N2 系統を用いた。卵の表面殺菌によって得られた無菌の *C. elegans* 孵化幼虫を、大豆ペプトン 4 %、酵母抽出物 3 %、肝臓の加熱抽出物を 10 % の割

合で含む無菌液体培地 (Cryan et al., 1963) に加えて、線虫の無菌培養を行った。なお、*C. elegans* N2 系統は、様々な研究からもウイルス等の感染がないことが明らかになっている。培養している線虫の様子の変化を観察し、変化が見られれば、その病徴について確認するとともに感染性の再現と原因因子の解析を行った。また、病徴が現れないことも考えられるため、無菌培養液上清および無菌培養した線虫についても、核酸を抽出し、電気泳動によって無処理では見られない核酸の有無の有無を調査した。

(3)長鎖 dsRNA を指標とした線虫のスクリーニング

3 つ目は、RNA ウイルスにターゲットを絞り、細胞内で複製する際に生じる dsRNA に注目して長鎖 dsRNA を指標とするものである。生物の生体内には、通常、長鎖 dsRNA は存在せず、それが存在することはウイルス感染している可能性が高い。そこで、生物内に見られる長鎖 dsRNA に注目してスクリーニングを行うものである。研究室で維持している多くの線虫の系統においてもウイルス感染している可能性があるため、まずはこれらの線虫を大量増殖し、dsRNA の検出を試みるとともに、RDV 法に供してウイルスの検出を試みた。大量培養法は、線虫の種類によって異なるため、通常の培養方法を用いて、それをスケールアップすることによって行った。電気泳動によって核酸の分析ができる程度に大量培養にした線虫から、フェノール/クロロホルム法によって全核酸を抽出し、エタノール沈殿によって核酸を集め、DNase I および S1 nuclease 処理によって DNA および一本鎖 RNA を分解し、dsRNA を調整し、電気泳動によって dsRNA の有無を確認した。dsRNA が検出された場合、新興ウイルス検出の有効手段である Rapid Determination System of Viral RNA Sequences (RDV 法) などのランダムプライマーを用いた PCR によって増幅させた後、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定し、データベースの相同性検索によってウイルスの有無の検出を試みた。また、dsRNA の逆転写を行った後、GenomiPhi V2 によって DNA 増幅をし、次世代シーケンサーによる解析についても試みた。

4. 研究成果

(1) 線虫の形態、行動、生存、増殖に基づく検出

土壌中から分離した線虫を寒天プレート上で培養し、形態、行動、生存、増殖を観察することによって異常を示す個体の探索を行ったところ、これまでのところ病原体によると思われる明らかな異常を示す線虫は見つからなかった。増殖の早い細菌食性線虫な

のでは、異常な個体が出現したとしてもなかなか見つけにくく、また、感染していても見かけ上は健全な個体が増殖し、気がつきにくいことが考えられる。また、増殖が遅い個体群などが見られたが、微小形態的な差異や異常を見つけて出すことができない場合が多く、その原因が、遺伝的な変異によるものなのか、または微生物による感染であるという明らかな証拠を得ることができなかった。異常と思われるものを見つけた場合の、その原因を特定する方法が必要である。

(2) ベイト法によるウイルスの検出

ベイト法によってウイルスをはじめとする病原体の検出を試みた。

非無菌ベイト法

C. elegans をベイトに探索を行った結果、線虫の増殖が抑制されるプレートが見つかり、それは、プレート上に形成された黄色いコロニーの色などから細菌によるものと判断された。その細菌の同定までは現在至っていないが、本方法は、新規病原体の探索方法として有効であると思われる。スクリーニング数を増やしていくことやベイトに用いる線虫種を変えることで、さらに新たな病原体を得られると思われる。

無菌ベイト法

無菌培養した *C. elegans* の野生株や RNA 干渉が効かないためにウイルスに感染しやすく、ウイルス感染によって病徴が出やすいと思われる *rde-1* 系統をベイトとして病原体の検出を試みた。その結果、尾部や陰門の形態異常が見られた個体を得られた。ウイルスをはじめとする微生物感染の有無を確認するため、線虫培養上清や培養線虫から核酸を抽出し、電気泳動を行い、無処理の対象区とのバンドパターンの比較を行ったが、明確な違いは見られなかった。また、その後の再検討の結果、これらの異常は無菌培養の際に引き起こされた生理的要因による可能性が高いと思われる。しかし、病徴が弱い微生物感染の場合には生理状態が悪い場合に病徴が現れることも考えられるので、微生物感染を完全に否定することはできず、今後、感染の有無についてのさらなる明確な指標が必要と考えられた。今後、さらに改良を加えることで、細菌食性や無菌培養が可能な線虫種を用いて新規病原体を探索する方法として、利用できる方法だと思われる。また、異なるサンプルやサンプル数を増やし、さらにこのスクリーニングを継続することによって、新たな病原体が得られる可能性があると思われる。

(3)長鎖 dsRNA を指標とした線虫のスクリーニング

生物の生体内には、通常、長鎖 dsRNA は存在しないことから長鎖 dsRNA に注目してスク

リーニングを行った。分析可能な量の核酸を抽出するために大量培養が比較的しやすい線虫種で、植物寄生性、菌食性、細菌食性、昆虫病原性等、異なる線虫種や食性を持つ線虫を計 15 種 23 分離株用いて実験を行った結果、昆虫病原性線虫 *Heterorhabditis megidis* の 1 分離株、スセンチウ 1 分離株、イモグサレセンチウ 1 分離株の計 3 種 3 分離株の線虫からそれぞれの系統に特異的な長鎖 dsRNA を検出した。検出された dsRNA のサイズは、約 6kbp または約 13kbp であった。そのうちのスセンチウから得られた dsRNA は他の線虫から得られたバンドに比べて明確で、量的にも多かったため（図 1）、まずはスセンチウの dsRNA に絞って研究を進めた。塩基配列の決定を行うために抽出液から dsRNA を精製し、新興ウイルスの検出法である Rapid Determination System of Viral RNA Sequences (RDV 法) によって遺伝子の増幅を試みたが増幅後のバンドがスメアとなり、塩基配列のためにダイレクトシーケンスに供試することはできなかった。そのため、単離した dsRNA の逆転写を行った後、GenomiPhi V2 によって DNA 増幅をし、次世代シーケンサーによる解析についても試みたが、塩基配列を決定することができなかった。この理由として、実験に供した dsRNA の量が少ない、または、dsRNA の純度が低かったことが考えられた。線虫は体サイズが小さく、解析に用いるために必要な量の線虫を得ることが難しく、時間がかかるため、より大量に核酸を得るために線虫の大量培養法の確立が今後の研究を進めていくために不可欠である。また、今回塩基配列決定に供した線虫以外の 2 種類についても、安定した解析が行えるような dsRNA 量を得られるように、継続して線虫の大量培養を行っていき、さらに研究を進めていく必要がある。また、検出された dsRNA が線虫に及ぼす影響について明らかにするため、同種の他系統を手に入れ、増殖特性をはじめとした系統間の比較が必要である。

昆虫病原性線虫 *H. megidis* では、実験に用いた同種の 5 系統のうち 1 系統でのみ長鎖 dsRNA バンドが検出された（図 2）さらに研究を進めるために大量培養を試みてきたが、感染後に線虫が死にやすいなど、他の昆虫病原性線虫に比べて弱いという特徴が分かり、この系統の性質と検出された長鎖 dsRNA と関連がある可能性も示唆された。今後は、大量培養系の確立とともに、dsRNA が検出されていない同種他系統との交配実験や感染実験などを行い、線虫への影響を明らかにしていく必要がある。

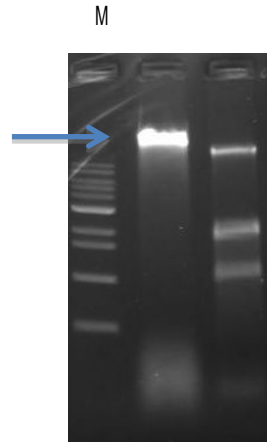


図 1 . 1 % アガロース電気泳動による、スセンチウから検出された長鎖 dsRNA のバンドの泳動像。スセンチウから抽出した全核酸を DNaseI/S1 Nuclease 処理したもの（ ）と未処理のもの（ ）。矢印は検出された約 13kbp の dsRNA を示す。dsRNA は量的に少ないため、 に用いた核酸の 10 倍以上の量を に供している。M は DNA マーカーを示す。

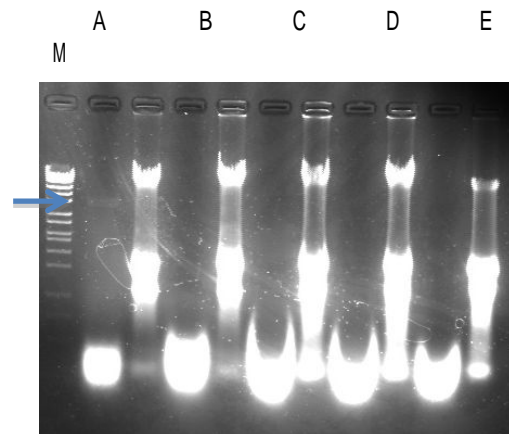


図 2 . 1 % アガロース電気泳動による *Heterorhabditis megidis* 分離株間での dsRNA バンドの比較。全核酸を DNaseI/S1 Nuclease 処理したもの（ ）と未処理のもの（ ）。矢印は検出された約 6kbp の dsRNA を示す。dsRNA は量的に少ないため、 に用いた核酸の 10 倍以上の量を に供している。M は DNA マーカーを示す。

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）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉賀 豊司 (Yoshiga, Toyoshi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号 : 00312231