

昆虫病原性線虫 *Steinernema carpocapsae* の昆虫培養細胞を用いた新規培養システムの開発と Recovery に関する研究

2008年3月修了

Key word entomopathogenic nematode,
recovery, life cycle

66518 資源生物制御学分野 菊田真吾
指導教員 永田昌男

<背景>

昆虫病原性線虫は害虫防除を目的とした生物防除資材の一つとして考えられている。線虫は通常、腸内に共生細菌を持ち、*Steinernema* 属は *Xenorhabdus* 菌との共生関係が知られている。線虫が昆虫に侵入すると共生細菌は放出され毒素を産生し、昆虫を致死させる。成長型ステージで線虫は、寄主の栄養分を摂取し、昆虫体内でライフサイクルを繰り返す。しかし、生育環境が悪化すると、成虫への成長を停止し、昆虫体外で生存できる唯一のステージである耐久型感染態幼虫 (Infective juvenile, IJ) が出現する。この IJ は野外を徘徊し、次の寄主をみつけると再び、寄生する。IJ は寄主に侵入すると、耐久型から成長型ステージへと生理的、形態的变化を引き起こす。この過程は Recovery と呼ばれる。

て30日間培養したところ、培養開始から、10日間で、細胞が枯渇して線虫数はプラトーに達した。その後、時間経過とともに IJ になる個体数は高まり 30日後には全線虫のうち、70.6%が IJ となった。すなわち、生育環境の悪化によって IJ への成長が誘導されたと考えられた。

昆虫から採取した IJ を本培養系に接種すると、48時間で96.6%の Recovery がみられた(図2B)。一方、培地のみ接種した IJ の Recovery は72時間を経過しても8.4%と低かったことから、Recovery には Sf9 細胞が必要であると推測された。

以上から、本培養系は *in vivo* での成長・発育を再現し、培養器を通しての観察が容易である点、栄養などの種々の条件を調節しやすい点から、線虫の生物学的知見を得るのに有用なツールとなると考えられた。

1. *S. carpocapsae* の昆虫培養細胞を用いた新規培養システムの開発

昆虫病原性線虫に関しては、線虫種の同定と地理的分布、害虫防除への応用面、人工培養による大量増殖に関する報告は多い。しかし、生物学的知見、特に成長・発生がどのように制御されているのかについては未知の部分が多い。そこで、これらの知見を得るために人工培養系での培養を試みた。しかしながら、既存の合成培地を用いた場合、線虫の成長遅延、発生不良、継代が困難という不具合が生じた。そこで、昆虫培養細胞を用いた線虫の新たな培養増殖系の確立を行った。

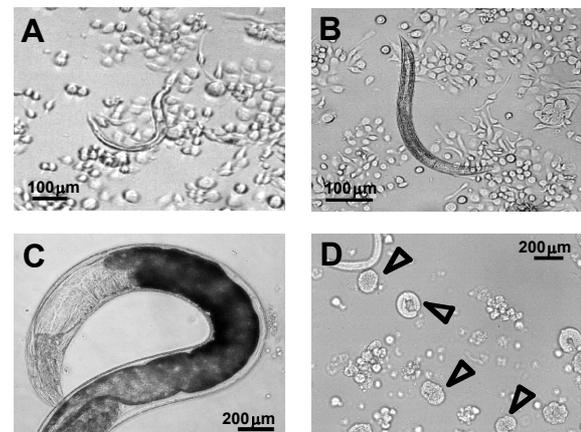


図1 培養プレートに接種された *S. carpocapsae*
A 孵化した1齢幼虫 (J1)、B 孵化後48時間 J3
C 孵化後96時間 雌成虫、D 孵化後120時間 卵(矢頭)

<結果と考察>

S. carpocapsae の卵をヨトウムシ由来の Sf9 細胞培養プレートに接種した(図1)。孵化した幼虫は細胞を摂食して脱皮、成長し、産卵した。なお、このシステムにおいて共生細菌は培地に添加した抗生物質で増殖が抑制された。ライフサイクルは生体とほぼ同じであり120時間で完了した。線虫は、次の細胞プレートに移すことで、継代が可能であり、1年以上、維持された。

本培養系において、IJ への成長が誘導されるかどうかを検討した(図2A)。線虫を継代せずに、続け

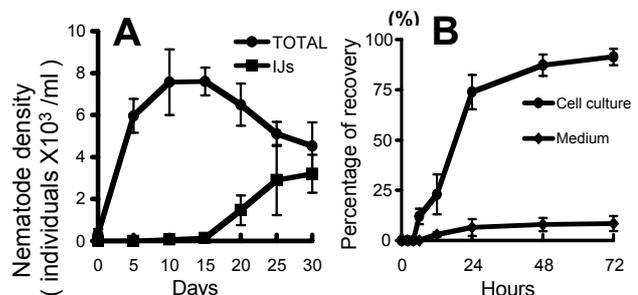


図2 昆虫培養細胞システムにおける IJ と Recovery
A 無処理での長期間培養
B 培養細胞下における IJ の Recovery

2. 昆虫培養細胞から分泌される Recovery 誘導因子について

本培養システムにおいて、高率の Recovery が観察されたことから、昆虫病原性線虫の Recovery 誘導因子(Recovery Inducing Factors, RIF)を想定し、探索した。

<結果と考察>

Recovery は細胞を培養した液で起き、死細胞では生じなかった。このことから、Recovery 誘導因子は細胞で産生され、培地に出てくると考えられた。IJ は 4 時間 RIF を含む培地で処理するだけで 50% の Recovery 率が得られた。

Sf9 細胞だけでなく、他の培養細胞においても Recovery がみられるかどうかを検討した。カイコ由来の BmN 細胞やキイロショウジョウバエ由来の S2 細胞においても IJ の Recovery がみられた。しかしながら、哺乳類由来の NIH3T3(マウス)、ヒトがん細胞由来 Hela 細胞においては、Recovery がみられなかった。このことから、RIF は昆虫細胞で産生されるが、哺乳類細胞では産生されないと考えられた。

RIF は熱に対して比較的安定性があり、5kDa

以下であった。ブタノール溶性画分を、C18 の逆相 HPLC で、アセトニトリル 0 ~ 5% のグラディエントを用いて分画すると、ほぼ単一の活性ピークを得ることができた(図 3)。

共生細菌なしの Axenic IJ を用いて調べると、Recovery は 8.3%しかみられなかった。この結果から、Recovery には共生細菌が関与している可能性が示された(図 4A)。次に、共生細菌を RIF と混合して培養し、その上清(Conditioned medium)に Axenic IJ を接種したところ、Recovery がみられた。このことから、IJ の Recovery を引き起こすには RIF 以外にも共生細菌が関与することが示された(図 4B)。

<まとめ>

昆虫細胞を用いた昆虫病原性線虫の培養系の開発に成功したことで、これまでほとんど知られていなかった Recovery の知見を得ることができた。また、Recovery 誘導因子の存在が認められ、共生細菌が Recovery に関与することが明らかになった。今後、Recovery が誘導されるメカニズムを解明していきたいと考えている。

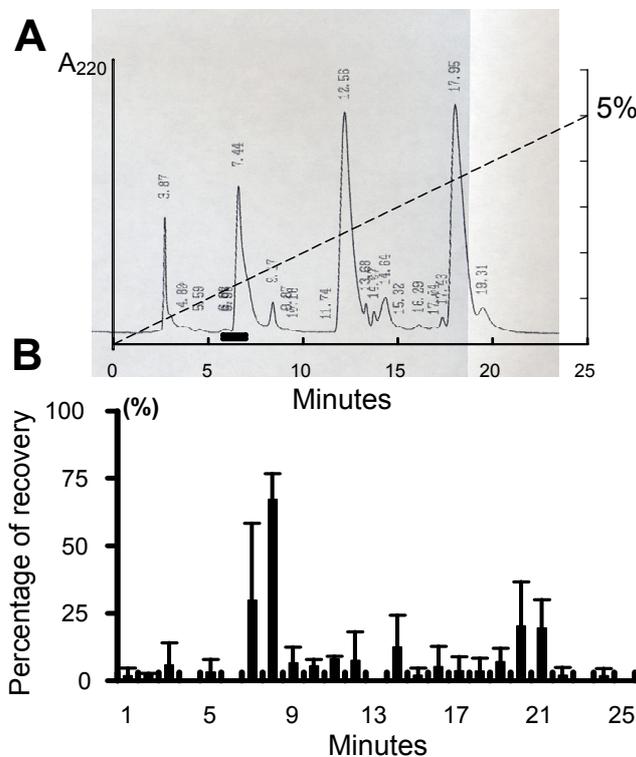


図3 RIFのHPLCによる単離
A クロマトグラフ Barに誘導活性
B 各分画のRecovery Assay

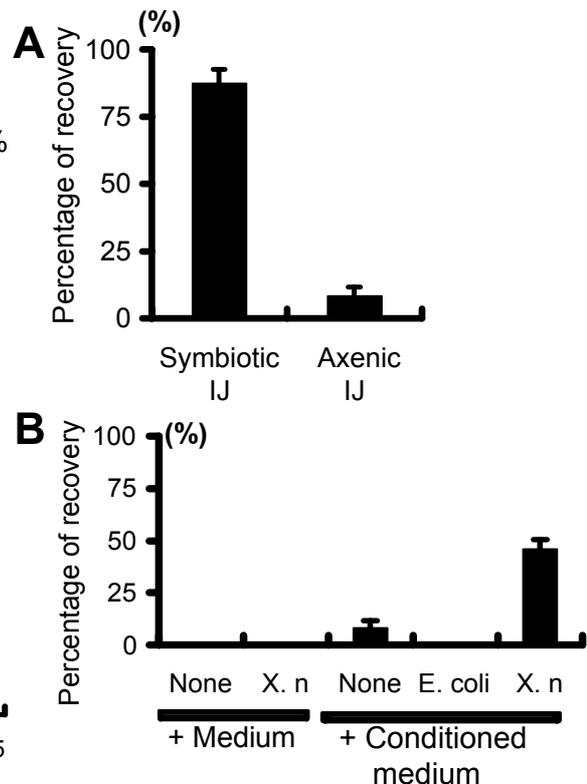


図4 共生細菌とRecoveryの関係
A Axenic IJのRecovery
B Recoveryにおける共生細菌の関与
X. n ; X. nematophila (共生細菌)
Medium ; IPL-41 培地