

修士論文

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

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

資源生物制御学分野

66518 菊田真吾

指導教員 永田昌男

2008 年 3 月

目次

| | |
|---------|---|
| Summary | 3 |
|---------|---|

第 1 章

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

| | |
|----------|----|
| 1. 緒言 | 5 |
| 2. 材料と方法 | 8 |
| 3. 結果 | 11 |
| 4. 考察 | 14 |
| 図表 | 17 |

第 2 章

昆虫病原性線虫 *Steinernema carpocapase* の Recovery 誘導因子

| | |
|----------|----|
| 1. 緒言 | 27 |
| 2. 材料と方法 | 29 |
| 3. 結果 | 32 |
| 4. 考察 | 35 |
| 図 | 38 |
| 参考文献 | 48 |
| 要約 | 53 |
| 謝辞 | 55 |

Summary

Development of a cultivation method for an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, using with cultivated insect cells and analysis of recovery inducing factor(s)

A new method for culturing an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, in cultured insect cells was devised. When *Steinernema* eggs were put into the established cell line Sf9, they grew, molted, developed to adults, and produced eggs. Their life cycle took about 6 days and successive subcultures were possible. Their developmental state was comparable to that of culture in insects, and an individual nematode and each developmental event could be observed easily through the transparent culture vial under a microscope. Living insect cells were food for nematodes because juveniles grew slowly and did not develop to adults in the culture medium only or in dead cells. Infective juveniles (IJs) were not observed during the first generation in culture, but they appeared and increased in number during 30 days of culture with cell deterioration. The propagation of nematodes and the occurrence of IJs varied with culture conditions such as medium volume. When IJs obtained from insects were transferred to cultured cells, they shed their skin and recovered from the dauer state. The percentage of IJ recovery in cells was almost the same as that *in vivo*. Culturing *Steinernema* with cultured insect cells is a useful tool to investigate its life cycle.

The recovery of IJs was induced by factors designed Recovery Inducing Factor(s) (RIF) in the cell-culture system. RIF was created by cultured cells and secreted into the medium. RIF was produced in the insect cells, but was not done in mammalian cells such as mouse or human. Properties of RIF were heat stable, smaller molecule, and butanol soluble. RIF was isolated as an active single peak by reverse-phase HPLC. Although recovery rate of axenic IJs (without bacteria inside vesicle) was very low in the cell culture, it increased to about 50% in the supernatant of the conditioned medium in which symbiotic bacteria were incubated, indicating that symbiotic bacterial factors are also needed for the recovery of *S. carpocapsae* with RIF from insect cells.

第 1 章

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

1. 緒言

食料不足の一因として害虫による農作物の被害がある。これに対する害虫防除対策として、化学農薬が幅広く使用されているが、農薬の利用によって害虫の殺虫剤抵抗性の出現、土壌・水質汚濁、生態系やヒトの健康への悪影響が顕在化している (Kogan, 1998)。そこで、化学農薬だけに依存せずに物理的、耕種的、生物的防除などの複数手段を取り入れた総合害虫防除管理 (Integrated Pest Management, IPM) が注目されている (Klein, 1990)。昆虫病原性線虫は生物的防除資材の一つであり、昆虫の幼虫に対して高い殺虫性を有し、鞘翅目、鱗翅目、双翅目など幅広い昆虫種に感染する特徴をもつ (Kaya and Gaugler, 1993)。

昆虫病原性線虫には *Steinernema* 属と *Heterorhabditis* 属があり、線虫体内に共生細菌を有している。*Steinernema* は *Xenorhabdus* 細菌、*Heterorhabditis* は *Photorhabdus* 細菌とそれぞれ共生関係にある (Poinar and Thomas, 1966; Ciche and Ensign, 2003)。線虫は昆虫の口、気門、肛門から侵入後、腸に存在する internal vesicle から共生細菌を寄主の血体腔に放出する (Forst and Nealson, 1996)。共生細菌は毒素を産生し、24 ~ 48 時間以内に昆虫を致死させ、昆虫の組織や体液を分解し、線虫が摂取しやすいようにする (Forst and Clarke, 2002)。線虫は寄主の栄養分を摂取し、昆虫体内で成虫まで成長し、産卵する (図 1)。そして線虫は昆虫体内で成長・発生を繰り返し、増殖する。生育環境が悪化し、栄養が制限されると、成虫への成長を停止して昆虫体外で生存できる唯一の形態である耐久型ステージへと成長する (Burnell and Stock, 2000; Popiel et al., 1989; Wang and Bedding, 1996)。耐久型ステージは3齢幼虫に相当するが、昆虫病原性線虫の耐久型3齢幼虫は感染態幼虫 (Infective juvenile, IJs) と呼ばれる。IJ は共生細菌を体内に有し、寄生昆虫から脱出して野外を徘徊して、新しい寄主を見つけると再び、寄生する (Poinar and Leutenegger, 1968; Campbell et al., 1995)。

昆虫病原性線虫については、土壌から単離された線虫種の同定と地理的分布、害虫防除を主体とした応用面の研究、人工培地による大量増殖などが多く報告されている (Unlu et al., 2007. Simard et al., 2006)。しかしながら、線虫の生物学的知見、特に昆虫体内での線虫の成長・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(Wang and Bedding, 1996)。昆虫病原性線虫のライフサイクルはこれまで、昆虫を解剖して線虫がどのように成長・発生しているのかを観察して得られてきたが、得られる情報は限られていた(Kaya, 1977; Wang and Bedding, 1996)。一方、昆虫病原性線虫は人工培養が可能であり、これまで多くの *In vitro* culture 法が開発されてきた(Dutky et al., 1964; Hara et al., 1981; Timper and Kaya, 1989; Volgyi et al., 1998)。私もその中で Dog food 培地、ラードを主体とした SGLPY 培地、Salad oil 培地による培養を試みた。しかし、これらの *in vitro* culture 法では、線虫の成長遅延、発生不良、継代の困難という問題に直面した。そこで本研究では、線虫の生物学的知見を得るために、まず *in vivo* の線虫のライフサイクルを *in vitro* で再現する新規培養系の開発を目的とした。

現在、様々な昆虫から多くの培養細胞株が樹立され、特に核多角体病ウイルスの培養・増殖に数多く利用されている(Blissard, 1996; Gaw et al., 1959)。この手法を用いることで、ウイルスの寄主となる昆虫に感染させるのではなく、昆虫培養細胞においてウイルスの感染や増殖の詳細が明らかにされつつある。この手法を参考にし、昆虫病原性線虫は昆虫組織を食べて成長できるという知見を元に(Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002)、昆虫培養細胞を病原性線虫への培養に応用することを試みた。すなわち、昆虫培養細胞系に *Steinernema carpocapsae* を導入し、線虫の Cell-culture システムでの成長、発生、増殖が可能であるかどうかをまず検討した。IJ への成長は、栄養飢餓、老廃物の蓄積、想定されている IJ 成長因子の蓄積などの生育環境の悪化を J1、J2 が感知して引き起こされると考えられており、*in vitro* 系での再現はほとんど報告されていない(Popiel et al., 1989)。この点についても、Cell-culture システムによって *in vitro* での IJ 誘導の再現が可能かどうか調査した。一方、IJ は昆虫に侵入すると、昆虫からのシグナルを感知して、耐久型ステージから成長型ステージへと生理的、形態的な変化を引き起こす(Campbell and Gaugler, 1991)。この現象は Recovery と呼ばれている(Golden and Riddle, 1984; Strauch and Ehlers, 1998)。既存の人工培地を用いた *in vitro* culture では、安定した Recovery はみられていない。本研究では、この Recovery についても検討し、関連する因子の特徴解明を試みた。

2. 材料と方法

2.1. 昆虫と昆虫病原性線虫

カイコ(鐘音系統)を人工飼料(シルクメイト、日本農産工業)で飼育した。飼育条件は 25 ± 2 、明期:暗期を 12h:12h に設定した。*Steinernema carpocapsae* (strain: All) はカイコの蛹に注射し、増殖させることによって系統維持した。以下に示したように表面殺菌した IJ(感染態幼虫、infective juveniles)を PBS に懸濁し、1 頭当りに 100 IJ/15 μ l を注射した。室温条件下で 3 週間インキュベート後に感染で死んだ蛹から、水中に遊出した IJ を回収する White trap 法により IJ を得た。IJ は実験に供試するまで PBS 中 10 で保存した。IJ は実験直前に PBS で 2 回洗浄し、表面殺菌のため 0.1%ホルマリン、0.1%次亜塩素酸ナトリウムにそれぞれ 30 分ずつ浸した。Cell-culture システムで用いる *S. carpocapsae* の卵は Cell-culture システムで得られたものを用いた。

2.2. 昆虫培養細胞

Spodoptera frugiperda(ヨトウムシ)由来の Sf9 細胞 (Invitrogen, CA) を 25 条件下で培養した。培地は IPL-41 (Invitrogen)を用い、10%ウシ血清培地 (FBS,Nihon Bioserum)とアンピシリン、ストレプトマイシンを含む 1%抗生物質液 (SIGMA, St. Louis, MO) を添加した。

2.3. *S. carpocapsae* の培養細胞プレートへの接種 (Cell-culture システム)

産卵 24 時間以内の *S. carpocapsae* の卵を細胞培養プレートに接種し、線虫を観察した。Sf9 細胞は 24 ウェルプレートに 300 μ l の IPL-41 培地とともに、コンフルエントになるまで培養した。25 個の卵を 1 ウェルに接種し、25 で培養した。一度の実験に 6 ウェルを同時に使い、実験は独立に 3 回行った。経過時間は線虫が孵化したときを 0 時間とした。線虫は位相差顕微鏡(OLYMPUS)で 1 頭ずつ成長を追跡した。線虫の次の産卵まで、0、24、48、72、96 と 120 時間後に観察した。

Cell-culture システムでの線虫の継代では、Cell-culture で産卵された線虫の卵 50 個を採集し、新しい細胞培養プレートに接種した。6 日後に、再び得られた卵を 50 個採集し、次の細胞培養プレートに接種することで継代を続けた。

Sf9 の死細胞は、コンフルエントになるまで細胞を培養した後、-30℃、24 時間で凍結させ、室温で解凍して得た。

2.4. *S. carpocapsae* の成長への温度の影響

細胞培養プレートに卵を接種し、15℃、25℃、30℃ のインキュベータに入れ、*S. carpocapsae* の成長を 120 時間後に観察した。

2.5. 培養液量の *S. carpocapsae* の成長に対する影響

培養液量の影響の実験は次のように行った。Sf9 細胞を 24 ウェルプレートでコンフルエントになるまで培養した。培地をすべて除き、新しく、5、50、100、150、300 と 600 µl の IPL-41 培地をウェルに加えた。次に、50 頭の *S. carpocapsae* J1 を 1 ウェルに接種し、25℃ でインキュベートした。IJ は昆虫体外へ出現するのは 14 日後であることから、接種して 14 日後に全線虫数と IJ 数を計測した。実験には一度に 4 ウェルずつ用い、実験は独立に 3 回行った。

2.6. IJ Recovery assay

Recovery は咽頭部の形成と J3 である感染態幼虫が脱皮しないままに被っている J2 の被膜の脱鞘で確認した (Strauch and Ehlers, 1998)。IJ を培養プレートに接種後、0、2、4、6、12、24、48、72 時間後に Recovery が起きたかどうかを観察した。4 ウェルを 1 度の実験に使い、IJ 50 頭を 24 ウェルプレートの 1 ウェルに接種し、実験は独立に 3 回行った。一方、*in vivo* における Recovery 率を知るために、50 頭の IJ をカイコ の 5 齢幼虫に注射し、解剖して Recovery が生じているか否かを確認した。カイコは 1 回に 5 頭ずつ用意し、

実験は独立に 3 回行った。

2.7. 統計処理

一次元分散分析(ANOVA)を行ったあと、全体に有意差がみられた場合に、Scheffé's f test で多重比較検定を行った。これらの実験において有意差は $P < 0.05$ で判定した。

3. 結果

3.1. 昆虫培養細胞を用いた *S. carpocapsae* の成長

表面殺菌した *S. carpocapsae* の感染態幼虫(IJ)を Sf9 細胞プレートに接種した。IJ は 4 齢幼虫(J4)に脱皮し、次に成虫まで成長し、72 時間後に交尾して産卵した。産卵された第2世代の卵を新しい細胞プレートに再び接種し、観察した(図 2A)。孵化した 1 齢幼虫(J1)は 48 時間で J3 まで成長した(図 2B)。成虫は孵化後、96 時間で観察され(図 2C)、120 時間後には、産卵と次世代の幼虫(J1)が観察された(図 2D)。

次に、*S. carpocapsae* の発育ステージの割合を 24 時間間隔で経時的に観察した(図 3)。それぞれの線虫が孵化した時間を 0 時間と設定し個体別に観察した。24 時間後では、J2 に成長したのが 84.1%で、まだ J1 のままだったのは 15.9%だった。48 時間後に J3 が観察された(68.8%)、J2 と J1 はそれぞれ 24.9%、6.3%だった。72 時間後では、J3 が全線虫の 43.4%を占めた。しかし、J3 と同じステージに相当する感染態幼虫は観察されなかった。J4 が 32.7%で、成虫も観察された(5.8%)。孵化後 96 時間では J4 が 47.5%、成虫が 22.3%だった。120 時間後に、55.1%の線虫が成虫まで成長した。成虫のうち 88.9%が産卵していた。以上の結果から *S. carpocapsae* の孵化から産卵までは 5 日であり、卵の中の embryo の発生に要する時間は、産卵されてから 24 時間以内であることから、ライフサイクルはおよそ 6 日間で完了すると判断された。各齢はほぼ 24 時間で経過するが、経過時間については著しい個体差があった。なお、120 時間後における死亡虫は 1.1%だった。また、感染態幼虫への成長は全個体の 0.2%だった。カイコの蛹に注射した IJ の場合には、成長し、次世代の出現がみられるまでは 72 時間だった。この次世代の J1 が再び、成虫にまで成長し、産卵する時間を調べたところ、およそ 120 時間であった。本培養系においてライフサイクルの完了に要する時間は生体とほぼ同じであった。

Cell-culture システムで線虫の継代が可能かどうかを検討した(図 4)。卵を 50 個採集して新しく用意した細胞プレートに継代した。これを繰り返して 3 度の継代後においても、線虫の産卵数に大きな減少はみられなかった。このシステムによる継代を 1 年以上にわたって継続し、線虫の系統を維持することができた。

昆虫体内では線虫の世代数が進むとともに線虫の餌が枯渇する状況となる。本培養系において、昆虫体内における状況を再現するために、線虫を細胞プレートに卵を接種して、何の処理も施さずにそのまま30日間インキュベートし、線虫の頭数とIJ数を5日おきに計測した (図5)。5日間で、接種したJ1は成虫まで成長し、産卵した。また、IJへの成長はみられなかった。第一世代の成虫が産卵をしたために、5・10日間で全線虫数は増加した。10日後までは第二世代の線虫が成虫にまで成長することはなかった。また、10日後にはプレートの細胞はほとんどみられなかった。15日間のインキュベーション後に、IJへ成長する個体が観察され始めた。その後、線虫の全体数は減少するものの、IJ数は増加を示した。卵を接種して30日後にIJは全線虫数の70.6%を占めた。なお、線虫体内の共生細菌は培地中の抗生物質で抑制され、増殖は認められず、その後消失したと考えられた。

3.2. Sf9 死細胞ならびに cell-free 培地における *S. carpocapsae* の成長

S. carpocapsae の卵を凍結融解した Sf9 死細胞あるいは Cell-free 培地(IPL41+FBS)に接種して 5 日後にステージを観察した(図 6)。線虫は J3 ステージまでしか成長できず、J4 や成虫には全く成長できなかった。同時に行った Sf9 生細胞を含む培養プレートにおいては、90.3%の線虫が J4 や成虫まで成長し、産卵まで観察することができた。

3.3. 温度の影響

S. carpocapsae の培養温度を変え、成長・発生と産卵を観察した(表 1)。15 条件下では、線虫の成長が抑制され、120 時間経過後も、接種した J1 ステージのままだった。30 条件下においては、成虫に達するまでの時間が96時間と、25 条件に比較して短くなった。しかし、孵化後 196時間を経過しても、成虫の卵巣の発達がみられず、次世代の産卵は観察されなかった。なお、33 以上では線虫は致死した。

3.4. 培養液量の変化と線虫の増殖数ならびに感染態幼虫数

培地量を変えることによって飼育環境を変化させて、全線虫の増殖数と感染態幼虫(IJ)数への影響を調査した(図7)。線虫数は接種してから14日後に計測した。培地液量が300 μ l と600 μ l の場合、5~150 μ l 液量に比べて線虫数は多く(300 μ l; 1693 \pm 1022, 600 μ l; 2159 \pm 1486)、IJ の出現も非常に少なかった(20 \pm 42.4, and 8.9 \pm 26.7, respectively)。一方、5 μ l の条件のときは、得られた全線虫数はすべての条件の中でもっとも少なく、IJ 率も高かった(64.8%)。50 μ l・600 μ l の培地量条件下では培地が少ない程IJ 率は高くなった。なお、IJ 数も培地が少ないと高い傾向にあったが、統計的に有意な差はみられなかった。

3.5. IJ Recovery assay

S. carpocapsae のIJ をカイコの終齢幼虫に注射したとき、12 時間後にIJ のRecovery 率は96.6 \pm 3.5% だった(図8)。それに対し、本培養系でIJ を12 時間培養した場合には、23 \pm 9.9%だった。しかしながら、24 時間培養したとき、Recovery 率は73.9 \pm 8.5%に上昇し、48 時間培養したときには、さらにRecovery 率が上昇した。したがって、最終的には遅れはするものの本培養系でのRecovery 率はカイコ生体を用いた場合と同様に高い値を示した。Medium のみではIJ のRecovery は72 時間を経過してもほとんど観察されなかった(8.4 \pm 3.7%)。

4. 考察

昆虫培養細胞であるヨトウムシ由来 Sf9 細胞を用いて、昆虫病原性線虫 *S. carpocapsae* の新規培養システム (Cell-culture システム) を開発した。Cell-culture システムを用いて線虫の卵から成虫まで成長させることができ、IJ への成長も観察できた。本培養系において、線虫のライフサイクルを完了するのに必要とされる時間は *in vivo* とほぼ同じ 6 日間であった。また、線虫を継代し、1 年以上系統を維持することができた。このことから、本培養系は線虫の成長・発生にとって必要な栄養条件、環境条件を満たしていると考えられる。従来の人工培地では継代を重ねていくうちに、成長遅延や発生不良が起こり、培養が困難になるという問題があった (Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002)。従来の *in vitro* 系では、成長・発生に必要な何らかの栄養分が欠けていると考えられる。Cell-culture システムでは、線虫の餌として生きた Sf9 細胞が重要であると考えられ、死細胞では、線虫の成長はほとんどみられなかった。この結果から、線虫は生きている細胞が培地中に分泌している物質に誘引されて細胞を摂食する可能性、あるいは細胞が死んだことによって失われる栄養分が線虫の成長には必要であることなどが考えられる。

Cell-culture システムにおいては線虫の形態、成長、脱皮、交尾などの行動や摂食による細胞の減少などの培養条件の変化を、培養器を通して、顕微鏡で詳細にいつでも観察することができる。一方、昆虫生体を用いたときには、解剖せずには観察はできない。本研究では成長過程を個体別に追跡した結果、線虫はおおよそ 24 時間ごとに脱皮して、次のステージへと成長することを観察した。しかし、ステージが進むにつれ個体差が大きくなっていき、培養系でも、昆虫体内においても、様々なステージや世代が混在していくと考えられた。

操作を加えずに 30 日間培養すると、細胞が枯渇した後、IJ への成長が誘導された。これは *in vivo* での状況と類似している。線虫は昆虫体内で数世代ライフサイクルを循環し、寄主の栄養がなくなると J4 や成虫への成長が抑制されて、IJ への成長が引き起こされる (Burnell and Stock, 2000)。この状態が Cell-culture システムにおいても生じ、IJ が多くなったと考えられる。IJ の出現する要因は不明であるが、線虫の高い個体群密度、栄養不足、線虫の老廃物の蓄積といった不適な環境によって引き起こされると推測されている (Popiel

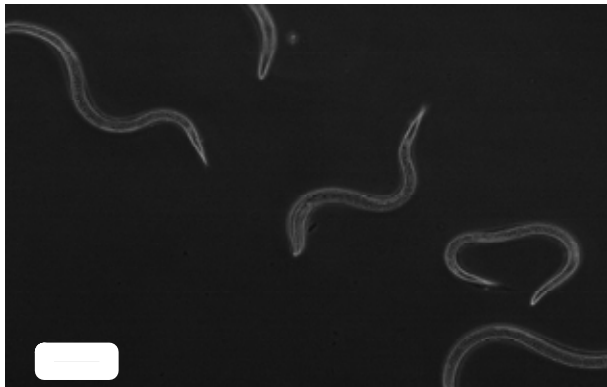
et al., 1989; Wang and Bedding, 1996)。Serwe-Rodriguez et al.,(2004)は *S. carpocapsae* の若齢幼虫は寄主内での乾燥を感知するとIJへ成長すると考えた。本研究の結果では、IJの出現は培地量に左右された。多い培地量のときには、線虫の生育環境に余裕があったのでIJへの誘引は少なかったと推察された。一方、少ない培地量のときには、生育環境の悪化を引き起こしやすいので線虫の多くがIJへと成長したと考えられた。この結果は、IJが乾燥ではなく、不適環境を感知してIJになった可能性が高いことを示唆している。

昆虫病原性線虫の温度の影響に関する研究はこれまで、ハチノツヅリガ幼虫を用いて行われてきた。*S. carpocapsae* は 25℃ を超える温度よりも 5・25℃ の方が生育環境に適しており、35℃ においては線虫の生存や感染性は著しく低下した(Kung et al., 1991)。また、*S. feltiae*を用いた実験では、28℃ で線虫の発生がみられなかったと報告されている(Hazir et al., 2001)。本培養系においても、*S. carpocapsae*の温度に対する影響を調査したところ、低温域では成長がみられなかった。30℃ 下においては、25℃ 条件に比べて成長の経過がおよそ 12 時間早かった。しかしながら、7 日間を経過しても産卵が観察されなかった。また、33℃ を超える温度域では、線虫が致死した。この結果は、昆虫を用いた従来の報告と一致している。Cell-culture システムの適用にあたっては、25℃ で行うのが好ましいことがわかった。

本培養システムにおいても Recovery (耐久型から成長型ステージの切り替え)の現象を確認できた。昆虫にIJをインジェクションしたとき、Recovery は 24 時間以内に 100%近く引き起こされることが知られていたが、人工培地では Recovery を引き起こしにくいという問題があった(Ehlers et al., 1998, Dolan et al., 2002)。しかしながら、本培養系を用いたときには、*S. carpocapsae*の Recovery 率は 48 時間で 87%を超え、昆虫体内でなくても十分 Recovery を起こさせることができた。

以上のことから、Cell-culture システムは生体における線虫の発生・成長を再現可能であり、IJへの変化や Recovery も誘導することができ、線虫の生物学的知見を得るツールとして有効であると考えられた。

A *Steinernema carpocapsae*



B Life cycle of *Steinernema carpocapsae*

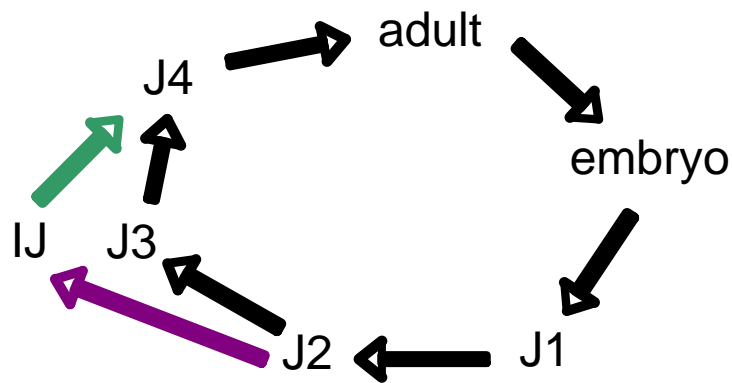


図1

A *Steinernema carpocapsae* (infective juvenile) scale bar 100 μ m

B 昆虫病原性線虫のライフサイクルの概略図

J1 は 1 齢幼虫を示す。成長型ステージの幼虫 J1・J4 は昆虫体内において成長・発生する。

IJ (Infective juvenile、感染態幼虫) は昆虫体から出て、土壤中に生存する耐久型ステージであり、

生育環境の悪化によって J2 から IJ へ成長する (紫の矢印)。寄主に侵入後、脱皮して J4 になり、これを

Recovery と呼ぶ (緑の矢印)。

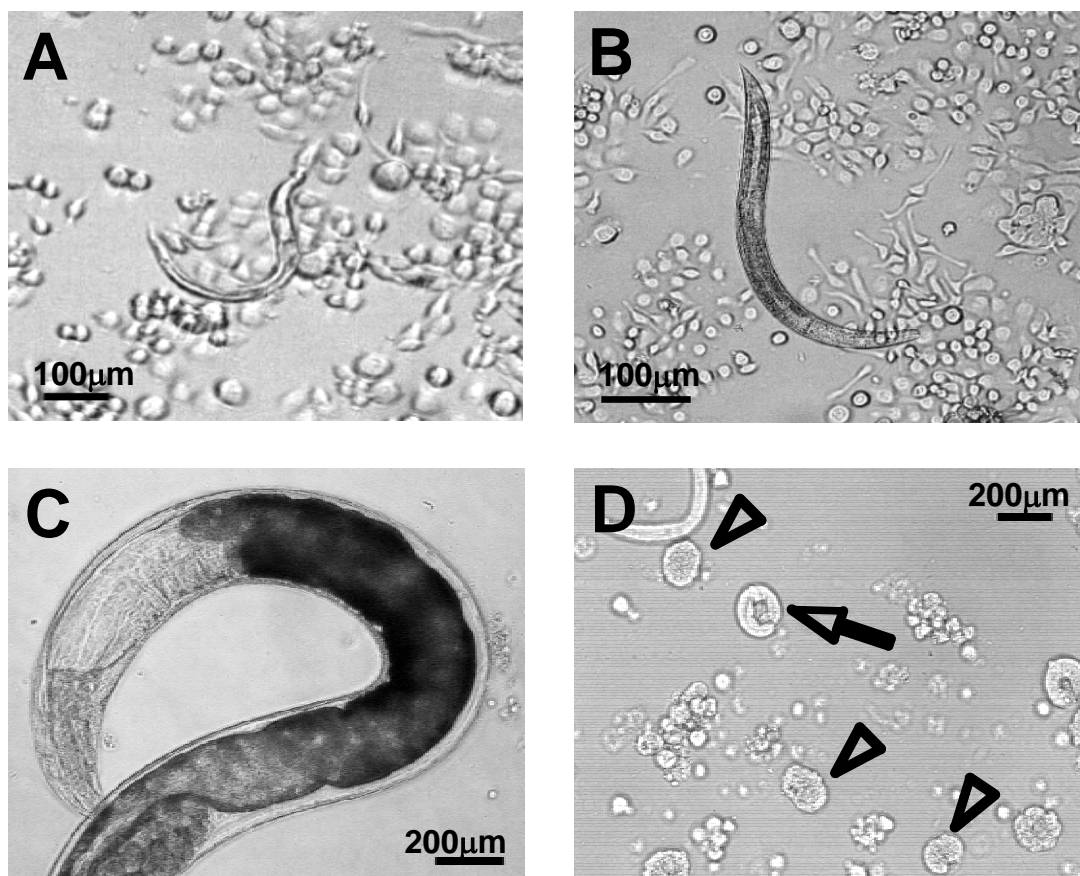


図2 Cell-culture システムを用いた *S. carpocapsae* の成長

A 孵化した J1、B 孵化後 48 時間の J3、C 孵化後 96 時間の 成虫、

D 孵化後 120 時間に産卵された卵(矢頭)、卵の中で成長中の embryo が観察される(矢印)

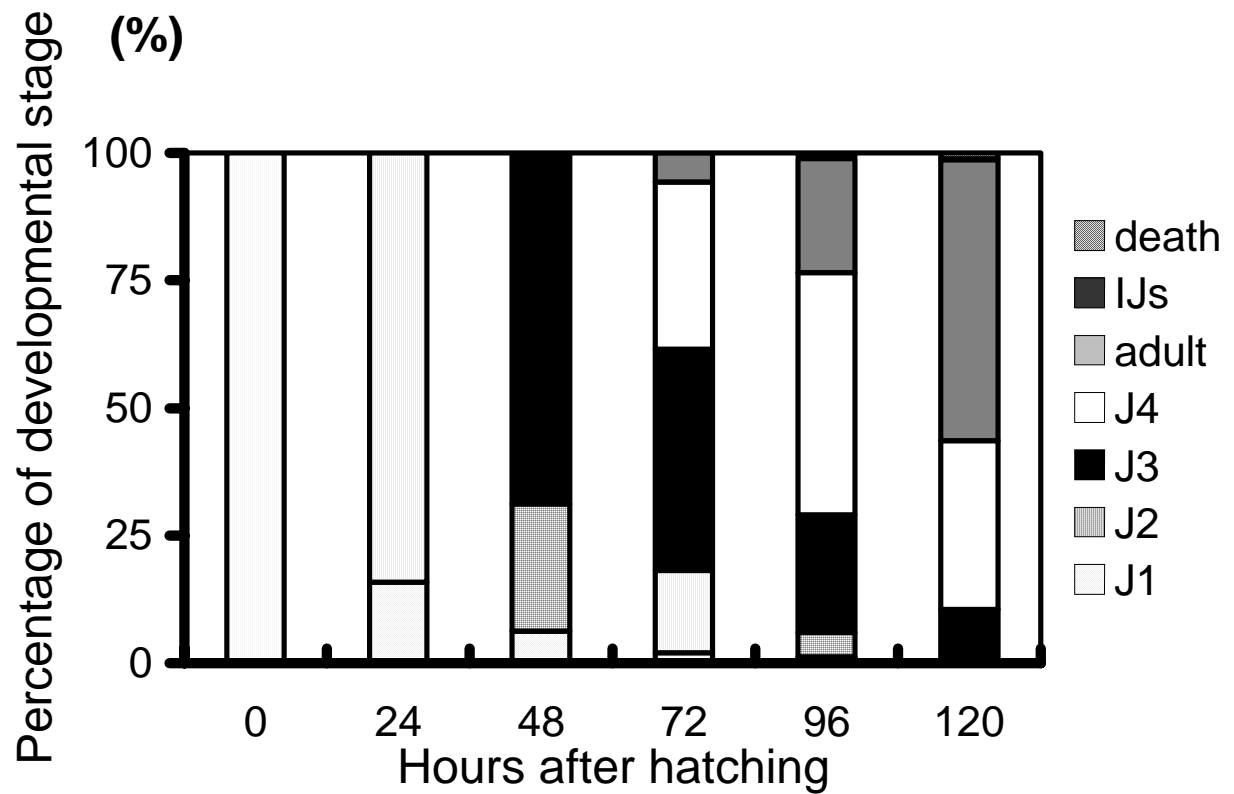


図3 *S. carpocapsae* の成長の経時的変化

1 ウェルにつき 50 個の卵を培養プレートに接種し、1 頭ずつ経時的に観察した。孵化した時間を 0 時間とした。

一度の実験に 6 ウェル用意した。実験は独立に 3 回行ない、同様の結果を得た。120 時間後において、IJ は

0.22%、死んだ線虫は 1.1% だった。

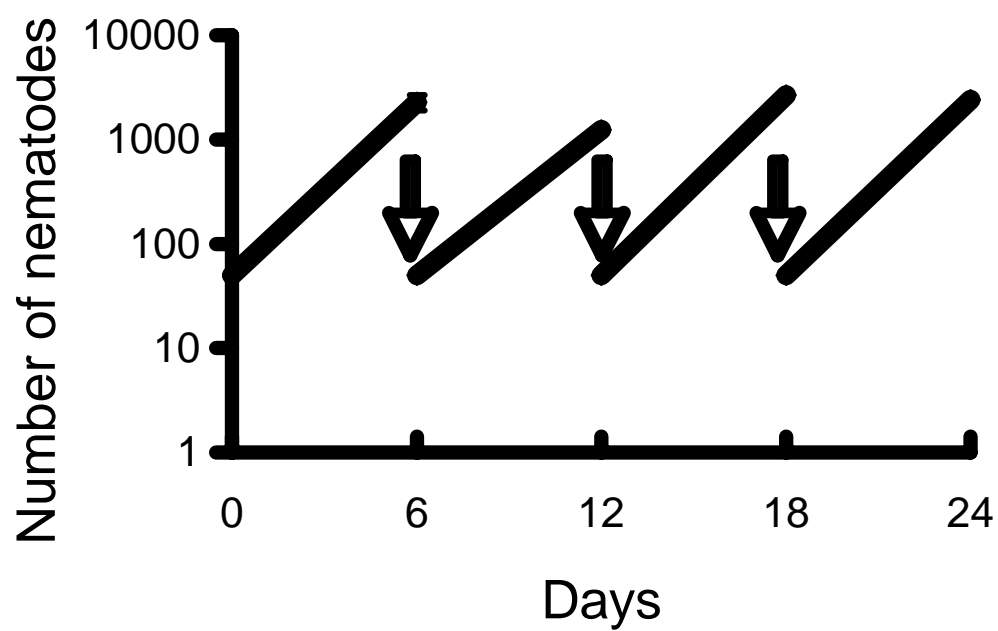


図4 Cell-culture システムによる線虫の継代

コンフルエントになるまで培養した Sf9 細胞プレートに 50 頭の卵を接種した。6 日おきに 50 頭の卵を採集して、継代した。矢印は継代したときを示す。

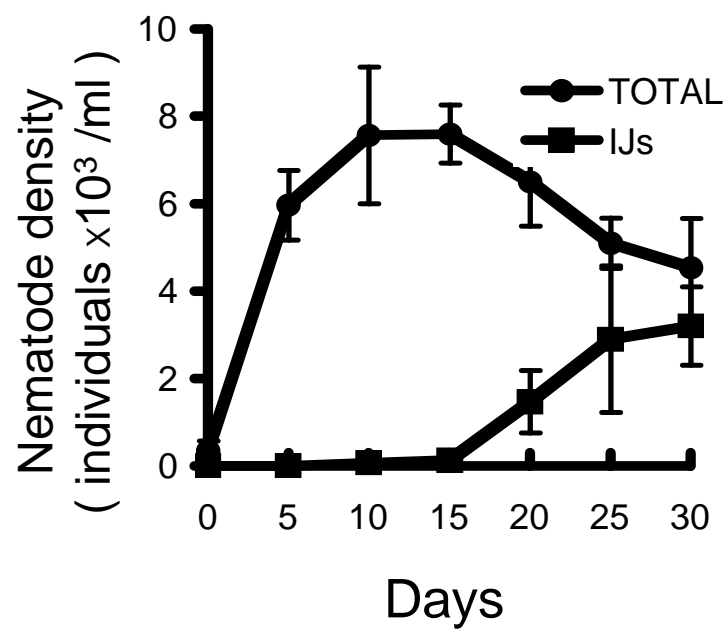


図5 無継代での Cell-culture システムにおける線虫の培養

線虫と Sf9 細胞を継代せずに、25 で 30 日間維持した。 は1ウェルあたりの生存している全線虫数を表す。

はウェルにみられた IJ 数を表す。エラーバーは S.D を示す。

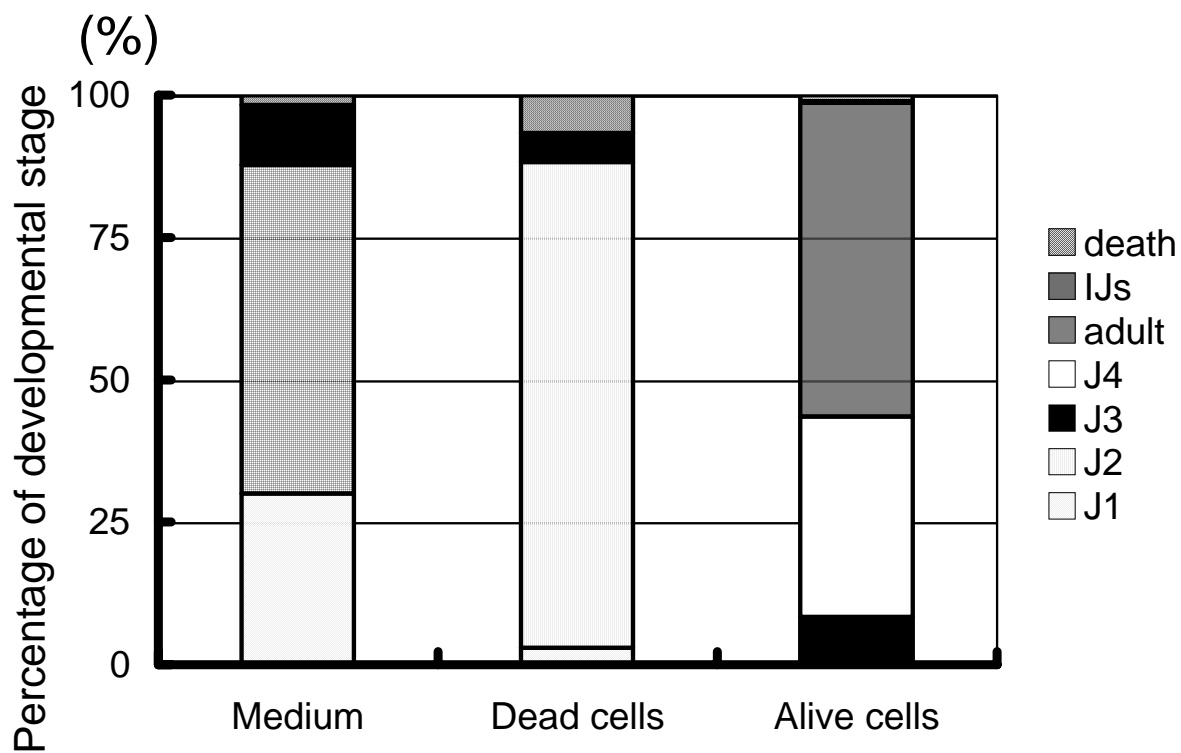


図6 死細胞や Cell-free 培地における *S. carpocapsae* の成長

1 ウェルにつき 50 頭の卵を細胞プレートに接種した。線虫のステージは孵化 120 時間後に調査した。6 ウェルを実験に用いた。独立に 3 回実験し、同様の結果を得た。

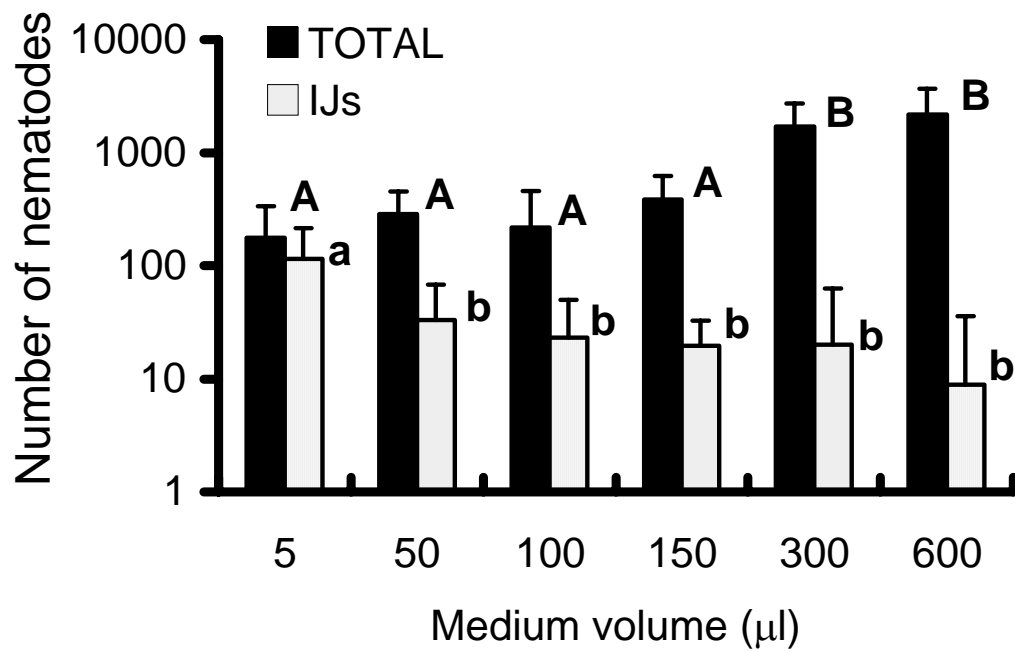


図7 培地量を変化させたときの線虫の増殖と感染態幼虫数

TOTAL は1 ウェル中の全線虫数 IJs は感染態幼虫数を示す。縦軸は対数で示す。

1 ウェルに50頭のJ1を接種し、接種してから14日後に全線虫数とIJ数を計測した。

1度の実験に4ウェルを用いた。実験は独立に3回行い、同様の結果を得た。

エラーバーはS.D.を示す。同じ文字は $P > 0.05$ で有意差がないことを示す。

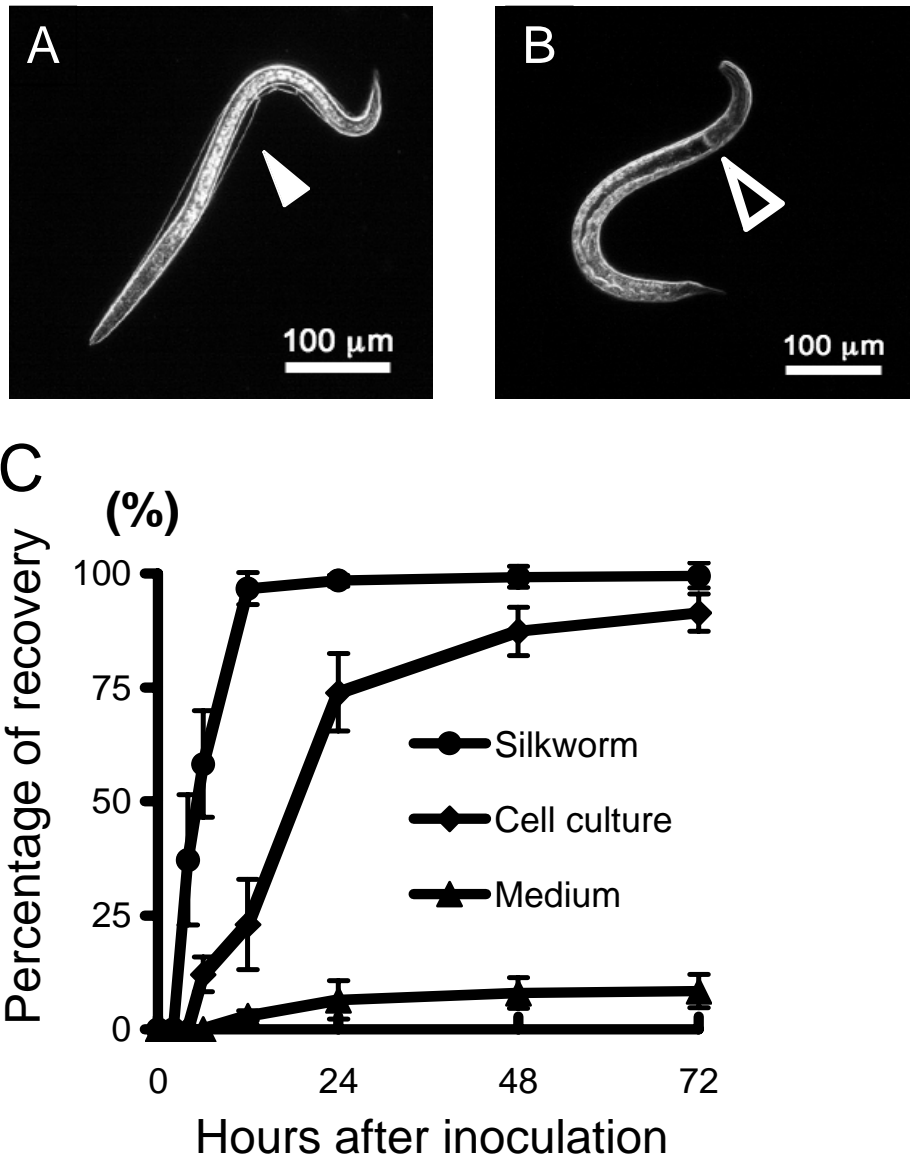


図 8 IJ Recovery assay

A IJ IJ の特徴である被膜を示す (白矢頭)。 B Cell-culture システムにおいて、Recovery した J3 ステージ Recovery でみられる咽頭部の形成を示す (黒矢頭)。 C Recovery に要する時間。 50 頭の IJ を 1 ウェルに接種し、実験は 5 ウェルで行った (Cell culture)。独立に 3 回実験し、同様の傾向を示した。カイコ注射については 50 頭の IJ をカイコ終齢幼虫に注射し、カイコ 5 頭を用いて計測した。実験は独立に 3 回行った。

表1 線虫の成長における温度の影響

| | Growth | Oviposition |
|----|--------|-------------|
| 15 | — | — |
| 25 | + | + |
| 30 | + | — |

Growth (卵から成虫までの成長)、Oviposition を 120 時間後に判定した。

第 2 章

昆虫病原性線虫 *Steinernema carpocapsae* の Recovery 誘導因子

1. 緒言

線形動物門を占める線虫の多くは耐久型ステージをもち、進化的に生存してきた (Ashton et al. 1999)。耐久型ステージは乾燥、低温といった不適な環境を乗り切るためのステージで、摂食停止、成長休止状態となる (Golden and Riddle, 1982)。線虫は生育に好ましい環境になると、耐久型から成長型ステージに脱皮し、再び、成長・発生するようになる。耐久型の形態からの脱皮と成長型への移行は Recovery と呼ばれる (Reape and Burnell, 1990)。すなわち、Recovery とは耐久型ステージから成長型ステージへと切替えが起こることであり、成長休止、摂食停止状態が解除される過程である (Riddle and Albert, 1997)。寄生線虫は耐久型ステージで野外に存在することから、宿主に侵入し寄生できるか否かは Recovery で決定されると考えられる (Tissenbaum et al., 2000)。

昆虫病原性線虫は鞘翅目、鱗翅目や膜翅目といった幅広い昆虫種に寄生する線虫である (Kaya and Gaugler, 1993)。この線虫が土壌中で唯一生存できる形態が耐久型ステージであり、これは感染態 3 齢幼虫 (Infective juvenile, IJ) と呼ばれる。他のステージはすべて昆虫体内で過ごす。IJ は 3 齢幼虫であるが、脱鞘せずに 2 齢幼虫の被膜を持ち、膜が二重構造となっている。この構造が、乾燥や物理的圧力に耐え、昆虫体外での生存を可能にさせている (Timper and Kaya, 1989)。この IJ は摂食停止、成長休止の状態にある。IJ は宿主に侵入した後、宿主の栄養物質を感知して、脱鞘し、成長型 3 齢幼虫へと生理的、形態的变化を引き起こし Recovery する (Campbell and Gaugler, 1991; Hallem et al., 2007)。この際、IJ が宿主のどのような物質を感知するのは未だ決定されていない (Ehlers and Shapiro-Ilan, 2006)。昆虫に侵入した IJ が Recovery に要する時間は 24 時間以内であり、およそ 100% 近くになると報告されている。しかし、従来の人工培地での *in vitro* 系においては、Recovery が観察されるのに 5・8 日間を必要とし、さらに、Recovery 率は 20・80% と非常にばらつきがある (Strauch and Ehlers, 1998; Hallem et al., 2007)。前章で述べたように、培養細胞を用いた *S. carpocapsae* の培養システムにおいては、IJ が 48 時間以内で、*in vivo* とほぼ同じ程度の Recovery を引き起こすことが明らかとなった。そこで、本培養システムを用いて線虫の Recovery を誘導する要因につ

いて探索した。

2. 材料と方法

2.1. 昆虫と昆虫病原性線虫

カイコの飼育、線虫の培養は前章で述べた方法による。カイコの体液は腹脚に針を刺し採取した。5 頭のカイコから採取した体液を、85 ℃ に 10 分浸し、10 分間、15000 rpm で遠心した上清をカイコ血清として実験に用いた。

2.2. 培養細胞

ヨトウムシ *Spodoptera frugiperda* 由来 Sf9 細胞 (Invitrogen, CA) とカイコ *Bombyx mori* 由来 BmN 細胞は、10%ウシ血清培地 (FBS, Nihon Bioserum, Japan) とアンピシリン、ストレプトマイシンを含む 1%抗生物質 (SIGMA, St. Louis, MO) を添加した IPL-41 培地 (Invitrogen) を用い、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 由来 S2 細胞は Schneider's 培地 (Invitrogen) で、25 ℃ 条件下で培養した。マウス由来 NIH3T3 細胞とヒトがん細胞由来 Hela 細胞は、10%ウシ血清培地 (FBS, Nihon Bioserum) とペニシリン・ストレプトマイシン (Invitrogen) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, SIGMA) を用い、0.5% CO₂、37 ℃ で培養した。

2.3. Conditioned 培地

培養した Sf9 細胞の上清 (Conditioned medium) は次のようにして得た。コンフルエントの Sf9 細胞を PBS で 3 回洗浄し、新しく IPL-41 培地を入れ 48 時間培養した。この培地を 5 分間、3000 rpm で遠心した上清を用いた。Sf9 細胞破碎液は次のようにして調整した。Sf9 細胞を 10 分間、3500 rpm の遠心により沈殿させ、1 ml の PBS で 2 回洗浄した。次に、700 µl の PBS を加え、超音波破碎機 (1 分間、5.5 output、95 duty) で破壊し、破碎液は 5 分間、15000 rpm で遠心し、その上清を 0.22 µm (MILLEX GV, MILLIPORE, Ireland) のフィルタで通過し、Recovery assay に用いた。Sf9 死細胞は -30 ℃ で 24 時間凍結し、それを常温で融解して得た。

2.4. IJ Recovery Assay

IJ の Recovery は咽頭部の形成と J2 の被膜の脱鞘が起きたかどうかで決定し、48 時間後に観察した。24 ウェルプレートの 4 ウェルを 1 度の実験に使い、実験は独立に 3 回行った。

2.5. Recovery 誘導因子の単離

IPL41 (FBS-free) で 168 時間培養した Sf9 細胞の培地上清を出発材料とした。この Conditioned 培地とブタノールを 2 : 3 で混合してブタノール相と水溶性の画分に分けた。水溶性画分をもう一度、新しいブタノールで再抽出し、ブタノール相に加え、加温減圧遠心機 60 で濃縮した。乾固後に 20 ml 分のブタノール相当たり 1 ml の DDW を加えて溶解した。

濃縮サンプルは HPLC にかける前に、0.5 μm のフィルタ (MILLIPORE) で濾過した。HPLC は reverse-phase で行い (HITACHI)、カラムは C18 カラム (LiChroCART 250-4.0 LiChrospher 100 RP-18(e) (5 μm), 関東化学) を用い、流速 1 ml/min の元に、DDW 中のアセトニトリル 0 ~ 5% のグラディエント条件で行い、220nm の吸光度を測定した。フラクションは 1 ml ずつを取り、採取した分画は再度、加温減圧によって溶媒を除いた。5 μl の DDW を加えて、IJ を 10 頭ずつ接種し、Recovery がみられるのかどうかを検討した。

2.6. Axenic IJ と *Xenorhabdus nematophila* の培養液

抗生物質を添加してある Cell-culture システムにおいて *S. carpocapsae* を卵から培養し、得られた IJ を Axenic IJ (無菌線虫) とした。これらの線虫体内からは共生細菌 *X. nematophila* は検出されなかった。共生細菌 *X. nematophila* は次のようにして得た。昆虫から取り出した IJ を表面殺菌し、抗生物質を含まない IPL-41 培地に接種後、その培地を MacConkey 培地 (SIGMA) に塗布して 25 で培養して、*X. nematophila* を得た。その *X. nematophila* を 500 μl の Recovery 誘導因子を含む培地に接種して、48 時間 25 条件下で震盪培養し ($\times 10^9$ /ml)、15000 rpm、10 分間遠心した上清を Recovery assay に用いた。共生細菌の Control とし

ては *E. coli* を用いた。

3. 結果

3.1. Sf9 細胞による *Steinernema carpocapsae* の Recovery の誘導

Cell-culture システムにおける *S. carpocapsae* の Recovery に、Sf9 細胞が必要かどうかを検討した (図 9)。通常の Cell-culture システム (Medium + FBS + cells) では IJ 接種後、48 時間で高い Recovery が得られた ($96.0 \pm 2.7\%$)。一方、培地のみでは、Recovery はほとんどみられなかった ($4.5 \pm 4.5\%$)。このため、Recovery は培地の成分だけでは誘導されることはなく、Sf9 細胞が必要であると考えられた。この場合、FBS(・) の IPL-41 培地で Sf9 細胞を培養した場合でも、FBS(+) 条件とほぼ同じ高い Recovery 率が得られた ($95.8 \pm 6.7\%$)。次に、IPL-41 培地ではなく PBS で Sf9 細胞を培養し、それを用い Recovery assay を行った。すると、 $54.4 \pm 14.2\%$ の Recovery がみられた。

3.2. Sf9 細胞の産生する因子による Recovery 誘導

IJ の Recovery を誘導する因子の局在について検討した。Sf9 細胞を 48 時間培養した上清 (Conditioned medium) に Recovery が誘導されるかどうか調べたところ、 $60.1 \pm 4.8\%$ に Recovery がみられ、Sf9 細胞が産生する因子によって Recovery が引き起こされると考えられた。また、PBS 中で破壊した Sf9 細胞の上清を用いた assay でも、 $46.3 \pm 8.3\%$ の Recovery がみられた (図 10 A)。死細胞からは因子は産生されなかった ($0.4 \pm 0.9\%$) (図 10 B)。Sf9 細胞の培養期間が長い培地を用いると、IJ の Recovery が高まった (図 11)。これらのことから、本研究では Recovery を誘導する因子を Recovery 誘導因子 (Recovery inducing factor(s), RIF) と命名して、さらに調査することにした。

3.4. Recovery 誘導因子における IJ の反応時間

IJ が Recovery 誘導因子によって Recovery するのに必要な時間について調査した (図 12)。コンフルエントの Sf9 細胞を 196 時間、新しい IPL-41 で培養した上清を Assay に用いた。この RIF を含む培地中に、0、4、

6、14、16、24、48 時間 IJ をそれぞれ浸し、PBS で 2 度洗浄した。その後 PBS で実験開始後 48 時間 (培地処理と PBS 保存の総計が 48 時間) になるまで IJ を培養して、Recovery を調査した。RIF を含む培地に 4 時間だけ暴露された IJ は $50.4 \pm 8.1\%$ が Recovery し、16 時間、暴露された IJ の Recovery は $89.3 \pm 2.4\%$ であり、ほぼプラトーに達していた。

3.5. 種々の培養液の Recovery 誘導活性

カイコ血清に含まれる活性と Cell-culture システムにより得られた活性の比較は段階希釈液を作製して調べた (図 13)。この結果、 10^{-2} 希釈で、カイコ生体では $46.6 \pm 12.6\%$ の活性があったのに対し、培地では $6.6 \pm 1.6\%$ の Recovery 率であった。 10^{-4} 希釈においては、両者とも Recovery がほとんどみられなかった。

他の昆虫由来培養細胞系において、IJ が Recovery できるかどうかを調査した。カイコ由来 BmN 細胞、キイロショウジョウバエ由来 S2 細胞を実験に用いた (図 14A)。結果は両者とも IJ の Recovery を引き起こした。BmN 細胞では $41.8 \pm 3.6\%$ 、S2 細胞では $46.5 \pm 3.6\%$ であった。

次に、哺乳類由来の培養細胞としてマウス由来の NIH3T3 細胞、がん細胞である Hela 細胞を用いた。これらの培養細胞でも線虫の卵を接種し、25℃ で培養すると成長・発生することを確認した。しかしながら、これら哺乳類由来の細胞においては Recovery がみられなかった (data not shown)。

3.6. Recovery 誘導因子の性質

Protease K ならびにトリプシンで RIF が失活するかどうかを検討したところ、これらの酵素では失活しなかった。次に、100kDa、30kDa、10kDa、5kDa の分子ふるいフィルタ (MILLIPORE) を用いて分画した。すると、5kDa 以下の液に RIF の活性がみられた。また、イオン交換樹脂への吸着から極性を調べたが、PH 極性は弱いと測定された。RIF はブタノールと水で分配した結果、ブタノール相に移行した。また、95℃、10 分間の熱処理でも 70% の活性が維持されていた (data not shown)。

3.7. Recovery 誘導因子の単離

Conditioned medium からブタノール抽出した画分を C18 reverse phase HPLC で分離した。分離条件を検討し、HPLC で得られた分画を Assay したところ、アセトニトリルの緩い勾配の初期に強い活性ピークが得られた(図 15)。このピークを採取し、再度、HPLC で分析した結果、かなり精製が進んだと考えられた(図 16)。

3.8. 共生細菌 *Xenorhabdus nematophila* と Recovery との関係性

本培養システムの Recovery Assay 系において、共生細菌を除いた Axenic IJ では Recovery が $8.3 \pm 3.3\%$ だった。これは Symbiotic IJ での Recovery $87.3 \pm 8.3\%$ に比べて、著しく低い値であった(図 17A)。次に、RIF を含む培地で *X. nematophila* を 48 時間培養した上清に Axenic IJ を接種したところ、Recovery 率が著しく高くなった(図 17B)。共生細菌の Control として同じグラム陰性細菌の大腸菌を用いて、同様の操作を行い Assay しても、Recovery はみられなかった。

4. 考察

昆虫病原性線虫の Recovery に関する報告は限られている。この理由として *in vitro* の実験では高い Recovery を得ることが困難であったことが考えられる。また、*in vivo*での報告についても、現象の観察が主であり、Recovery の誘導に関係する物質やメカニズムの情報は得られていない(Ehlers and Shapiro-Ilan, 2006)。今回、本研究で開発した Cell-culture システムでは、*in vivo*とほぼ同じ時間で、且つ、高い Recovery 率を得ることに成功した。本培養系での解析から、IPL-41 培地や FBS には Recovery 誘導活性はなく、Sf9 細胞によって Recovery が誘導されるということがわかった。さらに、Recovery は昆虫細胞により産生され、培地中に分泌される因子であることが想定され、これを Recovery 誘導因子 (Recovery inducing factor, RIF) と命名した。

RIF は熱に対して比較的安定性で、5kDa 以下であり、ブタノールに対する溶性が水よりも高い。Sf9 細胞から産生されている RIF の単離を試みた結果、逆相 HPLC で分離することによって、RIF はほぼ単一のピークとして単離することができた。物質的な解明はできなかったが、寄生性線虫における Recovery 誘導因子の単離は本研究が初めてであり、今後、寄生性線虫の Recovery メカニズムの研究が進められると考えられる。HPLC 精製分画の Recovery assay からは中途のステップにおける RIF 活性の低下が推測された。これについては、精製過程での消失や不安定性による可能性もあるが、RIF が単独で Recovery に寄与しているのではなく、他の因子も関係することも考えられ、さらに検討を必要とする。

線虫の生活史をコントロールする物質として、最近、*C. elegans* の耐久型ステージへの誘導フェロモンの単離が成功している (Jeong et al., 2005)。このフェロモンは水酸化脂肪酸に属する dideoxysugar ascarylose の配糖体であると報告されている。しかしながら、HPLC ステップにおいて、活性の大きな損失がみられており、耐久型への誘導には培地濃度の 1400 倍が必要とされている。また、すべての活性要素を取り入れて、はじめて耐久型ステージへの誘導に十分な活性が得られると考えられている (Butcher et al., 2007)。本研究の RIF はその性質からみて耐久型ステージへの誘導フェロモンとは異なっていると考えられる。

昆虫病原性線虫である *Heterorhabditis* 属では、培地で培養された共生細菌 *Photorhabdus luminescens* が産生した因子によって Recovery が引き起こされたとの報告がある (Strauch and Ehlers, 1998)。*Steinernema* では共生細菌の *X. nematophila* の培養液だけでは Recovery がみられることはなく、*Steinernema* 属と *Heterorhabditis* 属とで Recovery 機構が異なる可能性が示唆される。*Heterorhabditis* 属における Recovery に関する報告では、線虫の化学受容神経である ASJ ニューロンをレーザーマイクロビームで破壊した ASJ 欠損個体を用いたとき、Recovery がみられなくなったことから、IJ recovery には ASJ ニューロンが介していると言われている。また、*Heterorhabditis* では、cGMP に似た 8-bromo-cGMP を用いると Recovery がみられることが示されている (Hallem et al., 2007)。また、*C. elegans* では体内での機構として、膜貫通グアニリルシクラーゼ DAF-11 の活性による cGMP から GTP の産生を通じて recovery が引き起こされる Cyclic nucleotide pathway が知られている (Bimby et al., 2000)。さらに、線虫体内における Recovery の詳細として、Daf-9 の活性が Recovery に寄与することが報告されている。Daf-9 は線虫体内でステロールを産生し、Recovery を引き起こすのに関係している (Jia et al., 2002)。*C. elegans* と *Heterorhabditis* 属は非常に近縁であるのに対し、*Steinernema* 属はそれらとは少し離れた系統関係にある (Blaxter et al. 1998)。今回の研究で得られた知見を元に、今後の *Steinernema* の Recovery 研究の機構について検討していく必要がある。

Recovery 誘導因子は昆虫細胞で共通して産生されていた。しかも、ヨトウムシ由来細胞では高い Recovery 率であるのに対しハエ由来の S2 細胞では低かった。培養細胞にも由来昆虫の性質が反映されていることが考えられ、Recovery の起こりやすさと寄主への感染の成立や致死とは関係があると考えられる。*Heterorhabditis* をキイロショウジョウバエに感染させた報告では、IJ を 100 頭接種しても、およそ 60% の致死しか得られていない (Hallem et al., 2007)。一方、哺乳類由来の細胞では *S. carpocapsae* の IJ は全く Recovery できなかったことから、これらの細胞では Recovery 誘導因子がないと推測された。これまで、昆虫病原性線虫の哺乳類に対する無害性は、線虫が 33 以上において生存できないという根拠が大きかった (Kung et al., 1991)。また、高温耐性のトランスジェニック昆虫病原性線虫を作製しても、マウスに対して無害であった結果に対して、哺乳類は免疫機構が昆虫に比べて優れているので、線虫の働きが抑制され致死に至るからだと

うと考察されていた (Willson et al., 1999)。本研究の結果では、哺乳類由来の培養細胞に Recovery が認められなかったことが、宿主特異性の一因となることが示された。すなわち、昆虫病原性線虫は、仮に哺乳動物体内に侵入しても、Recovery が起こらず、成長しないことが予想される。すなわち、昆虫病原性線虫の哺乳類に対する安全性の新たな根拠となると考えられる。

本培養系で作製した Axenic IJ を用いて Recovery がみられるかどうかを検討したところ、Symbiotic IJ に比べて Recovery が顕著に減少した。Axenic IJ は共生細菌が除かれた感染態幼虫であり、この結果から、Recovery には共生細菌も関与していると考えられた。共生細菌 *X. nematophila* を、RIF を含む培地で 48 時間培養し、バクテリアを取り除いた上清を用いると、Axenic IJ の Recovery がみられた。しかし、IPL-41 培地や大腸菌を用いた assay では、Axenic IJ の Recovery がみられず、RIF と共生細菌の両方が必要である。

共生細菌の役割と RIF との関係性について、次のようなモデルを考えた (図 18)。仮説は modification、stimulation、complement の 3 つである。ここでは便宜上、昆虫細胞で産生される Recovery 誘導因子を RIF1 とし、細菌によるものを RIF2 と称する。modification 説は、線虫体内に取り込まれた RIF1 が共生細菌によって修飾されて、それが RIF2 となり Recovery が誘導されるという仮説である。stimulation 説は、取り込まれた RIF1 を共生細菌が感知して RIF1 とは異なる RIF2 を産生するという仮説である。そして、3 つ目に complement 説が考えられた。共生細菌によって産生される RIF2 と RIF1 の両方がそろったとき、または、双方が補って Recovery がみられるという説である。これらの他に寄主が関係した複雑な機構も想定し得る。今後これらの仮説の検証を中心に解析を進めたいと考えている。

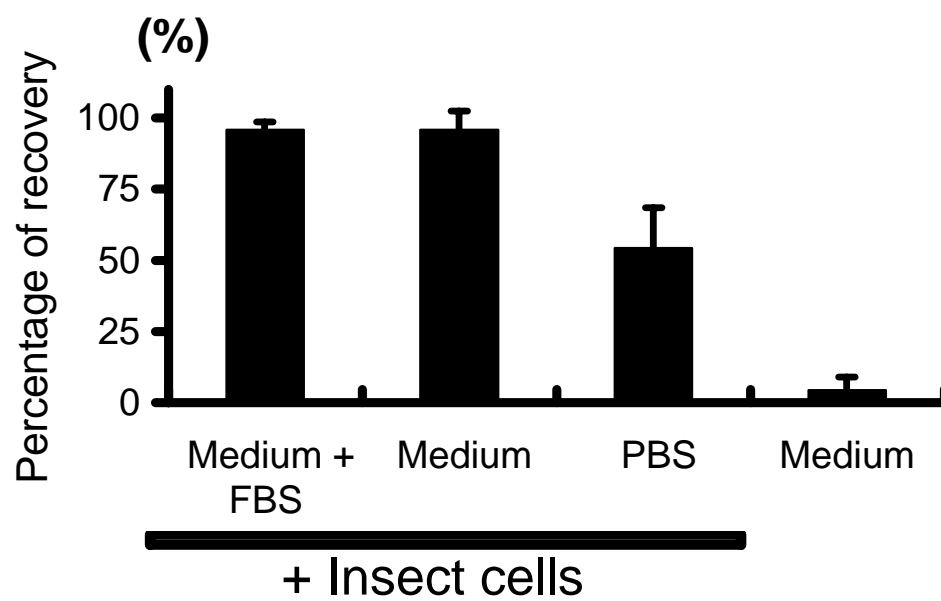


図9 *S. carpocapsae* IJ の昆虫細胞による Recovery 誘導
 Medium ; IPL-41 培地を示す。Insect cells は Sf9 細胞を示す。

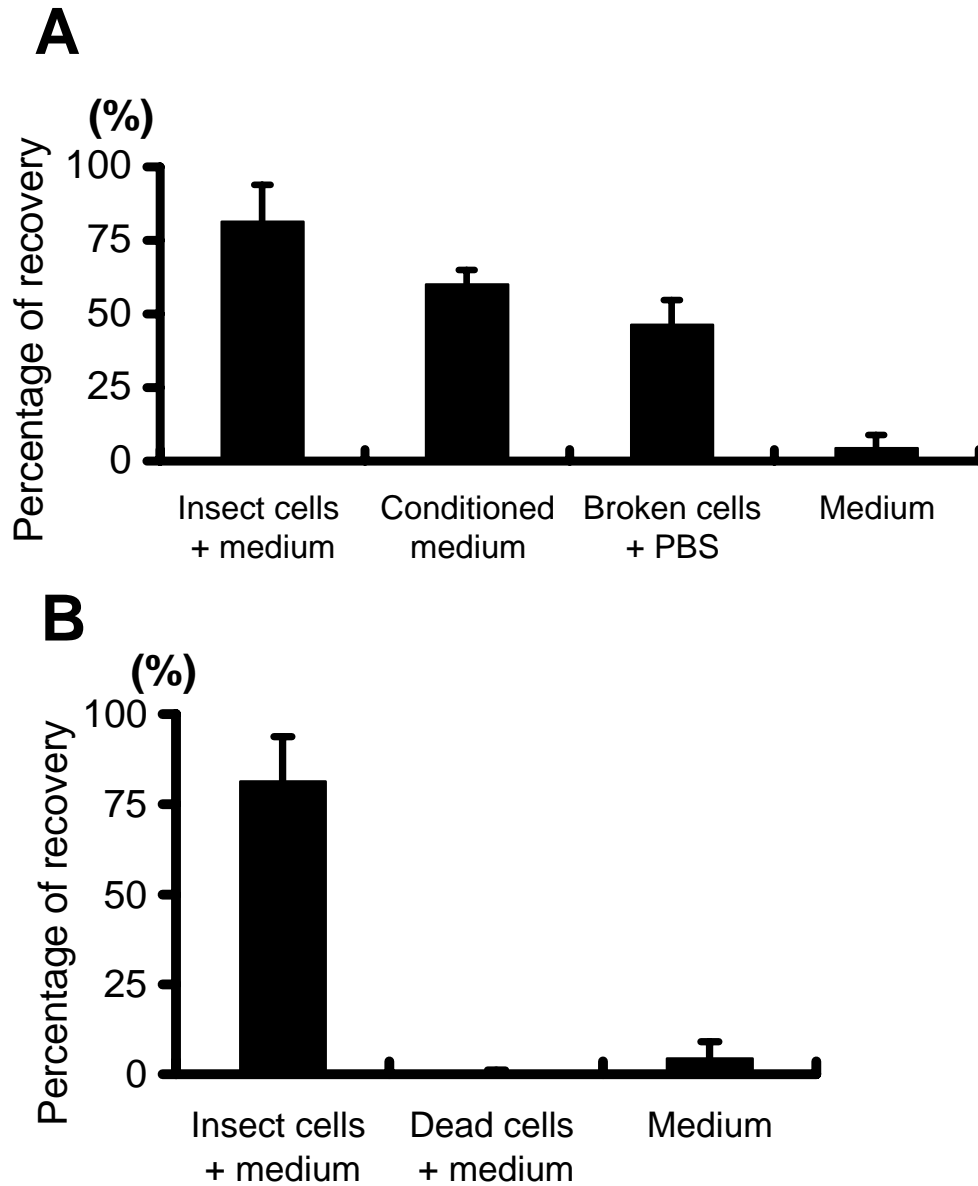


図 10 Sf9 細胞の産生因子による Recovery の誘導

A Conditioned medium は 48 時間、Sf9 細胞を含む IPL-41 培地で培養した上清。Broken cell + PBS は回収された Sf9 細胞を PBS 中で破壊した上清。

B Dead cells は -30℃ 凍結によって得られた。

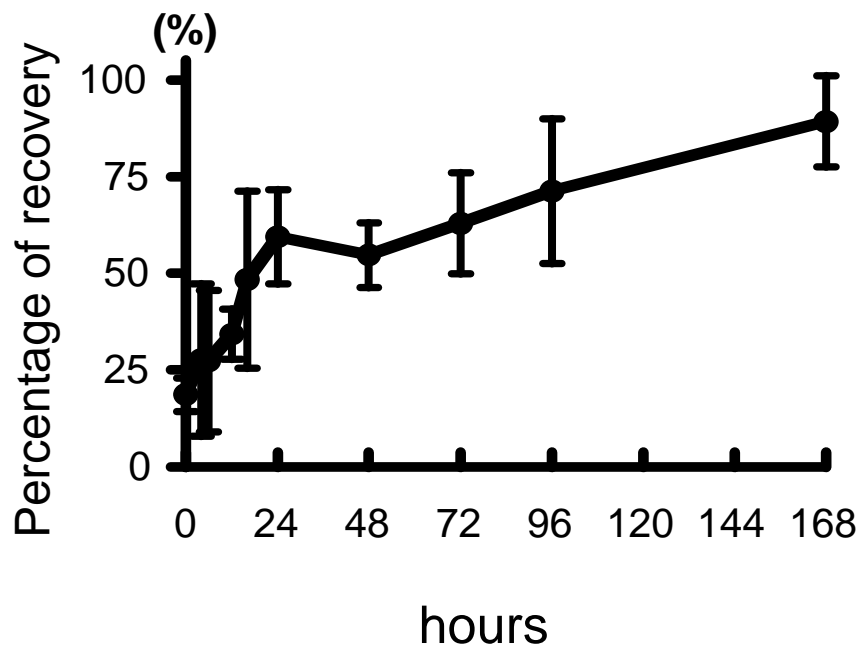


図 11 細胞培養時間に伴う Recovery 誘導活性の上昇
 コンフルエントの Sf9 細胞を様々な時間培養し、Assay した。
 Recovery は 48 時間後に判定した。
 Control は $5.8 \pm 6.6\%$ の Recovery がみられた。

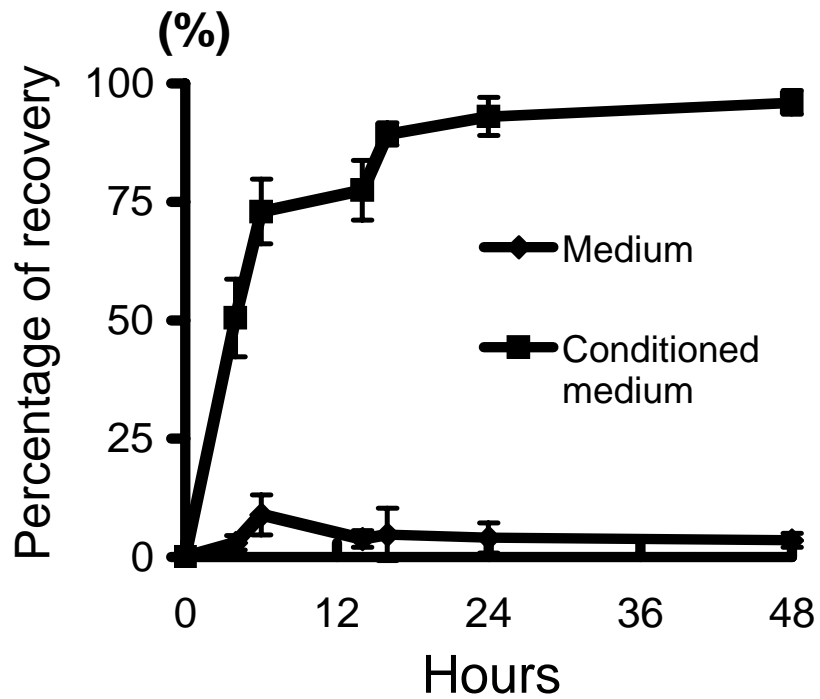


図 12 IJ が Recovery 誘導因子に反応するために必要な時間

168 時間、Sf9 細胞を培養した上清を用いた (RIF)。この上清に IJ を接種し、一定時間後に PBS で洗浄し、新しく用意した PBS 中で実験開始後 48 時間になるまでインキュベートした。

Medium は Control で IPL-41 培地を用いた。

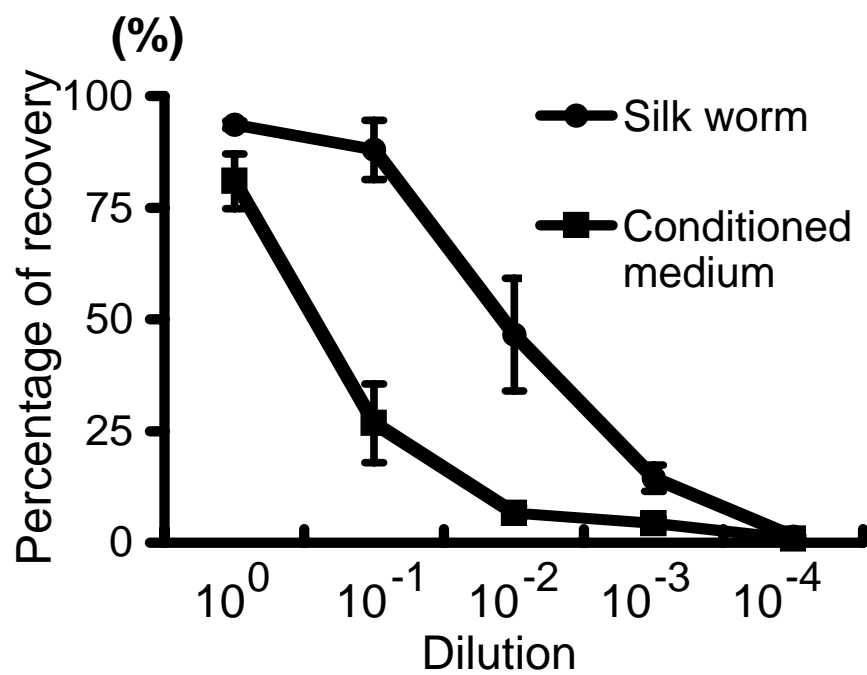


図 13 培養液の Recovery 誘導活性

Silkworm はカイコから得た血清を用いた。RIF は 168 時間、Sf9 細胞を培養した上清を用いた。

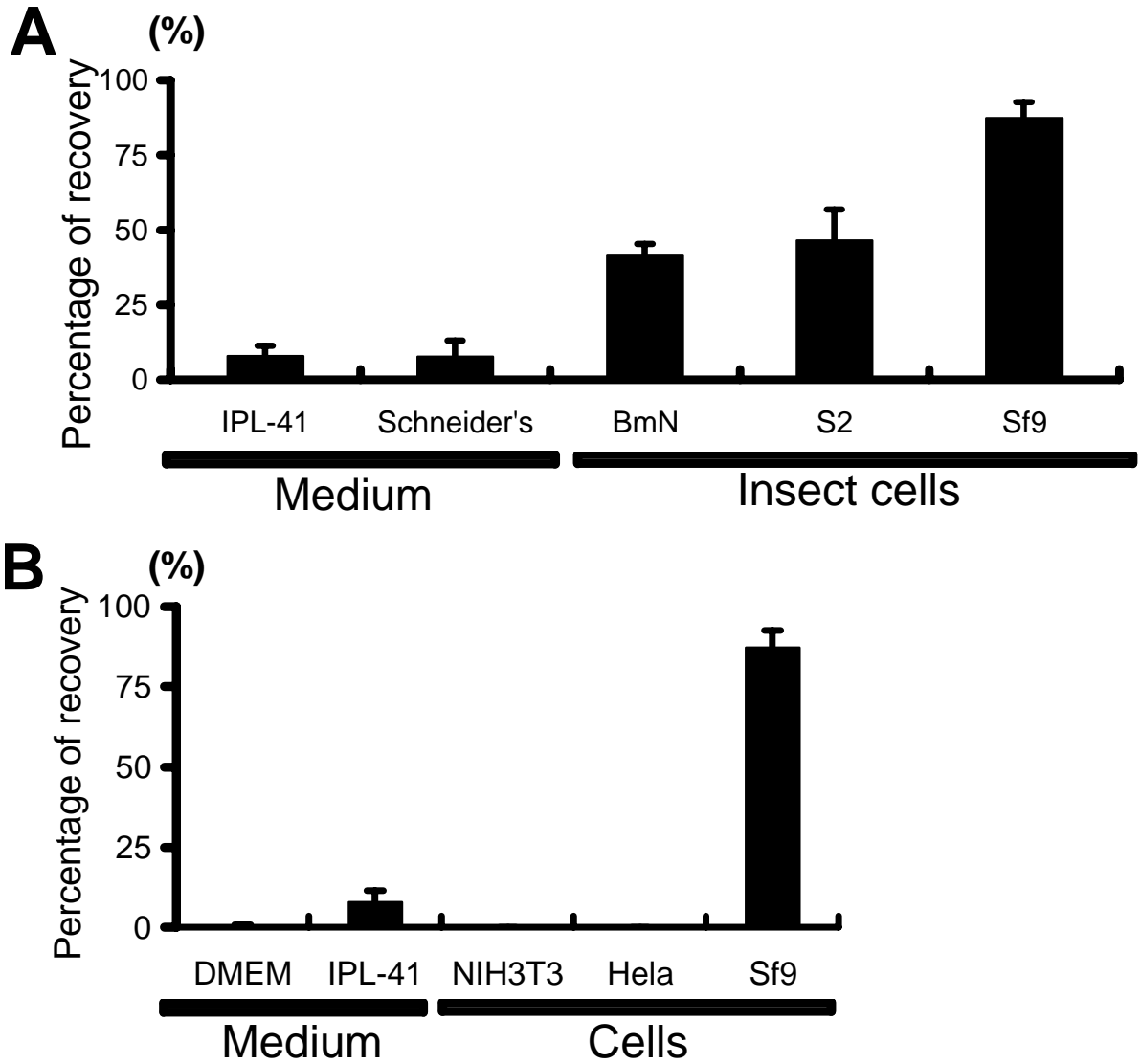


図 14 他の培養細胞系における Recovery

A 昆虫細胞における Recovery

IPL-41, Schneider's は培地のみ。BmN; カイコ由来細胞、S2; キロショウジョウバエ由来細胞、Sf9; ヨトウムシ由来細胞。

B 哺乳類由来の培養細胞における Recovery

DMEM は培地、NIH3T3; マウス由来細胞、Hela; ヒトがん由来細胞。

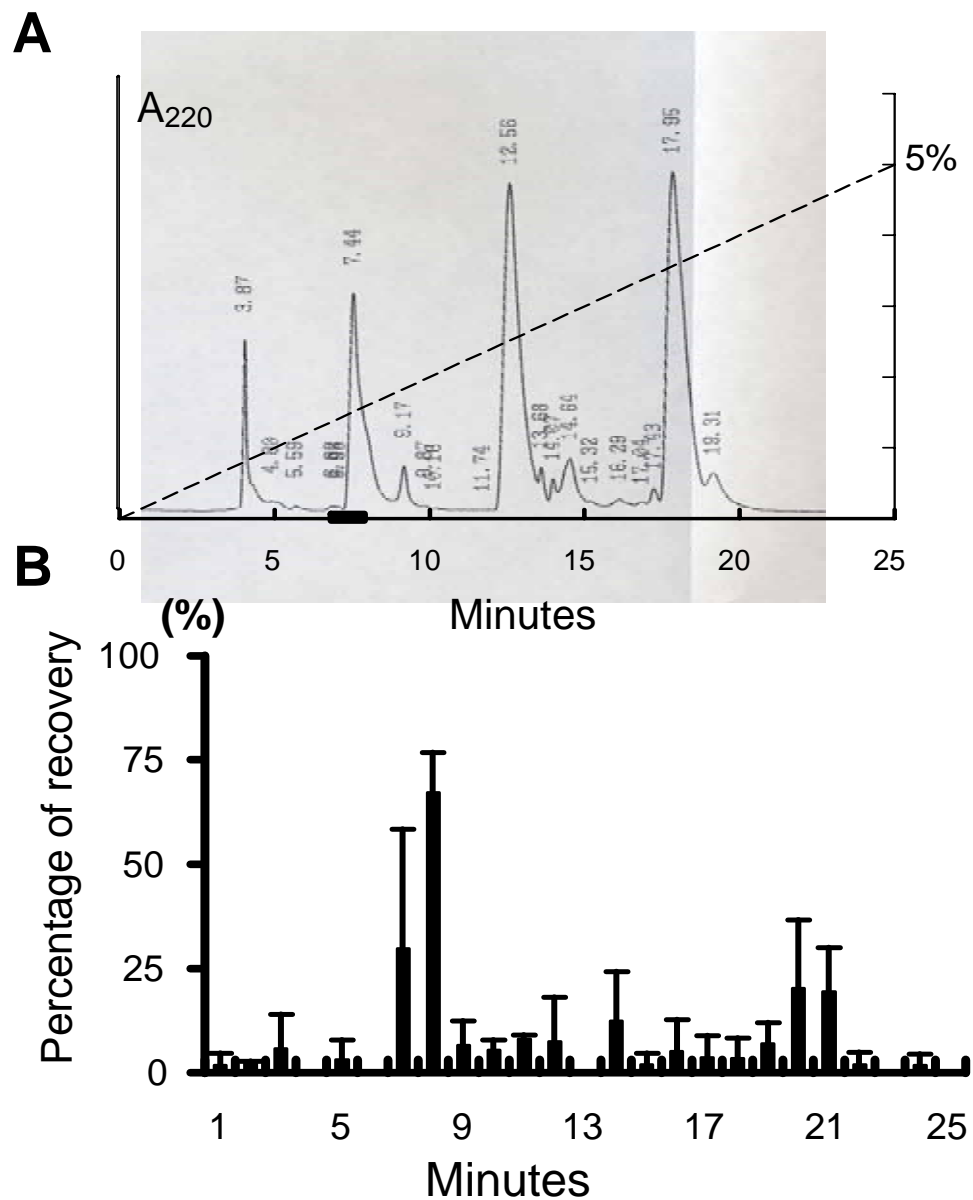


図 15

Recovery 誘導因子の単離

A HPLC で得られたチャート。Bar は回収した分画を示す。

カラム: Lichrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm)、溶媒: DDW 中での 0 - 5% アセトニトリル

流速 1 ml/min、吸光度 A_{220} で測定、サンプル量 10 μ l

B 各フラクションの Recovery assay

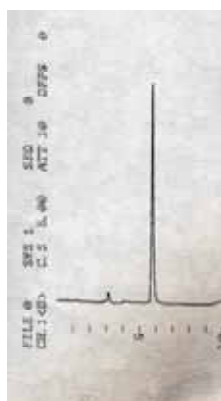
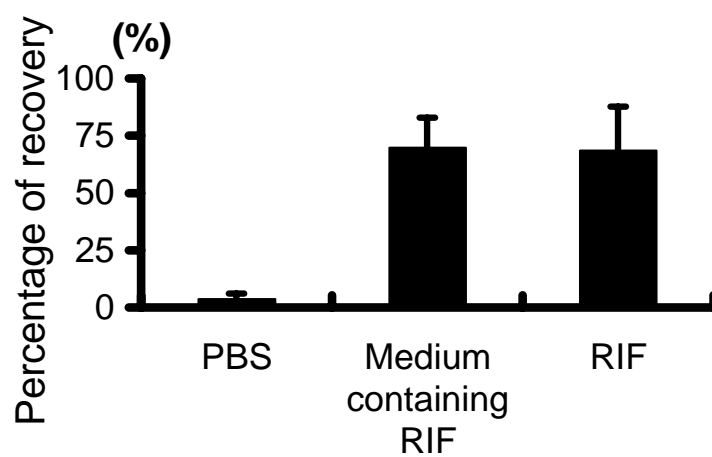
A**B**

図 16

A HPLC 活性ピークの再クロマトグラフ

B Recovery assay

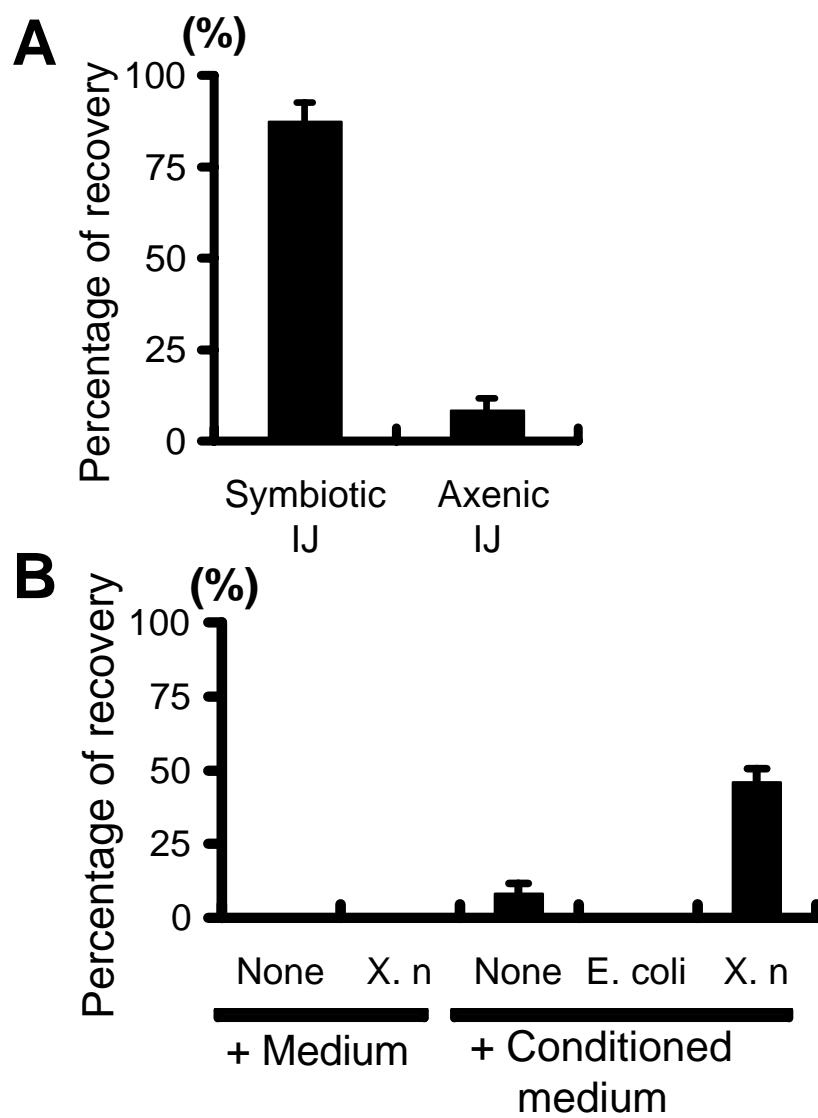
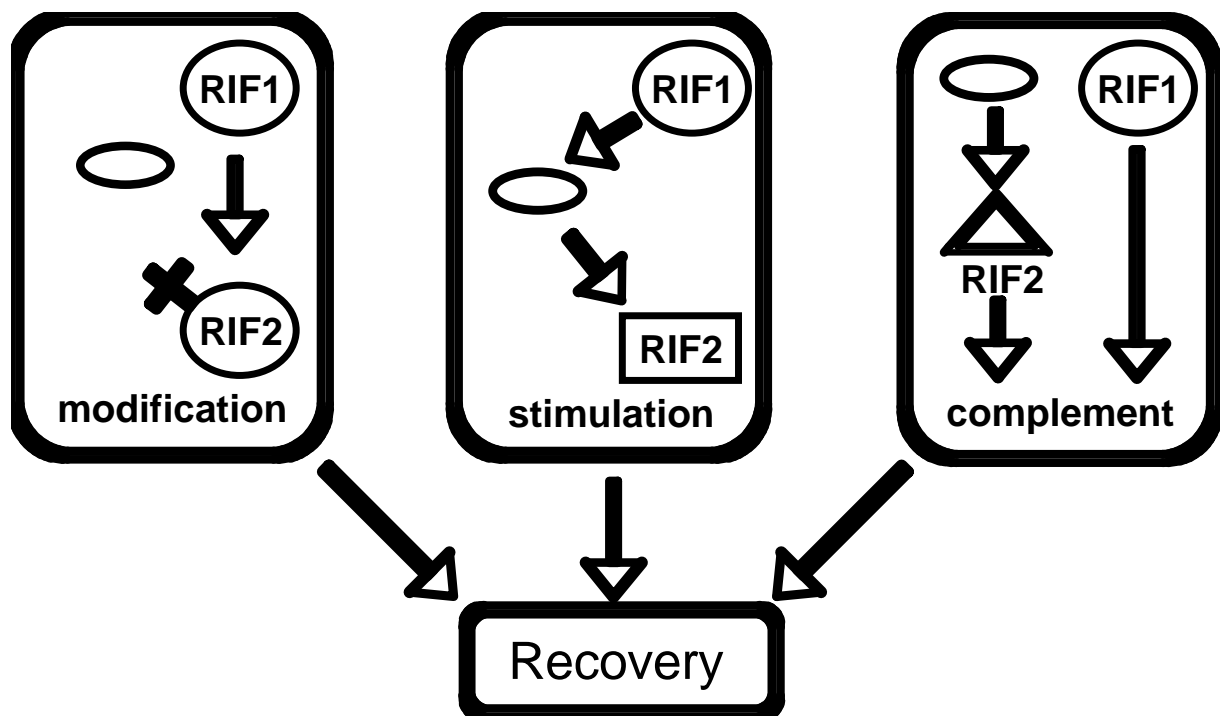


図 17 共生細菌と Recovery の関係

A Axenic IJ における Recovery、B 共生細菌と Recovery 誘導因子の関係性

X. n; 共生細菌 *X. nematophila* を示す。 Conditioned medium; RIF を含む IPL-41 培地



○ : *X. nematophila*を示す
 □ △ : *X. nematophila*によって分泌された因子

図 18 Recovery 誘導メカニズムのモデル

modification; 線虫体内に取り込まれた RIF が共生細菌によって修飾されて活性をもつ。

stimulation; 線虫体内に取り込まれた RIF が共生細菌に作用し、細菌が線虫に Recovery を引き起こす物質を分泌する。

Complement; 昆虫細胞によって産生される RIF と共生細菌が産生する因子の両方が働く。

参考文献

- Ashton, F. T., Li, J., and Schad, G. A. (1999). Chemo- and thermo sensory neuron: structure and function in animal parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology* 84, 297-316.
- Blissard, G. W. (1996). Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20, 73-93.
- Bimby, D. A., link, E. M., Vowels, J. J., Tian, H., Colacurcio, P. L., and Thomas, J. H. (2000). A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 85-104.
- Blaxter, M. L. De ley, P., Garey, J. R., Lui, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A. Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., and Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum nematode. *Nature* 392, 71-75.
- Burnell, A. M. and Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology* 2, 31-42.
- Butcher, R. A., Fujita, M., Schroeder, F. C. and Clardy, J. (2007). Small-molecule pheromones that control dauer development in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Chemical Biology* 3, 420-422.
- Campbell, L. R. and Gaugler, R. (1991). Mechanism for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 21, 219-224.
- Campbell, J., Lewis, E., Yoder, F. and Gaugler, R. (1995). Entomopathogenic nematode (Heterhorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. *Biological Control* 5, 598-606.
- Ciche, T. A. and Ensign, J. C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied Environmental Microbiology* 69, 1890-1897.
- Dolan, K. M., Jones, J. T. and Burnell, A. M. (2002). Detection of changes occurring during recovery from the dauer stage in *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology* 125, 71-81.

- Dutky, S. R., Thompson, J. V. and Cantwell, G. E. (1964). A technique for mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* 6, 417. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biological control*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 153-172.
- Ehlers, R-U. and Shapiro-Ilan, D. I. (2006) Mass Production In: Grewal, P. S., Ehlers, R-U. and Shapiro-Ilan, D. I., (eds.), *Nematodes as biological agents*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp 65-78.
- Ehlers, R-U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K. and Osterfeld, K. H. (1998). Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis*/ *Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 43, 77-86.
- Forst, S. and Neilson, K. (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. And *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews* 60, 1-43.
- Forst, S. and Clarke, D. (2002). Bacteria-nematode symbiosis. In: Gaugler, R. (Eds.), *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 57-77.
- Gaw, Z-Y., Liu, N. T. and Zia, T. U. (1959). Tissue culture methods for cultivation of virus grasserie. *Acta Virologica* 3 (Suppl), 55-60.
- Golden, J. W., and Riddle, D. L. (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218, 578-581.
- Golden, J. W. and Riddle, D. L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effect of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102, 368-378.
- Hallem, E. A., Rengarajan, M. Clche, T. A., and Sternberg, P. W. (2007). Nematodes, Bacteria, and Flies: a tripartite model for nematode parasitism. *Current Biology* 17, 898-904.
- Han, R., and Ehlers, R. U. (2000). Pathogenicity, Development, and Reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under Axenic *in vivo* conditions. *Journal of*

Invertebrate Pathology 75, 55-58.

- Hara, A. H., Lindegren, J. E. and Kaya, H. K. (1981). Monoexonic mass production of the entomogeneous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, on dog/agar medium, USDA/SEA, AAT-W-16. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biological control*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 153-172.
- Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhofer, A. M. and Keskin, N. (2001). Developmental temperature effect on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 243-250.
- Jeong, P. Y., Jung, M., Yim, Y. H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W. Kim. K., and Paik, Y. K. (2005). Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* 433, 541-545.
- Jia, K., Albert, P. S., and Riddle, D. L. (2002). DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* 129, 221-231.
- Kaya, H. K. (1977). Development of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperatures. *Journal of Nematology* 9, 346-349.
- Kaya, H. K. and Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual review of entomology* 38, 181-286.
- Klein, M. G. (1990). Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biological control*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 195-214.
- Kogan, M. (1998). Integrated pest management : Historical perspectives and contemporary developments. *Annual review of entomology* 43, 243-270.
- Kung, S-P., Gaugler, R., and Kaya, H. K. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic persistence. *Journal of Invertebrate Pathology* 57, 242-249.

- Poinar, G. O. Jr. and Thomas, G. M. (1966). Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology* 56, 385-390.
- Poinar, G. O. Jr. and Leutenegger, R. (1968). Anatomy of the infective and normal third-stage juveniles of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Nematoda). *Journal of Parasitology* 54, 340-350.
- Popiel, I., Grove, D. L. and Friedman, M. J. (1989). Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. *Parasitology* 99, 77-81.
- Reape, T. J., and Burnell, A. M. (1990). Enzyme induction in recovering dauer larvae of the nematode *Caenorhabditis elegans* in response to increasing concentrations of food source in the recovery medium. *Biochemical and Biophysical research communications* 172, 1013-1021.
- Riddle, D. L., and Albert, P. S. (1997). In *C.elegans* 2, eds. Riddle, D. L., Blumenthal, Meyer, B. and Priess, J. R. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview. NY). Pp. 739-768.
- Serwe-Rodriguez, J., Sonnenberg, K., Appleman, B., and Bornstein-forst, S. (2004). Effects of host desiccation on development, survival, and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85, 175-181.
- Shapiro-Ilan, D. I., and Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28, 137-146.
- Simard, L., Bélair, G. Gosselin, M-E., and Dionne, J., (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) against *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae), a turfgrass pest on golf courses. *Biocontrol and Science Technology* 16, 789-801.
- Strauch, O. and Ehlers, R-U. (1998). Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. In liquid culture. *Applied*

Microbiology and Biotechnology 50, 369-374.

Timper, P. and Kaya, H. K. (1989). Role of the second-stage cuticle of entomogeneous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 54, 314-321.

Tissenbaum, H. A., Hawdon, J., Perregaux, M., Hotez, P., Guarente, L. and Ruvkun, G. (2000). A Common muscarinic pathway for diapause recovery in the distantly related nematode species *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*. (2000). *Proceeding of the National Academy of Sciences* 97, 460-465.

Unlu I. O., Ehlers, R-U. and Susurluk, A. (2007) Additional data and first record of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri* from Turkey. *Nematology* 9, 1568-5411.

Volgyi, A., Fodor, A., Azentirmai, A. and Forst, S. (1998). Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied Environmental Microbiology* 64, 1188-1193.

Wang, J. and Bedding, R. A. (1996). Population developmental of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental and Applied Nematology* 19, 363-367.

White, G. F. (1927). A methods for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* 66, 302-303.

Wilson, M., Xin, W., Hashmi, S., and Gaugler, R. (1999). Risk assessment and fitness of a transgenic nematode. *Biological Control* 15, 81-87.

要約

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。

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。

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。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。線虫を継代せずに、続けて 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。一方、培地のみに接種した 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。

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。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)、Hela (ヒト) 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。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。次に、共生細菌を RIF と混合して培養し、その上清に 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。

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。

謝辞

研究や生活に関して細かい指導や考え方の御教授をしてくださった永田昌男先生に感謝します。また、青木不学先生には研究に対する姿勢や私の実験に気づかれた点を指摘してくださったことを感謝します。明治大学植物線虫学研究室の小倉信夫先生には線虫を供試してくださったことを感謝します。キイロショウジョウバエ由来 S2 細胞と培地を供試してくださった同専攻分子認識化学分野の片岡宏誌先生、松谷武嗣君に感謝します。資源生物制御学分野の博士課程に在籍する木内隆史さんには昼夜、場所も問わずに話を聞いてくださって感謝します。彼とのディスカッションや培養細胞、実験の組み立てなどなくては、私の研究成果はなかったと思います。また、日頃から当研究室のスタッフ、同期の友人たちに、ディスカッションしていただき、感謝します。昆虫病原性線虫の研究をするにあたって唯一、心良く受け入れてくださった永田先生と先端生命科学専攻に感謝します。