

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	田中 龍聖
題 目	カメムシ随伴が <i>Caenorhabditis japonica</i> 耐久型幼虫の生存に与える影響 (Effects of phoresy on survival of <i>Caenorhabditis japonica</i> dauer larvae)
<p>環境変化に対し、線虫のいくつかの種では休眠や休止状態となり耐性を獲得し生存するものが存在する。休眠は自発的に身体的な活動を一時的に止め運動性はあるものの、代謝を最低限に抑えることであり、線虫では餌を食べずに3カ月程度生存する耐久型幼虫が知られている。休止は、非自発的に身体的な活動が止まり、運動性はなく、代謝が限りなく抑えられ生存するような状態のことであり、線虫では乾燥下で細胞を保護する生理的変化が起こり、数年間生存できる耐無水生存が知られている。</p> <p><i>Caenorhabditis japonica</i> はベニツチカメムシに随伴した生活史を持つ細菌食性線虫である。<i>C. japonica</i> はカメムシ雌成虫上から一年を通して耐久型幼虫が静止して検出されることから、休眠状態である耐久型幼虫がカメムシ上で休止状態になっていることが示唆されるが、その詳細については明らかでない。そこでこの休止状態の詳細と休止状態が生存へ与える影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>カメムシ非随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫の生存性を調べたところ、カメムシ非随伴時の <i>C. japonica</i> は耐久型幼虫であっても水溶液中や土壌中で10日程度と非常に短い生存期間であった。カメムシ非随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫の生存期間が短い要因を明らかにするため、エネルギー源のトリアシルグリセロール(TG)と生物の老化要因である酸化ストレスの影響について調べたところ、<i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は、TG量はわずかな減少にとどまったが、酸化ストレスに非常に弱く、経時的にタンパク質の酸化が増えていた。一方、野外から採取したカメムシを室内で長期間維持したところ、カメムシ随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は3カ月以上生存可能であった。カメムシ随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫の生存期間が長い要因を明らかにするため、体表構造と乾燥耐性とタンパク質の発現について調べたところ、カメムシ随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は耐無水生存型の休止をする線虫とは異なり体の収縮がほとんどなく、乾燥耐性も低かった。また、カメムシ随伴時の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫では抗酸化に関与するものを含む5つの特異的なタンパク質の発現がみられた。</p> <p>以上のことから、<i>C. japonica</i> は休眠ステージである耐久型幼虫であっても酸化ストレスに弱く、生存期間が短い、カメムシに随伴することにより、外界から守られ、自身も耐無水生存とは異なる特異的な休止状態となり、抗酸化を含めた生理的変化が起こり、長期生存できると考えられる。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 . TANAKA RYUSEI

題 目 Effects of phoresy on survival of *Caenorhabditis japonica* dauer larvae  
(カメムシ随伴が *Caenorhabditis japonica* 耐久型幼虫の生存に与える影響)

*Caenorhabditis japonica* is a bacterial-feeding nematode and forms phoretic association with the shield bug *Parastrachia japonensis* showing egg-guarding and provisioning behaviors. Dauer larvae (DL), a non-feeding diapause stage of *C. japonica* are mainly found on adult female bugs throughout the year except for the provisioning period. *C. japonica* DLs seems to survive on the bugs waiting for the next bug's provisioning about 10 months. In this study, I examined the effects of phoretic association with the bug for the survival of *C. japonica* DL. When *C. japonica* DL were kept in M 9 buffer or soil, survival rate dramatically declined within 10 days. Protein carbonyl accumulation significantly increased during incubation and oxidative stress tolerance was significantly lower than that of *C. elegans* DL probably because *C. japonica* DL show very active phoretic behaviors to associate with the bug. On the other hand, when DL associated with the bug were kept in an wooden box, higher survivorship was observed even after 3 months. *C. japonica* DLs on the bugs were in quiescent form and appeared to be partly desiccated, but their lateral alae were not shrunken as seen in anhydrobiotic nematodes. At least five proteins that are abundant in DL associated with the bug were detected.

These results suggest that *C. japonica* DL show short survivorship without associating with bug but are able to extend their survivorship by entering quiescence and being protected from biotic and abiotic factors on the bug.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	田中 龍聖
審査委員	主査 佐 賀 大学 教授 野間口 眞太郎
	副査 佐 賀 大学 准教授 吉賀 豊司
	副査 鹿児島 大学 教授 曾根 晃一
	副査 佐 賀 大学 教授 早川 洋一
	副査 鹿児島 大学 教授 津田 勝男
審査協力者	
題 目	カメムシ随伴が <i>Caenorhabditis japonica</i> 耐久型幼虫の生存に与える影響 (Effects of phoresy on survival of <i>Caenorhabditis japonica</i> dauer larvae)
<p>線虫は地球上でもっとも繁栄している動物のひとつであるが、自身の移動能力は低い。そのため、環境変化に対し、線虫のいくつかの種では休眠や休止状態となり耐性を獲得し生存するものが存在する。休眠は環境変化に対し自発的に身体的な活動を一時的に止めて代謝を最低限に抑える状態であり、線虫では休眠の例として耐久型幼虫が知られている。耐久型幼虫は、代謝を抑え、餌を摂食せずに長期間生存する。休止は、環境変化によって非自発的に身体的な活動や、代謝が限りなく抑えられ生存するような状態のことであり、線虫では休止の例として、耐無水生存が知られている。耐無水生存は、乾燥に曝されることにより生理的変化が起こり、乾燥下で長期生存できるものである。</p> <p><i>Caenorhabditis japonica</i>はベニツチカメムシに随伴した生活史を持つ細菌食性線虫である。<i>C. japonica</i>は、カメムシ雌成虫上から一年を通して耐久型幼虫のステージで検出されることから、休眠状態である耐久型幼虫としてカメムシ上で休止状態になっていることが示唆されるが、その詳細については明らかでない。そこで、カメムシ随伴時および非随伴時の<i>C. japonica</i>耐久型幼虫の生存性の比較</p>	

を行った。その結果、カメムシ非随伴時の *C. japonica* は耐久型幼虫であっても水溶液中や土壌中で 10 日程度と非常に短い生存期間を持ったが、カメムシ随伴時は実験室内で 3 カ月以上生存できることが明らかとなった。

カメムシ非随伴時の *C. japonica* 耐久型幼虫の生存期間を短くする要因を明らかにするため、エネルギー源のトリアシルグリセロール (TG) と生物の老化因子である酸化ストレスの影響について調べた。その結果、*C. japonica* 耐久型幼虫では、TG 量はわずかな減少にとどまった。しかし酸化ストレスの影響は、他の線虫の耐久型幼虫と比較して、非常に大きく現れた。このことより、非随伴時の生存期間の短縮は、*C. japonica* 耐久型幼虫が元々酸化ストレス耐性を持たないことが主な原因の 1 つであると示唆された。

カメムシ随伴時の *C. japonica* 耐久型幼虫の長期生存要因を明らかにするため、体表構造と乾燥耐性とタンパク質の発現について調べたところ、カメムシ随伴時の *C. japonica* 耐久型幼虫は、耐無水生存する他の線虫とは異なり、体の収縮がほとんどなく、乾燥耐性も低かった。しかし、カメムシ随伴時には、カメムシの体表の形態的および生理的環境を利用することで、乾燥を軽減し、さらには微生物の感染も防いでいることが分かった。また、*C. japonica* 耐久型幼虫自身も、抗酸化作用に関与するものを含む 5 つの特異的なタンパク質の発現を上昇させ、生理的にストレス耐性を上昇させている可能性が示唆された。

以上のことから、*C. japonica* は耐久型幼虫であっても酸化ストレスに弱く、生存期間が短い、カメムシに随伴することによって耐久型幼虫は外環境から保護されるとともに、自身も耐無水生存とは異なる休止状態となり、抗酸化を含めた生理的変化が起こることによって、長期生存できると考えられる。

本研究は、*C. japonica* の耐久型幼虫が、カメムシに随伴する場合のみ、長い期間生存できることを明らかにした。これは、一般的な線虫の耐久型幼虫では初めての知見である。そして、長期生存にはカメムシ随伴による外環境からの保護と休止による生理的変化が必要であることを明らかにするとともに、線虫体内では、これまでの線虫の休止とは異なる、新規の生理的休止メカニズムが利用されていることを明らかにした。このメカニズムの解明がさらに進み、応用的な技術に反映されることになれば、生物農薬として利用されている同目の昆虫病原性線虫の保存性の向上や、農作物に害をなす線虫の生存性を低める技術の開発や、生物の老化機構の解明につながるものと考えられる。以上のことにより、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値のあるものと認定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	田中 龍聖
審査委員	主査 佐 賀 大学 教授 野間口 眞太郎
	副査 佐 賀 大学 准教授 吉賀 豊司
	副査 鹿児島 大学 教授 曾根 晃一
	副査 佐 賀 大学 教授 早川 洋一
	副査 鹿児島 大学 教授 津田 勝男
審査協力者	
実施年月日	平成23年 1月27日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成23年 1月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	田中 龍聖
<p>〔質問1〕電子顕微鏡の写真では、ベニツチカメムシ上で固まりになった休止状態の線虫の個体間に油状の物質が存在するが、それはベニツチカメムシが分泌している物質かあるいは <i>C. japonica</i> が分泌している物質か？また、<i>C. japonica</i> が分泌しているとすれば、それは死ぬ過程やあるいはダメージを受けたときの分泌物質である可能性はないか？</p>	
<p>〔回答1〕<i>C. japonensis</i> が分泌しているものであると考えている。また、休止状態から回復した線虫の生存率は高いので、死ぬときやダメージを受けたときの分泌物質とは考えにくい。</p>	
<p>〔質問2〕ベニツチカメムシ上に便乗していないとき、酸化ストレスがかかるということであるが、他の線虫でもそのようなことがあるのか？またそのような線虫でも同じようにSODの発現があるのか？</p>	
<p>〔回答2〕他の線虫でも、酸化ストレスおよびSODの発現があることが知られている。しかし、<i>C. japonica</i> ではベニツチカメムシに便乗したときだけ、SODが発現し、単に耐久型幼虫になっただけではその発現はない。よって、随伴特異的な線虫側の反応であると言える。</p>	
<p>〔質問3〕<i>C. japonica</i> がベニツチカメムシに乗る時期はいつか？</p>	
<p>〔回答3〕ちょうどベニツチカメムシの繁殖のときである。梅雨で湿度の最も高い時期になる。</p>	
<p>〔質問4〕線虫が耐無水生存をするとき、一般的に、状態特異的に生産する物質としてトレハロースが知られているが、なぜ <i>C. japonica</i> は油を生産するのか？</p>	
<p>〔回答4〕理由はよく解らないが、他の線虫でも昆虫に便乗するとき油が分泌されるという報告があり、それほど珍しいことではないと思われる。</p>	
<p>〔質問5〕ベニツチカメムシに便乗したとき、線虫が極端な脱水状態に陥るのを防ぐ仕組みがあるのではないか？</p>	
<p>〔回答5〕確かに、カメムシ自体の体表ワックスや翅の構造から、線虫にとって体表付近の湿度があまり下がりにくくなっている可能性は大きいと考えられる。</p>	
<p>〔質問6〕<i>C. japonica</i> がベニツチカメムシ上でとる休止状態は、通常の線虫における極端な環境悪化に対応する休止状態とは根本的に異なる、特異的な休止状態と言ってよいのではないか？</p>	
<p>〔回答6〕確かに、そのとおりである。<i>C. japonica</i> の場合、ベニツチカメムシ上で休止状態にあった個体を取り出し、活性状態にさせ、再びベニツチカメムシに乗せると、休止状態に戻る。これは他の線虫の耐久型幼虫では見られない、特異的な現象である。これには、<i>C. japonica</i> がベニツチカメムシに乗っているときに受ける、軽度の乾燥やその他の影響が重要な働きをしているものと考えられる。</p>	
<p>〔質問7〕ベニツチカメムシ上で <i>C. japonica</i> の休止を誘導する物質として、二酸化炭素の可能性は考えられないか？</p>	
<p>〔回答7〕十分に可能性はある。一般的に、二酸化炭素は線虫の行動に影響を与える物質であるということが知られている。</p>	
<p>〔質問8〕線虫が休止状態のとき、内部形態に変化はないのか？</p>	
<p>〔回答8〕大きな変化は認められなかった。</p>	
<p>〔質問9〕線虫にとっての弱い乾燥あるいは強い乾燥とはどのようなことか？</p>	
<p>〔回答9〕一般的に、弱い乾燥とは湿度97%程度であり、強い乾燥とはそれ以下の湿度のときを言う。</p>	