

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	奥村 悦子
題 目	<p><i>Caenorhabditis japonica</i> における、ベニツチカメムシへの種特異的および偏雌的便乗行動に関する研究</p> <p>(Studies on the species-specific and female-biased phoretic behavior of the nematode <i>Caenorhabditis japonica</i> to its host insect <i>Parastrachia japonensis</i>)</p>
<p>細菌食性線虫 <i>Caenorhabditis japonica</i> は、亜社会性昆虫ベニツチカメムシ雌成虫の体表面に、摂食せずに長期間生存可能な耐久型幼虫の状態が付着し、便乗関係を持つと考えられる。本研究では <i>C. japonica</i> がベニツチカメムシに遭遇し、ベニツチカメムシに特異的に便乗する機構ならびに <i>C. japonica</i> が増殖のためにベニツチカメムシから離脱する機構の解明を目指した。</p> <p><i>C. japonica</i> では、ニクテイションと呼ばれる宿主探索行動を示す耐久型幼虫が負の走地性を示し、有意に上方へ移動することが明らかとなった。この行動によって、土壤中で増殖して出現した <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は、地表面へ移動し、地上を徘徊するベニツチカメムシに遭遇する機会を高めることが示唆された。オルファクトメーターを用いた実験では、<i>C. japonica</i> 耐久型幼虫はベニツチカメムシのにおいを含む空気の方角へ有意に移動した。このにおいを回収して分析したところ、ベニツチカメムシ特異的と思われる物質が検出された。また、人工便乗実験によって、<i>C. japonica</i> 耐久型幼虫はベニツチカメムシ特異的に便乗することが明らかとなった。さらに、ベニツチカメムシのヘキサノ体表面物質に対する有意な誘引・定着が確認された。他種のカメムシや節足動物を使用した場合には、人工便乗実験での便乗は見られず、また体表面抽出物質への誘引・定着は見られなかった。一方、便乗実験や誘因実験では、ベニツチカメムシ雌雄間で有意な差は見られなかった。以上のことより、<i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は、においや接触した時の体表面物質を認識し、ベニツチカメムシ特異的に付着し、長期間の休止状態へ移行することが示された。また、雌に偏った便乗は、誘因性の違いによるものではないことが示唆された。一方、ベニツチカメムシからの離脱実験では、ベニツチカメムシ上の <i>C. japonica</i> 耐久型幼虫は高湿度下で運動性を回復後、ベニツチカメムシ孵化幼虫の存在下で離脱する個体が増加した。このことから、<i>C. japonica</i> は便乗後、ベニツチカメムシの繁殖期にあたる梅雨に、土壤中のベニツチカメムシ巢内で高湿度に曝されるとともに、カメムシのふ化を刺激として離脱し、巢内にあるカメムシの摂食後の栄養卵などを利用して増殖していることが示唆された。</p> <p><i>C. japonica</i> は、宿主探索行動および宿主認識機能を発達させることによって、ベニツチカメムシと種特異的な便乗関係を構築したと考えられる。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Etsuko Okumura
題 目	Studies on the species-specific and female-biased phoretic behavior of a nematode <i>Caenorhabditis japonica</i> to its host insect <i>Parastrachia japonensis</i> (<i>Caenorhabditis japonica</i> における、ベニツチカメムシへの種特異的および偏雌的便乗行動に関する研究)

Bacteriophagous *Caenorhabditis japonica* forms a phoretic association with the burrower insect *Parastrachia japonensis*. *C. japonica* dauer larvae (DL), a phoretic stage of the nematodes, are mainly found on adult *P. japonensis* females but no other species. The aim of the present study is to elucidate the mechanisms of species-specific and female host-biased ectophoresy as well as mechanisms of disembarkation from its host insect in *C. japonica*.

Behaviors of *C. japonica* DL to associate with *P. japonensis* were studied. *C. japonica* DL showed negative gravitaxis, which enhanced upward movement. In the experiments using an olfactometer, *C. japonica* DL significantly migrated toward the direction of odor from *P. japonensis* but not toward from other insects tested. Analysis of odors using a GC-MS suggested the presence of *P. japonensis*-specific odors. In the loading experiments, *C. japonica* DL embarked onto *P. japonensis* but not other invertebrates tested. There was no difference in association between the sexes of *P. japonensis*. In the chemoattraction experiments, *C. japonica* DLs were significantly attracted to hexane-extracts from *P. japonensis* but not from other invertebrates. Hexane-extracts from *P. japonensis* arrested the dispersal of *C. japonica* DL when they touched to the extracts but those from other invertebrates did not. There was no difference in chemoattraction to the sexes of *P. japonensis*. These results indicate that newly produced *C. japonica* DL migrate to the soil surface by using negative gravitaxis, which increases the opportunity to encounter their host insect wandering the soil surface. *C. japonica* DL recognize and move to *P. japonensis* using odors from the insects, embark onto *P. japonensis*. Female-biased phoresis seems not to be caused by the difference in sexual attraction to the sexes of *P. japonensis*.

For disembarkation from *P. japonensis*, high humidity resumed the mobility of *C. japonica* DL on *P. japonensis* but it was not enough cue for disembarkation and many DL stayed on *P. japonensis*. Among the conditions tested, disembarkation was significantly increased in the presence of *P. japonensis* nymphs. These results suggest that quiescent DL recover their mobility under high humidity in the nest of *P. japonensis* in the litter, and then the presence of nymphs after hatching stimulates the disembarkation.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	奥村悦子
審査委員	主査 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 野間口 眞太郎
	副査 鹿児島大学 准教授 坂巻 祥孝
	副査 佐賀大学 准教授 徳田 誠
審査協力者	
題目	<p>Studies on the species-specific and female-biased phoretic behavior of the nematode <i>Caenorhabditis japonica</i> to its host insect <i>Parastrachia japonensis</i></p> <p>(<i>Caenorhabditis japonica</i>における、ベニツチカメムシへの種特異的および偏雌的便乗行動に関する研究)</p>
<p>細菌食性線虫 <i>Caenorhabditis japonica</i> はベニツチカメムシと種特異的および雌宿主特異的な便乗関係をもつ。その特殊な便乗が成立する機構を解明することを目的に、便乗ステージである耐久型幼虫を用いて研究を行った。</p> <p>土壌表面を徘徊するベニツチカメムシに便乗する確率を高めるには、<i>C. japonica</i> は土壌表面へ移動し、宿主と出会う機会を増やす必要がある。そこで、土壌中から表面へ移動する機構として、<i>C. japonica</i> は上方への移動を行うために負の走地性を示すのではないかと仮定し、実験を行った。ニクテーションと呼ばれる宿主探索行動を示している個体は、有意に上方向への移動がみられ、負の走地性を示すことが明らかになった。また、この負の走地性は、線虫の生理状態などの影響を大きく受けることが示唆された。</p> <p>これまでベニツチカメムシ以外の動物からは <i>C. japonica</i> は野外で検出されていないこと、またベニツチカメムシの雄成虫ではほとんどみられず、雌成虫上に偏ってみられることから、<i>C. japonica</i> はベニツチカメムシを特異的に認識していることが予想された。そのため、ベニツチカメムシへの特異的誘因性について検討した。</p>	

先ず, *C. japonica* はベニツチカメムシに効率よく到達できるためにカメムシのにおいを利用できるのではないかと仮定し, オルファクトメーターを作成し, においに対する反応を調べた. その結果, ベニツチカメムシのにおいに対しては *C. japonica* は反応し, 定位したが, 他のカメムシやバッタなど, また二酸化炭素に対しては反応を示さなかった. ベニツチカメムシ特異的なにおいを検討するため, ベニツチカメムシ特異的なにおい成分の検出を試みたところ, 少なくとも7成分が検出された. また, *C. japonica* がベニツチカメムシに接触した際に正しい宿主として体表面物質を認識しているのではないかと仮定し, カメムシ体表面のヘキササン抽出物に対する反応を調べたところ, *C. japonica* はベニツチカメムシの抽出物質に対して誘引されたが; 他のカメムシやダンゴムシの抽出物質に対しては誘因性がみられなかった. さらに, 人工的便乗実験を行ったところ, *C. japonica* はベニツチカメムシに有意に多く便乗し, 他のカメムシやダンゴムシに対してはほとんど便乗しなかった. 一方, ベニツチカメムシの雌雄間の比較を行ったところ, 人工便乗実験ならびに誘因実験ともに有意な差はみられなかった. 以上のことから, *C. japonica* はベニツチカメムシのにおいならびに体表面物質を特異的に認識し, 定位するとともに便乗のキューとして利用していることが予想された. また, 雌に偏った便乗は, 誘因性の違いによるものではないことが明らかになった.

ベニツチカメムシに便乗した *C. japonica* がカメムシ巢内で離脱する要因を明らかにするため, 人工のカメムシ巢を作成し, 条件の検討を行った. 梅雨時期にリター中に存在するベニツチカメムシの巢を模して, 高湿度条件での離脱を調べたところ, 高湿度だけでは一部の離脱しか起こらず, 餌として大腸菌を入れた場合にも離脱は促進されなかった. 一方, ベニツチカメムシの幼虫存在下では最も離脱が促進された. このことから, *C. japonica* はベニツチカメムシの巢内の高湿度条件下で, 運動性を回復し, 一部が離脱するが, カメムシ卵のふ化によって出現した幼虫の存在によって離脱が促進されることが明らかとなった.

本研究は, *C. japonica* を用いて宿主探索ならびに離脱という便乗に必要な行動について調査し, これまで線虫では知られていなかった負の走地性の存在, 宿主特異的な便乗関係, 種特異的なカイロモンの存在, 離脱キューの存在を初めて明らかにしたものであり, 学術的にも非常に意義がある. また, 本研究の研究結果は, これまであまり解明されてこなかった寄生性線虫の宿主探索行動を理解し, 解明していく上でも大きな知見となりうる. 以上のことより, 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	奥村悦子
審査委員	主査 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 野間口 眞太郎
	副査 鹿児島大学 准教授 坂巻 祥孝
	副査 佐賀大学 准教授 徳田 誠
審査協力者	
実施年月日	平成25年 1月 17日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成25年1月17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	奥村悦子
<p>[質問1] カメムシ幼虫存在下で線虫が離脱する際に、具体的にどのような刺激が必要と考えているか？</p> <p>[回答1] 物理的・化学的・生物的刺激が考えられるが、幼虫は活発に摂食し、代謝するため幼虫の出すにおいなどの化学的・生物的刺激が大きいと考える。</p> <p>[質問2] 離脱する際に雌カメムシが忌避物質を出すなど、カメムシ側の要因は関係しないのか？</p> <p>[回答2] 体表面物質に対する誘因性を調べても、離脱後の雌カメムシの体表面物質に対する誘因性は高く、雌カメムシの生理的変化の可能性は否定できないが、それによる影響は少ない。そのため、より強い幼虫からの誘因因子によって離脱が生じると考えている。</p> <p>[質問3] カメムシから離脱した線虫はどこに分布しているのか？</p> <p>[回答3] カメムシ巢内で増殖し、また、巢の周辺土壌表面にあるボロボロノキの実でも検出されることから、カメムシの巢およびその周辺に分布している。</p> <p>[質問4] カメムシに乗れなかった線虫はどうなるのか？</p> <p>[回答4] 土壌中での生存性が低いことから、死亡すると考えている。一方、カメムシに乗った線虫はカメムシ上でストレスから守られ、長期生存できると考えられる。</p> <p>[質問5] カメムシ上の線虫の個体間での競争はないのか？</p> <p>[回答5] 一斉に離脱が起こらないことなどを考えると、線虫個体間での競争はあるのではないかと考える。</p> <p>[質問6] カメムシから離脱して増殖する際にどのようなメリットがあるかと考えるか？</p> <p>[回答6] 昆虫死体や共生細菌、卵など、カメムシの巢にはタンパク質や脂質に富んだものが存在するため、このようなものを栄養源として優先的に利用することで、他の競争種より多くの子孫を残せるという大きなメリットがあると考えている。</p> <p>[質問7] ガンマ分布しているものに対してANOVAを用いているのはよくない。ノンパラメトリックな方法を用いるべき。</p> <p>[回答7] 修正します。</p> <p>[質問8] 本論文では、カメムシ上での保護も含めて線虫とカメムシの関係を便乗と呼んでいるが、この用語は適切か？</p> <p>[回答8] 現在のところ他に適切な用語はない。今後、新たな用語を検討し、提案していく必要があると考えている。</p> <p>[質問9] カメムシの雄雌間で便乗線虫数に違いがある原因はどう考えるのか？</p> <p>[回答9] 実験結果から、誘因性には関係がないと考えている。雄と雌では体サイズに違いがあり、小さい雄上では乾燥に曝されやすいために雄上の線虫は死亡すると考えている。または、行動的に雄雌間で違いがあるのかもしれない。</p>	