

2022 年度
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	新屋 良治
研究機関名	明治大学
所属部署名	農学部
役職名	専任准教授
研究課題名	線虫化学コミュニケーションの理解と寄生線虫防除への応用
研究実施期間	2022 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日

研究成果の概要

(1) 線虫頭部神経配置の理解

モデル生物であり頭部神経配置が理解されている *Caenorhabditis elegans* と植物寄生線虫は形態および頭部神経配置が大きく異なることから、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、マツノザイセンチュウ及びオキナワザイセンチュウ頭部神経系の空間的配置を明らかにする必要がある。まず定法である化学固定法によって、線虫を固定した後、連続超薄切片の作製を行い線虫頭部の TEM 撮影を行った。続いて、得られた連続切片をもとに三次元再構成図を作製した。しかしながら、従来から用いられてきた化学固定法による固定では、固定液の十分な浸透が得られず、微細な神経構造を理解するに十分な高解像度の TEM 画像を得ることができなかった。そこで、試料作製手順を検討し、凍結置換装置 (Leica EM AFS2) にて固定液 (1%オスミウム in アセトン) と置換する手法 (高圧凍結法) を新たに使用した。その結果、神経樹状突起のトレースが可能であるほどの高解像度の画像の取得に成功した。

(2) 線虫への遺伝子導入技術の確立

オキナワザイセンチュウにおける高効率且つ安定的な遺伝子導入技術を確立するために、抗生物質であるハイグロマイシン B を用いたスクリーニング条件の検討を行った。5~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の様々な濃度のハイグロマイシン B に線虫を浸し、24 時間インキュベーションした後の死亡率を測定した。その結果、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が 100%の致死率を生じさせる最低濃度であることが明らかになり、今後本条件を用いて形質転換体線虫のスクリーニングを行うこととした。続いて、ハイグロマイシン B 抵抗性遺伝子と GFP 配列を含むプラスミドベクターを作成し、オキナワザイセンチュウのプロモーター配列を in fusion cloning 法により挿入した。作製したプラスミドを用いてパーティクルガンを実施したところ、Po 世代での GFP 発現は確認できた。