

2020 年度

博士学位論文

マリーゴールド由来殺線虫物質  $\alpha$ -terthienyl の分子遺伝学的作用解析

**Molecular genetics of nematicidal action of the marigold exudate  $\alpha$ -terthienyl**

中部大学大学院

応用生物学研究科 応用生物学専攻

浜口 昂大

## 目次

略語一覧.....	3
Introduction .....	7
第1章 <i>Caenorhabditis elegans</i> と <i>Meloidogyne incognita</i> に対する $\alpha$ -terthienyl の殺線虫 活性評価.....	15
1.1. 背景.....	15
1.2. 材料と方法.....	16
1.3. 結果.....	18
1.4. 考察.....	20
1.5. 図.....	30
第2章 $\alpha$ -terthienyl に対する <i>C. elegans</i> の解毒代謝応答.....	32
2.1. 背景.....	32
2.2. 材料と方法.....	34
2.3. 結果.....	37
2.4. 考察.....	40
2.5. 図.....	53
2.6. 表.....	70
第3章 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性と <i>gst</i> 発現異常変異体の表現型との関係.....	72
3.1. 背景.....	72
3.2. 材料と方法.....	73
3.3. 結果.....	75
3.4. 考察.....	78
3.5. 図.....	87
第4章 総括.....	100
謝辞.....	101
引用文献.....	102

## 略語一覧

- OH : ヒドロキシラジカル hydroxyl radical
- 1,3-D : 1,3-ジクロロプロペン dichloropropene
- $^1\text{O}_2$  : 一重項酸素
- 6PGDH : 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ 6-phosphogluconate dehydrogenase
- ABC transporter : ATP 結合カセット輸送体 ATP-binding cassette transporter
- AChE : アセチルコリンエステラーゼ acetylcholinesterase
- $\alpha$ -terthienyl アルファ-ターチ (テルチ) エニル : 2,2':5',2''-Terthiophene
- APX : アスコルビン酸ペルオキシダーゼ ascorbate peroxidase
- ARE : 抗酸化剤応答配列 antioxidant response element
- ATTKL1 : *Arabidopsis thaliana* トランスケトラーゼ transketolase-1
- BBT : 5- (3-buten-1-ynyl) -2,2'-bithienyl
- BBTOAc : 5- (4-acetoxy-1-butynyl) -2,2'-bithienyl
- BBTOH : 5- (4-hydroxy-1-butynyl) -2,2'-bithienyl
- BPT : 2- (but-3-en-1-ynyl) -5- (penta-1,3-diynyl) -thiophene
- BRAP : Breast cancer 1 (BRCA1) -associated protein
- bZip : ベーシックロイシンジッパー basic leucine zippe
- Cas : CRISPR-associated
- CeWDR-23 : *Caenorhabditis elegans* の WDR-23
- ChE : コリンエステラーゼ cholinesterase
- CLSM : 共焦点レーザー顕微鏡 confocal laser scanning microscope
- CN : シストセンチュウ cyst nematode
- CNC : cap'n'collar
- CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats
- CTL : カタラーゼ catalase
- CYP : シトクロム cytochrome P450
- DAF : abnormal dauer formation
- dauer : 耐久型幼虫 dauer larva
- DCF-DA : 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸 dichlorofluorescein diacetate
- DDB : DNA binding protein
- DDT : dichloro diphenyl trichloroethane
- DIC : ノマルスキー微分干渉顕微鏡 differential interference contrast microscope
- DMSO : ジメチルスルホキシド dimethyl sulfoxide

EC<sub>50</sub> : 半数効果濃度 Effective Concentration 50  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸 ethylenediaminetetraacetic acid  
EGF : 上皮成長因子 epidermal growth factor  
EMS : エチルメタンサルホン酸 ethyl methanesulfonate  
EOR : egg-laying defective-1 (egl-1) suppressor  
EPN : 昆虫病原性線虫 entomo-pathogenic nematode  
EU : 欧州連合 European Union  
EZR : Easy R  
FAO : 国際連合食糧農業機関 Food and Agriculture Organization of the United Nations  
*G. pallida* : ジャガイモシロシストセンチュウ  
*G. rostochiensis* : ジャガイモシストセンチュウ  
G6PD : グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ glucose-6-phosphate dehydrogenase  
GCK : germinal center kinase  
GDH : グルタミン酸デヒドロゲナーゼ glutamate dehydrogenase  
*gep* 変異体 : *gst* 発現異常変異体 abnormal *gst* expression mutant  
GFP : 緑色蛍光タンパク質 green fluorescent protein  
GPX : グルタチオンペルオキシダーゼ glutathione peroxidase  
GSH : 還元型グルタチオン glutathione  
GSSG : 酸化型グルタチオン  
GST : グルタチオン S-トランスフェラーゼ glutathione S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 過酸化水素 hydrogen peroxide  
HPGDS : ヒト造血器型プロスタグランジン D 合成酵素 hematopoietic prostaglandin D synthase  
*hyp* : 下皮 (細胞) hypodermis (cell)  
IC<sub>50</sub> : 半数阻害濃度 median inhibitory concentration  
IPM : 総合的病害虫 (有害生物) 管理 Integrated Pest Management  
IPTG : イソプロピル-β-D (-) -チオガラクトピラノシド Isopropyl-β-D (-) -thiogalactopyranoside  
J2 : 第 2 期幼虫 second stage juvenile  
Keap1 : ケルチ様 EHC 関連タンパク質 Kelch-like-ECH-associated protein 1  
L1 : 第 1 期幼虫 first stage larvae  
L2 : 第 2 期幼虫  
L3 : 第 3 期幼虫  
L4 : 第 4 期幼虫  
LC<sub>50</sub> : 半数致死濃度 Lethal Concentration 50  
LD<sub>50</sub> : 半数致死量 Lethal Dose 50

*M. arenaria* : アレナリアネコブセンチュウ  
*M. hapla* : キタネコブセンチュウ  
*M. incognita* : サツマイモネコブセンチュウ  
*M. javanica* : ジャワネコブセンチュウ  
MDA : モノデヒドロアスコルビン酸 monodehydroascorbate  
MDH : リンゴ酸デヒドロゲナーゼ malate dehydrogenase  
MDHAR : モノデヒドロアスコルビン酸レクターゼ monodehydroascorbate reductase  
N2 : *C. elegans* 野生型 Bristol strain  
NAD (P) H : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (リン酸) nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)  
NGM : nematode growth medium  
NLS : 核移行シグナル nuclear localization signal  
Nrf : NF-E2-related factor  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : スーパーオキシド superoxide  
OP50 : *Escherichia coli* OP50 株  
Ov-GST-3 : 回旋糸状虫 *Onchocerca volvulus* の GST-3  
*P. penetrans* : キタネグサレセンチュウ  
PA : ピロリジジンアルカロイド pyrrolizidine alkaloid  
PSMO : 多基質モノオキシゲナーゼ polysubstrate monooxygenase  
POD : ペルオキシダーゼ peroxidase  
PPN : 植物寄生性線虫 plant parasitic nematode  
PPP : ペントースリン酸経路 pentose phosphate pathway  
PRDX : ペルオキシレドキシシン peroxiredoxin  
PWD : 松枯れ病 pine wilt disease  
PWN : マツノザイセンチュウ pine wood nematode  
RFP : 赤色蛍光タンパク質 red fluorescent protein  
RKN : ネコブセンチュウ root-knot nematode  
RLN : ネグサレセンチュウ root-lesion nematode  
RNAi : RNA 干渉 interference  
ROS : 活性酸素種 reactive oxygen species  
Sf-21 : 鱗翅目卵巣細胞 lepidopteran ovarian cell  
SKN : skinhead family member  
SL : セスキテルペンラク トン sesquiterpene lactone  
SNB : synaptobrevin  
SOD : スーパーオキシドジスムターゼ superoxide dismutase

*T. erecta* : アフリカンマリーゴールド  
*T. minuta* : ワイルドマリーゴールド (シオザキソウ)  
*T. patula* : フレンチマリーゴールド  
*T. tenuifolia* : メキシカンマリーゴールド (テヌイフォリア)  
*Tagetes* spp. : マリーゴールド marigold  
Tn5B1-4 : 鱗翅目卵巣細胞 lepidopteran ovarian cell  
TNT : トリニトロトルエン 2,4,6-trinitrotoluene  
UGT : UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ glucuronosyl transferase  
UV : 紫外線 ultraviolet  
WDR : WD40 リPEATタンパク質 repeat protein  
WNK : with no lysine (K)  
XOD : キサンチン-オキシダーゼ xanthine-oxidase

## Introduction

爆発的な人口問題を抱える中で、品種改良や化学肥料を用いた「緑の革命 Green Revolution」により、農作物の大量生産が可能になった現代、植物は我々が消費する食物の 80 (%) を占める一方、食用作物の 40 (%) が病気や病害虫によって失われているとされ、気候変動や人間の経済活動による病原体の拡散も重なり、植物保護の重要性がますます高まっている (FAO, 2019; Pingali, 2012)。作物は 23,000 年前には栽培されていたとされるが (Snir et al., 2015)、植物の病変も古くから知られており、世界最古の記録は、752 年の孝謙天皇の和歌 (植物ウイルス) とされる (井上, 1983; Saunders et al., 2003)。19 世紀半ばにアイルランドで発生したジャガイモ飢饉 Irish potato famine も疫病菌 (*Phytophthora infestans*) が原因であり (Haas et al., 2009)、日本における、寛正 (1460 年) といった大飢饉も、天候異常による病害虫の大発生が原因の一つで、特に享保 (1732 年) は、ウンカ (イネの害虫) の大発生により 100 万人が餓死したとも言われている (中島, 1974; 岡本, 1992)。農薬に関する最古の記録は、「家伝殺虫散」(1600 年) とされるが、江戸時代の多くの防除法は不安定で、害虫が発生しても、神頼みするか、労力をかけて手で取るしか対処法がなかったため、次第に薬剤防除が望まれるようになった (岡本, 1953, 1992)。享保飢饉を契機に、ウンカの注油駆除も普及したとされる (岡本, 1992)。しかし、現代に続く農薬の基盤ができるには、明治まで待たなければならなかった (大田, 2013)。

人口増加に対応するため、労働時間を削減し、限りある農地で効率的に収量を確保するには、農薬は不可欠である (Nishimoto, 2019)。世界の農薬市場額は年間 500-600 億 US ドル、成長率は 3.8 (%) と言われており、今後も成長していくと考えられている (Nishimoto, 2019; Phillips McDougall, 2018)。生物農薬市場は全体の 5.6 (%) にとどまっている (Nishimoto, 2019)。また、日本全体の農薬

市場額は約 3,700 億円である (廣岡, 2019)。しかし、規制強化により開発費が年々増加しており、十数万化合物に 1 つとも言われる新規剤の開発には、平均 2.86 億 US ドル、11.3 年の期間を要すとされ、農薬開発は厳しさを増している (Nishimoto, 2019; Phillips McDougall, 2016)。

植物寄生性線虫 Plant parasitic nematode (PPN) は世界で最も深刻な農業病害虫であるとされ、ナス科 (トマト、ジャガイモ、コショウ等) のような経済的に重要な幅広い作物種に寄生し (Sato et al., 2019)、農業被害額は世界で年間 800-1000 億 US ドルと推定されている (Degenkolb and Vilcinskis, 2016; Jones et al., 2013; Oka et al., 2000)。線虫による損失は収量全体の 12.3 (%) に相当する (Singh et al., 2015)。線虫は地球上で最も多く生息する動物であると言われており、三胚葉性・左右相称の線形動物 Nematoda 門に属し、土壌コミュニティにおいても主要な位置を占めている (Bardgett et al., 2014; Ishibashi, 2002; van den Hoogen et al., 2019)。最近の研究では、 $4.4 \pm 0.64 \times 10^{20}$  頭の線虫が地球の表面土壌に生息しているとされ、これは地球上の全ヒトバイオマスの 82 (%) (約 0.3 ギガトン) に相当する (van den Hoogen et al., 2019)。線虫は、約 11 億年前に節足動物 Arthropod と脊索動物 Chordate から分岐したとされる (Wang et al., 1999)。既知種は 24,783 種が報告されているものの (Zhang, 2011)、細菌を摂食する自由生活性 (自活性) 線虫に加え、動物や植物に寄生する寄生性線虫など、多様な生態が報告されており、多様性は 1 億種を超えるとも言われている (Ishibashi, 2002)。最古の線虫化石は、1 億 2,000 万年~1 億 3,500 万年前の昆虫に寄生した状態で見つかっており、これは動物-動物内部寄生の最古の例と言われている (Poinar et al., 1994)。人間との関係も古くから知られており、紀元前 2,700 年の中国に寄生性線虫 (回虫) の記録がある (Maggenti, 1981)。線形動物門は、主に陸生の幻器綱 Secernentea と海生の尾腺綱 Adenophorea に分けられるが、分子系統解析から、寄生性線虫は

自由生活性から複数回、独立に発生したと考えられ、農業上重要な PPN が属するティレンクス目 Tylenchida は幻器綱 Secernentea に分類されている (Blaxter et al., 1998)。PPN のうち、(1) ネコブセンチュウ Root-Knot Nematodes (RKN) (*Meloidogyne* spp.)、(2) シストセンチュウ Cyst Nematodes (CN) (*Heterodera* と *Globodera* spp.)、(3) ネグサレセンチュウ Root-Lesion Nematodes (RLN) (*Pratylenchus* spp.) が科学的・経済的観点から重要視されている (Jones et al., 2013)。(1) RKN (e.g. サツマイモネコブセンチュウ *M. incognita*) は根に侵入し、根細胞を「巨大細胞 giant cell」に再分化させ (Sato et al., 2018)、名前の通り、根に「こぶ knot」を形成し、商品価値を失わせる。(2) CN (e.g. ジャガイモシストセンチュウ *G. rostochiensis*、ジャガイモシロシストセンチュウ *G. pallida*) は、死亡雌の体がシストとなり、卵中で第 2 期幼虫 second stage juvenile (J2) を休眠保護することにより、土壤中で何十年と生存するため、特に根絶が難しい種として知られている (Bohlmann and Sobczak, 2014)。J2 は植物が放出する「ふ化促進物質 hatch-stimulating substance」によってふ化し、根細胞内を移動して壊死を引き起こすだけでなく、分泌物を注入し、食細胞となる多核質細胞 multinuclear syncytium を形成する (Bohlmann and Sobczak, 2014; Sato et al., 2019; Wyss and Grundler, 1992)。(3) RLN (e.g. キタネグサレセンチュウ *P. penetrans*) は、全発育ステージで根への侵入が可能であり、生根細胞を食害するだけでなく、他の土壤病害虫の二次感染を誘発し、壊死を引き起こす (Fosu-Nyarko and Jones, 2016; Jones et al., 2013)。

PPN は、1743 年に Needham によって報告されたが、これは植物における病気と病原体の関係性が観察された世界初の例と言われている (Lehman, 1979)。日本においては、明治 17 年の小麦寄生性の小蛆とされた *Anguilla tritici* の報告があるが (玉利, 1884)、線虫の論文初報告は、明治 27 年の恭菜線虫 *Heterodera*

*radicicola* (後にネコブセンチュウに分類) の「つるれいし」*Momordica charntia* への寄生報告とされる (安田, 1894)。以後、PPN の防除研究が実施されてきた。日本において線虫害が一般的に認識され、防除が実施されるようになったのは 1960 年頃と言われている (大林, 1977)。PPN の防除は、臭化メチル methyl bromide による土壌燻蒸が 50 年以上実施されてきたが、Class I オゾン層破壊物質に登録されたことにより、国際的に使用が禁止された (Desaeger et al., 2017)。以後、作物の植栽前には、1,3-ジクロロプロペン dichloropropene (1,3-D) による土壌燻蒸が広く用いられるようになった (Fang et al., 2019; Klaunig et al., 2015)。しかし、2009 年、EU による審査の際、1,3-D は認可されなかったことから (Wesenbeek and Knowles, 2019)、今後、1,3-D は国際的に禁止されていくと考えられている。1950 年代以降、上記のような化学系防除剤に依存してきたことから、病害虫の抵抗性が発達し、次世代農薬の必要性がより高まっている (Faizi et al., 2011; Wilson and Tisdell, 2001)。しかし、殺線虫剤は、世界市場額が 13 億ドル (殺菌剤は 134 億ドル、殺虫剤は 164 億ドル、除草剤は 326 億ドル) しかないという経済的課題があり、さらに、土壌中の線虫に有効成分を到達させなければならないという技術的課題が、殺線虫剤の開発をより困難にしている (Oka, 2020)。現行農薬の使用も禁止されつつあることから、これに代わる環境にやさしい防除指針が必要となっている (Wang et al., 2007)。そこで、従来法と環境負荷の少ない防除法を組み合わせる総合的病害虫 (有害生物) 管理 Integrated Pest Management (IPM) の手法がより重要となっている (Oka et al., 2000)。綿-ピーナッツのような輪作 Crop rotation も、線虫防除に広く用いられている手法であるが (Jordan et al., 2008)、植物や微生物といった天然物質に由来する生物農薬 biopesticide も、病害虫防除に用いられている (Leahy et al., 2014)。例えば、昆虫病原性細菌と共生する昆虫病原性線虫 Entomo-Pathogenic Nematode (EPN) は幅広い昆虫種に対

して高い病原性を示すことから (Ciche, 2007; Sato et al., 2016)、SDS Biotech K.K. 社の BioSafe (*Steinernema carpocapsae*) や Biotopia (*S. glaseri*) といった生物農薬として市販された実績もある (Choo et al., 2002)。

キク科 Asteraceae 植物には殺虫作用があり、この作用は 1,500 年前には知られていなかったとされ、欧州でも 15 世紀には知られていた (藤田, 1925; 佐藤, 1905)。日本では、明治 14 年に輸入されたシロバナムシヨケギク (除虫菊) (有効成分ピレトリン pyrethrin) を用いた「蚊取り線香」への利用が有名で、明治 19 年には除虫菊が広く知られるようになり、戦前は世界総生産の 70 (%) を占める輸出特産物であった (藤田, 1925; 中島, 1974; 新津, 1935; 佐藤, 1905)。大正 10 年には、日本初の有機合成農薬であるクロルピクリンの製造も開始されたものの、太平洋戦争により、農薬の輸入や生産が激減し、深刻な食糧不足の一因となった (中島, 1974)。マラリア蔓延地において、多くの日本将兵が資材も与えられずマラリアで死んでいった一方で (中川, 1989)、除虫菊が不足する中でもアメリカは DDT 等を用いて伝染病の予防に努めたことが大戦の勝敗を分けたとも言われ、DDT の殺虫効果を発見したミュラー Müller は 1948 年にノーベル賞を受賞している (上遠, 1975; Nature Publishing Group, 1948)。戦後、日本にも DDT といった合成農薬がもたらされ、めざましい成果を上げたことにより、今日に続く化学農薬時代を迎えることになった (中島, 1974)。

土壌中の線虫防除には、対抗植物 Antagonistic plant も用いられている (Gapasin et al., 2000)。対抗植物とは、線虫を効果的に減少させる植物のことで (Toida et al., 1991)、最も研究されている対抗植物はキク科のマリーゴールド marigold (タゲテス *Tagetes* spp.) であり、PPN に対する高い病原性 (抑制能力) と、多くの病害種 (14 属以上) に対する抑制能力を示す (Bridge, 1996; Nahak and Sahu, 2017; Wang et al., 2007)。Tyler (1938) は 29 品種のマリーゴールドが RKN に対する抵

抗性を示したと報告している。後に、フレンチマリーゴールド *T. patula* が最も線虫に有効であり、RKN に対する防除力は、ヨードメタン methyl iodide による土壤燻蒸と差がないレベルであると報告された (Marahatta et al., 2012; Ploeg, 2002)。以後、マリーゴールドを対抗植物として利用するため、PPN に対する殺線虫活性の解明が進められてきた (Hooks et al., 2010; Steiner, 1941)。しかし、マリーゴールドの対抗植物としての有用性とは裏腹に、残渣または根抽出物として土壤にすき込んだ際の殺線虫活性についてはよく分かっていない (Wang et al., 2007)。加えて、マリーゴールドが対抗植物として効果を発揮するには、温度や日長といった栽培条件を考慮する必要がある (Wang et al., 2007)。例えば、*M. incognita* の抑制には、低温 (15°C以下) での栽培を避けるべきとされる (Ploeg and Maris, 1999)。残念ながら、*T. patula* やアフリカンマリーゴールド *T. erecta* の種子は誰でも入手できるものの、雑草との競争に負けてしまうため、輪作/緑肥作物以外の商業的な価値を見出すことは困難である (LaMondia, 2006)。

$\alpha$ -terthienyl ( $C_{12}H_8S_3$ , MW 248) はマリーゴールドから単離された青色蛍光化合物である (Zechmeister and Sease, 1947)。後に、 $\alpha$ -terthienyl の線虫、昆虫、菌、ウイルス、細胞に対する毒性が明らかになり、現在、マリーゴールドの殺線虫活性において主要な役割を示す物質であると考えられている (Topp et al., 1998; Wang et al., 2007)。また、多くの植物由来の殺虫成分は、環境中で素早く分解されると言われている (Mpumi et al., 2016)。よって、 $\alpha$ -terthienyl は残留性が低く、環境にやさしい農薬候補物質の 1 つであると考えられている (Nivsarkar et al., 2001; Wang et al., 2007)。しかし、線虫の作用部位などは依然不明であり、さらなる研究が期待されている。

自活性線虫である *Caenorhabditis elegans* は様々な生物学的・遺伝学的な利点を持つモデル生物として広く知られている (Ankeny, 2001; Brenner, 1974)。C.

*C. elegans* は細菌 *Escherichia coli* OP50 株を用いて容易に培養でき、1 世代が短い (20°Cで 3 日) ため、安価で非常に扱いやすい (Brenner, 1974)。同じく遺伝学のモデル生物として使われているショウジョウバエ (*Drosophilidae* 科) にはない利点として、飢餓状態になったばかりの若い幼虫 (L1-L2) を、15 (%) グリセリンを用いた液体凍結保存法により、液体窒素で長期間保存することもできる (Brenner, 1974; Nigon and Félix, 2017; Stiernagle, 2006)。*C. elegans* は自家受精により約 300 の子世代を産む雌雄同体 (5AA, XX) と、これと他家受精できる雄 (5AA, XØ) の 2 つの生殖様式を持つことから、遺伝学的解析が容易である (Brenner, 1974; Singson, 2001)。*C. elegans* の雌雄同体は細胞数が 959 細胞しかなく (雄は 1031 個)、体が透明であるため、顕微鏡で全細胞を観察することができ、これは細胞系譜 cell lineage の決定をも可能にした (Corsi et al., 2015; Kimble and Hirsh, 1979; Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983)。また、遺伝子組換えにより、緑色蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein (GFP) を生きた細胞における標識として用いることもできる (Chalfie et al., 1994)。これらの発見により、線虫の「どの細胞」が「どのように働いている」のかを詳細に解析することが可能となった。

*C. elegans* は世界で初めて全ゲノム配列 (97-Mb) が解読された後生動物であり、19,000 以上の遺伝子の存在が明らかとなっている (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)。以後、様々な遺伝学的情報が *C. elegans* を用いて明らかになってきた。他生物のゲノムと比較すると、ヒト human ゲノムは約 2.85-Gb で (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)、21,306 のタンパクコード遺伝子を含むが (Pertea et al., 2018)、少なくとも *C. elegans* プロテオームのうち 83 (%) はヒトホモログ遺伝子であると言われている (Lai et al., 2000)。マウス mouse ゲノムは約 2.5-Gb で、うち約 14 (%) がヒトゲノムと類似しており、

約 30,000 のタンパクコード遺伝子を含み、ヒトゲノムの約 80 (%) がマウスオーソログ遺伝子であると報告されている (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002)。他には、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* ゲノムは約 125-Mb で、25,498 のタンパクコード遺伝子を含み (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)、ワモンゴキブリ American cockroach (*Periplaneta americana*) ゲノムは約 3.38-Gb で、21,336 のタンパクコード遺伝子を含む (Li et al., 2018)。これらのことから、いかに *C. elegans* ゲノムが小さいか、いかにヒトと共通した遺伝子が多いかが分かる。また、*C. elegans* は極めて強力な逆遺伝学的ツールである RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) を誘導することもできる (Fire et al., 1998)。これらの利点から、殺線虫剤フルエンスルホン Fluensulfone の作用解析には、遺伝学的手法を適用できる自活性線虫 *C. elegans* によるアプローチが有効だという報告もある (Kearn et al., 2014)。最近の研究で、癌 cancer 患者の尿に誘引される *C. elegans* の走化性 chemotaxis を利用した、経済的で非侵襲的な癌スクリーニング法が開発されたことは記憶に新しい (Hirotsu et al., 2015)。

*C. elegans* の情報源は非常によく整備されている。ゲノムを始めとする遺伝学的情報は WormBase ([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org)) から入手できる (Howe et al., 2012)。WormBook ([www.wormbook.org](http://www.wormbook.org)) もオープンアクセスで利用でき、様々な生物学的手法を学ぶことができる (Girard et al., 2007; Greenwald, 2016)。また、*C. elegans* の野生型 wild-type や 3,000 以上の変異体 mutant 株は Caenorhabditis Genetics Center (CGC) ([cgc.umn.edu](http://cgc.umn.edu)) から有料で入手できる (Stiernagle, 2006)。

以上のことから、本研究では、モデル生物として *C. elegans* を、PPN の代表として *M. incognita* J2 (Gillet et al., 2017; Jones et al., 2011) をそれぞれ選択し、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性の解明をおこなった。

## 第1章 *Caenorhabditis elegans* と *Meloidogyne incognita* に対する $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性評価

### 1.1. 背景

マリーゴールド (*Tagetes* spp.) はアメリカ大陸原産で、*Tagetes* 属 56 種の多くが観賞植物として栽培されている (Nahak and Sahu, 2017; Saisugun et al., 2017; Salehi et al., 2018)。マリーゴールドの中で、最も線虫防除に使われている種は、*T. patula*、*T. erecta*、ワイルドマリーゴールド *T. minuta* である (Bridge, 1996; Wang et al., 2007)。属名 *Tagetes* はエルトリアの農業神「ターゲス Tages」に由来し (Bandana et al., 2018)、一般名マリーゴールドは「聖母マリアの黄金の花 Virgin Mary's gold」を意味する (Saisugun et al., 2017)。*Tagetes* spp. の栽培は、高温 (26.2-36.4°C) は適しておらず、至適条件は 14.5-28.6°C、pH 7.0-7.5 の砂壤土である (Salehi et al., 2018)。マリーゴールドは、特にネコブセンチュウ *Meloidogyne* spp. とネグサレセンチュウ *Pratylenchus* spp. に対する抑制効果が高いことが知られている (Hooks et al., 2010; Marahatta et al., 2012)。いくつか例を挙げると、*T. patula* は雌ネコブセンチュウを抑制する (Marahatta et al., 2012)。*T. erecta* は二毛作 double-crop により、*P. penetrans* 密度をジャガイモでは 93 (%)、トマトでは 98 (%) 減少させる (Alexander and Waldenmaier, 2002)。複数種のマリーゴールド (*T. patula* × *T. erecta*) の輪作/緑肥をした 1-2 年後、根の *P. penetrans* 数が減少し、出荷量が増えた (LaMondia, 2006)、といった報告がある。最近の研究では、*T. patula* と *T. patula* 抽出物は、深刻な農作物被害をもたらす半翅目 hemiptera 害虫に対する殺虫活性を示し、植物由来殺虫剤としての有用性も明らかになっている (Fabrick et al., 2020)。

$\alpha$ -terthienyl は光活性化物質であると報告されているものの (Nivsarkar et al., 2001)、殺線虫活性は光活性化せずとも発揮されるとの報告もある (Faizi et al.,

2011)。Ohbayashi et al. (1983) も指摘しているように、 $\alpha$ -terthienyl を殺線虫剤として土壌にすき込んだ場合であっても、光活性化は起こりにくいと考えられる。

本章の目的は、UV 照射による光活性化、または、UV 非照射による光不活性化  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性を解明することである。本章では、 $\alpha$ -terthienyl が (1) 光活性化せずとも殺線虫活性を発揮すること、(2) 若齢成虫 young adult に比べ、耐久型幼虫 dauer larva に対してより高い殺線虫活性を発揮することを示した。

## 1.2. 材料と方法

### 線虫株と培養法

*C. elegans* は、別記しない限り、Brenner (1974) と Stiernagle (2006) の方法に従い操作・培養した。簡潔に方法を示す。線虫の培養は全て 20°C で実施した。線虫の食糧源として液体 L-Broth (LB) [塩化ナトリウム 1.0 g、トリプトン Bacto™ Tryptone 1.0 g、イーストエキス Bacto™ Yeast Extract 0.5 g を脱イオン水 (Elix® Essential 3 により製造) に溶かして 100 ml とする] で培養した *E. coli* OP50 液を播種した Nematode Growth Medium (NGM) [塩化ナトリウム 0.6 g、ペプトン Bacto™ Peptone 0.5 g、寒天 3.4 g、脱イオン水 195 ml をオートクレーブ滅菌し、1M 塩化カルシウム溶液 0.2 ml、1M 硫酸マグネシウム溶液 0.2 ml、1M リン酸バッファー (リン酸二水素カリウム 5.41 g、リン酸水素二カリウム 1.78 g を脱イオン水に溶かして 50 ml とする) 5.0 ml、5 mg/ml コレステロール溶液 0.2 ml を加える] プレートを用いた。本章で使用した線虫株は、野生型標準株 N2 (Bristol strain) である。

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 40 ml、5M 水酸化ナトリウム sodium hydroxide 溶液 10 ml、脱イオン水 50 ml) で処理した *C. elegans* 抱卵成虫から、第 1 期幼虫 Larva (L) 1 に同調化した線虫を用意し (Porta-de-la-

Riva et al., 2012)、これを NGM プレートに移し、young adult となるまで 48 時間培養した。*C. elegans* 耐久型幼虫は、4 週間培養した（古い）NGM プレートから、M9 バッファー（リン酸水素二ナトリウム 0.6 g、リン酸二水素カリウム 0.3 g、塩化ナトリウム 0.5 g を脱イオン水に溶かして 100 ml とし、1M 硫酸マグネシウム溶液 0.1 ml を加える）で回収した。

*M. incognita*（宮崎県都城産）は明治大学の新屋良治研究室で、トマト（品種ちびっこ）を用いた水耕栽培法により培養されたものを使用した（Nishiyama et al., 2015）。ふ化した第 2 期幼虫（J2）は、ベールマン法により回収し、1 週間以内に使用した。

### 殺線虫活性評価

全操作は 20°C で実施した。NGM プレートから *C. elegans* young adult と耐久型幼虫を M9 バッファーで回収・洗浄し、約 20 頭/50  $\mu$ l に調整した。そして、各濃度に調整した  $\alpha$ -terthienyl (2,2':5',2''-Terthiophene、東京化成工業株式会社、T1196) と共に 96-well plate の well に加え、24、48、72 時間処理した。光活性化 photoactivated  $\alpha$ -terthienyl 処理は、線虫培養開始前に、上記の 96-well plate を UV-A 光源（FL20S・BLB、東芝ライテック株式会社）から 32.5 cm 下に垂直に静置し、30 分間の UV 照射により実施した（Huang et al., 2017; Nivsarkar et al., 1991）。 $\alpha$ -terthienyl 最終濃度は、2（%）ジメチルスルホキシド dimethyl sulfoxide (DMSO)（富士フィルム和光純薬株式会社）を含む M9 バッファー中で、光活性化時は、0、1、2.5、5  $\mu$ M に、不活性化時は 0、5、10、25  $\mu$ M に調整した。 $\alpha$ -terthienyl は 25  $\mu$ M で、2（%）DMSO を含む M9 バッファー中で沈殿を生じ始めたため、本研究では 25  $\mu$ M を最高濃度とした。Katiki et al. (2011) と本研究の予備実験により、*C. elegans* は 2（%）までの DMSO に耐性を持つことが示されている（data

not shown)。線虫の死亡率 Mortality (%) は、物理的刺激に応答しないものを死亡とし、算出した。

*M. incognita* J2 は滅菌水で洗浄し、約 20 頭/50  $\mu$ l に調整した。そして、2 (%) DMSO を含む滅菌水で上記濃度に調整した  $\alpha$ -terthienyl と共に 96-well plate に加え、24 時間処理した。光活性化処理は同様に実施した。死亡率 (%) も同様に算出した。

薬剤処理実験 1 回につき 96-well plate の 4 well 以上 (約 80 頭/処理区) の薬剤処理を各濃度に対して実施し、これを 1 回の実験とし、独立に 3 回反復して平均値 mean  $\pm$  標準誤差 standard error を算出した。死亡率データの多くは、Kolmogorov-Smirnov 検定または Shapiro-Wilk 検定により正規分布していなかったため (data not shown)、検定方法は Kruskal-Wallis 検定 (3 群以上の比較)、または Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction (多重比較の場合) により実施した。半数致死濃度 Lethal Concentration 50 (LC<sub>50</sub>) は Probit 法により算出した。全ての統計解析は、Kanda (2013) に従い EZR (バージョン 1.40) を使用した。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアであり、自治医科大学付属さいたま医療センターのホームページで無償配布されている。

### 1.3. 結果

#### *C. elegans* と *M. incognita* に対する光活性または不活性化 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性

*C. elegans* young adult、*C. elegans* 耐久型幼虫、*M. incognita* J2 に対する光活性/不活性化  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性を調べた。線虫は土壌中の (細菌といった) 食糧源が不足すると、*C. elegans* では耐久型幼虫、*M. incognita* では J2 として長期間生存すると考えられている (Cassada and Russell, 1975; Ishibashi and Kondo,

1974)。 *C. elegans* young adult に対する光不活性化  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は、24 時間処理では全濃度 (0、1、2.5、5  $\mu$ M) で見られなかったが、この活性は光活性化により全濃度で劇的に増加した (図 1-1A)。 *C. elegans* young adult の 24 時間後の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) は、1  $\mu$ M では  $47 \pm 7.2$  (%), 2.5  $\mu$ M では  $86 \pm 3.1$  (%), 5  $\mu$ M では  $100 \pm 0.0$  (%),  $LC_{50}$  は  $1.93 \pm 0.03$   $\mu$ M であった。摂食行動をしない耐久型幼虫は、全身を厚いクチクラ cuticle に覆われているため、有害化合物といった環境ストレスに耐性を持つことが知られている (Cassada and Russell, 1975)。 *M. incognita* J2 は土壤中で多く見られる休眠・感染期の発育ステージである (Karssen and Moens, 2006)。興味深いことに、 *C. elegans* 耐久型幼虫と *M. incognita* J2 は、光活性化せずとも  $\alpha$ -terthienyl 処理により効果的に殺虫されることが示され、光活性化により殺線虫活性はさらに増加した (図 1-1B、C)。不活性化  $\alpha$ -terthienyl を処理した *C. elegans* 耐久型幼虫の死亡率 (%) は、1  $\mu$ M では  $74 \pm 2.2$  (%), 2.5  $\mu$ M では  $93 \pm 1.5$  (%), 5  $\mu$ M では  $97 \pm 0.88$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $0.72 \pm 0.06$   $\mu$ M であった。光活性化  $\alpha$ -terthienyl を処理した *C. elegans* 耐久型幼虫の死亡率 (%) は、1  $\mu$ M では  $99 \pm 0.76$  (%), 2.5  $\mu$ M では  $100 \pm 0.0$  (%), 5  $\mu$ M では  $100 \pm 0.0$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $0.28 \pm 0.02$   $\mu$ M であった。不活性化  $\alpha$ -terthienyl を処理した *M. incognita* J2 の死亡率 (%) は、1  $\mu$ M では  $58 \pm 3.3$  (%), 2.5  $\mu$ M では  $99 \pm 0.55$  (%), 5  $\mu$ M では  $99 \pm 0.55$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $0.84 \pm 0.05$   $\mu$ M であった。光活性化  $\alpha$ -terthienyl を処理した *M. incognita* J2 の死亡率 (%) は、1  $\mu$ M では  $98 \pm 1.0$  (%), 2.5  $\mu$ M では  $100 \pm 0.0$  (%), 5  $\mu$ M では  $100 \pm 0.0$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $0.37 \pm 0.03$   $\mu$ M であった。

### ***C. elegans* young adult に対する光不活性化 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性**

*C. elegans* young adult に対して光不活性化  $\alpha$ -terthienyl を 24、48、72 時間処理

した。 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は、24 時間後では全濃度で見られなかったが、48、72 時間後、死亡率 (%) は濃度依存的 dose-dependent manner に増加した (図 1-2)。48 時間後の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $16 \pm 3.0$  (%), 10  $\mu$ M では  $31 \pm 4.8$  (%), 25  $\mu$ M では  $55 \pm 4.8$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $22 \pm 1.1$   $\mu$ M であった。72 時間後の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $30 \pm 3.5$  (%), 10  $\mu$ M では  $59 \pm 4.4$  (%), 25  $\mu$ M では  $90 \pm 4.1$  (%), そして、 $LC_{50}$  は  $11 \pm 0.52$   $\mu$ M であった。

#### 1.4. 考察

マリーゴールド各品種 (*T. patula*, *T. erecta*, *T. signata*, *Tagetes hybrid*) は、ネコブセンチュウ各種 (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*) の J2 数と根のこぶ数を減少させる (Ploeg, 1999)。しかし、5 つの温度条件 (10、15、20、25、30°C) 下で、マリーゴールド各品種の *M. incognita* の抑制効果を調べた研究では、25°C と 30°C の *T. signata* と、30°C の *Tagetes hybrid* で、こぶの発生が確認され、*T. signata* では他品種に比べて *M. incognita* 感染が見られたと報告されている (Ploeg and Maris, 1999)。マリーゴールド各品種 (*T. patula* ssp., *T. erecta*, *T. tenuifolia*) のネグサレセンチュウ (*P. penetrans*) 土壌密度も低かったが、*T. patula* 根の周囲のみ、他品種と比べてネグサレセンチュウ密度が高かったと報告されている (Kimpinski et al., 2000)。しかし、*T. patula* を休耕後に植栽しても *M. incognita* を抑制しない (Marahatta et al., 2010)。マリーゴールドは線虫数を減少させたが、減少しない実験日もあった (Whittington and Zehr, 1992)、というように、マリーゴールドの線虫抑制能力は不安定だという指摘もある。仮説では、マリーゴールドは (卵のような) 休眠期よりも、活動期の *Meloidogyne* spp. を抑制するのではないかと考えられている (Marahatta et al., 2012)。事実、マリーゴールドは *M. incognita* 卵 egg の生育には影響を及ぼさない (Ploeg and Maris, 1999)。最近の研

究でも、マリーゴールドは休眠期に比べ、活動期の PPN をより効果的に抑制すると言われている (Marahatta et al., 2012)。しかし、詳細についてはよく分かっていない。

チオフェン thiophene である光活性化物質  $\alpha$ -terthienyl は、 $\alpha$ -terthienyl ラジカル、一重項酸素 singlet oxygen、スーパーオキシドアニオンラジカル superoxide anion radical の発生源であると言われている (Bakker et al., 1979; Nivsarkar et al., 1992, 2001)。チオフェンは、それ自身が不安定で自動的に酸化されるため、基底状態 ground-state の酸素 oxygen をスーパーオキシドアニオンラジカルに変換することができる (Nivsarkar et al., 2001)。三量体 trimeric チオフェンである  $\alpha$ -terthienyl は花に多く含まれるが、チオフェン含有量と多様性が最も高い部位は根であるとされ、チオフェンは、主な生合成部位である根から花に輸送され、生体内変換される (Margl et al., 2002)。また、毛状根細胞における  $\alpha$ -terthienyl の蓄積は光によって阻害される (Kyo et al., 1990)。おそらく光活性化  $\alpha$ -terthienyl は植物にとっても有害なのだろう。実際、植物への影響も報告されている (Zhao et al., 2018)。マリーゴールドに含まれる各種チオフェンの殺線虫活性はあまり明らかになっていないが、*Tagetes* 属には、5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl (BBT)、5-(4-hydroxy-1-butynyl)-2,2'-bithienyl (BBTOH)、5-(4-acetoxy-1-butynyl)-2,2'-bithienyl (BBTOAc)、 $\alpha$ -terthienyl の 4 つの主要なチオフェンが存在し、最も含有量が多いのは BBT で、次いで BBTOAc と  $\alpha$ -terthienyl である (Margl et al., 2002)。オレイン酸から変換されるチオフェンの生成には、 $H_2S$  の付加が重要だと考えられているが、2-3 個のチオフェン環を持つチオフェンの生成には、第 2 環の生成に先立って末端のメチル基の除去が必要で、モノチオフェンである 2-(but-3-en-1-ynyl)-5-(penta-1,3-diynyl)-thiophene (BPT) は、*Tagetes* 属特有の (何らかの) 条件により BBT と BBTOAc に変換されるが、シトクロム P450 (CYP) により触媒さ

れると考えられている脱メチル化に障害があると、ごく少量しか変換されない (Jacobs et al., 1995)。予測では、BBT の 3 重結合に H<sub>2</sub>S が付加し、次いで脱水素環縮合により  $\alpha$ -terthienyl が生成すると考えられている (Downum et al., 1983; 富田, 1964)。 $\alpha$ -terthienyl の土壌濃度と、*M. incognita* に対して活性のある濃度 (1-2.5  $\mu$ M) に大差はない (Campbell et al., 1982; Weidenhamer et al., 2019)。根のチオフェン含有量は、 $\alpha$ -terthienyl は 24-60 ( $\mu$ g/g)、BBT は 198-241 ( $\mu$ g/g) で、土壌含有量は根の 1.1 (%) であるが、 $\alpha$ -terthienyl の根と土壌の含有量との間に相関は見られるものの、BBT では見られない (Weidenhamer et al., 2019)。また、BBTOH は *T. patula* からのみ見つかっている (Margl et al., 2002)。BBTOH は、同じく *T. patula* から抽出された殺線虫物質 (-) -2-isopropenyl-5-acetyl-6-hydroxy-2, 3-dihydrobenzofuran (ヒドロキシトレメトン hydroxytremetone) よりも高い殺線虫活性があり、*T. patula* の主要な殺線虫活性は BBTOH によるかもしれないと報告されている (Hatakeda et al., 1985)。しかし、詳細についてはよく分かっていない。富田 (1964) の解説によれば、ナミクキセンチュウ、バレイショシストセンチュウ、コムギツブセンチュウに対して種々のポリチエニル polythienyl と  $\alpha$ -terthienyl 類縁化合物の殺線虫作用を調べたところ、高い殺線虫活性を示すのは全て 2,2'-bithienyl 誘導体であり、例えば、5-phenyl-2,2'-bithienyl は活性を示すものの、1,4-di-(2-thienyl)-benzene は示さない。逆に、 $\alpha$ -terthienyl の thienyl 基を異性化、あるいは phenyl 基で置換しても、2,2'-bithienyl 誘導体である限り殺線虫作用はほとんど変わらないが、5,5'-二置換 bithienyl と比較して 5-一置換 bithienyl の活性が高い (富田, 1964)。置換物の原子の大きさが活性に関係すると考えられており、塩素の二置換物は強い活性を示すが、臭素の二置換物は活性を示さない (富田, 1964)。また、bithienyl の 3,3' の位置に置換基を持つと活性が失われるが、これは、polythienyl の共鳴構造に対する立体障害によると考えられている (富田,

1964)。また、4-置換の 2,2'-bithienyl である 2,2'-4,2''-terthienyl は 5'置換である  $\alpha$ -terthienyl とほぼ同じ活性を持つものの、 $\alpha$ -terthienyl に thienyl 基をさらに追加すると活性が低下する (富田, 1964)。これらのことから、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性には、2,2'-bithienyl の置換基の性質、大きさ、数、置換の位置が重要であると考えられている (富田, 1964)。しかし、詳細についてはよく分かっていない。UV-A 照射した各チオフェンで *E. coli* や *Saccharomyces cerevisiae* を処理すると、BBT と  $\alpha$ -terthienyl で効果的な成長抑制が見られ、BBTOH と BBTOAc は、これらより効果は低いものの抑制効果が見られた (Downum et al., 1983)。しかし、UV-A 非照射では抑制は見られない (Downum et al., 1983)。 $\alpha$ -terthienyl をフザリウム菌 3 種 (ダイコン萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*、キャベツ萎黄病菌 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*、キュウリつる割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) に処理すると、UV 照射下で孢子発芽と菌糸生育を阻害し、類縁化合物 2-acetyl-bithienyl も UV 照射下でキュウリつる割病菌の孢子発芽に対し、 $\alpha$ -terthienyl と同様の活性を示す (Ohbayashi et al., 1983)。また、*T. patula* に含まれる BBT と BBTOAc は青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* を抑制するという報告もある (Terblanche and de Villiers, 1998)。 $\alpha$ -terthienyl と BBTOH は類似した作用機構を持ち、BBTOH は、暗条件では菌体に浸透し、低濃度では無毒で液胞に蓄積するが、UV-A 照射により、菌全体の内膜系に作用する (Romagnoli et al., 1998)。また、感受性の菌に対して高濃度の BBTOH を処理すると、暗条件であっても成長が抑制され、早期老化を誘導する (Romagnoli et al., 1998)。UV 照射を受けた  $\alpha$ -terthienyl とその類似体は、マウスサイトメガロウイルス Murine cytomegalovirus とシンドビスウイルス sindbis virus に対して毒性を示し、最小阻害濃度は 0.02-40  $\mu$ M である (Naithani et al., 2010)。*T. patula* に含まれる他の化合物の殺線虫活性も評価されており、ステアリン酸 stearic acid (C18) とオレイン酸 oleic acid

(C18:1) はパルミチン酸 *palmitic acid* (C16) よりも殺線虫活性があり、脂肪酸 *fatty acid* の活性は鎖長と二重結合の位置と数に依存し、安息香酸 *benzoic acid* の活性は-OH 基の増加により増加する (Faizi et al., 2011)。合成品の  $\alpha$ -terthienyl、コセンダングサ *Bidens pilosa* の葉から抽出された *phenylheptatriyne* (PHT)、そして、ダリア *Dahlia* spp.、エキノプス *Echinops* spp.、アキノキリンソウ *Solidago vigaurea* から得た計 7 種のポリアセチレンとチオフェンをヨーロッパアワノメイガ *European corn borer Ostrinia nubilalis* に摂食させると、アセチレン前駆体よりも生合成されたチオフェンの毒性が高くなり、チオフェン環の数の増加に伴って毒性が増加する (Champagne et al., 1986)。また、微生物でも同様の報告がある (Champagne et al., 1986)。 $\alpha$ -terthienyl により誘導される細胞毒性 *cytotoxicity* は、 $\alpha$ -terthienyl を含む細胞が UV-A (320-400 nm) 照射を受けた時に、一重項酸素が細胞内で形成されることで生じる (Christiaens et al., 2005; Rampone et al., 1986)。光活性化 BBT も  $\alpha$ -terthienyl と似たメカニズムで細胞毒性を発揮する (Downum et al., 1983)。膜タンパク質が光活性化  $\alpha$ -terthienyl のターゲットとして重要とも言われている (Downum et al., 1983)。ネッタイシマカ *Aedes aegypti* 幼虫では、 $\alpha$ -terthienyl は中腸 *midgut* で活性酸素種 *reactive oxygen species* (ROS) を生成し、囲食膜 *peritrophic membrane* を崩壊させ、腸の防壁障害を引き起こし、ミトコンドリア ROS を増加させ、ミトコンドリア機能不全と細胞壊死を誘導する (Zhang et al., 2019)。蚊幼虫に対して、天然抽出物または市販合成品の  $\alpha$ -terthienyl を、UV (366 nm) 照射し、濃度 33 ppb ( $\approx 0.13 \mu\text{M}$ ) で処理すると死亡率 100 (%) を示す (Nivsarkar et al., 2001)。シストセンチュウ *H. zaeae* に対して市販品の  $\alpha$ -terthienyl を濃度 0.125 (%) ( $\approx 5 \text{ mM}$ ) で処理すると、24 時間後の死亡率は 100 (%) で、光活性/不活性化間に差は見られなかったとの報告もある (Faizi et al., 2011)。本研究では、*C. elegans* young adult、耐久型幼虫、*M. incognita*

J2 を光活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、不活性化時に比べ、高い殺線虫活性を示すことを明らかにした。また、 $\alpha$ -terthienyl (東京化成工業株式会社) を有効成分とする殺線虫剤が日本で販売されるならば、毒物及び劇物取締法 (毒劇法) では、LD<sub>50</sub> 値から農薬 D-D (有効成分 1,3-ジクロロプロペン) (アグロカネショウ株式会社) やフェノール Phenol (アジレント・テクノロジー株式会社) と同様に、(特定毒物、毒物、劇物のうち) 劇物に分類されると思われる。

マリーゴールドによる線虫抑制効果は、根で ROS を生成する  $\alpha$ -terthienyl によるものと考えられている (Topp et al., 1998)。線虫侵入後、根のペルオキシダーゼ peroxidase 活性が増加し、 $\alpha$ -terthienyl が励起され、線虫近辺または体内で一重項酸素が生成されるのではないかとされているが (Faizi et al., 2011)、線虫体内における  $\alpha$ -terthienyl の詳細な挙動についてはよく分かっていない。また、このような強力な殺生剤が根から放出されるならば、微生物群集も多大な影響を受けると予想される (Topp et al., 1998)。しかし、マリーゴールドは土壤微生物数の低下を引き起こさず (Topp et al., 1998)、*T. patula* は自活性線虫に対する有害化合物を生成しなかったとの報告もある (Marahatta et al., 2010)。本研究では、*M. incognita* J2 と *C. elegans* 耐久型幼虫の間の死亡率の差はあまり見られなかった。一方で、*M. incognita* J2 と比較して、*C. elegans* young adult に対する  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は見られなかった (図 1-1)。土壤施用したマリーゴールドの花弁は、ネグサレセンチュウの密度を抑制するが、自活性線虫の密度を増加させるという報告もある (中園, 1989)。これら結果は、PPN と比較して、 $\alpha$ -terthienyl は活発な自活性線虫に対して活性を発揮しない可能性を示している。

長さ 1,300  $\mu\text{m}$ 、幅 60  $\mu\text{m}$  の *C. elegans* 成虫は、開口部 (咽頭 pharynx、肛門 anus、排出孔 excretory pore、陰門 vulva) を除き、厚さ 0.5  $\mu\text{m}$  の主にコラーゲン collagen タンパク質からなる多層細胞外構造クチクラにより完全に覆われている (Cox et

al., 1981)。クチクラの表面には、線虫の側面に沿って 3 本近接して存在する溝状の突起物「アラエ alae」があり、また、1  $\mu\text{m}$  間隔で環状の輪が連続してくぼんでおり、(annuli と呼ばれる) 体環構造を形成している (Cox et al., 1981)。クチクラ内部は、大きく分けるとほぼ同じ厚さの 2 層からなり、「支柱 struts」によって各層が結合され、流体で満たされた空間 (medial zone) によって区切られている (Altun and Hall, 2020; Cox et al., 1981)。内側の基底層 basal layer or zone はさらに 3 層 (下皮に隣接する非結晶質層 amorphous layer、線虫の頭部から尾部へ左回りに渦巻く内側の繊維層 inner fiber layer、右回りに渦巻く一番外側の繊維層 outermost fiber layer) に分かれ、基底層の形態は線虫全体で変わらない (Altun and Hall, 2020; Cox et al., 1981)。外側の皮質層 cortical zone の厚さと形態の変化により、クチクラの (アラエや annuli といった) 表面構造が生じる (Cox et al., 1981)。また、基底層や皮質層の構造はジスルフィド結合によって保たれている (Cox et al., 1981)。一般的には、クチクラは 5 層 (外側から、表皮層 surface coat、上皮層 epicuticle layer、皮質層、medial zone、基底層) からなると考えられている (Altun and Hall, 2020)。耐久型は直径が減少しており、かつ 4 本のアラエのある厚い皮質 (上皮層) を持つため、非耐久型は断面積の 4.4 (%) がクチクラであるのに対し、耐久型では 10.2 (%) と厚くなっているのに加え、システインと疎水性アミノ酸を多く含むため、透過性が低くなっている (Altun and Hall, 2020; Kramer, 1997; Wolkow and Hall, 2016)。また、耐久型は、口腔が完全にクチクラに覆われているため摂食行動をせず、物質の内外への拡散も阻害されているが、肛門は閉塞していない (Wolkow and Hall, 2016)。 $\alpha$ -terthienyl は young adult と比較して耐久型に対する高い殺線虫活性を示し、厚いクチクラによる防御を突破して活性を発揮する可能性が示された。 $\alpha$ -terthienyl は親油性 (疎水性) なため (Feng et al., 1993)、耐久型のクチクラと親和性が高くなり、活性を発揮するのかもしれない

が、耐久型に対する詳細な作用機構については、さらなる研究が必要である。

生きているマリーゴールドのみが殺線虫活性を発揮すると言われており (Marahatta et al., 2010)、すき込みでは線虫を抑制しないが、残渣は線虫捕食菌 nematophagous (nematode-trapping) fungi を増殖させる可能性があり (Wang et al., 2007)、マリーゴールドによる線虫抑制効果は、土壤中に殺生剤を放出するだけではないかもしれないとの指摘もある (Topp et al., 1998)。土壤中に  $\alpha$ -terthienyl を濃度 200 ppm で混合させても、*M. javanica* に効果はないという報告もある (Gommer, 1973)。しかし、詳細についてはよく分かっていない。上記のようなマリーゴールド (またはチオフエン) の殺線虫活性に関する不安定な報告は、以下の 4 つの原因によるかもしれない。(1) 栄養素の欠乏; マリーゴールド根のチオフエン放出物は、カリウム ( $K^+$ ) 欠乏により 2 倍以上になると言われている (Weidenhamer et al., 2019)。カリウム欠乏は病原体抵抗性の低下といった、植物に対する多くの悪影響をもたらす (Ruan et al., 2015)。また、硫酸塩 sulfate 濃度が 20 倍から 40 倍減少すると、マリーゴールドのチオフエン量が 25-50 (%) 減少するという報告もある (Arroo et al., 1997)。(2) 他の病原体の存在; *Agrobacterium rhizogenes* の感染により誘導された *T. patula* 毛状根を暗条件で培養すると  $\alpha$ -terthienyl を生成し、殺線虫活性を示す (Kyo et al., 1990)。*A. rhizogenes* を感染させ誘導した対抗植物ルドベキア (*Rudbeckia hirta*) の毛状根から再分化させた植物の根から  $\alpha$ -terthienyl が検出されたという報告もある (Daimon and Mii, 1995)。これらは、 $\alpha$ -terthienyl が病原体への抵抗物質として使われている可能性を示している。(3) 他の物質との競合;  $\alpha$ -terthienyl 単体は蚊幼虫に対して死亡率 100 (%) を示すにもかかわらず、コバルトイオン ( $Co^{2+}$ ) が  $\alpha$ -terthienyl と反応すると、架橋体 bridge species を形成し、蚊幼虫に対して完全に無毒となる (Nivsarkar et al., 1996)。コバルトは植物に有益な重金属イオンであり、一般的に報告されている

植物内濃度は 30-40 ppm である (Anjum et al., 2015; Kabata-Pendias and Pendias, 2001; Macnicol and Beckett, 1985)。(4) 他のマリーゴールド抽出物との競合 ; 寿命延長、抗酸化、神経保護活性を示す *T. erecta* の花抽出物には、ラリシトリン laricitrin といった、*C. elegans* を酸化ストレスから保護するフラボノール flavonol も含まれている (Moliner et al., 2018)。また、マリーゴールド抽出物を鶏飼料に加えると、鶏卵重、卵黄彩度、酸化安定性が増加するという報告もある (Grčević et al., 2019)。これらのことから、マリーゴールドによる PPN 抑制効果の差異は、 $\alpha$ -terthienyl や抗酸化物質といった化合物の総生成量が、環境条件や品種によって変化するからではないかと思われる。本章では、 $\alpha$ -terthienyl は殺線虫活性を發揮したが、これは、上記のような殺線虫活性を抑制する影響を受けなかったためだと思われる。

加えて、 $\alpha$ -terthienyl 放出量は植物体の大きさと強い相関があり (Weidenhamer et al., 2019)、マリーゴールドの殺線虫活性が最大になるには、完全な成熟 (3-4 か月) を必要とする (Wang et al., 2007)。本研究では、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は光活性/不活性に関わらず、濃度依存的に増加した。加えて、*T. patula* カルス calli の殺線虫活性も、 $\alpha$ -terthienyl 量に比例すると報告されている (Fujimoto et al., 1990)。これらの結果から、マリーゴールドの殺線虫活性において、 $\alpha$ -terthienyl が主要な働きを担っていると考えられる。また、農薬の有効成分であるジクロロプロペン dichloropropene は、熱や光にさらされると不安定となるが (EPA, 2000)、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は逆に光 (UV) 照射により増加するため、農業現場での利用に適していると思われる。国立環境研究所 有害紫外線モニタリングネットワーク事務局 (2017a, 2017b, 2017c, 2017d) によると、日本各地 (北海道陸別局、茨城県つくば局、沖縄県辺戸岬局と波照間局) の UV-A 量は、本実験の紫外線量より多いため、 $\alpha$ -terthienyl は屋外環境でも光活性化されると考えられる。ま

た、マリーゴールドの植栽に比べ、 $\alpha$ -terthienyl を基にした殺線虫剤は上記のような競合要素を含まないため、より安定した殺線虫活性を示すのではないかとと思われる。しかし、 $\alpha$ -terthienyl の土壌施用については、より詳細な研究が必要である。

本章の結論として、 $\alpha$ -terthienyl は、(1) 光活性化せずとも殺線虫活性を発揮し、(2) young adult と比較して、耐久型幼虫に対する殺線虫活性を示すことが分かった。 $\alpha$ -terthienyl は、光が届かない土壌中であっても、摂食行動をしない耐久型幼虫に対して殺虫活性を発揮できると考えられる。第 2 章では、光のない土壌中の  $\alpha$ -terthienyl の詳細な挙動を明らかにするため、光活性化をしない条件で、線虫体内での解毒代謝酵素の働きについて調べた。

1.5. 図

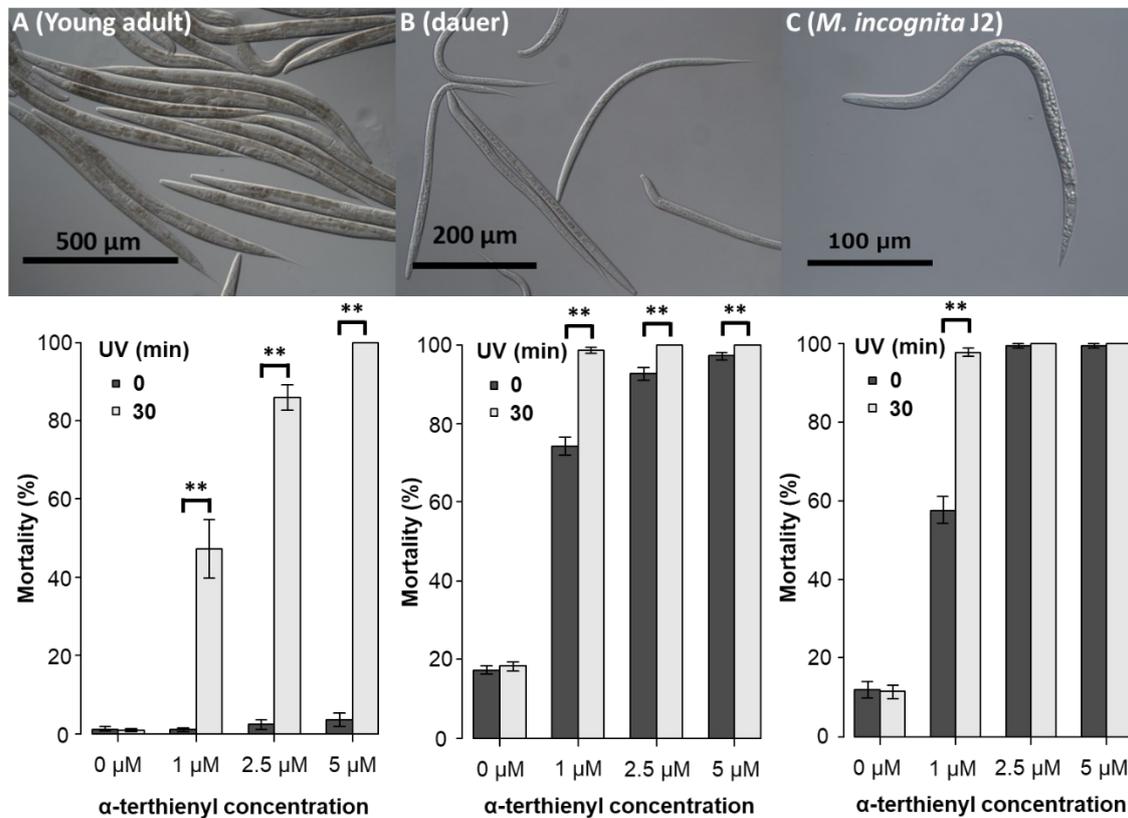


図1-1、各濃度の光活性または不活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理した線虫の死亡率 (%) 30 分間の UV-A 照射による光活性化または不活性化  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理した (A) *C. elegans* young adult、(B) *C. elegans* 耐久型幼虫、(C) *M. incognita* J2 の各濃度の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差)。死亡率 (%) は、独立に 3 回反復して算出した (\*\* $P < 0.005$ 、Mann-Whitney U 検定) (N=9,312)。図中の各線虫はノマルスキー微分干渉顕微鏡 Differential Interference Contrast microscope (DIC) (Nikon ECLIPSE E600) により撮影した。

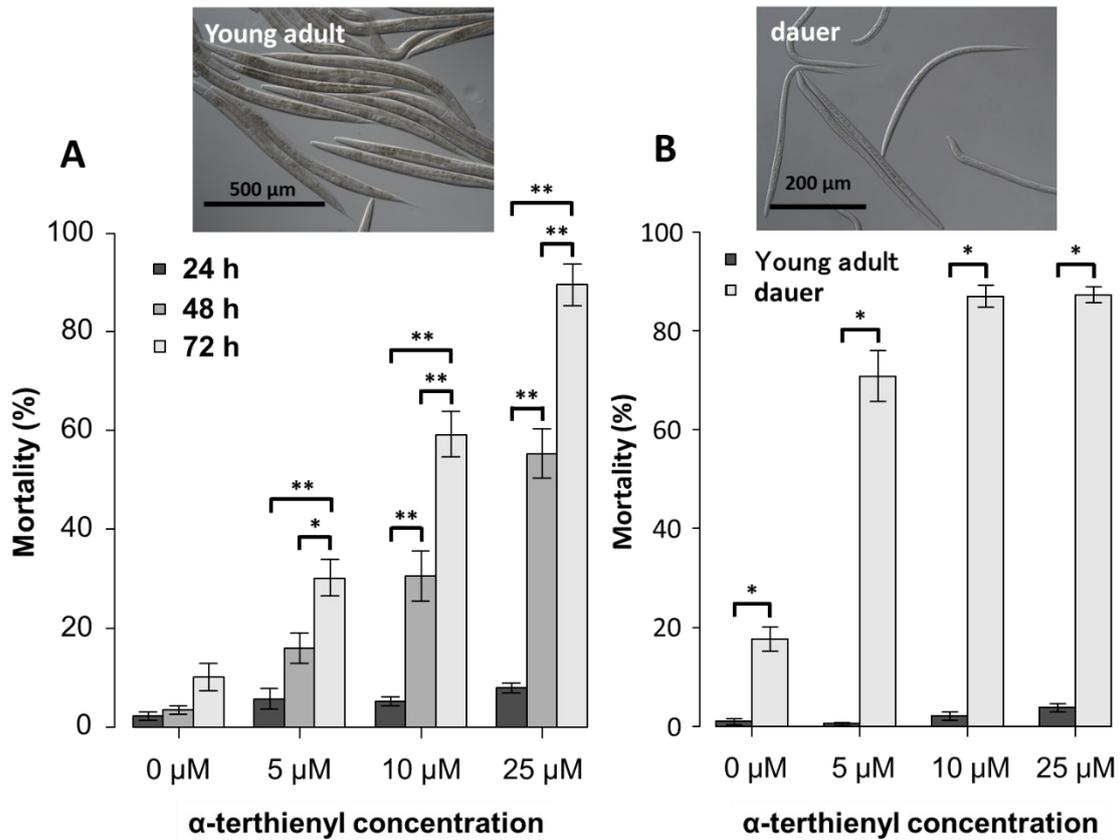


図 1-2、各濃度の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理した線虫の死亡率 (%)

各濃度の  $\alpha$ -terthienyl で (A) 24、48、72 時間処理した *C. elegans* young adult の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差)。(B) 24 時間処理した *C. elegans* young adult と耐久型幼虫の死亡率 (%) の比較。死亡率 (%) は同様に算出した (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction) (N=5,699)。図中の各線虫は同様に DIC により撮影した。

## 第2章 $\alpha$ -terthienyl に対する *C. elegans* の解毒代謝応答

### 2.1. 背景

$\alpha$ -terthienyl は UV 照射により活性化して酸化毒性を発揮し、殺線虫活性を示すと報告されているが (Bakker et al., 1979)、UV 照射せずとも殺線虫作用を示すことが第1章の実験で示された (図 1-2)。また、同様の結果が報告されている (Faizi et al., 2011)。よって、本章では、光不活性化 (UV 非照射)  $\alpha$ -terthienyl がどのように殺線虫作用を発揮するかを調べることを目的に実験を組み立てた。

$\alpha$ -terthienyl が発揮する活性のメカニズムについては、いくつか報告がある。光活性化  $\alpha$ -terthienyl による酸化毒性は、活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) のうち、一重項酸素とスーパーオキシドアニオンラジカルの生成によるものと報告されている (Bakker et al., 1979; Nivsarkar et al., 1992, 2001)。ROS は高い反応性を持つ小分子で、酸素の不完全な1電子還元により生成され、ROS の蓄積は、酸化ストレス (タンパク質、DNA、脂質が酸化され、ダメージを受ける状態) を誘導する (Scherz-Shouval and Elazar, 2011)。ROS には、酸素ラジカルであるスーパーオキシド superoxide ( $O_2^-$ ) とヒドロキシラジカル hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )、そして、非ラジカルである過酸化水素 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) と一重項酸素 ( $^1O_2$ ) が含まれ、このうち最も毒性が高いのはヒドロキシラジカルである (del Río, 2015; Scherz-Shouval and Elazar, 2011)。一般的に光酸化反応では、光 (UV-A) により励起した光増感物質 photosensitizer が  $O_2$  と反応し、エネルギー移動により一重項酸素、電子移動によりスーパーオキシドアニオンが生成する (Downum, 1992)。チオフェン ( $\alpha$ -terthienyl) は Type II 型の光増感物質であると言われている (Downum, 1992; Downum et al., 1983; Zhao et al., 2018)。細胞は ROS を解毒し、酸化ストレスから身を守る抗酸化システムを発達させてきたが (Scherz-Shouval and Elazar, 2011)、ROS を用いた免疫システムも発達させてきた。例えば、松枯

れ病 pine wilt disease (PWD) の初期段階では、病原線虫マツノザイセンチュウ pine wood nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* が侵入した宿主マツは、高濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成する「酸化バースト oxidative burst」と呼ばれる免疫反応を示し、低病原系統のマツノザイセンチュウは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性を示すため、免疫により殺虫されるが、強病原系統は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抵抗性を示すため、マツ内で生き残ることができる (Vicente et al., 2015)。

スーパーオキシドや過酸化水素といった ROS は、生体内 *in vivo* では解毒代謝酵素 detoxification enzyme スーパーオキシドジスムターゼ superoxide dismutase (SOD) やカタラーゼ catalase (CTL) の基質となる (Loew, 1900; McCord and Fridovich, 1969; Moreno-Arriola et al., 2014)。光活性化  $\alpha$ -terthienyl は、2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸 dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) を用いた蛍光による細胞内 ROS 測定法により、鱗翅目卵巣細胞 lepidopteran ovarian cell (Tn5B1-4 と Sf-21) において濃度依存的な ROS 誘導活性を示し、ペルオキシダーゼ peroxidase (POD)、SOD、CTL 活性を減少させると報告されている (Huang et al., 2017)。また、光活性化  $\alpha$ -terthienyl を昆虫 Tn-5B1-4 細胞とヒト 293 細胞に対して処理すると、昆虫細胞 (Effective Concentration 50 : EC<sub>50</sub>=3.36  $\mu$ g/mL) はヒト細胞 (EC<sub>50</sub>=6.23  $\mu$ g/mL) に比べ、ROS 産生といった  $\alpha$ -terthienyl による影響を強く受ける (Huang et al., 2010)。

解毒代謝酵素は第 1 相 Phase I、第 2 相 Phase II、第 3 相 Phase III 酵素に分類される (Quesnot et al., 2014)。シトクロム cytochrome P450 (CYP) を始めとする第 1 相酵素は、生体異物 xenobiotics に対するヒドロキシ化 hydroxylation といった酸化反応を触媒して極性化合物を生成し、グルタチオン S-トランスフェラーゼ glutathione S-transferase (GST) (細胞質、ミトコンドリア、小胞体に存在) を始めとする第 2 相酵素が抱合できるように変性させ、最終的に、異物は ATP 結合

カセット輸送体 ATP-binding cassette (ABC) transporter を始めとする第 3 相酵素により排出される (Han, 2011; Quesnot et al., 2014)。ROS により酸化された生体分子も有害な基質となるが、これらは GST や UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ glucuronosyl transferase (UGT) といった第 2 相酵素により代謝される (Lindblom and Dodd, 2006)。これらは  $\alpha$ -terthienyl 抵抗性にも重要であると考えられる。GST は、グルタチオン Glutathione (GSH) のチオール基 (-SH) と対象化合物のジスルフィド結合反応を触媒して求電子性を中和し、水溶性を高める酵素である (Habig et al., 1974; Keen et al., 1976)。グルタチオンは細胞内で酸化型 (GSSG) と還元型 (GSH) で存在するが (Halprin and Ohkawa, 1967)、酸化型はグルタチオン還元酵素 glutathione reductase によって還元型に変換される (Conn and Vennesland, 1951)。C. elegans の酸化ストレス関連酵素は、主に、構造的・機能的な哺乳類 Nrf2 ホモログであり、咽頭組織の形成に必要な遺伝子スクリーニングにより同定された CNC (cap'n'collar) 転写因子 skinhead family member-1 (SKN-1) によって制御されている (An and Blackwell, 2003; Wu et al., 2017)。上記のようなストレス応答における SKN-1 の活性は、WD40 リピートタンパク質である WDR-23 によって負に制御されている (Choe et al., 2009)。

本章では、 $\alpha$ -terthienyl が (3) 線虫の下皮に浸透して活性を発揮し、(4) 酸化ストレスを生じる化合物であることを示した。

## 2.2. 材料と方法

### 線虫株と培養法

C. elegans の操作・培養は、前章と同様に実施した。本章では、以下の 5 株の線虫を使用した。野生型 N2 (Bristol)、DP38 *unc-119 (ed3) III*; KHA117 {*chuls117[unc-119 (+), P<sub>gst-4::gst-4::nls::rfp</sub>]*} (C. elegans の *gst-4* プロモータ

一により *gst-4::nls::rfp* 融合遺伝子を発現する遺伝子組換え線虫) ; KHA143 {*chuls143[unc-119 (+) , Pgst-4::gst-4::gfp]II*} (*C. elegans* の *gst-4* プロモーターにより *gst-4::gfp* 融合遺伝子を発現する遺伝子組換え線虫) ; KHA166 {*chuls166[unc-119 (+) , Pctl-1::Bxy-ctl-1::gfp]*} (*C. elegans* の *ctl-1* プロモーターにより *ctl-1::gfp* 融合遺伝子を発現する遺伝子組換え線虫)、KHA169 {*sod-1::[chuSi169 gfp::3×flag]II*} (*C. elegans* の *sod-1* プロモーターにより *sod-1::gfp* 融合遺伝子を発現する遺伝子組換え線虫)。

### 解毒代謝酵素の発現観察

*C. elegans* 解毒代謝酵素の発現部位を観察するため、前章と同様に young adult に同調化した遺伝子組換え線虫を、最終濃度 10  $\mu$ M の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl と、ポジティブコントロールとして M9 バッファーに溶かして最終濃度 7.03 mM としたアクリルアミド acrylamide (富士フィルム和光純薬株式会社) (Hasegawa et al., 2008) と共に 96-well plate に加え、24 時間処理した。処理後の線虫を、M9 バッファーに濃度 1 (%) で混合した 1-フェノキシ-2-プロパノール 1-phenoxy-2-propanol (東京化成工業株式会社) で数分間処理し、麻痺させた線虫をスライドガラス上のアガーパットに移し (Shaham, 2006)、カバーガラスをかけ、プレパラートを作成した。そして、融合遺伝子の発現部位を、共焦点レーザー顕微鏡 confocal laser scanning microscope (CLSM) LSM710 (Zeiss) により観察した。

### 定量的リアルタイム quantitative real time PCR (qRT-PCR)

$\alpha$ -terthienyl 処理による 3 つの遺伝子 (*gst-4*、*sod-1*、*ctl-1*) の発現変化量を調べるため、前章と同様に young adult に同調化した *C. elegans* N2 を、10  $\mu$ M の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl と共に 9 cm ガラス製プレートに加え、24 時間処理した。コ

ントロールには、2 (%) DMSO を混合した M9 バッファーを使用した。試薬濃度と線虫密度は前章と同様であるが、各液量は 100 倍にスケールアップした。処理後、線虫を M9 バッファーで回収・洗浄し、液体窒素で急速凍結させ、-80°C で保存した。RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen) のプロトコールに従い、全 total RNA を抽出した。全 RNA 濃度を 50 (ng/μl) に調整し、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) と付属の Oligo dT Primer と Random 6 mers (逆転写反応用プライマー) を用いて逆転写した。qRT-PCR は、Sato et al. (2014) に従い、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) と CFX96 リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad) により実施し、各遺伝子用プライマーは、Primer 3 plus (<https://primer3plus.com>) を用いて設計した。各遺伝子の相対的な発現量 relative expression level (%) は、ハウスキーピング遺伝子 *snb-1* をコントロールとして用い、 $\Delta\Delta$ CT 法により算出した (Livak and Schmittgen, 2001; Sato et al., 2014)。qRT-PCR で用いたプライマーリストを表 2-1 に示す。各 qRT-PCR は、独立した線虫を用いて 4 回反復した。

## RNA 干渉

*C. elegans* N2 ゲノムの PCR により得られた *skn-1* と *wdr-23* 遺伝子断片をクローニングした RNAi ベクター pPD129.36 を用意した (Stanford 大学 A. Fire の方法を参考)。上記の RNAi 用プライマーリストを表 2-2 に示す。空 RNAi ベクターまたは各遺伝子断片を挿入した pPD129.36 を用いて *E. coli* HT115 を形質転換 transform した (Kamath et al., 2001)。各 RNAi プラスミドで形質転換した *E. coli* HT115 をイソプロピル-β-D (-) -チオガラクトピラノシド Isopropyl-β-D (-) -thiogalactopyranoside (IPTG) で 4 時間処理し、これを播種した NGM プレート (アンピシリン ampicillin 50 μg/ml、テトラサイクリン tetracycline 12.5 μg/ml) に、

L1 に同調化した線虫を移し、48 時間培養した。前章と同様に、同調化した young adult を M9 バッファーで回収し、 $\alpha$ -terthienyl と共に 96-well plate に移して 24、48、72 時間処理し、死亡率 (%) を算出した。融合遺伝子の発現は CLSM により観察した。

## 2.3. 結果

### $\alpha$ -terthienyl に対する解毒代謝酵素の発現パターン

ROS に対する主要な解毒酵素ファミリーは、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ glutathione peroxidase (GPX)、CTL、ペルオキシレドキシシン peroxiredoxin (PRDX) である (Henkle-Dührsen and Kampkötter, 2001)。ROS によって酸化され、有害な基質となった生体内分子は GST や UGT のような第 2 相代謝酵素により解毒される (Lindblom and Dodd, 2006)。 $\alpha$ -terthienyl に対する *C. elegans* の分子応答を調べるため、上記解毒酵素のうち、酸化物と生体異物に対する *sod-1*、*ctl-1*、*gst-4* の発現が比較的多く報告されていたため (Choe et al., 2009; Doonan et al., 2008; Hasegawa et al., 2008; Vicente et al., 2015)、これらを解析対象として選択した。

上記遺伝子に緑色蛍光タンパク質 green fluorescent protein (GFP) を融合させた遺伝子組換え線虫を用いて、 $\alpha$ -terthienyl 処理後の GST-4::GFP、SOD-1::GFP、CTL-1::GFP 発現を観察した。GST-4 発現は非ストレス条件下では見られなかったが (図 2-3A、B)、強力な GST 誘導物質であるアクリルアミド (Hasegawa et al., 2008) で KHA143 (*gst-4::gfp*) 線虫を処理すると、GST-4 が線虫の全身で強く発現した (図 2-3C、D)。 $\alpha$ -terthienyl で処理すると、GST-4 が線虫の上皮 hypodermis で顕著に発現した (図 2-3E、F)。SOD-1 は非ストレス条件下では、線虫の全身で弱く恒常的 constitutively に発現していたが (図 2-4A、B)、*sod-1* 発現を上昇さ

せるアクリルアミド (Hasegawa et al., 2008) で KHA169 (*sod-1::gfp*) 線虫を処理すると、SOD-1 発現が線虫の全身で増加した (図 2-4C、D)。 $\alpha$ -terthienyl で処理すると、SOD-1 が線虫の下皮で顕著に発現した (図 2-4E、F)。非ストレス条件下では、恒常的な CTL-1 発現が線虫の腸細胞 gut cell で見られたが (図 2-5A、B)、 $\alpha$ -terthienyl で KHA166 (*ctl-1::gfp*) 線虫を処理しても CTL-1 発現に変化は見られなかった (図 2-5C、D)。これらの結果に加え、qRT-PCR により各遺伝子の発現量を確認したところ、同様の結果が得られた (図 2-6)。

最も発現が顕著であった GST-4 の発現部位を細胞レベルで確認するため、*gst-4* と核移行シグナル nuclear localization signal (*nls*)、赤色蛍光タンパク質 red fluorescent protein (*rfp*) 融合遺伝子を発現する遺伝子組換え *C. elegans* KHA117 を用いた。非ストレス条件下では、同様に GST-4 発現は観察されなかったが (data not shown)、アクリルアミドで処理すると、GST-4 がほとんど全ての体細胞 somatic cell で強く発現した (図 2-7A、B)。 $\alpha$ -terthienyl で処理すると、GST-4 が下皮細胞のみで顕著に発現することを細胞レベルで確認した (図 2-7C、D)。

### **$\alpha$ -terthienyl により誘導される解毒代謝酵素の発現は SKN-1 / WDR-23 システムの制御下にある**

CNC ファミリーの 1 つである転写因子 SKN-1 は、多くの解毒代謝酵素の発現を直接制御している (An and Blackwell, 2003)。ベーシックロイシンジッパー-basic leucine zipper (bZip) 転写因子である CNC タンパク質は、線虫、昆虫、魚類、哺乳類 (ヒト) で広く保存されているが、植物と菌類には存在しない (Sykiotis and Bohmann, 2010)。WD40 リピートタンパク質 WDR-23 は、非ストレス条件下では SKN-1 と結合して活性を抑制するが、ストレスに曝されると SKN-1 を解離し、これを活性化させる (Tang and Choe, 2015)。本章では  $\alpha$ -terthienyl に対する *gst-4*

と *sod-1* の発現と、*skn-1/wdr-23* の関係について調べた。

*skn-1* をノックダウンさせると、 $\alpha$ -terthienyl 処理により線虫の下皮で誘導される GST-4 と SOD-1 の発現を抑制した (図 2-8)。また、*skn-1* をノックダウンさせると、アクリルアミド処理により誘導される GST-4 と SOD-1 の発現が線虫の一部の組織以外で抑制されることも確認した (図 2-9)。*wdr-23* をノックダウンさせると、非ストレス条件下であっても GST-4 と SOD-1 が強く発現し、これらの発現は  $\alpha$ -terthienyl 処理後であっても変化しなかった (図 2-10A-H)。また、*skn-1* と *wdr-23* をノックダウンさせても、CTL-1 の発現パターンに変化は見られなかった (図 2-8M-R、図 2-10I-L)。

### 解毒代謝酵素の発現は $\alpha$ -terthienyl 感受性に関係する

*C. elegans* に対する  $\alpha$ -terthienyl の感受性または抵抗性と解毒代謝酵素の関係を調べるため、*skn-1* と *wdr-23* の Feeding RNAi を実施した。 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は、前章と同様に、コントロール (空ベクター pPD129.36) RNAi では時間・濃度依存的に増加していた。しかし、*skn-1* または *wdr-23* をノックダウンさせると、線虫の死亡率 (%) への影響が見られた (図 2-11A-C)。24 時間処理では、線虫の死亡率 (%) は、10  $\mu$ M では  $11 \pm 2.0$  (%), 25  $\mu$ M では  $17 \pm 2.1$  (%) であったが、*skn-1* の RNAi により死亡率 (%) は、10  $\mu$ M では  $15 \pm 3.1$  (%), 25  $\mu$ M では  $33 \pm 6.8$  (%) に上昇し、*wdr-23* の RNAi により死亡率 (%) は、10  $\mu$ M では  $1.5 \pm 0.92$  (%), 25  $\mu$ M では  $4.7 \pm 0.83$  (%) に減少した (図 2-11A)。48 時間処理では、各 RNAi 処理による死亡率の差はより顕著となったが (図 2-11B)、72 時間処理では、25  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl により、ほとんどの線虫が死亡した (図 2-11C)。また、72 時間後のコントロール RNAi の LC<sub>50</sub> は  $10 \pm 0.40$   $\mu$ M であったが、*skn-1* RNAi では  $5.4 \pm 0.18$   $\mu$ M、*wdr-23* RNAi では  $12 \pm 0.41$   $\mu$ M となった。

## 2.4. 考察

SOD はスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) ラジカルを酸素 ( $O_2$ ) と過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に解毒する唯一の酵素で、この反応に続き、GPX または CTL により過酸化水素が酸素 ( $O_2$ ) と水 ( $H_2O$ ) に解毒される (Fridovich, 1995; Moreno-Arriola et al., 2014)。*C. elegans* には 5 つの *sod* 遺伝子が存在し (Doonan et al., 2008)、*sod-1* (Cu/Zn SOD) (細胞質 cytosolic) (Larsen, 1993)、*sod-2* (Mn SOD) (ミトコンドリア mitochondrial) (Suzuki et al., 1996)、*sod-4* (Cu/Zn SOD) (細胞外 extracellular) (Fujii et al., 1998) の他に、*sod-3* (Mn SOD) (ミトコンドリア) (Suzuki et al., 1996) と *sod-5* (Cu/Zn SOD) (細胞質) (Jensen and Culotta, 2005) が各部位で発現するが、*sod-1* は全 SOD 活性の約 80 (%) に寄与する一方で、*sod-3* と *sod-5* は低レベルで発現する (Doonan et al., 2008; Schaar et al., 2015)。また、*sod-1* と *sod-2* は増殖期の主要な *sod* 遺伝子で、耐久型幼虫期では *sod-3* と *sod-5* の発現が上昇する (Doonan et al., 2008; Honda and Honda, 1999)。過酸化水素で処理すると、各抗酸化酵素 (CTL、SOD、GPX) のうち、有意な発現は CTL のみで見られ、線虫の過酸化水素に対する保護は CTL が重要であると報告されている (Vicente et al., 2015)。*C. elegans* ゲノムには 3 つの *ctl* 遺伝子が直列 tandem に存在し、*ctl-3* (ニューロン neuron、筋肉、咽頭)、*ctl-1* (細胞質)、*ctl-2* (ペルオキシソーム peroxisome) はそれぞれ各部位で異なる活性を持つ (Petriv and Rachubinski, 2004; Togo et al., 2000; Vicente et al., 2015)。また、CTL-1 は線虫の腸で発現することを確認した (図 2-5)。本研究では、細胞質でのスーパーオキシドと過酸化水素の代謝を調べるため、*sod-1* と *ctl-1* をそれぞれ選択した。第 2 相酵素は、第 1 相酵素による代謝反応を経た生体異物や (酸化された) 生体分子と、還元剤 reducing agent との共役反応を触媒する (An and Blackwell, 2003)。このような有害分子に対する

生体防御システムは、動物で広く保存されている。哺乳類では、bZip 型転写因子である DNA 結合ドメインタンパク質 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が、抗酸化剤応答配列 antioxidant response element (ARE) を介して、第 2 相酵素をコードする多くの遺伝子の転写活性化に関わっている (Ney et al., 1993; Nguyen et al., 2003a)。β プロペラリピートを持つケルチ様 EHC 関連タンパク質 Kelch-like-ECH-associated protein 1 (Keap1) は、酸化または求電子ストレスのない状態では、ユビキチン-プロテアソーム分解系を介して Nrf2 を抑制する (Hasegawa and Miwa, 2010; Kobayashi et al., 2006; Nguyen et al., 2003b)。Keap1 と Keap1-Nrf2 複合体は、Keap1 のリンカードメインにより細胞質に局在する (Zhang and Hannink, 2003)。

(ROS のような) ARE 誘導物質は Keap1 のシステイン cysteine を修飾し、直接 Keap1-Nrf2 複合体を分離させ、Nrf2 の核蓄積を誘導する (Egler et al., 2005; Itoh et al., 1999; Rushmore et al., 1991)。マウス Keap1 には計 25 のシステイン残基があるが、うち 4 つ (Cys226、Cys613、Cys622、Cys624) が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性の Nrf2 活性化に必要だと報告されている (Suzuki et al., 2019)。しかし、Keap1 のストレス感受メカニズムの詳細はよく分かっていない (Suzuki et al., 2019)。哺乳類 Nrf と *C. elegans* の SKN-1 は機能的に類似していることが明らかになっている (An and Blackwell, 2003)。*C. elegans* では、酸化ストレス応答には転写因子 SKN-1 が必要であり、実際、SKN-1 の活性化は *ctl*、*sod*、少なくとも 9 種類の *gst* 遺伝子の発現を誘導する (Park et al., 2009)。生物は多様な GSTs を発現するが、これらは、配列相同性、細胞分布、基質特異性から以下の 7 つのクラスに分類される (Kampkötter et al., 2003)。Alpha、Mu、Pi (Mannervik et al., 1985)、Sigma (Meyer and Thomas, 1995)、Theta (Meyer et al., 1991)、Zeta (Board et al., 1997)、Omega (Board et al., 2000) クラスである。*C. elegans* ゲノムには約 50 種の *gst* 遺伝子が存在するが (Leiers et al., 2003)、GST-4 は線虫の全身で発現し (Hasegawa et al.,

2008)、レポーター遺伝子として発現解析によく用いられている。

SKN-1 結合領域は、*ctl* や *sod* など、多くの第 2 相酵素のプロモーター領域に存在する (An and Blackwell, 2003; Lindblom and Dodd, 2006)。GST コード遺伝子のプロモーターには 2 つまたはそれ以上の SKN-1 結合領域があると予測されている (Hasegawa et al., 2008)。 *C. elegans* 幼虫に対して酸化ストレス誘導物質であるパラコート paraquat で処理すると、*gst-4* の定常状態 mRNA レベルは 40 倍に増加し、*sod-1* と *sod-3* も 2 倍に増加すると報告されている (Tawe et al., 1998)。DNA binding protein 1 (DDB-1)、そして、SKN-1 と相互作用する WDR-23 は腸、下皮、神経細胞核で発現し、SKN-1 の核蓄積を抑制する (Choe et al., 2009)。線虫は KEAP1 ホモログを欠いており、KEAP1 による NRF2 の制御と、線虫の WDR-23 の類似点はメカニズムのみで、構造的には KEAP1 と WDR-23 は別物である (Lo et al., 2017)。KEAP1 が存在するにもかかわらず、ヒトゲノムは WDR23 を保持しており、KEAP1 と WDR23 はそれぞれ独立したメカニズムで NRF2 を制御する (Lo et al., 2017)。線虫の 2 つの主要な CeWDR-23 アイソフォームの細胞内分布は、哺乳類の 2 つの主要なアイソフォームの分布と一致しており、アイソフォーム 1 は主に細胞質に局在し、アイソフォーム 2 は核に豊富に含まれることから、標準的な制御系統である KEAP1 と独立して、WDR23 は別系統で NRF2 活性を制御すると考えられている (Lo et al., 2017; Staab et al., 2013)。本章では、細胞質に局在する CeWDR-23 アイソフォーム a (Staab et al., 2013) を RNAi の対象とした。

WDR-23 の機能喪失により、腸細胞核で SKN-1 が蓄積して SKN-1 タンパクレベルが上昇し、第 2 相酵素の恒常的な転写が誘導される (Choe et al., 2009)。GST 誘導物質アクリルアミドにより誘導された全身の GST-4 発現は、*skn-1* RNAi により、咽頭と体壁筋 body wall muscle 以外で抑制される (図 2-9C、D) (Hasegawa

et al., 2008)。 *skn-1* RNAi により、発現増加 (%) も *sod-1* では 80 (%)、 *ctl-2* では 100 (%) 抑制される (Park et al., 2009)。 ストレス応答因子である転写因子 abnormal dauer formation-16 (DAF-16) は核移行により活性化される (Deng et al., 2020; Rottiers et al., 2006)。 DAF-16 のコンセンサス Akt 領域が、 AKT タンパク質の下流 downstream に分岐する DAF-2 経路によってリン酸化されると、 DAF-16 の核蓄積が抑制される (Lin et al., 2001)。 DAF-2 制御のリン酸化酵素 kinase は、 WDR-23 の上流 upstream で SKN-1 活性を抑制する (Choe et al., 2009)。 実際には、 *daf-2* 活性が低下すると、 *C. elegans* の *gst-4*、 *sod-3*、 *ctl-1*、 *ctl-2* の発現は増加する (Murphy et al., 2003)。 また、 SKN-1 は *daf-16* 転写を直接制御せず (Deng et al., 2020)、 *daf-16* は SKN-1 発現にも不要である (Tullet et al., 2008)。 DAF-2 経路のシグナルが低下すると、 SKN-1 は DAF-16 と一部しか重複しない遺伝子発現プログラムを誘導する (Tullet et al., 2008)。 DAF-2 の共活性の理由は不明だが、 SKN-1 は熱ストレスによって抑制されるが、 熱耐性には DAF-16 が必要なため、異なる転写因子が協調的に働いていると考えられている (Deng et al., 2020)。

$\alpha$ -terthienyl または類縁化合物は、植物根内で線虫に浸透して殺虫すると予測されているが (Bakker et al., 1979)、私が調べた限りでは、これを証明する明確な証拠はなかった。  $\alpha$ -terthienyl 処理により GST-4 と SOD-1 が *C. elegans* の下皮で発現したことから (図 2-3E、F と図 2-4E、F)、  $\alpha$ -terthienyl は線虫の下皮に浸透 penetrate し、酸化ストレス誘導物質として作用すると考えられる。もし、  $\alpha$ -terthienyl が口 mouth から摂食され、活性を発揮するならば、解毒代謝酵素の発現は、アクリルアミドで処理した遺伝子組換え線虫で観察されたように (図 2-3C、D と図 2-7A、B)、咽頭筋 pharyngeal muscle と腸で見られるはずである。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡により、ピンホールにより上下から対象面以外の蛍光を防ぐことに加え、標本に焦点を結んだレーザービームを 1 点に照射し、

対象を細かく走査スキャンした線虫組織の光学的スライス画像を得た (Paddock, 1999)。よって、上記の結果も、各レポーター遺伝子の発現部位を正確に捉えたものと考えている。また、光不活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、2.5  $\mu$ M から GST-4::GFP 発現が見られる (図 2-3M)。光活性化  $\alpha$ -terthienyl では、より低濃度から GST-4::GFP 発現が見られるものの、約半数の線虫が死亡する 1  $\mu$ M で処理しても、発現量は多くなかった (図 1-1、2-3M)。この結果は、光活性化  $\alpha$ -terthienyl は、線虫が死亡する濃度であっても GST-4 による解毒代謝が十分になされないため、高い殺線虫活性を発揮する可能性を示している。

*C. elegans* の上皮系は 2 つの細胞群から構成され、(1) クチクラを分泌する多核融合細胞からなる下皮細胞は、主な融合細胞である hyp 7 に加え、頭部 (hyp 1 から hyp 6) と尾部 (3 つの単核細胞 hyp 8、9 と 11、最後尾の 2 核細胞 hyp 10) の小さい下皮細胞からなり、(2) 特殊上皮細胞 specialized epithelial cell は、ニューロンの感覚受容体、下皮と内部組織を結合させるリンカー細胞、クチクラの一部を分泌してクチクラ構造を作る機能を持つ (Altun and Hall, 2020; Shemer and Podbilewicz, 2000; Sulston et al., 1983)。クチクラは線虫の外骨格 exoskeleton であり、形態の維持、外界との相互作用または保護、運動性に重要な役割を果たす (Kramer et al., 1997)。線虫の両側にはシーム細胞 seam cell と呼ばれる特殊な下皮細胞が縦一列に存在し、シーム細胞と P 細胞 (腹索芽細胞) の分裂により生成された多くの核が hyp 7 に融合し、(雌雄同体では) 139 個の核を含む *C. elegans* 最大の融合細胞として体表の大部分を占めるようになる (Shemer and Podbilewicz, 2000; Sulston et al., 1983)。線虫の口腔はリング状の 3 つの下皮細胞 (最内側の hyp 1、内側の hyp 2、外側の hyp 3) に覆われ、下皮と消化器系の上皮内層を結合させる役割を持ち、続いて hyp 3 は hyp 4 と接続する (Altun and Hall, 2020; Sulston et al., 1983)。頭部の 5 つの下皮細胞は全て融合細胞で、2 から 3 個の核

を含む(Altun and Hall, 2020)。また、hyp 6 は hyp 7 と融合し(Yochem et al., 1998)、肛門の前にある hyp 12 も hyp 7 と融合するが(Altun and Hall, 2020; Sulston and Horvitz, 1977)、hyp 10 と hyp 13 では性特異的な細胞融合が起こる(Shemer and Podbilewicz, 2000)。雌雄同体の尾部では、4つの尾部下皮細胞のうち3つ(hyp 8 から 10)が伸縮してはめ込むように組織化され、後続の背側細胞(hyp 11)が最前部に収まるようになっている(Nguyen et al., 1999)。しかし、雄の尾部では、前方から後方に細胞融合が進行し、まず hyp 8 と hyp 11、次に hyp 9、最後に hyp 10 と融合する(Nguyen et al., 1999)。雄特異的な2核細胞 hyp 13 は、腹側の2細胞からなり、形態形成の最終段階で hyp 7 と融合するが、雌雄同体ではこれらの核は hyp 7 に含まれている(Nguyen et al., 1999)。また、下皮細胞の機能や発達に影響する遺伝子変異は、クチクラの構造と機能、筋肉発達、線虫の形態に障害をもたらす(Altun and Hall, 2020)。KHA117 (*gst-4::nls::rfp*) を  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、頭部と尾部を含む全身の下皮細胞核で蛍光が見られることを確認した(図 2-7C、D)。 $\alpha$ -terthienyl はモルモット guinea pig の上皮 epidermis、付属器 adnexae、上皮真皮 superficial dermis を通して皮膚 skin に浸透すると報告されており(Rampone et al., 1986)、この報告は、本研究の結果とも一致する。

$\alpha$ -terthienyl は、一重項酸素を生成する作用機構により細胞膜の破裂をもたらすが、DNA の構造と機能には影響しないため、発癌性・変異原性は低いと考えられている(Rampone et al., 1986)。本研究では、*skn-1* RNAi により GST-4 や SOD-1 の発現が抑制されると、 $\alpha$ -terthienyl に対する感受性が増加し、*wdr-23* RNAi により GST-4 や SOD-1 を発現させると  $\alpha$ -terthienyl に対する耐性が付与されることが分かった(図 2-11、2-12)。また、野生型 N2 と KHA143 (*gst-4::gfp*) の比較により、*gst-4::gfp* 融合遺伝子は  $\alpha$ -terthienyl の感受性または抵抗性に影響しないことも確認した(図 2-11D)。

$\alpha$ -terthienyl は蚊幼虫ではオキシラジカル機構により作用すると言われている (Nivsarkar et al., 2001)。嫌気処理 (ジチオナイト dithionite、メルカプトエタノール mercaptoethanol、窒素) により、光活性化  $\alpha$ -terthienyl の活性には酸素が必要なことが分かっている (Bakker et al., 1979)。ナミクキセンチュウ *Ditylenchus dipsaci* を用いた Bakker et al. (1979) の実験によると、光活性化  $\alpha$ -terthienyl 処理により、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ glucose-6-P dehydrogenase (G6PD) 活性が減少するが、一重項酸素失活剤 quencher (ヒスチジン histidine、トリプトファン tryptophan、メチオニン methionine、 $N_3$ ) で処理すると、酵素阻害が解除され、逆に、一重項酸素の寿命を延長させる重水  $D_2O$  で処理すると、酵素抑制効果が上昇する (Bakker et al., 1979; Matheson and Lee, 1978)。一重項酸素はオレフィン olefin と反応して 1,2-ジオキセタン dioxetane を生成するが (Wieringa et al., 1972)、光活性化  $\alpha$ -terthienyl をオレフィンと反応させると、ジオキセタンが生成する (Bakker et al., 1979)。また、EDTA、カタラーゼと過酸化水素、または、ヒドロキシラジカル失活剤 (マンニトール mannitol と安息香酸 benzoate) を  $\alpha$ -terthienyl に添加しても影響は見られない (Bakker et al., 1979)。これらのことから、ROS のうち、過酸化水素とヒドロキシラジカルは関与しないと考えられている (Bakker et al., 1979)。しかし、Bakker et al. (1979) は、SOD を添加しても  $\alpha$ -terthienyl 活性への影響が見られなかったと報告したため、酵素抑制におけるスーパーオキシドアニオンの働きは考えられてこなかった (Nivsarkar et al., 2001)。後に、蚊幼虫において SOD 活性が  $\alpha$ -terthienyl ラジカルとスーパーオキシドラジカルによって抑制されると報告され、酵素抑制は毒性における重要なステップであり、これが酸素ラジカルの蓄積を誘導し、細胞損傷を引き起こす可能性があることが報告された (Nivsarkar et al., 2001)。このことから、*C. elegans* を  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、生成した上記ラジカルによって SOD 活性が抑制される

ため、*sod-1* と比較して *gst-4* の発現がより顕著になるのかもしれない (図 2-6、2-12)。CTL-1 は線虫の腸で恒常的に発現するが (図 2-5A、B)、KHA166 (*ctl-1::gfp*) を  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、CTL-1 発現に変化は見られなかった (図 2-5C、D)。この結果は、CTL-1 は  $H_2O_2$  を生成しない  $\alpha$ -terthienyl の解毒代謝に関係せず、過酸化水素から生成される最も反応性の高い ROS であるヒドロキシラジカルも (Chen et al., 2015)、 $\alpha$ -terthienyl からは生成されない可能性を示し (Bakker et al., 1979)、これらの仮説はこれまでの報告と一致する。また、CTL-1 発現は *skn-1* と *wdr-23* の RNAi による影響を受けないことも確認した (図 2-8M-R、図 2-10I-L、図 2-12E)。qRT-PCR の結果も、 $\alpha$ -terthienyl 処理により *ctl-1* 発現が有意に上昇しないことを示している (図 2-6)。また、 $H_2O_2$  処理による、KHA166 の CTL-1::GFP 発現の増加も確認した (図 2-12D)。これは、Taub et al. (1999) の CTL-1 の機能報告とも一致する。私が調べた限りでは、カタラーゼ遺伝子のうち、*ctl-1* と *skn-1* の直接的な関係は報告されていなかったが、本研究により、線虫の腸で発現する *ctl-1* は *skn-1* の制御下になく、下皮に作用する  $\alpha$ -terthienyl の解毒代謝にも関係しないことが分かった。これらの結果は、 $\alpha$ -terthienyl に対する線虫の防御機構は SKN-1 / WDR-23 システムに大きく依存するという仮説とも一致する。

本研究では  $\alpha$ -terthienyl は耐久型幼虫に対する高い殺線虫活性を示すことを明らかにした (図 1-1、図 1-2)。耐久型幼虫は長期間劣悪な環境にさらされる可能性があるため、細胞へのダメージを避ける必要がある (Larsen, 1993)。耐久型幼虫は水透過性が低く、乾燥し難く、様々な化合物に対する耐性を示すが、これらの特性は、摂食行動をしないことと、非常に規則的な筋間隔を持つ特殊なクチクラ層による (Cassada and Russell, 1975)。このように、*C. elegans* 耐久型幼虫は劣悪な環境で生存するための形態的・代謝的に特別な発育ステージである (Cassada

and Russell, 1975; Erkut and Kurzchalia, 2015)。プロテオーム解析により、いくつかの第2相タンパク質 (GST-5、GST-7、GST-10) はL3と比較して耐久型幼虫で増加していたが、GST-36は耐久型幼虫で減少していた (Jones et al., 2010)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のH<sub>2</sub>OとH<sub>2</sub>への還元を触媒し、脂質とステロイドも還元対象とするペルオキシダーゼであるGPX-2も耐久型幼虫で増加していた (Jones et al., 2010)。耐久型幼虫では young adult に比べ SOD 活性が5倍高かったが、間接的なCTL誘導は起こらず、耐久型幼虫の高いSOD活性は、体内で生成したフリーラジカルの消化が生存に重要である可能性を示している (Larsen, 1993)。一方で、Vanfleteren and De Vreese (1995) は SOD と CTL 活性が耐久型幼虫で上昇すると報告している。しかし、Jones et al. (2010) は SOD-1 が耐久型幼虫で上昇したが、有意ではないと報告している。また、耐久型幼虫における過酸化水素耐性は成虫よりも20倍高いが、この耐性は酸化ストレスへの細胞内抵抗性には重要でなく、耐久型幼虫と young adult との CTL 活性の差も見られなかったと報告されている (Larsen, 1993)。このように、酵素の恒常的な発現は増殖期よりも耐久型幼虫でよく見られるが、生体異物に対する酵素の誘導反応は停滞している可能性がある。本研究では、耐久型幼虫の遺伝子組換え線虫に対して  $\alpha$ -terthienyl を処理しても、GST-4の発現はあまり見られず (図 2-3I-L)、SOD-1でも同様の結果が得られた (data not shown)。また、私が調べた限りでは、*gst-4* の発現は耐久型幼虫で増加していなかった。*gst-4* や *sod-1* は主に増殖期で発現することから (Doonan et al., 2008)、 $\alpha$ -terthienyl は *C. elegans* 耐久型幼虫に対して高い殺線虫活性を発揮するのかもしれない。しかし、さらなる研究が必要である。

*C. elegans* の体長は、L1では250 ( $\mu$ m)、young adultでは900-940 ( $\mu$ m) (Altun and Hall, 2020)、成虫では1,300 ( $\mu$ m) (Cox et al., 1981)、耐久型幼虫では495  $\pm$  60 ( $\mu$ m) であるが (Cassada and Russell, 1975)、若い幼虫に対して  $\alpha$ -terthienyl を

処理しても、耐久型幼虫で見られたような劇的な死亡率 (%) の変化は見られなかった (data not shown)。これは、線虫に対する  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は、体長よりも解毒代謝活性に依存する可能性を示している。

1,3-D を始めとする有機ハロゲン化合物の土壌燻蒸剤は気化し、土壌中の水分と反応して PPN のクチクラに浸透し、 $S_N2$  求核置換反応によりタンパク質と反応し、代謝異常を引き起こす (Ebene et al., 2019; Zheng et al., 2006)。(作業員である) ヒトも 1,3-D の蒸気をすぐ吸入してしまうが、GST を介したグルタチオン (GSH) 抱合により直ちに排出される (EPA, 2000)。1,3-D の高い揮発性は有効性を増加させるが、大気への放出と作業員の暴露量を増加させる (Yates and Ashworth, 2018)。1,3-D の GSH 抱合は一般的な解毒代謝経路であるが (Bartels et al., 2000)、GST が制御する 1,3-D 解毒代謝における GSH 抱合の役割についてはよく分かっていない (Klaunig et al., 2015)。1,3-D はヒトへの発癌性が疑われており (Baker et al., 1996)、1,3-D の慢性的な経口暴露は、非遺伝毒性作用によりラット rat 肝臓で腫瘍形成を増加させる (Klaunig et al., 2015)。1,3-D はグルタチオンによって直ちに解毒されるものの、解毒によりグルタチオンの枯渇を引き起こすため、これがラット肝臓における腫瘍形成をもたらす可能性がある (Klaunig et al., 2015)。有機リン系農薬を始めとする非燻蒸剤は、その使いやすさと費用から、燻蒸剤よりも一般的になりつつある (Starr et al., 2007; Wada et al., 2011)。有機リン系農薬であるイミシアホス Imicyafos やカーバメート系農薬であるオキサミル Oxamyl の殺線虫作用は、興奮性神経伝達物質であるアセチルコリン acetylcholine を神経筋シナプスで加水分解し、興奮反応を終了させる働きのあるアセチルコリンエステラーゼ acetylcholinesterase (AChE) の阻害である (Opperman and Chang, 1990)。また、フルオピラム fluopyram (コハク酸デヒドロゲナーゼ阻害剤) は、*M. incognita* や自活性線虫を麻痺させ、根感染を阻害す

るが (Faske and Hurd, 2015)、これを有効成分とする農薬 (バイエルクロップサイエンス株式会社と日本農薬株式会社) は、複合体 II に作用し、線虫のエネルギー生産を阻害する世界初の殺線虫剤である (Umetsu and Shirai, 2020)。主要な殺線虫剤である 1,3-D の殺線虫作用は代謝異常であり、燻蒸剤のため吸入の危険性もあるが、 $\alpha$ -terthienyl は GST や SOD を線虫の下皮で発現させる殺線虫活性を発揮し、燻蒸も必要なく、有機リン系とも異なる作用機構を持つと考えられるため、 $\alpha$ -terthienyl も IPM に適合する次世代の殺線虫剤となる可能性がある。

$\alpha$ -terthienyl の除草活性 herbicidal activity も研究されており、 $\alpha$ -terthienyl の半数阻害濃度 median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) は、雑草であるオニメヒシバ *Digitaria sanguinalis* では 22.03 (mg/l)、モデル生物シロイヌナズナ *A. thaliana* では 29.64 (mg/l)、緑藻であるコナミドリムシ *Chlamydomonas reinhardtii* では 1.10 (mg/l) であり、主要な除草剤アトラジン atrazine よりも高い除草活性を持つ (Zhao et al., 2018)。 $\alpha$ -terthienyl と植物が接触すると、除草剤ターゲットである *A. thaliana* トランスケトラーゼ transketolase-1 (ATTKL1) 活性部位との結合による酵素抑制と、*atkl1* の抑制による光合成阻害が誘導され、植物の枯死を引き起こす (Huo et al., 2018; Zhao et al., 2018)。しかし、 $\alpha$ -terthienyl に対する植物の IC<sub>50</sub> は、線虫 (*C. elegans* や *M. incognita*) の LC<sub>50</sub> や昆虫細胞の EC<sub>50</sub> と比較して高いため (Huang et al., 2010; Zhao et al., 2018)、線虫防除における農作物に対する悪影響はあまりないと考えられる。

殺線虫活性を示す植物のうち、土壌にすき込んだ時に殺線虫物質を放出すると考えられている植物はいくつか存在する。線虫抑制に使われているクロタラリア *Crotalaria* には 1,2-dehydropyrrolizidine alkaloid (PA) が存在する (Ntalli and Caboni, 2012)。しかし、クロタラリアの主要な分泌物質の 1 つであるモノクロタリン monocrotaline は家畜やヒトへの悪影響を引き起こすことが知られている

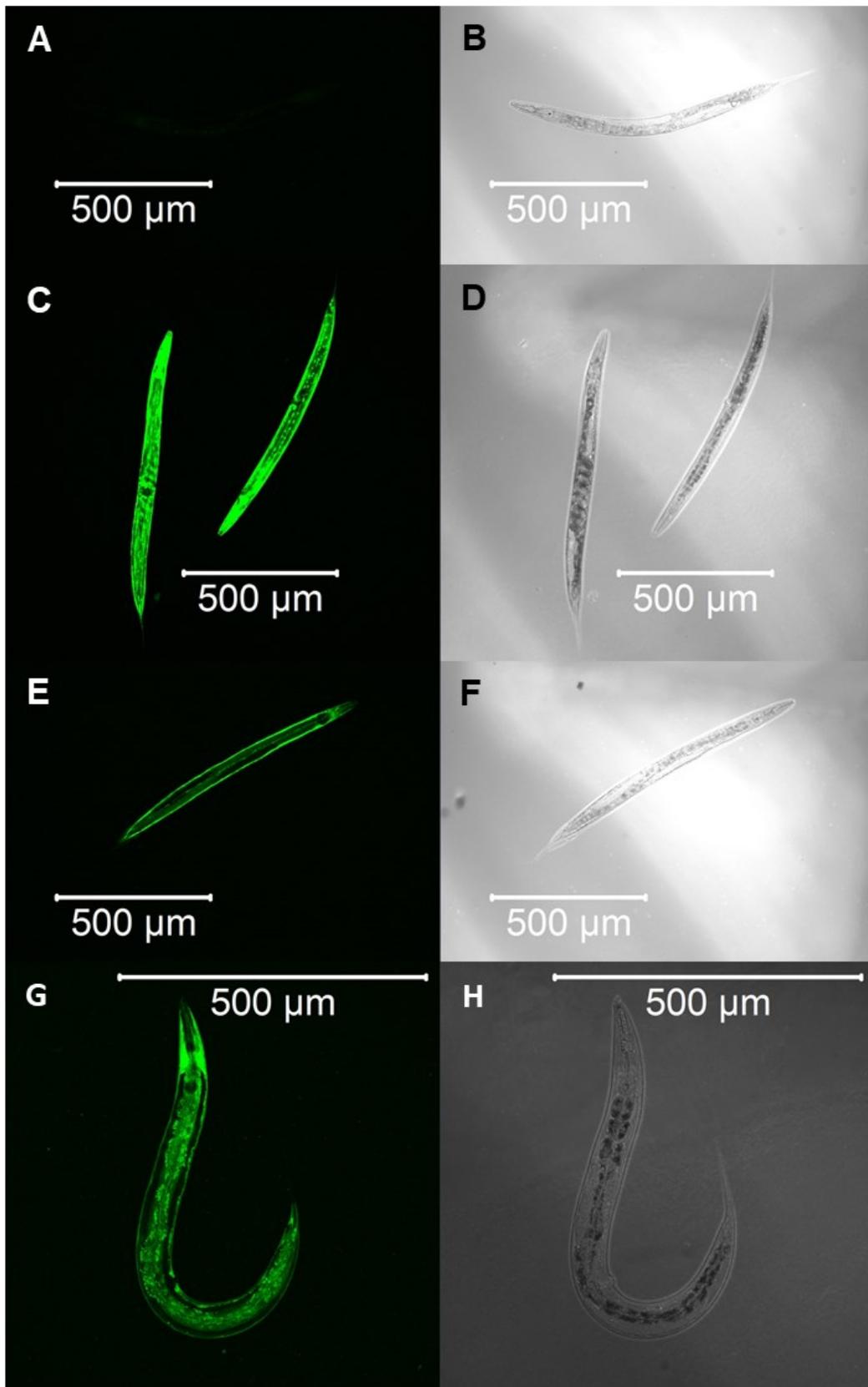
(Ntalli and Caboni, 2012)。PA はアジアやアフリカで問題となっている外来雑草種であるヒマワリヒヨドリ *Chromolaena odorata* にも含まれ、根に含まれる PA は濃度 70-350 (mg/l) で *M. incognita* に対する殺線虫活性を示したと報告されている (Ntalli and Caboni, 2012)。アスパラガス *Asparagus officinalis* の根から単離されたアスパラガス酸は、濃度 35 ppm で存在し、複数種の PPN に対して毒性を持ち、アスパラガスの線虫抵抗性に関して重要な役割を担っている (Takasugi et al., 1975)。オート麦 Oat (*Avena sativa*) は *Heterodera* や *Pratylenchus* に対して、殺線虫物質 *O*-methyl-apigenin-*C*-deoxyhexoside-*O*-hexoside を産生する防御機構を持つ (Soriano et al., 2004)。抵抗性品種のダイズ *Glycine max* 根は、ダイズシストセンチュウ *H. glycines* を接種させると、線虫の頭部領域に誘起され、Glyceollin と呼ばれるファイトアレキシン phytoalexin を産生する (Huang and Barker, 1991)。インドネシア・スマトラ島の植物 *Knema hookeriana* から抗線虫物質 3-undecylphenol と 3-(8Z-tridecenyl)-phenol が単離されている (Alen et al., 2000)。キク科のアラゲハンゴンソウ *Rudbeckia hirta* の根から単離されたチアルブリン thiarubrine C (polyacetylenic 1,2-dithiin) は光のない状態で *M. incognita* と *P. penetrans* に対する殺線虫活性を示す (de Viala et al., 1998)。植物以外からも殺線虫物質は見つかっており、殺線虫細菌 *Streptomyces albogriseolus* HA10002 から単離された fungichromin B (6'-methyl-fungichromin) も天然微生物由来の農薬候補物質として有望である (Zeng et al., 2013)。カカオ *Theobroma cacao* 根から分離され、cholest-5-en-3-ol (3.beta.) -carbonochloridateなどを産生する *Bacillus thuringiensis* AK08 も *Melydogyne* sp. に対する高い殺線虫効果を持つ (Maulidia et al., 2020)。エジプトの過酷な環境から分離された放線菌 *Saccharomonospora viridis* Hw G550 が産生するプロテアーゼも、*M. incognita* J2 のクチクラを加水分解する高い殺線虫活性を示したため、線虫防除に利用できると考えられている

(Darwesh et al., 2019)。「ニーム Neem」の名で知られるセンダン科 Meliaceae のインドセンダン *Azadirachta indica* に含まれるアザジラクチン azadirachtin は、すでに線虫防除用の市販製剤として登録されているが (Javed et al., 2008; Ntalli and Caboni, 2012)、上記の化合物の実用性もモデル線虫 *C. elegans* を用いた本研究の実験モデルで確かめることができる。

一方で、分子遺伝学を用いた防除法の開発も進められている。遺伝子ドライブ gene drive は、他の対立遺伝子よりも高確率で遺伝する遺伝子が、個体群において素早く広がるシステムのこと、有害生物防除への応用が注目されている (Champer et al., 2016)。例えば、マラリアベクターであるハマダラカ *Anopheles gambiae* 雌の *doublesex* 転写産物はエクソン exon 5 を含むが、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) -CRISPR-associated (Cas) 9 を用いてイントロン intron 4 とエクソン 5 の境界を破壊した遺伝子ドライブ産物を導入すると、間性 intersex で完全な不稔性を示す (Jinek et al., 2012; Kyrou et al., 2018)。しかし、遺伝子ドライブでは、人為的に遺伝子改変された個体が、意図せず元々の生息地に帰化することにより、世界的な種の減少を引き起こす危険性がある (Webber et al., 2015)。このことから、現在、最も現実味のある次世代の防除手法は、生物由来の有用物質を次世代の殺虫剤として用いることではないかと考える。

本章の結論として、 $\alpha$ -terthienyl は、(3) 線虫の下皮に浸透して殺線虫活性を發揮し、(4) 酸化ストレスを誘導する化合物であることを示した。 $\alpha$ -terthienyl は光が届かない土壌中であっても、摂食行動をしない幼虫のクチクラに浸透し、効果的に殺線虫活性を發揮するため、農業現場での感染態幼虫 (PPN) 防除に応用できる可能性が高いことを示した。

2.5. ☒



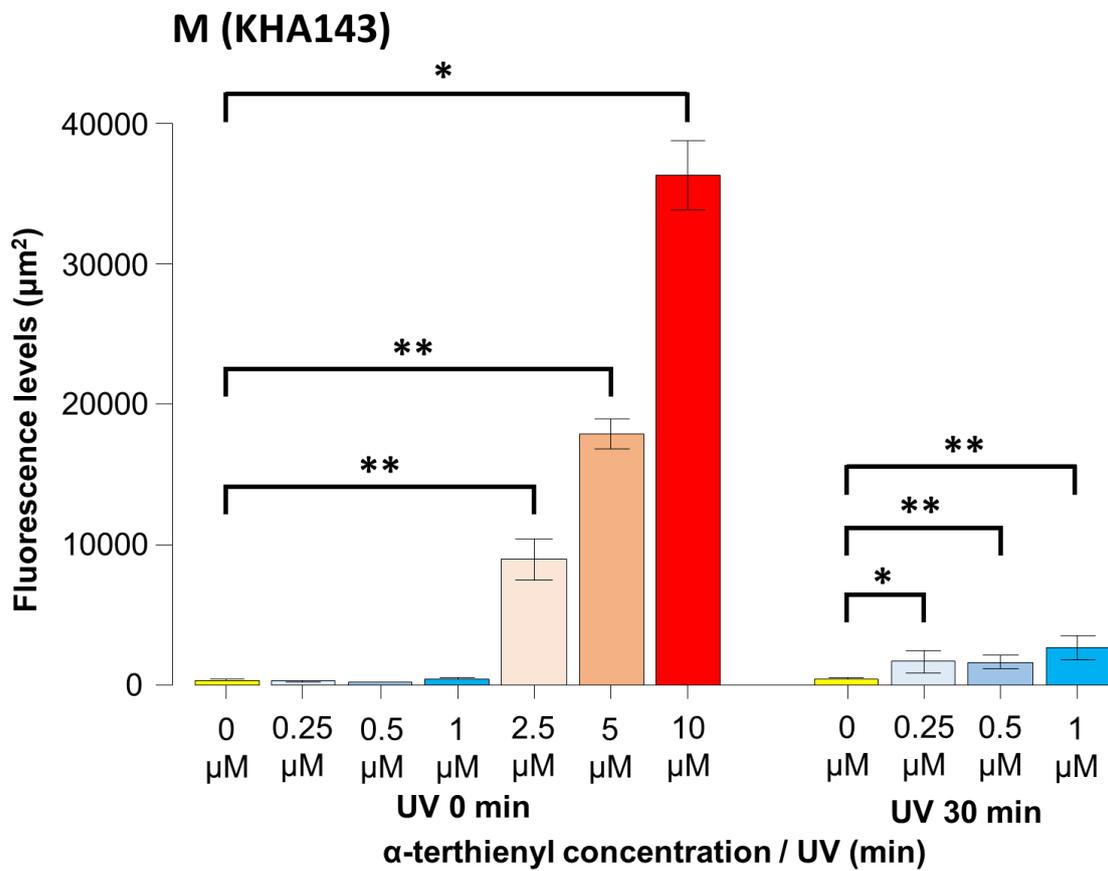
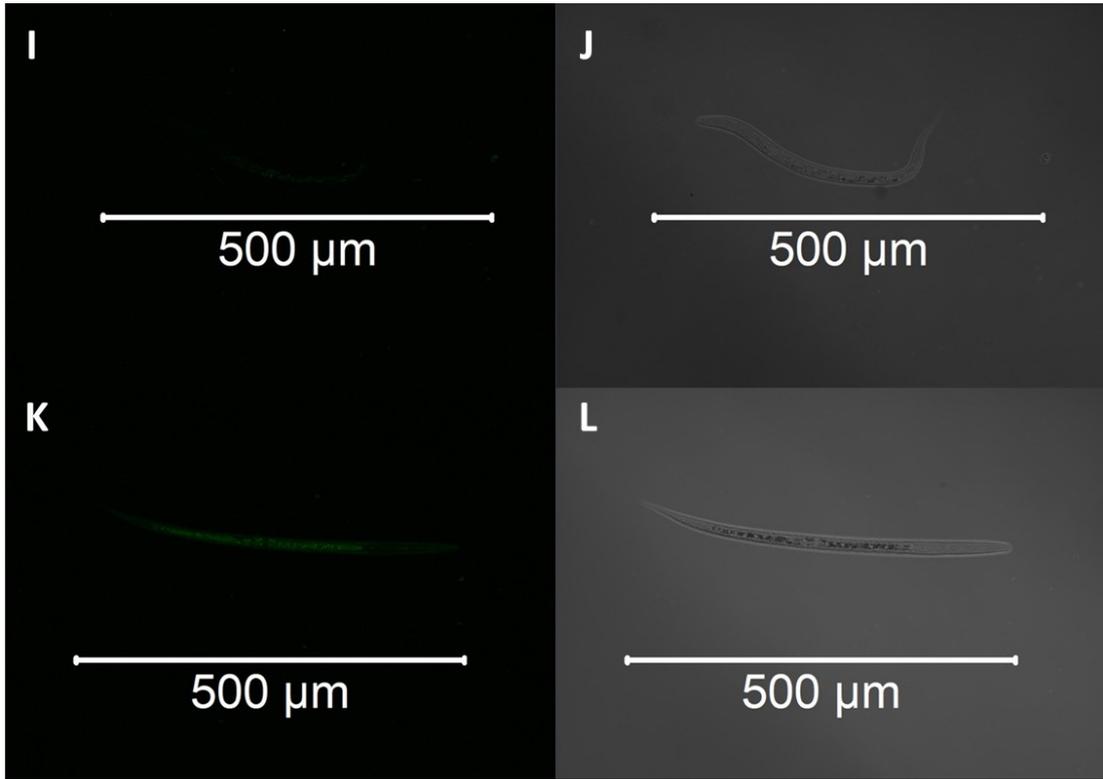


図 2-3、遺伝子組換え線虫 KHA143  $\{chu1s143[unc-119 (+), Pgst-4::gst-4::gfp]II\}$   
の GST-4::GFP 発現パターン

(A、B) 薬剤非処理条件では、young adult 線虫の GST-4::GFP 発現は見られない (100 倍)。(C、D) 7.03 mM のアクリルアミドで 24 時間処理すると、GST-4::GFP が線虫の全身で強く発現する (100 倍)。(E、F) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理すると、GST-4::GFP が線虫の下皮で顕著に発現する (100 倍)。(G、H) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理した GST-4::GFP 発現を 200 倍で観察した。(I、J) 薬剤非処理条件では、dauer 線虫の GST-4::GFP 発現は見られない (200 倍)。

(K、L) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、同倍率の young adult と比較して dauer の GST-4::GFP 発現はあまり見られない (200 倍)。スケールバーは 500  $\mu$ m。(M) 各濃度の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理し、CLSM で撮影した各 young adult 線虫 1 個体あたりの GFP 蛍光密度 fluorescence levels (pixels /  $\mu$ m<sup>2</sup>) を ImageJ (NIH、<https://imagej.nih.gov/ij/>) により計測した (平均値 $\pm$ 標準誤差) (N=116)。光不活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、2.5  $\mu$ M から濃度依存的に GST-4::GFP 発現が増加する。光活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、より低濃度から GST-4::GFP 発現が見られるものの、約半数の線虫が死亡する 1  $\mu$ M であっても発現量は多くなかった (\* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.005、Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。

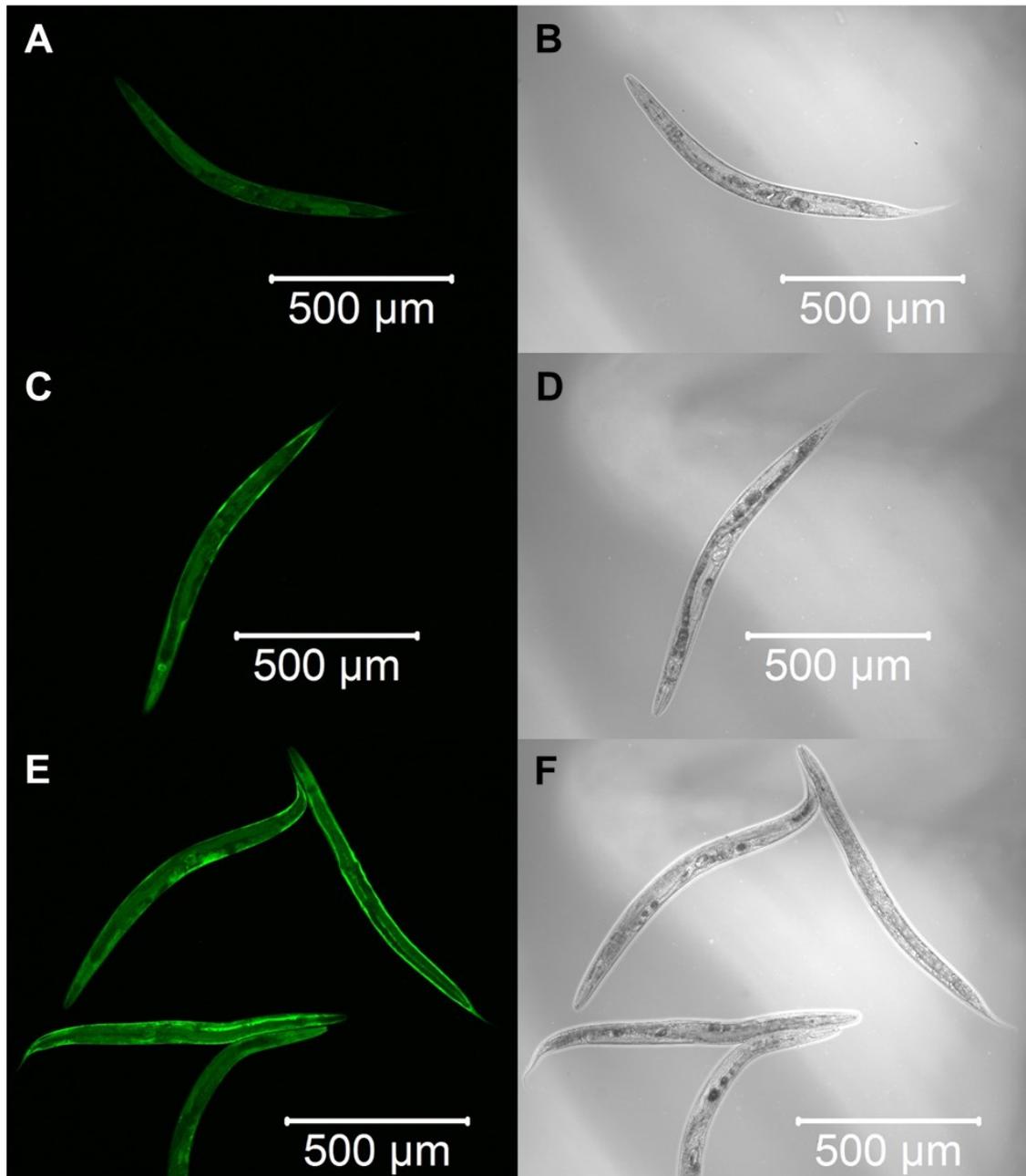


図 2-4、遺伝子組換え線虫 KHA169  $\{sod-1::[chuSi169\ gfp::3\times flag]II\}$  の SOD-1::GFP 発現パターン

(A、B) 薬剤非処理条件では、SOD-1::GFP が線虫の全身で弱く恒常的に発現する。(C、D) 7.03 mM のアクリルアミドで 24 時間処理すると、SOD-1::GFP が線虫の全身で発現する。(E、F) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理すると、SOD-1::GFP が線虫の下皮で顕著に発現する。スケールバーは 500  $\mu$ m (100 倍)。

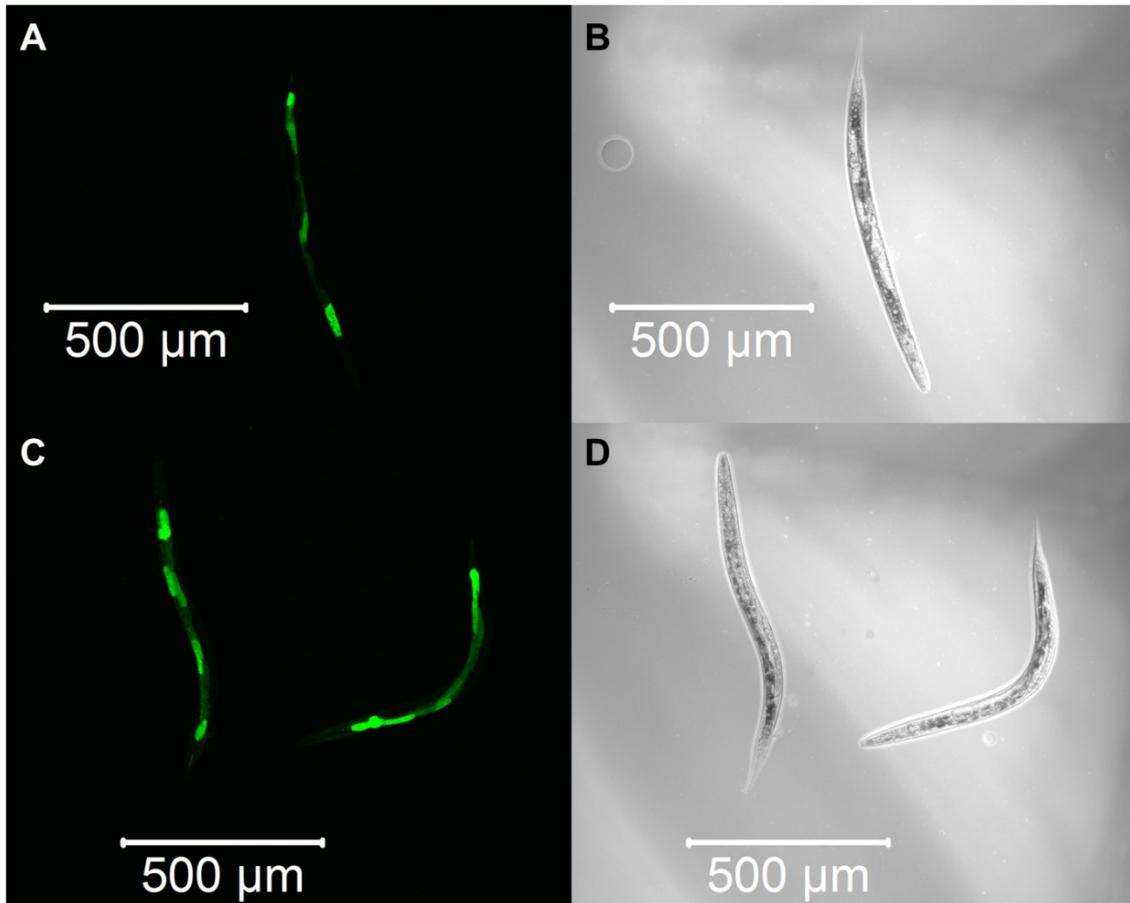


図 2-5、遺伝子組換え線虫 KHA166  $\{chuls166[unc-119 (+), Pctl-1::Bxy-ctl-1::gfp]\}$  の CTL-1::GFP 発現パターン

(A、B) 薬剤非処理条件では、CTL-1::GFP が線虫の腸で恒常的に発現する。(C、D) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、CTL-1::GFP 発現に変化は見られない。スケールバーは 500  $\mu$ m (100 倍)。

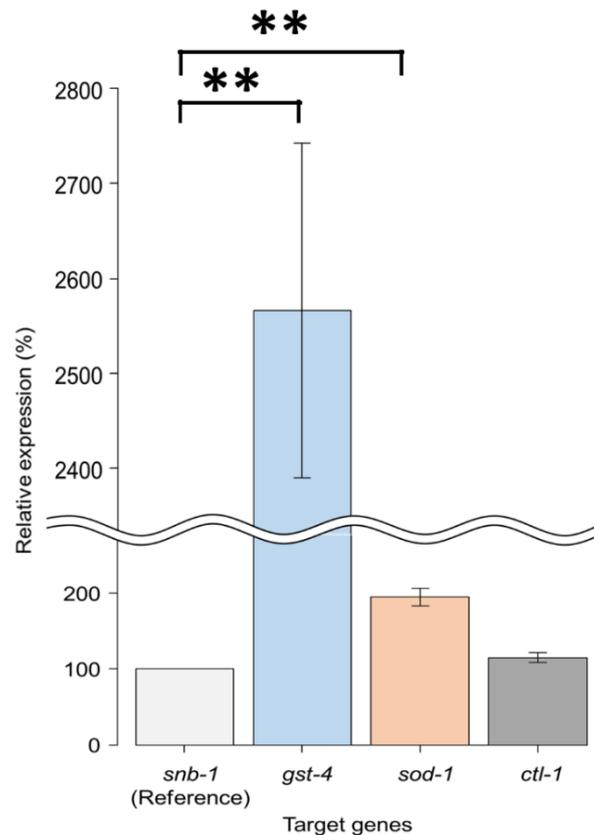


図 2-6、10  $\mu\text{M}$  の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理した *C. elegans* N2 の *gst-4*、*sod-1*、*ctl-1* の発現解析 (qRT-PCR)

$\alpha$ -terthienyl で処理した *C. elegans* N2 の各遺伝子の発現量(%)は、*gst-4* では 2,567  $\pm$  169 (%）、*sod-1* では 195  $\pm$  11.3 (%）、*ctl-1* では 115  $\pm$  6.55 (%) であった (平均値 $\pm$ 標準誤差)。ハウスキーピング遺伝子 *snb-1* をコントロールとして、各遺伝子の相対的な発現量 relative expression level (%) を求めた。実験は独立に 4 回反復した (\*\* $P < 0.005$ 、Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。

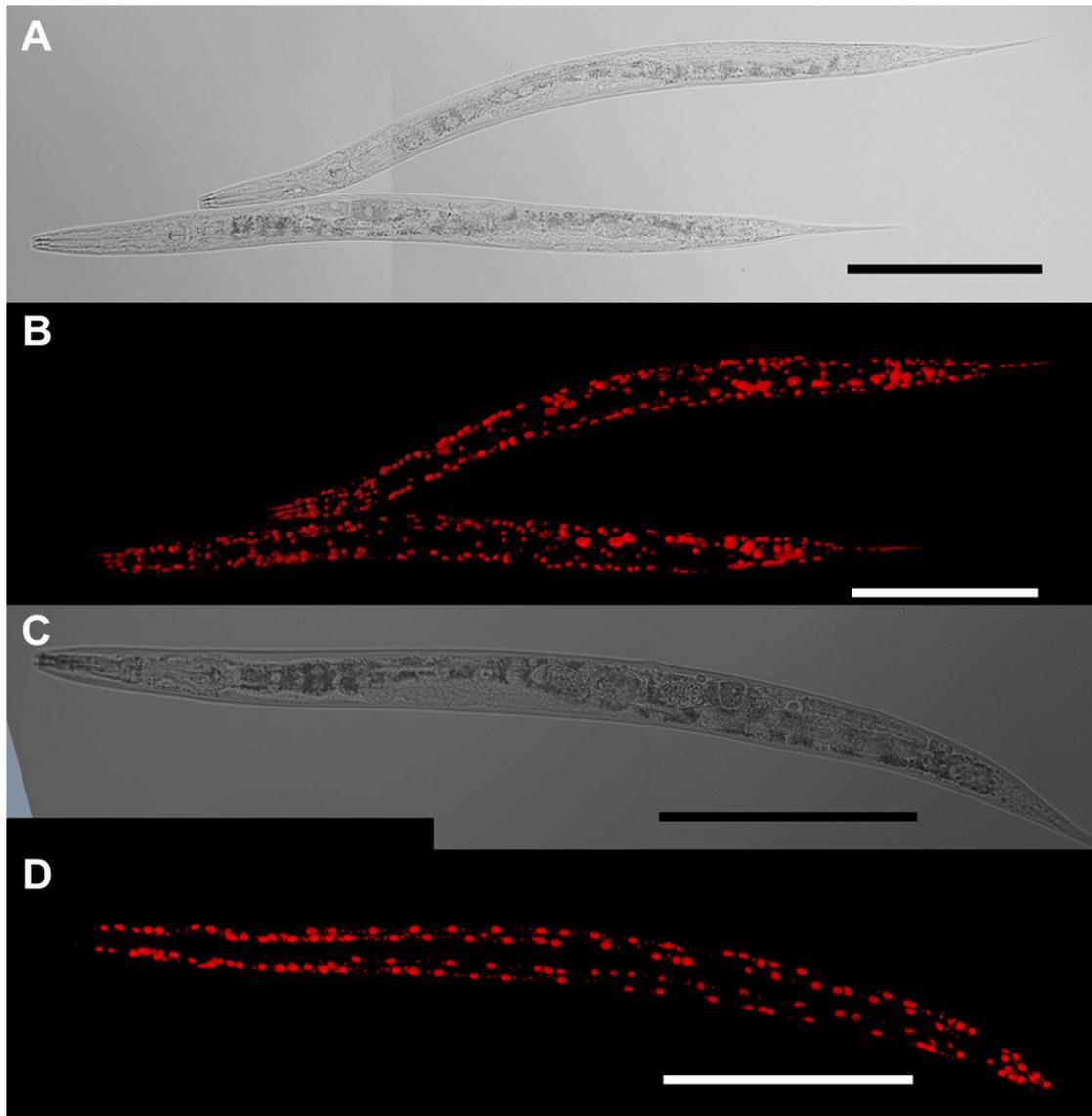
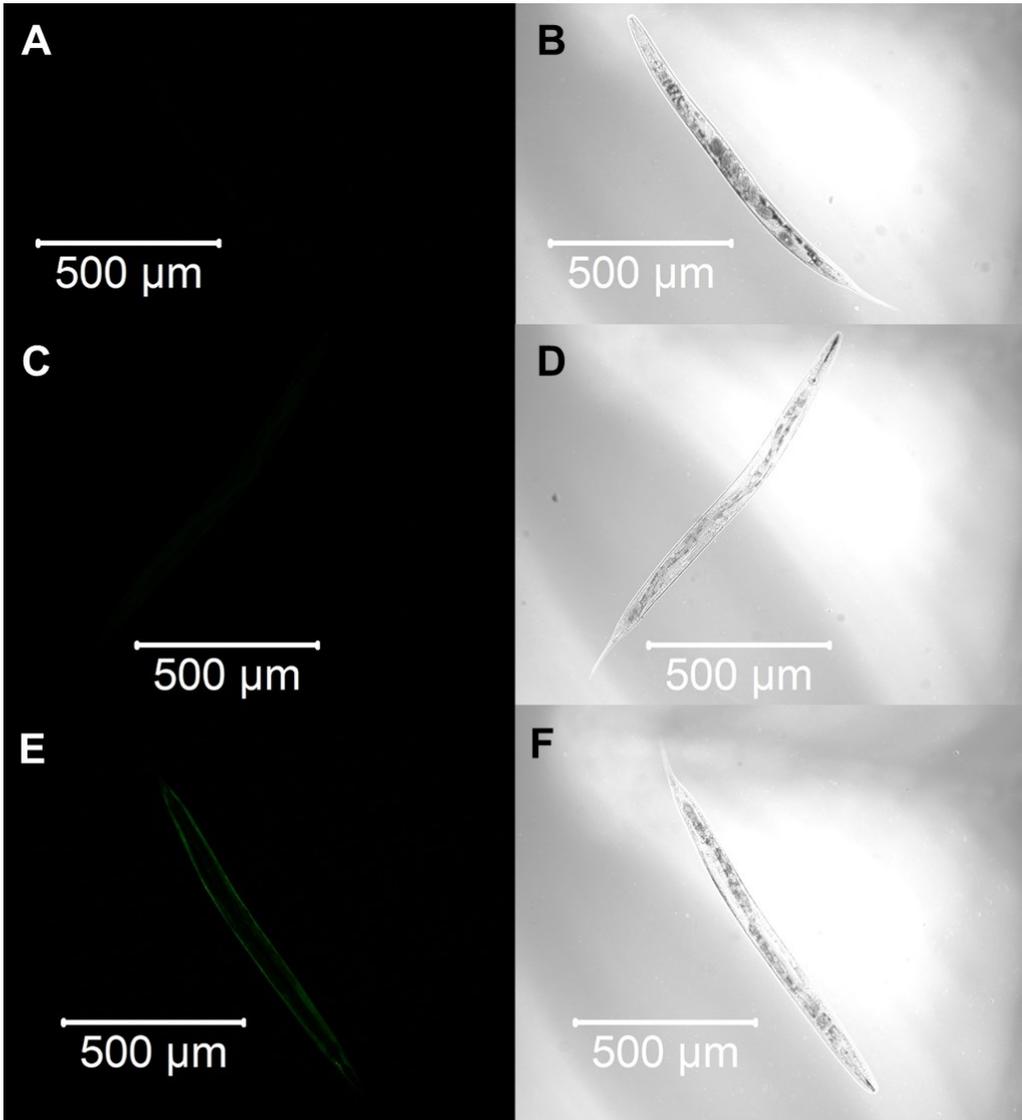


図 2-7、7.03 mM のアクリルアミドまたは 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理した遺伝子組換え線虫 KHA117  $\{chuIs117[unc-119 (+), Pgst-4::gst-4::nls::rfp]I\}$  の GST-4::NLS::RFP 発現パターン

薬剤非処理条件では、GST-4::NLS::RFP 発現は見られない (data not shown)。(A、B) アクリルアミドで処理すると、GST-4::NLS::RFP が線虫のほとんど全て (全身) の体細胞核で発現する。(C、D)  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、GST-4::NLS::RFP が線虫の下皮細胞核で発現する。スケールバーは 200  $\mu$ m。



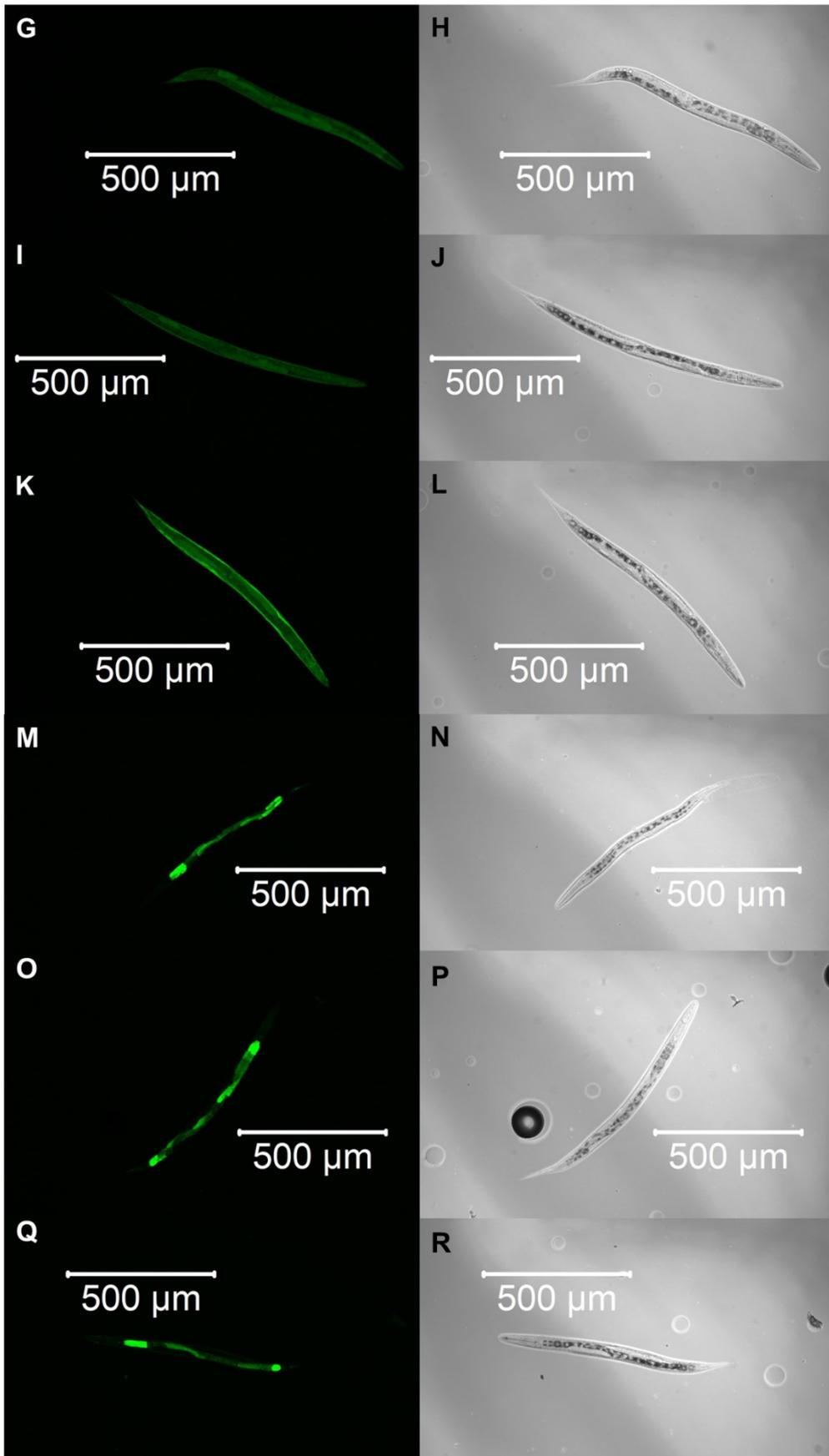


図 2-8、*skn-1* RNAi により、10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、GST-4::GFP と SOD-1::GFP 発現は見られず、CTL-1::GFP 発現に変化は見られない

(A、B) 薬剤非処理条件では、*skn-1* RNAi 処理した KHA143 (*gst-4::gfp*) の GST-4::GFP 発現は見られない。(C、D)  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、*skn-1* RNAi 処理した KHA143 の GST-4::GFP 発現は見られない。(E、F) Blank (pPD129.36) RNAi 処理した KHA143 を  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、GST-4::GFP が線虫の下皮で発現する。(G、H) 薬剤非処理条件では、*skn-1* RNAi 処理した KHA169 (*sod-1::gfp*) の SOD-1::GFP 発現は弱く恒常的なレベルである。(I、J)  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、*skn-1* RNAi 処理した KHA169 の SOD-1::GFP 発現は弱く恒常的なレベルである。(K、L) Blank RNAi 処理した KHA169 を  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、SOD-1::GFP が線虫の下皮で発現する。(M、N) 薬剤非処理条件では、*skn-1* RNAi 処理した KHA166 (*ctl-1::gfp*) の CTL-1::GFP 発現は線虫の腸で見られる。(O、P)  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、*skn-1* RNAi 処理した KHA166 の CTL-1::GFP 発現に変化は見られない。(Q、R) Blank RNAi 処理した KHA166 を  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、CTL-1::GFP 発現に変化は見られない。スケールバーは 500  $\mu$ m (100 倍)。

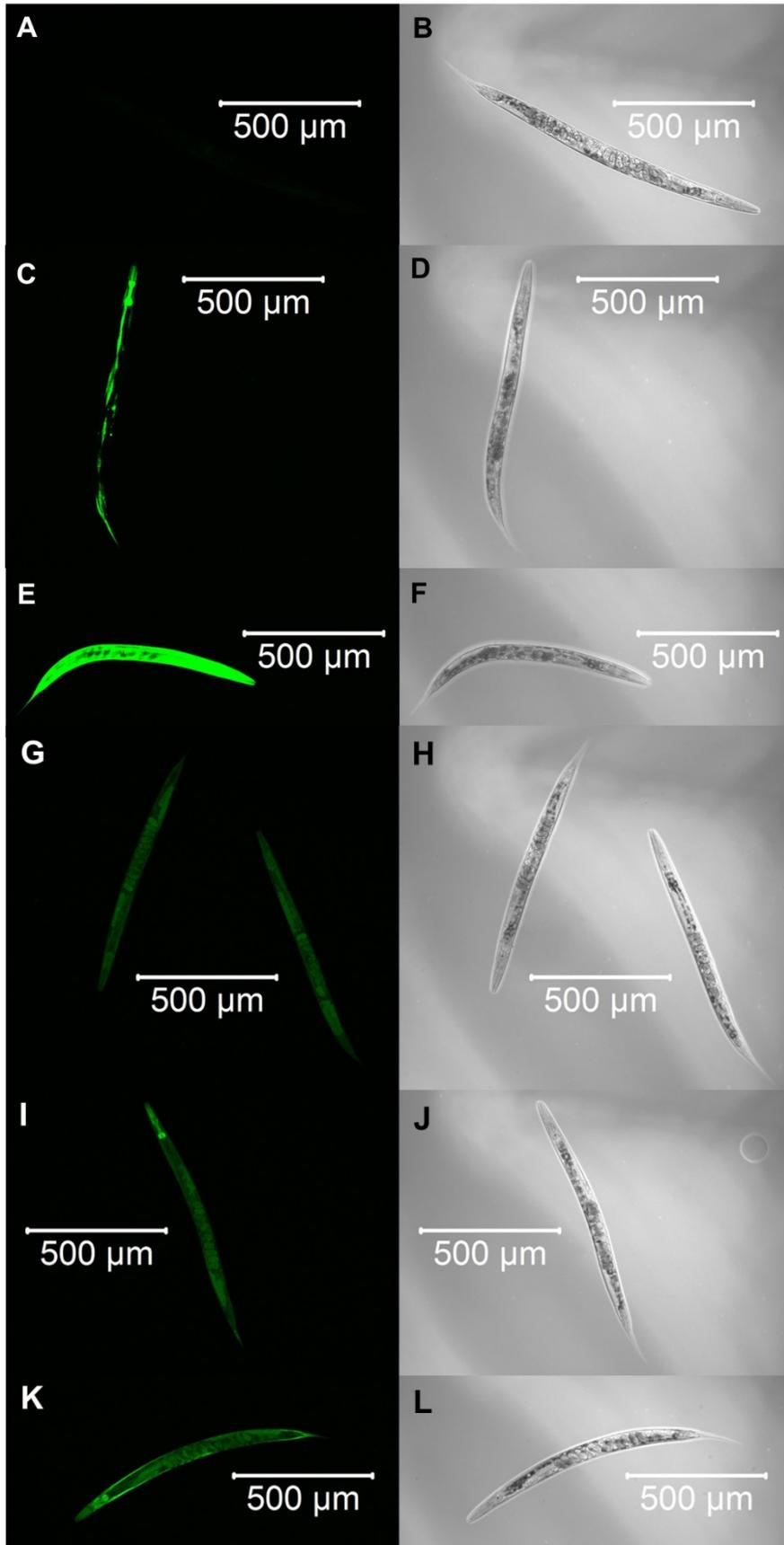


図 2-9、*skn-1* RNAi により、7.03 mM のアクリルアミドで 24 時間処理しても、GST-4::GFP と SOD-1::GFP 発現が抑制される

(A、B) 薬剤非処理条件では、*skn-1* RNAi 処理した KHA143 (*gst-4::gfp*) の GST-4::GFP 発現は見られない。(C、D) アクリルアミドで処理すると、*skn-1* RNAi 処理した KHA143 の GST-4::GFP 発現は線虫の咽頭と体壁筋で見られる。(E、F) Blank RNAi 処理した KHA143 をアクリルアミドで処理すると、GST-4::GFP が線虫の全身で発現する。(G、H) 薬剤非処理条件では、*skn-1* RNAi 処理した KHA169 (*sod-1::gfp*) の SOD-1::GFP 発現は弱く恒常的なレベルである。(I、J) アクリルアミドで処理すると、*skn-1* RNAi 処理した KHA169 の SOD-1::GFP 発現は咽頭のみで見られる。(K、L) Blank RNAi 処理した KHA169 をアクリルアミドで処理すると、SOD-1::GFP が線虫の全身で発現する。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  (100 倍)。

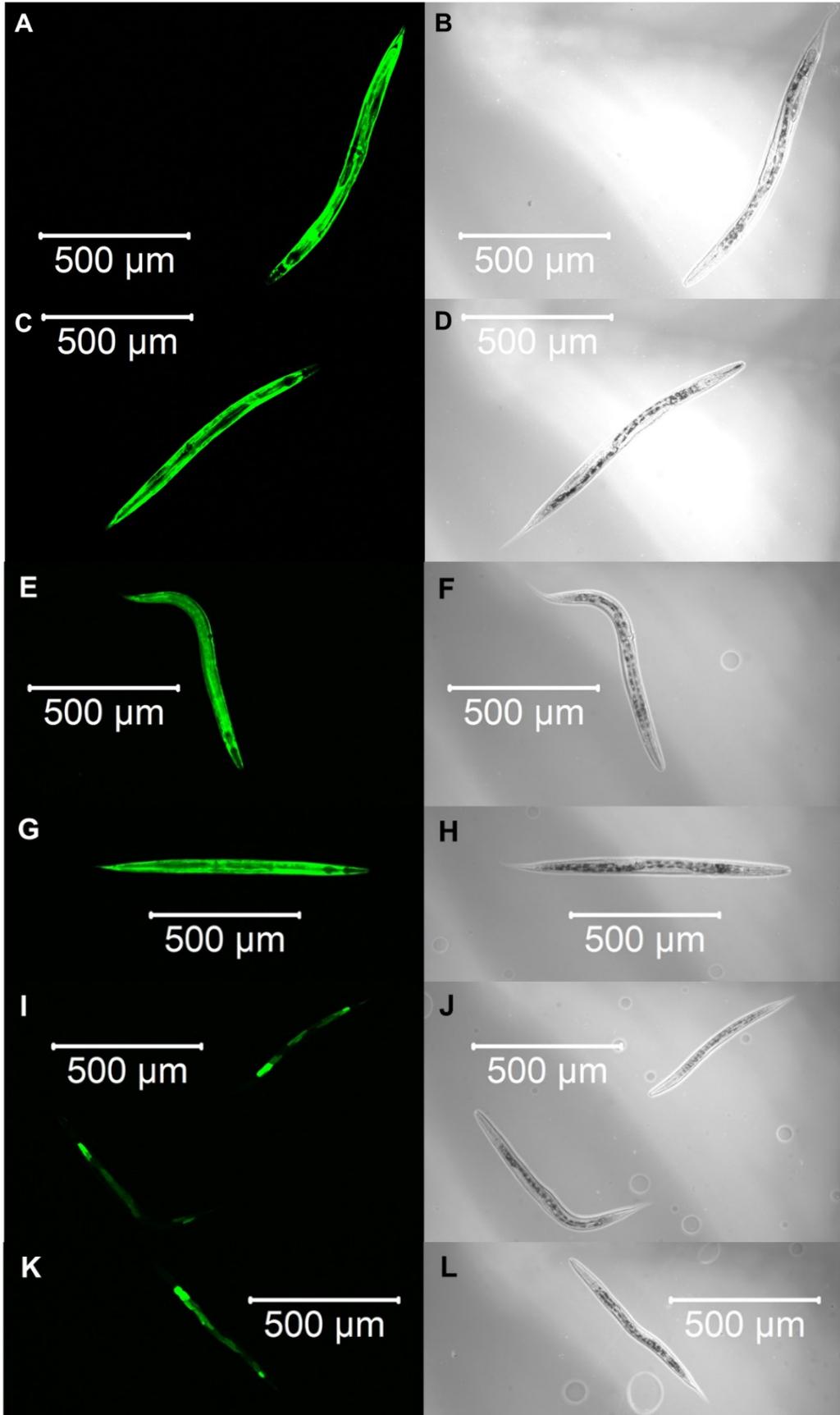


図 2-10、*wdr-23* RNAi により、薬剤非処理条件でも、GST-4::GFP と SOD-1::GFP が線虫の全身で強く発現するが、CTL-1::GFP 発現に変化は見られない

(A、B) 薬剤非処理条件でも、*wdr-23* RNAi 処理した KHA143 (*gst-4::gfp*) の GST-4::GFP が線虫の全身で強く発現する。(C、D) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、*wdr-23* RNAi 処理した KHA143 の GST-4::GFP が線虫の全身で強く発現する。(E、F) 薬剤非処理条件でも、*wdr-23* RNAi 処理した KHA169 (*sod-1::gfp*) の SOD-1::GFP が線虫の全身で強く発現する。(G、H) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、*wdr-23* RNAi 処理した KHA169 の SOD-1::GFP が線虫の全身で強く発現する。(I、J) 薬剤非処理条件では、*wdr-23* RNAi 処理した KHA166 (*ctl-1::gfp*) の CTL-1::GFP 発現は線虫の腸で見られる。(K、L) 10  $\mu$ M の  $\alpha$ -terthienyl で 24 時間処理しても、*wdr-23* RNAi 処理した KHA166 の CTL-1::GFP 発現に変化は見られない。スケールバーは 500  $\mu$ m (100 倍)。

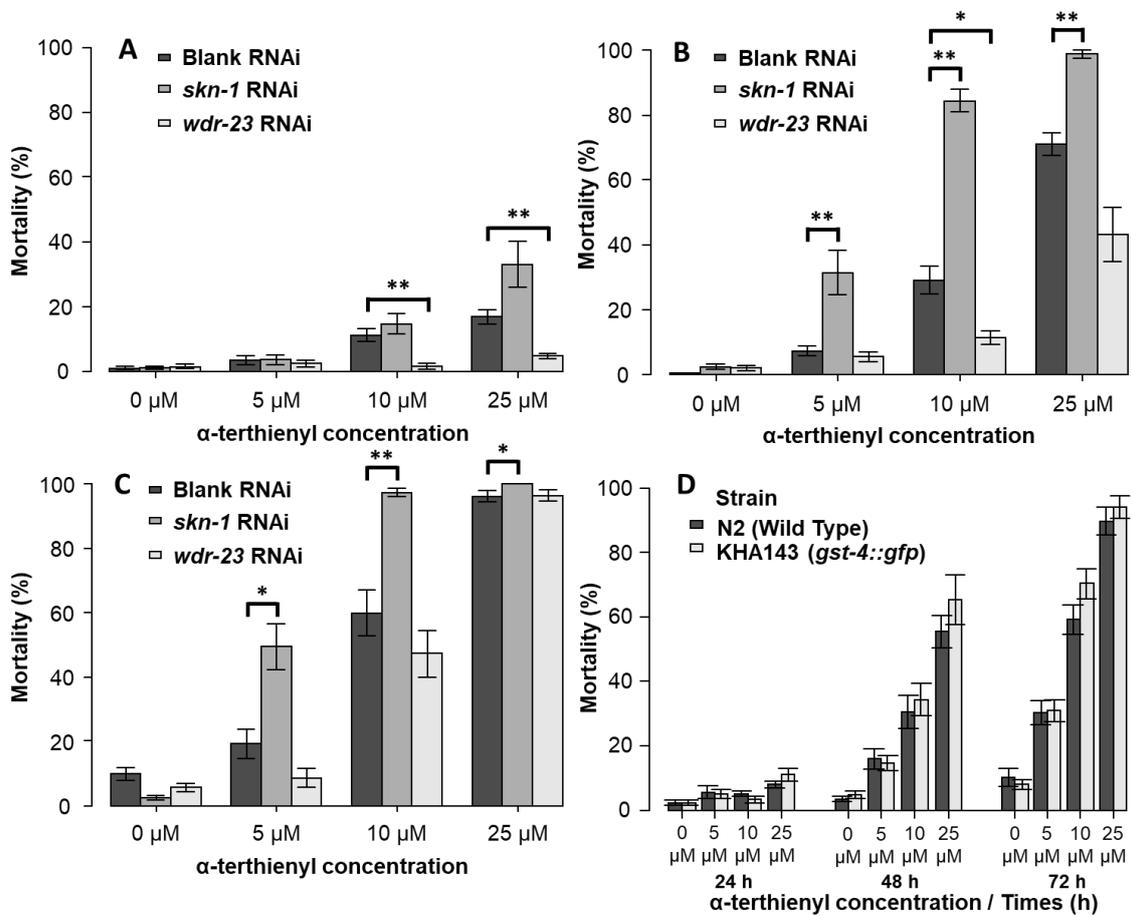


図 2-11、*C. elegans* に対する  $\alpha$ -terthienyl 感受性または抵抗性は、*skn-1* と *wdr-23* RNAi の影響を受ける

RNAi 処理した KHA143 (*gst-4::gfp*) を各濃度の  $\alpha$ -terthienyl で、(A) 24 時間、(B) 48 時間、(C) 72 時間処理した線虫の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) を同様に算出した (N=9,633)。(D) 野生型 N2 と KHA143 を各濃度の  $\alpha$ -terthienyl で、24、48、72 時間処理した線虫の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) を同様に算出した (N=5,507)。殺線虫活性は、処理後 24 時間では全濃度で見られないが、48 時間後の KHA143 の LC<sub>50</sub> は  $19 \pm 0.79 \mu\text{M}$ 、72 時間後は、 $9.2 \pm 0.42 \mu\text{M}$  となった。全処理区において、N2 と KHA143 の間に差は見られない ( $P > 0.05$ ) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ 、Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。

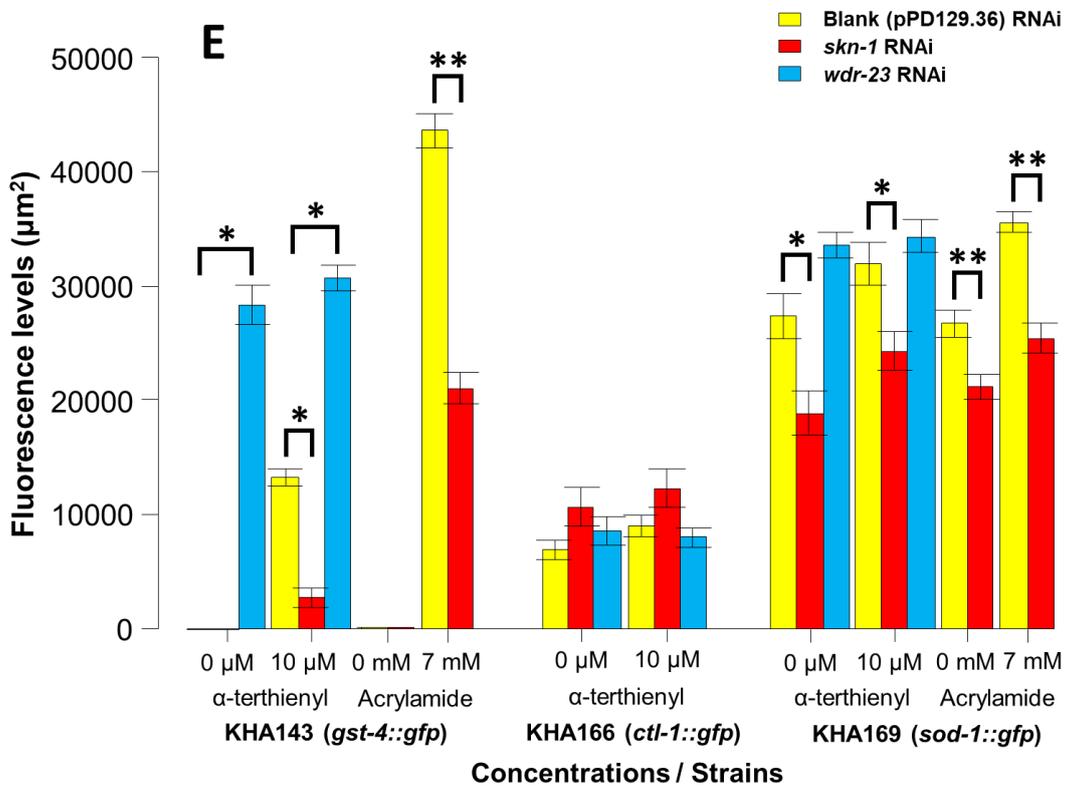
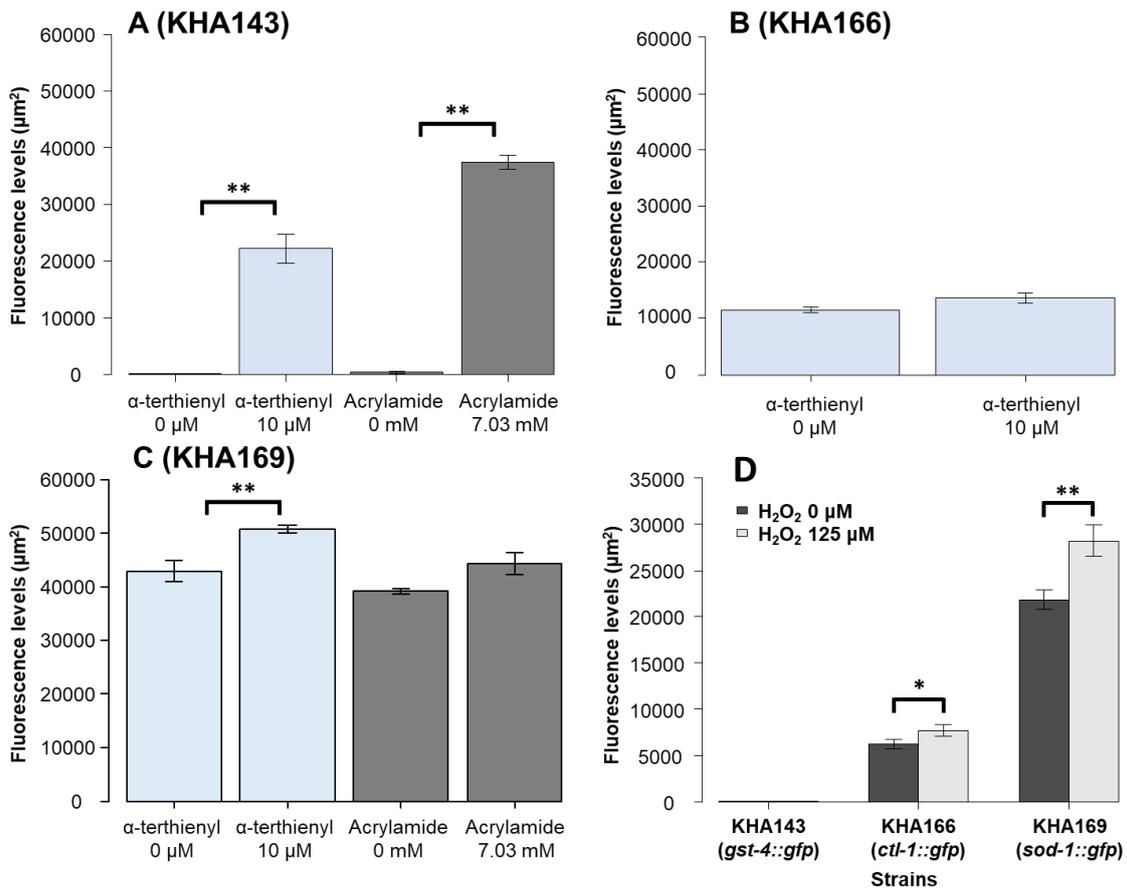


図 2-12、10  $\mu\text{M}$  の  $\alpha$ -terthienyl、125  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、7.03 mM のアクリルアミドで 24 時間処理した線虫の GST-4、CTL-1、SDO-1 発現解析

CLSM で撮影した各 young adult 線虫の 1 個体あたりの GFP 蛍光密度 (pixels /  $\mu\text{m}^2$ ) を ImageJ により計測した (平均値 $\pm$ 標準誤差)。(A)  $\alpha$ -terthienyl またはアクリルアミドで処理すると、KHA143 (*gst-4::gfp*) の GST-4::GFP 発現が増加する (N=76)。(B)  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、KHA166 (*ctl-1::gfp*) の CTL-1::GFP 発現に変化は見られない (N=35)。(C)  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、KHA169 (*sod-1::gfp*) の SOD-1::GFP 発現が増加し、アクリルアミドで処理すると、発現は増加傾向 ( $P=0.0674$ ) であった (N=51)。 $\alpha$ -terthienyl では独立に 3 回、アクリルアミドでは 2 回反復し、各濃度の平均値 $\pm$ 標準誤差を 8 個体以上から計算した。(D) 各線虫を  $\text{H}_2\text{O}_2$  (富士フイルム和光純薬株式会社) で処理すると、GST-4::GFP 発現に変化は見られないが、CTL-1::GFP 発現と SOD-1::GFP 発現は増加する (N=103)。(E) RNAi 処理した各線虫を  $\alpha$ -terthienyl またはアクリルアミドで処理した。GST-4::GFP 発現は *skn-1* RNAi により減少し、*wdr-23* RNAi では増加する。しかし、*skn-1* または *wdr-23* RNAi による CTL-1::GFP 発現の変化は見られない。SOD-1::GFP 発現は *skn-1* RNAi により減少し、*wdr-23* RNAi により、薬剤処理せずとも  $\alpha$ -terthienyl やアクリルアミド処理時と差がない SOD-1::GFP 発現が見られる ( $P>0.05$ ) (N=192) (\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.005$ 、Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。

## 2.6. 表

表 2-1、qRT-PCR で用いたプライマーリスト

プライマー名	プライマー配列
Cegst-4_qPCRFor	5' – TGCTCAATGTGCCTTACGAGGA – 3'
Cegst-4_qPCRRev	5' – GGGAAGCTGGCCAAATGGAG – 3'
Cesod-1_qPCRFor	5' – GAAGCTGGAGCCGATGGAGT – 3'
Cesod-1_qPCRRev	5' – GGCCAACGACAGTGTTTGA – 3'
Cectl-1_qPCRFor	5' – AGCCACGTCAGTTCTGGGAG – 3'
Cectl-1_qPCRRev	5' – TCCTCAAACAGCCACCCAA – 3'
Cesnb-1_qPCRFor	5' – TGGAGCGTGATCAGAAGTTGTC – 3'
Cesnb-1_qPCRRev	5' – TCCACCAATACTTGCGCTTCAG – 3'

*snb-1* プライマーは、Sato et al. (2014) で報告された配列を使用した

表 2-2、RNAi で用いたプライマーリスト

---

プライマー名 ， プライマー配列

---

Ceskn1EcoRI\_For, 5' – GGAATTCGGCCAATCCAAATATGATTATCCA – 3'

Ceskn1EcoRI\_Rev, 5' – GGAATTCGGGCAGCAACCTTGTTCTTTCCG – 3'

Cewdr-23\_For, 5' – AGGGAACAACATATTGCATTTAGT – 3'

Cewdr-23\_RevEcoRI, 5' – GGGAATTCTTGGGATGATCGTATGGTGCAA – 3'

---

## 第3章 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性と *gst* 発現異常変異体の表現型との関係

### 3.1. 背景

第2章の逆遺伝学的な実験により、線虫の  $\alpha$ -terthienyl に対する防御機構は、第2相解毒代謝酵素 *gst-4* と *sod-1*、これらの転写因子 *skn-1* とサプレッサー *wdr-23* が関わっていることが明らかとなった。本章では、 $\alpha$ -terthienyl に対する未知の代謝機構を明らかにすることを目的に、順遺伝学的な実験を組み立てた。

「地球の歴史は地層に、生物の歴史は染色体に記されてある (1946年)」、コムギ遺伝学者でゲノム説の先駆者である木原均博士の言葉である (Crow, 1994)。遺伝に関する学説は紀元前にはすでに存在しており、コス島のヒポクラテス Hippocrates (紀元前 460-377年) は、生物体の各部分が作り出す何らかの物質が子の形質を決定すると述べ、遺伝物質という概念の基礎を築いたとされる (Sturtevant, 2001; Yapijakis, 2009)。1866年にメンデル Mendel の植物雑種の論文が発表され (Mendel, 1866)、1900年に3人の植物学者ド・フリース de Vries、コレンス Correns、ツェルマク Tschermak によって独立にメンデルの法則が再発見された (Gayon, 2016)。1906年に、イギリスの生物学者ベイトソン Bateson が遺伝学を意味する「genetics」という語を考案し、メンデルの法則に基づいた遺伝学が普及していった (Gayon, 2016)。逆遺伝学が確立されているにもかかわらず、近年、目的表現型を制御する未知遺伝子の同定や病気の治療法開発に利点を持つ、変異体を用いた伝統的な順遺伝学 (表現型から遺伝型を探すアプローチ) への回帰が見られる (Douglas and Popko, 2009)。また、線虫の全組織で RNAi が作用するわけではなく、特に神経系の遺伝子は耐性を示すことが知られている (Timmons et al., 2001)。*skn-1* の Feeding RNAi も咽頭と体壁筋での GST-4 発現を抑制できず、*gst-4* の RNAi であっても咽頭での発現を抑制できないが

(Hasegawa et al., 2008)、順遺伝学的手法では RNAi が効き難い遺伝子も解析できる (Kutscher and Shaham, 2014)。 *C. elegans* で最も広く用いられる変異原はエチルメタンスルホン酸 ethyl methanesulfonate (EMS) であり、これは G/C から A/T の点変異を誘発し (Flibotte et al., 2010)、終止コドンへの変異もよく誘発する (Kutscher and Shaham, 2014)。標準的な EMS 濃度である 50 mM で *C. elegans* を処理すると、400,000 ヌクレオチドにつき 1 つの突然変異をゲノムに導入できると言われている (Cuppen et al., 2007)。しかし、従来の  $\alpha$ -terthienyl の実験対象である PPN や昆虫の遺伝子組換えや解析は困難とされ、私が調べた限りでも、 $\alpha$ -terthienyl の感受性または抵抗性と *gst-4* に着目した *C. elegans* 変異体スクリーニングは実施されてこなかった。

そこで、本章では、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性を順遺伝学的に調べるため、所属研究室で、遺伝子組換え *C. elegans* KHA143 (*gst-4::gfp*) と比較して、核移行シグナル *nls* により *gst-4* 発現部位の観察が容易となった KHA117 (*gst-4::nls::rfp*) から EMS 処理により分離された、GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を恒常的に発現する独立した abnormal *gst* expression (*gcp*) 変異体のうち、表現型が顕著な 5 株 (*gcp-1, -2, -6, -7, -9*) を用い、 $\alpha$ -terthienyl 殺線虫活性と変異体の表現型の関係について調べた。本章では、これらの変異体に対して細胞レベルの表現型解析を実施した結果、(5)  $\alpha$ -terthienyl 急性毒性に対する防御機構には、GST-4 の発現量と発現部位が重要である可能性を示した。

## 3.2. 材料と方法

### 線虫株と培養

*C. elegans* の操作・培養は前章と同様に実施した。本章では、以下の 7 株の線虫を使用した。N2 (Bristol strain)、KHA117 *{chuls117[unc-119 (+) , Pgst-4::gst-*

4::*nls::rfp*}]、*gcp-1* (対立遺伝子 *chu4*) (*gst-4::) (GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を恒常的に発現する変異体)、KHA534 *gcp-2* (*chu17*) (*gst-4::) (GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を線虫の腸で恒常的に発現する変異体)、*gcp-6* (*chu18*) (*gst-4::) (GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を線虫の腸で恒常的に発現する変異体)、KHA519 *gcp-7* (*chu7*) (*gst-4::) (GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を線虫の下皮で恒常的に発現する変異体)、KHA529 *gcp-9* (*chu15*) (*gst-4::) (GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子を恒常的に発現する変異体)。*****

### 殺線虫活性評価

操作は前章と同様に実施した。簡潔に、young adult に同調化した *C. elegans* を M9 バッファーで回収・洗浄し、約 20 頭/50  $\mu$ l に調整した。各濃度に調整した光不活性化  $\alpha$ -terthienyl またはパラコート (1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium Dichloride) (東京化成工業株式会社) と共に 96-well plate の well に加え、24、48 時間処理した。 $\alpha$ -terthienyl 最終濃度は、同様に 0、5、10、25  $\mu$ M に調整した。パラコート最終濃度は、M9 バッファー中で 0、5、10、50、100 mM に調整した。統計解析は同様に実施した。

### 解毒代謝酵素の発現観察

操作は前章と同様に実施した。簡潔に、young adult に同調化した遺伝子組換え *C. elegans* を、最終濃度 10  $\mu$ M の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl または最終濃度 50 mM のパラコートと共に 96-well plate に加え、24 時間処理した。処理後の線虫を、1 (%) の 1-フェノキシ-2-プロパノール処理により麻痺させ、融合遺伝子の発現部位を CLSM により観察した。

## 浸透圧ストレス

Wheeler and Thomas (2006) と Dodd et al. (2018) の方法を参考に、*C. elegans* に対する高張 NGM プレートを用いた急性浸透圧ストレス試験を実施した。簡潔に、young adult に同調化した *C. elegans* を、51 mM (対照区) または 500 mM NaCl を含む NGM プレートに移し、線虫が停止するまでの時間を秒 second 単位で計測した。物理的刺激を加え、数分経過しても応答しない線虫を停止とした。独立した実験を 3 回以上実施し、各処理区で計 30 頭以上の線虫を用いた。統計解析は Kanda (2013) に従い EZR で実施し、 Kaplan-Meier 生存曲線 Kaplan-Meier procedure、ログランク検定 log-rank test と Bonferroni correction により評価した。

### 3.3. 結果

#### *gst* 発現異常 (*gep*) 変異体に対する光不活性化 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性評価

$\alpha$ -terthienyl 解毒代謝と *gst* 発現異常表現型の関係を調べるため、遺伝子組換え *C. elegans* KHA117 (野生型) と *gep* 変異体に対して光不活性化  $\alpha$ -terthienyl を 24、48 時間処理した。24 時間処理では、 $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性は野生型ではあまり見られなかったが、死亡率 (%) は野生型と比較して *gep-1* では減少し、*gep-2* では増加した (図 3-13A)。KHA117 の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) は、5  $\mu$ M では  $15 \pm 1.9$  (%), 10  $\mu$ M では  $19 \pm 1.9$  (%), 25  $\mu$ M では  $26 \pm 2.7$  (%) であったが、*gep-1* では、5  $\mu$ M で  $3.8 \pm 1.6$  (%), 10  $\mu$ M で  $6.6 \pm 1.6$  (%), 25  $\mu$ M で  $7.9 \pm 2.0$  (%) に減少し、*gep-2* では、5  $\mu$ M で  $38 \pm 11$  (%), 10  $\mu$ M で  $48 \pm 11$  (%), 25  $\mu$ M で  $75 \pm 7.3$  (%) に上昇した。しかし、他の *gep* 変異体と KHA117 の間に差は見られなかった。*gep-6* の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $8.5 \pm 1.7$  (%), 10  $\mu$ M では  $10 \pm 1.6$  (%), 25  $\mu$ M では  $29 \pm 6.7$  (%)。 *gep-7* の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $7.2 \pm 2.1$  (%), 10  $\mu$ M では  $11 \pm 2.0$  (%), 25  $\mu$ M では  $15 \pm 3.2$  (%)。

*gep-9* の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $15 \pm 4.0$  (%), 10  $\mu$ M では  $23 \pm 2.7$  (%), 25  $\mu$ M では  $23 \pm 2.9$  (%) であった。48 時間処理では、各 *gep* 変異体と KHA117 の死亡率 (%) の差がより顕著となった (図 3-13B)。KHA117 では、5  $\mu$ M で  $26 \pm 2.1$  (%), 10  $\mu$ M で  $65 \pm 3.8$  (%), 25  $\mu$ M で  $84 \pm 3.0$  (%) であったが、*gep-1* では、5  $\mu$ M で  $5.7 \pm 1.6$  (%), 10  $\mu$ M で  $16 \pm 1.4$  (%), 25  $\mu$ M で  $39 \pm 6.8$  (%) に減少し、*gep-2* では、5  $\mu$ M で  $72 \pm 5.3$  (%), 10  $\mu$ M で  $100 \pm 0.23$  (%), 25  $\mu$ M で  $100 \pm 0.34$  (%) に上昇した。*gep-9* の死亡率 (%) も、5  $\mu$ M では  $55 \pm 5.7$  (%), 10  $\mu$ M では  $80 \pm 2.7$  (%), 25  $\mu$ M では  $89 \pm 2.2$  (%) に上昇した。しかし、他の *gep* 変異体と KHA117 の間に差は見られなかった。*gep-6* の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $29 \pm 3.2$  (%), 10  $\mu$ M では  $64 \pm 9.8$  (%), 25  $\mu$ M では  $87 \pm 3.8$  (%)。 *gep-7* の死亡率 (%) は、5  $\mu$ M では  $17 \pm 2.2$  (%), 10  $\mu$ M では  $74 \pm 9.1$  (%), 25  $\mu$ M では  $92 \pm 3.1$  (%) であった。

#### **$\alpha$ -terthienyl に対する *gep* 変異体の解毒代謝酵素の発現観察**

$\alpha$ -terthienyl に対する *gep* 変異体の解毒代謝応答を調べるため、各変異体の GST-4::NLS::RFP 融合遺伝子の発現を CLSM により観察した。薬剤非処理条件であっても、各 *gep* 変異体の恒常的な GST-4 発現が観察された (図 3-14)。*gep-1* では、GST-4 発現が線虫の腸と下皮で (図 3-14A、B)、*gep-2* では、線虫の腸と筋肉で (図 3-14C、D)、*gep-6* では、線虫の腸で (図 3-14E、F)、*gep-7* では、線虫の下皮で (図 3-14G、H)、*gep-9* では、線虫の腸、筋肉、下皮でそれぞれ観察された (図 3-14I、J)。各 *gep* 変異体を 10  $\mu$ M の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、非処理区と比較して、GST-4 が各変異体の発現部位に加え、主に線虫の下皮で発現した (図 3-15)。しかし、*gep-9* の GST-4::NLS::RFP 発現にあまり変化は見られなかった (図 3-15U-Y)。

### **$\alpha$ -terthienyl 抵抗性変異体 *gep-1* に対するパラコートの殺線虫活性評価**

表現型が顕著であった  $\alpha$ -terthienyl 抵抗性変異体 *gep-1* の解毒代謝機構を評価するため、細胞内酸化ストレス誘導物質であるパラコートを用いた。KHA117(野生型) と変異体 *gep-1* に対して各濃度のパラコートを 24 時間処理したところ、KHA117 の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) は、5 mM では  $14 \pm 1.8$  (%), 10 mM では  $22 \pm 3.3$  (%), 50 mM では  $41 \pm 2.9$  (%), 100 mM では  $91 \pm 1.7$  (%), LC<sub>50</sub> は  $52 \pm 1.8$  mM であったが、*gep-1* の死亡率 (%) は、5 mM では  $3.7 \pm 1.4$  (%), 10 mM では  $7.2 \pm 1.7$  (%) に減少し、LC<sub>50</sub> は  $56 \pm 1.5$  mM であった。一方で、50 mM では  $43 \pm 4.3$  (%), 100 mM では  $96 \pm 1.3$  (%) と、高濃度では野生型との間に差は見られなかった (図 3-16)。

### **パラコートに対する変異体 *gep-1* の解毒代謝酵素の発現観察**

KHA117 (*gst-4::nls::rfp*) (野生型) と変異体 *gep-1* に対して、50 mM のパラコートを 24 時間処理し、GST-4::NLS::RFP 発現を観察した (図 3-17)。薬剤非処理条件では、KHA117 の GST-4 発現は観察されなかったが (図 3-17A、B)、パラコートで処理すると、GST-4 が主に線虫の下皮で発現した (図 3-17C、D)。薬剤非処理条件では、*gep-1* の恒常的な GST-4 発現が線虫の腸と下皮で見られ (図 3-17E、F)、パラコートで処理すると非処理時と比較して、GST-4 が線虫の腸と下皮で強く発現した (図 3-17G、H)。また、パラコート処理時の *gep-1* の GST-4::NLS::RFP 発現量は KHA117 と比較して多かった (図 3-17I)。

### **急性浸透圧ストレス評価**

*gep* 変異体の GST-4 制御機構と浸透圧ストレスの関係を調べるため、各 *gep* 変

異体を、500 mM NaCl を含む高張 NGM プレートで処理した。線虫を 500 mM NaCl プレートに移すと、線虫から数分以内に高張により水分が失われ、体が収縮して麻痺した。5 株の *gep* 変異体のうち 4 株と野生型 (N2 または KHA117) 間には、高張ストレスにより線虫が動かなくなるまでの時間に差は見られなかったが、変異体 *gep-7* は野生型と比較して急性高張ストレスに対して感受性であった (図 3-18)。浸透圧ストレスと  $\alpha$ -terthienyl に対する感受性または抵抗性の間に相関は見られなかった (図 3-13、3-18)。また、N2 と KHA117 間には、高張ストレスに対する感受性・抵抗性に差がないことも確認した (図 3-18、 $P > 0.05$ )。

### 3.4. 考察

$\alpha$ -terthienyl は、*O. nubilalis* では、チオフェン外環の二重結合の 1 か所で、第 1 相酵素の多基質モノオキシゲナーゼ polysubstrate monooxygenase (PSMO) (CYP) によるエポキシ化とエポキシド開環がなされた後、GST が関与する GSH 抱合により解毒されるが、これら (解毒代謝酵素) の誘導は  $\alpha$ -terthienyl に対する高い耐性を付与する (Feng et al., 1993)。また、*O. nubilalis* では、 $\alpha$ -terthienyl は 1 つ以上の CYP アイソザイムを選択的に誘導するが、同時に 1 つ以上のアイソザイムを減少させるため、CYP の総量は変化しない (Feng et al., 1993)。酸化ストレスが生成されると、抱合反応により GSH が消費されるが、GSH の枯渇は酸化ストレスによるダメージを悪化させると言われており、抱合体形成により GSH を減少させる効果のあるキク科から単離されたセスキテルペンラクトン sesquiterpene lactone (SL) を  $\alpha$ -terthienyl と共に処理すると、草食性昆虫タバコスズメガ *Manduca sexta* に対する殺虫活性が増加する (Guillet et al., 2000)。この結果は、本研究の  $\alpha$ -terthienyl は GST が触媒する GSH 抱合反応によって解毒されるという仮説とも一致する。*C. elegans* においても、 $\alpha$ -terthienyl 処理により、最

も発現が上昇する遺伝子は *gst-4* であることから (図 2-6)、 $\alpha$ -terthienyl 解毒代謝には、GST と GSH の役割が大きいと考えられる。

Ov-GST-3 (ヒト寄生性線虫である回旋糸状虫 *Onchocerca volvulus* の GST-3) を発現する遺伝子組換え *C. elegans* AK1 は、野生型 N2 と比較して、ヒポキサンチン hypoxanthine/キサンチン-オキシダーゼ xanthine-oxidase (XOD) システムにより生成された細胞外 ROS と、ジュグロン juglone により生成された細胞内 ROS に対する高い耐性を示す (Kampkötter et al., 2003)。GST-4::GFP を過剰発現する遺伝子組換え *C. elegans* BL1 は、ヒポキサンチン/XOD による細胞外酸化ストレスに比べ、ジュグロンまたはパラコートによる細胞内酸化ストレスに対する高い抵抗性を示す (Leiers et al., 2003)。ヒポキサンチン/XOD は、ヒポキサンチンに酸素を付与して尿酸 uric acid に変換し、スーパーオキシドアニオンと過酸化水素を生成させるシステムである (Leiers et al., 2003)。ジュグロンは、ジアホラーゼ diaphorase により NAD (P) H を減少させ、酸素をスーパーオキシドアニオンに還元する (Kampkötter et al., 2003)。また、パラコートは WDR-23 による SKN-1 抑制を解くことで、*gst-4* の転写を活性化させるが、*skn-1* RNAi は、パラコートにより誘導される *Pgst-4::GFP* 発現を抑制する (Choe et al., 2009)。野生型 KHA117 をパラコートで処理した際の GST-4::NLS::RFP 発現量と比較して、 $\alpha$ -terthienyl に対する耐性を示した変異体 *gep-1* をパラコートで処理すると、発現量が増加した (図 3-17I)。野生型と比較して変異体 *gep-1* はパラコートに対しても耐性を示したことから (図 3-16)、*gep-1* は細胞内 ROS に対する耐性を獲得している可能性がある。パラコートの殺線虫機構と、 $\alpha$ -terthienyl 殺線虫機構は類似しているのかもしれない。これらの結果は、 $\alpha$ -terthienyl は、線虫の下皮に浸透して細胞内 ROS (一重項酸素) を誘導し、殺線虫活性を発揮するが、この活性は GST-4 発現により減少するという仮説とも一致する。

電子伝達系の複合体 complex III (ユビキノール-シトクロム *c* レダクターゼ ubiquinol-cytochrome-*c* reductase) はユビキノールからシトクロム *c* への電子輸送を触媒する酵素であり、高等真核生物では、この複合体は 11 個のサブユニットで構成され (Blakely et al., 2005)、この中の 1 つがシトクロム *b* である (Anderson et al., 1981)。NADH-シトクロム *c* レダクターゼは、シトクロム *b*<sub>5</sub> レダクターゼとシトクロム *b*<sub>5</sub> から構成され、還元されたシトクロム *b*<sub>5</sub> によりシトクロム *c* を還元し (Hara and Minakami, 1971)、これが複合体 III から複合体 IV へ電子を輸送する (Kobayashi et al., 2016)。シトクロム *c* は ROS 除去も担っており、ミトコンドリアの外で ROS が生成されると、シトクロム *c* がミトコンドリアから放出され、電子伝達系を介して電子を輸送し、スーパーオキシドアニオンを酸素に酸化する (Atlante et al., 2000)。 $\alpha$ -terthienyl 処理によりシトクロム *b*<sub>5</sub> と NADH-シトクロム *c* レダクターゼ活性が増加するが、NADH オキシダーゼと NADPH-シトクロム *c* レダクターゼ活性は変化しないと報告されている (Feng et al., 1993)。また、 $\alpha$ -terthienyl 処理により、*D. dipsaci* のコリンエステラーゼ cholinesterase (ChE)、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ glucose-6-P dehydrogenase (G6PD)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ malate dehydrogenase (MDH) 活性が減少し、酵母由来の G6PD、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ glutamate dehydrogenase (GDH) 活性も減少する (Bakker et al., 1979)。ペントースリン酸経路 pentose phosphate pathway (PPP) の G6PD と 6PGDH は NADPH の主な供給源となる (Corpas et al., 1998)。MDH はリンゴ酸とオキサロ酢酸 oxaloacetate の相互変換を触媒する NAD/NADH 依存性酵素で (Minárik et al., 2002)、GDH は NAD (P) H による  $\alpha$  ケトグルタル酸 ketoglutarate の還元的アミノ化により、グルタミン酸を可逆的に生成する酵素である (Lightfoot et al., 2007)。これらの報告は、 $\alpha$ -

terthienyl 処理により NAD (P) H 量が変化する可能性を示している。また、シトクロム *c* レダクターゼは NADPH 依存性の過酸化水素生成には関係しないが、NADPH オキシダーゼ oxidase は NADPH を基質として酸素から過酸化水素を生成する (Dupuy et al., 1991)。 $\alpha$ -terthienyl 処理は、NADPH オキシダーゼ活性を減少させると報告されており (Feng et al., 1993)、これは、 $\alpha$ -terthienyl 処理により CTL-1 発現は増加しないという結果とも一致する。

パラコートはパルス放射線分解による 1 電子還元を受けてパラコートラジカルとなり、酸素の 2 電子還元を触媒し、1 電子還元物であるスーパーオキシドラジカル生成を経て、2 電子還元物である過酸化水素を生成するが、この酸化還元反応により、GSH の維持に必要な NADPH が減少し、加えて、パラコートラジカルが直接 GSH を酸化させ、酸化型グルタチオン (GSSG) が増加し、細胞毒性を引き起こす (Bus and Gibson, 1984; Michaelis and Hill, 1933)。植物においても ROS を生成して毒性を発揮する物質が知られている。植物において最も豊富な抗酸化物質はアスコルビン酸 Ascorbic acid (ビタミン C) であり、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ ascorbate peroxidase (APX) はこれを消費して過酸化水素を解毒する (Smirnoff, 2000)。APX により生成したモノデヒドロアスコルビン酸 monodehydroascorbate (MDA) はモノデヒドロアスコルビン酸レクターゼ monodehydroascorbate reductase (MDHAR) と NADH によりアスコルビン酸に還元される (Arrigoni et al., 1981; Hossain and Asada, 1985)。火薬の主成分であり、生物毒性を示すトリニトロトルエン 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) は植物に取り込まれると MDHAR6 による NADH の酸化により 1 電子還元されてニトロラジカルを生成し、スーパーオキシドを生成する植物毒性を持つ (Johnston et al., 2015)。 $\alpha$ -terthienyl の線虫毒性も、これらと類似したメカニズムによって引き起こされるのかもしれない。

野生型ヒト SOD1 (*C. elegans* SOD-1 のオーソログ) と、タンパク構造が変化した変異 SOD1 を発現する遺伝子組換え *C. elegans* に対してパラコート処理すると、野生型線虫と比較して、野生型 SOD1 株では差は見られないが、変異体 SOD1 株では酸化ストレスに対する感受性が上昇する (Oeda et al., 2001)。この結果は、変異酵素を過剰発現させてもストレス耐性は付与されず、むしろ感受性が上昇する可能性を示している。よって、GST-4::NLS::RFP を発現するものの、 $\alpha$ -terthienyl に対して感受性を示す変異体 *gcp-2* は、 $\alpha$ -terthienyl を解毒代謝する酵素機能に何らかの障害を持つ可能性が示唆された。

*Ov-gst-3* (回旋糸状虫 *O. volvulus* の *gst-3*) をノックダウンさせた *C. elegans* AK1 (Ov-GST-3) は、RNAi 非処理区と比較して、ジュグロンとヒポキサンチン/XOD に対する感受性が上昇する (Kampkötter et al., 2003)。また、Ov-GST-3 はペルオキシダーゼとチオールトランスフェラーゼ活性を持たないと報告されている (Kampkötter et al., 2003)。*gst-4* をノックダウンさせた *C. elegans* BL1 (GST-4::GFP) は、RNAi 非処理区と比較してジュグロンに対する感受性が上昇し、*gst-4* 欠損変異体も、野生型と比較してジュグロンに対する感受性が上昇するため、GST-4 過剰発現と酸化ストレス耐性は直接関係すると報告されている (Leiers et al., 2003)。また、Ov-GST-3 外来遺伝子の発現は、酸化ストレス耐性を付与するが、寿命へは影響せず (Kampkötter et al., 2003)、GST-4::GFP を過剰発現する *C. elegans* BL1、*gst-4* 欠損変異体、野生型間の寿命の差も見られない (Leiers et al., 2003)。これらの結果は、*gst* 発現異常の表現型は寿命よりもストレス耐性に現れることを示唆しており、酸化ストレス耐性は *gst* 過剰発現により付与されるという本研究の仮説とも一致する。一方で、*skn-1* 変異体は野生型 N2 と比較して寿命が 25-30 (%) 減少すると報告されているため (An and Blackwell, 2003)、寿命への影響が見られた場合は *gst-4* より上流の SKN-1 に変異が生じている可能性もある。本研究で

は、*skn-1* 経路で *gst-4* を発現する  $\alpha$ -terthienyl またはパラコート を 5 株のうち 3 株の *gep* 変異体に対して処理すると、主に下皮で *gst-4* 発現が増加したため (図 3-15、3-17)、各 *gep* 変異体の SKN-1/WDR-23 システムは機能している可能性が示唆された。しかし、変異体 *gep-9* に対して  $\alpha$ -terthienyl を処理しても GST-4::NLS::RFP 発現量にあまり変化が見られなかったため (図 3-15Y)、*gep-9* は  $\alpha$ -terthienyl に対する *gst-4* 発現制御機構に何らかの障害を持つ可能性が示唆された。

*C. elegans* BL1 成虫に対してジュグロンを処理すると、咽頭周辺細胞、筋繊維 muscle fiber、下皮で GST-4::GFP 発現が見られるが、L3 では咽頭のイスマス isthmus とターミナルバルブ terminal bulb、筋肉、下皮で見られる (Leiers et al., 2003)。GST-4 発現は卵/胚では完全に消失するが、成虫と比較して幼虫で強く、L3 で最大となるものの、雌雄同体と雄の間に差はない (Leiers et al., 2003)。また、*gst-4* のノックダウンは全発育ステージで不完全であり、線虫の筋肉では完全に抑制されるが、咽頭と下皮では発現が見られる (Leiers et al., 2003)。咽頭と下皮は、体内と体外環境の分子交換を担う組織であるため、酵素による防御が必要であると考えられている (Leiers et al., 2003)。加えて、*gst-4* をノックダウンさせても、他の GSTs による補填はおこなわれず、個々の GST は高度に特殊化されていると考えられている (Leiers et al., 2003)。これらのことから、本研究では、線虫の下皮で *gst-4* を抑制するため、*gst-4* そのものではなく転写因子 *skn-1* とサプレッサー *wdr-23* を RNAi の対象として選択した。

マイクロアレイ解析により、非ストレス条件では SKN-1 は 233 個の遺伝子の発現を上昇させ、最も増幅率の高い遺伝子は *gst-4* であることが分かっている (Oliveira et al., 2009)。第 2 相酵素遺伝子以外では、第 1 相 (例えば CYP) と第 3 相 (トランスポーター) 遺伝子の発現も上昇しており、SKN-1 は全身の解毒に

幅広く関与している (Oliveira et al., 2009)。しかし、SKN-1 により発現上昇する遺伝子の中に SOD と CTL は含まれないことから、SKN-1 はスーパーオキシドや過酸化水素に対する一次応答は制御せず、代わりにグルタチオンに依存した解毒代謝を促進すると考えられている (Oliveira et al., 2009)。一方で、線虫をアクリルアミドで処理すると、18 種の *gst* と *sod-1* を含む 409 個の遺伝子発現が上昇し、最も増幅率が高いのは同様に *gst-4* であるが、この発現も *skn-1* により制御されると報告されている (Hasegawa et al., 2008)。実際に、*C. elegans* を  $\alpha$ -terthienyl で処理すると *gst-4* と *sod-1* の発現が上昇し、これらの発現は *skn-1* / *wdr-23* RNAi により変化することも前章で示されている。これらの結果は、*skn-1* が制御する第 2 相酵素の中で、最も発現する遺伝子は *gst-4* であるが、ストレス条件下では *gst* に加え *sod-1* も上昇することを示している。

上記のことから、*C. elegans* では SKN-1 活性を調べるため、*gst-4* の転写活性化がよく指標に用いられるが、上皮成長因子 epidermal growth factor (EGF) 経路を制御する転写因子 egg-laying defective-1 (*egl-1*) suppressor-1 (EOR-1) も、SKN-1 と並行して *gst-4* の転写を誘導する (Detienne et al., 2016)。Breast cancer 1 (BRCA1)-associated protein 2 (Brp2) の *C. elegans* オーソログ腫瘍抑制遺伝子 BRAP-2 も、SKN-1 を活性化させ、第 2 相酵素の発現を促進する (Hu et al., 2017; Koon and Kubiseski, 2010; Li et al., 1998)。これらの遺伝子を *gep* 変異体の解析対象とするのも興味深い。

線虫は水の透過性が高く、極度の高張ストレスにさらされると、体の 50 (%) の水分を失うと言われている (Choe and Strange, 2007)。浸透圧センサーとなる with no lysine (K) -1 (WNK-1) の活性化により収縮が活性化されるが、高張によって過度の収縮が起きると、線虫は膨圧を失って麻痺する (Choe and Strange, 2007)。WNK-1 は germinal center kinase-3 (GCK-3) と結合し、線虫の腸と下皮で

イオンと水分の吸収を制御し、水分を失い収縮した後、全身でこれらを素早く再吸収させ、線虫を生存させる (Choe and Strange, 2007)。よって、本章では腸や下皮で *gst-4* を過剰発現する *gep* 変異体と、Choe and Strange (2007) で報告されているように、下皮での反応が重要な浸透圧ストレスとの関係を調べた。変異体 *gep-7* のみ野生型と比較して感受性であったことから (図 3-18)、線虫の下皮で *gst-4* を過剰発現する *gep-7* は浸透圧調節機構に何らかの異常を持つ可能性があるものの、 $\alpha$ -terthienyl の抵抗性または感受性を示す他の *gep* 変異体と高張ストレスの間に相関は見られなかった。よって、 $\alpha$ -terthienyl 作用機構と浸透圧ストレスは関係がないと考えられる。

本研究で明らかとなった  $\alpha$ -terthienyl の作用機構と類似したメカニズムを持つ植物由来物質の報告もある。セイヨウオトギリ (セントジョーンズワート St. John's wort) *Hypericum perforatum* に最も豊富に含まれるヒペリシン hypericin は、一重項酸素 (または ROS 各種) を生成する光依存性の細胞毒性を示す (Durán and Song, 1986; Halder et al., 2005; Lu and Atkins, 2004)。また、ヒペリシンという名前は属名 *Hypericum* (オトギリソウ属) に由来する (Durán and Song, 1986)。ヒペリシンはヒト GST アイソフォーム (P1-1、A1-1) と結合し、P1-1 は一重項酸素の生成をほぼ無視できるレベルまで抑制するものの、A1-1 と結合したヒペリシンからは一重項酸素が生成される (Halder et al., 2005)。また、GST P1-1 は Pi クラスの 2 量体アイソエンザイム isoenzyme で、GST A1-1 は Alpha クラスの 2 量体アイソエンザイムである (Lu and Atkins, 2004)。ちなみに *C. elegans* の GST-4 は Sigma クラスに分類され (Hasegawa et al., 2010)、ヒト造血器型プロスタグランジン D 合成酵素 hematopoietic prostaglandin D synthase (HPGDS) のオーソログである (Pohl et al., 2019)。また、細胞質 GSTs は 2 量体であり、分子量約 25 kDa のサブユニットを持つ (Park et al., 2019)。これらの報告は、 $\alpha$ -terthienyl やヒ

ペリシンといった一重項酸素生成型の光活性化物質に対する線虫の防御機構は GST によって制御されるが、全ての GSTs が解毒に関与するわけではない可能性を示している。

本章の結論として、*gcp* 変異体の順遺伝学的解析により、GST-4 を線虫の腸と下皮で恒常的に発現し、薬剤処理時の GST-4 発現量も多い変異体 *gcp-1* は  $\alpha$ -terthienyl に対する抵抗性を獲得し、腸と筋肉で恒常的に発現する *gcp-2* は感受性を示し、加えて、腸、筋肉、下皮で恒常的に発現するが、 $\alpha$ -terthienyl 処理により発現量が増えない *gcp-9* も感受性であることが分かった。これらのことから、本章では、(5) *C. elegans* に対する  $\alpha$ -terthienyl の抵抗性または感受性には GST-4 の発現量と発現部位が重要である可能性を示した。

3.5. 図

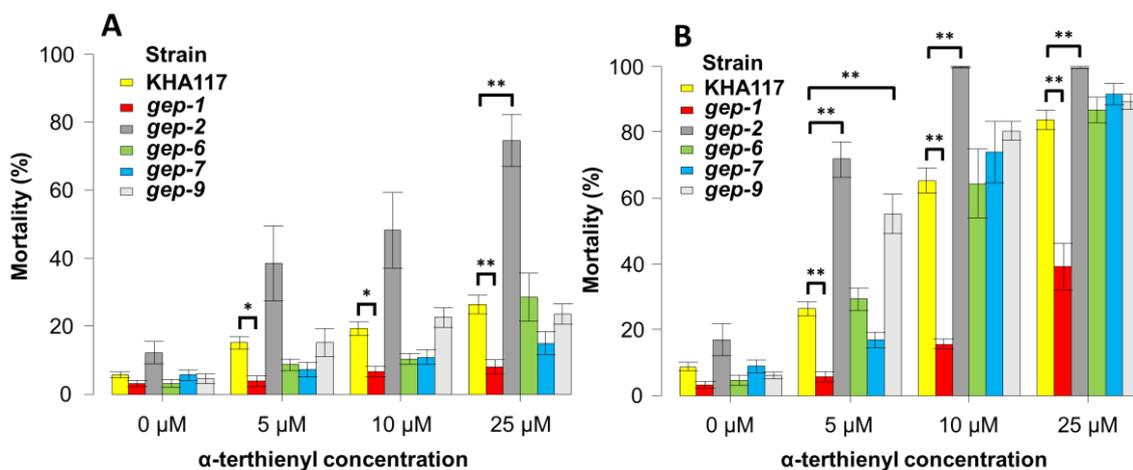
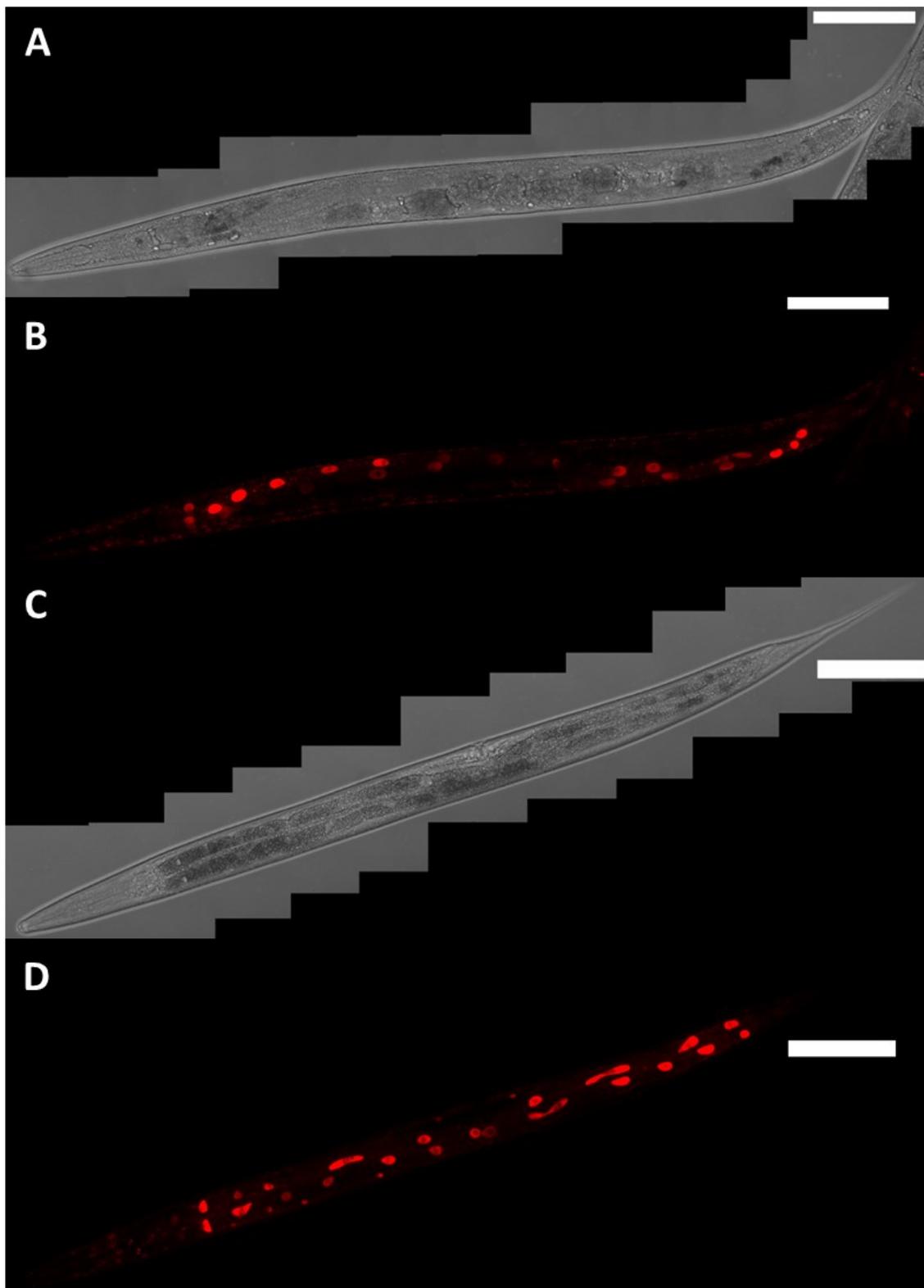
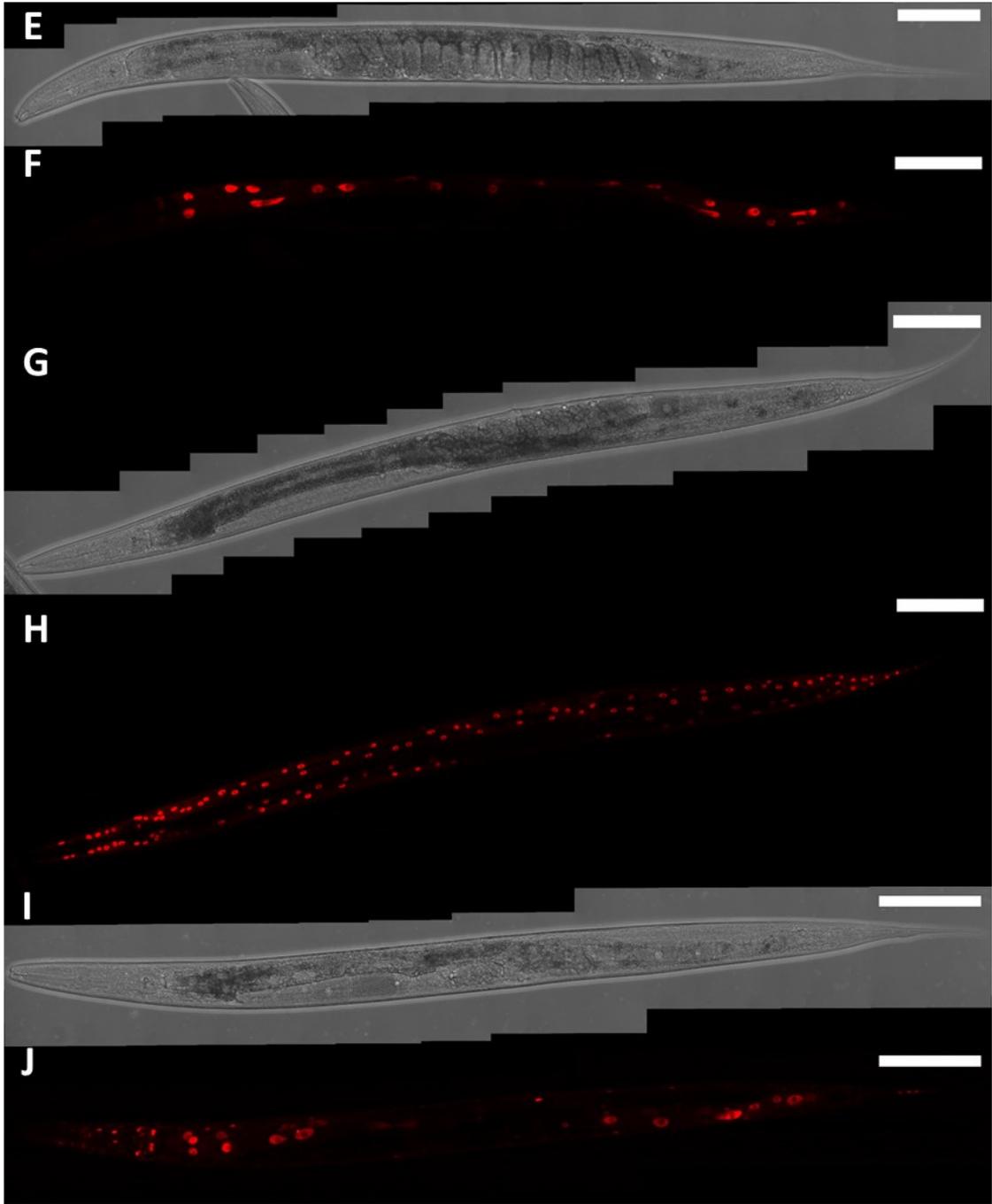


図 3-13、各 *gep* 変異体に対する  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫活性評価

各濃度の光不活性化  $\alpha$ -terthienyl を (A) 24 時間、(B) 48 時間処理し、各 *gep* 変異体の死亡率 (%) (平均値 $\pm$ 標準誤差) を算出した。死亡率 (%) は、各濃度につき 96-well plate の 3 well 以上 (約 60 頭の線虫) を 1 回の実験とし、これを独立に 3 回以上反復し、各濃度につき計 9 well 以上のデータを用いて算出した (N=17,010) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。





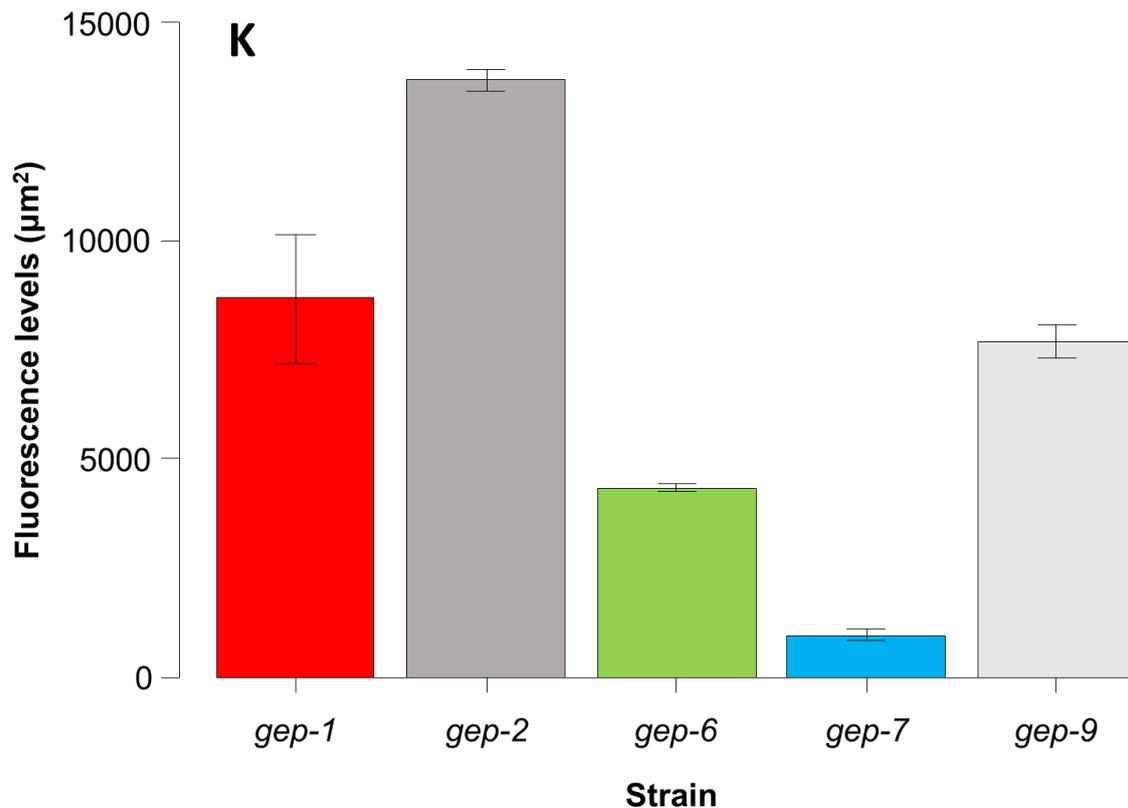
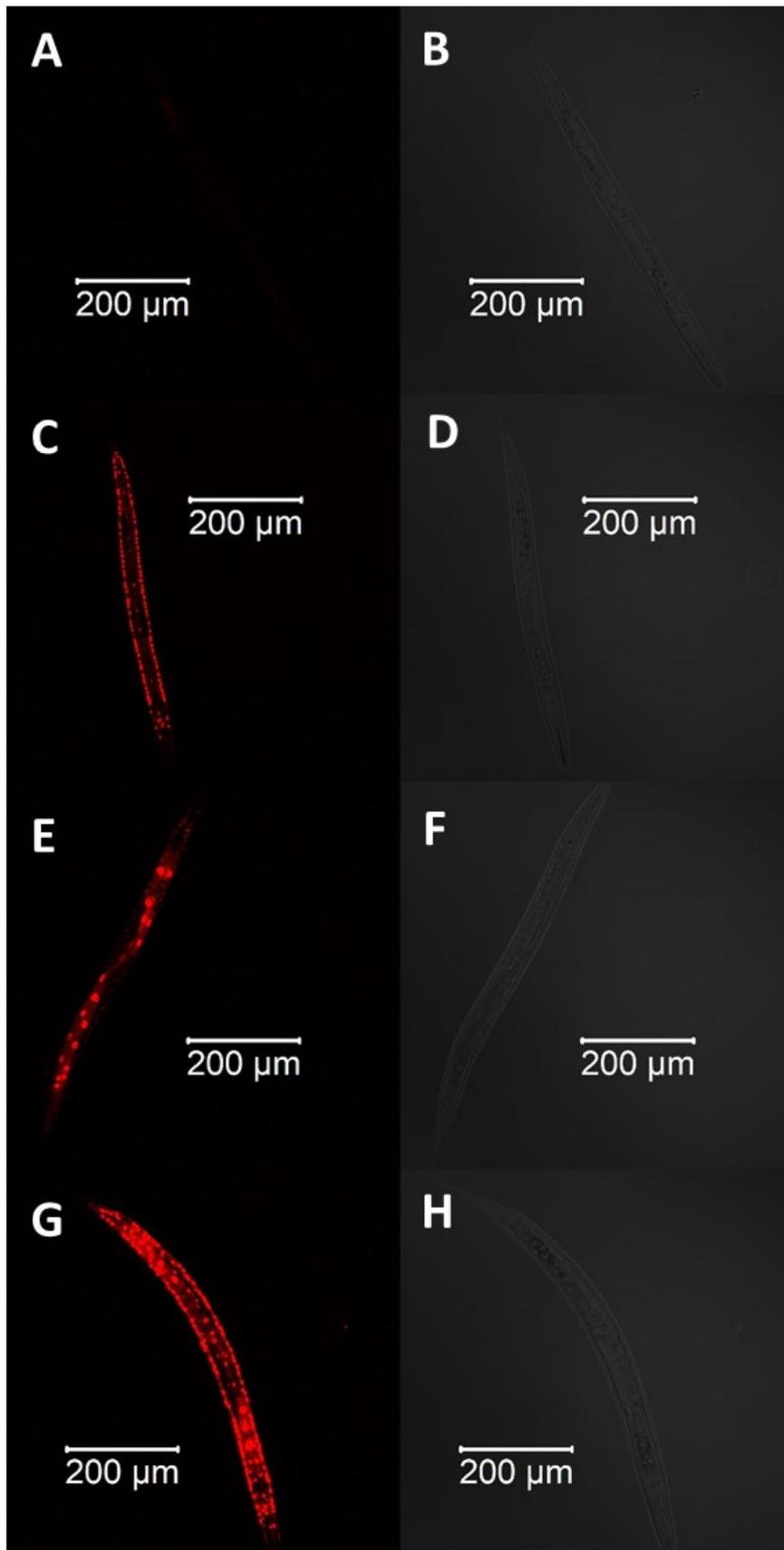
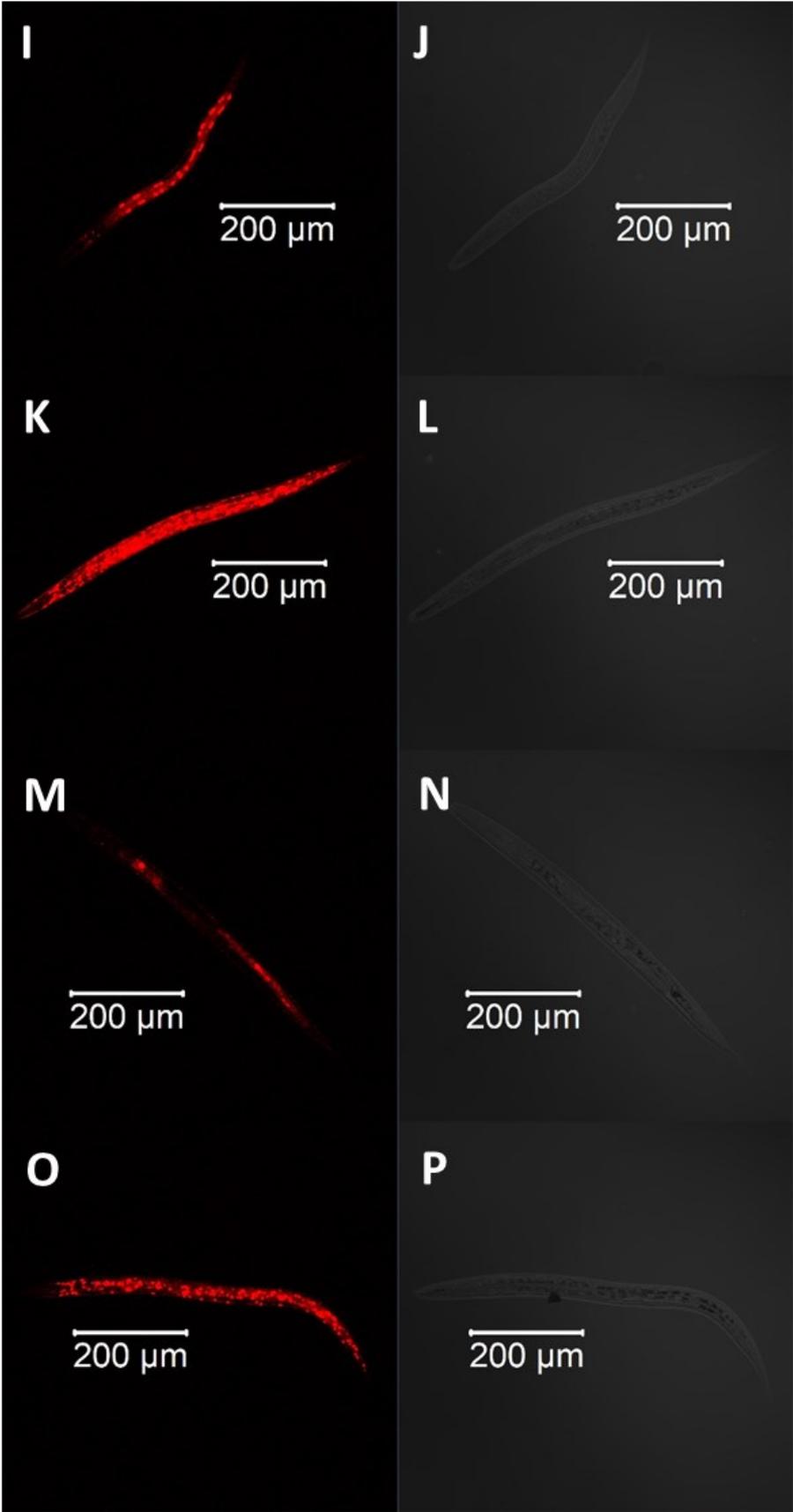
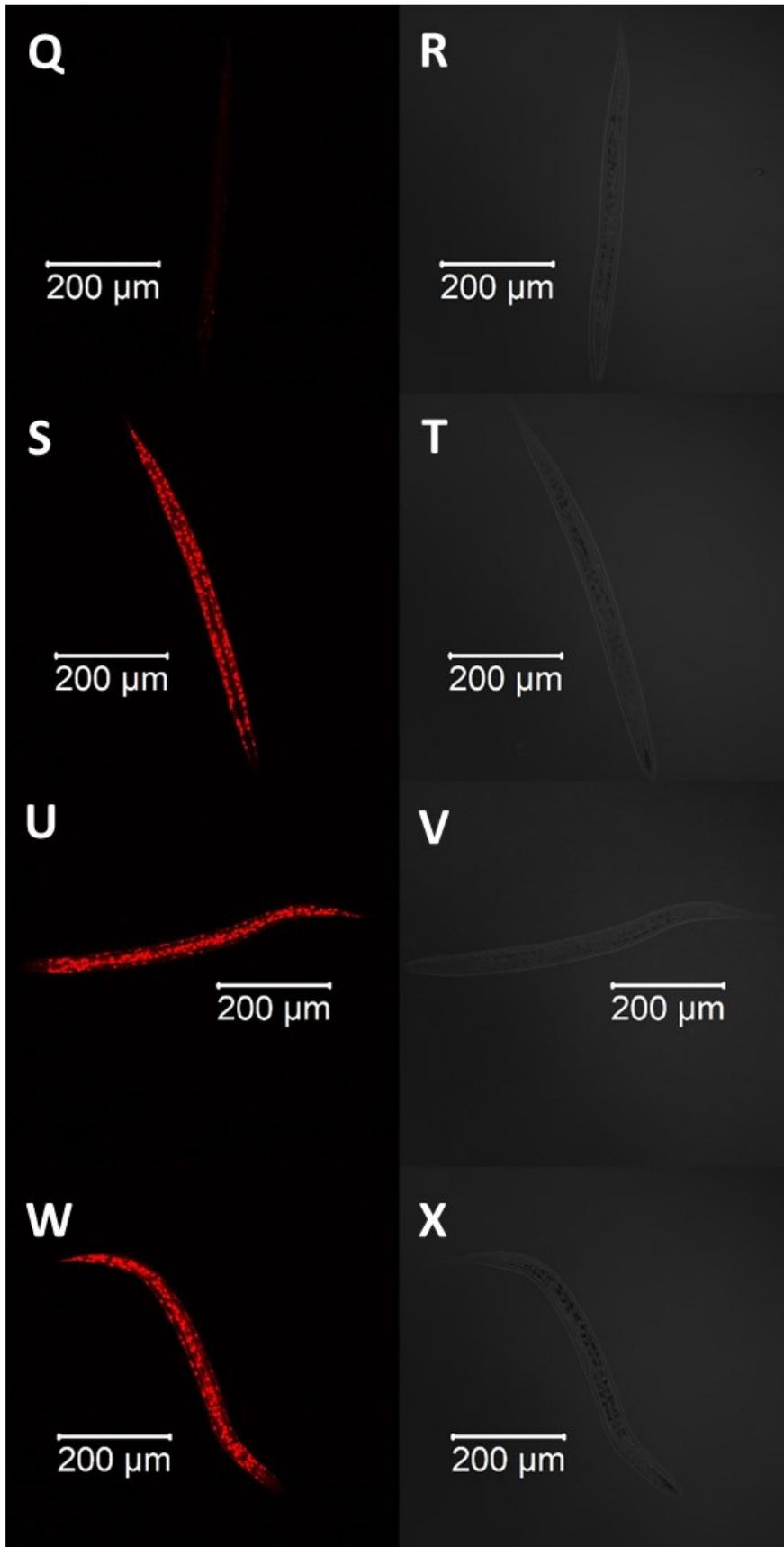


図 3-14、薬剤非処理条件下の各 *gep* 変異体の GST-4::NLS::RFP 発現部位  
 CLSM により撮影した各画像を ImageJ (MosaicJ プラグイン) により合成した。  
 (A、B) *gep-1* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現は線虫の腸と下皮で見られる。  
 (C、D) *gep-2* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現は腸と筋肉で見られる。(E、F)  
*gep-6* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現は腸で見られる。(G、H) *gep-7* の恒常的  
 な GST-4::NLS::RFP 発現は下皮で見られる。(I、J) *gep-9* の恒常的な GST-  
 4::NLS::RFP 発現は腸、筋肉、下皮で見られる。スケールバーは 100 µm。(K)  
 CLSM で撮影した各 L4 線虫 1 個体あたりの RFP 蛍光密度 (pixels/µm<sup>2</sup>) を ImageJ  
 により計測し、平均値±標準誤差を求めた (N=44)。*gep-1, -2, -9* の恒常的な GST-  
 4::NLS::RFP 発現はよく見られるものの、*gep-7* ではあまり見られない。







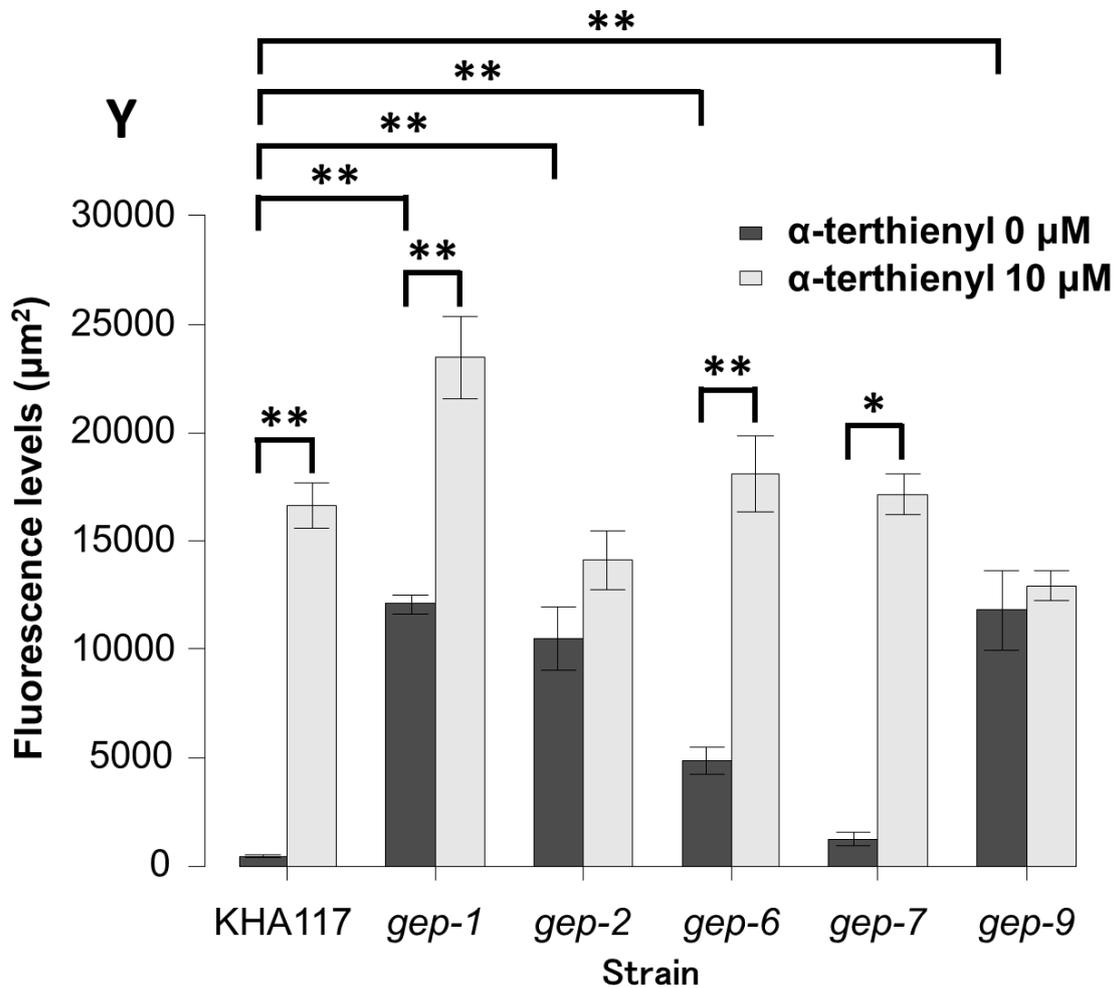


図 3-15、10 µM の光不活性化 α-terthienyl を 24 時間処理した各 *gep* 変異体の GST-4::NLS::RFP 発現部位

(A、B) 薬剤非処理条件では、KHA117 (*gst-4::nls::rfp*) の GST-4::NLS::RFP 発現は見られない。(C、D) α-terthienyl で処理すると、KHA117 の GST-4::NLS::RFP が線虫の下皮で発現する。(E、F) 薬剤非処理条件では、*gep-1* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と下皮で見られる。(G、H) α-terthienyl で処理すると、*gep-1* の GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と下皮で増加する。(I、J) 薬剤非処理条件では、*gep-2* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と筋肉で見られる。(K、L) α-terthienyl で処理すると、*gep-2* の GST-4::NLS::RFP 発現が線虫

の腸、筋肉、下皮で増加する。(M、N) 薬剤非処理条件では、*gcp-6* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸で見られる。(O、P)  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、*gcp-6* の GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と下皮で増加する。(Q、R) 薬剤非処理条件では、*gcp-7* の弱い恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の下皮で見られる。(S、T)  $\alpha$ -terthienyl で処理すると、*gcp-7* の GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の下皮で増加する。(U、V) 薬剤非処理条件では、*gcp-9* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸、筋肉、下皮で見られる。(W、X)  $\alpha$ -terthienyl で処理しても、*gcp-9* の GST-4::NLS::RFP 発現の変化はあまり見られない。各線虫は CLSM で撮影した。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  (200 倍)。(Y) CLSM で撮影した各線虫 1 個体あたりの RFP 蛍光密度 (pixels /  $\mu\text{m}^2$ ) を ImageJ により計測し、各濃度の平均値  $\pm$  標準誤差を求めた。薬剤非処理条件では、KHA117 と比較して各変異体の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が見られた。しかし、*gcp-7* の恒常的な発現量は、KHA117 と比較して有意ではなかった。 $\alpha$ -terthienyl で処理すると、非処理区と比較して各株の有意な GST-4::NLS::RFP 発現の増加が見られた。しかし、*gcp-2* の発現量はあまり増加しておらず ( $P=0.109$ )、*gcp-9* では増加は見られなかった。また、他株と比較して  $\alpha$ -terthienyl 処理時の *gcp-1* の発現量が多い傾向が見られた ( $P=0.0678$ ) (N=137) (\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.005$ 、Mann-Whitney U 検定と Bonferroni correction)。

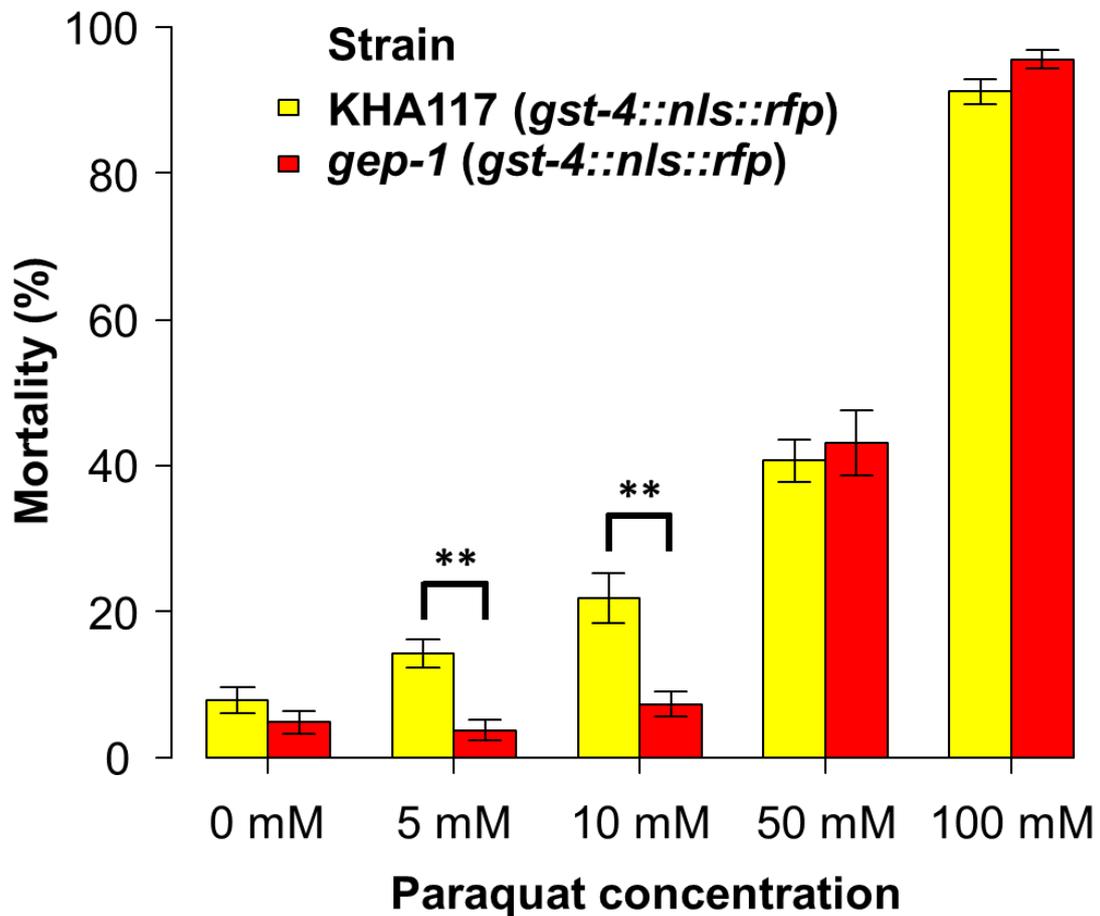
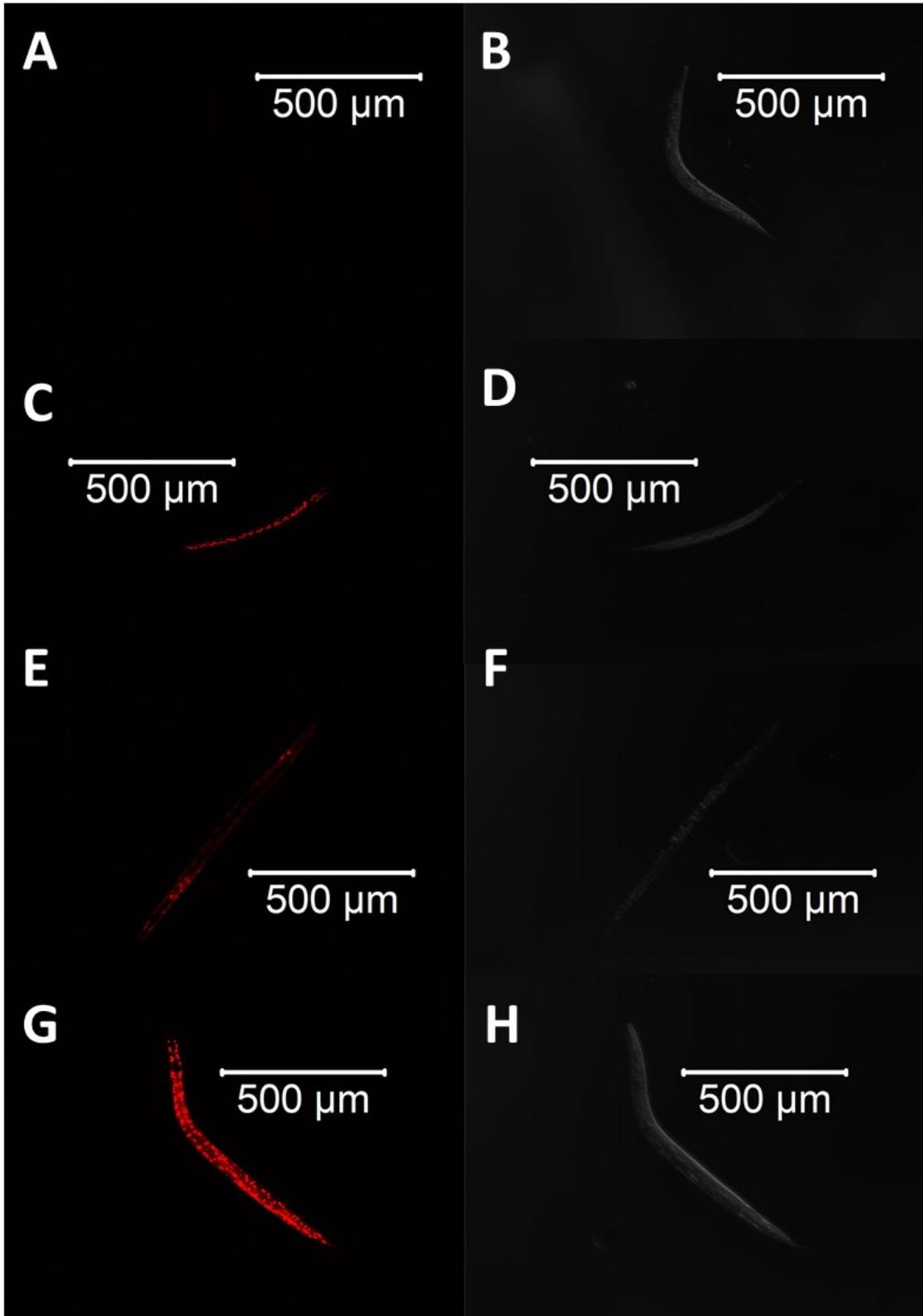


図 3-16、変異体 *gep-1* に対するパラコートの殺線虫活性評価

KHA117 (野生型) と変異体 *gep-1* に対して各濃度のパラコートを 24 時間処理し、線虫の死亡率 (%) (平均値±標準誤差) を算出した。死亡率 (%) は同様に、独立に 3 回以上反復して算出した (N=3,093) (\*\**P* <0.005、Mann-Whitney U 検定)。



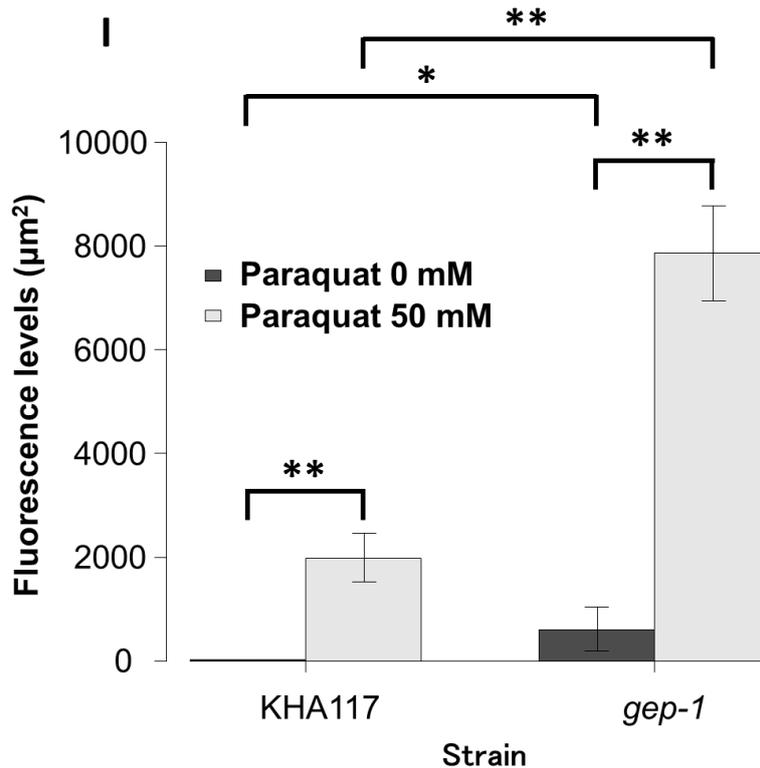


図 3-17、50 mM のパラコートで 24 時間処理した変異体 *gep-1* の GST-4::NLS::RFP 発現

(A、B) 薬剤非処理条件では、KHA117 (*gst-4::nls::rfp*) の GST-4::NLS::RFP 発現は見られない。(C、D) パラコートで処理すると、KHA117 の GST-4::NLS::RFP が線虫の下皮で発現する。(E、F) 薬剤非処理条件では、*gep-1* の恒常的な GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と下皮で見られる。(G、H) パラコートで処理すると、*gep-1* の GST-4::NLS::RFP 発現が線虫の腸と下皮で増加する。スケールバーは 500 µm (100 倍)。(I) DIC で撮影した各線虫 1 個体あたりの RFP 蛍光密度 (pixels/µm<sup>2</sup>) を ImageJ により計測し、各濃度の平均値±標準誤差を求めた。薬剤非処理条件では、KHA117 と比較して *gep-1* の有意な GST-4::NLS::RFP 発現が見られた。パラコートで処理すると、各株の GST-4::NLS::RFP 発現の増加が見られた。パラコート処理時の *gep-1* の発現量は KHA117 と比較して多かった (N=39) (\**P*<0.05、\*\**P*<0.005、Mann-Whitney U 検定)。

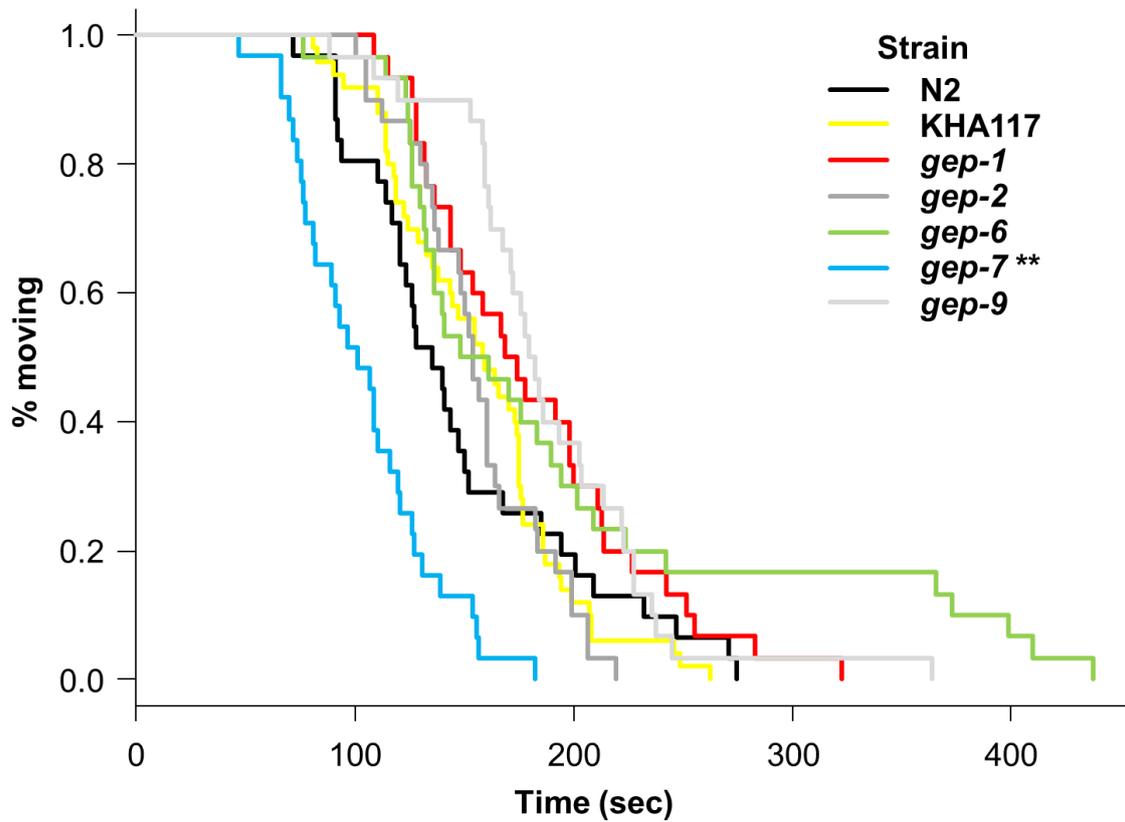


図 3-18、高張ストレスに対する *gep* 変異体の活動への影響評価（ Kaplan-Meier 生存曲線）

各 *gep* 変異体を 51 mM NaCl を含む NGM プレート（通常組成）で young adult となるまで成長させた後、500 mM NaCl を含む高張 NGM プレートに移すと、線虫の活動率 moving（%）は時間依存的に減少する。各 *gep* 変異体のうち、*gep-7* のみ、野生型（N2 と KHA117）と比較して急性浸透圧ストレスに対して感受性であった（N=232）（\*\* $P < 0.005$ 、ログランク検定と Bonferroni correction）。

## 第4章 総括

本研究では、世界中で深刻な農作物被害をもたらしている植物寄生性線虫に対する次世代農薬の開発を目的に、対抗植物マリーゴールド由来殺線虫成分  $\alpha$ -terthienyl の殺線虫機構を調べた。

対抗植物が持つ線虫抑制効果は、古くから知られていた一方、モデル生物を用いた科学研究が十分実施されてこなかった。モデル生物 *C. elegans* を用いた実験結果から、 $\alpha$ -terthienyl は UV 照射せずとも、*C. elegans* 耐久型幼虫やネコブセンチュウに対する殺線虫活性があること。線虫の下皮に作用し、第 2 相解毒代謝酵素の GST-4 や SOD-1 の発現を誘導する殺線虫機構を持ち、これらの発現を制御する SKN-1 / WDR-23 システムによって解毒代謝反応が制御されていること。GST-4 を恒常的に発現する変異体の実験から、 $\alpha$ -terthienyl に対する *C. elegans* の防御機構には、GST-4 の発現量と発現部位が重要である可能性があることが分かった。

*C. elegans* により、 $\alpha$ -terthienyl の解毒代謝反応を解明するための基礎的な情報が得られた。今後、 $\alpha$ -terthienyl に対して感受性または抵抗性を示す変異体の解析により、耐久型幼虫への作用機構といった、未解明のメカニズムを明らかにできると考えられる。

$\alpha$ -terthienyl は現在主流となっている化学農薬とは異なる殺線虫機構を持ち、総合的有害生物管理 (IPM) に適合する可能性のある天然成分であると分かった。加えて、光が届かない土壌中であっても、防除が困難とされる耐久型の線虫に対して殺線虫活性を発揮する可能性を示した。また、本研究の実験モデルは、次世代農薬開発における天然殺虫成分のスクリーニングにも応用できることも提言したい。

## 謝辞

本研究を博士論文とすることができたのは、主査であります中部大学大学院応用生物学研究科の長谷川浩一准教授、副査であります同研究科の松本吉博教授及び鈴木孝征准教授、修士論文の副査であります中部大学応用生物学部の町田千代子特任教授及び大塚健三博士をはじめ、応用生物学部の先生方から多大なるご指導、ご助言を頂いたためです。厚く御礼申し上げます。

アメリカ合衆国・フロリダ大学生物学部の Keith P. Choe 准教授には、*C. elegans* に関する多くのご助言を頂きました。明治大学農学部の新屋良治専任講師には、線虫の操作をご指導頂きました。ポルトガル・エボラ大学の Cláudia S. L. Vicente 博士には、微生物学や英語のご指導を頂きました。中部大学分析計測センターの河村益徳先生に、CLSM の操作をご指導頂きました。国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター植物免疫研究グループの佐藤一輝博士には、統計解析、*C. elegans* の実験操作、リアルタイム PCR など、本研究の実験に必要な様々なご指導を頂きました。国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所東北支所生物被害研究グループの小澤壮太博士には、線虫学や昆虫学に関するご指導だけでなく、研究生活に必要な様々なご助言を頂きました。インドネシア共和国・ジャクアラ大学農学部の Rina Sriwati 博士には、英語や生活に関するご助言を頂きました。鹿児島純心女子大学看護栄養学部の幾代以子助教には、日々の研究に関するご助言を頂きました。明治大学農学部の深山敦司さんからネコブセンチュウ（都城株）を分譲頂きました。フロリダ大学滞在中、Choe 研究室の方々に実験のご協力を頂きました。中部大学応用生物学部事務室の方々には、学会や書類に関するご協力を頂きました。中部大学 2014 年度卒の先輩方、歴代の卒業生にご協力頂きました。所属研究室の学生に感謝申し上げます。

最後に、私自身の生活を支えてくださった家族に感謝申し上げます。

## 引用文献

Alexander, S. A., Waldenmaier, C. M. (2002). Suppression of *Pratylenchus penetrans* Populations in Potato and Tomato using African Marigolds. *J Nematol.* 34(2), 130-134.

Alen, Y., Nakajima, S., Nitoda, T., Baba, N., Kanzaki, H., Kawazu, K. (2000). Two antinematodal phenolics from *Knema hookeriana*, a Sumatran rainforest plant. *Z Naturforsch.* 55c, 300-303. doi: 10.1515/znc-2000-3-426.

Altun, Z. F., Hall, D. H. (2020). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>

An, J. H., Blackwell, T. K. (2003). SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Gene Dev.* 17, 1882-1893. doi: 10.1101/gad.1107803

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457-465. doi: 10.1038/290457a0.

Anjum, N. A., Singh, H. P., Khan, M. I. R., Masood, A., Per, T. S., Negi, A., Batish, D. R., Khan, N. A., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I. (2015). Too much is bad—an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22, 3361-3382. doi: 10.1007/s11356-014-3849-9.

Ankeny, R. A. (2001). The Natural History of *Caenorhabditis elegans* Research. *Nat Rev Genet.* 2, 474-479. doi: 10.1038/35076538

Arrigoni, O., Dipierro, S., Borraccino, G. (1981). Ascorbate Free Radical Reductase, A Key Enzyme of the Ascorbic Acid System. *FEBS LETTERS.* 125(2), 242-244.

Arroo, R. R. J., Jacobs, J. J. M. R., Van Gestel, J. A. M., Kenkel, H., Jannink, W., Croes, A. F., Wullems, G. J. (1997). Regulation of thiophene biosynthesis by sulphate in roots of marigolds. *NewPhytol.* 135, 175-181. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00637.x

Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Azzariti, A., Marra, E. (2000). Cytochrome *c* Is Released from Mitochondria in a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent Fashion and Can Operate as a ROS Scavenger and as a Respiratory Substrate in Cerebellar Neurons Undergoing Excitotoxic Death. *J Biol Chem.* 275(47), 37159-37166. doi: 10.1074/jbc.M002361200

Bakker, J., Gommers, F. J., Nieuwenhuis, I., Wynberg, H. (1979). Photoactivation of the nematicidal compound alpha-terthienyl from roots of marigold (*Tagetes* species): A possible singlet oxygen role. *J Biol Chem.* 254(6), 1841-1844.

Baker, L. W., Fitzell, D. L., Seiber, J. N., Parker, T. R., Shibamoto, T., Poor, M. W., Longley, K. E., Tomlin, R. P., Propper, R., Duncan, D. W. (1996). Ambient air concentrations of pesticides in California. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1365-1368.

Bandana, K., Raina, R., Kumari, M., Rani, J. (2018). *Tagetes minuta* : An overview. *International Journal of Chemical Studies*. 6(2), 3711-3717.

Bardgett, R. D., van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*. 515, 505-511. doi: 10.1038/nature13855.

Bartels, M. J., Brzak, K. A., Mendrala, A. L., Stott, W. T. (2000). Mechanistic aspects of the metabolism of 1,3-dichloropropene in rats and mice. *Chem Res Toxicol*. 13(11), 1096-1102. doi: 10.1021/tx000124p.

Blakely, E. L., Mitchell, A. L., Fisher, N., Meunier, B., Nijtmans, L. G., Schaefer, A. M., Jackson, M. J., Turnbull, D. M., Taylor, R. W. (2005). A mitochondrial cytochrome *b* mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J*. 272(14), 3583-3592. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04779.x.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392, 71-75. doi: 10.1038/32160.

Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., Jermini, L. S. (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem J*. 328, 929-935. doi: 10.1042/bj3280929.

Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrnyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J Biol Chem.* 275(32), 24798-24806. doi: 10.1074/jbc.M001706200.

Bohlmann, H., Sobczak, M. (2014). The plant cell wall in the feeding sites of cyst nematodes. *Front. Plant Sci.* 5, 89. doi: 10.3389/fpls.2014.00089

Bardgett, R. D., van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature.* 515, 505-511. doi: 10.1038/nature13855.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77, 71-94.

Bridge, J. (1996). Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 201-225. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.201.

Bus, J. S., Gibson, J. E. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect.* 55, 37-46. doi: 10.1289/ehp.845537.

Campbell, G., Lambert, J. D., Arnason, T., Towers, G. H. (1982). Allelopathic properties of  $\alpha$ -terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of asteraceae. *J Chem Ecol.* 8(6), 961-972. doi: 10.1007/BF00987662.

Cassada, R. C., Russell, R. L. (1975). The Dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46, 326-342. doi: 10.1016/0012-1606(75)90109-8

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science.* 263, 802-805. doi: 10.1126/science.8303295.

Champer, J., Buchman, A., Akbari, O. S. (2016). Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet.* 17, 146-159. doi: 10.1038/nrg.2015.34.

Champagne, D. E., Arnason, J. T., Philogène, B. J., Morand, P., Lam, J. (1986). Light-mediated allelochemical effects of naturally occurring polyacetylenes and thiophenes from asteraceae on herbivorous insects. *J Chem Ecol.* 12(4), 835-858. doi: 10.1007/BF01020255.

Chen, L., Li, X., Zhang, J., Fang, J., Huang, Y., Wang, P., Ma, J. (2015). Production of Hydroxyl Radical via the Activation of Hydrogen Peroxide by Hydroxylamine. *Environ Sci Technol.* 49(17), 10373-10379. doi: 10.1021/acs.est.5b00483.

Choe, K. P., Strange, K. (2007). Evolutionarily conserved WNK and Ste20 kinases are essential for acute volume recovery and survival after hypertonic shrinkage in

*Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293, C915-C927. doi: 10.1152/ajpcell.00126.2007.

Choe, K. P., Przybysz, A. J., Strange, K. (2009). The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2704-2715. doi: 10.1128/MCB.01811-08

Choo, H. Y., Kaya, H. K., Huh, J., Lee, D. W., Kim, H. H., Lee, S. M., Choo, Y. M. (2002). Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. *Biocontrol*. 47, 177-192.

Christiaens, F. J., Chardon, A., Fourtanier, A., Frederick, J. E. (2005). Standard ultraviolet daylight for nonextreme exposure conditions. *Photochem. Photobiol.* 81, 874-878. doi: 10.1562/2004-05-14-RA-167.

Ciche, T. (2007). The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* research community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.135.1.

Conn, E. E., Vennesland, B. (1951). Glutathione reductase of wheat germ. *J Biol Chem*. 192, 17-28.

Corpas, F. J., Barroso, J. B., Sandalio, L. M., Distefano, S., Palma, J. M., Lupiáñez, J. A.,

Del Río, L. A. (1998). A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem J.* 330, 777-784. doi: 10.1042/bj3300777.

Corsi, A. K., Wightman, B., Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.177.1.

Cox, G. N., Kusch, M., Edgar, R. S. (1981). Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *J Cell Biol.* 90, 7-17. doi: 10.1083/jcb.90.1.7.

Crow, J. F. (1994). HITOSHI KIHARA, Japan's Pioneer Geneticist. *Genetics.* 137, 891-894.

Cuppen, E., Gort, E., Hazendonk, E., Mudde, J., van de Belt, J., Nijman, I. J., Guryev, V., Plasterk, R. H. A. (2007). Efficient target-selected mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: toward a knockout for every gene. *Genome Res.* 17, 649-658. doi: 10.1101/gr.6080607.

Daimon, H., Mii, M. (1995). Plant Regeneration and Thiophene Production in Hairy Root Cultures of *Rudbeckia hirta* L. Used as an Antagonistic Plant to Nematodes. *Jpn. J. Crop Sci.* 64(3), 650-655. doi: <https://doi.org/10.1626/jcs.64.650>

de Viala, S. S., Brodie, B. B., Rodriguez, E., Gibson, D. M. (1998). The potential of thiarubrine C as a nematicidal agent against plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 30(2), 192-200.

Degenkolb, T., Vilcinskas, A. (2016). Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100, 3799-3812. doi: 10.1007/s00253-015-7233-6

del Río, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot.* 66, 2827-2837. doi: 10.1093/jxb/erv099

Deng, J., Dai, Y., Tang, H., Pang, S. (2020). SKN-1 Is a Negative Regulator of DAF-16 and Somatic Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 10(5), 1707-1712. doi: 10.1534/g3.120.401203.

Desaeger, J., Dickson, D. W., Locascio, S. J. (2017). Methyl Bromide Alternatives for Control of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Tomato Production in Florida. *J Nematol.* 49(2), 140-149. doi: 10.21307/jofnem-2017-058.

Detienne, G., de Walle, P. V., Haes, W. D., Schoofs, L., Temmerman, L. (2016). SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling. *Worm.* 5(4), e1230585. doi: 10.1080/21624054.2016.1230585.

Dodd, W., Tang, L., Lone, J. C., Wimberly, K., Wu, C. W., Consalvo, C., Wright, J. E., Pujol, N., Choe, K. P. (2018). A Damage Sensor Associated with the Cuticle Coordinates Three Core Environmental Stress Responses in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 208, 1467-1482. doi: 10.1534/genetics.118.300827.

Doonan, R., McElwee, J. J., Matthijssens, F., Walker, G. A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J. R., Gems, D. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Gene Dev.* 22, 3236-3241. doi: 10.1101/gad.504808

Douglas, D. S., Popko, B. (2009). Mouse forward genetics in the study of the peripheral nervous system and human peripheral neuropathy. *Neurochem Res.* 34, 124-137. doi: 10.1007/s11064-008-9719-4.

Downum, K. R. (1992). Tansley Review No. 43 Light-activated plant defence. *New Phytol.* 122, 401-420.

Downum, K. R., Hancock, R. E. W., Towers, G. H. N. (1983). Photodynamic action on *Escherichia coli* of natural acetylenic thiophenes, particularly 5-(buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl. *Photobiochemistry and Photobiophysics.* 6, 145-152.

Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Dème, D., Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid

plasma membrane. *J Biol Chem.* 266(6), 3739-3743.

Durán, N., Song, P. S. (1986). Hypericin and its photodynamic action. *Photochem Photobiol.* 43, 6, 677-680. doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb05646.x.

Ebone, L. A., Kovaleski, M., Deuner, C. C. (2019). Nematicides: history, mode, and mechanism action. *Plant Sci. Today.* 6(2), 91-97. doi: 10.14719/pst.2019.6.2.468.

Eggler, A. L., Liu, G., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B., Mesecar, A. D. (2005). Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 10070-10075. doi: 10.1073/pnas.0502402102.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2000). Toxicological Review of 1,3-Dichloropropene. EPA/635/R-00/001. *Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.* 1-83.

Erkut, C., Kurzchalia, T. V. (2015). The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance. *Planta.* 242, 389-396. doi: 10.1007/s00425-015-2300-x

Fabrick, J. A., Yool, A. J., Spurgeon, D. W. (2020). Insecticidal activity of marigold *Tagetes patula* plants and foliar extracts against the hemipteran pests, *Lygus hesperus* and *Bemisia tabaci*. *PLoS One.* 15(5), e0233511. doi: 10.1371/journal.pone.0233511.

Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Iqbal, E. Y., Lubna., Siddiqi, H., Naz, A. (2011). Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. Yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9080-9093. doi: 10.1021/jf201611b.

Fang, W., Yan, D., Wang, Q., Huang, B., Ren, Z., Wang, X., Wang, X., Li, Y., Ouyang, C., Migheli, Q., Cao, A. (2019). Changes in the Abundance and Community Composition of Different Nitrogen Cycling Groups in Response to Fumigation With 1,3-dichloropropene. *Sci Total Environ.* 650(1), 44-55. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.432.

Feng, R., Houseman, J. G., Downe, A. E., Arnason, J. T. (1993). Effects of  $\alpha$ -Terthienyl on the midgut detoxification enzymes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *J Chem Ecol.* 19(9), 2047-2054. doi: 10.1007/BF00983807.

FAO. (2019). *International Year of Plant Health, 2020: Communication guide*. Rome.

Faske, T. R., Hurd, K. (2015). Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Fluopyram. *J Nematol.* 47(4), 316-321.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391, 806-811. doi: 10.1038/35888.

Flibotte, S., Edgley, M. L., Chaudhry, I., Taylor, J., Neil, S. E., Rogula, A., Zapf, R., Hirst, M., Butterfield, Y., Jones, S. J., Marra, M. A., Barstead, R. J., Moerman, D. G. (2010). Whole-genome profiling of mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 185, 431-441. doi: 10.1534/genetics.110.116616.

Fosu-Nyarko, J., Jones, M. G. K. (2016). Advances in understanding the molecular mechanisms of root lesion nematode host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 253-278. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100257

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64, 97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.

Fujii, M., Ishii, N., Joguchi, A., Yasuda, K., Ayusawa, D. (1998). A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.* 5(1), 25-30. doi: 10.1093/dnares/5.1.25.

Fujimoto, T., Kyo, M., Miyauchi, Y., Mayama, S. (1990). Nematocidal Activity and  $\alpha$ -Terthiophene Content in Marigold Callus. *Plant Tissue Culture Letters.* 7(3), 177-180. doi: 10.5511/plantbiotechnology1984.7.177

Gapasin, R. M., Miller, S. A., Sanchez. C. Y. (2000). Antagonistic Plants for the Management of the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne graminicola* in Rice-Onion System. *Trans. Nat. Aca. Sci. Tech Phippines.* 22, 131-136.

Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *C R Biol.* 339, 225-230. doi: 10.1016/j.crvi.2016.05.009.

Gillet, F.-X., Bournaud, C., Antonino de Souza Júnior, J. D., Grossi-de-Sa, M. F. (2017). Plant-parasitic nematodes: towards understanding molecular players in stress responses. *Ann Bot.* 119, 775-789. doi: 10.1093/aob/mcw260

Girard, L. R., Fiedler, T. J., Harris, T. W., Carvalho, F., Antoshechkin, I., Han, M., Sternberg, P. W., Stein, L. D., Chalfie, M. (2007). WormBook: The Online Review of *Caenorhabditis elegans* Biology. *Nucleic Acids Res.* 35, D(Database issue)472-475. doi: 10.1093/nar/gkl894.

Gommer. F. J. (1973). Nematicidal principles in *compositae*. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen.* 73-17. pp. 1-71. Nederland.

Grčević, M., Kralik, Z., Kralik, G., Galović, D., Radišić, Ž., Hanžek, D. (2019). Quality and oxidative stability of eggs laid by hens fed marigold extract supplemented diet. *Poult Sci.* 98(8), 3338-3344. doi: 10.3382/ps/pez134.

Greenwald, I. (2016). WormBook: WormBiology for the 21st Century. *Genetics.* 202(3), 883-884. doi: 10.1534/genetics.116.187575.

Guillet, G., Harmatha, J., Waddell, T. G., Philogène, B. J. R., Arnason, J. T. (2000). Synergistic insecticidal mode of action between sesquiterpene lactones and a phototoxin,

$\alpha$ -terthienyl. *Photochem Photobiol.* 71(2), 111-115. doi: 10.1562/0031-8655(2000)071<0111:sipsim>2.0.co;2.

Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M. V., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., Bollmann, S. R., Bos, J. I. B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J. C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M. A., Fugelstad, J., Gilroy, E. M., Gnerre, S., Green, P. J., Grenville-Briggs, L. J., Griffith, J., Grünwald, N. J., Horn, K., Horner, N. R., Hu, C.-H., Huitema, E., Jeong, D.-H., Jones, A. M. E., Jones, J. D. G., Jones, R. W., Karlsson, E. K., Kunjeti, S. G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., Maclean, D., Chibucos, M. C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H. J. G., Morgan, W., Morris, P. F., Munro, C. A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D. C., Schumann, U. D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D. J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P. J. I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R. J., Whisson, S. C., Judelson, H. S., Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 461, 393-398. doi: 10.1038/nature08358.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22), 7130-7139.

Halder, M., Chowdhury, P. K., Das, R., Mukherjee, P., Atkins, W. M., Petrich, J. W. (2005). Interaction of glutathione S-transferase with hypericin: A photophysical study. *J Phys Chem B*. 109, 41, 19484-19489. doi: 10.1021/jp051645u.

Halprin, K. M., Ohkawara, A. (1967). The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *J Invest Dermatol*. 48(2), 149-52. doi: 10.1038/jid.1967.24.

Hamaguchi, T., Sato, K., Vicente, C. S. L., Hasegawa, K. (2019). Nematicidal actions of the marigold exudate  $\alpha$ -terthienyl: oxidative stress-inducing compound penetrates nematode hypodermis. *Biol Open*. 8(4), bio038646. doi: 10.1242/bio.038646. <https://bio.biologists.org/content/8/4/bio038646>

Han, H. K. (2011). Role of transporters in drug interactions. *Arch Pharm Res*. 34(11), 1865-1877. doi: 10.1007/s12272-011-1107-y.

Hara, T., Minakami, S. (1971). On Functional Role of Cytochrome *b*<sub>5</sub> I. NADH-linked Cytochrome *c* Reductase in Microsomes. *J. Biochem*. 69, 317-321.

Hasegawa, K., Miwa, S., Isomura, K., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H., Miwa, J. (2008). Acrylamide-Responsive Genes in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Sci*. 101, 215-225. doi: 10.1093/toxsci/kfm276

Hasegawa, K., Miwa, J. (2010). Genetic and cellular characterization of *Caenorhabditis*

*elegans* mutants abnormal in the regulation of many phase II enzymes. *PLoS One*. 5(6), e11194. doi: 10.1371/journal.pone.0011194.

Hasegawa, K., Miwa, S., Tsutsumiuchi, K., Miwa, J. (2010). Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. *PLoS One*. 5(2), e9267. doi: 10.1371/journal.pone.0009267.

Hatakeda, K., Saito, N., Ito, S., Ikushima, Y., Asano, T. (1985). A new nematocidal compound in French marigold [Japanese]. *Jpn. J. Nematol.* 15, 11-13. doi: 10.14855/jjn1972.15.11

Henkle-Dührsen, K., Kampkötter, A. (2001). Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 129-142. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00252-3

廣岡卓. (2019). 農薬市場とイノベーション. *JETI*. 67(5), 13-16.

Hirotsu, T., Sonoda, H., Uozumi, T., Shinden, Y., Mimori, K., Maehara, Y., Ueda, N., Hamakawa, M. (2015). A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS One*. 10(3), e0118699. doi: 10.1371/journal.pone.0118699

Honda, Y., Honda, S. (1999). The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative

stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385-1393.

Hooks, C. R. R., Wang, K.-H., Ploeg, A., McSorley, R. (2010). Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Appl. Soil Ecol.* 46, 307-320. doi: 10.1016/j.apsoil.2010.09.005

Hossain, M. A., Asada, K. (1985). Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem.* 260(24), 12920-12926.

Howe, K., Davis, P., Paulini, M., Tuli, M. A., Williams, G., Yook, K., Durbin, R., Kersey, P., Sternberg, P. W. (2012). WormBase: Annotating many nematode genomes. *Worm.* 1(1), 15-21. doi: 10.4161/worm.19574.

Hu, Q., D'Amora, D. R., MacNeil, L. T., Walhout, A. J. M., Kubiseski, T. J. (2017). The Oxidative Stress Response in *Caenorhabditis elegans* Requires the GATA Transcription Factor ELT-3 and SKN-1/Nrf2. *Genetics.* 206, 1909-1922. doi: 10.1534/genetics.116.198788.

Huang, J. S., Barker, K. R. (1991). Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. *Plant Physiol.* 96, 1302-1307. doi: 10.1104/pp.96.4.1302.

Huang, Q., Liu, Y., Zhan, T., Deng, Y., He, Y. (2010). Comparable susceptibilities of

human 293 cells and insect Tn-5B1-4 cells to photoactivated  $\alpha$ -terthienyl. *J Agric Food Chem.* 58, 2637-2642. doi: 10.1021/jf902204q.

Huang, Q., Yun, X., Rao, W., Xiao, C. (2017). Antioxidative cellular response of lepidopteran ovarian cells to photoactivated alpha-terthienyl. *Pestic. Biochem. Physiol.* 137, 1-7. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.09.006

藤田直市. (1925). 除蟲菊の生薬學的研究. *薬學雜誌*. 526, 1063-1078. doi: [https://doi.org/10.1248/yakushi1881.1925.526\\_1063](https://doi.org/10.1248/yakushi1881.1925.526_1063)

Huo, J., Zhao, B., Zhang, Z., Xing, J., Zhang, J., Dong, J., Fan, Z. (2018). Structure-Based Discovery and Synthesis of Potential Transketolase Inhibitors. *Molecules.* 23, 2116. doi: 10.3390/molecules23092116

井上忠男. (1983). 生物コーナー. *化学と生物*. 21(2). 114-115. doi: <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.21.114>

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431, 931-945. doi: 10.1038/nature03001.

Ishibashi, N., Kondo, E. (1974). The developmental stages of nematodes for survival, with some discussions on the term "infective" and "dauer" [Japanese]. *Japanese Journal of Nematology.* 4, 1-10.

Ishibashi, N (Editor). (2003). Biology of Nematodes [Japanese]. *University of Tokyo Press*. pp. 1-290. ISBN 4-13-06214-4.

Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., Yamamoto, M. (1999). Regulatory Mechanisms of Cellular Response to Oxidative Stress. *Free Rad. Res.* 31, 319-324. doi: 10.1080/10715769900300881.

Jacobs, J. J., Arroo, R. R., De Koning, E. A., Klunder, A. J., Croes, A. F., Wullems, G. J. (1995). Isolation and Characterization of Mutants of Thiophene Synthesis in *Tagetes erecta*. *Plant Physiol.* 107, 807-814. doi: 10.1104/pp.107.3.807.

Javed, N., Anwar, S. A., Fyaz, S., Khan, M. M., Ashfaq, M. (2008). Effects of Neem formulations applied as soil drenching on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on roots of tomato. *Pak. J. Bot.* 40(2), 905-910.

Jensen, L. T., Culotta, V. C. (2005). Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J Biol Chem.* 280(50), 41373-41379. doi: 10.1074/jbc.M509142200.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829.

Johnston, E. J., Rylott, E. L., Beynon, E., Lorenz, A., Chechik, V., Bruce, N. C. (2015). Monodehydroascorbate reductase mediates TNT toxicity in plants. *Science*. 349, 1072-1075. doi: 10.1126/science.aab3472.

Jones, L. M., Staffa, K., Perally, S., LaCourse, E. J., Brophy, P. M., Hamilton, J. V. (2010). Proteomic analyses of *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates a shared detoxification system in longevity assurance. *J Proteome Res*. 9, 6, 2871-2881. doi: 10.1021/pr9009639.

Jones, L. M., De Giorgi, C., Urwin, P. E. (2011). *C. elegans* as a Resource for Studies on Plant Parasitic Nematodes. In *Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions* (ed. Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C.). pp. 175-220. Switzerland: Springer Nature.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M., Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 14, 946-961. doi: 10.1111/mpp.12057.

Jordan, D. L., Barnes, J. S., Corbett, T., Bogle, C. R., Johnson, P. D., Shew, B. B., Koenning, S. R., Ye, W., Brandenburg, R. L. (2008). Crop response to rotation and tillage in Peanut-based cropping systems. *Agron. J.* 100, 1580-1586. doi: 10.2134/agronj2008.0075

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. 3rd edn. *CRC Press*. Boca Raton. 1-403.

Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G., Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2, 1-10. doi: 10.1186/gb-2000-2-1-research0002

上遠章. (1975). DDT, BHC, パラチオンが世に出るまで. *Journal of Pesticide Science*. Inaugural Issue, 21-22. doi: <https://doi.org/10.1584/jpestics.1975.16>

Kampkötter, A., Volkmann, T. E., de Castro, S. H., Leiers, B., Klotz, L. O., Johnson, T. E., Link, C. D., Dührsen, K. H. (2003). Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol.* 325(1), 25-37. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01174-9.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452-458. doi: 10.1038/bmt.2012.244

Karsen, G., Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In *Plant Nematology* (ed. Perry, R. N., Moens, M.). 59. Oxford, UK: CABI.

Katiki, L. M., Ferreira, J. F. S., Zajac, A. M., Masler, C., Lindsay, D. S., Chagas, A. C. S.,

Amarante, A. F. T. (2011). *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Vet. Parasitol.* 182, 264-268. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.020

Kearn, J., Ludlow, E., Dillon, J., O'Connor, V., Holden-Dye, L. (2014). Fluensulfone is a nematicide with a mode of action distinct from anticholinesterases and macrocyclic lactones. *Pestic Biochem Physiol.* 109, 44-57. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.01.004.

Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *J Biol Chem.* 251(20), 6183-6188.

Kimble, J., Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 70(2), 396-417. doi: 10.1016/0012-1606(79)90035-6.

Kimpinski, J., Arsenault, W. J., Gallant, C. E., Sanderson, J. B. (2000). The Effect of Marigolds (*Tagetes* spp.) and Other Cover Crops on *Pratylenchus penetrans* and on Following Potato Crops. *J Nematol.* 32(4S), 531-536.

Klaunig, J. E., Gehen, S. C., Wang, Z., Klein, P. J., Billington, R. (2015). Mechanism of 1,3-dichloropropene-induced Rat Liver Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 143(1), 6-15. doi: 10.1093/toxsci/kfu221

Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M.

(2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 26(1), 221-229. doi: 10.1128/MCB.26.1.221-229.2006.

Kobayashi, H., Nagao, S., Hirota, S. (2016). Characterization of the Cytochrome *c* Membrane-Binding Site Using Cardiolipin-Containing Bicelles with NMR. *Angew. Chem.* 128, 14225-14228. doi: 10.1002/anie.201607419

国立環境研究所 有害紫外線モニタリングネットワーク事務局. (2017a). 陸別局 UV-A 観測データ.

[https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/rikubetsu/monthly/rikubetsu\\_m\\_uva\\_2017.gif](https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/rikubetsu/monthly/rikubetsu_m_uva_2017.gif). 2020年12月10日閲覧.

国立環境研究所 有害紫外線モニタリングネットワーク事務局. (2017b). つくば局 UV-A 観測データ.

[https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/tsukuba/monthly/tsukuba\\_m\\_uva\\_2017.gif](https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/tsukuba/monthly/tsukuba_m_uva_2017.gif). 2020年12月10日閲覧.

国立環境研究所 有害紫外線モニタリングネットワーク事務局. (2017c). 辺戸岬局 UV-A 観測データ.

[https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/hedo/monthly/hedo\\_m\\_uva\\_2017.gif](https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/hedo/monthly/hedo_m_uva_2017.gif). 2020年12月10日閲覧.

国立環境研究所 有害紫外線モニタリングネットワーク事務局. (2017d). 波照間

局 UV-A 観測データ.

[https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/hateruma/monthly/hateruma\\_m\\_uva\\_2017.gif](https://db.cger.nies.go.jp/gem/uv/data/images/hateruma/monthly/hateruma_m_uva_2017.gif). 2020 年 12 月 10 日閲覧.

Koon, J. C., Kubiseski, T. J. (2010). Developmental arrest of *Caenorhabditis elegans* BRAP-2 mutant exposed to oxidative stress is dependent on BRC-1. *J Biol Chem.* 285(18), 13437-13443. doi: 10.1074/jbc.M110.107011.

Kramer, J. M. (1997). Extracellular Matrix. In *C. elegans* II, 2nd edition (ed. Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R.). pp. 471-500. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring.

Kutscher, L. M., Shaham, S. (2014). Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.167.1

Kyo, M., Miyauchi, Y., Fujimoto, T., Mayama, S. (1990). Production of Nematocidal Compounds by Hairy Root Cultures of *Tagetes Patula* L. *Plant Cell Rep.* 9, 393-397. doi: 10.1007/BF00232407.

Kyrou, K., Hammond, A. M., Galizi, R., Kranjc, N., Burt, A., Beaghton, A. K., Nolan, T., Crisanti, A. (2018). A CRISPR-Cas9 gene drive targeting *doublesex* causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 36(11), 1062-1066. doi: 10.1038/nbt.4245.

Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S., Lin. W. (2000). Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Proteomics. *Genome Res.* 10(5), 703-713. doi: 10.1101/gr.10.5.703.

LaMondia, J. A. (2006). Management of lesion nematodes and potato early dying with rotation crops. *J Nematol.* 38(4), 442-448.

Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(19), 8905-8909. doi: 10.1073/pnas.90.19.8905.

Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R., Berckes, N. (2014). Biopesticide Oversight and Registration at the U.S. Environmental Protection Agency. *ACS Symposium Series.* 1172(1), 3-18. doi: 10.1021/bk-2014-1172.ch001.

Lehman, P. S. (1979). Seed and leaf gall nematodes of the genus *Anguina* occurring in North America. *Nematol. Circ.* 55, 1-2.

Leiers, B., Kampkötter, A., Grevelding, C. G., Link, C. D., Johnson, T. E., Dührsen, K. H. (2003). A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med.* 34(11), 1405-1415. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00102-3.

Li, S., Ku, C. Y., Farmer, A. A., Cong, Y. S., Chen, C. F., Lee, W. H. (1998). Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. *J Biol Chem.* 273(11), 6183-6189. doi: 10.1074/jbc.273.11.6183.

Li, S., Zhu, S., Jia, Q., Yuan, D., Ren, C., Li, K., Liu, S., Cui, Y., Zhao, H., Cao, Y., Fang, G., Li, D., Zhao, X., Zhang, J., Yue, Q., Fan, Y., Yu, X., Feng, Q., Zhan, S. (2018). The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. *Nat Commun.* 9, 1008. doi: 10.1038/s41467-018-03281-1.

Lightfoot, D. A., Mungur, R., Ameziane, R., Nolte, S., Long, L., Bernhard, K., Colter, A., Jones, K., Iqbal, M. J., Varsa, E., Young, B. (2007). Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E. coli*. *Euphytica.* 156, 103-116. doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9357-y>

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet.* 28(2), 139-145. doi: 10.1038/88850.

Lindblom, T. H., Dodd, A. K. (2006). Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* 305, 720-730. doi: 10.1002/jez.a.324

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 25, 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lo, J. Y., Spatola, B. N., Curran, S. P. (2017). WDR23 regulates NRF2 independently of KEAP1. *PLoS Genet.* 13(4), e1006762. doi: 10.1371/journal.pgen.1006762.

Loew, O. (1900). A New Enzyme of General Occurrence in Organisms. *Science.* 11(279), 701-702. doi: 10.1126/science.11.279.701.

Lu, W. D., Atkins, W. M. (2004). A novel antioxidant role for ligandin behavior of glutathione S-transferases: attenuation of the photodynamic effects of hypericin. *Biochemistry.* 43, 12761-12769. doi: 10.1021/bi049217m.

Macnicol, R. D., Beckett, P. H. T. (1985). Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil.* 85, 107-129.

Maggenti, A. (1981). History of the Science. In *General Nematology.* pp. 1-8. Springer-Verlag, New York. doi: 10.1007/978-1-4612-5938-1

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., Jörnvall, H. (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 7202-7206. doi: 10.1073/pnas.82.21.7202.

Marahatta, S. P., Wang, K. H., Sipes, B. S., Hooks, C. R. R. (2010). Strip-tilled cover cropping for managing nematodes, soil mesoarthropods, and weeds in a bitter melon

agroecosystem. *J. Nematol.* 42(2), 111-119.

Marahatta. S. P., Wang. K. H., Sipes. B. S., Hooks. C. R. R. (2012). Effects of *Tagetes patula* on active and inactive stages of root-knot nematodes. *J Nematol.* 44(1), 26-30.

Margl, L., Tei, A., Gyurján, I., Wink, M. (2002). GLC and GLC-mS analysis of thiophene derivatives in plants and in *in vitro* cultures of *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*). *Z Naturforsch.* 57c, 63-71. doi: 10.1515/znc-2002-1-211.

Matheson, I. B. C., Lee, J. (1978). Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 29, 879-881.

Maulidia, V., Soesanto, L., Syamsuddin., Khairan, K., Hamaguchi, T., Hasegawa, K., Sriwati, R. (2020). Secondary metabolites produced by endophytic bacteria against the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne* sp.). *Biodiversitas.* 21(11), 5270-5275. doi: 10.13057/biodiv/d211130

McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244(22), 6049-6055.

Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzen-hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Ver-eines in Brünn.* 4, 3-47.

Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., Ketterer, B. (1991).

Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J.* 274, 409-414. doi: 10.1042/bj2740409.

Meyer, D. J., Thomas, M. (1995). Characterization of rat spleen prostaglandin H D-isomerase as a sigma-class GSH transferase. *Biochem J.* 311, 739-742. doi: 10.1042/bj3110739.

Michaelis, L., Hill, E. S. (1933). THE VILOGEN INDICATORS. *J Gen Physiol.* 16, 859-873. doi: 10.1085/jgp.16.6.859.

Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M., Antalík, M. (2002). Malate dehydrogenases-structure and function. *Gen Physiol Biophys.* 21, 257-265.

Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., López, V., Langa, E., Ferreira, I. C. F. R., Gómez-Rincón, C. (2018). Edible Flowers of *Tagetes erecta* L. as Functional Ingredients: Phenolic Composition, Antioxidant and Protective Effects on *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients.* 10 (12), 2002. doi: 10.3390/nu10122002.

Moreno-Arriola, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Carmona-Aparicio, L., Ortega-Cuellar, D. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A useful model for studying metabolic disorders in which oxidative stress is a contributing factor. *Oxid Med Cell Longev.* 705253. doi: 10.1155/2014/705253.

Mouse Genome Sequencing Consortium. (2002). Initial sequencing and comparative

analysis of the mouse genome. *Nature*. 420, 520-562. doi: 10.1038/nature01262.

Mpumi, N., Mtei, K., Machunda, R., Ndakidemi, P. A. (2016). The toxicity, persistence and mode of actions of selected botanical pesticides in Africa against insect pests in common beans, *P. vulgaris*: a review. *American Journal of Plant Sciences*. 07, 138-151. doi: 10.4236/ajps.2016.71015

Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C. (2003). Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 424, 277-283. doi: 10.1038/nature01789.

Nahak, G., Sahu, R. K. (2017). Bio-controlling Effect of Leaf Extract of *Tagetes patula* L. (Marigold) on Growth Parameters and Diseases of Tomato. *Pak J Biol Sci*. 20, 12-19. doi: 10.3923/pjbs.2017.12.19.

Naithani, R., Mehta, R. G., Shukla, D., Chandrasekera, S. N., Moriarty, R. M. (2010). Antiviral Activity of Phytochemicals: A Current Perspective. In *Dietary Components and Immune Function* (ed. Watson, R. R., Zibadi, S., Preedy, V. R.). pp. 421-468. Springer Science+Business Media, LLC. doi: 10.1007/978-1-60761-061-8\_24

中川良三. (1989). 墓標なき墓場—西ニューギニアを訪ねて. *安全工学*. 28(1). 53-56. doi: [https://doi.org/10.18943/safety.28.1\\_53](https://doi.org/10.18943/safety.28.1_53)

中島稔. (1974). 農薬の将来. *化学と生物*. 12(10), 690-694. doi:

<https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.12.690>

Nature Publishing Group. (1948). Nobel Prize for Medicine: Dr. Paul Müller. *Nature*. 162, 727. doi: <https://doi.org/10.1038/162727a0>

中園和年. (1989). 土壤線虫の発生生態と有機物施用の効果. *肥料科学*. 12, 67-93.

Ney, P. A., Andrews, N. C., Jane, S. M., Safer, B., Purucker, M. E., Weremowicz, S., Morton, C. C., Goff, S. C., Orkin, S. H., Nienhuis, A. W. (1993). Purification of the Human NF-E2 Complex: cDNA Cloning of the Hematopoietic Cell-Specific Subunit and Evidence for an Associated Partner. *Mol Cell Biol*. 13(9), 5604-5612. doi: 10.1128/mcb.13.9.5604.

Nguyen, C. Q., Hall, D. H., Yang, Y., Fitch, D. H. A. (1999). Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail tip. *Dev. Biol.* 207, 86-106. doi: 10.1006/dbio.1998.9173.

Nguyen, T., Sherrett, P. J., Huang, H.-C., Yang, C. S., Pickett, C. B. (2003a). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* 278, 4536-4541. doi: 10.1074/jbc.M207293200

Nguyen, T., Sherratt P. J., Pickett, C. B. (2003b). Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated by the Antioxidant Response Element. *Annu. Rev. Pharmacol.*

*Toxicol.* 43, 233-260. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229

Nigon, V. M., Félix, M. A. (2017). History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.181.1.

新津秀 . (1935). 蚊の驅除と除虫菊の話 . *家事と衛生*. 11(6), 21-25. doi: [https://doi.org/10.11468/seikatsueisei1925.11.6\\_21](https://doi.org/10.11468/seikatsueisei1925.11.6_21)

Nishimoto, R. (2019). Global trends in the crop protection industry. *J. Pestic. Sci.* 44(3), 141-147. doi: 10.1584/jpestics.D19-101

Nishiyama, H., Ngan, B. T., Nakagami, S., Ejima, C., Ishida, T., Sawa, S. (2015). Protocol for root-knot nematode culture by a hydroponic system and nematode inoculation to *Arabidopsis*. *Nematol. Res.* 45, 45-49. doi: 10.3725/jjn.45.45

Nivsarkar, M., Kumar, G. P., Laloraya, M., Laloraya, M. M. (1991). Superoxide dismutase in the anal gills of the mosquito larvae of *Aedes aegypti*: its inhibition by alpha-terthienyl. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 16, 249-255. doi: 10.1002/arch.940160404

Nivsarkar, M., Kumar, G. P., Laloraya, M., Laloraya, M. M. (1992). Generation of superoxide anion radical by alpha-terthienyl in the anal gills of mosquito larvae *Aedes aegypti*: a new aspect in alpha-terthienyl phototoxicity. *Arch Insect Biochem Physiol.* 19, 261-270. doi: 10.1002/arch.940190405.

Nivsarkar, M., Kumar, G. P., Laloraya, M. (1996). Metal Binding and Resultant Loss of Phototoxicity of Alpha-Terthienyl: Metal Detoxification Versus Alpha-Terthienyl Inactivation. *Bull Environ Contam Toxicol.* 56(2), 183-189. doi: 10.1007/s001289900028.

Nivsarkar, M., Cherian, B., Padh, H. (2001). Alpha-terthienyl: a plant-derived new generation insecticide. *Curr. Sci.* 81, 667-672.

Ntalli, N. G., Caboni, P. (2012). Botanical nematicides: a review. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9929-9940. doi: 10.1021/jf303107j

Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H., Ishii, N. (2001). Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet.* 10, 19, 2013-2023. doi: 10.1093/hmg/10.19.2013.

Ohbayashi, N., Kobayashi, N., Komada, H. (1983). Effect of  $\alpha$ -terthienyl, one of the nematicidal substances of marigold, on the behavior of three pathogenic Fusaria under UV-irradiated or dark condition [Japanese]. *神奈川園試研報.* 30, 85-88.

Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I., Spiegel, Y. (2000). New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Manag. Sci.* 56, 983-988. doi: 10.1002/1526-4998(200011)56:11<983::AID-PS233>3.0.CO;2-X

Oka, Y. (2020). From Old-Generation to Next-Generation Nematicides. *Agronomy*. 10, 1387. doi: 10.3390/agronomy10091387

岡本大二郎. (1953). 家傳殺虫散－農薬に関する－古文書の紹介－. *農薬ニュース*. 32, 6-7.

岡本大二郎. (1992). 虫獣除けの原風景. *社団法人日本植物防疫協会*. pp. 120-136, 179-205, 260-277.

Oliveira, R. P., Abate, J. P., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C. T., Blackwell, T. K. (2009). Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell*. 8, 524-541. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x.

大林延夫. (1977). マリーゴールドを利用した線虫の防除－その殺線虫成分と総合防除への利用－. *化学と生物*. 15(5), 297-299.

大田博樹. (2013). 日本の農薬産業技術史-農薬のルーツを探訪する-. *日本農薬学会誌*. 38(2), 161-166. doi: 10.1584/jpestics.W13-02

Opperman, C. H., Chang, S. (1990). Plant-parasitic nematode acetylcholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. *J Nematol*. 22(4), 481-488.

Paddock, S. W. (1999). Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques*. 27(5), 992-996, 998-1002, 1004. doi: 10.2144/99275ov01.

Park, S. K., Tedesco, P. M., Johnson, T. E. (2009). Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell.* 8, 258-269. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00473.x

Park, H. J., Kim, M. J., Rothenberger, C., Kumar, A., Sampson, E. M., Ding, D., Han, C., White, K., Boyd, K., Manohar, S., Kim, Y. H., Ticsa, M. S., Gomez, A. S., Caicedo, I., Bose, U., Linser, P. J., Miyakawa, T., Tanokura, M., Foster, T. C., Salvi, R., Someya, S. (2019). GSTA4 mediates reduction of cisplatin ototoxicity in female mice. *Nat Commun.* 10, 4150. doi: 10.1038/s41467-019-12073-0.

Pertea, M., Shumate, A., Pertea, G., Varabyou, A., Chang, Y. C., Madugundu A. K., Pandey, A., Salzberg, S. L. (2018). Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. *bioRxiv.* 1-21. doi: <https://doi.org/10.1101/332825>

Petriv, O. I., Rachubinski, R. A. (2004). Lack of peroxisomal catalase causes a progeric phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 279, 19996-20001. doi: 10.1074/jbc.M400207200.

Phillips McDougall. (2016). A Consultancy Study for CropLife International, CropLife America and the European Crop Protection Association, March 2016. *R&D Study.* pp. 1-41.

Phillips McDougall. (2018). *Evolution of the crop protection industry since 1960*, November 2018. pp. 1-18.

Pingali, P. L. (2012). Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(31), 12302-12308. doi: 10.1073/pnas.0912953109.

Ploeg, A. T. (1999). Greenhouse Studies on the Effect of Marigolds (*Tagetes* spp.) on Four *Meloidogyne* Species. *J Nematol*. 31(1), 62-69.

Ploeg, A. T., Maris, P. C. (1999). Effect of Temperature on Suppression of *Meloidogyne incognita* by *Tagetes* Cultivars. *J Nematol*. 31(4S), 709-714.

Ploeg, A. T. (2002). Effect of selected marigold varieties on root-knot nematodes and tomato and melon yields. *Plant Dis*. 86, 505-508.

Pohl, F., Teixeira-Castro, A., Costa, M. D., Lindsay, V., Fiúza-Fernandes, J., Goua, M., Bermano, G., Russell, W., Maciel, P., Lin, P. K. T. (2019). GST-4-Dependent Suppression of Neurodegeneration in *C. elegans* Models of Parkinson's and Machado-Joseph Disease by Rapeseed Pomace Extract Supplementation. *Front Neurosci*. 13, 1091. doi: 10.3389/fnins.2019.01091.

Poinar Jr, G. O., Acra, A., Acra, F. (1994). Earliest fossil nematode (Mermithidae) in cretaceous Lebanese amber. *Fundam. appl. Nematol*. 17(5), 475-477.

Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *J. Vis. Exp.* 64, e4019. doi: 10.3791/4019

Quesnot, N., Bucher, S., Fromenty, B., Robin, M. A. (2014). Modulation of metabolizing enzymes by bisphenol A in human and animal models. *Chem Res Toxicol.* 27(9), 1463-1473. doi: 10.1021/tx500087p.

Rampone, W. M., McCullough, J. L., Weinstein, G. D., Towers, G. H. N., Berns, M. W., Abeyssekera, B. (1986). Characterization of Cutaneous Phototoxicity Induced by Topical Alpha-Terthienyl and Ultraviolet A Radiation. *J Invest Dermatol.* 87(3), 354-357. doi: 10.1111/1523-1747.ep12524490.

Romagnoli, C., Mares, D., Bruni, A. (1998). The photodynamic effect of 5-(4-hydroxy-1-butinyl)-2,2'-bithienyl on dermatophytes. *Mycol. Res.* 102(12), 1519-1524.

Rottiers, V., Motola, D. L., Gerisch, B., Cummins, C. L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D. J., Antebi, A. (2006). Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Dev Cell.* 10, 473-482. doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.008.

Ruan, L., Zhang, J., Xin, X., Zhang, C., Ma, D., Chen, L., Zhao, B. (2015). Comparative analysis of potassium deficiency-responsive transcriptomes in low potassium susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep.* 5, 10090. doi: 10.1038/srep10090.

Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991). The Antioxidant Responsive Element. Activation by Oxidative Stress and Identification of the DNA Consensus Sequence Required for Functional Activity. *J Biol Chem.* 266(18), 11632-11639.

Saisugun, J., Adi, L. K., Gowthami, A. K., Sneha, P. K., Sasidhar, R. L. C., Suryanarayana, R. D., Nagaraju, B., Venkateswara, R. B. (2017). Extraction and biological evaluation of esterified lutein from marigold flower petals. *International Journal of Chemical Science.* 1(1), 14-22.

Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N. C. C., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., Sharifi-Rad, J. (2018). *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules.* 23(11), 2847. doi: 10.3390/molecules23112847

佐藤捨三郎 . (1905). 除蟲菊ニ就テ . 藥學雜誌 . 283, 766-788. doi: [https://doi.org/10.1248/yakushi1881.1905.283\\_766](https://doi.org/10.1248/yakushi1881.1905.283_766)

Sato, K., Yoshiga, T., Hasegawa, K. (2014). Activated and inactivated immune responses in *Caenorhabditis elegans* against *Photorhabdus luminescens* TT01. *SpringerPlus.* 3, 274. doi: 10.1186/2193-1801-3-274

Sato, K., Yoshiga, T., Hasegawa, K. (2016). Involvement of vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis pathways in the insecticidal activity of *Photorhabdus luminescens*. *Appl Environ*

*Microbiol.* 82 (12), 3546-3553. doi: 10.1128/AEM.00522-16.

Sato, K., Kadota, Y., Gan, P., Bino, T., Uehara, T., Yamaguchi, K., Ichihashi, Y., Maki, N., Iwahori, H., Suzuki, T., Shigenobu, S., Shirasu, K. (2018). High-quality genome sequence of the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* genotype A2-O. *Genome Announc.* 6(26), e00519-18. doi: 10.1128/genomeA.00519-18

Sato, K., Kadota, Y., Shirasu, K. (2019). Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. *Front. Plant Sci.* 10, 1165. doi: 10.3389/fpls.2019.01165.

Saunders, K., Bedford, I. D., Yahara, T., Stanley, J. (2003). Aetiology: The earliest recorded plant virus disease. *Nature.* 422, 831. doi: 10.1038/422831a.

Schaar, C. E., Dues, D. J., Spielbauer, K. K., Machiela, E., Cooper, J. F., Senchuk, M., Hekimi, S., Van Raamsdonk, J. M. (2015). Mitochondrial and Cytoplasmic ROS Have Opposing Effects on Lifespan. *PLoS Genet.* 11(2), e1004972. doi: 10.1371/journal.pgen.1004972

Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci.* 36(1), 30-38. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.007.

Shaham, S. (2006). Methods in Cell Biology, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.49.1

Shemer, G., Podbilewicz, B. (2000). Fusomorphogenesis: cell fusion in organ formation. *Dev. Dyn.* 218, 30-51. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(200005)218:1<30::AID-DVDY4>3.0.CO;2-W.

Singh, S., Singh, B., Singh, A. P. (2015). Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. *Procedia Environmental Sciences.* 29, 215-216. doi: 10.1016/j.proenv.2015.07.270

Singson, A. (2001). Every sperm is sacred: fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 230(2), 101-109. doi: 10.1006/dbio.2000.0118.

Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol.* 3, 229-235.

Snir, A., Nadel, D., Groman-Yaroslavski, I., Melamed, Y., Sternberg, M., Bar-Yosef, O., Weiss, E. (2015). *PLoS One.* 10(7), e0131422. doi: 10.1371/journal.pone.0131422

Soriano, I. R., Asenstorfer, R. E., Schmidt, O., Riley, I. T. (2004). Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathology.* 94, 1207-1214. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1207.

Staab, T. A., Griffen, T. C., Corcoran, C., Evgrafov, O., Knowles, J. A., Sieburth, D. (2013). The Conserved SKN-1/Nrf2 Stress Response Pathway Regulates Synaptic Function in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 9(3), e1003354. doi:

10.1371/journal.pgen.1003354.

Starr, J. L., Koenning, S. R., Eirkpatrick, T. L., Robinson, A. F., Roberts, P. A., Nichols, R. L. (2007). The future of nematode management in cotton. *J Nematol.* 39(4), 283-294.

Steiner, G. (1941). Nematodes parasitic on and associated with roots of marigolds (*Tagetes* hybrids). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 54, 31-34.

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. doi: 10.1895/wormbook.1.101.1

Sturtevant, A. H. (2001). A History of Genetics. *CSHL Press.* 1-174.

Sulston, J. E., Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56(1), 110-156. doi: 10.1016/0012-1606(77)90158-0.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100(1), 64-119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4.

Suzuki, N., Inokuma, K., Yasuda, K., Ishii, N. (1996). Cloning, sequencing and mapping of a manganese superoxide dismutase gene of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *DNA Res.* 3(3), 171-174. doi: 10.1093/dnares/3.3.171.

Suzuki, T., Muramatsu, A., Saito, R., Iso, T., Shibata, T., Kuwata, K., Kawaguchi, S., Iwawaki, T., Adachi, S., Suda, H., Morita, M., Uchida, K., Baird, L., Yamamoto, M. (2019). Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1. *Cell Rep.* 28(3), 746-758.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.047.

Sykiotis, G. P., Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal.* 3(112), re3. doi: 10.1126/scisignal.3112re3.

Takasugi, M., Yachida, Y., Anetai, M., Masamune, T., Kegasawa, K. (1975).

Identification of asparagusic acid as a nematicide occurring naturally in the roots of asparagus. *Chemistry Letters.* 4, 43-44.

玉利喜造. (1884). 小麥の害蟲豫防法質問並答. *大日本農會報告.* 37, 21-23. doi: 10.11501/2327184

Tang, L., Choe, K. P. (2015). Characterization of *skn-1/wdr-23* phenotypes in *Caenorhabditis elegans*; pleiotrophy, aging, glutathione, and interactions with other longevity pathways. *Mech. Ageing Dev.* 149, 88-98. doi: 10.1016/j.mad.2015.06.001

Taub, J., Lau, J. F., Ma, C., Hahn, J. H., Hoque, R., Rothblatt, J., Chalfie, M. (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature.* 399, 162-166. doi: 10.1038/20208.

Tawe, W. N., Eschbach, M. L., Walter, R. D., Henkle-Dührsen, K. (1998). Identification

of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display.

*Nucleic Acids Res.* 26, 1621-1627. doi: 10.1093/nar/26.7.1621

Terblanche, J., de Villiers, D. A. (1998). The suppression of *Ralstonia solanacearum* by marigolds. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Springer, Heidelberg. 325-331. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03592-4>

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796-815. doi: 10.1038/35048692.

Timmons, L., Court, D. L., Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263, 103-112. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00579-5.

Toida, Y., Keereewan, S., Puttirut, N. (1991). Assessment and Prevention of Mungbean Damage Caused by the Root-knot Nematode, *Meloidogyne javanica* in Thailand. *Japanese Journal of Nematology*. 21, 6-10. doi: <https://doi.org/10.14855/jjn1972.21.6>

富田一郎. (1964). マリーゴールドの殺線虫成分の化学構造と作用機構 [Japanese]. *植物防疫*. 18(9), 345-349.

Togo, S. H., Maebuchi, M., Yokota, S., Bun-Ya, M., Kawahara, A., Kamiryo, T. (2000). Immunological detection of alkaline-diaminobenzidine-negative peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans* purification and unique pH optima of peroxisomal

catalase. *Eur J Biochem.* 267(5), 1307-1312. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01091.x.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282, 2012-2018. doi: 10.1126/science.282.5396.2012.

Topp, E., Millar, S., Bork, H., Welsh, M. (1998). Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biol Fertil Soils.* 27, 149-154. doi: 10.1007/s003740050413

Tullet, J. M. A., Hertweck, M., An, J. H., Baker, J., Hwang, J. Y., Liu, S., Oliveira, R. P., Baumeister, R., Blackwell, T. K. (2008). Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell.* 132, 1025-1038. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.030.

Tyler, J. (1938). Proceedings of the root-knot nematode conference. *Plant Disease Reporter Suppl.* 109, 133-151.

Umetsu, N., Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *J. Pestic. Sci.* 45(2), 54-74. doi: 10.1584/jpestics.D20-201.

van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., de Goede, R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S., Bardgett, R. D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J. E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S. R., Creamer, R., Mauro da Cunha Castro, J., Dam, M., Djigal, D., Escuer, M., Griffiths,

B. S., Gutierrez, C., Hohberg, K., Kalinkina, D., Kardol, P., Kergunteuil, A., Korthals, G., Krashevskaya, V., Kudrin, A. A., Li, Q., Liang, W., Magilton, M., Marais, M., Martín, J. A. R., Matveeva, E., Mayad, E. H., Mulder, C., Mullin, P., Neilson, R., Nguyen, T. A. D., Nielsen, U. N., Okada, H., Rius, J. E. P., Pan, K., Peneva, V., Pellissier, L., Carlos Pereira da Silva, J., Pitteloud, C., Powers, T. O., Powers, K., Quist, C. W., Rasmann, S., Moreno, S. S., Scheu, S., Setälä, H., Sushchuk, A., Tiunov, A. V., Trap, J., van der Putten, W., Vestergaard, M., Villenave, C., Waeyenbergh, L., Wall, D. H., Wilschut, R., Wright, D. G., Yang, J., Crowther, T. W. (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*. 572, 194-198. doi: 10.1038/s41586-019-1418-6.

Vanfleteren, J. R., De Vreese, A. (1995). The gerontogenes *age-1* and *daf-2* determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 9, 1355-1361. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557026

Vicente, C. S. L., Ikuyo, Y., Shinya, R., Mota, M., Hasegawa, K. (2015). Catalases induction in high virulence pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* under hydrogen peroxide-induced stress. *PLoS ONE*. 10, e0123839. doi: 10.1371/journal.pone.0123839

Wada, S., Toyota, K., Takada, A. (2011). Effect of the nematicide imicyafos on soil nematode community structure and damage to radish by *Pratylenchus penetrans*. *J Nematol.* 43(1), 1-6.

Wang, D. Y., Kumar, S., Hedges, S. B. (1999). Divergence time estimates for the early

history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc Biol Sci.* 266, 163-171. doi: 10.1098/rspb.1999.0617.

Wang, K. H., Hooks, C. R., Ploeg, A. (2007). Protecting Crops from Nematode Pests: Using Marigold as an Alternative to Chemical Nematicides. *Plant Disease Publication*. PD-35, 1-6. Manoa, Hawaii, University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources.

Webber, B. L., Raghu, S., Edwards, O. R. (2015). Opinion: Is CRISPR-based gene drive a biocontrol silver bullet or global conservation threat? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(34), 10565-10567. doi: 10.1073/pnas.1514258112.

Weidenhamer, J. D., Montgomery, T. M., Cipollini, D. F., Weston, P. A., Mohny, B. K. (2019). Plant density and rhizosphere chemistry: does marigold root exudate composition respond to intra-and interspecific competition? *J Chem Ecol.* 45, 525-533. doi: 10.1007/s10886-019-01073-5.

Wesenbeeck, I. J. V., Knowles, S. (2019). Groundwater monitoring for 1,3-dichloropropene in high fumigant use areas of North America and Europe. *Pest Manag Sci.* 75(8), 2278-2282. doi: 10.1002/ps.5398.

Wheeler, J. M., Thomas, J. H. (2006). Identification of a Novel Gene Family Involved in Osmotic Stress Response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 174, 1327-1336. doi: 10.1534/genetics.106.059089.

Whittington, D. P., Zehr, E. I. (1992). Populations of *Criconemella xenoplax* on peach interplanted with certain herbaceous plants. *J Nematol.* 24(4S), 688-692.

Wieringa, J. H., Strating, J., Wynberg, H., Adam, W. (1972). Adamantylideneadamantane oxide, A stable 1,2-dioxetane. *Tetrahedron Lett.* 2, 169-172.

Wilson, C., Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol. Econ.* 39, 449-462. doi: 10.1016/S0921-8009(01)00238-5

Wolkow, C. A., Hall, D. H. (2016). Handbook of *C. elegans* Dauer Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/dauer/dauerhomepage.htm>

Wu, C. W., Wang, Y., Choe, K. P. (2017). F-Box Protein XREP-4 Is a New Regulator of the Oxidative Stress Response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 206, 859-871. doi: 10.1534/genetics.117.200592.

Wyss, U., Grundler, F. M. W. (1992). Feeding behaviour of sedentary plant parasitic nematodes. *Neth. J. Pl. Path.* 98, Supplement 2, 165-173.

Yapijakis, C. (2009). Hippocrates of Kos, the father of clinical medicine, and Asclepiades of Bithynia, the father of molecular medicine. Review. *In Vivo.* 23, 507-514.

安田篤.(1894).「つるれいし」ニ寄生スル線虫ニ就テ. *動物學雜誌*. 6(74), 448-451.

Yates, S. R., Ashworth, D. J. (2018). Simulating emissions of 1,3-dichloropropene after soil fumigation underfield conditions. *Sci Total Environ.* 621, 444-452. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.278.

Yochem, J., Gu, T., Han, M. (1998). A new marker for mosaic analysis in *Caenorhabditis elegans* indicates a fusion between hyp6 and hyp7, two major components of the hypodermis. *Genetics.* 149, 1323-1334.

Zechmeister, L., Sease, J. W. (1947). A blue-fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigolds. *J. Am. chem. Soc.* 69, 273-275. doi: 10.1021/ja01194a032

Zeng, Q., Huang, H., Zhu, J., Fang, Z., Sun, Q., Bao, S. (2013). A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *Antonie Leeuwenhoek.* 103, 1107-1111. doi: 10.1007/s10482-013-9890-8

Zhang, D. D., Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137-8151. doi: 10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003

Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa.* 3148, 7-12. doi:

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.3>

Zhang, J., Ahmad, S., Wang, L. Y., Han, Q., Zhang, J. C., Luo, Y. P. (2019). Cell death induced by  $\alpha$ -terthienyl via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the midgut of *Aedes aegypti* larvae. *Free Radic Biol Med.* 137, 87-98. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.021.

Zhao, B., Huo, J., Liu, N., Zhang, J., Dong, J. (2018). Transketolase Is Identified as a Target of Herbicidal Substance  $\alpha$ -Terthienyl by Proteomics. *Toxins.* 10, 41. doi: 10.3390/toxins10010041.

Zheng, W., Yates, S. R., Papiernik, S. K., Guo, M., Gan, J. (2006). Dechlorination of chloropicrin and 1,3-dichloropropene by hydrogen sulfide species: redox and nucleophilic substitution reactions. *J. Agric. Food Chem.* 54(6), 2280-2287. doi: 10.1021/jf0527100.