

報 文

自活性土壌線虫の分離と培養および遺伝学の試み

江村忠秀¹⁾, 大野美紀¹⁾, 檜尾啓介¹⁾, 三輪さつき²⁾, 長谷川浩一^{2,3)}, 三輪錠司^{1,2)}¹⁾ 中部大学応用生物学部, ²⁾ 中部大学生物機能開発研究所, ³⁾ 京都大学大学院農学研究科

要 旨

中部大学キャンパス内の土壌からベールマン法を用いて自活性土壌線虫を分離し、大腸菌を餌にして培養をおこなった。ライン化して野生型YS-22211を確立した(以下YSと略す)。雌雄同体と雄の2つの性があり、ふだんは雌雄同体のみで増殖するが、まれに雄があらわれた。雄と交配すると雌雄同体から産まれる次世代は、およそ1:1の性比で雌雄同体と雄が出現した。産卵数、成長、および寿命の計測をおこなったところ、同じ自活性土壌線虫で生物学のモデルである *Caenorhabditis elegans* と比べて体のサイズは小さく、発生速度も遅かった。産卵数も少なくばらつきが大きかったものの、平均寿命は長かった。つぎに、突然変異誘発剤による変異体の分離を試みたところ、体のサイズが太短い (dumpy) 変異体を2種類分離した。ひとつは、サイズが太短いものの消化器系および生殖系は野生型とかわらず、小さな線虫体内に各器官が圧縮された状態であった。もうひとつのものは、消化器系および生殖系など全てが短くなっていた。両者は異なる遺伝子の変異によって生じた表現型であると示唆された。

1. はじめに

線形動物門 (Phylum Nematoda) は、やく30の動物門からなる真正後生動物亜界 (Eumetazoa) のうち、偽体腔類 (Pseudocoelomata) に属する動物門の一つである (白山, 2000)。この線虫と呼ばれている生物はすべて、前後・左右・背腹の3軸からなる筒状の蛇様形態をし、背腹方向に蛇行しながら動くといった、お互いに極めて類似した形態をしているものの、動物寄生性 (animal parasitic) のものもいれば、植物寄生性 (plant parasitic) のもの、さらには自由生活性 (自活性: free living) のものもあり、広範囲にわたる食性、様々な生活性をもつ。たとえば、ヒトの小腸に寄生する回虫 *Ascaris lumbricoides* や、ハマダラ蚊 *Amopheles gambiae* によって伝播され、ヒトのリンパ管に寄生するフィラリア *Brugia malayi* などは、アフリカなどの発展途上国を中心に、現在でも数百万人規模の感染、発病が起こっており医学上重要な課題となっているばかりではなく、当該国の経済的発展を妨げる大きな要因ともなっている。また、ネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita*、ネグサレセンチュウ *Pratylenchus penetrans*、マツノザイセ

ンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* といった、農林作物病害をおこす植物寄生性線虫も重要な病害虫として世界中で問題となっている (Nematode Net, <http://nematode.net/>)。

一方、自由生活性線虫は、土壌有機物を食べたり、細菌もしくは糸状菌を食べたりすることで食物連鎖の底辺を担う、生態学上重要な働きを担ってはいるものの上述した動植物寄生性線虫と比べても地味な存在である。この自由生活性線虫の仲間のうち、現在の生物学においてひととき重要なモデル生物となっているものがある。*Caenorhabditis elegans* (セノラブディテス・エレガンス: 以下、エレガンスと略す) である。Sydney Brenner が発生および行動のモデル生物として遺伝学を開発して以来 (Brenner, 1974)、理学などの基礎研究分野から医学・薬学・農学などの応用研究分野まで広く利用されている。理由としては、エレガンスが土壌中をすみかとし、(1) 細菌を食して自力で生活している線虫であり世界中どこにでもみられる最も普遍的な土壌線虫であること; (2) また、虫体は5倍から50倍程度の実体顕微鏡下で容易に観察することができること; (3) 実験に必要

でない場合は -196°C の液体窒素で生きたまま永久凍結保存できるので, 管理維持費や時間がいちじるしく少なくすむこと; (4) エレガンスは自家受精して繁殖するので, 親の生殖細胞に生じた変異は劣性変異でも交配などの人為的操作を加えずにF2世代においてホモ接合体として分離し, 変異形質が表現される。このため, 自然にホモ変異体が得られ, ホモ変異体から同質の遺伝子型をもった個体をたやすく大量に得ることもできること; (5) 受精から成体に至るまでの細胞系譜および発生過程での個々の細胞の分裂, 行動が完全に明らかにされていることなど, 遺伝学的, 形態学的観察や考察を行う上で多くの利点を備えていることが挙げられる(三輪, 1986a, b)。

今回, 中部大学構内の土壌より新規な自活性土壌線虫を分離し, その産卵数 (brood size), 成長速度 (growth rate) および寿命 (life span) を計測した。さらに, 突然変異誘発剤により変異体を作成し, 遺伝学の開発を試みた。本報告は, 中部大応用生物学部三輪研究室でおこなわれた2004年度卒業論文(江村, 大野, 樫尾による, 名前順)の一部を採用し, 加筆・修正したものである。

2. 材料と方法

2-1. 自活性土壌線虫YS-22211

2004年3月, 中部大学三浦メモリアルホール

(1)

(2)

(3)

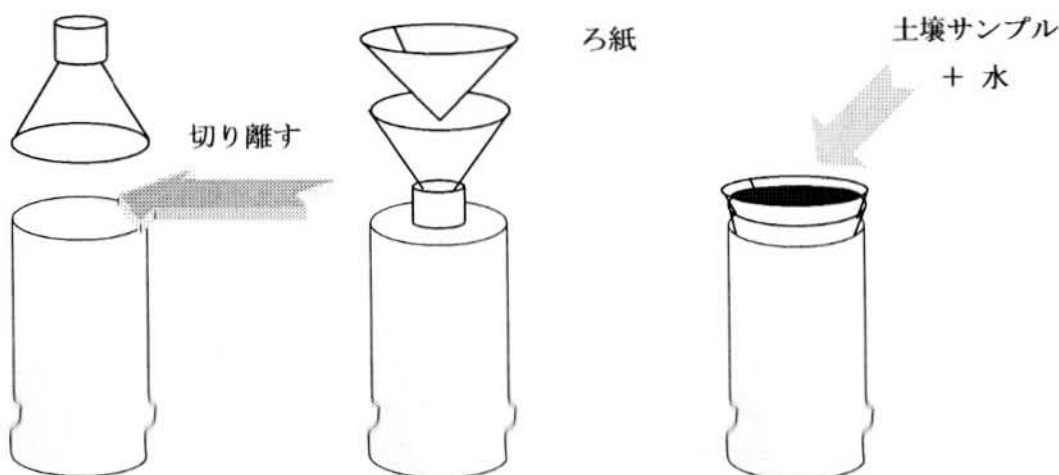


図1 簡易バールマン法

(1) 500 ml ペットボトルの頭部をカッターナイフで切り離す。(2) それを逆さまにすることで漏斗とし, ろ紙をセットする。(3) ろ紙の上に土壌サンプルをいれ, 水で十分湿らせたのちにサランラップで覆ってから一晩室温で放置する。ペットボトルを大きくすることで, 大量の土壌を扱うことも可能である。

周辺の土壌から簡易バールマン法を用いて自活性土壌線虫を分離した。キャップつき500mlペットボトルの頭部をカッターナイフで分離し, それを逆さまにすることで“漏斗”とした, ろ紙を漏斗にセットし, 土壌をいれて十分水で湿らせたのち, 水分の蒸発を防ぐためにサランラップで覆ってから一晩室温で放置した。翌日, 土壌とともにろ紙を取り除き, 漏斗の底に沈んだ線虫をパスツールピペットで回収した(図1)。回収した線虫数種を, エレガンスの培養法に従って大腸菌*Escherichia coli* OP50 を餌にNGM (nematode growth medium) 培地(長谷川&三輪, 2004a)で培養した。NGM培地で正常に増殖した線虫のうちのひとつをYS-2とした。さらに, 増殖したYS-2から1頭ずつ10頭を選び別々に産卵させ, 産卵数の一番多かったものを選ぶという手順を4回繰り返してライン化した。最終的に得られたものをYS-22211 (以下, YSと略す)とし, これを野生標準型 (以下, 野生体) として実験に供した。以下の実験はすべて 20°C にておこなった。

2-2. 産卵数, 成長, 寿命の測定

YSの産卵数, 成長, および寿命は, Hasegawa et al. (2004) の方法に準じておこなった。寿命に関しては, 通常のNGM培地以外に, DNA合成阻害剤であるFluorodeoxyuridine (FUDR) を培地に混合したものを作成し (FUDR培地), L1

幼虫もしくはL2幼虫の時点からFUdR培地にて培養することで次世代が生まれない状態にして計測した。

2-3. 突然変異体の分離

突然変異誘発剤Ethylmethane sulfonate (EMS) を用いた変異体作製方法によって(長谷川 & 三輪, 2004a), 形態に異常をきたした突然変異体を分離した。変異体分離後, 目的遺伝子以外のゲノム上に生じた変異を除去するために, 野生体の雄と2回バッククロスをおこなって回収した変異体をライン化し実験をおこなっ

た。変異の遺伝特性を調べるため, 野生体と突然変異体と交配させ, F1およびF2個体における表現型の出現比を算出し, χ^2 検定により統計処理をおこなった。

3. 結果と考察

3-1. YS線虫の形態的特徴

エレガンスの培養方法であるNGM培地と大腸菌*E. coli* OP50で, YSを培養することができた。土壌中で生育する自活性線虫は, 口腔部や食道の形状から細菌食性 (bacteriovorous), 糸状菌食性 (fungivorous), 捕食性 (predacious),

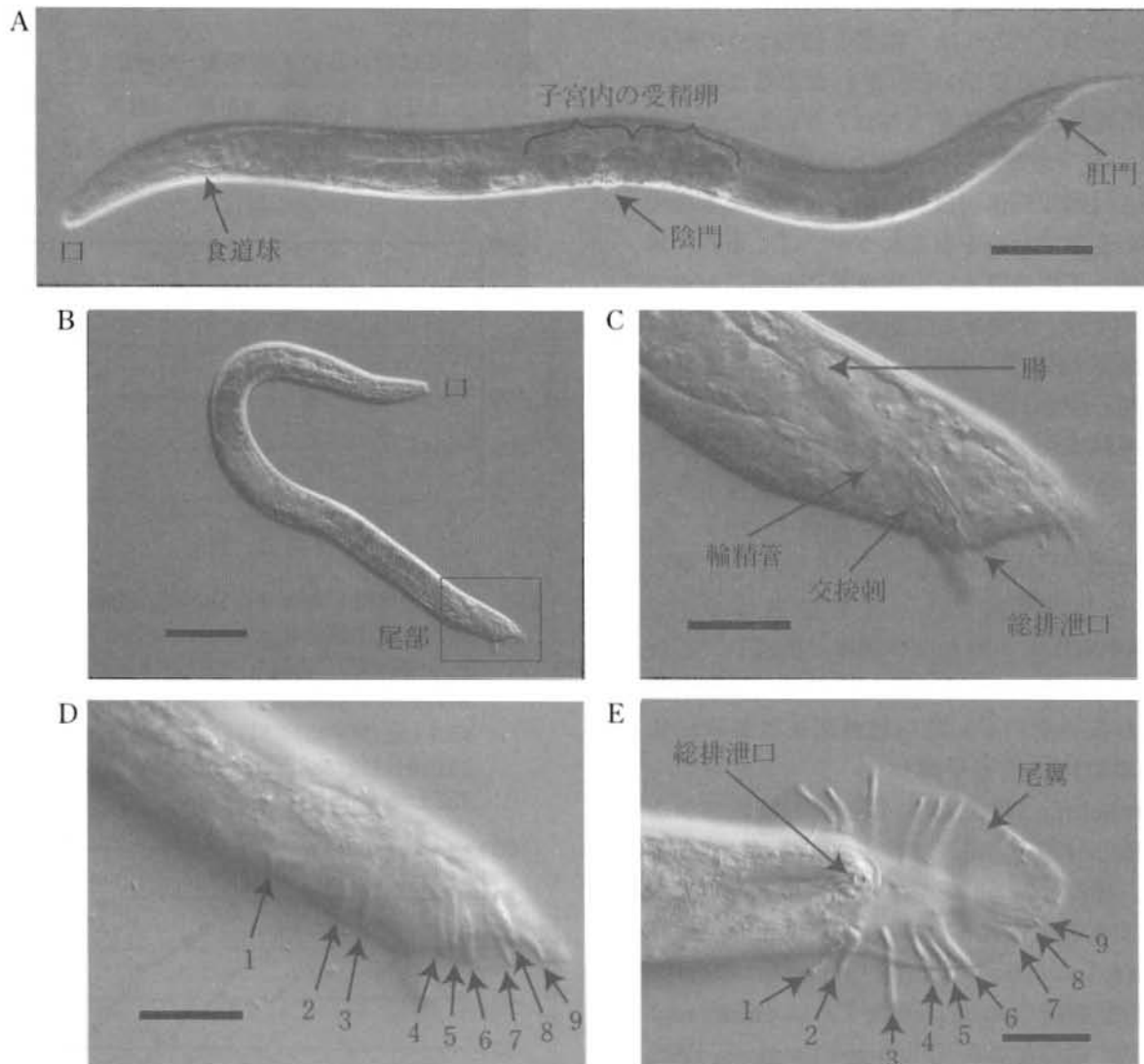


図2 分離した自活性土壌線虫YSおよびエレガンスN2株のノマルスキー微分干渉顕微鏡像。A, YS雌雄同体成虫の全体像。陰門を境に, U字型の生殖細胞が前後に展開する。子宮は小さく, 受精卵はふつう前後2つずつしか保持されず, 前核形成が始まる前に産卵される。B, YS雄成虫の全体像。雌雄同体成虫よりもひとまわり小さく, 生殖器官は総排泄口から頭に向かって1本伸びている。尾部には雄に特徴的な, 生殖器官をもつ。C, YS雄成虫の尾部で, 図Bの枠部分を拡大。D, 図Cの焦点を線虫体左側表面にずらすことで, 9本の尾部感覚突起の配置が観察できる。E, 腹側からみたエレガンス雄成虫の尾部。YS同様に9対の尾部感覚突起と尾翼が見られる。スケールバー, A, Bは100 μ m, C, D, Eは20 μ m。

および雑食性 (omnivorous) にわけることができる (石橋, 2003). YSのばあい, 口腔部はエレガンスと同じ筒状で, 容易に細菌食性であることがわかった. YSの雌雄同体個体は自前で精子および卵子をつくるので, 交尾をすることなく自家受精をおこなうことで二倍体の次世代が産みだされる. Aphelenchidaに属する菌食性線虫 *Aphelenchus avenae* は, 精子をつくらず雌のみで単為生殖をおこなう. この単為生殖線虫 *A. avenae* のばあい, 産卵直後の卵には前核がひとつしか出現しないまま個体発生がおこなわれるが, YSでは2つの前核が出現し, 融合を経たのち個体発生がはじまる (長谷川&三輪, 未発表データ). これは, 精子と卵の2つの配偶子融合 (つまり受精) と, それによる二倍体化がおこなわれ, 個体発生がおこなわれたことを意味する. また, 雌雄同体と雄の性が存在し, ふだんは雌雄同体が自前の精子と卵による自家受精のもとで増殖をおこなうが, ごくまれに雄が出現して雌雄同体と交尾をおこなうことができる (図2). 交尾をして雄からの精子を供給された雌雄同体は, およそ1:1の割合で雌雄同体と雄を産む. エレガンスにおいて雌雄同体は常染色体を5対, 性染色体を1対 (5AA+XX) 持つが, ごくまれに配偶子形成時に染色体不分離が生じ, 性染色体を持たない配偶子 (精子, もしくは卵子) が出現する. この配偶子と正常な配偶子との受精によって性染色体を1つ (5AA+XO) しか持たない個体が発生し, これが雄となる (Meyer, 1997). YSの染色体数の確認はしていないが, 性染色体構成は雌雄同体XX, 雄XOであると予測している.

Rhabditida (桿線虫目) は形態的特徴が少なく, 種の分類・同定には特別な知識と技術を要する. 種の分類・同定をする際には, 雄の生殖器官である尾翼あるいは交尾囊 (caudal alae, bursa もしくは fan) や交接刺 (spicule) の形状, 尾部感覚突起 (caudal papillae または sensory ray) の配列が指標となる (Fitch and Emmons, 1995; Sudhaus and Fitch, 2001). 尾部感覚突起には神経がとおっており, 交尾をするときに尾翼を広げて雌あるいは雌雄同体の陰門位置を走査する役割を果たす. 雌あるいは雌雄同体の陰門の位置を確認した雄は, 交接刺を雌の陰門に差し込んで精子を注入する (Liu and Sternberg, 1995). エ

レガンス同様にYS雄には9対の感覚突起があるが, 第1番目の感覚突起が他よりも離れたところに位置し, 尾翼も小さいことから (図2), *Caenorhabditis* 属ではないと考えられた.

3-2. 成長, 産卵数および寿命

20℃で餌が十分にある条件下で, YS雌雄同体の産卵数および成長速度を測定した. 同調培養後24時間たったときを1日目としたところ, 4日目に産卵が始まり7日目に産卵が終了した. このころから体長が短くなっていき, 死亡する個体も出てきた. 表1に産卵数, 図3に成長曲線, 図4に寿命曲線を示したが, 表1の1日目

表1 20℃におけるYSの産卵数 (N=10)

	1日目	2日目	3日目	4日目	計
産卵数	38±16.8	41±15.2	54±16.9	55±15.3	187±52.1

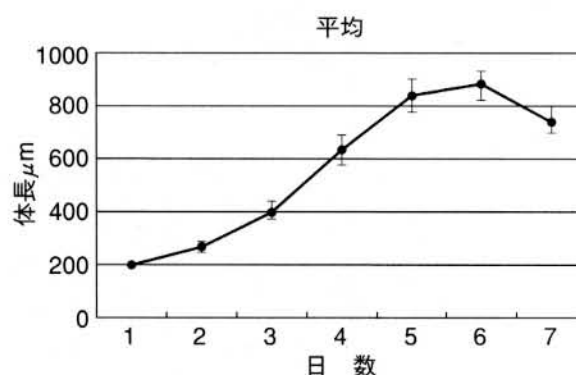


図3 20℃で培養したときのYSの成長曲線で, 平均体長と標準偏差を示した. 1日目, $193 \pm 14.3 \mu\text{m}$ (N=45); 2日目, $271 \pm 16.4 \mu\text{m}$ (N=45); 3日目, $407 \pm 34.3 \mu\text{m}$ (N=45); 4日目, $638 \pm 58.1 \mu\text{m}$ (N=45); 5日目, $850 \pm 62.5 \mu\text{m}$ (N=45); 6日目, $888 \pm 58.8 \mu\text{m}$ (N=45); 7日目, $752 \pm 50 \mu\text{m}$ (N=45).

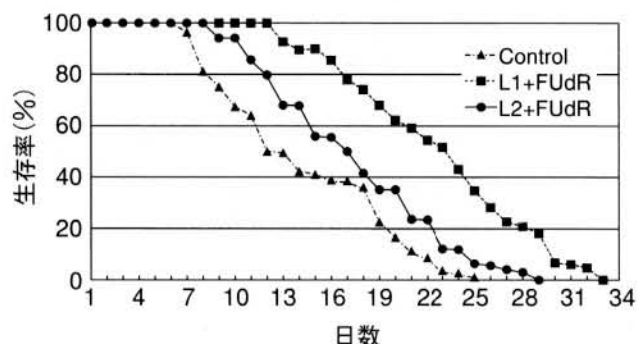


図4 20℃におけるYSの寿命曲線, 平均寿命および標準偏差はControl, 14.4 ± 5.5 (N=36); L1+FUdR, 22.9 ± 5.7 (N=77); L2+FUdR, 17.5 ± 5.4 (N=34).

および4日目は、図3と図4の4日目および7日目
に相当する。YS雌雄同体の産卵数は合計187±
52.1 (N=10) と少なく、個体間のばらつきもか
なりあった(変動係数, 27.9%)。雌雄同体個体
の生殖細胞は、例えばエレガンスの場合、発生
段階の途中でまず精子へと分化し、以後は卵母
細胞を作りつづける(長谷川&三輪, 2004b)。
したがって、雌雄同体個体が雄との交尾をする
ことなく産む卵の数は、自前の精子の数によっ
て制限されている。YSの場合も同じであると
考えられ、精子を使い果たしたあとは卵殻で覆
われていない未受精卵を産んでいるのを確認し
た。また、エレガンスには、同種でありながら
性質が異なる株がおおよそ30種存在する。そのほ
とんどの株はBristol株(通称N2株と呼称し、世
界共通標準株。本報でも以下、N2と略称する)
とほぼ同じ産卵数であるが、なかには今回計測
したYSの産卵数と同じくらいの少ないものも
あり、そのばらつきも大きい(Hodgkin and Doniach,
1995)。原因としてmobile gene, jumping gene
などといわれている可動性因子、トランスポ
ゾンのコピー数と移動性が考えられている。エレ
ガンスN2株のゲノム(おおよそ100Mb)に占める
トランスポゾンおよびその類似配列の割合は
12%であり(The *C. elegans* sequencing consor
tium, 1998)。移動性が調べられている
Tc1/mariner familyは7種類ある(Plasterk and
van Luenen, 1997)。Tc1/mariner familyのうち
のひとつであるTc1はN2のゲノム中に31コピ
ー確認されている。エレガンスの亜種である
Bergerac株ではコピー数がおおよそ300あり、変
異体の分離(transposon tagging法をもちいた
分離)に便利な株としてよく用いられている。
Tc1の構造は、両端に54bpのTIR (terminal
inverted repeat) をもち、ひとつのORFをもっ
た1610 bpの配列である。エキソン部分は、TIR
を認識してTc1を切り出す343アミノ酸からな
るtransposaseのみをコードしており、挿入部
位遺伝子プロモーターによって読み取られる
(Sijen and Plasterk, 2003)。N2株の生殖細胞で
はTc1の活動は抑制されているため、Tc1によ
る変異の期待は低い。YSの産卵数計測をおこ
なうときに、産卵数は正常ではあるものの孵化
率が低い、またはほとんど孵化しないラインが
出てくる場合がある(三輪さつき, 私信)。こ

れはトランスポゾンの移動による変異が原因
で、胚性致死になったのではないかと考えられ
る。今後、Tc1をプローブとしたゲノミックサ
ザンをおこなうことで、YSゲノム内における
コピー数の確認をおこなう必要がある。

エレガンスと比べて、20℃におけるYSの平
均産卵数は少なく成長速度は遅いものの、平均
寿命に関しては長い。産卵を抑制するための
FUdRをYSに処理することで、処理しなかった
YSと比べて平均寿命が飛躍的に伸びているこ
とを確認した(図4)。コントロールと比較する
と、L2からFUdR処理して培養した場合(以下
L2処理)の平均寿命は122%、L1から処理して
培養した場合(L1処理)は159%の伸びであっ
た。一般的に、1個体の寿命と産卵数にはトレ
ードオフの関係が成り立つと考えられている。
つまり産卵数を多くすれば次世代を多く残すこ
とができる反面、個体への負担が高くなって寿
命が短くなるが、産卵数を減らすことで負担が
減り、個体の寿命が長くなるという。しかし、
L1処理とL2処理と比較したばあい、ともに産
卵の阻害がおこなわれるものの、L1処理のほ
うがさらに131%も伸びていた。FUdRはDNA
複製阻害剤であるため、幼虫期の成長にも影響
があらわれる。L1処理のばあいは、成長速度
が遅くなり個体間でかなりの差が生じた。し
たがって、L1処理とL2処理の差は、産卵期ま
での成長が遅くなったことが原因であると考え
られる。このように、一生が短く個体をいちど
にたくさん処理することができることから、線
虫は生物の老化研究のモデルとして最適な材
料といえる。長寿遺伝子や寿命制御カスケード
などがエレガンスの強力な遺伝学によって発見
され(Johnson, 1990; Ren et al., 1996; Schackwitz
et al., 1996; Pierce et al., 2001)、それら発見さ
れた寿命に関わる遺伝子のオルソログが、酵母、
ショウジョウバエ、マウス、そしてヒトにも存
在することが証明されつつある(Longo and
Finch, 2003; Tatar et al., 2003)。エレガンスの研
究が発端となってヒトにいたるまで生物界に広
く保存されている寿命関連遺伝子の存在が明ら
かになり、エレガンスは寿命研究の強力なモデ
ル生物としての地位を不動のものとしている。
本実験で扱っているYSと、エレガンスとの比
較をおこなうことで、線虫間における生態と寿

命の関係を明らかにし, 進化学的な意味付けがなされることが期待できる。

3-3. 突然変異体Dpy

一般に突然変異誘発剤としてEMSが用いられ, 主にGCからATへの点変異を誘発するが, 低確率でそれ以外の点変異, 欠失変異も生じる。その他, DEB (diepoxybutane) またはTMP (trimethylpsoralen) とUVを用いて短い欠失 (0.1から5 kb) を生じさせることが可能なので, PCRを併用したKO (knockout) 個体の作製に用いられることもある。親 (以後, F0) 世代を変異剤で処理し, 第一 (F1) 世代で変異遺伝子をヘテロにもつ個体を得る。優性変異体を得るにはF1世代にあらわれる変異形質をスクリーニングする。劣性変異体を得るにはF1ヘテロ個体 (heterozygote) から自家受精により変異遺伝子をホモにもつF2個体homozygoteが4分の1の割合で産みだされるので, F2世代にあらわれる変異形質をスクリーニングする(三輪, 1986a)。Brennerが1974年のGeneticsに発表した論文では, EMSを用いてやく300の形態, 行動異常の変異体を分離し, そこからおよそ100の遺伝子

を決定し, そして6つの連鎖群へと分けている (Brenner, 1974)。形態異常の変異体のばあい, 野生体よりもサイズが小さいSma (small), 太短いDpy (dumpy), 長いLon (long), 行動異常のばあいはUnc (uncoordinated) として多数分離し, 相補テスト, 2点および3点交雑をおこなうことで連鎖群を決定し, 遺伝地図を作成する。そしてこれらの変異を遺伝マーカーとして, とれてきた新規変異遺伝子の染色体上のおおまかな位置を知ることが可能となる。表記方法として, 表現型の特徴をあらわす3字を用い, 表現型を示すばあいは頭文字だけ大文字 (Dpy), 変異遺伝子を表す場合はすべて小文字イタリック (*dpy*), その遺伝子がコードするタンパク質を示すばあいはすべて大文字 (DPY) にする。

EMS処理をして目的の変異表現型をもつ個体を得たときに, 表現型にはあらわれていないが目的の遺伝子以外にも変異が起こっている可能性があるため, 野生体の雄と何度か交配させ目的遺伝子以外は野生型遺伝子に整える必要がある。今回は2回繰り返しおこない, 形態異常の変異体Dpyを2株作製し, Dpy-eおよびDpy-kとした。各変異体の雌雄同体と野生体の雄とを

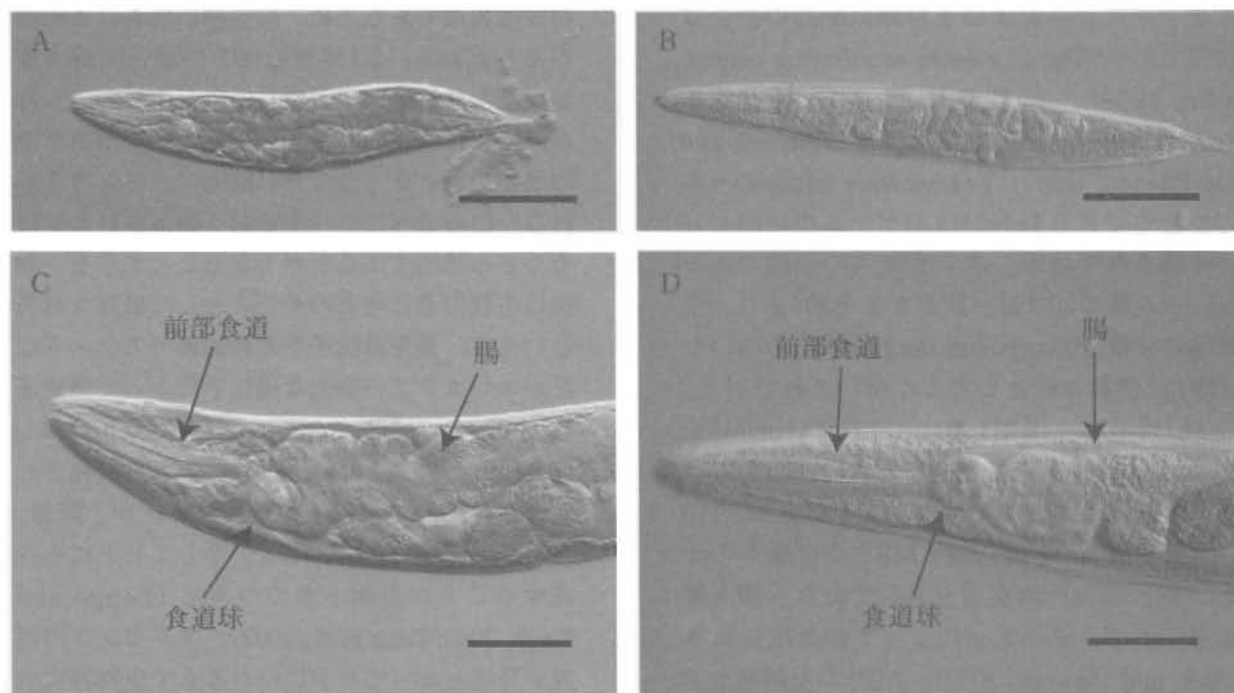


図5 単離した2種類のDpy変異体のノマルスキー微分干渉顕微鏡像。A, Dpy-k雌雄同体成虫の全体像。B, Dpy-e雌雄同体成虫の全体像, 野生体と比較してともに太短い。C, 図Aの前部を拡大し, 消化器系である食道を青, 腸を赤で示した。体のサイズが小さいものの食道及び腸の大きさは野生体と同じなため, 圧縮された状態である。D, 図Bの前部を拡大し, 消化器系である食道を青, 腸を赤で示した。表皮細胞だけでなく消化器系 (食道と腸), 生殖系も小さくなっており, おさまりが良い。スケールバー, A, Bは100 μ m, C, Dは50 μ m。

交配したところ、F1は全て野生型であり、F1を1頭ずつ新しいプレートに移して培養した結果、産まれたF2はDpyと野生型が出現した、 χ^2 検定の結果、Dpy:野生型=1:3で分離しているという結論になり、これらのDpyは劣性変異体であることがわかった。ノマルスキー微分干渉顕微鏡による詳細観察をおこなったところ、同じく体長が短いDpy-kは、消化器系と生殖系は野生体と変わらないサイズであった。つまり、小さな線虫体内に各器官が圧縮された状態であった(図5 A, C)。一方、Dpy-eのばあい、表皮細胞だけでなく消化器系(食道と腸)、生殖系もサイズが短くなっていた(図5 B, D)。モデル生物であるエレガンスでもDpyは多数報告されており、主にコラーゲンの変異によって発生する(WormBase, <http://www.wormbase.org/>)。線虫の組織と組織の間にある構造として細胞外マトリックス extracellular matrices (ECMs) があり、外部からの物理的刺激を防ぐ、細胞移動をコントロールする、組織の物理的強度をもたせるといった働きをもつ。ECMsに2つのタイプがあり、ひとつはクチクラ (cuticle)、もうひとつは基底膜 (basement membrane) である。クチクラは線虫の体表や食道管の内壁を覆い、発生段階においてその質も異なっている。そのうちほとんどが難溶性物質であるが、中には可溶性のものも存在し、それがコラーゲンである(Kramer, 1997)。同じ体が太短くなる表現型を示したが、*dpy-k*はコラーゲンのように表皮細胞にかかわる何らかのタンパクをコードする遺伝子がおかしくなったことが原因で、また*dpy-e*は体全体を制御しているなんらかの遺伝子が異常をおこしたことが原因であると考えられる。この両者は異なる遺伝子突然変異であると考えられるが、このことを確かめるには相補性テストをおこなう必要がある。

本実験で単離したYSは、エレガンスと比べて体のサイズが小さく、発生・成長が遅く、産卵数も少なかった。したがって、エレガンスと比べてモデル生物としての素質は劣るものの、膨大な知見・情報をもつエレガンスの近縁種として、胚発生パターン、遺伝子構造・機能、さらにはゲノムレベルでの比較対照とすることで、進化上重要な知見を得られる可能性を持っている。現在、我々は本線虫の前核融合、体軸

決定、初期胚発生パターンについての観察をおこない、エレガンスとの比較をおこなっている。今後、YSの同定・記載をおこなうことで分類学上の位置を明らかにし、エレガンスとの比較対照としての準備をおこなってゆく予定である。

引用文献

- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71-94.
- Fitch, D. H. A. and Emmons, S. W. (1995) Variable cell positions and cell contacts underlie morphological evolution of the rays in the male tails of nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 170, 564-582.
- 長谷川浩一、三輪錠司 (2004a) Cエレガンス実験事始め、「線虫学実験法」日本線虫学会編、日本線虫学会、pp. 195-214.
- 長谷川浩一、三輪錠司 (2004b) 線虫*Caenorhabditis elegans*の初期胚発生と体軸の決定。中部大学応用生物学部紀要 3, 31-38.
- Hasegawa, K., Miwa, S., Tsutsumiuchi, K., Taniguchi, H. and Miwa, J. (2004) Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Toxicol. Letters 152, 183-189.
- Hodgkin, J. and Doniach, T. (1997) Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 146, 149-164.
- 石橋信義 (2003) 土壌の線虫、「線虫の生物学」石橋信義 編、東京大学出版会、pp. 84-93.
- Johnson, T. E. (1990) Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower gompertz rate of aging. Science 249, 908-912.

- Kramer, J. M. (1997) Extracellular Matrix. In *C. ELEGANS II* (eds. Riddle, D. L. Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 471-500.
- Liu, K. S. and Sternberg, P. W. (1995) Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 14, 1-20.
- Longo, V. D. and Finch, C. E. (2003) Evolutionary Medicine: From dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299, 1342-1346.
- Mayer, B. J. (1997) Sex determination and X chromosome dosage compensation. In *C. ELEGANS II* (eds. Riddle, D. L. Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 201-240.
- 三輪錠司 (1986a) 虫のつくり方 I. *科学* 56, 68-77.
- 三輪錠司 (1986b) 虫のつくり方 II. *科学* 56, 162-170.
- Pierce, S. B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S. A., Buchman, A. R., Ferguson, K. C., Heller, J., Platt, D. M. and Pasquinelli, A. A. (2001) Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.* 15, 672-686.
- Plasterk, R. H. A. and van Luenen, H. G. A. M. (1997) Transposon. In *C. ELEGANS II* (eds. Riddle, D. L. Blumenthal, T., Meyer, B. J., Priess, J. R.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 97-116.
- Schackwitz, W. S., Inoue, T., Thomas, J. H. (1996) Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719-728.
- Sijen, T. and Plasterk, R. H. A. (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germline by natural RNAi. *Nature* 426, 310-314.
- 白山義久 (2000) 線形動物門. 「無脊椎動物の多様性と系統」 白山義久 編, 裳華房, pp. 142-145.
- Sudhaus, W. and Fitch, D. (2001) Comparative studies on the phylogeny and systematics of the Rhabditidae (Nematoda). *J. Nematol.* 33, 1-68.
- Tatar, M., Bartke, A. and Antebi, A. (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.
- The *C. elegans* sequencing consortium (1998) Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.
- Title** : Culturing and genetics of a newly isolated free-living soil nematode
- Authors** : Tadahide Emura, Keisuke Kashio, Miki Ohno, Satsuki Miwa, Koichi Hasegawa, and Johji Miwa.
- Keywords** : Chubu University campus, Miwa Worm Lab., novel soil nematode, *C. elegans*, Baermann funnel method

Summary

Culturing and genetics of a newly isolated free-living soil nematode

Tadahide Emura¹⁾, Keisuke Kashio¹⁾, Miki Ohno¹⁾,
Satsuki Miwa²⁾, Koichi Hasegawa^{2,3)}, and Johji Miwa^{1,2)}

1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) Institute for Biological Function, Chubu University.

3) Graduate School of Agriculture, Kyoto University.

A novel free-living soil nematode was isolated from the soil of the Chubu University campus. This species yet to be identified grew successfully on nematode growth medium (NGM) seeded with the bacterium *Escherichia coli* as a food, and we suppose that it is a member of Rhabditida. After re-isolating it 4 times by selecting the animal with the largest brood size, we froze the selected line in liquid N₂. This nematode line was temporarily named YS-22211, which is abbreviated YS. We analyzed the reproductive mode of YS and some body morphology as well as measured its brood size, growth rate, and life span. We also isolated mutants in an attempt to establish the YS genetics. Although YS has the two sexes hermaphrodite and male, it usually reproduces by the self-fertilization of the egg by its own sperm. Hermaphrodites also mate with rarely-emerging males and reproduce cross-fertilized offspring with the equal ratio of males to hermaphrodites. Both body and brood size were smaller than those for the model organism *Caenorhabditis elegans*, and life span was slightly longer. We isolated two morphologically different dumpy mutants by EMS mutagenesis. The one seemed to maintain the gut, pharynx, and gonad of the same sizes as those for the wild type in spite of its small body size, whereas the other was small not only in the outside body structure but also in the inside body structure such as the gut, pharynx, and gonad.