

センチュウ *C.elegans* が誘引されるベンズアルデヒドの濃度について

森田啓介 坂井愛美 筒井涼太 北橋永羽 福田大智 新居孟 白亦加 前田翔大
総合理学 兵庫県立神戸高等学校科2年

がん検査において*C. elegans*が、がん患者の尿に誘引することが廣津（2015）により解明されている。*C. elegans*はAWC嗅覚神経を使用して誘引時に匂いを嗅ぎ分ける。よって他の種類のセンチュウでもこのAWC嗅覚神経をもっていれば同じようにがん検査に利用できるのではないかと考えた。本研究では、がん患者の尿の代わりに同じくAWC嗅覚神経で感知されるベンズアルデヒドを使用することにした。しかし、*C. elegans*は低濃度のベンズアルデヒドに誘引され、高濃度のベンズアルデヒドを忌避する。そこで、*C. elegans*の反応が誘引から忌避に変わる濃度を調べることにした。実験の結果、 $4.0\sim 4.5\ \mu\text{l/ml}$ が誘引と忌避の境目であるとわかった。*C. elegans*を誘引させるには、 $2.5\ \mu\text{l/ml}$ が最適であるとわかった。

1. はじめに

*C. elegans*はモデル生物として広く用いられており、優れた嗅覚を持っている。*C. elegans*の持つ“がん患者の尿に誘引される”という特性を利用した新たながん検査方法が実用化されようとしている。この検査方法はより安価に早期のがんでも発見できるとして期待されている[1]。しかし、この検査方法において使用されるセンチュウの種類は現在のところ*C. elegans*のみである。害虫とされている他の種類のセンチュウもこのがん検査に使用することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

2.1. 研究の動機と目的

このがん検査方法において*C. elegans*ががん患者の尿に誘引されるとき、*C. elegans*はAWC嗅覚神経を使用してその匂いを感知している[2]。がん患者の尿は入手不可能だったので、同じくAWC嗅覚神経で感知され、入手しやすく扱いやすいベンズアルデヒドを用いた[2]。*C. elegans*は低濃度のベンズアルデヒドに誘引反応を示し、高濃度のベンズアルデヒドには忌避反応を示す[2]。誘引されるベンズアルデヒド濃度の範囲と忌避される濃度の範囲はわかっていない。ベンズアルデヒドにセンチュウが誘引される濃度範囲が分かれば、AWC嗅覚神経を持つかどうかの判断に使えると考えた。そこで、*C. elegans*がベンズアルデヒドのどの濃度では誘引され、どの濃度では忌避するかを明らかにしようとした。

2.2. 本研究の特徴

本研究では、ベンズアルデヒドの濃度を変えて*C. elegans*の誘引反応を動画を撮影することで調べた。

3. 実験

3.1. 培養方法

NGM培地[3]で大腸菌を餌とし、 22.5°C のインキュベーター内で培養する。

3.2. 実験方法

1. 直径5 cmの実験用培地^{※1}のシャーレの下に図1の計数シート^{※2}を貼り付ける。この実験用培地は、実験前に*C. elegans*を培養しているインキュベーターに入れ、*C. elegans*育成用の培地と同



図1 計数シート

温にしておく。
2. □に小さくちぎったガーゼを置く。
3. ○に*C. elegans*をまち針で育成用培地から移す。
4. □に置いたガーゼに $25\ \mu\text{l}$ のベンズアルデヒドをマイクロピペットを使用して滴下する。
5. ベンズアルデヒド滴下から30分間、図2の撮影装置で動画撮影し、センチュウの移動を観察する。

※1. 育成用培地よりも固く薄くしたもの。

※2. 計数シートについて：黒色背景の直径5 cmの円上に、□を中心とした直径10 mmから85 mmまで直径差が5 mmの16個の同心円を描いたものである。



図2 撮影装置

1~5はクリーンベンチで行う。

ベンズアルデヒドの濃度は $2.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $3.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $3.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $4.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $4.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $5.0\ \mu\text{l/ml}$ 、さらに滴下なしでも行った。（この実験において、中央とは図1:計数シートの○を含む二線に挟まれた領域、誘引とは中央よりも□側の領域、忌避とは中央よりも△側の領域を示している。）

3.3. 結果

結果は表1のようになった。0分はベンズアルデヒドを滴下した瞬間、3分、30分はベンズアルデヒドの滴下からちょうど3分後、30分後の分布を表している。誘引、中央、忌避は、シャーレに移した個体数のうち、その時間に各領域にいたC. elegansの個体数を割合で表している。

表 1 : C. elegans の行動解析結果

| 濃度(μl/ml) | 時間(分) | 誘引(%) | 中央(%) | 忌避(%) |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| 2.5 | 0 | 35 | 20 | 45 |
| | 3 | 55 | 10 | 35 |
| | 30 | 67 | 0 | 33 |
| 3.0 | 0 | 0 | 91 | 9 |
| | 3 | 5 | 45 | 50 |
| | 30 | 11 | 44 | 44 |
| 3.5 | 0 | 33 | 58 | 8 |
| | 3 | 42 | 42 | 17 |
| | 30 | 56 | 33 | 11 |
| 4.0 | 0 | 27 | 45 | 27 |
| | 3 | 45 | 27 | 27 |
| | 30 | 44 | 22 | 33 |
| 4.5 | 0 | 26 | 48 | 26 |
| | 3 | 13 | 45 | 42 |
| | 30 | 26 | 30 | 44 |
| 5.0 | 0 | 0 | 30 | 70 |
| | 3 | 10 | 50 | 40 |
| | 30 | 0 | 58 | 42 |
| 滴下なし | 0 | 0 | 40 | 60 |
| | 3 | 20 | 53 | 27 |
| | 30 | 44 | 39 | 17 |

4. 考察

次のグラフは表1の結果をグラフ及び散布図にしたものである。

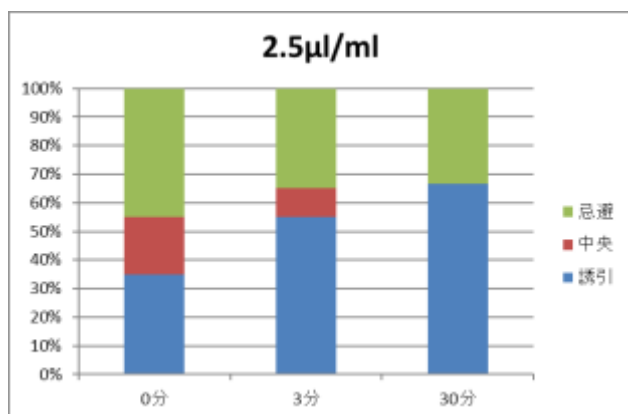


図 3

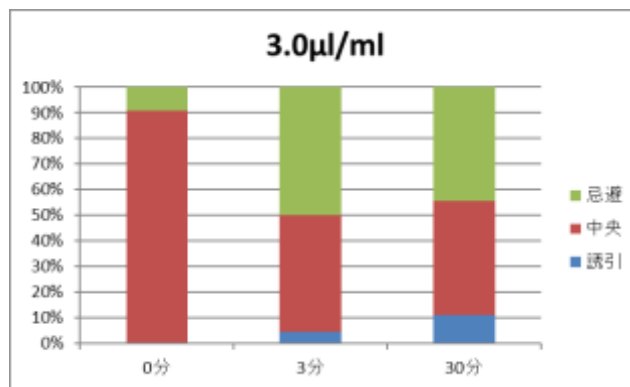


図 4

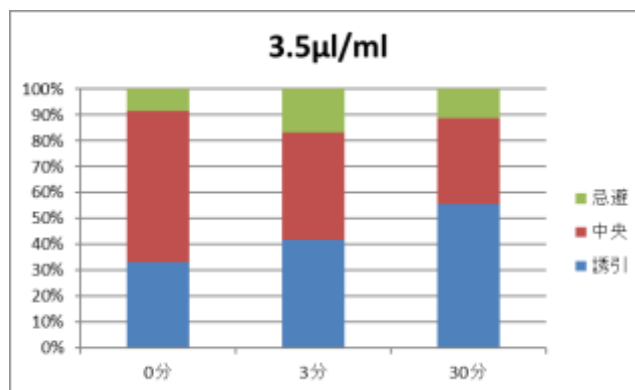


図 5

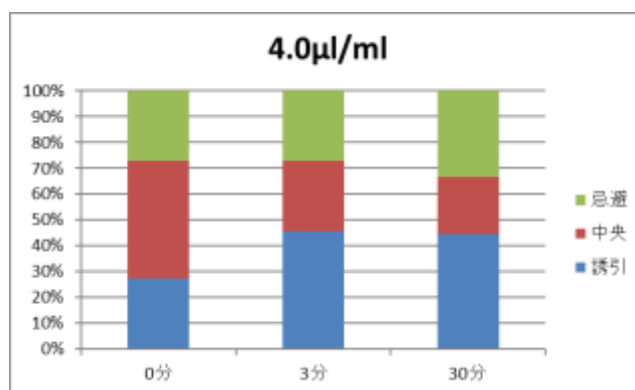


図 6

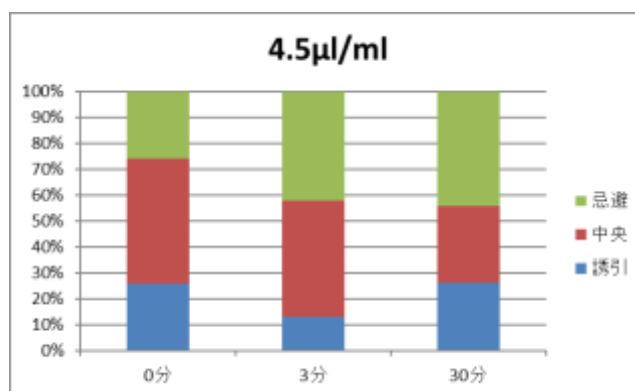


図 7

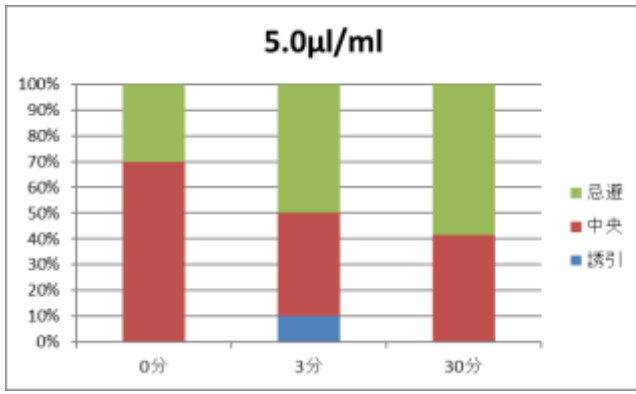


図 8

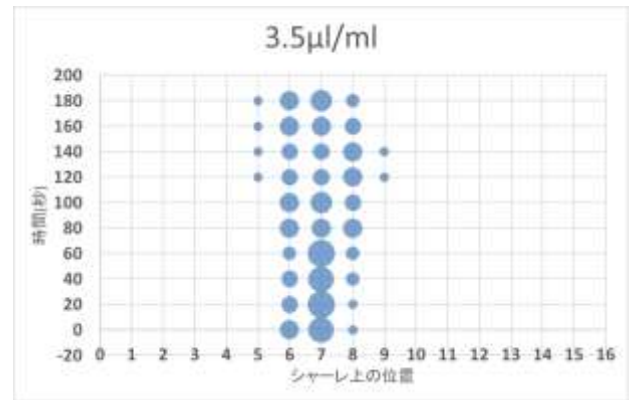


図 12

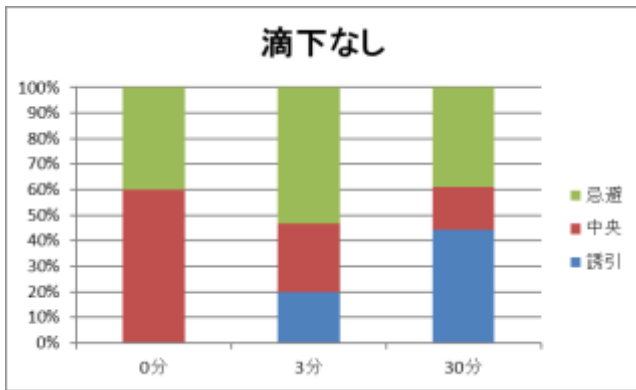


図 9

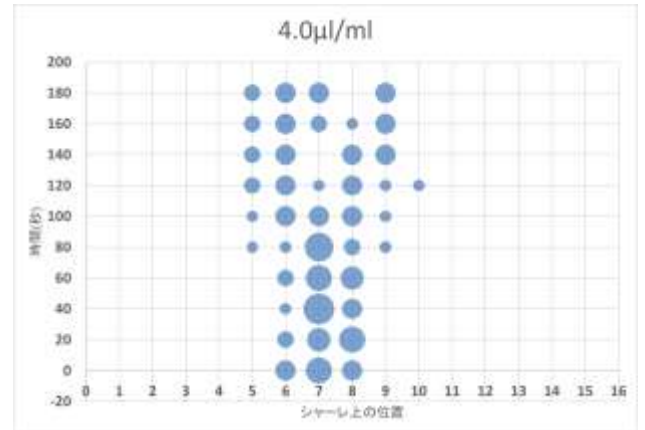


図 13

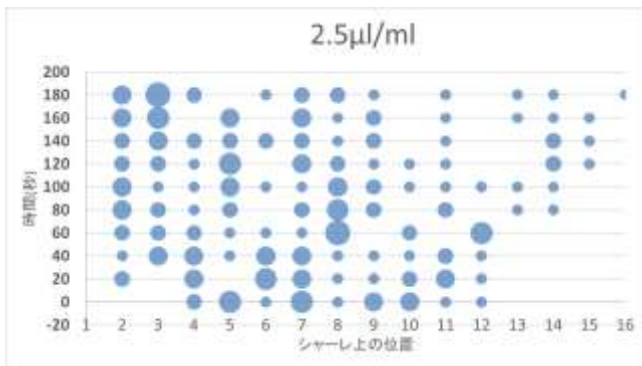


図 10

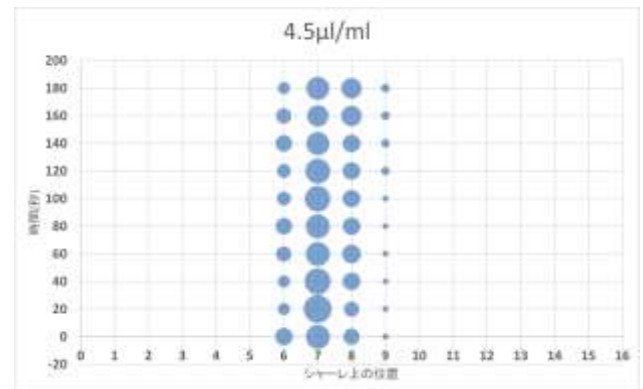


図 14

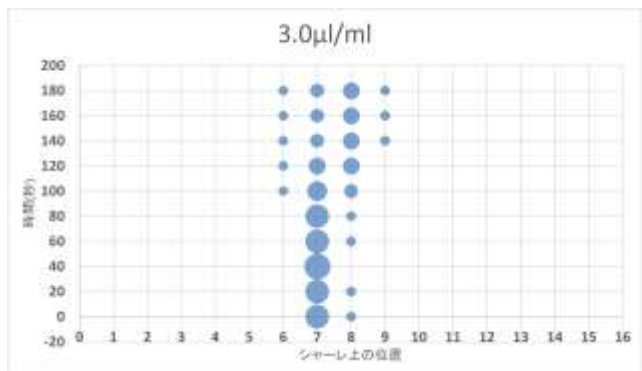


図 11

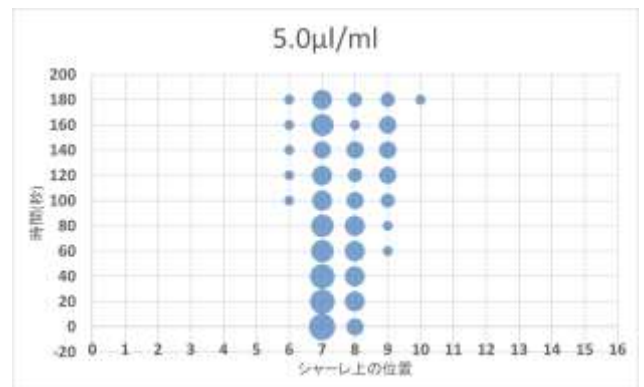


図 15

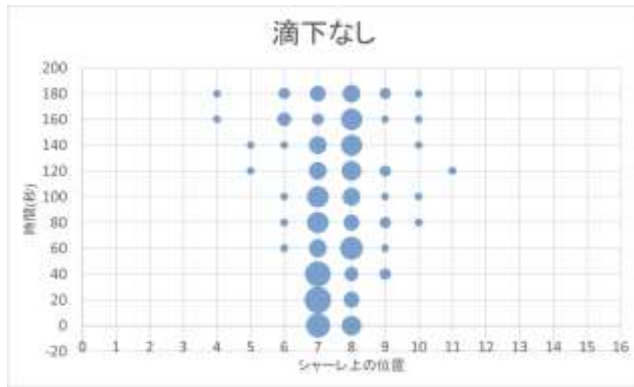


図 16

C. elegansは、 $2.5 \mu\text{l/ml}$ では誘引されたと考えられる。また、図10から分かるように広がりも大きい。全体としては、ベンズアルデヒド濃度 $4.0\sim 4.5 \mu\text{l/ml}$ が誘引と忌避の境目であるといえる。しかし、①前後の誘引傾向からして $3.0 \mu\text{l/ml}$ のみにおいて他と異なる結果が得られたこと、②ベンズアルデヒド濃度 $3.0\sim 5.0 \mu\text{l/ml}$ については、誘引・忌避に関わらずC. elegansの行動範囲が狭かったこと(図11～図15)について以下の考察をした。

①について

AWC嗅覚神経でPI(3, 4, 5)P₃という物質が上昇すると匂い物質からの忌避行動が引き起こされることが分かっている[4]。しかし、この上昇を引き起こす要因については「種々の刺激によって」[5]としか記載されておらず、実際に上昇させる刺激が実験においてあったかは不明である。

②について

(1)最終的な位置が中央に集中していたのは、動画を観察した結果から、C. elegansが□・△間を繰り返し往復していたことが分かった。このことが要因の一つと考えられる。

(2)これまでの動画の解析から、センチュウの体長が誘引・忌避の速度に関係していると考えており、 $2.5 \mu\text{l/ml}$ の実験では、体長の大きな個体が多く、その他の濃度では小さな個体が多かったことが行動範囲の狭さの原因であると考えた。

5. 結論

誘引と忌避の境目は $4.0\sim 4.5 \mu\text{l/ml}$ である。確実に誘引させるには、 $2.5 \mu\text{l/ml}$ が最も適しているといえる。また、実験に使用するセンチュウはできるだけ成長した大形個体にするべきである。

6. 展望

ネグサレセンチュウを用いて、上記と同様の実験を

行おうとしたが、ネグサレセンチュウは動きが遅く、観察しづらいなどの面から、がん検査への活用には不向きであると考えた。

根や塊茎に侵入して被害を及ぼすネグサレセンチュウなどの他のセンチュウがAWC嗅覚神経を持っている場合、誘引反応を用いて、植物から遠ざけることできるのではないかと考えた。

7. 謝辞

本研究に多大な助言をいただいたサイエンスアドバイザー並びに神戸高校の教員の方々にお礼申し上げます。加えて、二度にも渡りセンチュウを提供して頂いた甲南大学理工学部統合ニューロバイオロジー研究所の久原篤教授に深く感謝いたします。

[参考文献・参考URL]

[1] 生物そのものを利用したバイオセンサー-線虫嗅覚によるがん診断-

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/jao/46/3/46-191/-pdf>

[2] 線虫の化学感覚と行動

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakusei-riseika/23/1/23-1-10/-pdf/-char/ja>

[3] NGMプレート(線虫飼育培地)作製 | 一般社団法人 日本細胞生物学会

[4] 線虫Caenorhabditis elegans の感覚応答と学習を制御する機構

https://www.jstage.jst.go.jp/article/hikakusei-riseika/28/2/28_2_231/_pdf/-char/ja

[5] PIP2 によるイオンチャネルの直接的制御

https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/142/6/142_320/_pdf

[6] 水久保隆之・二井一禎, 線虫学実験, 京都大学学術出版会, 2014