

線虫誘引物質の評価法開発と単離・同定

澤 進一郎*

熊本大学大学院自然科学研究科

Analysis of Attractant of Plant Parasitic Nematode

Shinichiro SAWA*

Graduate school of Science and Technology, Kumamoto University
Kumamoto 860-8555

ABSTRACT

Because of the agricultural importance, the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* that infect soybean (*Glycine max*) and *Meloidogyne incognita* that infect many crops have emerged as good research models to understand the signaling, perception, and response events during plant-nematode interactions. The recent advances in our understanding of the cellular, physiological, and molecular basis of legume-nematode interactions are merging at the crossroads of plant-microbe interactions and plant developmental biology. Plant attraction of plant parasitic nematodes is thought to be a soluble chemical that is perceived by nematodes, and nematode can recognize where the plant is. In order to increase knowledge of molecular mechanisms underling of plant-animal interaction, analysis of plant attractant of plant parasitic nematode is one of the most impressive and smart theme. Furthermore, this theme can be applied to agriculture field. Here we have developed devices to evaluate the nematode guidance activity, and one guidance behavior was confirmed when the nematode are packed in a small space in detail. Further, we could detect plant attractant activity from roots of some plant species. We could observe many nematodes can be attracted at the root tip of Maize and some other plants. The attraction was confirmed by using PF127 gel, which is well known for nematode behavior evaluation gel. If we could identify the chemical structures of the attractant, we could develop new agricultural chemical that can utilize for the defense of the nematode damage. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 41-44, 2015.

Key words : nematode, Arabidopsis, attractant, chemical, M. incognita

*〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1

大豆は、世界中で食糧として利用される重要な作物の一つである。日本でも北海道を中心に栽培が行われているが、シスト線虫等による線虫被害により、連作は容易ではなく、線虫対策が急務である。線虫による作物被害は世界で年間数十兆円とも試算されている。そのような状況のなかで、線虫感染耐性作物も存在するが、完全に耐性を示すわけではない上に、作物が高温にさらされると、その感染耐性が打破されてしまうことが知られている。このようなことから、線虫感染の分子機構を明らかにし、その感染被害抑制の対策を急がなければならないと考えられる。

我々は、以前、様々な合成ペプチドを用いて、線虫の植物への感染効率を低下させるペプチドを見いだした¹⁾。その解析において、CLEペプチドが線虫感染に重要な機能を果たすことを明らかにした。また、我々は、さらに、サツマイモネコブセンチュウのシロイヌナズナへの感染系を確立し、CLEペプチドなどを用いた感染成立に、細胞分裂やペプチドホルモン、再分化やオーキシシンシグナルに関与する遺伝子が関与することを明らかにした²⁾。さらに、より強い感染耐性を示す作物を作出するために、線虫感染過剰突然変異体の単離を行い、5つの突然変異体の単離に成功した³⁾。

これまでに、遺伝学的に線虫感染防除が可能な基礎研究を展開してきたが、本研究では、農薬の開発を念頭に置いた基礎研究を行った。線虫は、植物の根に感染するが、土の中で根に感染するためには、根から分泌するなんらかの化合物を認識し、誘引物質として利用し、植物の位置を確認していると考えられる。しかし、これまで、植物が分泌する線虫誘引物質は単離されていない。このことから、我々は、まず、線虫の行動を評価する実験系を開発し、その開発系を用いて、誘引物質の単離・同定を試みた。

今後、この誘引物質を同定し、化学合成することで、“線虫ホイホイ”のような、線虫を一箇所に集めて一網打尽にする農薬の開発などに応用できると考えている。

実験方法

実験生物系統

本研究では、九州沖縄農研で培養されているネコブセンチュウ (Root-Knot Nematode; 以下, RKN) のサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*; 以下, *M. incognita*) を用い、その培養にはトマト (*Solanum lycopersicum*) の栽培品種であるブリッツ (カネコ種苗株式会社) を用いた。また、シ

ロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型 (以下, WT) としてColumbia (以下, Col) を用いている。

シロイヌナズナへの*M. incognita*感染

まず、1.5 mLチューブに入れたシロイヌナズナ種子に滅菌液を1 mL加えて滅菌した。クリーンベンチ内でピペットマンを用いてそれぞれの培地に種子を1粒ずつ1シャーレに6粒ずつ滴下した。5℃で2日間休眠打破を行った後、培養室に移し5日間培養 (24h明条件/20℃) した。

次に、水耕栽培システムから回収した*M. incognita* のJ2sを10 μ m ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) を500 mL Sterilfilホルダー (MILLIPORE) のプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。メンブレンフィルターを取り出し、必要な量の滅菌水を入れた100 mLビーカーに移し、メンブレンフィルターを軽く洗ってJ2sを必要量の滅菌水に濃縮した。さらに、その線虫溶液を10 μ m ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) をSterilfil無菌ろ過システムのプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。次に、メンブレンフィルターを取り出し、滅菌水を少量入れた丸型シャーレに移し、メンブレンフィルターを軽く洗ってJ2sを少量の滅菌水に濃縮した。さらに、濃縮溶液を10 μ m ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) をSterilfil無菌ろ過システムのプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。

滅菌した*M. incognita* のJ2sを5日間育成したシロイヌナズナの入ったシャーレに1枚あたり約720頭 (1個体あたり約120頭) のJ2sが入った200 μ Lを植物体の根から約2 cm下に接種した。

結果と考察

線虫行動評価系の開発

まず最初に、初期型マイクロ流路デバイスを開発した (Fig. 1A)。デバイス試験には、1%寒天を用いた。初期型では試薬を滴下する穴にセンチュウが侵入することができ、センチュウは一旦穴に入りゲル表面

に出ると再び侵入することがほとんどできなくなった (Fig. 1B). このため誘引または忌避行動の結果その穴表面にいるのか、偶然その穴表面にいるのか判断できなかった。また、穴のふちにいるセンチュウは見えにくく、カウントできない固体もあった (Fig. 1B)。

そこでセンチュウが穴へ侵入できないように、センチュウは通過できないが、試薬は拡散するフィルタの開発を行った。(Fig. 1C). このデバイスを用いて左の部屋に忌避物質を入れた場合、右の部屋に線虫が忌避する行動を観察することが出来た (Fig. 1D). このことから、このデバイスを用いて、様々な化合物の誘引試験が可能となった。

効果があると報告されている化合物に対する走化性試験

サリチル酸は強力な誘引物質であり殺線虫・不可逆的孵化抑止物質とされている物質である⁴⁾。本研究では、15 mM ~ 15 pM間の10倍希釈ごとの濃度で実験を行った。15 mM を20 μ L滴下した実験において、試薬滴下後330分で滴下した側の部屋で死に始め、24hでは滴下した部屋の全てのセンチュウが死んでいた。330分の死に始めと同時に滴下した部屋のセンチュウ数の増加にともない死体数が増えていき、右の部屋のセンチュウ数は格段に少なくなった。その他の濃度では有意な変化は起きなかった。

塩化カルシウムは誘引作用で殺線虫作用があるとされている物質である⁴⁾。本研究では濃度1.34 Mを3 μ L滴下し実験を行った。この時、センチュウは塩化カルシウムに対して忌避性をしめした。しかし24h後では

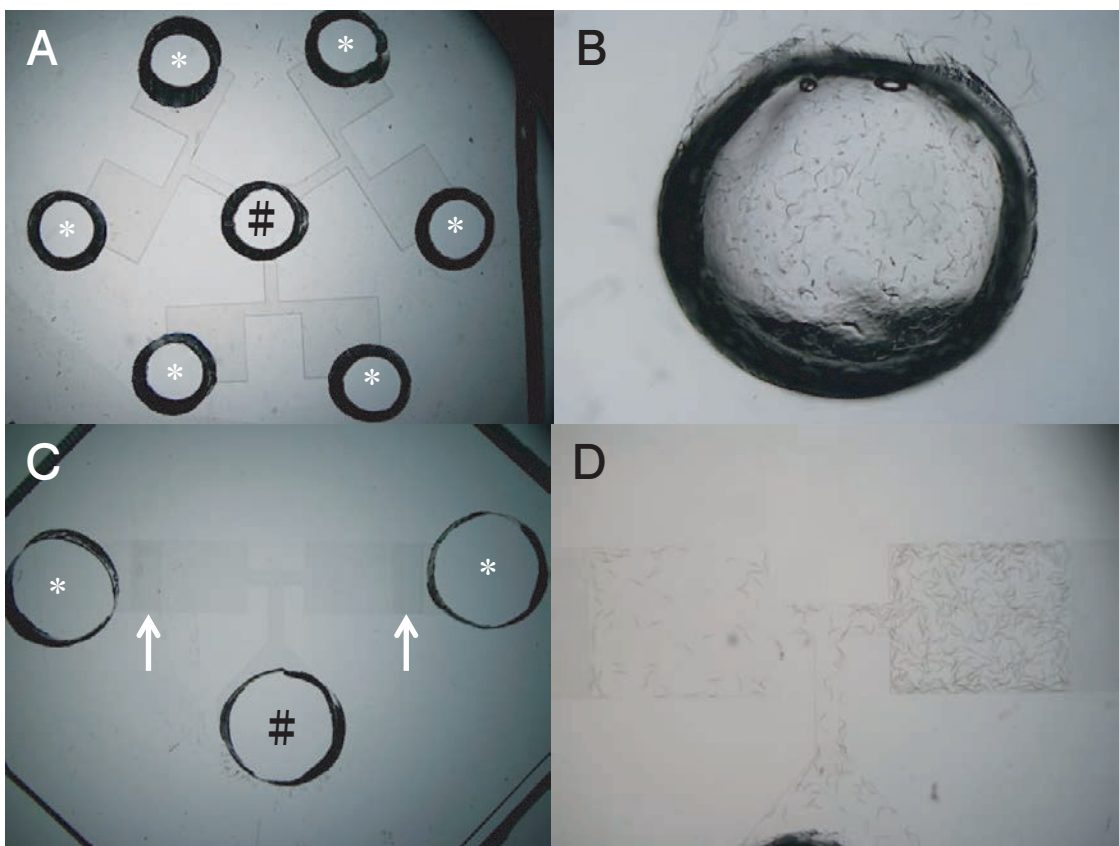


Fig. 1. Micro device to evaluate nematode behavior

A: Proto-type device does not have slit to avoid nematode internalization to the chemical spot (*).

B: Nematodes trapped in the chemical spot. Thread like black ones are nematodes.

C: Micro device with slit (arrow).

D: Avoidance was putted in the left chemical spot. Nematodes moved to right room. #: nematode pool

試薬を滴下した部屋のセンチュウ数は格段に増え、対照の部屋のセンチュウ数は格段に減っていた。試薬を滴下した部屋のセンチュウは弱っており、死んでいるものもいた。

酢酸は誘引作用で殺線虫作用があるとされている物質である⁴⁾。本研究では10倍希釈ごとに30 mM～300 μ Mまで実験を行った。30 mMを3 μ L滴下した実験では、330分で滴下した部屋の半数程が死んでおり、徐々に死个体数の割合は増え、24hでは両方の部屋で全てのセンチュウは死んでいた。サリチル酸と同様に死に始めと同時に滴下した部屋のセンチュウ数の増加にともない死体数が増えていき、右の部屋のセンチュウ数は格段に少なくなっていく。

その他の試薬に対する走化性試験

ストリゴラクトンは植物が菌根菌とのコミュニケーションのために分泌している物質である (Akiyama *et al.*, 2005)。原液が10 μ Mのストリゴラクトンを、原液、10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍 希釈

し、それらを2 μ L滴下することでデバイス試験を行った。原液2 μ Lではかなり強い忌避がみられた。また原液3 μ Lではさらに強い忌避がみられた。10倍希釈では忌避の効果が下がり、100倍以上の希釈では有意な結果は得られなかった。

線虫は根の細胞壁、もしくは細胞壁の分解物に誘引されるのではないかと考え、細胞壁成分のスクリーニングを行った。まず1 mg/mLに調整した細胞壁成分を3 μ L滴下し試験したが、誘引効果は見られなかった。

PF127ゲルを用いた誘引試験

これまでに、線虫誘引活性を検出するために、PF127ゲルが利用されている。そこで、我々は、PF127ゲルに根の先端をのせ、線虫誘引活性を試験したところ、有意な線虫誘引活性を確認した。このことから、この根と、PF127ゲルを用いて線虫誘引物質を精製し、マイクロデバイスを用いた試験によって誘引物質の同定と確定を目指すことが急務と考えられた。

要 約

本研究では、マイクロ流路デバイスを開発・改良し、線虫の行動を人工的に制御・評価することが可能となった。このデバイスの開発により、誘引物質の同定に道が開けたと考えている。また、植物の根への誘引活性を、PF127ゲルを用いて検出する事が可能となった。このことは、線虫誘引物質の単離・精製への道筋ができたと考えられると共に、デバイスと組み合わせ、精製を進めることが可能であることを示している。これらの成果により、今後、線虫誘引物質を同定し、ダイズなどの畑に投与することで、一網打尽に殺虫する、もしくは、誘引物質とトラップを組み合わせ“線虫ホイホイ”を作成することで、土壤中の線虫量を減少させることが可能になると考えている。

文 献

- 1) Sawa S (2008): Basic analysis for the defense of soybean cyst nematodes by using synthetic peptides. *Soy Protein Research*, **11**, 40-44.
- 2) Sawa S (2012): Basic analysis on the defense for nematode infection in Plant. *Soy Protein Research*, **15**, 21-25.
- 3) Sawa S (2013): Analysis of Molecular Mechanisms of Plant Parasitic Nematode Infection Steps. *Soy Protein Research*, **16**, 39-42.
- 4) Wuyts N, Swennen R and Waele DD (2006): Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology* **8**, 1239-1245.