

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651209

研究課題名（和文） 寄生性線虫と土壤微生物の化学生態学的解析

研究課題名（英文） Chemical ecology of parasitic nematode and soil amoeba

研究代表者

GOTO Derek (GOTO DEREK)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40419205

研究成果の概要（和文）：細胞性粘菌と線虫を同一のシャーレ上で培養すると、粘菌は線虫を忌避させることを定量的に示した。このような忌避行動を起こさせる原因は細胞性粘菌の子実体の分泌する化学物質であることを同様の実験から導きだした。この混合物は抗線虫薬開発の有用資源となる。植物を生育させその根のから 2 mm 離れた地点に、細胞性粘菌が放出する疎水性物質をろ紙に吸着させたものおき、直後にそれぞれの植物から 10 mm 離れた地点に線虫を播種し、48 時間後に植物の根の染色を行い感染数の比較を行った。その結果、細胞性粘菌抽出物が近くにあった植物ではなかった植物に比べ有意に線虫の感染が減少していた。

研究成果の概要（英文）：This project discovered that a plant parasitic nematode exhibits avoidance behavior when placed in the same habitat as a soil amoeba. This response was validated by quantitative data analysis. Further analysis suggested that a secretion from one stage of the amoeba was the factor that induced this avoidance behavior. The potential for its application in agriculture to reduce parasitic nematode infection was shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：化学生態学、二次代謝産物、生物相互作用、寄生性センチュウ、細胞性粘菌

1. 研究開始当初の背景

農薬の使用は土壤の微生物環境を破壊し、結果的には線虫の誘導多発生を常態化させる。また、土壤環境の悪化は線虫の被害の増大につながる事からも土壤の微生物相の回

復を最適化させる戦略が減農薬線虫防除体系として合理的であると考えられる。一方で、いわゆる環境修復に有効とされている有用微生物の多くは難培養性であったり、土壤に移植した際の定着率が低いなどの問題がある。現に線虫の天敵微生物パストリアは宿主

特異性の高い絶対寄生性であるため培養が困難であり高コストである。世界規模での食糧問題が取り上げられる昨今、農作物の安全かつ定常的な供給は人類の繁栄に極めて重大な事項である。我が国は寄生性線虫に対する農薬の使用量が世界の中でも最も多く、環境保全の観点からも減農薬線虫防除体系の確立の必要に迫られていた。

2. 研究の目的

環境問題の解決・改善を視野にいれ土壌微生物がもつ潜在的な能力を開発することを目的とした。細胞性粘菌の化学生態学の基礎研究から線虫汚染の状況を調べる遺伝子マーカーや、さらには抗線虫活性のある有用物質の検索による微生物農薬の開発へつなげることをめざした。

3. 研究の方法

これまでに類似の先行事例がなかったことから、まず細胞性粘菌と線虫の間に化学物質によるコミュニケーションがあるのかを調べるバイオアッセイ系の確立を行った。バイオアッセイ系の確立に関しては、結果をより定量的に示すことができるように、線虫の移動痕跡の線をもとにドット数をカウントすることによって数値化することを試みた。

また、そのコミュニケーションが化学物質によるものか、あるいは何らかの物理的な刺激に夜一般的な反応なのかを比較した。その活性を抽出する方法を見つけ、抽出物が植物への線虫の感染を阻害することを調べるバイオアッセイ系を作り上げた。

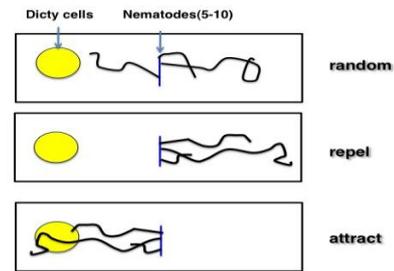
4. 研究成果

(1)アッセイ系の確立

細胞性粘菌には線虫の行動に影響を与える活性があることを明らかにするためのバイオアッセイ系を確立した。もしも線虫と粘菌の間に何等かのコミュニケーションがあるのであれば上図の **repel** か **attract** のどれかのパターンが観察され、コミュニケーションがない、あるいは相互に何ら影響を及ぼさない場合には **random** のパターンになるとか

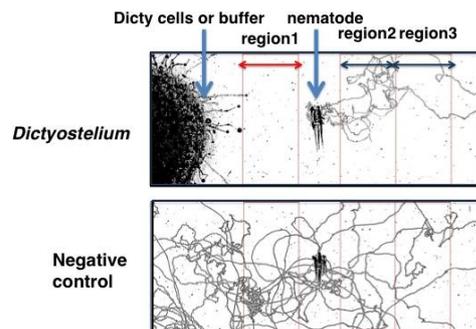
んがえた。

Nematode behavior with *Dictyostelium*



上記のアイディアに基づいて細胞性粘菌の子実体が存在した場合の線虫の行動がどうなるかを、その移動跡に基づいて観察した。下図はその結果を示したもの。線虫が、細胞性粘菌を避けるようにして動いていることがわかる。

Nematode track after 24 hr



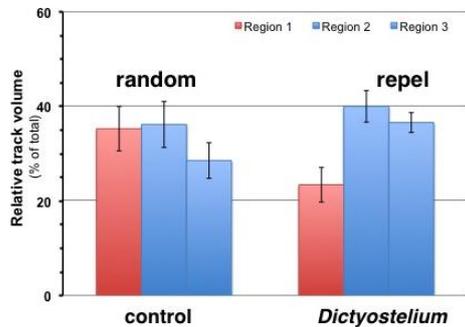
(2)バイオアッセイの結果の定量化

この結果を受けてこれらの行動を定量的に示すため数値化することを試みた。

そこで、線虫の移動した跡をドット数に換算して、粘菌側 (**region1**) と粘菌のいない領域 (**region2,region3**) に分けてそれぞれのドット数をカウントしてグラフ化した。右上にその結果を示す。

以上の結果から、細胞性粘菌が存在すると、植物寄生性線虫はこれを避けるように行動することが、定量的に示された。

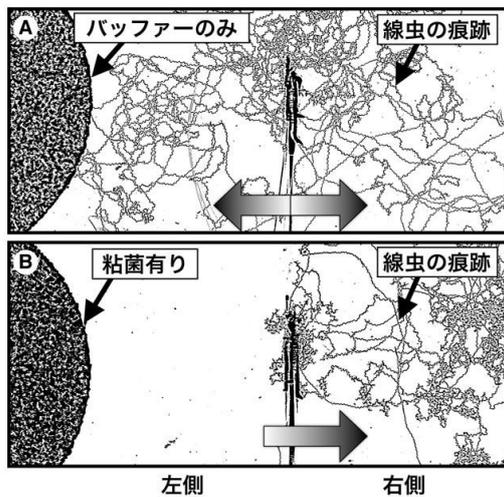
Track assay after 24 hr



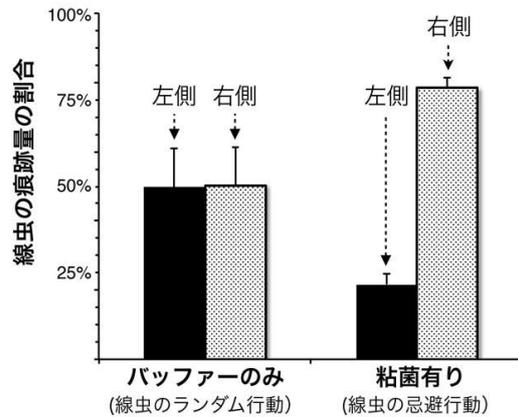
(3)忌避活性物質の抽出方法の確立と化学物質によるコミュニケーションの確認

次にこの忌避行動は細胞性粘菌から放出される化学物質によって誘導されることを確認した。

そこでまず細胞性粘菌をろ紙上で発生させ、子実体を形成した後、これを取り除いた。こうすることによって、細胞性粘菌から分泌された化合物は寒天培地中に残るが、細胞性粘菌自体は存在しないので、生物が存在することによる物理的な刺激（例えば二酸化炭素濃度や湿気）によって忌避行動が起こされているのかどうかを観察することができる。さらにその結果を定量化したものを以下に示す。



これに基づいて、結果を数値化したものが以下のグラフである。



以上の結果から、細胞性粘菌由来の化合物が、植物寄生性線虫に忌避行動を起こしていることが考えられたので、細胞性粘菌から細胞分泌物を抽出して、同様の実験を行うことを考えた。

一般的に脂溶性物質を抽出するには Bligh-Dyer 法などが利用されるが、この場合膜脂質の混入が多いため活性をはっきりと追うことが難しいと判断した。そこで、これまで細胞性粘菌から分化誘導分子を精製した経験にもとづき、疎水性ビーズを用いてこれに吸着した化合物を有機溶媒で抽出する方法をとった。

実際の写真が以下の通り。



この化合物をろ紙にしみ込ませて、先の方法と同様にシャーレ上で寄生性線虫とともに培養することによって、これまでみていたような忌避活性がみられるかどうかを確認した。

この物質は植物への線虫の感染を有意に阻止した。

それではこの化合物は植物への寄生性線虫の感染を阻止することができるのか。

現在パイロット実験の段階では、植物に対する感染も阻止することがわかった。

今後さらに詳細な検討を加え、粘菌と線虫の化学生態学的な関わりを明らかにすると同時に、線虫の防除体系の確立に向けての研究を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

日本農芸化学会2012年度大会
2012年3月25日、京都女子大学(京都)
「土壌微生物細胞性粘菌の化学生態学」
宮崎 早紀、Goto Derek¹、齊藤 玉緒²

[図書] (計0件)

[産業財産権]

現在出願準備中。6月を目処に特許申請を行う。(北海道大学、上智大学の共同出願)

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/gotolab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

GOTO Derek (GOTO DEREK)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 40419205

(2) 研究分担者

齊藤 玉緒 (SAITO TAMAO)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号: 30281843

(3) 連携研究者

()

研究者番号: