

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658109

研究課題名(和文)植物寄生性線虫の感染に必要な生物間シグナルの解明

研究課題名(英文) Studies on the signaling molecules necessary for plant parasitic nematodes infection.

研究代表者

近藤 竜彦 (Kondo, Tatsuhiko)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：30362289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物寄生性線虫は、宿主植物の根に寄生して生育不良や収量低下を引き起こす、農業上重要な害虫である。卵からふ化した感染性幼虫は、宿主植物から分泌されると考えられている「誘引物質」を感知して宿主根へ接近し、感染すると考えられているが、その物質の正体は不明であった。我々は、この線虫誘引物質の活性を評価する手法を確立し、この活性物質の単離同定を試みた。その結果、予想外なことに、宿主植物ではなく宿主植物の根の周囲に生育する根圏細菌が生産する物質が線虫誘引活性を示すことを明らかにし、その物質の単離、構造決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Plant parasitic-nematodes threaten agricultural crops by infecting the host plant root. The infective juvenile of the nematodes in the soil can locate the host plant root in some unrevealed way to find the most suitable point for infection. It is speculated that host-root-derived bioactive compounds called "attractants" plays a pivotal role in the infective stage of the nematodes. We established the bioassay method to evaluate the bioactivity of the attractants and found that a liquid culture of a bacterium isolated from the hydroponic culture of a host plant showed strong attraction activity against root-knot nematode. We performed purification of the attractant in the culture supernatant and purified an active compound, elucidated its structure by following NMR analysis.

研究分野：生物有機化学

キーワード：植物寄生性線虫 誘引物質 生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

土壤中に生息する植物寄生性線虫は、宿主植物に侵入、定着し、宿主から栄養を奪って繁殖するという絶対寄生性の生活環を持つ。感染された植物体は生育不良、収量低下、根腐れなどの症状を示し、全世界の経済作物の病害虫被害の約 1/3 は線虫が原因であるという統計もある。

植物寄生性線虫の中でも農業上の被害が大きいサツマイモネコブセンチュウは、非常に広範な宿主範囲を持つことが知られている。この線虫の感染確立の過程には、宿主根から分泌されると考えられている「線虫誘引物質」を線虫が感知して根に接近するという過程が必須であるが、この線虫誘引物質の化学的本体については全く分かっていなかった。また、この線虫は、宿主根に侵入して定着すると、エフェクターと呼ばれる物質群を分泌して周囲の植物細胞の特徴的な分化を誘導することで、食餌に適した環境 (feeding site) を形成する。このエフェクターの有力な候補として、植物細胞の分化を調節することが知られる CLE 遺伝子のホモログであると予想される 16D10 遺伝子に由来する生理活性ペプチドの関与が示唆されていたが、生理活性を示す成熟型ペプチドの構造は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

前項に述べたように、農業上重要な害虫であるサツマイモネコブセンチュウが宿主に感染する過程には、宿主根に由来する線虫誘引活性物質と感染後に線虫が分泌する生理活性ペプチドという複数の生理活性物質が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、これらの生理活性物質を単離、構造決定し、将来的に新たな線虫防除法の開発につながる知見を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

a) 線虫誘引物質

まず、生物検定に必要となるサツマイモネコブセンチュウの培養法について検討を行い、これと並行して先行研究においてサツマイモネコブセンチュウが誘引されることが報告されていたアルファルファから調製した根浸出液を用いて、線虫誘引活性を評価する生物検定系を確立する。

この生物検定を指標として、アルファルファ根浸出液に含まれる線虫誘引活性物質を精製し、単離した活性物質の構造解析を行うことでその構造を決定する。

b) エフェクター

サツマイモネコブセンチュウを感染させた宿主植物の水耕栽培液を精製出発原料として、陽イオン交換および逆相オープンカラムクロマトグラフィーを用いた粗精製を行うことにより粗ペプチド画分を得る。さらにこの画分を逆相 HPLC で細かく分画し、各

画分を MALDI-TOFMS/MSMS で解析することにより、16D10 遺伝子に由来する生理活性ペプチドの検出、同定を目指す。

4. 研究成果

a) 線虫誘引活性物質

アルファルファの根を材料として、線虫誘引活性を検出する手法について検討した。専用に設計したゴムパッキンを 2 枚のスライドガラスで挟んだ容器を作成し、被検定試料を直径約 2mm の寒天玉 (2% 寒天) に浸透させたものをその容器中に固定し、これを軟寒天 (0.5% 寒天) で包埋した。この装置中に 200 頭程度のサツマイモネコブセンチュウを放ち、軟寒天中に侵入したサツマイモネコブセンチュウのうち被検定試料の浸透した寒天玉に誘引されるものの割合を算出することで誘引活性を評価した。アルファルファ根の浸出液を用いた生物検定では、有意な線虫誘引活性が観測されたことから、誘引活性を検出する生物検定系を確立することができたと判断した (図 1A, B)。

次に、アルファルファの根浸出液を被検定試料として、誘引物質の物性の検討を行った。種々の検討を行う過程で、アルファルファ根の破砕液を 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌すると活性が大きく低下することが明らかになった。この結果から、この系において観測される誘引活性はアルファルファ根浸出液に含まれる細菌に起因する可能性について検討した。アルファルファ水耕栽培液から細菌を単離し、その培養液を用いて誘引活性検定を行った結果、誘引活性を示す複数の菌を発見し、さらに 16S DNA 配列の解析により菌種を同定した (図 1C)。この結果は、サツマイモネコブセンチュウの宿主根への誘引に、おそらく宿主植物根の近傍に生息する土壤細菌が生産する物質が関与しているという、これまでの仮説とは異なる誘引モデルの存在を強く示唆している。

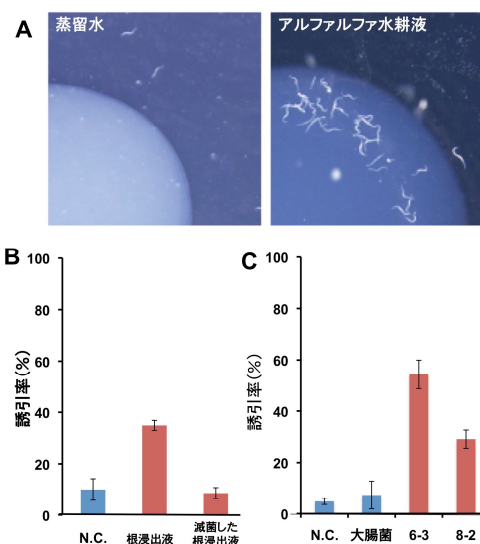


図1 (A) 線虫誘引活性を評価する生物検定法。写真左下は試料溶液に浸漬した寒天玉。(B) アルファルファ根浸出液とそれを濾過滅菌したものの線虫誘引活性。(C) 単離した土壤細菌の培養液の線虫誘引活性。

そこで、単離した線虫誘引物質生産菌のうち一株を培養し、その培養上清を生物検定に供した結果、有意な線虫誘引活性を示すことが明らかになった。さらに、培養上清を用いて活性物質の化学的性質に関する種々の予備的検討を行った結果、活性物質は逆相樹脂にほとんど吸着されない高極性物質であり、分画分子量 30kDa の限外濾過膜を通過することのできない高分子化合物であることが明らかになった(図2)。

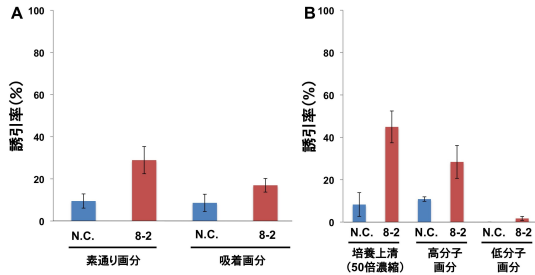


図2 (A) 逆相樹脂を用いて分画した細菌培養上清の線虫誘引活性。主要な活性は素通り画分に観察された。(B) 限外濾過膜を用いて分画した細菌培養上清の線虫誘引活性。主要な活性は高分子画分に観察された。

これらの情報をもとに活性物質の精製法について種々検討を行い、活性物質を単離する手法を確立した。単離した活性物質の¹H-NMR スペクトルを測定したところ、3-5.2ppm に多糖に特徴的な非常にブロードなシグナルが多数観測された。さらに、1個のメチル基と複数のアセチル基に由来するシグナルが観測された(図3A)。また、酸加水分解の¹H-NMR スペクトルを糖標品のものと比較した結果、酸加水分解物中の主要成分はグルコサミンであることが明らかになり、元の構造中に複数のアセチル基が存在するという情報と考え合わせると、活性物質はN-アセチルグルコサミンを主成分とする多糖であることが示唆された。(図3B)

活性物質そのものの¹H-NMR スペクトルは

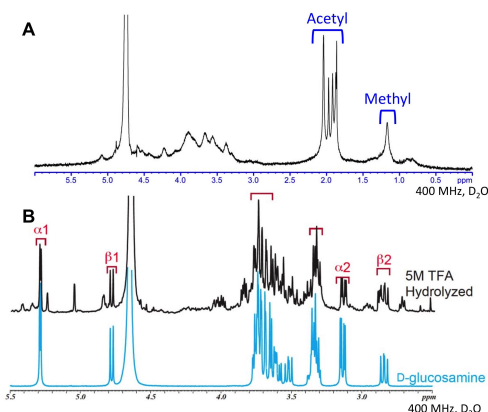
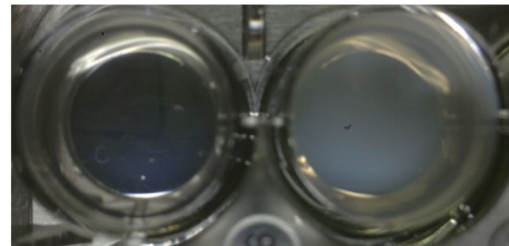


図3 (A) 精製した活性物質の¹H-NMRスペクトル。多糖に特徴的な非常にブロードなシグナルが3-5.2ppmに観測された。(B) 活性物質の酸加水分解物とD-グルコサミン標品の¹H-NMRスペクトル。

シグナルがブロードで解析困難であったため、弱い酸性条件で低分子化を行い、得られた部分加水分解物の各種二次元NMRスペクトルを測定し解析した結果、活性物質は4残基のN-アセチルグルコサミンと1残基の6-デオキシ糖からなる繰り返し構造を有する多糖であることが明らかになった。

この細菌が生産する物質が環境中で実際

に線虫誘引物質として機能するためには、この細菌が宿主植物根の周囲に局在する必要がある。この点に関して検討を行ったところ、アルファルファ根浸出液がこの細菌の増殖を強く刺激するという現象を見出した。(図4)そこで、この細菌に対する増殖刺激活性を指標として、アルファルファ根に由来する細菌増殖刺激物質(Root-Exudate-derived Microbe growth Stimulating factor, REMS factor)の単離同定を試みた。計3段階のカラムおよびHPLC精製により、複数の活性物質を同定した。



control + 根浸出液

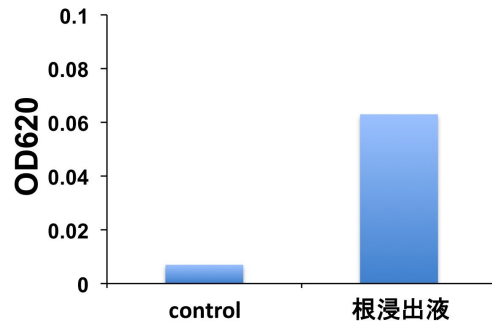


図4 根浸出液の細菌増殖刺激活性。細菌培養液に根浸出液を加えて一晩インキュベートすると、顕著な細菌増殖が観察された。

以上の結果から、宿主根から放出されるREMS活性物質により増殖した土壌細菌の生産する多糖を線虫が感知して線虫が宿主根の位置を特定するという、2種の生理活性物質を介した3生物間の相互作用による新しい線虫誘引モデルの存在が強く示唆された。

b) エフェクター

サツマイモネコブセンチュウを感染させたトマトの水耕栽培液から、粗ペプチド画分を得て、逆相HPLCで分画し、各画分をMALDI-TOFMSで詳細に解析したが、目的とするペプチドを検出することができなかった。並行して、16D10遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナ植物体からカルスを誘導し、その液体培養上清についても同様の解析を行ったが、目的とするペプチドを検出することができなかった。

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 3件)

吉田翔太郎、西川博崇、開出智美、小川舞、近藤竜彦
ネコブセンチュウの宿主根への誘引に関する生理活性物質の探索、日本農薬学会
2014 年度大会、2015.3

研究者番号：

吉田翔太郎、開出智美、岩堀英晶、近藤竜彦
ネコブセンチュウの誘引現象に関する生理活性物質の探索、日本農芸化学会
2015 年度大会、2015.3

西川博崇、小川 舞、村瀬 潤、岩堀英晶、近藤竜彦
ネコブセンチュウの誘引現象に関する宿主根由来物質の探索、日本農芸化学会
2015 年度大会、2015.3

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
近藤 竜彦 (KONDO, Tatsuhiko)

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()