

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790035

研究課題名(和文) マイクロ流路デバイスを用いたセンチュウの農作物寄生メカニズムの定量的解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis method for plant parasitic mechanisms of nematodes by using a microchannel device

研究代表者

肥田 博隆 (HIDA, HIROTAKA)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60402509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、世界中で農作物に深刻な被害を及ぼしている植物寄生性センチュウの代表種であるサツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*, 以下ネコブセンチュウ)を対象とし、マイクロ流路デバイスを用いることで、寄生にかかわる生化学的行動の新規分析手法を確立した。作製したマイクロ流路デバイス上で、アガロースゲルの導入によりネコブセンチュウが運動可能な環境を構築すると共に、拡散に伴う化学物質の濃度分布を定量的に明らかにした。本分析手法により、硝酸カリウムに対するネコブセンチュウの化学走性(濃度勾配に対する誘引、忌避行動)は、濃度勾配の値により変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Plant-parasitic nematodes substantially damage a wide variety of agricultural crops worldwide. The chemotaxis of nematodes is a key factor in their parasitic relationship with plants. Therefore, we have developed a new, efficient, and quantitative method to analyze chemotaxis of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne incognita*, using a microchannel device. We quantitatively defined time-dependent concentration gradients of chemicals in the microchannel by using fluorescein. We also developed a protocol to allow the nematodes to move around in the microchannels by loading an agarose gel with optimum concentration. Using this assay method, we have shown that potassium nitrate stimulates the behavior of *M. incognita* and can have both repellent and attractant effects, depending on the concentration gradient.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：MEMS マイクロ流路 化学走性分析 植物寄生性センチュウ MicroTAS

### 1. 研究開始当初の背景

植物寄生性センチュウによる農作物の損失は、世界全体で年間約 8 兆円と推定されている。特に、その代表種であるサツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*, 以下ネコブセンチュウ)がニンジンやトマトなどの多種多様な植物に与える被害は甚大であり、その防除対策は農業政策にとって重要な課題となっている。ネコブセンチュウの効率的な防除には、その行動や嗜好など、寄生に関わる生態の理解が必要不可欠であるにもかかわらず、根の特定部位から侵入すること以外はほとんど解明されていない。これは、体長 1 mm 未満と微小なネコブセンチュウの生態を詳細に観察し、定量的に分析、評価する実験手法が未発達であることに起因する。

### 2. 研究の目的

本研究は、微細加工技術により作製したマイクロ流路デバイスを用い、ネコブセンチュウの植物寄生に関わる物質や、その化学走性(濃度勾配に対する誘引、忌避性)を定量的に明らかにすることを目的とする。その知見をもとに、農薬に替わる環境に低負荷かつ効果的な防除対策の実現を目指し、更に将来的には、世界規模での食糧、環境問題の改善に貢献する。

### 3. 研究の方法

本研究では、微細加工技術を用いて PDMS (polydimethylsiloxane) 製マイクロ流路を作製し、以下を実施することでネコブセンチュウが植物に寄生する生化学的なメカニズム、および寄生行動と密接な関係を持つと考えられる化学走性を解明する。

(1) 行動分析用マイクロ流路デバイスの開発: マイクロ流路中にネコブセンチュウが行動可能な環境を形成し、顕微鏡下で詳細な行動観察が可能な実験系を確立する。

(2) マイクロ流路内における物質の濃度分布計測: 有限要素法に基づくシミュレーションや拡散方程式に基づく理論計算、および実験的手法から、マイクロ流路内における物質の濃度分布を定量的に評価する。

(3) ネコブセンチュウの行動を誘発する化学条件の探索: 本手法の実証として、これまでセンチュウが誘引・忌避行動を起こすと示唆された物質を用いた化学走性分析を行うと共に、より高い効果を持つ新規物質を探索する。

(4) 行動を誘発する化学環境の定量化: 対象物質の濃度分布とセンチュウの行動(誘引・忌避)との関連性を定量的に明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究で提案するマイクロ流路デバイスを用いたネコブセンチュウの行動分析手法の初期検討として、T 字型 PDMS マイクロ流路デバイスを作製した(図 1)。本デバイスは

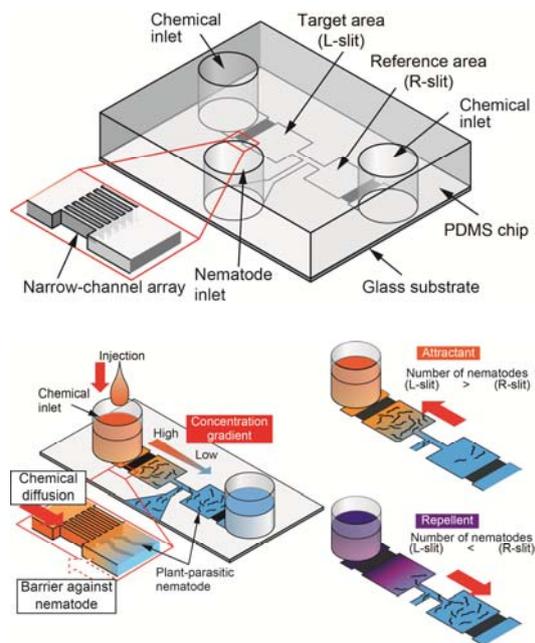


図 1 ネコブセンチュウの化学走性分析用 T 字型マイクロ流路デバイスの概略図(上)および化学走性分析の原理(下)

ネコブセンチュウの導入用リザーバ、化学物質の拡散用リザーバ、およびマイクロスリット(ネコブセンチュウの観察領域)で構成され、物質拡散用のリザーバと観察領域とは幅 5  $\mu\text{m}$  の狭流路アレイで接続されている。化学走性分析では、リザーバから狭流路を介して物質が拡散し、一定時間後、マイクロスリットに濃度勾配が形成される。この時、狭流路アレイはネコブセンチュウのリザーバへの侵入を防ぐフィルタとしての役割を果たし、その行動はマイクロスリット内に制限される。この状態において、マイクロスリット内の濃度分布とネコブセンチュウの個体数の増減との関係から、化学走性を定量的に評価することが可能となる。本デバイスは、微細加工技術であるフォトリソグラフィを用いて感光性材料 SU-8 を材料とした微細構造体を作製し、それを鋳型として PDMS へと転写する(ソフトリソグラフィ)ことで作製した。

#### (1) 行動分析用マイクロ流路デバイスの開発

マイクロ流路内でネコブセンチュウが行動できる環境条件を実験的に明らかにした。リザーバよりマイクロ流路内に低融点アガロースゲルを充填、凝固させた後、ネコブセンチュウを導入し顕微鏡で観察した。その結果、0.5~1% (w/w) ゲル中でネコブセンチュウが運動可能であることを確認した(図 2)。一方で、純水、および 0.1% (w/w) 濃度のゲル中では明確な移動が見られなかったことから、センチュウの運動には、一定以上の硬度を持つゲルやマイクロピラーなど、物理的な支持が必要であることが示唆された。本手法により、濃度分布の予測が容易な単純な形状のマ

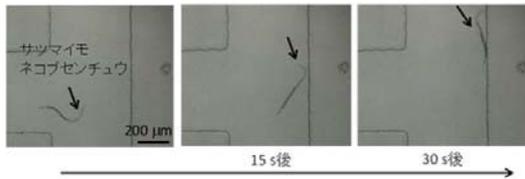


図2 アガロースゲル1%(w/w)を充填したマイクロ流路中におけるネコブセンチュウの運動

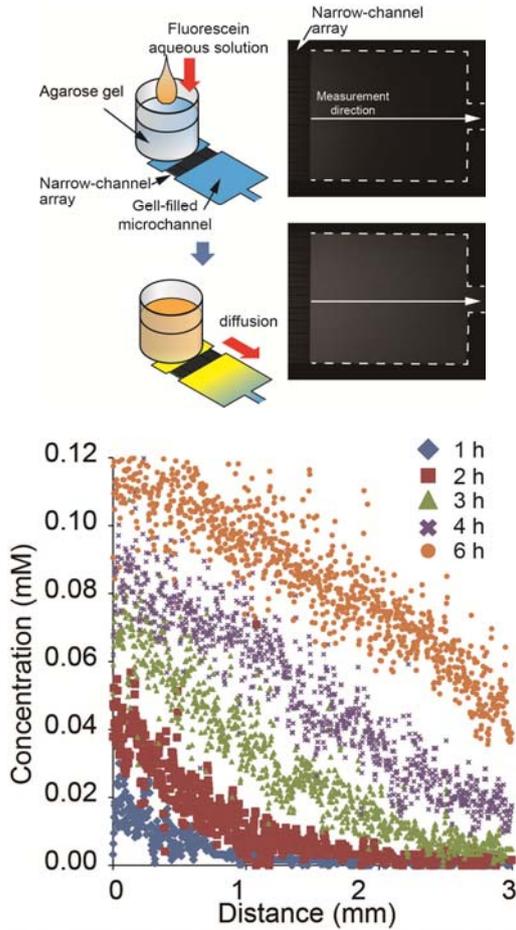


図3 フルオレセインを用いたマイクロ流路内における物質の濃度分布計測

マイクロ流路中においてネコブセンチュウの行動分析が可能となったことから、化学走性分析の定量的評価を実現する見通しを得た。

#### (2) マイクロ流路内における物質の濃度分布計測

蛍光物質の拡散による実験的評価、および拡散方程式による算出より、マイクロ流路中の濃度分布の定量的評価を行った。実験的評価では、マイクロ流路中をアガロースゲルで充填した状態で蛍光物質(フルオレセインおよびローダミンB)を拡散し、蛍光輝度を計測することで、流路内の濃度分布の計時変化を定量化に評価した。蛍光物質は狭流路アレイを介して拡散し、マイクロスリット内に一定の濃度勾配が形成、維持されることを確認した(図3)。この実験結果は拡散方程式による計算とよく一致したことから、任意の物質を用

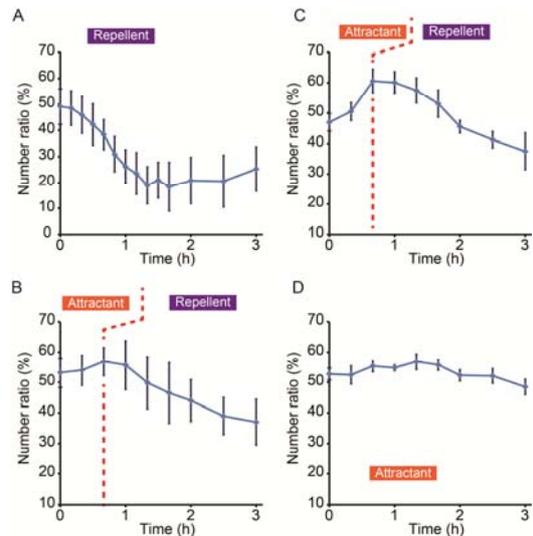


図4 硝酸カリウム水溶液に対するネコブセンチュウの化学走性(誘引性 $\geq 50\%$ 、忌避性 $< 50\%$ )。滴下濃度 A:990 mM, B:99 mM, C:50 mM, D:9.9 mM。

いた場合における濃度分布が予測可能である見通しを得た。

#### (3) ネコブセンチュウの行動を誘発する化学条件の探索

本分析手法により、ネコブセンチュウは硝酸カリウム( $\text{KNO}_3$ )により行動が誘発され、その誘引性、忌避性は濃度勾配に依存することを明らかにした。T字型マイクロ流路デバイスを用いて、ネコブセンチュウの忌避性物質として報告例がある硝酸カリウム( $\text{KNO}_3$ )を用いた化学走性分析を行った。この結果、高濃度の硝酸カリウム水溶液(990 mM,  $3\mu\text{l}$ )を滴下した場合、従来の報告例と同様、忌避行動を確認した一方で、比較的低濃度(99 および 50 mM, 各  $3\mu\text{l}$ )を滴下した場合、初期段階で誘引行動を示したのち、時間と共に忌避行動へと転じることを確認した。更に低濃度(9.9 mM)では、低い誘引性を確認した(図4)。本研究で得られた知見より、化学走性によるネコブセンチュウの行動制御を行う上で、化学物質の種類のみでなく、濃度勾配のコントロールが重要であることが示された。

#### (4) 化学走性分析のハイスループット化

T字型マイクロ流路による化学走性分析手法は原理的に単一の化学環境下におけるものであったため、分析の更なる高効率化を目指し、マイクロ流路デバイスの再設計により、ネコブセンチュウの化学走性分析のハイスループット化を実現した。本デバイスは物質拡散用リザーバ、センチュウ導入用リザーバ、および4か所の分析対象領域(以下スリット)で構成され、物質導入口とスリットとは拡散用主流路ならびに狭流路アレイで接続されている(図5)。化学走性分析では、拡散

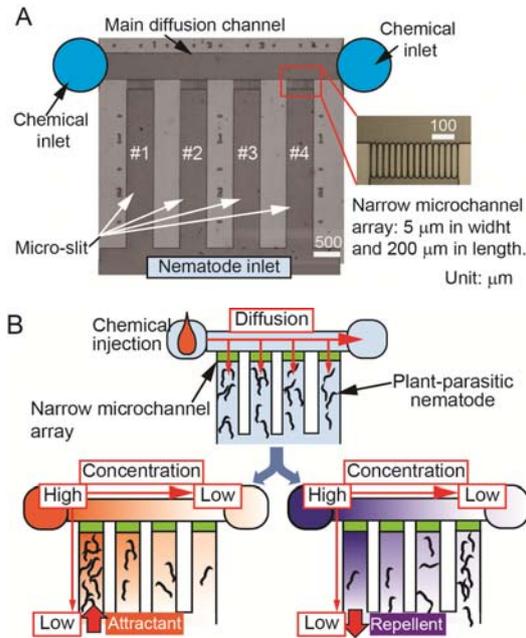


図 5 ネコブセンチュウのハイスループット化学走性分析デバイス。A: デバイスの写真 B: 化学走性の原理図

により各スリット内に 4 種の異なる濃度勾配を形成し、各スリットでのセンチュウの個体数の増減から、誘引、忌避性を評価する。

作製したマイクロ流路デバイスについて、上記(2)と同様の手法で各スリットに形成される濃度分布を計測した。この結果、4 種の異なる濃度勾配が形成され、その比率が一定時間維持されることを実験的に確認した。本デバイスによる化学走性分析の実証試験として、ネコブセンチュウを各スリット内に導入後、 $\text{KNO}_3$  水溶液  $15 \mu\text{l}$  を拡散用リザーバに滴下し、ネコブセンチュウの個体数の変動を計測した。その結果、高濃度(190 mM)を滴下した場合、全てのスリットにおいてネコブセンチュウは忌避行動を示し、滴下する硝酸カリウム水溶液の濃度の減少に従い、下流側における忌避行動の消失を確認した。このことから、本手法によりセンチュウの行動を誘発するために必要な濃度勾配の閾値を定量的に表す見通しを得た(図 6)。

本研究では、マイクロ流路デバイスによるネコブセンチュウの定量的な化学走性分析を行った。今後、本手法を応用し、植物由来物質を用いることで、生化学的な観点より植物寄生メカニズムの解明を進めることで、ネコブセンチュウの有効な防除法の実現を目指す。

この研究期間内での国内外学会講演は 9 件(国内学会 4 件、国際学会 5 件、招待講演 1 件含)であり、学術雑誌に 1 件投稿済み(2015 年 4 月時点)である。

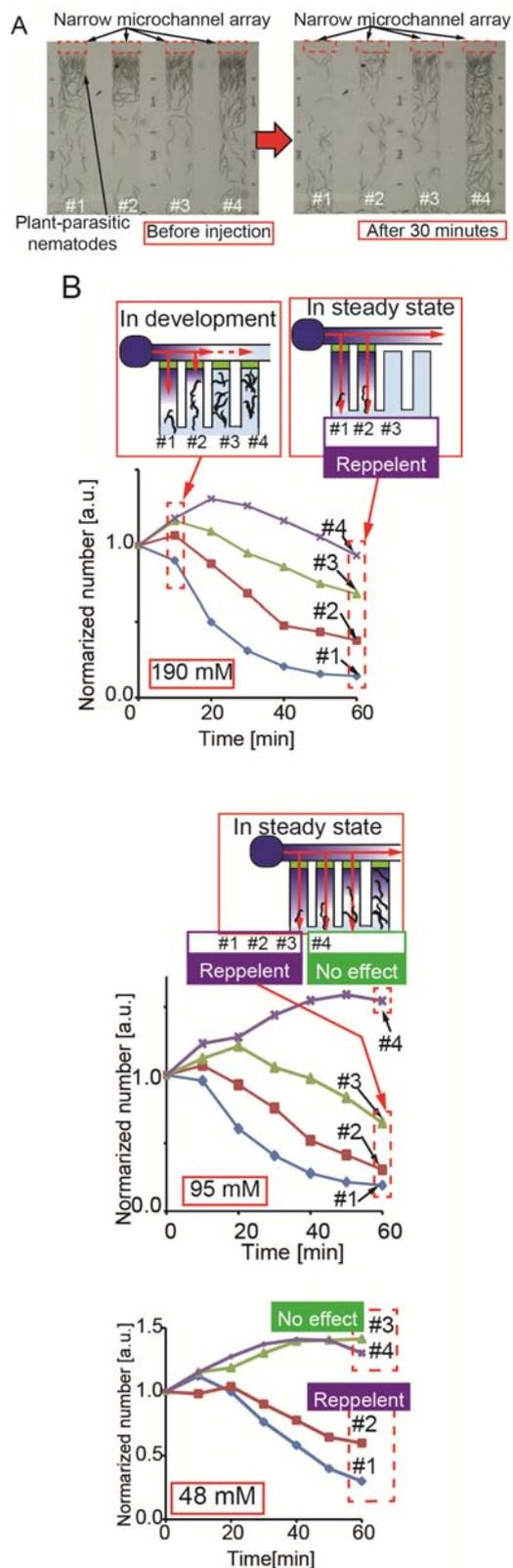


図 6 ハイスループット化学走性分析デバイスによる結果。A: 硝酸カリウム(190 mM)滴下時のネコブセンチュウの行動観察 B: 各スリットにおけるネコブセンチュウの変動。滴下した硝酸カリウムの濃度: 190 mM(上), 95 mM(中), 48 mM(下)

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 9 件)

① H. Hida, H. Nishiyama, S. Sawa, M. Notaguchi, H. Arata, T. Higashiyama, and I. Kanno, MEMS Applications in Agriculture, The International Conference on Small Science (ICSS 2014), 2014. 12. 8-11, 香港 (中国)

② H. Hida, M. Matsumura, I. Kanno, H. Nishiyama, S. Sawa, T. Higashiyama, and H. Arata, HIGH-THROUGHPUT CHEMOTAXIS ASSAY OF PLANT-PARASITIC NEMATODE TOWARD GREEN AGRICULTURE, 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014. 10. 26-30, サンアントニオ (アメリカ)

③ H. Hida, M. Matsumura, I. Kanno, H. Nishiyama, S. Sawa, T. Higashiyama, and H. Arata, High-throughput Chemotaxis Assay of Plant-parasitic Nematode by Using a Microchannel Device, International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014 "Plant Live-Cell Imaging and Microdevices", 2014. 9. 9-10, 名古屋大学 (愛知県)

④ 肥田 博隆, 松村 匡隆, 神野 伊策, 西山 英孝, 澤 進一郎, 東山 哲也, 新田 英之, 植物寄生性センチュウのハイスループット化学走性分析用デバイス, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 29 回研究会, 2014. 5. 22-23, 日本女子大学 (東京都)

⑤ H. Hida, I. Kanno, H. Nishiyama, S. Sawa, T. Higashiyama, and H. Arata, Behavior Analysis of Plant-parasitic Nematode in a Microchannel, 2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013), 2013. 11. 10-13, 名古屋大学 (愛知県)

⑥ 肥田 博隆, 西山英孝, 澤進一郎, 神野伊策, 東山哲也, 新田英之, 植物寄生性センチュウの行動分析用マイクロ流路デバイス: 流路規格および流路内物質濃度分布の検証, 第 5 回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2013. 11. 5-7, 仙台国際センター (宮城県)

⑦ H. Hida, M. Matsumura, I. Kanno, H. Nishiyama, S. Sawa, T. Higashiyama, and H. Arata, ON-CHIP CHEMOTAXIS ASSAY OF PLANT-PARASITIC NEMATODE TOWARDS INCREASING GLOBAL CROP PRODUCTIVITY, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences

(MicroTAS 2013), 2013. 10. 27-31, フライブルク (ドイツ)

⑧ 西山英孝, 肥田 博隆, 戸高 晃彦, 江島千佳, 相良知実, Bui Thi Ngan, 澤進一郎, サツマイモネコブセンチュウに対する誘引忌避物質探索, 2013 年度日本線虫学会大会 (第 21 回大会), 2013. 9. 5-6, 唐津市民交流プラザ (佐賀県)

⑨ 肥田 博隆, 西山英孝, 澤進一郎, 東山哲也, 新田英之, 植物寄生性センチュウの化学走性分析用マイクロ流路デバイス, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会, 2013. 5. 23-24, 東北大学 (宮城県)

[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

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/eng-dynamics/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥田 博隆 (HIDA, Hirotaka)  
神戸大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 60402509

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし