

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14913

研究課題名（和文）植物寄生性線虫の感染過程における宿主根認識機構の解明

研究課題名（英文）Studies on the attraction mechanism of the plant parasitic nematodes.

研究代表者

近藤 竜彦（Kondo, Tatsuhiko）

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：30362289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：農業被害の大きい植物寄生性線虫であるサツマイモネコブセンチュウの感染性幼虫が、宿主である植物の根を探索する仕組みについて研究を行い、土壌中に生息する細菌の中に線虫を誘引する細菌が存在し、その細菌が植物の根の周囲で増殖することを、土壌細菌のスクリーニングと次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を組み合わせることで明らかにした。さらに、土壌細菌が線虫を誘引する仕組みについても明らかにした。これらの結果は、植物から分泌される物質によって根の周囲で線虫誘引細菌が増殖し、そこへ線虫が誘引されるという、植物と細菌と線虫の三者間相互作用による新規な線虫誘引モデルの存在を強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで未解明であった植物寄生性線虫の感染機構の一端が明らかになった。植物寄生性線虫による農業被害は年間数十兆円とも言われておりその半分はサツマイモネコブセンチュウによるものである。一方で、従来主流であったガスを使った土壌燻蒸はその危険性と環境負荷の大きさから規制が強化されており、新規で安全な線虫防除法の開発が急務である。本研究により明らかになった線虫誘引機構を応用することで、土壌中のサツマイモネコブセンチュウのみを特異的に誘引し殺虫する、効果が高く環境負荷の小さい殺線虫剤の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, the mechanisms how the infective juveniles of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) are able to find the root tips of the host plants in soil were investigated. We found several isolates which can attract the nematodes by the screening of soil microbiome and elucidated the mechanism of the attraction. We also discovered that a part of the nematode-attracting bacteria proliferated in the rhizosphere of the host plant by using metagenomic analysis. These data indicate the novel attraction mechanism based on the interaction between host plants, bacteria, and nematodes.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物寄生性線虫 サツマイモネコブセンチュウ 誘引物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は、広範な宿主植物の根に寄生して植物の成長を阻害し枯死させる農業上非常に重要な害虫である。植物寄生性線虫による農業被害は年間 8 兆円とも 40 兆円とも言われており、その約半分はサツマイモネコブセンチュウによるものである。線虫の防除にはガス状の燻蒸剤が用いられてきたが、作業者に対する危険性や環境負荷の大きさから規制が強化されており、新たな線虫防除法の開発が急務である。

(2) 卵から孵化したサツマイモネコブセンチュウの 2 齢幼虫 (J2) は、宿主植物の根を探索しながら土壤中を移動し、根を発見するとそこへ侵入して寄生関係を築き、植物から養分を奪って成長する。J2 が宿主の根へ接近する際には、植物根から分泌される「線虫誘引物質 (Attractant)」が重要な役割を果たしていると考えられており、線虫誘引物質を利用すればサツマイモネコブセンチュウを選択的に誘引殺虫することが可能になる。この植物根から分泌される線虫誘引物質の精製を試みた研究が複数あるが単離に至った例はなく、植物寄生性線虫が根に到達し感染する仕組みは未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 我々はサツマイモネコブセンチュウの感染機構を研究する過程で、土壌から単離した細菌の中に線虫誘引活性を示すもの (線虫誘引細菌) が存在することを発見した。この線虫誘引細菌が生産していると考えられる線虫誘引物質を明らかにする。

(2) 土壌中における線虫誘引現象において、線虫誘引細菌が実際に関与しているのかどうかを明らかにするために、土壌菌叢のメタゲノム解析によって植物根の周囲 (根圏) において線虫誘引細菌が増殖しているかどうかを明らかにする。また、植物根から分泌されこれらの細菌の増殖を刺激する物質 (Root-Exudate-derived Microbe growth Stimulating factor, REMS factor) を明らかにすることで、植物-細菌-線虫の三者間相互作用による新しい線虫感染モデルが存在することを示す。

3. 研究の方法

(1) 土壌から単離した線虫誘引細菌を培養し、細菌が生産していると考えられる線虫誘引物質を抽出する。我々が確立した線虫誘引活性試験を指標として活性物質を精製、単離してその構造を明らかにする。

(2) 土壌から線虫誘引細菌をスクリーニングし多数の線虫誘引活性を示す単離株を得て、16S rDNA 配列を解析してカタログ化する。これと並行して、アルファルファの根から得られた浸出液を土壌に添加し、経時的に土壌をサンプリングしてメタゲノム解析を行うことで、根浸出液に応答して増殖が促される細菌群を同定する。この 2 群のデータを比較することにより、根圏において線虫誘引細菌が増殖しているかどうかを調べる。

(3) 注目している線虫誘引細菌が土壌菌叢中でその割合を増加させているかどうかを簡便に調べる手法を、定量的 PCR を用いて確立する。この手法を生物検定として用いて、植物根から分泌され、線虫誘引細菌の増殖を刺激する REMS factor を精製、単離し、その構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 土壌から単離した線虫誘引細菌単離株のうち、最も高頻度で単離され安定した誘引活性を示す C1 株を用いて、この細菌が生産する線虫誘引物質の抽出を試みた。一般的な有機溶媒抽出に加え、菌体の凍結破砕、揮発性成分の固相抽出など様々な手法を用いて抽出を試みたが、線虫誘引活性を示す抽出物は得られなかった。

その試行錯誤の過程で、リン酸緩衝液が濃度依存的に C1 株による線虫誘引を阻害することを発見した。この現象は同濃度の MOPS 緩衝液では観察されなかったことから、リン酸の緩衝能が原因ではなく、リン酸により線虫誘引物質が不活性化されていることが示唆された。そこで、リン酸と不溶性の塩を形成することが知られている鉄イオンの関与を疑い、硫酸鉄を用いて線虫誘引試験を行ったところ、硫酸鉄は有意な線虫誘引活性を示した (図 1A)。また、各種金属イオンを陽

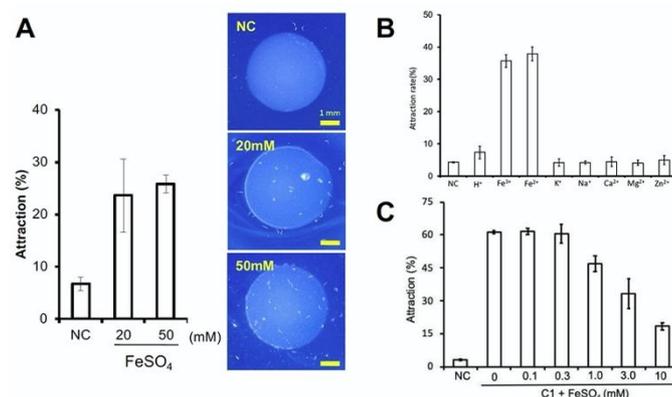


図1 サツマイモネコブセンチュウは細菌が可溶化する鉄イオンに誘引される。A: 硫酸鉄 (II) の線虫誘引活性、B: 各金属イオンを保持させた陽イオン交換樹脂の線虫誘引活性、C: 線虫誘引細菌C1株の線虫誘引活性は硫酸鉄 (II) によって濃度依存的に阻害される。

イオン交換樹脂に吸着させたもので線虫誘引試験を行った結果、鉄イオンのみが活性を示し、鉄イオンが活性本体であることが明らかになった(図1B)。さらに、硫酸鉄を添加することでC1株による線虫誘引現象が濃度依存的に阻害されたことから、C1株による線虫誘引にはC1株によって可溶化された鉄イオンが関与していることが強く示唆された(図1C)。

鉄イオンを線虫誘引剤として利用しようとする、可溶性の Fe^{2+} が空気酸化によって容易に不溶性の Fe^{3+} へと変換されることが問題となる(前述のようにC1株から活性画分を抽出することができなかったのも、抽出の過程で鉄イオンが酸化されて不溶化したことが原因であると予想される)。種々の検討から、 Fe^{2+} をフミン酸に保持、徐放させる手法を確立した。フミン酸に保持させた Fe^{2+} を土壌に埋設し、サツマイモネコブセンチュウを土壌中に放って線虫誘引試験を行った結果、未滅菌の土壌中でも鉄イオンが有意な線虫誘引活性を示した(図2)ことから、今後は圃場レベルで線虫を誘引駆除する手法の開発に寄与することが期待される。

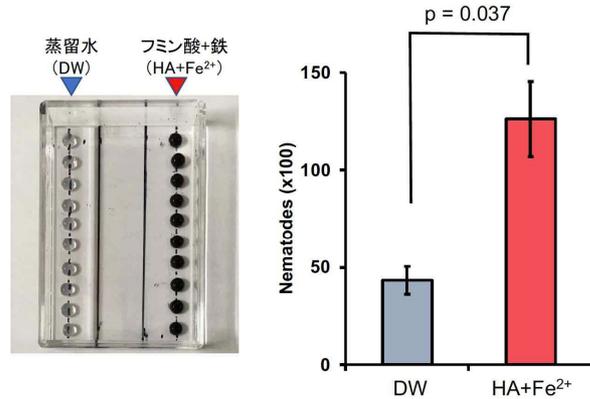


図2 土壌における鉄イオンの線虫誘引作用。蒸留水および鉄を吸着したフミン酸懸濁液で寒天玉を作成し、装置の両端に配置した。寒天玉の上に未滅菌の土壌を被せ、装置中央部に線虫を放ち、両端へ移動した線虫を計数した。

以上の結果を基に、特許申請を行い、2023年に特許を取得した(特許第7236132号)。また、上記の成果をまとめて発表した日本農芸化学会2019年度大会においてトピックス賞を受賞した。

(2)土壌から単離した細菌株を用いて、線虫誘引活性を指標としたスクリーニングを行い、7属36株の線虫誘引細菌を単離し、16S rDNA配列を解析してカタログ化した。並行して、土壌にアルファルファの根から調製した根浸出液を添加し、土壌菌叢の経時変化をメタゲノム解析した結果、複数の細菌(OTU)が、根浸出液に反応してその存在比を増加させることが明らかになった(図3A)。線虫誘引細菌の情報とメタゲノム解析の結果を照合した結果、線虫誘引細菌(厳密には線虫誘引細菌とほぼ同じ配列のOTU)の多くが、根浸出液に反応して土壌菌叢中の存在比を増加させることが明らかになった(図3B)。

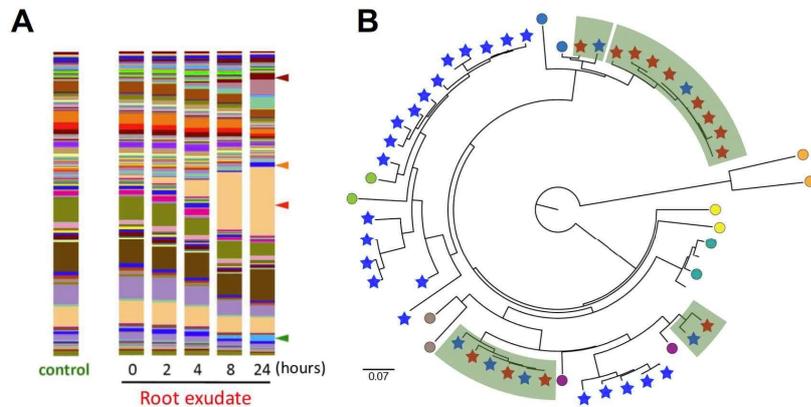


図3 A: アルファルファの根から調製した浸出液は土壌菌叢を短時間で変化させる。B: 線虫誘引細菌(赤)と根浸出液に反応して菌叢中で存在比を増加させるOTU(青)は非常によく一致する。

以上の結果から、根浸出液に含まれる物質(REMS factor)に反応して、根圏において線虫誘引細菌が増殖し、線虫誘引細菌によって土壌から可溶化される鉄イオンが線虫誘引物質として作用するという、植物-細菌-線虫の三者間相互作用による新規な線虫誘引モデルの存在を明らかにした。

(3)植物根から分泌され、線虫誘引細菌の増殖を刺激するREMS factorについては、細菌種によって異なることが明らかになった。前述のメタゲノム解析において、根浸出液の代わりに根浸出液に含まれるアミノ酸組成を再現したアミノ酸混合液を添加したところ、単離した線虫誘引細菌の一つであるC1株は根浸出液の場合と同様にその存在比が増加したことから、C1株におけるREMS factorは根浸出液に含まれるアミノ酸であることが明らかになった(図4)。一方で、同じく線虫誘引活性を示すB1株においてはC1株のようなアミノ酸への反応が観察されなかったことから、アミノ酸とは別にB1株にとってのREMS factorが存在することが示唆された。

そこで、土壌菌叢中におけるB1株の存在比の変化を定量的PCRを用いて解析する系を確立し、これを指標として根浸出液中に含まれるB1株のREMS factorの精製を試み、活性物質として2種の低分子有機化合物を単離、同定した(現在、特許申請準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井田和輝、近藤竜彦、小鹿 一
2. 発表標題 植物根圏における土壌細菌の増殖を刺激する物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井田和輝、樋口侑夏、西川博崇、近藤竜彦、小鹿 一
2. 発表標題 根圏におけるBacillus属細菌の増殖刺激物質の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田和輝、近藤竜彦、小鹿 一
2. 発表標題 根圏細菌の増殖を刺激する物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田和輝、吉田翔太郎、西川博崇、開出智美、伊藤晋作、石毛太一郎、岩堀英晶、近藤竜彦、小鹿 一
2. 発表標題 ネコブセンチュウの誘引機構の解明とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田和輝, 吉田翔太郎, 西川博崇, 開出智美, 伊藤晋作, 石毛太一郎, 岩堀英晶, 近藤竜彦, 小鹿一
2. 発表標題 土壌細菌を介したネコブセンチュウの誘引現象
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口侑香, 西川博崇, 伊藤晋作, 石毛太一郎, 近藤竜彦, 小鹿一
2. 発表標題 根浸出液に由来する枯草菌増殖刺激物質の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 吉田翔太郎, 西川博崇, 開出智美, 岩堀英晶, 近藤竜彦, 小鹿一
2. 発表標題 ネコブセンチュウの誘引現象に関する生理活性物質
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤竜彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 248
3. 書名 最新農業技術土壌施肥vol.12	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 線虫誘引剤	発明者 近藤竜彦	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、7236132	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

本研究で取得した特許第7236132号については、取得まで時間がかかり2023年に取得いたしました。「産業財産権」の項目の取得年につきましては2023年と記すべきところ、フォームが2020年までしか受け付けなかったため「2020年」と記しました。

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------