

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380029

研究課題名(和文)植物寄生性線虫の寄生阻害物質の探索・同定とその寄生阻害機作の解明

研究課題名(英文)Detection, identification and mechanism of defense-related molecule for plant parasitic nematodes.

研究代表者

水久保 隆之(MIZUKUBO, Takayuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター病害虫研究領域・上席研究員

研究者番号：30370513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円、(間接経費) 3,990,000円

研究成果の概要(和文)：ジャスモン酸を処理した植物より、テルペン化合物のスクラレオールを単離した。スクラレオールを処理した植物では、ネコブセンチュウの侵入数が有意に低下し、植物体内のエチレンが上昇した。シロイヌナズナのエチレン欠損体(ein2-1)にスクラレオールを処理して野生株と比較すると、ein2-1株ではネコブセンチュウ侵入抑制効果がなく、ニグリンが集積せず、リグニンの生合成に關与する遺伝子経路の発現がなかった。リグニンの蓄積が起きないシロイヌナズナ変異体(ccr2)にスクラレオールを処理したときにも、線虫の侵入は抑制されなかった。スクラレオールの線虫抑制機作は根の硬化誘導による侵入阻害だと示唆される。

研究成果の概要(英文)：We focused on sclareol, a natural labdane-type diterpene known as the antimicrobial and defense-related molecule, and investigated whether and how sclareol application on plant body inhibits RKN infection to tomato and Arabidopsis roots. Plants that received sclareol application suppressed RKN infection, except for the ethylene (ET) insensitive mutant ein2-1. Exogenously applied sclareol enhanced EIN2-dependent pathway and induced expression of lignin biosynthetic genes in roots of the plant. Accumulation of lignin in the roots which was caused by the activation of phenylpropanoid pathway resulted in suppression of invasion of RKN. Sclareol-induced RKN resistance was compromised in the Arabidopsis mutant deficient in a lignin biosynthetic gene, suggesting that lignin is involved in the sclareol-induced resistance against RKN.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ジャスモン酸 線虫侵入抑制物質 ネコブセンチュウ トマト スクラレオール シロイヌナズナ
ニグリン エチレン

1. 研究開始当初の背景

世界農業に及ぼす年間被害額が数千億円以上と見積もられている植物寄生性線虫は、現在、長期間にわたって安定的な防除効果を発揮する方法が確立されていない。植物寄生性線虫の多くは土壤中に生息し、植物根に寄生する。植物は線虫に寄生されることで、養分吸収や通水を阻害され、萎凋や枯死を起こす。

植物寄生性線虫の中でも、最も甚大な被害を引き起こすのが 700 種以上の宿主範囲をもつネコブセンチュウ (*Meloidogyne* 属) とされている。ネコブセンチュウは体長 0.4 mm、体幅 0.015 mm 程の円筒状の生物である。植物根に寄生したセンチュウは寄生部位に巨大細胞を誘導し、そこから養分を得る定着生活に入る。巨大細胞の周辺組織は増殖し、センチュウ寄生部位は大きくこぶ状に膨らむとともに、新たな分岐根の発達が損なわれ、通水や養分吸収が阻害される。ネコブセンチュウに対しては主に抵抗性品種の栽培と土壤消毒剤による防除が行われている。しかしながら、抵抗性を打破する線虫系統の出現によって抵抗性品種による防除は無効化されることが多い。また、土壤消毒に関しても、土壤深層に生息する線虫まで消毒することが出来ず、残存した線虫による寄生被害を防ぐことが困難である。そのため、早急な新たな防除方法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

ネコブセンチュウは植物へと寄生する際、タンパク質を分泌し、それをシグナル物質として寄主の防御反応抑制や巨大細胞の誘導を行っている。センチュウが寄生するためには分泌タンパク質の複雑な集合体の関与が必須であると考えられており (Jaubert et al., 2002; Huang et al., 2003)、機能が異なる 60 種以上のタンパク質が同定されている。また、寄生後は皮膚から抗酸化酵素を放出して寄主からの酸化反応に対抗していることが明らかにされている (Robertson et al., 2000; Prior et al., 2001; Jones et al., 2004)。また、ネコブセンチュウは植物の存在によって移動や生態が変化することが知られている。植物存在下でのネコブセンチュウの移動に比べ、土壤水流の身による移動は非常に小さく、宿主植物の根分泌物がネコブセンチュウの孵化や運動を賦活化することも知られている (Fujimoto et al., 2009, 2010; Oka and Mizukubo, 2009)。したがって、ネコブセンチュウの生活環には植物の存在が極めて大きく影響すると考えられているが、ネコブセンチュウを誘引もしくは忌避するような物質の特定はいまだなされていない。ところで、近年、糸状菌や細菌、ウイルス等の病原体に対する植物の抵抗性反応において、植物ホルモンがシグナル物質として機能することが知られている。ネコブセンチュウに対する抵抗性反応も例外ではなく、植物は

ホルモンの 1 種であるジャスモン酸をシグナル物質として使用していることが示唆されている。ジャスモン酸を外部施与した植物に対するネコブセンチュウの侵入が低下することも明らかとなっている (Fujimoto et al., 2010)。しかしながら、ジャスモン酸自体にはネコブセンチュウの移動制限もしくは殺虫活性等はない。これらのことより、植物がジャスモン酸処理をきっかけとして、ネコブセンチュウの侵入抑制に関わる物質を放出しているのではないかと考えられる。そこで、本研究課題では、ジャスモン酸処理した植物からネコブセンチュウ侵入抑制物質の単離・同定を行うとともに、植物-センチュウ間における抑制物質がもたらす侵入抑制メカニズムの解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ネコブセンチュウの 1 種であるサツマイモネコブセンチュウを供試線虫とした。ネコブセンチュウの宿主にはトマトとシロイヌナズナを用いた。

宿主植物にジャスモン酸を処理し、センチュウ寄生抑制能の上昇を指標に、生化学的手法により精製単離した。単離した物質は機器分析による構造解析を行った。さらに、単離した物質の殺線虫効果の有無やセンチュウに対する生理応答の変化、植物に対する生理応答の変化を分子遺伝学的・生化学的手法による解析を通じて、センチュウ寄生抑制の制御機構を明らかにした。

具体的な研究手法は以下のとおりである。まず、ジャスモン酸処理した植物根より酢酸エチル可溶性画分を抽出し、センチュウ侵入抑制活性を有する画分の特定を行った。線虫侵入抑制検定は本葉 2 枚展開期のトマトを用い、濃度別に画分をトマトに処理した。画分処理からそれぞれ 1 日、2 日、3 日経過した後、センチュウをトマト株元に接種した。センチュウ接種から 1 週間後、植物の生長を評価するとともに根内部のセンチュウ数を計数した。計数後、センチュウの根への侵入抑制効果が大きかった画分を高速液体クロマトグラフィにて再度極性ごとに分画する。再分画後、上記と同様の実験手続きによってセンチュウ侵入抑制効果を評価した。以上をバイオアッセイ系として、センチュウの根への侵入を抑制する物質の単離を行った。単離した物質は NMR 等の機器分析に供し、構造を確定した。構造確定後は合成品を作成し、植物に処理した時に植物がネコブセンチュウ侵入抑制能を有するか検定を行った。また、侵入抑制物質が殺ネコブセンチュウ効果を持つかどうか評価した。

さらに、ネコブセンチュウ侵入抑制物質を処理した時に、発現が変化する遺伝子の評価を行うとともに、侵入抑制物質の処理前後のトマトの根における細胞形態学的な変化を評価した。

4. 研究成果

ジャスモン酸を処理した植物より、ネコブセンチュウ侵入抑制物質であるスクラレオールの単離に成功した(図1左)。スクラレオールは植物体内で産生されるテルペン化合物の1種である。スクラレオールを外部施与した植物において、ネコブセンチュウの侵入数が有意に低下した。スクラレオールの構造類縁体であるスクラレオライド(図1右)を処理した植物ではネコブセンチュウの侵入が抑制されることはなかったことから、ネコブセンチュウ侵入抑制効果はスクラレオール特異的な反応であることが示唆された(図2)。



図1 スクラレオールおよびスクラレオライドの構造式

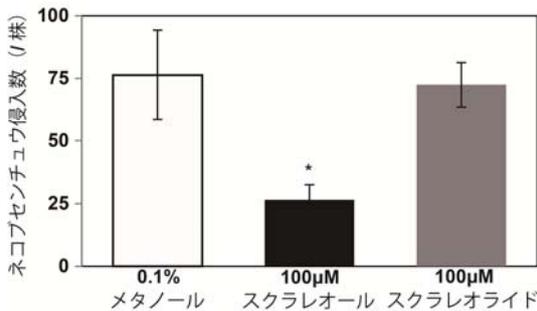


図2 各薬品処理したトマトに対するネコブセンチュウ侵入数

スクラレオール処理によって、植物体内で産生される植物ホルモン量変化を評価したところ、エチレンの上昇がみられた(図3A)。エチレンはジャスモン酸と協調的に反応がおこることが知られている植物ホルモンである。各種植物ホルモン伝達経路欠損変異体(シロイヌナズナ)にスクラレオールを処理したところ、エチレン欠損体(ein2-1)のみ、ネコブセンチュウ侵入抑制効果がみられなかった(図3B)。上記より、スクラレオールの植物体内における反応にはエチレン伝達経路が関与していることが示唆された。

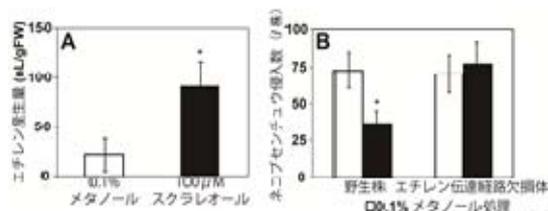


図3 スクラレオール処理によるエチレン内生量の変化と各薬品処理したシロイヌナズナに対するネコブセンチュウ侵入数

スクラレオールを処理したシロイヌナズ

ナの根における遺伝子発現解析を行ったところ、野生株では根の木化を誘導する物質であるリグニンの生合成に関与する遺伝子経路の発現がみられたが、ein2-1では発現が起きていなかった。リグニンの蓄積を観察すると、スクラレオール処理によって、野生株の根ではリグニンの蓄積が観察されたが、ein2-1で観察できなかった(図4A)。リグニンの蓄積が起きないシロイヌナズナ変異体(ccr2)にスクラレオールを処理すると、線虫の侵入が抑制されなかった(図4B)。以上の結果から、線虫抵抗性誘導物質候補の1種であるスクラレオールは、植物に処理すると、根の硬化を誘導し、線虫の侵入を妨げることが示唆された。

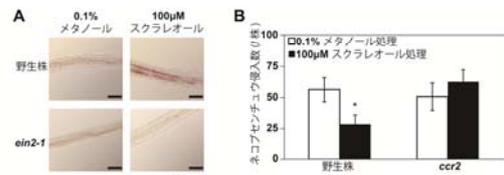


図4 スクラレオール処理されたシロイヌナズナにおけるリグニン蓄積と各薬品処理したシロイヌナズナに対するネコブセンチュウ侵入数

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計13件)

①藤本岳人、安部洋、水久保隆之、瀬尾茂美、スクラレオール処理された植物はリグニン化を誘導し、サツマイモネコブセンチュウの感染を抑制する、第58回日本応用動物昆虫学会大会、2014年3月27日、高知大学(高知県高知市)

②Shigemi Seo, Naoto Tajima, Mika Murata, Taketo Fujimoto, Takayuki Mizukubo, Ichiro Mitsuhashi, Atsushi Mochizuki, Plant-derived terpene-related compounds that induce resistance against insect herbivores and diseases、第55回日本植物生理学会年会、シンポジウム発表、2014年3月19日、富山大学(富山県富山市)

③Fujimoto T, Abe H, Mizukubo T, Seo S (2014) The diterpene sclareol represses the root-knot nematode infection through induction of ethylene-dependent lignification in Arabidopsis 第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学(富山県富山市)

④藤本岳人、安部洋、水久保隆之、瀬尾茂美、スクラレオールを処理された植物におけるサツマイモネコブセンチュウ感染抑制メカニズムの解明、日本線虫学会第21回大会、佐賀市、2013年9月6日、唐津市民交流プラザ(佐賀県唐津市)

⑤藤本岳人、瀬尾茂美、安部洋、水久保隆之、サツマイモネコブセンチュウの感染を抑制する植物由来物質の同定、第57回応用動物昆虫学会、2013年3月28日、日本大学(藤沢市)

⑥藤本岳人、瀬尾茂美、安部洋、水久保隆之、Exogenous application of a natural

diterpene induces resistance to root-knot nematode in Arabidopsis and tomato through activation of the host defense, 第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 22 日、岡山大学（岡山県岡山市）

⑦瀬尾茂美、作物の重要病害を抑える天然物質の探索の試み、平成 24 年度関東東海・北陸農業研究推進会議・関東東海病害虫 病害・虫害・鳥農獣害研究会（招推待進講演会演説）、2013 年 2 月 7 日、農林水産技術会議筑波事務所（茨城県つくば市）

⑧水久保隆之、微生物処湾誘導抵抗性によるナス科花菜類のネコブセンチュウ防除技術、日本線虫学会第 20 回大会、20 周年記念シンポジウム 2 新しい環境保全型センチュウ防除技術、2012 年 9 月 19 日、研究交流センター（茨城県つくば市）

⑨藤本岳人、安部 洋、瀬尾茂美、水久保隆之、The repressing effect of root-knot nematode (Meloidogyne incognita) infection by a natural terpene application in Arabidopsis thaliana and tomato, 2012、IS-MPMI 2012 XV International Congress Program Book, 2012 年 7 月 29 日、同国立京都国際会館（京都府）

⑩瀬尾茂美、効率的探索法による植物病害抵抗性誘導物質の探索と防除におけるその利用に向けた取り組み、第 2 回植物生理科学シンポジウム、2012 年 7 月 12 日、北海道大学（札幌市）

⑪瀬尾茂美、作物の重要病害を抑える天然由来の抵抗性誘導物質の探索と防除への利用、Bio tech 2012 アカデミックフォーラム、2012 年 4 月 26 日、東京ビッグサイト（東京都）

⑫藤本岳人、安部洋、瀬尾茂美、水久保隆之、シロイヌナズナ及びトマトにおけるサツマイモネコブセンチュウ感染数を減少させる天然テルペン化合物の同定、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学（京都府）

⑬藤本岳人、安部洋、瀬尾茂美、水久保隆之、シロイヌナズナ及びトマトにおけるサツマイモネコブセンチュウ感染数を減少させる天然テルペン化合物の同定、日本線虫学会第 19 回大会、2011 年 9 月 15 日、京都市国際交流会館（京都府）

〔その他〕

ホームページ等

① 瀬尾茂美、五味剣二、加来久敏、安部洋、瀬戸秀春、中津信吾、関正博、小林光智衣、中保一浩、一瀬勇規、光原一朗、大橋祐子、水久保隆之、藤本岳人、森脇明弘、高垣真喜一、作物の重要病害である青枯病を抑える天然物質の同定、2013 研究成果情報、<http://www.nias.affrc.go.jp/seika/nias/h24/nias02406.html>

② 日本農業新聞 「トマト青枯病 抵抗性成分を抽出 生物研タバコ葉から」平成 25 年 10 月 3 日（注：スクラレオールがトマト

青枯病やネコブセンチュウに対する抵抗性を誘導することを紹介した記事）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水久保 隆之 (MIZUKUBO, Takayuki)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター病害虫研究領域・上席研究員
研究者番号：30370513

(2) 研究分担者

瀬尾 茂美 (SEO, Shigemi)
独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任研究員
研究者番号：80414910