学術奨励賞受賞者研究要旨

植物寄生性線虫の系統分類と寄生機構に関する分子生物学的研究[†]

植 原 健 人^{*}

UEHARA, T.^{*}: Molecular phylogenetic analysis and characterization of secretory enzyme genes of the plant parasitic nematodes

ネグサレセンチュウ属は、植物体の地下部に侵入し、組織内を移動しながら摂食を続け、組織を崩壊・腐敗させる農業上重要な植物寄生性線虫である。線虫防除では、対抗植物・非寄主を組み合わせた輪作体系の導入が進められているが、それらの防除法は、有効である対象線虫が特定の種類に限

られ、事前に線虫種の同定が必要である。本属の線虫は微細な形態的特徴により同定されているため高度な熟練と時間を要する。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いた同定法を検討した。また、本属の線虫については植物体に侵入し組織を崩壊・腐敗させる機構が十分に分かっていない。線虫の植物への寄生戦略を解明するため線虫の酵素遺伝子を解析した。

1. アイソザイム及びリボゾーム DNA 塩基配列の比較

ネグサレセンチュウ属 *Pratylenchus penetrans*, *P. crenatus*, *P. loosi*, *P. vulnus*, *P. coffeae*, *P. zaei*, *P. brachyurus* の主要 7 種のうち、*P. crenatus* を除く 6 種について、リンゴ酸デヒドロゲナーゼとホスホグルコースイソメラーゼの 2 つのアイソザイム解析により、6 種のネグサレセンチュウの識別が可能であった。また、ネグサレセンチュウの rDNA 領域を PCR 増幅し、PCR-RFLP 解析を行ったところ、上記 7 種を識別することができた。さらに、PCR-RFLP 法が海外の線虫に対しても有効であることが、南米のネグサレセンチュウの調査で確かめられた。そこで、形態的に識別が困難であるネグサレセンチュウ属の rDNA の塩基配

列を決定し比較を行ったところ、ネグサレセンチュウ属内で種間の塩基配列の相同性が低いことが明らかになった。他属の線虫と比べて、ネグサレセンチュウ属の構成種は遺伝的にかけ離れていると推察された。

2. 種特異的同定法の開発

明確で迅速な同定法として、rDNA 領域の塩基配列を基に種特異的プライマーを設計し、種に特異的な配列を PCR 増幅することで、短時間で重要種の種特異的同定を可能とした。さらに、リバーシ・ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法によりネグサレセンチュウ主要 7 種の同定を可能にした。これらの同定法は、形態的同定では不可能であった幼虫 1 頭からの同定を可能とした。

3. 分泌酵素遺伝子の解析

キタネグサレセンチュウ *P. penetrans* の緩衝液抽出液に、セルラーゼ活性の存在を確認した。そこで既知のセルラーゼ遺伝子の保存領域から RT-PCR と RACE 法により、2 つの *Pp-eng-1*, *Pp-eng-2* と名付けた全長 cDNA を単離した結果、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列は細菌の β -1,4-エンドグルカナーゼと高い相同性を示した。またゲノム配列を解析した結果、これらの遺伝子にはイントロンが存在しており、さらにサザン解析の結果から考えて、共生細菌等の由来のものではなく、ネグサレセンチュウ自身が β -1,4-エンドグルカナーゼを保持していることが明らかとなった。これらの結果より、ネグサレセンチュウが口針を使用し機械的に植物体に侵入する以外に、植物体を酵素反応で分解していることが示唆される。

本研究を行うにあたり、農業技術研究機構北海道農業研

[†] 平成15年3月28日 平成15年度大会で受賞した学術奨励賞研究の要旨

^{*} 北海道農業研究センター National Agriculture Research Center for Hokkaido Region, 1 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-8555, Japan

究センター百田洋二室長，串田篤彦氏，東京農工大学寺岡
徹教授，農業技術研究機構中央農業総合研究センター高橋

賢司部長をはじめ多くの方々からご指導とご協力を頂いた。ここに心から感謝の意を表する。