

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和2年度研究奨励金交付課題)

研究課題

ワラビー萎縮症の病原物質の同定

筆頭研究者氏名 宮崎翔

所属 慶應義塾大学 理工学部 応用化学科

共同研究者名 (所属)

なし

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】

ワラビー萎縮症はフタテンチビヨコバイがイネ科植物を吸汁する際に注入される物質によって生じる植物の萎縮、すなわち矮化及び葉の隆起化である(図1)。フタテンチビヨコバイはアフリカからアジア・オセアニアの熱帯・亜熱帯にかけて広く分布し、日本においても九州中南部の飼料用トウモロコシの夏播き栽培でワラビー萎縮症による減収が問題となっている。本研究課題はこの矮化及び隆起化を引き起こす生物活性物質を生物有機化学的手法により単離・構造決定することを第一の到達目標とし、どのように両現象が植物内で引き起こされるのか化合物の視点から解明することで防除法の基盤構築や有用形質の単離に繋げることを最終目標としている。

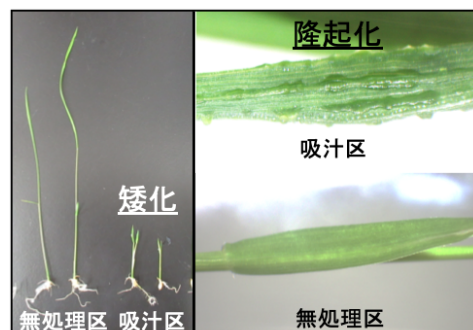


図1. ワラビー萎縮症

【方法】

先行研究ではトウモロコシを用いてワラビー萎縮症の研究が展開されていたが(Matsukura et al., *Crop Prot.*, 2009), 遺伝情報や組換え技術が整備されているイネを材料にすることにした。まず、フタテンチビヨコバイとイネを用いて研究室でのワラビー萎縮症の再現法と累代飼育法を構築した。

- ① 先行研究を参考に、フタテンチビヨコバイはイネ(コシヒカリ)を餌として累代飼育を行った(Tokuda et al., *Kyushu Plant Prot Res.*, 2003)。試験では、蓋なしの1.5 mL チューブに入れたMS寒天培地に発芽したイネ(日本晴)を1本植え、チューブを試験管(外径17.5 mm, 全長130 mm)に入れ、そこにフタテンチビヨコバイ幼虫もしくは成虫を加えて、28°C(16 h 明 / 8 h 暗)で培養し、4日後に苗丈を、10日後に葉の隆起を測定した。
- ② これまで葉の隆起に関しては目視によりその程度を3段階で区別していたが(Tokuda et al., *Kyushu Plant Prot Res.*, 2003), より公正な評価法の構築を指向し、画像解析系の導入を検討した。
- ③ 萎縮症誘発物質の単離に向けフタテンチビヨコバイ成虫(雌雄混合)を凍結粉碎し、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノール、水の各種溶媒で抽出を行うことで粗抽出物を得た。

【成果】

- ① 先行研究では土を用いて試験されていたが、植物の成長を化合物等で制御しやすい寒天系の培地を検討した。すなわち、寒天、ハーフMSとMS培地、土を用いてワラビー萎縮症の発症を確認した。試験管にイネとフタテンチビヨコバイの幼虫もしくは成虫を加え培養したところ、フタテンチビヨコバイを入れていないコントロール区と比べ、フタテンチビヨコバイを入れている全ての試験区において生育抑制(矮化)が観察された。一方、培養10日後においてMS培地やピートモスを用いた試験区で葉の隆起が観察されたが、寒天培地では認められなかった。また、幼虫も成虫と同様の傾向でワラビー萎縮症を発症できることを確認した。しかし、雌個体は試験中に産卵をするため、その物理的刺激により植物の生育に負荷がかかる傾向が見られたため、雄成虫を試験に利用することにした。次に葉の隆起が寒天培地で認められずMS培地で顕著に観察されたことに着目し、栄養成分と隆起形成の関連性を検討した。MS培地から窒素、リン、カリウム、硫黄、鉄、マグネシウム、ナトリウムの各栄養素をそれぞれ欠乏させた培地を調製し、フタテンチビヨコバイの雄成虫1匹と培養を行った。その結果、窒素源を取り除くことで隆起が認められなくなり、窒素源が隆起形成に関与していることを明らかとした(Miyazaki et al., *Plants*, 2020)。
- ② 葉の隆起は目視によりその程度を区別していた(図2左、従来法)。目視は容易であるが、より客観的かつ定量的で公正な評価法の構築を狙い画像解析系を導入した。イネの葉の断面画像をImageJで読み込み、隆起中心部から背景画像(葉の表面)への距離をユークリッド距離に換算することで256段階での評価が可能となった(図2左、新法)。その結果、隆起の変化度合を数値化することができ、さらに観察では評価の難しい数時間の吸汁による僅かな変化も数値として反映できることを確認した(図2右、Miyazaki et al., *Appl Entomol Zool.*, in press)。

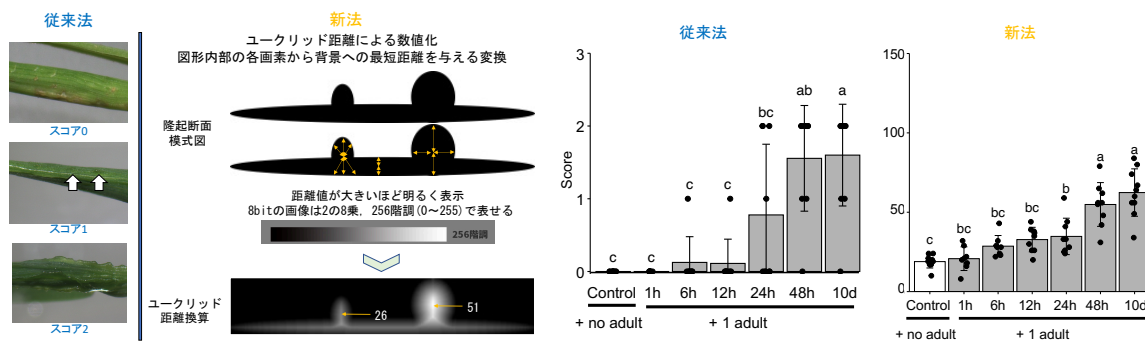


図2. 隆起度合の数値化

- ③ 矮化・隆起化誘発物質の抽出法とイネへの投与法を検討した。フタテンチビヨコバイと同様に吸器のような針をイネの師管選択的に挿入することは難しく、師管液採取にヨコバイ科昆虫の吸器が利用されていることから昆虫の巧妙な機構の存在が伺える。そこでイネへの簡便な投与方法として、MS培地に添加、イネ子葉鞘と第一葉の間への滴下、切ったイネ第一葉断面への滴下、の3種を用いてフタテンチビヨコバイを各種溶媒で抽出した粗抽出物を投与した。全ての試験区で隆起化は認められなかったが、水で抽出した粗抽出物を培地に添加した試験区で矮化が認められた。矮化というネガティブスクリーニングのため、この粗抽出物に含まれる矮化誘発物質が抽出過程で得られた毒性化合物である可能性を排除できない。そこで、ワラビー萎縮症を引き起こすトウモロコシ、ワラビー萎縮症抵抗性トウモロコシ、フタテンチビヨコバイが吸汁できないシロイヌナズナに対して粗抽出物を投与したところ、抵抗性トウモロコシとシロイヌナズナでは矮化活性は見られず、非抵抗性トウモロコシでのみ矮化活性が見られた。この結果は、水抽出物中にワラビー萎縮症の矮化誘導物質が含まれていること、さらにワラビー萎縮症は確かに物質で引き起こされていることを示している。さらに有機溶媒との分配、限外ろ過、シリカカラムでの精製を行ない、現在までに矮化誘発物質が水溶性の低分子化合物であることまで明らかとしている。

今後は矮化誘発物質の同定に加え、隆起化誘発物質の探索系の構築を進めていく予定である。