

モノクローナル抗体を用いた酵素標識抗体測定法による ネコブセンチュウ類の同定

藤原 留美¹⁾・黒木 修一²⁾・長友 由隆¹⁾・高木 浩¹⁾
(¹⁾宮崎大学農学部・²⁾宮崎県総合農業試験場)

Identification of *Meloidogyne* spp. by enzyme linked immuno sorbent assay using monoclonal antibody. Rumi FUJIWARA¹⁾, Syuichi KUROGI²⁾, Yoshitaka NAGATOMO¹⁾ and Hiroshi TAKAKI¹⁾ (¹⁾ Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki, 889-21. ²⁾ Miyazaki Agricultural Experiment Station, Sadowara, Miyazaki 880-02)

Seven monoclonal antibodies against *Meloidogyne incognita* were prepared. Identification of nematodes was done by an enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) using the antibodies. A comparison of the reaction activities of the antibodies against *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* and *M. hapla*, indicated that two of the antibodies reacted to *M. incognita* specifically. Furthermore, the reactive characteristics of the antibodies against nematodes varied. These results suggest that it may be possible to identify the root-knot nematode by immunological methods using the monoclonal antibodies.

Key words: ELISA, identification, *Meloidogyne incognita*, monoclonal antibody

従来、一般的に行われているネコブセンチュウの同定は、形態的特徴によるものや判別寄主による反応性の差を利用して行われてきた(荒城, 1992)。しかし、これらの方法は、十分な習熟や時間を要するなどの欠点がある。一方、近年、ネコブセンチュウの同定法として、アイズアムを用いた方法(奈良部ら, 1992)、全DNAのRAPD-PCR(CENIS, 1993)、rDNAのPCR-RFLP法(ZIJLSTRA et al., 1995)、等が報告されており、迅速かつ正確な同定結果が得られることから生化学的・分子生物学的手法を用いたセンチュウの同定法が注目されている(奈良部ら, 1992)。

そこで著者らは、簡便かつ迅速な同定法としてサツマイモネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*)から抽出したタンパク質を抗原として作製したモノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用し、サツマイモネコブセンチュウの同定を試みた。

本実験を進めるにあたり、試料のセンチュウを御提供いただいた農林水産省農業研究センター奈良部孝氏に厚く感謝の意を表す。

材料および方法

1. 供試線虫

宮崎県農業試験場線虫圃場(宮崎市佐土原)から採集したサツマイモネコブセンチュウ(レース1)を中心に実験を行った。また、比較のために同試験場に発生したサツマイモネコブセンチュウのトマト抵抗性打破系統と、農業研究センター病害虫防除部線虫害研究室から分譲されたアレナリアネコブセンチュウ(*M. arenaria*)、ジャワネコブセンチュウ(*M. javanica*)およびキタネコブセンチュウ(*M. hapla*)を供試した。採取したセンチュウおよび分譲を受けたセンチュウの被害植物根から採取した卵嚢を線虫の増殖に供した。センチュウはトマト(福寿2号)を用いて単卵嚢から増殖を行い、寄生根から分離した雌成虫を実験に供試した。

さらに、比較試料として大腸菌を餌とする食細菌性のセンチュウ(*Rhabditida* 目未同定センチュウ)を汚染土壌からベルマン法により回収し、1/4YP 培地(1.125% Yeast extract, 0.25% Bacto-peptone, 0.125% NaCl, 1.5% Agar, pH 6.8)を用い、25°Cのインキュベーターで培養し、増殖を行った。

2. タンパク質の抽出

各センチュウが寄生したトマト(福寿2号)の寄生根からそれぞれ雌成虫を50頭ずつエッペンドルフチューブに採取し、試料とした。試料を蒸留水で数回洗浄後、抽出液(20%スクロース, 2% Triton-X100) 180 μ l を分注し、氷冷下でホモジナイザー(シャフト径8 mm)を用いて1分間磨砕した。次いで磨砕試料を4 $^{\circ}$ C, 20,000 \times gで15分間遠心分離し、沈殿物と脂質の中間層から可溶性タンパク質を回収した。汚染土壌から回収したサツマイモネコブセンチュウのトマト抵抗性打破系統の2期幼虫および Rhabditida 目未同定センチュウの2期幼虫は抽出液で30 mg/ml に調製し、4 $^{\circ}$ Cで30分間超音波破碎を行った後、4 $^{\circ}$ C, 20,000 \times gで15分間遠心分離し、沈殿物と脂質の中間層から可溶性タンパク質を回収した。各試料のタンパク質含量は牛血清アルブミンを標準として、BRADFORD 法(BRADFORD, 1976)によって定量した。

3. モノクローナル抗体の作製

サツマイモネコブセンチュウ雌成虫から抽出したタンパク質を抗原とした。免疫動物にマウスを用い、定法(富山・安東, 1991)に従ってモノクローナル抗体を作製した。

モノクローナル抗体による識別: サツマイモネコブセンチュウ雌成虫から抽出したタンパク質を抗原として調製したモノクローナル抗体を用いて、定法(西村, 1992)に従い酵素標識抗体測定法(以下 ELISA 法)によってセンチュウの識別を行った。比較のためアレナリアネコブ, ジャワネコブおよびキタネコブセンチュウの雌成虫, サツマイモネコブセンチュウのトマト抵抗性打破系統の2期幼虫, Rhabditida 目未同定センチュウの2期幼虫および大腸菌から抽出したタンパク質についても同様に ELISA 法による測定を行った。各試料タンパク質のプレート吸着時の濃度は30 μ g/ml とし、各ウェルに100 μ l ずつ分注した。二次抗体としてペルオキシ

ダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ IgG (ZYMED) を用いた。発色は 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム塩(0.15 mg/ml) および 0.003% H₂O₂ を含む 0.1M クエン酸緩衝液(pH 4.0)で20分間反応させた。測定波長は405 nm と 490 nm とし、各測定値の比(O.D.405/490)を求めた。実験は各2回行い、各測定値の比からブランク値の比を差し引いた値の平均値で評価した。

結果および考察

サツマイモネコブセンチュウ雌成虫から抽出したタンパク質を抗原とし、モノクローナル抗体を作成した結果、NM1-17, NM3-23, NM5-120, NM11-13, NM14-13, NM15-14 および M22-22 の7種類のモノクローナル抗体が得られた。

これらのモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による測定の結果を Table 1 に示した。各抗体とも Rhabditida 目未同定センチュウと大腸菌には全く反応しなかった。サツマイモネコブセンチュウとそのトマト抵抗性打破系統にはいずれの抗体も反応性を示し、両系統に対する反応は概ね類似していたが、抗体 NM1-17, NM15-14 には、その反応性に明らかな差異が認められた。すなわち、抗体 NM1-17 はサツマイモネコブセンチュウのトマト抵抗性打破系統に高い反応を示す一方で、抗体 NM15-14 はサツマイモネコブセンチュウに高い反応を示した。このことより、抗体 NM1-17 および NM15-14 は、トマトのセンチュウ抵抗性の打破に関与するネコブセンチュウのタンパク質を認識しているのではないかと考えられ、その機構解明の鍵タンパク質の存在が示唆された。

一方、ネコブセンチュウ4種間で比較した場合、サツマイモネコブセンチュウのみに反応する抗体 NM14-13 および NM22-22, サツマイモ, アレナリアネコブセン

Table 1. Detection of nematodes by ELISA using monoclonal antibodies against *M. incognita*.

Nematodes	Antibodies						
	NM1-17	NM3-23	NM5-120	NM11-13	NM14-13	NM15-14	NM22-22
<i>M. incognita</i>	+ ^{b)}	++	++	+++	+	++	+
<i>M. arenaria</i>	+	+	++	+++	-	+	-
<i>M. javanica</i>	-	+	-	-	-	+	-
<i>M. hapla</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. incognita</i> ^{a)}	++	++	++	+++	+	+	+
Rhabditida	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-

a) *M. incognita* breaking resistance of tomato

b) +++: >1, ++: 0.5~1, +: 0.1~0.5, -: <0.1 (O.D. 405/490)

チュウに反応する抗体 NM1-17, NM5-120 および NM11-13, サツマイモ, アレナリア, ジャワネコブセンチュウに反応する抗体 NM3-23, 4種類のネコブセンチュウ全てに反応する抗体 NM15-14 があり, それぞれの抗体の反応性が異なっていた。

以上をまとめると, サツマイモネコブセンチュウの同定に限れば, 抗体 NM14-13, NM22-22 によって同定が可能になるものと推察された。また, さらに他の抗体の各線虫に対する反応性の差異を利用することによりサツマイモネコブセンチュウの両系統の識別だけでなく他の3種のネコブセンチュウの同定ができる可能性も示唆された。

今後, さらに, これらの抗体が認識しているエピトープのアミノ酸配列の解析によって, 各種ネコブセンチュウ

ウに特有のタンパク質を解明し, ELISA 法によってそのタンパク質を検出することで, より特異的なネコブセンチュウ類の同定が可能になるものと期待される。

引用文献

- 1) 荒城雅昭 (1992) 線虫研究の歩み 日本線虫研究会 : pp. 29-36.
- 2) BRADFORD, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- 3) CENIS, J. L. (1993) *Phytopathology* **83** : 76-80.
- 4) 奈良部孝 (1992) 線虫研究の歩み 日本線虫研究会 : pp. 37-39.
- 5) 奈良部孝・難波成任・山下修一・土崎常男 (1989) *日線虫誌* **19** : 46-51.
- 6) 西村正徳 (1992) 免疫化学実験法 西村書店 : pp. 230-231.
- 7) 富山朔二・安東民衛 (1991) 単クローン抗体実験マニュアル 講談社 : pp. 8-104.
- 8) ZIJLSTRA, C., LEVER, A. E. M., UENK, B. J. and VAN SILFHOUT, C. H. (1995) *Phytopathology* **85** : 1231-1237.

(1997年4月30日 受領)