

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07860

研究課題名(和文) マツ枯れの病原線虫はどのように進化してマツノマダラカミキリと結び付いたのか

研究課題名(英文) How did *Bursaphelenchus xylophilus*, the pathogen of pine wilt disease, evolve and relate to *Monochamus alternatus*?

研究代表者

前原 紀敏 (Maehara, Noritoshi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：20343808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マツノザイセンチュウを含む*Bursaphelenchus*属線虫の分子系統解析により、ゾウムシやキクイムシに分散型3期幼虫で運ばれる(便乗する)線虫から、カミキリムシに分散型4期幼虫で便乗するマツノザイセンチュウ近縁種が進化してきたと考えられている。本研究では、研究代表者が考案した人工蛹室を用いて線虫と昆虫の関係を調べ、カミキリムシに便乗できる分散型4期幼虫の誕生を契機にマツノザイセンチュウ近縁種、さらにはマツノザイセンチュウが進化してきたことを裏付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究では、「マツノザイセンチュウ - マツノマダラカミキリ」というマツ枯れにおいて現在成立している関係が対象とされてきた。これに対して、本研究では、対象を*Bursaphelenchus*属線虫全体にまで広げること、マツノマダラカミキリとマツノザイセンチュウの関係の進化過程に迫ろうとしたところに最大の特色がある。この視点から研究を進めた結果、マツノマダラカミキリとマツノザイセンチュウの関係の進化過程の一端を解明することができた。また、得られた知見は「マツノザイセンチュウ - マツノマダラカミキリ」という便乗関係を断ち切る防除法の開発に活かしていく。

研究成果の概要(英文)：The evolution of the *Bursaphelenchus xylophilus* group nematodes from species carried by weevils and bark beetles to species carried by cerambycid beetles is indicated by molecular phylogenetic analysis. The phoretic stages of the former and latter species are the third- and fourth-stage dispersal juveniles, respectively. We used a simple nematode-loading method to beetles and examined the relationships between nematodes and beetles. The results supported our hypothesis that the fourth-stage dispersal juvenile played an important role in the evolution of *B. xylophilus* group and then *B. xylophilus*.

研究分野：森林微生物生態学

キーワード：マツノザイセンチュウ 進化 昆虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マツ枯れが広がる仕組み

マツ枯れ(マツ材線虫病)の病原体マツノザイセンチュウは、マツノマダラカミキリの虫体内へと乗り移り、マツ枯死木から健全木へと媒介され、本病を伝染する。このようにマツノザイセンチュウは分散・移動にマツノマダラカミキリを利用しており、これを「便乗」と呼ぶ。

(2) *Bursaphelenchus* 属線虫全体の中での進化

マツノザイセンチュウが属する *Bursaphelenchus* 属は 130 種以上の線虫を含むが、その多くはゾウムシやキクイムシに便乗する。分子系統解析により、これらの線虫からマツノザイセンチュウの近縁種が進化して、カミキリムシに便乗するようになったと考えられている (Kanzaki, Maehara et al. 2011 *Nematology* 13, 787-804)。

(3) マツノザイセンチュウ近縁種の中での進化

分子系統解析の結果、マツノザイセンチュウ近縁種に関して、広葉樹に生息しマツノマダラカミキリ以外のカミキリムシに便乗する線虫(タラノザイセンチュウ、クワノザイセンチュウ、*B. doui* など)から、針葉樹に生息しマツノマダラカミキリに便乗する線虫(マツノザイセンチュウ、ニセマツノザイセンチュウなど)へという進化の方向性が明らかになっている (Kanzaki, Maehara et al. 2012 *Nematology* 14, 395-404)。線虫が生息する樹木の変化は媒介者であるカミキリムシに依存しており、カミキリムシの食性の変化に伴って線虫の種分化(新しい種の発生)が起こる。研究代表者は、基盤研究 B (H23-25) において、マツノザイセンチュウ近縁種である *B. doui* がヒロウドカミキリによって広葉樹から針葉樹へと運ばれてきた後、マツノザイセンチュウへと進化した可能性を示した。

(4) マツノザイセンチュウ及び *Bursaphelenchus* 属線虫の便乗ステージ

健全木に侵入したマツノザイセンチュウは、増殖型サイクル(卵 増殖型 2~4 期幼虫 成虫 卵)を繰り返し、爆発的に増えてマツを枯らす。一方、マツノマダラカミキリに便乗する際には、分散型サイクル(卵 増殖型 2 期幼虫 分散型 3 期幼虫 分散型 4 期幼虫 虫体への便乗)へ移行する。分散型 3 期幼虫は、マツノマダラカミキリが蛹から成虫になる頃に出す物質に反応して便乗のためのステージである分散型 4 期幼虫になり、タイミングよくその成虫に便乗する (Maehara and Futai 2001 *Nematology* 3, 455-461)。ここに両者の親和性(線虫が昆虫に多く便乗できること)が生じている。一方、ゾウムシやキクイムシに便乗する線虫は、分散型 3 期幼虫で便乗し、分散型 4 期幼虫というステージを持たない。

(5) 寒天培地を用いたカミキリムシの人工蛹室

研究代表者は、寒天培地を用いたカミキリムシの人工蛹室を開発し、マツノザイセンチュウだけでなくタラノザイセンチュウやクワノザイセンチュウなどの近縁種をその媒介者であるカミキリムシに多数乗り移らせることに成功していた (Maehara et al. 2013 *Nematol. Res.* 43, 9-13)。

2. 研究の目的

研究代表者は、仮説 1「ゾウムシやキクイムシに分散型 3 期幼虫で便乗する *Bursaphelenchus* 属線虫の中から、カミキリムシへの便乗に特化した分散型 4 期幼虫を持つマツノザイセンチュウ近縁種が現れ、カミキリムシに便乗できるようになった」、及び仮説 2「マツノザイセンチュウ近縁種の中で広葉樹から針葉樹へとカミキリムシの乗り換えが起こり、マツノマダラカミキリに多く便乗できるマツノザイセンチュウが現れた」という 2 つの仮説を立てた。本研究では、人工蛹室を用いて線虫と昆虫の関係を調べることで、これらの仮説を検証し、マツノザイセンチュウとマツノマダラカミキリの関係の進化的な成立過程を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゾウムシに運ばれる *Bursaphelenchus* 属線虫における分散型 3 期幼虫の出現要因の解明

人工蛹室にゾウムシに運ばれる線虫を入れた場合、昆虫が存在しなくても分散型 3 期幼虫が出現するかを調べた。線虫は、クロコブゾウムシに運ばれる *B. niphades* を用いた。

(2) クロコブゾウムシの飼育・交尾・産卵

クロコブゾウムシの飼育・交尾・産卵方法を検討した。

(3) ゾウムシに運ばれる *Bursaphelenchus* 属線虫のゾウムシ及びカミキリムシへの便乗調査

クロコブゾウムシの線虫 *B. niphades* とクロコブゾウムシまたはマツノマダラカミキリの蛹を



図1. 人工蛹室におけるクロコブゾウムシ蛹

人工蛹室で組み合わせた（図 1）。そして、成虫になったクロコブゾウムシ及びマツノマダラカミキリに *B. niphedes* の分散型 3 期幼虫が便乗するかを調べた。クロコブゾウムシは（2）で、マツノマダラカミキリは人工飼料で育てたものを用いた。

（4）マツノザイセンチュウのゾウムシ及びマツノマダラカミキリへの便乗調査

マツノザイセンチュウとクロコブゾウムシまたはマツノマダラカミキリの蛹を人工蛹室で組み合わせた。そして、クロコブゾウムシが存在する場合にマツノザイセンチュウの分散型 4 期幼虫が出現するか、また成虫になったクロコブゾウムシに分散型 4 期幼虫が便乗するか（分散型 4 期幼虫はカミキリムシに特化していてゾウムシには便乗できないのか）を調べた。

（5）*B. doui* 4 アイソレイトのマツノマダラカミキリへの便乗調査

マツノザイセンチュウ近縁種である *B. doui* は、広葉樹と針葉樹の両方を利用するピロウドカミキリとヒメヒゲナガカミキリ、針葉樹を利用するカラフトヒゲナガカミキリ（マツノマダラカミキリの近縁種）及びアカマツ枯死木から分離されている。寒天培地を用いた人工蛹室で、これら *B. doui* 4 アイソレイトとマツノマダラカミキリを組み合わせた。

4. 研究成果

（1）ゾウムシに運ばれる *Bursaphelenchus* 属線虫における分散型 3 期幼虫の出現要因の解明

B. niphedes の分散型 3 期幼虫は、昆虫が存在せず線虫単独の場合には出現しなかった。

（2）クロコブゾウムシの飼育・交尾・産卵

直径 5 cm 程度のアカマツ枝を用いることで、クロコブゾウムシの飼育・交尾・産卵が可能になった。

（3）ゾウムシに運ばれる *Bursaphelenchus* 属線虫のカミキリムシへの便乗調査

クロコブゾウムシに便乗する *B. niphedes* の分散型 3 期幼虫は、クロコブゾウムシの存在下で多数出現して虫体に移り移ったが、マツノマダラカミキリが存在してもほとんど出現せず、虫体に移り移れなかった。また、研究代表者のこれまでの研究で、*B. okinawaensis* の便乗ステージである分散型 3 期幼虫は、昆虫が存在しなくても多数出現するのにも、マツノマダラカミキリに少数しか乗り移れないことが分かっている（Maehara et al. 2016 *Nematology* 18, 679-685）。以上のことから、分散型 3 期幼虫ではマツノマダラカミキリにあまり乗り移れないと考えられた。

（4）マツノザイセンチュウのゾウムシへの便乗調査

マツノザイセンチュウの分散型 4 期幼虫は、マツノマダラカミキリが存在する場合に多数出現して虫体に移り移り、クロコブゾウムシの存在下でも少し出現して虫体に移り移る場合もあった。（3）と（4）より、分散型 4 期幼虫はカミキリムシへの便乗に特化しているわけではなかったが、仮説 1 は概ね支持された。

（5）*B. doui* 4 アイソレイトのマツノマダラカミキリへの便乗調査

広葉樹と針葉樹の両方を利用するピロウドカミキリとヒメヒゲナガカミキリから分離された *B. doui* よりも針葉樹を利用するカラフトヒゲナガカミキリ及びアカマツ枯死木から分離された *B. doui* の方がマツノマダラカミキリによく乗り移り、針葉樹のみに関連する *B. doui* では、広葉樹に関連する *B. doui* よりも、マツノマダラカミキリに対する親和性が高まっていた。これは、仮説 2 を支持する結果である。

（6）得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

従来の研究では、「マツノザイセンチュウ - マツノマダラカミキリ」というマツ枯れにおいて現在成立している関係が対象とされてきた。これに対して、本研究では、対象を *Bursaphelenchus* 属線虫全体にまで広げることで、マツノマダラカミキリとマツノザイセンチュウの関係の進化過程に迫ろうとしたところに最大の特色がある。この視点から研究を進めた結果、仮説 1 と 2 を裏付ける結果が得られ、マツノマダラカミキリとマツノザイセンチュウの関係の進化過程の一端を解明することができた。

（7）今後の展望

「広葉樹から針葉樹へとカミキリムシを乗り換えた *B. doui* は、その後どのようにして病原性を獲得し、病原力の強いマツノザイセンチュウへと進化したのか」というマツ枯れにおける最大の謎の 1 つを解明する。

得られた知見を「マツノザイセンチュウ - マツノマダラカミキリ」という便乗関係を断ち切る防除法の開発に活かす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maehara Noritoshi, Kanzaki Natsumi, Aikawa Takuya, Nakamura Katsunori	4. 巻 20
2. 論文標題 Effect of <i>Monochamus grandis</i> (Coleoptera: Cerambycidae) on phoretic stage formation of <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Nematoda: Aphelenchoididae) and the transfer of nematodes to the beetle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-00003123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maehara Noritoshi, Nakamura Katsunori	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of low-temperature summer nights on adults of <i>Monochamus alternatus</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Forest Research	6. 最初と最後の頁 237 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13416979.2018.1471026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前原紀敏、小澤壮太、神崎菜摘、升屋勇人
2. 発表標題 マツノザイセンチュウのクロコブゾウムシへの乗り移り
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤壮太、前原紀敏、神崎菜摘、相川拓也、中村克典
2. 発表標題 マツノザイセンチュウ近縁2種の便乗型成虫のカミキリムシへの乗り移り
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前原紀敏
2. 発表標題 マツ枯れが広がる仕組み
3. 学会等名 日本環境動物昆虫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前原紀敏、相川拓也、神崎菜摘、中村克典
2. 発表標題 Bursaphelenchus doui 4アイソレイトのマツノマダラカミキリへの乗り移り
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前原紀敏、神崎菜摘、相川拓也、中村克典
2. 発表標題 ヒゲナガカミキリのマツノザイセンチュウ保持能力
3. 学会等名 日本線虫学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村 克典、大塚 生美、佐藤 文吉、駒木 貴彰、梅津 勘一、前原 紀敏、市原 優、相川 拓也、佐藤 大樹、杉本 博之、浦野 忠久、宮下 智弘、中島 剛、井城 泰一、林 雅秀、小林 颯太、小澤 洋一、天野 智将、那須 仁弥、山野邊 太郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本林業調査会	5. 総ページ数 212
3. 書名 森林保護と林業のビジネス化 マツ枯れが地域をつなぐ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

前原紀敏・中村克典(2019)夏の夜の低温がマツノマダラカミキリ成虫に及ぼす影響. 森林防疫 68, 166-170

前原紀敏(2018)マツノザイセンチュウ近縁種の媒介者およびマツに対する病原性・病原力. 山林 1607, 29-34

前原紀敏(2018)マツノザイセンチュウをはじめとするBursaphelenchus属線虫の媒介者. みどりの東北 174, 5

研究業績アーカイブ https://www.researchgate.net/profile/Noritoshi_Maehara

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
連携研究者	中村 克典 (Nakamura Katsunori) (40343785)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
連携研究者	相川 拓也 (Aikawa Takuya) (90343805)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	
連携研究者	神崎 菜摘 (Kanzaki Natsumi) (70435585)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等 (82105)	