

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18208015

研究課題名（和文） 劇症型樹木萎凋病の発病メカニズムに関する分子生物学的研究

研究課題名（英文） Studies on the pathogenic mechanisms of fulminating tree wilts

研究代表者 二井 一禎 (FUTAI KAZUYOSHI)
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：50165445

研究成果の概要：

マツ枯れに関しては病原体の純系化に成功し、これにより精度の高い、かつ再現性のある分子生物学的研究が可能になった。さらに、病原線虫感染に始まる寄主-寄生者間の分子応答に関しては、宿主樹体内で異常に増加生成される線虫表皮タンパク質を発見し、その化学的同定に成功したが、寄主の感染応答遺伝子については現在も研究を継続中である。

一方、ナラ枯れに関しては、媒介昆虫の樹体内における亜社会性行動の実態や、この媒介昆虫と関連する菌類の生態や、坑道内での群集構造、さらには病原菌感染後の寄主体内における二次代謝産物の動態などを研究し、一定の成果を得た。さらに、本病を生物学的に防除するために天敵微生物の探索を実施し、これまでにいくつかの候補微生物を得る事に成功した。

以上のように、二つの劇症型森林萎凋病の防除法確立のために必要な基礎知見を明らかにする事に成功しており、今後の未解決課題の研究遂行も併せて、これら流行病の防除法確立に貢献することが可能となろう。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2007年度	17,100,000	5,130,000	22,230,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：劇症型萎凋病、マツ枯れ、ナラ枯れ、防御関連物質、病原性決定因子

1. 研究開始当初の背景

日本各地の森林に甚大な被害を及ぼしている2つの流行病については、いまだに効果的な防除法が得られないまま、被害の進展を許している。2つの森林流行病のうち、マツ

枯れは研究の歴史も古く、問題点が煮詰まってきたおり、現在では病原体側と宿主樹木側の両面から、発病応答に関する遺伝子の解明が始まろうとしていた。私どもの研究室ではそのような背景の中、いち早く分子生物学的な手法の導入に手をつけ、この分野をリード

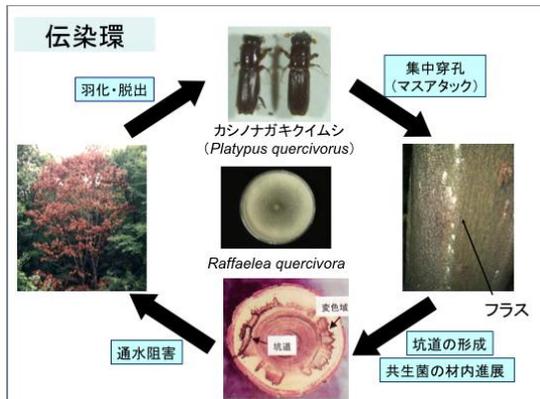
しようとしていた。一方、ナラ枯れについては既に10年以上の研究が先行していたので、テーマを限定して研究に当たる事にした。

2. 研究の目的

マツ枯れに関しては根本的な防除法の開発のためには、正確な発病のメカニズムの解明と、樹木側の抵抗性のメカニズムの解明が必要と考え、病原線虫の側の病原性因子の解明を図るとともに、樹木側が感染時に発現誘導する遺伝子群を明らかにする事により、病原線虫と寄主樹木の感染応答の解明を目指した。また、寄主樹木の抵抗性因子として菌根共生系に着目し、その働きを明らかにしようとした。

一方、ナラ枯れに関しては被害の進展の急速さを考慮し、とりあえず発病メカニズムは後回しにして、具体的防除法の開発をめざすことにした。そのため、本病に関与する宿主樹木、媒介昆虫、食餌菌、天敵微生物の4者のそれぞれについて感染環における生態的役割を明らかにする事により、伝染鎖の切断法を明らかにしようとした。

3. 研究の方法



マツ枯れ研究における研究法は、病原力の異なる複数の線虫株を用いて感受性寄主樹木への接種実験を行い、その後の樹木側、線虫側に発現・生成される遺伝子やタンパク質の比較検討を行うという手法を用いた。特に病原線虫については、病原性に関与すると考えられる体表タンパク質と分泌タンパク質に焦点を絞り、プロテオミクス研究を実施した。一方、寄主樹木側の感染応答を明らかにするため、病原線虫を人工接種した後に発現する遺伝子の探索を行った。この際、接種源に病原性の異なる2系統の線虫を用いる事により、発病時に特異的に発現する遺伝子群をcDNA サプレッションサブトラクション法によりとらえることにした。

ナラ枯れ研究においては野外に生育する成木を対象に病原菌を接種し、その後一定期

間ごとに樹木組織を回収し、そこに含まれるポリフェノール類の量的変化を指標に寄主の感染応答を追跡した。また、野外枯損木と、室内に持ち込んだ枯損木の丸太を併用し、その材内における媒介昆虫とその食餌酵母を対象にした、綿密な観察、実験を実施した。また、野外枯死丸太から回収した媒介昆虫の幼虫から、天敵微生物を分離し、その種を分離・同定するとともに、その殺虫活性を明らかにし、防除への可能性を探る散布実験を実施した。

4. 研究成果

マツ枯れの研究においては、まず、緻密かつ高感度の分子生物学実験に耐えうる病原線虫株を確立した。マツ枯れ研究に従来用いられてきた既存のマツノサイセンチュウ「系統」について、同一系統内でのきょうだい交配を繰り返すことにより、より純度の高い「純系株」を複数得た（強病原力 S10 系統由来の3系統、弱病原力 OKD-1 系統由来の1系統）。それらの病原力や増殖量等を指標とした生物学的検定結果から、元の既存系統が遺伝的多様性を内包した不均一な集団であることを示した（下表、図1）。

表. 各病原線虫株の生物学的形質検定結果の一部。宿主体内での増殖性も純系株は元となる既存系統と異なる結果を示した（各カラム内で異なるアルファベットは統計的に異なる値；Tukey 法、 $P < 0.05$ ）

Isolate	No. of nematodes		
	2weeks	4weeks	
S10	349.4 ± 52.0	19066.4 ± 5408.3	a
S10 P1	497.2 ± 113.7	7193.0 ± 2952.6	a
S10 P3	62.6 ± 14.1	619.6 ± 159.3	b
S10 P9	194.4 ± 63.0	9673.0 ± 4560.7	a
OKD-1	101.8 ± 34.1	175.4 ± 33.5	b
OKD-1 F7	19.8 ± 4.3	34.4 ± 12.4	b
Control	0	0	

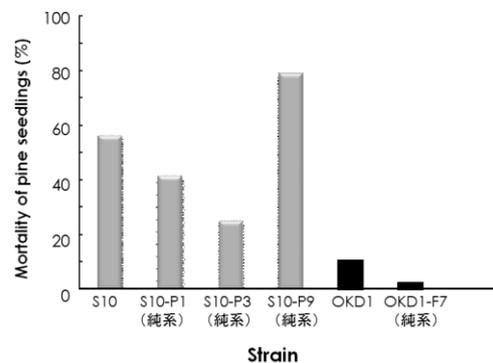


図1. 既存の病原線虫株（強病原力 S10 系統及び弱病原力 OKD1 系統）の兄弟交配により得た純系株の病原性。いずれの純系も元となる既存系統と異なる形質を示した（論文準備中）。

線虫の病原因子に関しては、蛍光レクチン染色及びレクチンブロッキング、フォーカスドプロテオーム解析により、病原線虫の体表タンパク質について成長ステージ別、培養条件別の詳細な化学構造を植物寄生線虫として初めて明らかにした (図 2)。その中で、病原線虫の体表タンパク質に病原性への関与が想定されるタンパク質を見だし、そのタンパク質が樹体内で著しい増加を見せる事を明らかにした (投稿中)。また、分泌タンパク質についても、病原性線虫に特異的なタンパク質を見だしており、本病の発病メカニズムの解明に大きな進展をもたらす事ができた。

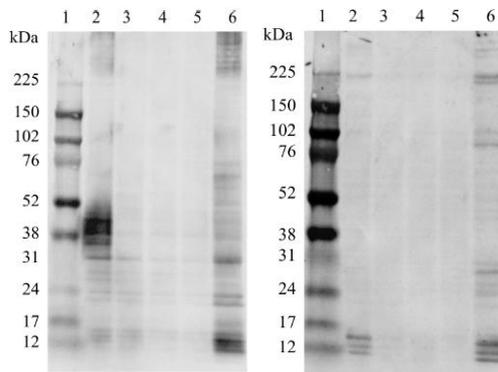


図 2. 病原線虫体表より抽出した糖タンパク質の蛍光レクチンプロット結果 (A, HRP 結合 WGA; B, ConA 使用). レーン 1, 分子量マーカー; 2, 2 期幼虫; 3, 3 期幼虫; 4, 4 期幼虫; 5, 成虫; 6, 卵.

また、寄主マツの側で感染時に発現する遺伝子についても、病原力の異なる複数の線虫株を接種源に用いた cDNA サプレッションサブトラクション法による比較を行い、強病原性線虫の感染に対し特異的に発現誘導される候補遺伝子群を絞り込んでいるが、定量的 PCR 及び局在試験等による今後の確認実験を必要としている。これらを併せて、マツ枯れのメカニズム解明に大きな寄与ができるものと信じる。

さらに、本研究の遂行過程において、病原線虫の成長過程別分画法ならびに同線虫特異的遺伝子を指標としたリアルタイム PCR に基づく線虫定量法 (図 3) を開発し、投稿論文として公表した。これらはいずれも本病害の基礎研究を行う上で極めて実用性が高く、今後創薬や分子治療等を視野に入れた発展的な研究を行う上で大きく寄与するものであると考える。

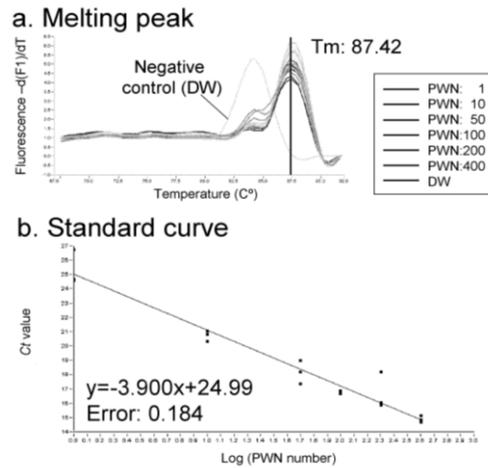
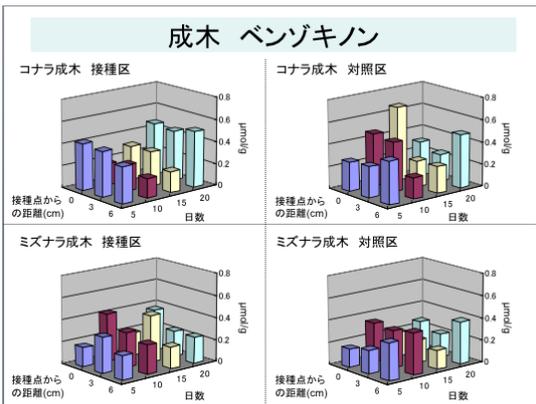
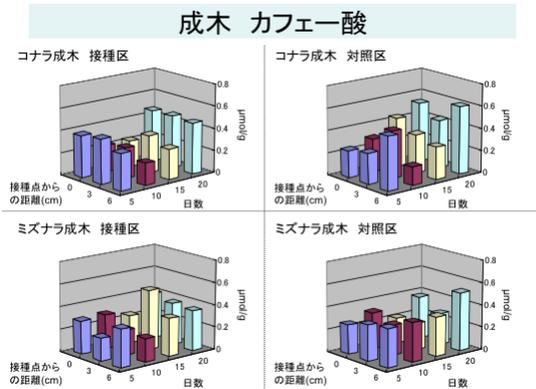


図 3. rDNA ITS 領域を標的としたマツノザイセンチュウ特異的リアルタイム PCR による線虫定量法. Baermann 漏斗法による線虫抽出過程を経ずにマツ材組織内の線虫数を定量的に評価することを可能にした. 図は、条件設定の際の melting peak 解析 (a) と検量線 (b) を示す.

ナラ枯れの研究では以下のような成果を得る事ができた。

- (1) 日本各地から収集したナラ枯れ枯死材から分離した媒介昆虫の幼虫から 30 株以上の微生物 (細菌と菌類) を得たが、それらの媒介昆虫の幼虫に対する接種試験の結果、防除資材として有望な 4 株を得た。今後、その施与法の開発を試みる。
- (2) ナラ枯れの病原菌を媒介する甲虫 (カシノナガキイムシ) は酵母を餌にし、この酵母を伝播先の樹木に穿孔したトンネル (坑道) の内壁に繁殖させ、それを餌に次世代の幼虫が繁殖する。本研究ではこの媒介昆虫の食餌源となっている酵母の生態を詳細に研究したが、その中で、坑道に優占する 4 種の主要酵母を明らかにするとともに他の酵母種も含めた酵母の群集構造の解明に成功した。また、新規に発見された複数株の酵母について記載論文として報告した。
- (3) 媒介昆虫がこのように宿主樹木の幹にトンネルを穿孔し、その中でファミリー形成をする点を重視し、その社会性を実験的に解明することに成功した。既にその成果は 2 報の論文として投稿し、1 報は受理され他の 1 報は査読中である。
- (4) 野外に生育する宿主ナラ類樹木に

病原菌を接種し、その後の寄主の感染応答を追跡した。病原菌接種木において特有の寄主反応が見られる事を明らかにした。野外において病原菌を人工接種した成木の場合に見られた寄主反応のうち、カフェー酸とベンゾキノンの量の時間・空間的な変化を二つの図として下に表す。



- (5) その他、ナラ枯れについては宿主樹体内に内生する微生物の役割についても考察を加えた。具体的には、コナラ内生菌を単離し、ナラ枯れ病原菌に対する拮抗作用を見出した。本病の生物防除法の開発に有用な情報を提供するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- (1) Shinya, R., Takeuchi, Y., Miura, N., Kuroda, K., Ueda, M. and Futai, K. Surface coat proteins of the pine wood nematode,

Bursaphelenchus xylophilus: profiles of stage and isolate-specific characters. *Nematology* 11: 429-438, 2009 (査読有)

- (2) Takeuchi, Y., Futai, K. Diagnosis and quantification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner), in wood of *Pinus thunbergii* with real-time PCR. *Nematological Research* 39: 9-16, 2009 (査読有)

- (3) Yamasaki, M. and Futai, K. Host selection by *Platypus quercivorus* (Coleoptera: Platypodidae) before and after flying to trees. *Applied Entomology and Zoology* 43(2): 249-257, 2009 (査読有)

- (4) Kawai, A., Takeuchi, Y., Azuma, J. and Futai, K. Inhibitory effect of endophytic fungi in *Quercus serrata* on *Raffaelea quercivora*. *Tree and Forest Health* 12(3): 135-136, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- (1) 遠藤力也・鈴木基文・辨野義己・二井一禎：養菌性キクイムシと手を組んだ酵母たち。第120回日本森林学会大会（京都市、2009年3月）
- (2) 真田陽平・藤本岳人・Hagus Tarno・二井一禎：*Steinernema*属線虫2種を用いたカシノナガキクイムシの防除法の検討。日本線虫学会第16回大会（茨城県つくば市、2008年9月）
- (3) 新屋良治・竹内祐子・植田充美・二井一禎：マツノザイセンチュウ表面タンパク質の性質。日本線虫学会第16回大会（茨城県つくば市、2008年9月）

[図書] (計 6 件)

- (1) Mota, M.M., Futai, K. and Vieira, P.: Pine Wilt Disease and the Pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes (Ciancio, A. and Mukerji, K. G eds.), 346 pp, 2009, Springer
- (2) 二井一禎: 植物と菌根菌. 寄生と共生 (石橋、名和編) p238-263, 2008, 東海大学出版会
- (3) 二井一禎: 共生微生物の世界. 微生物機能の開発 (植田編) p63-89, 2008, 京都大学学術出版会
- (4) Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S. and Futai, K. eds. : Mycorrhizae : Sustainable Agriculture

- and Forestry, 359 pp, 2008, Springer
- (5) Zhao, B.G, Futai, K., Sutherland, J.R. and Takeuchi, Y. eds. : Pine Wilt Disease, 459 pp, 2008, Springer
- (6) Futai, K. and Mota, M.M.: Biology and microbial inter-relationships: Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems (Mota, M.M. and Vieira, P. eds), 405 pp, 2008, Springer

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二井 一禎 (FUTAI KAZUYOSHI)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：50165445

(2) 研究分担者

東 順一 (AZUMA JUNNICH)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：80115782

山田 利博 (YAMADA TOSHIHIRO)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：30332571

植原 健人 (UEHARA TAKETO)
農業・食品産業技術総合研究機構
北海道農業研究センター・主任研究員
研究者番号：30355458

(3) 連携研究者

なし