

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19880016  
 研究課題名（和文） マツノザイセンチュウのアセチルコリンエステラーゼ遺伝子のクローニング  
 研究課題名（英文） Cloning of the genes coding acetylcholine esterase (AChE) of the pine wood nematode  
 研究代表者  
 竹内 祐子 (Yuko Takeuchi)  
 京都大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：80452283

## 研究成果の概要：

森林流行病であるマツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウについて、薬剤作用部位及び作用機作の解明を目的とした分子生物学的研究を行った。現在防除に使用されている樹幹注入剤の標的分子であり、神経伝達に關与するアセチルコリンエステラーゼに着目し、同線虫ゲノムから同酵素をコードする遺伝子断片を複数単離し、塩基配列及びイントロン挿入位置を明らかにした。また、同線虫の体表構造を成長過程別、病原力系統別に精査し、体表構造特性が薬剤作用性に影響を与えている可能性を見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：森林病害、線虫、薬剤反応性、遺伝子、クローニング、マツノザイセンチュウ、表面タンパク質、分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) を病原体とするマツ材線虫病は、国内外各地のマツ林に甚大な被害を及ぼし続ける伝染性の劇症型萎凋病害である。現在防除に使用されている樹幹注入剤は、酒石酸モランテルを主成分とした殺線虫剤であり、マツノザイセンチュウの神経伝達に關与す

るアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性を阻害することが明らかにされている (松浦ら 1986, 1987 日本線虫学会誌)。しかしその後はこの標的部位に着目した研究はなく、樹幹注入剤の詳細な作用機作は解明されてこなかった。

AChE については、近年の分子生物学的手法の発達により、コードする遺伝子がモデル

生物 *Caenorhabditis elegans* をはじめとする複数種の線虫で特定され、その機能解析が進められている (Arpagaus et al. 1994 *The Journal of Biological Chemistry*; Poitte et al. 1999 *Molecular & Biochemical Parasitology*)。一方、マツノザイセンチュウに関する DNA 情報は大半が系統解析や種同定のための rDNA 塩基配列にとどまっており、機能遺伝子についてはセルラーゼ等の一部の酵素に関するものに限られている (Kikuchi et al. 2004 *FEBS Letters*)。また、森林総合研究所主体のマツノザイセンチュウ EST プロジェクトも本研究開始当初はその全貌が明らかになっていなかった。そこで、マツノザイセンチュウの AChE についても、他種の相同遺伝子の情報をもとに AChE 遺伝子を同定・精査することで、樹幹注入剤の作用機構を明らかにすることが可能であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、樹幹注入剤の殺線虫作用の標的部位と考えられるマツノザイセンチュウの AChE 遺伝子の詳細な機能解析を通して、同薬剤の作用機作を解明することを目的とした。同時に、DNA 及びタンパク質等の分子情報が圧倒的に欠落しているマツノザイセンチュウについて特定遺伝子に着目した研究を行うことで、同線虫研究に基礎的知見を提供することも目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子の単離

マツノザイセンチュウの AChE 遺伝子を単離した。Arpagaus et al. (1994 *The Journal of Biological Chemistry*) を参考に、AChE 遺伝子を増幅するディジェネレートプライマー (5'-GA(A/G) GA(C/T) TG(C/T) CTi TA(C/T) CTi AA-3'; 5'-CCi GCi GA(C/T) TCi CC(A/G)-3') を用いて、マツノザイセンチュウのゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。得られた遺伝子断片は、サブクローニングを経て塩基配列を決定し、相同性検索に供した。その後、新たに設計した各断片に特異的なプライマーを用いて、cDNA における各遺伝子配列を決定した。

### (2) 体表構造の分析

本研究を進める中で、マツノザイセンチュウの体表構造特性が薬剤作用性に影響を与えている可能性を見出した。微小なマツノザイセンチュウ体の表面構造を詳細に解析するために、蛍光レクチン染色法及びレクチンブロッキング法を用い、成長過程別、病原性の異なる系統別にプロファイリングを行

った。

### (3) リアルタイム PCR による線虫定量

樹幹注入処理後のマツ内における線虫数及び分布様式を正確に把握するために、DNA を指標とした新たな線虫定量法を開発した。標的部位にはマツノザイセンチュウの  $\beta$ -tubulin 遺伝子 (*tbb*) 及び rDNA の ITS 領域を用いた。既知頭数のマツノザイセンチュウをマツ材と混合した試料より DNA を抽出し、それを標準鋳型としたリアルタイム PCR により反応条件を最適化した。また、実際にマツノザイセンチュウを接種したマツ苗を用いて実用性検定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) AChE 遺伝子の単離

マツノザイセンチュウのゲノム DNA を鋳型としたディジェネレート PCR により、塩基長の異なる複数の遺伝子断片を得た。それらの塩基配列を決定し、得られた配列と他種の既知 AChE 遺伝子との相同性解析 (BLAST 解析) を行ったところ、3 つの断片 (塩基長 770-bp, 458-bp, 362-bp) が AChE 遺伝子である可能性が高いことが明らかになった。また、各々の配列を cDNA とゲノム DNA 間で比較することにより、イントロン挿入位置を明らかにした。

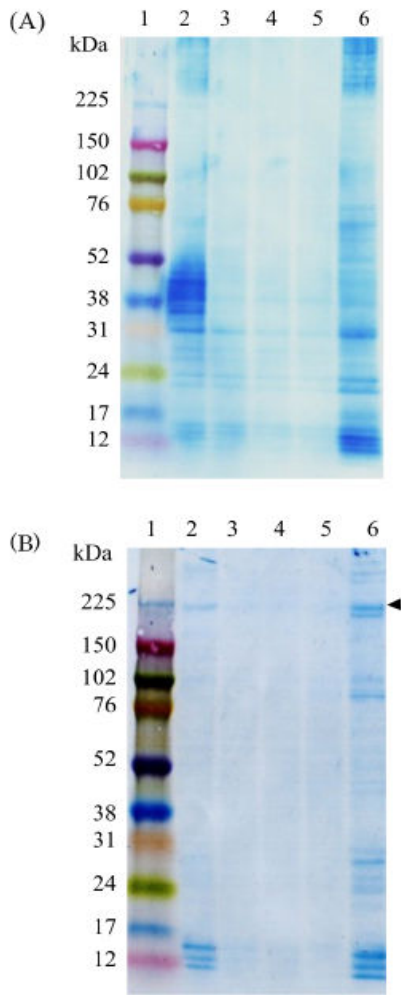
### (2) マツノザイセンチュウの体表構造

#### ① 成長過程別分画法

マツノザイセンチュウの体表構造を研究する中で、各ステージの体サイズに基づいてマツノザイセンチュウを成長過程別に分画する簡便な手法を開発した (Shinya et al. 2009 *Nematology*, 後述の「雑誌論文 3」)。この手法はタンパク質研究のみならず、成長過程別の遺伝子発現解析や接種検定等、多様なマツノザイセンチュウ研究に応用可能であり、今後の発展研究に大きく寄与するものと考えられる。

#### ② 体表構造の変化

成長過程別、病原力系統別に複数の蛍光レクチン (ConA, WGA, PNA, UEA I, RCA<sub>120</sub>) によりマツノザイセンチュウ体表を直接染色し、あるいは抽出処理によって単離した後 SDA-PAGE 分画したものをレクチンブロッキングした結果、各々異なる染色性を示し、体表構造に明確な違いがあることが示された (図 1. Shinya et al. 2009 *Nematology*, 後述の「雑誌論文 2」)。

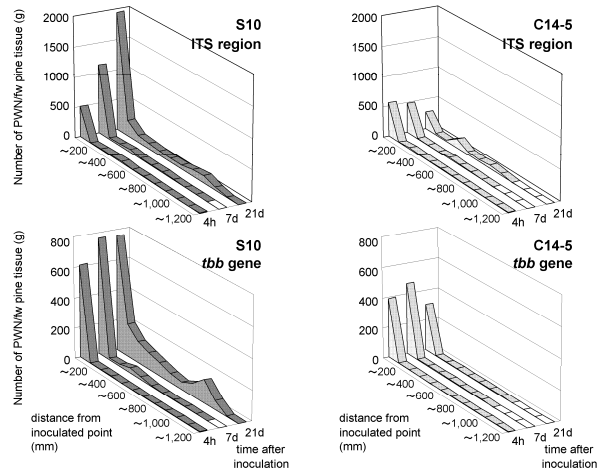


▲図1. HRP標識レクチン (A, WGA もしくは B, ConA) でプロットした、様々な成長過程のマツノザイセンチュウ由来の体表タンパク質の泳動像. レーン 1, 分子量マーカー; 2, 第二期幼虫の体表抽出物; 3, 第三期幼虫の体表抽出物; 4, 第四期幼虫の体表抽出物; 5, 成虫の体表抽出物; 6, 卵の体表抽出物. 「雑誌論文 2」より.

### (3) マツノザイセンチュウの定量法

薬剤の樹幹注入処理を行った宿主マツ樹体内における線虫分布を正確に把握するために、リアルタイム PCR 法に基づく材内のマツノザイセンチュウ数の簡便な定量法を開発した (図 2. Takeuchi and Futai, *Japanese Journal of Nematology*, accepted, 後述の「雑誌論文 1」). 従来 Baermann 漏斗法による線虫抽出を経て顕微鏡下で行っていた線虫計数の作業軽減と精度の向上を実現した. この手法は、研究現場だけでなく病害の人為的拡大を防ぐための検疫の場でも有用であると期待される.

上記の研究成果は、これまで遺伝子及びタンパク質に関する情報の極めて乏しかったマツノザイセンチュウについて、詳細な分子情報を明らかにしたという点で非常に有用であり、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の基礎が定まったと言える.



▲図 2. クロマツ樹体内におけるマツノザイセンチュウ (左, 強病原力 S10 系統; 右, 弱病原力 C14-5 系統) 分布様式の経時変化. マツノザイセンチュウ ITS 領域 (上段) もしくは  $\beta$ -tubulin 遺伝子 (下段) を標的としたリアルタイム PCR による定量結果 (N=3). 「雑誌論文 1」より.

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 5 件) すべて査読有

1. Yuko Takeuchi, Kazuyoshi Futai. Diagnosis and quantification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood of *Pinus thunbergii* with real-time PCR. *Japanese Journal of Nematology*, accepted.
2. Ryoji Shinya, Yuko Takeuchi, Natsuko Miura, Koichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, Kazuyoshi Futai. Surface coat proteins of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: profiles of stage and isolate specific characters. *Nematology*, **11**(3): 429-438, 2009.
3. Ryoji Shinya, Yuko Takeuchi, Kazuyoshi Futai. A technique for separating the developmental stages of the propagative form of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology*, **11**(2): 305-307, 2009.
4. 川井彩子・竹内祐子・東 順一・二井一禎. コナラ内生菌による *Raffaelea quercivora* への抑制効果. 樹木医学研究, **12**(3): 135-136, 2008.
5. Yuko Takeuchi, Kazuyoshi Futai. Avirulent isolate of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, survives 7 months in asymptomatic host seedlings. *Forest Pathology*, **37**(5): 289-291, 2007.

[学会発表] (計 10 件)

1. 新屋良治、森坂裕信、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フォーカスドプロテオーム解析」  
日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡、2009 年 3 月 29 日)
2. 飯島 桂・小林正秀・佐波聖樹・田中和博・竹内祐子  
「落下したマツ葉からマツノマダラカミキリ後食の兆候を発見する試み」  
第 120 回日本森林学会大会 (京都、2009 年 3 月 26 日)
3. 大崎祥卓・木村玲二・大槻恭一・山中典和・竹内祐子  
「ADR センサーによるマツ枯れ過程のモニタリング」  
平成 20 年度日本農業気象学会 中国・四国支部大会 (広島県福山、2008 年 12 月 4 日)
4. 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」  
第 16 回日本線虫学会大会 (つくば、2008 年 9 月 19 日)
5. Ryoji Shinya, Yuko Takeuchi, Naoko Miura, Mitsuyoshi Ueda, Kazuyoshi Futai.

‘*Bursaphelenchus xylophilus* surface coat proteins: stage-specific changes and characterization.’

5th International Congress of International Nematology, Brisbane, Australia, 15 July 2008.

6. Yuko Takeuchi, Kazuyoshi Futai.  
‘Asymptomatic carrier trees in pine wilt disease: from the ecological viewpoint.’  
5th International Congress of International Nematology, Brisbane, Australia, 15 July 2008.
7. 飯島 桂・小林正秀・田中和博・野崎 愛・竹内祐子  
「マツ葉の落下数によるマツノマダラカミキリ後食量把握の試み」  
第 119 回日本森林学会大会 (東京、2008 年 3 月 28 日)
8. 太田 淳・竹内祐子・竹本周平・二井一禎  
「マツノザイセンチュウの遺伝子型—日本各地の被害マツ林間の比較—」  
第 119 回日本森林学会大会 (東京、2008 年 3 月 28 日)
9. 川井彩子・竹内祐子・東 順一・二井一禎  
「コナラ内生菌の *Raffaelea quercivora* への抑制効果」  
第 12 回樹木医学会大会 (名古屋、2007 年 11 月 30 日)
10. 新屋良治・竹内祐子・二井一禎  
「マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) 表皮上糖タンパク質のステージ間および系統間差異の検出」  
第 15 回日本線虫学会大会 (京都、2007 年 9 月 13 日)

[図書] (計 2 件)

1. Yuko Takeuchi. Host fate following infection by the pine wood nematode. *In: Pine wilt disease* (eds. Bo Guang Zhao, Kazuyoshi Futai, Jack R. Sutherland, Yuko Takeuchi). p 235-249. Springer, 2008
2. Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Field diagnosis of the asymptomatic carrier of pinewood nematode. *In: Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems.* (eds. Paulo R. Vieira, Manuel M. Mota). p. 279-289. Springer, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 祐子 (Yuko Takeuchi)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80452283

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし