

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15853

研究課題名（和文）ウイルスベクターを用いたマツ材線虫病の分子機構の解明

研究課題名（英文）Novel Functional Analysis for Pathogenic Proteins of Bursaphelenchus xylophilus in Pine Seed Embryos Using a Virus Vector

研究代表者

新屋 良治（SHINYA, RYOJI）

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：30802798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マツノザイセンチュウを病原体とするマツ材線虫病は、マツ類樹木に枯死を引き起こす深刻な樹木病害であり、防御応答の過剰誘導により樹木全体が枯死すると考えられている。近年、線虫病原因子の候補が徐々に明らかとなってきたが、分子機能解析手法の不足により病原因子の特定には未だ至っていない。私たちは本研究課題において、木本類への外来遺伝子発現を可能にするウイルスベクターを利用して、線虫病原候補タンパク質をクロマツ種子の胚に一過的に発現させる系を確立した。確立した手法を用いて試験した結果、3種の線虫由来分子（ソーマチン様タンパク質及びGH30）が、マツ種子胚に対して防御応答を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツ材線虫病は日本において過去数十年に亘り最重要森林病害虫として日本国内のマツ林に甚大な被害をもたらしてきたが、その発病分子メカニズムは十分に理解されて来なかった。本課題研究により、本来の宿主であるマツにおいて線虫由来の分子の機能解析が可能可能になったため、今後本手法を用いてマツ材線虫病の分子メカニズムが明らかになることが期待され、その後新規の線虫防除技術手法の開発につながるものと予想される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a novel functional analysis method for susceptible black pine seed embryos using transient overexpression by the Apple latent spherical virus vector and investigated five secreted proteins of *B. xylophilus* causing cell death in tobacco to determine whether they induce hypersensitive responses in pine. We found that three of five molecules induced significantly higher expression in pathogenesis-related genes. This study is the first to analyze the function of pathogenic candidate molecules of *B. xylophilus* in natural host pines using exogenous gene expression, which is anticipated to be a powerful tool for investigating the PWD mechanism.

研究分野：植物保護学

キーワード：マツノザイセンチュウ マツ材線虫病 ウイルスベクター 分子機能解析

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ(以後、マツノザイ)が樹木に過剰な抵抗性反応を誘導し、最終的に樹木全体が細胞死することで発症すると考えられている(マツ自害説)。申請者らはこれまで、マツノザイ病原候補因子をモデル植物であるベンサミアナタバコへ過性発現させた際に、植物体へ細胞死を引き起こす5種類のマツノザイ分泌タンパク質を、マツ枯れの有力な病原候補因子として絞り込んできた(Shinya et al., 2013; Kirino et al., 2020; Shinya and Kirino et al., 2021)。マツ枯れの枯死メカニズムの解明に向けた次なる課題は、マツノザイ病原候補因子が実際の宿主であるマツへ枯死を誘導することの証明である。しかしながら、宿主マツの遺伝子操作手法は現段階で未確立であり、上述の課題を解決するためには、宿主マツに対するマツノザイ病原因子の直接的な機能解析手法の新規開発が必須であった。

近年になり、ALSV (*apple latent spherical virus*) ベクターを介したクロマツの形質転換技術が開発され、クロマツへの外来遺伝子の発現およびクロマツ内在性遺伝子の発現抑制がはじめて可能となった。本手法をマツ枯れメカニズムの研究へと応用することにより、これまで未開拓であったマツノザイ病原因子の証明がはじめて可能になると着想した。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、クロマツ種子胚においてマツノザイ病原候補因子を発現させ防御応答誘導活性を評価する技術を確立すること、さらにクロマツへ過剰な防御応答を誘導するマツノザイ病原因子を証明することである。

3. 研究の方法

本研究では、ALSV を用いてクロマツにマツノザイ病原候補因子を発現させ、本来の宿主であるマツにおいても防御応答を誘導し得るかを確認する。まず、感受性クロマツの苗木においては、マツノザイ感染時に一部の PR 遺伝子が過剰発現することが報告されているため、培地上のクロマツ種子胚においても、マツノザイを接種時に、PR 遺伝子の発現が上昇することをリアルタイム PCR で確認した。次に、線虫病病原候補因子の完全長 cDNA 配列を ALSV に組み込み、パーティクルガン法によりクロマツ種子胚へ接種した。本研究では、これまでに申請者らが見出してきたマツノザイ病原候補因子5種類(2種のソーマチン様タンパク質、システインプロテアーゼインヒビター、GST、GH-30)の完全長 cDNA 配列をプラスミドベクターに挿入し、5種類のプラスミドベクターを作製した(pEALSR2-BxTH1, pEALSR2-BxTH2, pEALSR2-BxCPI, pEALSR2-BxGH30, pEALSR2-BxGST)。pEALSR1 と pEALSR2L5R5 をキノア上で増幅させたあと、パーティクルガン法によりクロマツ種子胚に打ち込んだ。その後クロマツ種子胚は 90mm mGD プレートにて培養した。3, 5, 7 日間培養した後、クロマツ種子胚を回収し total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。マツノザイ感染時に特異的に応答する4種類のマツ防御応答遺伝子(*PR-2*, *PR-4*, *PR-5*, *PR-6*)に対するプライマーを用いて、各日数での遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により確認した。

4. 研究成果

感受性クロマツの苗木においては、マツノザイ感染時に一部の PR 遺伝子が過剰発現することが報告されている。本研究ではまず、培地上のクロマツ種子胚においても、マツノザイを接種時に、PR 遺伝子の発現が上昇することをリアルタイム PCR で確認した。中でも継続的に発現している *PR-2*、*PR-4*、*PR-5* および *PR-6* 遺伝子を、マツノザイ病原因子を探索する際のマーカー遺伝子として選抜した。次に上述5種類の病原候補因子の完全長 cDNA 配列を組み込んだ ALSV ベクターをパーティクルガン法を利用してクロマツ種子胚へ打ち込んだ結果、2種類の *thaumatin* ならびに GH-30 が全てのマーカー PR 遺伝子の発現を上昇させることが判明した。この結果により、これら3種類のマツノザイ由来の分泌タンパク質が自然宿主であるマツに対して防御応答を誘導することが明らかになった。これまで、マツを利用したマツノザイ分子機能解析系は存在しなかったことから、本研究成果により初めて自然宿主を用いた分子機能解析

手法の確立に成功したと言える。これまで、一部国外グループでは、RNAiによるマツノザイの遺伝子発現抑制を用いた機能解析を精力的に押し進めていた。しかしながら、マツノザイに対するRNAiの効果は非常に低く、また一過的であることから、病原因子の機能解析には不向きであるという問題点を抱えていた。本研究は、マツノザイではなくマツ側の遺伝子操作による、他研究者が未だ全く手を付けていない新たなアプローチであり、今後マツ枯れの病原因子をスクリーニングする上で有力なツールとなることが期待される。これら一連の研究成果は論文として取りまとめ、Frontiers in Plant Science 誌に発表された (Kirino et al., 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Ichiishi K, Ekino T, Kanzaki N, Shinya R | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Thick cuticles as an anti-predator defence in nematodes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nematology | 6. 最初と最後の頁 11-20 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1163/15685411-bja10107 | 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 Kanzaki N, Yamashita T, Lee JS, Shih PY, Ragsdale EJ, Shinya R | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Tokorhabditis n. gen. (Rhabditida, Rhabditidae), a comparative nematode model for extremophilic living | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16470 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-95863-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Shinya R, Kirino H, Morisaka H, Takeuchi-Kaneko Y, Futai K, Ueda M. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Comparative secretome and functional analyses reveal glycoside hydrolase family 30 and cysteine peptidase as virulence determinants in the pinewood nematode Bursaphelenchus xylophilus | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 640459 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.640459 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 桐野巴瑠、新屋良治 | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 マツ枯れの発病メカニズム解明に向けた研究最前線と将来展望 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 森林遺伝育種 第10巻 | 6. 最初と最後の頁 14-19 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32135/fgtb.10.1_14 | 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 Shinya Ryoji, Kirino Haru, Morisaka Hironobu, Takeuchi-Kaneko Yuko, Futai Kazuyoshi, Ueda Mitsuyoshi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Comparative Secretome and Functional Analyses Reveal Glycoside Hydrolase Family 30 and Cysteine Peptidase as Virulence Determinants in the Pinewood Nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 640459 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.640459 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 桐野 巴瑠、新屋 良治 | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 マツ枯れの発病メカニズム解明に向けた研究最前線と将来展望 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 森林遺伝育種 | 6. 最初と最後の頁 14 ~ 19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32135/fgtb.10.1_14 | 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 Watanabe Shu, Tsunashima Ayaka, Itoyama Kyo, Shinya Ryoji | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Survey of mermithid nematodes (Mermithida: Mermithidae) infecting fruit-piercing stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in Japan | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology | 6. 最初と最後の頁 27 ~ 39 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-020-00705-7 | 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 Kirino Haru, Yoshimoto Kohki, Shinya Ryoji | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Thaumatococin-like proteins and a cysteine protease inhibitor secreted by the pine wood nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> induce cell death in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0241613 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241613 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sun Simo, Shinya Ryoji, Dayi Mehmet, Yoshida Akemi, Sternberg Paul W., Kikuchi Taisei | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Telomere-to-Telomere Genome Assembly of Bursaphelenchus okinawaensis Strain SH1 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e01000-20 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01000-20 | 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 Ekino Taisuke, Kirino Haru, Kanzaki Natsumi, Shinya Ryoji | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Ultrastructural plasticity in the plant-parasitic nematode, Bursaphelenchus xylophilus | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 11576 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68503-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名 Shih Pei-Yin, Lee James Siho, Shinya Ryoji, Kanzaki Natsumi, Pires-daSilva Andre, Badroos Jean Marie, Goetz Elizabeth, Sapir Amir, Sternberg Paul W. | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Newly Identified Nematodes from Mono Lake Exhibit Extreme Arsenic Resistance | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Biology | 6. 最初と最後の頁 3339 ~ 3344.e4 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.08.024 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計28件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ekino T, Shinya R |
| 2. 発表標題 Diversity of the recognition system and nervous structure |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamashita R, Ekino T, Kanzaki N, Shinya R |
| 2. 発表標題 The possibility of matrotrophy in viviparous |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 新屋良治 |
| 2. 発表標題 Wild nematodes as model organisms |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 新屋良治 |
| 2. 発表標題 植物寄生性線虫における表現型可塑性と環境認識機構 |
| 3. 学会等名 日本獣医学会寄生虫分科会シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 市石 宙、新屋良治 |
| 2. 発表標題 線虫に感染する微胞子虫の探索とその特性解明 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 玉木芳明、新屋良治 |
| 2. 発表標題 Pelodera strongyloidesにおける交尾栓の役割 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 戸川侑樹、佐川茉莉花、Matthew R Gronquist、Paul W Sternberg、新屋良治 |
| 2. 発表標題 C. elegans のオスは揮発性の性フェロモンをどのように受容しているのか？ |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 立石迪照、小林大介、伊澤晴彦、新屋良治 |
| 2. 発表標題 Bursaphelenchus conicaudatus に感染しているウイルスの発見及び感染経路 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 土井健太郎、新屋良治 |
| 2. 発表標題 マツノザイセンチュウの交尾行動パターンの解明 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 高村美月、桐野巴瑠、秋庭満輝、菊地泰生、新屋良治 |
| 2. 発表標題 マツノザイセンチュウの増殖力と性比の多様性 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 日高旭峻、新屋良治 |
| 2. 発表標題 ニセフクロセンチュウの無摂食下における長期生存メカニズム |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山下達矢、浴野泰甫、神崎菜摘、新屋良治 |
| 2. 発表標題 胎生線虫 <i>Tokorhabditis tufae</i> は子に栄養を供給している？ |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤森友太、新屋良治 |
| 2. 発表標題 フトマルヤスデに共寄生する 3 種の線虫とその生活史 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浴野泰甫、新屋良治 |
| 2. 発表標題 植物寄生性線虫種間におけるアンフィドニューロンの共通性 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 桐野巴瑠、前原紀敏、新屋良治 |
| 2. 発表標題 オキナワザイセンチュウにおける dauer 誘導条件の探索 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 喜多村 隆、新屋良治 |
| 2. 発表標題 日本産 <i>Meloidogyne hapla</i> の生殖様式の解明 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 藤森友太、新屋良治 |
| 2. 発表標題 八重山諸島のフトマルヤスデに共寄生する線虫の生活史 |
| 3. 学会等名 日本生態学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新屋良治 |
| 2. 発表標題 マツノザイセンチュウの病原性と病原力の理解はどこまで進んだのか？ |
| 3. 学会等名 森林遺伝育種学会シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinya R, Kikuchi T, Sternberg PW. |
| 2. 発表標題 Bursaphelenchus okinawaensis: a genetically tractable system for the study of evo-devo and plant-parasitic nematodes. |
| 3. 学会等名 22nd International C. elegans Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinya R. |
| 2. 発表標題 Mining the hidden potential of C. elegans and other nematodes |
| 3. 学会等名 Future of the nematodes studies 2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shinya R, Shih PY, Lee JS, Kanzaki N, Sapir A, Sternberg PW. |
| 2. 発表標題 極限環境の湖に生息する線虫は高度ヒ素耐性を示す |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 富田陸, 浴野泰甫, 神崎菜摘, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 Aphelelenchoiidae科線虫における乾燥耐性メカニズム |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 堀江洋成, 浴野泰甫, 神崎菜摘, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 捕食性線虫 <i>Seinura caverna</i> における孵化幼虫の飢餓に対する適応戦略 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浴野泰甫, 神崎菜摘, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 捕食性線虫 <i>Seinura caverna</i> の共食い回避機構 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 桐野巴瑠, 吉本光希, 小長谷賢一, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 マツノサイセンチュウ分泌タンパク質に関するクロマツ胚を用いた機能解析 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 深山敦司, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 光強度はMeloidogyne incognitaのオス出現に影響する |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 渡部就, 網島彩香, 糸山享, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 果樹カメムシ類に寄生するシヘンチュウの調査 |
| 3. 学会等名 日本線虫学会第27回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 市石宙, 浴野泰甫, 神崎菜摘, 新屋良治 |
| 2. 発表標題 シロアリ嗜好性線虫はなぜクチクラを肥厚化させるのか? |
| 3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|