

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380085

研究課題名（和文） マツノザイセンチュウに対する抵抗性マツの抵抗性発現機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of resistance expression of resistant pines against pinewood nematode infection

研究代表者

山田 利博（YAMADA TOSHIHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30332571

研究成果の概要（和文）：マツ材線虫病に対する抵抗性機構を、抵抗性マツを用いて、遺伝子発現、組織学的・生化学的な変化から検討した。PR 遺伝子の発現を伴う生体防御の発動はクロマツ感受性個体で早いのにに対し抵抗性個体で遅く、抵抗性個体では活性酸素ーリグニン化関連遺伝子が早く発現した。組織学的には感受性で組織破壊が激しく、一部の抵抗性品種でリグニン化が顕著であった。また抗菌性物質の集積はストローブマツ以外では抵抗性、感受性共に認められなかった。

研究成果の概要（英文）：Resistance mechanisms of pine wilt-resistant pines were investigated from gene expression, histological and biochemical aspects. Expression of defensive genes including PR proteins genes was faster in susceptible clone of Japanese black pine, while reactive oxygen – lignification related genes were expressed faster in the resistant clone. Destruction of host tissue was severe in susceptible pines, and lignification was conspicuous in resistant pines. Accumulation of antimicrobial substances was not observed in both susceptible and resistant pines except eastern white pine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：森林生態・保護・保全

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウ（以下、線虫）によって生じるマツ材線虫病（マツ枯れ）は、わが国でいまだ猖獗を極めてだけでなく、東アジアで拡大の一途を辿っており、ポルトガルにも侵入が確認されるなど世界的な流行病となりつつある。本線虫は北米大陸由来と考えられており、旧世界に持ち込まれたこ

とで流行状態を招いた侵入病害である。わが国では被害に対処するため、枯損木の焼却や薬剤散布等対処療法的な対策に加え、恒久的な対策として抵抗性育種を第一に考える必要があることから抵抗性育種事業が展開され、アカマツ、クロマツとも抵抗性個体の選抜が行われてきた。

しかし、抵抗性機構が不明な現状において

は接種検定による選抜および交配による育種に限られ、抵抗性個体の選抜効率は極めて低い上に、マツ自体が他殖性であり、挿し木が困難といった制約のため、労力、時間、費用面で限界がある。そこで、育種の効率化を目指し DNA マーカーを利用した MAS (Marker Assisted selection) が進められているが、ゲノムサイズが巨大であり、ゲノム自体に重複が多いことなど様々な制限から遺伝学的手法だけで抵抗性に関する遺伝的特性や遺伝子の解明を目指すには多くの問題がある。一方、病徴進展に応じて発現する生体防御関連遺伝子群の単離といった分子生物学的アプローチは、上記問題を解決する上で最も有効な方法であり、家系に関係なく抵抗性を選抜することが可能であるとともに、抵抗性遺伝子の解明へ直結出来ると考えられる。

また、マツノザイセンチュウの感染に対するマツの組織・細胞学的あるいは生化学的反応に関しては感受性であるクロマツやアカマツについて数多く研究され、萎凋枯死過程における組織や細胞の壊死・破壊、脂質やタンニンなどの化学物質の変化について報告されている。一方、ストロブマツやテダマツなどの抵抗性のマツ樹種では樹体内での線虫の増殖が抑制されるとともに、マツ組織の壊死・破壊は接種部付近に限定的だとされている。生化学的な抵抗性機構についてはストロブマツで関与すると考えられる成分がいくつか判明している。しかし、選抜育種によって開発された抵抗性クロマツ・アカマツについては、抵抗性に関わる組織学的あるいは生化学的な検討はほとんどなされておらず、線虫の移動・増殖を抑制する機構は全く不明のままである。

抵抗性マツ類の組織レベルあるいは生化学的な防御反応やそれに対する線虫の分布・増殖を明らかにすることは、抵抗性機構の解明につながるだけでなく、抵抗性品種の開発・評価の重要な指標にもなる。

2. 研究の目的

本研究では、抵抗性マツ種であるテダマツ、ストロブマツ、あるいは抵抗性クロマツおよび感受性クロマツにおけるマツノザイセンチュウ侵入に伴う生体防御反応の違いを分子レベル（遺伝子発現レベル）、あるいは組織レベル、物質（活性成分）レベルで明らかにすることを目的とする。

そのために、線虫の侵入と拡大によって変化する生体防御関連遺伝子群の網羅的な単離を行い、時系列な発現定量解析を行うことによって、生体防御関連遺伝子群の樹体内応答に関する詳細、つまり経過時間毎に特異的に発現する遺伝子の特定とその発現差異を明らかにする。

また、マツ内部における線虫の加害程度とそれに対応するマツ側の防御応答を解剖観察や抽出物の検定により、感受性マツおよび抵抗性マツで比較することで、材線虫病抵抗性に関わる防御応答を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生体防御関連遺伝子発現プロファイル解明

①サブトラクション法による生体防御関連遺伝子の単離

クロマツ抵抗性個体（波方 73：抵抗性ランク 5）およびクロマツ感受性個体（片浦 1）を利用し、マツノザイセンチュウ（アイソレート：Ka-4）を接種した後、1 日、3 日、7 日、14 日目の皮層および形成層の組織から抽出した RNA をもとにサブトラクションライブラリーを作成した。サブトラクションライブラリーは、同時系列の抵抗性から感受性の発現遺伝子を差分したライブラリーを Forward ライブラリーとし、感受性から抵抗性の発現遺伝子を差分したライブラリーを Reverse ライブラリーとして、計 7 ライブラリーを作成した。なお、感受性の 14 日目のサンプルは枯死したため、十分な RNA を抽出することができなかった。そこで、14 日目については、抵抗性 14 日目のサンプルと感受性 7 日目のサンプルを利用した Forward ライブラリーのみを作成した。サブトラクションライブラリーは Clontech 社製のキットを利用して、推奨されているプロトコールに従って作製した。

作成した 7 ライブラリーについては、クローニングの後、任意に選抜した 500 クローンをシーケンス解析し、それぞれの配列は Blast2GO を利用して相同性検索およびアノテーションを行った。さらに、抵抗性および感受性の各ライブラリーにおいて顕著に差分され単離できた遺伝子については、リアルタイム PCR による発現定量解析を行った。

②マイクロアレイを利用した生体防御関連遺伝子の発現プロファイリング

サブトラクション法によって単離したクロマツの 1,175 遺伝子およびテダマツで単離されている 11,121 遺伝子を利用してマイクロアレイ (NimbleGen Microarray 4×72K) を作成し、抵抗性および感受性クロマツにおける線虫接種後、3、12、24、168 時間後の遺伝子発現プロファイルを行った。さらに、各時系列において非接種サンプルの遺伝子発現をリファレンスとして 2 倍以上の発現量に差が認められる遺伝子を比較した。

(2) 活性物質、防御関連物質の特定と生成解析

線虫 (Ka4) を接種したストロブマツ、テダマツ及びクロマツ（抵抗性クローン及び感受性クローンにつきそれぞれ数系統）の

苗木から、経時的に枝部を採取し凍結保存した。接種部から下に5~15cm程度離れた部位を抽出に用いた。

線虫抵抗性に関連する物質の探索にあたっては抽出物中の抗菌性を有する物質の検出はTLCバイオオートグラフィー法あるいはペーパーディスク法によった。

<抽出物の調製および前処理>

・メタノール抽出

凍結サンプルを樹皮と材とに分けて細かく刻み、重量の30倍量のメタノールを加えて室温で一晩静置した後固形物を除去し、減圧乾固させた。TLCでの分離に際しては、樹皮は0.5g/mL、材は1g/mLに相当する濃度になるようメタノールに再溶解させ、内20μL分をスポッティングした。

・温水抽出及び分子量分画

刻んだ試料（樹皮と材に分けた場合と分けなかった場合がある）に重量の10倍量の純水を加え40℃で一晩静置した後、桐山濾紙で濾過し固形物を除去した。ロータリーエバポレーター及び遠心エバポレーターを用いて1g/mL、2g/mLおよび4g/mLに相当する濃度に調製した。抽出液の一部は、遠心式限外濾過フィルターを用い、3つの分子量範囲（~3,000、3,000~50,000、50,000~）に分画・濃縮した。

・冷水抽出

試料（樹皮と材は分離せず）を液体窒素中で粉碎し、次いで10倍量の冷純水を加えて懸濁させた。冷蔵庫中で1時間静置した後、桐山濾紙で濾過し固形物を除去した。凍結乾燥により水を除去し、1g/mL、2g/mLおよび4g/mLに相当する濃度になるように純水を添加して再溶解させた。

(3) 形態・組織化学的变化および線虫の行動解析

抵抗性クロマツ品種および感受性クロマツ品種の接ぎ木クローン苗や、ストローブマツとテータマツの成木の枝に線虫（Ka-4、10,000頭）を接種した。接種3日後から2週間後にかけて接種枝をサンプリングし、接種部に近い部位から切片を作成した。

切片作成はクリオミクロームおよび粘着フィルム法（川本法）により行った。粘着フィルム法は、切片をフィルムに貼り付けた状態で染色作業および観察を行うことができるので、組織の変形や線虫の脱落等を防ぐことができる方法である。染色には、リグニンを染色するフロログルシン塩酸法、フェノール性化合物を染色するファストブルーB染色、線虫を蛍光染色するF-WGA染色を行った。

4. 研究成果

(1) 生体防御関連遺伝子発現プロファイル解明

① サブトラクション法による生体防御関連遺伝子の単離

クロマツ抵抗性および感受性個体におけるマツノザイセンチュウ接種に伴う生体防御関連遺伝子の発現挙動の違いを明確にするために、接種後の時系列に従ってSuppression Subtractive Hybridization (SSH) 法による発現プロファイルを行った。

抵抗性個体のライブラリーから単離した遺伝子の多様性は高く、1日目および3日目のライブラリーではCellular processやMetabolic processに分類される遺伝子群が単離できた。7日目および14日目になるとResponse to stimulusに分類される刺激応答および生体防御に関連する遺伝子群が単離できた。感受性個体のライブラリーから単離した遺伝子の多様性は顕著に低く、接種後1日目から7日目までにResponse to stimulusを中心とする刺激応答や生体防御に関連する遺伝子群が多く単離でき、それらの遺伝子群は感受性個体のライブラリーの半数を占めた（図1）。

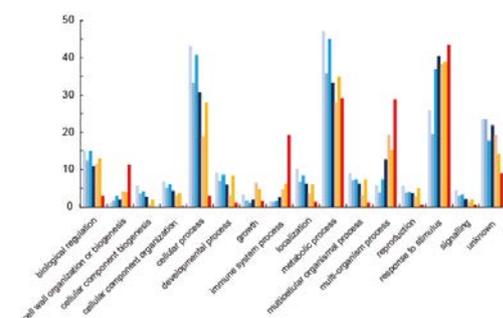


図1 各ライブラリーから単離した遺伝子のGO (Gene Ontology) マッピング

Biological processに分類される二番目の階層グループごとに分類した。抵抗性 (R) および感受性個体 (S) におけるマツノザイセンチュウ接種後、1日目 (1dpi)、3日目 (3dpi)、7日目 (7dpi)、14日目 (14dpi) の各ライブラリーの遺伝子群の構成を示す。

サブトラクション法で単離した遺伝子の発現を定量的に検証するために、リアルタイムPCRによる発現定量解析を行った。ターゲットとした遺伝子は、抵抗性個体のライブラリーで顕著に表れた Peroxidase (PR-9) および Extensin、感受性のライブラリーで顕著に表れた Thaumatin-like protein (PR-5) および Proteinase-inhibitor (PR-6) である。PR-9、Extensin、PR-5 および PR-6 の遺伝子発現は、抵抗性および感受性共に線虫の侵入と時間の経過とともに増加することが分かったが、抵抗性と感受性個体では遺伝子間の発現パターンに違いが見られた（図2）。感受性個体はいずれの遺伝子においても接種後1日目から3-5倍量の発現変動を示した。一方で、抵抗性個体では1日目および3日目に

において PR-5 および PR-6 の遺伝子発現がわずかに 1-2 倍の発現変動を示すが、PR-9 および Extensin の遺伝子発現は接種後 1 日目から 2.5-4 倍量増加することが分かった。さらに 7 日目および 14 日目の発現量は、いずれの遺伝子も感受性個体の発現量とほぼ同等になることが分かった。

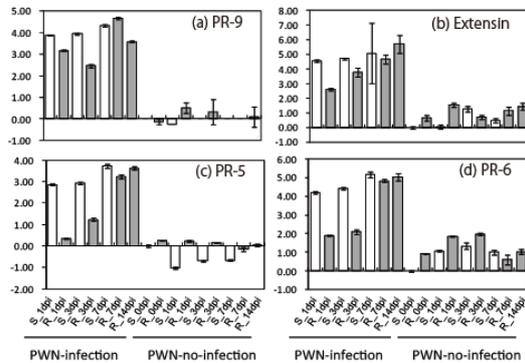


図 2 生体防御関連遺伝子の発現定量解析

発現定量解析には抵抗性 (R) および感受性個体 (S) におけるマツノザイセンチュウ (PWN) 接種後、1 日目 (1dpi) ,3 日目 (3dpi) ,7 日目 (7dpi) ,14 日目 (14dpi) および同時系列の非接種個体を使用した。発現量は感受性個体の非接種 0 日目のサンプルをリファレンスとして相対的に比較した。(a)PR-9 は Peroxidase, (b) Extensin, (c) PR-5 は Thaumatin-like protein, (d) PR-6 は proteinase-inhibitor に相当する遺伝子を表す。

②マイクロアレイを利用した生体防御関連遺伝子の網羅的発現プロファイリング

クロマツ抵抗性および感受性個体における線虫接種に伴う生体防御関連遺伝子の発現挙動の違いを網羅的にプロファイルするためにマイクロアレイを用いた発現解析を行った。

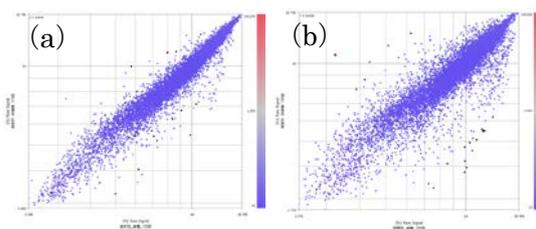


図 3 マイクロアレイによる発現解析 (Scatter plot)

(a) 抵抗性個体の接種後 7 日目の遺伝子発現の比較を示し、(b) 感受性個体の接種後 7 日目の遺伝子発現の比較したものを示す。縦軸はモック (水を接種したもの) の発現を示し、横軸は線虫を接種したものの。

発現解析を行った結果、抵抗性および感受性共に接種後 3 時間、12 時間、24 時間の遺伝子発現に顕著な差異は観察出来なかった。しかし、接種後 168 時間 (7 日目) では、抵抗性個体で遺伝子発現に変動が見られな

った一方で、感受性個体では 22 個の遺伝子で発現に変動が見られた (図 3)。特に感受性個体で顕著な発現変動が見られた遺伝子は PR-4 と PR-5 であった。

③抵抗性および感受性個体における線虫に対する生体防御反応の違い

サブトラクション法およびマイクロアレイ解析の結果から、抵抗性個体および感受性個体における線虫侵入に伴う生体防御反応の違いには顕著な違いが認められた。抵抗性個体では線虫の侵入に対し、PR 遺伝子の発現を伴う生体防御反応の発動が遅く、感受性では逆に PR 遺伝子の発現を伴う生体防御反応の発動が早期に生じる。また、抵抗性個体では、少なくとも 1-3 日目の間に PR-9 や Extensin といった活性酸素の発生によって誘導される細胞壁強化 (リグニフィケーション) に関連する遺伝子が PR 遺伝子を中心とする生体防御関連遺伝子よりも多く発現している。

クロマツにおける抵抗性および感受性の線虫に対する生体防御反応において、抵抗性個体は、線虫の侵入に対し、より局所的かつ早期にセンチュウの移動を制限できる遺伝子 (リグニフィケーションに関連する遺伝子) を発現・機能させ、早期にセンチュウの増殖と拡大を抑制する防御メカニズムが働いていると推察される。一方で、感受性個体では、リグニフィケーション等の遺伝子発現の他にも PR 遺伝子の過剰発現を伴った過敏反応 (Hypersensitive reaction) が生体防御のバランスを崩し、センチュウの移動および拡大を制限できず、水分通道阻害 (キャビテーション) の誘導につながり、結果として枯死に至っていると推察される。今回の遺伝子発現解析の結果から、PR-5 の遺伝子発現は特に感受性で早期に高発現していることから、抵抗性および感受性個体を判断する分子マーカーとして利用できる可能性がある。

(2) 活性物質、防御関連物質の特定と生成解析

<ストロブマツ及びテダマツ>

メタノール抽出物の TLC バイオオートグラフィーのみを実施した。線虫接種 14 日目に採取したサンプルを分析に用いた。

ストロブマツでは樹皮抽出物の一部において抗菌スポット (Rf 値 0.5 近辺) が検出され、この物質の同定を行う予定であったが、同じサンプルの別部位からの抽出物を用いて再度同様の試験を行ったところ抗菌スポットは検出できなかった。再現性の良い結果を得るには抽出部位や分析法の再検討が必要と考えられた。一方、テダマツについては、いずれのサンプルにおいても抗菌スポットは検出されなかった。

<クロマツ>

用いたクローンを以下に示した。
 抵抗性：波方37、波方73、津屋崎50
 感受性：片浦1、瑞浪1

・TLCバイオオートグラフィー

この試験では、波方37、津屋崎50及び片浦1（線虫接種7日後）を用いた。いずれのクローンにおいても明瞭な抗菌活性は検出されなかった。また、線虫接種の有無による相違は認められなかった。

・ペーパーディスク法

温水抽出物（分子量分画なし）の抗菌検定には波方37、津屋崎50及び片浦1（線虫接種7日後）を用いた。温水抽出物（3つの分子量範囲に分画）の検定では、波方73及び瑞浪1（線虫接種3日後及び10日後）を用いた。冷水抽出物の検定には津屋崎50及び片浦1（線虫接種7日後）を用いた。いずれのサンプルについても、線虫接種の有無によらず抗菌活性は検出されなかった（図4）。

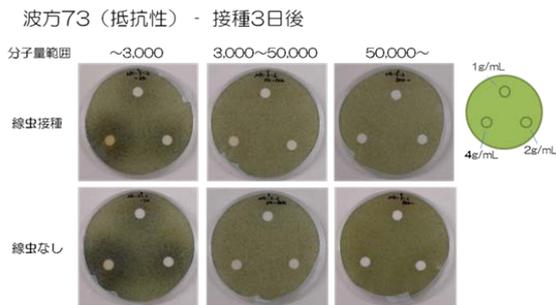


図4 ペーパーディスク法によるクロマツ温水抽出物の抗菌検定の一例

(3) 形態・組織化学的变化および線虫の行動解析

感受性クロマツでは、接種後3日目までに、皮層樹脂道と木部樹脂道におけるエピセリウム細胞の破壊、形成層の破壊が観察された（図5）。形成層の生じた空隙には多数の線虫が分布しており、線虫の増殖は形成層を加害することによって生じることが推察された。7日目以降、形成層や木部柔組織が激しく加害され、線虫が多数観察された。柔細胞の一部ではリグニン化やフェノール物質の蓄積が確認された。

抵抗性クロマツでは、接種後3日目に皮層樹脂道のエピセリウム細胞の破壊が観察されるものの、木部樹脂道や形成層では破壊が生じておらず、感染初期における組織破壊の進展が感受性クロマツに比べて遅いことがわかった。7日目以降は、組織破壊がゆっくりと進展していく品種（波方73、波方37）とほとんど拡大しない品種（志摩64）がみられた。ほとんど拡大しない品種の特徴として、リグニン化が多数の柔細胞で生じるという特徴がみられた（図6）。

結論として、抵抗性クロマツでは品種に関わりなく、初期の組織破壊の進展が遅いとい

う特徴が認められた。初期の病徴進展を抑制する機構は組織化学的観察からは明らかにされなかったが、後期における抵抗性、つまり発現までに時間のかかる防御反応が線虫の加害に対して間に合うことによって、最終的に枯れずに生き残れるのではないかと推察された。

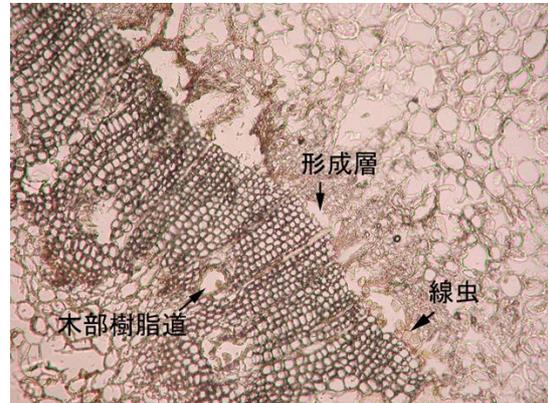


図5 感受性クロマツでみられた組織破壊と線虫の増殖（接種後3日目、無染色）

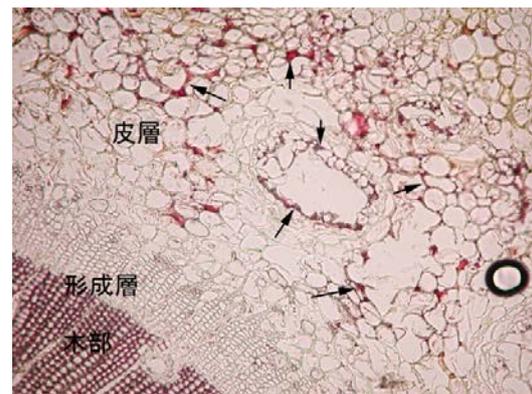


図6 抵抗性クロマツ（志摩64）でみられた柔細胞のリグニン化（接種後10日、フロログルシン塩酸染色）
 矢印はリグニン化した細胞壁を指す。

ストロブマツの分離線虫数は時間の経過とともに漸減した。解剖観察では、いずれの時期においても形成層や木部組織の破壊は認められず、切片中に線虫を確認することはできなかった。したがって、線虫はストロブマツの組織を加害することができず、増殖することもできなかったと考えられた。

テダマツでは分離線虫数が比較的多いものほとんど分離されないものに分かれた。1日目から7日目までの枝や14日目以降で線虫がほとんど分離されない枝では、解剖観察によって組織内に線虫を確認することがなく、形成層や木部組織の破壊も起こっていなかった。一方、14日目や28日目の線虫が多数分離された枝では、形成層や木部樹脂

道の一部が破壊され、破壊された細胞の周辺は褐色に変色していた。線虫は変色域の形成層の空隙や木部樹脂道に多数観察されたが、非変色域ではほとんどみられなかった。ファストブルーB染色では褐変した組織が赤褐色に染色され、フェノール性物質の存在が推察された。

これらのことから、テーダマツでは、接種枝によっては組織の破壊が起こり、そのような場合には線虫の増殖が起こることがわかった。しかし、組織破壊が起こったとしても、その周囲で防御反応が起こり、線虫の分散を抑制しているものと考えられた。

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 4 件)

- ① 楠本 大・米道 学・村田政穂・渡辺敦史・磯田圭哉・平尾知士・山田利博、材線虫病抵抗性マツ類における組織の反応と線虫の分布・増殖、樹木医学研究、査読有、14 巻 3 号、2010、pp.98-100
- ② 山田利博・米道 学・里見重成・井上広喜、千葉演習林産材線虫病抵抗性マツのセグメントを用いた抵抗性機構探索、樹木医学研究、査読有、14 巻 3 号、2010、pp.114-115
- ③ 米道 学・塚越剛史・里見重成・軽込勉・池田裕行・山田利博、千葉演習林において選抜したアイグロマツの材線虫病抵抗性、関東森林研究、査読有、60 号、2009、pp.113-116
- ④ 山田利博、微生物の感染と樹木の反応、樹木医学研究、査読有、12 巻 2 号、2008、pp.91-97

[学会発表] (計 18 件)

- ① Hirao, T.、Differential gene expression of pine wood nematode-resistant and -susceptible Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) in response to PWN infection, Plant and Animal genome XIX Conference, 2011 年 1 月 15-19 日、サンディエゴ (アメリカ合衆国)
- ② 平尾知士、マツノザイセンチュウ侵入後のクロマツの生体防御関連遺伝子プロファイル、日本育種学会、2010 年 9 月 25 日、秋田県立大学
- ③ 平尾知士、クロマツにおけるマツノザイセンチュウ生体防御関連遺伝子の発現プロファイリング、日本植物生理学会第 51 回年会、2010 年 3 月 19 日、熊本大学
- ④ Hirao, T.、Gene expression profiling in *Pinus thunbergii* defence responses to nematode infection, Plant and Animal

Genome XVIII Conference, 2010 年 1 月 9-13 日、サンディエゴ (アメリカ合衆国)

- ⑤ 渡辺敦史、ストレス応答遺伝子の種内変異解明に向けた基礎的研究、第 120 回日本森林学会大会、2009 年 3 月 26 日、京都大学

[図書] (計 2 件)

- ① Yamada, T.、Springer Verlag、Biochemical responses in pine trees affected by pine wilt disease. In "Pine Wilt Disease", 2008、223-234
- ② Wang, Y., Yamada, T., Sakaue, D. and Suzuki, K.、Springer Verlag、Influence of fungi on multiplication and distribution of the pinewood nematode. In "Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems", 2008、115-127

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

鴨田 重裕 (KAMODA SHIGEHIRO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：80282565
渡邊 敦史 (WATANABE ATSUSHI)
独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部育種第二課育種研究室・研究室長
研究者番号：80282565

(3) 連携研究者

磯田 圭哉 (ISODA KEIYA)
独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター森林バイオ第一研究室・研究員
研究者番号：60391702