

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21780147

研究課題名（和文） マツ材線虫病における病原線虫－宿主植物間の初期認識機構に関する分子生物学的研究

研究課題名（英文） Molecular biological study on the pathogenic nematode-host plant interactions at the early stage of pine wilt disease

研究代表者

竹内 祐子（TAKEUCHI YUKO）

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（和文）：伝染性森林病害であるマツ材線虫病の病原機構を明らかにするため、分子生物学的手法を用いて病原体マツノザイセンチュウとマツ属宿主との間の初期認識を精査した。マツノザイセンチュウの体表タンパク質および分泌タンパク質を対象としたプロテオーム解析と、感受性クロマツを対象とした遺伝子発現解析を行った結果から、マツノザイセンチュウは宿主側の防御応答を回避するなんらかの機構を備えている可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pine wilt disease is an infectious forest disease caused by the pathogenic pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. To elucidate the pathogenic mechanism of the disease, the interaction between the nematode and host pine at an early stage was investigated, by means of molecular biological techniques. The proteomic analyses determined the profile of surface-coat proteins and secreted proteins of the nematode, and cDNA subtraction analysis determined several genes involved in the host responses. Results obtained indicate that the pine wood nematode has a kind of system to defeat host defense responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：遺伝子発現・森林病害・線虫・相互認識機構・プロテオーム・マツノザイセンチュウ

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウ（以下、ザイセンチュウ）を病原体とするマツ材線虫病は、1905年の国内最初の被害報告以降、北海道を除く日本全国及び東アジア諸国、欧州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樹木萎凋病である。本病の伝染環は病原

線虫－伝播昆虫－宿主植物の三者による複雑な相互作用の上に成立しており、これまで三者各々を標的として様々な防除対策が講じられてきたものの、本病は今なお各地で猖獗を極めている。

本病の防除が困難な理由としては、そもそも本病の病原機構が完全に解明されていな

いために、対症療法をとらざるを得ないことが挙げられる。ザイセンチュウ感染後の宿主体内における詳細な病徴進展過程は組織化学的研究等により明らかにされてきたが (Fukuda 1997; 山田 2006; 原・竹内 2006 など)、感染成立の可否を決定する因子はまだまだ仮説の域を出ない。線虫と宿主の親和性は、主にザイセンチュウ側の病原力とマツ側の感受性により決定するが、そのいずれも種内で大きく変動し、しかも環境条件等の外的要因にも左右される。また、それら両者を司る因子に関する分子生物学的研究も皆無であった。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえて、宿主の病徴進展といういわば感染成立後のプロセスを追うという従来の視点から離れ、本病の感染成立の場に着目した。病原線虫-宿主植物の相互初期認識メカニズムを詳らかにすることで、本病の病原機構を解明することが可能になると考えた。本研究では、(1) ザイセンチュウと (2) 宿主である感受性クロマツの両者を研究対象とし、認識分子及び遺伝子のスクリーニングと検証を相互に繰り返し行うことにより、初期認識機構の全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ザイセンチュウ病原因子の探索

ザイセンチュウにおいて宿主マツ組織との最初の接触面である体表面タンパク質 (SC) 及び発病過程への関与が指摘されてきた分泌タンパク質に特に注目し、プロテオーム解析による網羅的同定を行った。SC タンパク質に関しては、糸状菌 *Botrytis cinerea* 菌叢上での培養時と宿主植物体内での増殖時という異なる条件下にあるザイセンチュウを対象として、体表面物質の網羅的解析を行い比較した。分泌タンパク質については、研究期間中に解説・公開された本線虫種のドラフトゲノム情報 (Kikuchi et al. PLoS pathogens, 2011) を利用し、LC-MS/MS 解析を行った。

(2) 宿主植物の発病因子の探索

宿主であるマツ属樹に関しては、研究開始時点で明らかになっている遺伝子情報が少なかったことから、標的遺伝子を絞らない網羅的な遺伝子発現解析として、cDNA サブトラクション法 (発現量に差のある差次的遺伝子、すなわち 2 種類の mRNA 集団の一方が発現しているが、他方では低下または発現していない遺伝子を選択的に増幅する手法) による発現遺伝子群の量的比較を行った。これは、対象として病原力の異なる 2 系統 (強病原力系統 S10、弱病原力系統 OKD-1) のザイ

センチュウを人工接種して 28 時間後及び 76 時間後の感受性クロマツ鉢植え苗を用いた。その結果をもとに強病原力系統のザイセンチュウ感染時のみ、あるいは弱病原力系統のザイセンチュウ感染時のみ宿主樹木において発現誘導される遺伝子群を選抜し、部分塩基配列情報を得た。また、そのなかで病徴進展に関与していると思われる 4 種の遺伝子について、ザイセンチュウ (強病原力系統及び弱病原力系統の増殖型、強病原力系統の分散型を接種源として使用) 感染後の発現量の動態をリアルタイム PCR 法による定量解析から明らかにした。

4. 研究成果

(1) ザイセンチュウ病原因子

まず、ザイセンチュウの SC タンパク質の解析結果から、ザイセンチュウは環境条件によって体表構造を大きく変化させることが明らかになった。特に、糸状菌叢上での培養時と宿主感染後 (樹木体内での増殖時) では変化が大きく、後者は量にして約 9 倍であり (図 1)、さらに構造も大きく異なっていた (図 2)。RP-HPLC 及び SDS-PAGE による分離を経て、生成量の大きく異なっていた 37 のタンパク質画分 (うち 29 種は後者で生成量が多く、8 種は少なかった) を選抜して MALDI-TOF/MS 解析に供した結果、活性酸素種除去に関わる分子など複数の分子は宿主感染に伴って生成量が増加していることが明らかになった。また、後者のみに含まれる SC タンパク質として同定されたタンパク質のうち、9 種はザイセンチュウ由来ではなくその随伴細菌由来であることが示唆された (Shinya et al. 2010)。

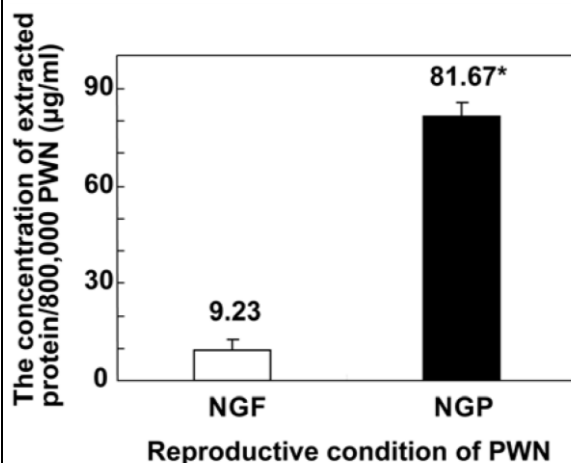


図 1. 菌叢上培養線虫 (NGF) と宿主クロマツに接種した線虫 (NGP) から抽出した総タンパク質量比較。ザイセンチュウ約 8×10^5 頭を使用 (反復 3 回; $P < 0.01$, Tukey's test).

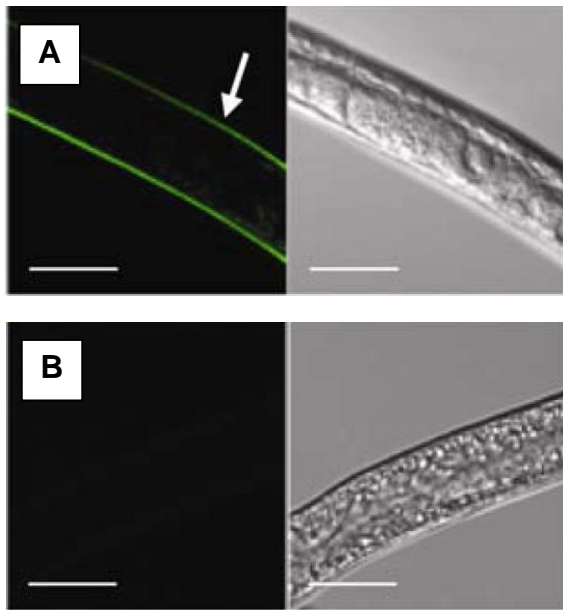


図 2. 宿主クロマツに接種した線虫 (A) と菌叢上培養線虫 (B) の免疫染色画像. 14-3-3 タンパク質に対する一次抗体で染色後、FITC 標識抗体で二次反応. いずれも左が蛍光観察、右は明視野観察. クロマツ内生息時のみ体表に 14-3-3 タンパク質が提示されている様子がわかる.

また、クロマツ組織の水抽出物により分泌促進させることで得たザイセンチュウの分泌タンパク質に含まれる 1360 種を網羅的に同定した (未発表)。

(2) 宿主植物の発病因子

cDNA サブトラクション (Clontech PCR-Select cDNA サブトラクションキット, タカラバイオ) により得られた cDNA ライブラリーについて、サブクローニングを経て (TA Cloning Kit, Invitrogen 使用) 塩基配列解析を行い、Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) を用いて BLASTx 検索、機能の推定および Gene Ontology (GO) 解析による生物学的プロセスおよび分子機能の分類とその比較を行った。

接種 28 時間後の結果は図 3 の通りである。強病原力系統のザイセンチュウ感染時と弱病原力系統のザイセンチュウ感染時とで、マツにおいて発現誘導される遺伝子群の大半は Catalytic activity と Binding に分類され、大きな差は認められなかった。しかし、数は少ないものの、弱病原力系統接種マツでのみ活性酸素耐性に関係する遺伝子が発現していた (図 2A)。

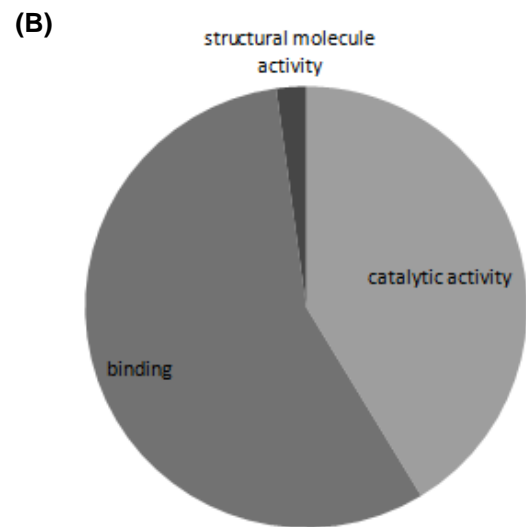
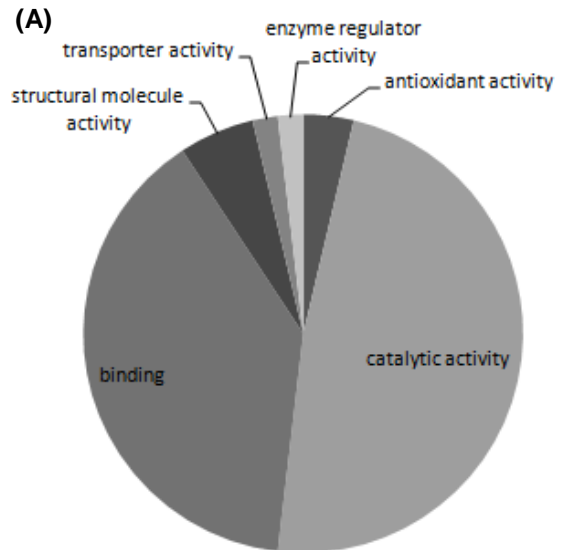


図 3. 弱病原力系統線虫を接種したマツで多く発現していた遺伝子 (A) 及び強病原力系統線虫を接種したマツで多く発現していた遺伝子 (B) の分子機能による分類. 接種 28 時間後の結果を示す.

さらに、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量試験から、強病原力系統ザイセンチュウは宿主マツの初期の防御応答を抑制している可能性があること、特に分散型 (媒介昆虫による移動・分散時にとる形態) のザイセンチュウは宿主マツの認識を回避する機構を持っている可能性が高いことが示唆された。

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 3 件)

1. Shinya, R., Morisaka, H., Takeuchi, Y., Ueda, M., and Futai, K. Comparison of the surface coat proteins of the pine

wood nematode appeared during host pine infection and in vitro culture by a proteomic approach. *Phytopathology*, 査読有, Vol. 100, 2010, 1289-1297
doi:10.1094/PHYTO-04-10-0109

2. Takeuchi, Y., and Futai, K. Diagnosis and quantification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer), in wood of *Pinus thunbergii* with real-time PCR. *Nematological Research*, 査読有, Vol. 39, 2009, 9-16
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjn/39/1/39_1_9/_pdf
3. Shinya, R., Takeuchi, Y., Miura, N., Ueda, M., and Futai, K. Surface coat proteins of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: profiles of stage- and isolate-specific characters. *Nematology*, 査読有, Vol. 11, 2009, 429-438
DOI:10.1163/156854109X447006

[学会発表] (計 11 件)

1. 津川 和典・竹内 祐子・二井 一禎「マツノザイセンチュウ接種により誘導されるクロマツの遺伝子発現プロファイル」第 123 回日本森林学会大会、2012 年 3 月 28 日、宇都宮大学 (栃木県)
2. 新屋 良治・森坂 裕信・竹内 祐子・菊地 泰生・植田 充美・二井 一禎「プロテオーム解析から見えてきたマツノザイセンチュウの寄生戦略」第 123 回日本森林学会大会 (招待講演)、2012 年 2 月 28 日、宇都宮大学 (栃木県)
3. 金子 彰・新屋 良治・竹本 周平・竹内 祐子・二井 一禎「マツノザイセンチュウ純系間における遺伝子発現プロファイルの比較」日本線虫学会第 19 回大会、2011 年 9 月 15 日、京都市国際交流会館 (京都府)
4. Futai, K., Shinya, R., Takeuchi, Y., and Ueda, M. Pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, revealed by proteomic analysis. 3rd International Symposium on Frontiers in Agriculture Proteome Research, 10 November, 2011, Tsukuba International Congress Center (Ibaraki Prefecture)
5. Shinya, R., Takeuchi, Y., Morisaka, H., Ueda, M., and Futai, K. Surface coat and secretion proteins of the pine wood nematode: the strategy requirements for attack and defense at the host-parasite interface. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 9 September, 2011, Sapporo Convention Center (Hokkaido)

6. Shinya, R., Takeuchi, Y., Morisaka, H., Kikuchi, T., Ueda, M., and Futai, K. A proteomic dissection of the parasitic strategy of the pinewood nematode. Society of Nematologists 50th Anniversary Meeting, 18 July, 2011, Oregon State University (U.S.A.)
7. Takeuchi, Y., Shinya, R., Ichimura, K., Takemoto, S., and Futai, K. Establishment of the genetically uniformed pure-lines of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, 23 September, 2010, Vienna (Austria)
8. Shinya, R., Morisaka, H., Takeuchi, Y., Ueda, M., and Futai, K. Dramatic alteration of the surface coat proteins of the pine wood nematode during host pine infection revealed by a proteomic approach. 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, 22 September, 2010, Vienna (Austria)
9. 新屋 良治・森坂 裕信・竹内 祐子・植田 充美・二井 一禎「病原力の異なるマツノザイセンチュウ 4 系統間での比較セクレトーム解析」日本線虫学会第 18 回大会、2010 年 8 月 26 日、北海道大学 (北海道)
10. 新屋 良治・森坂 裕信・竹内 祐子・植田 充美・二井 一禎「マツ感染時におけるマツノザイセンチュウ表面タンパク質のフォーカストプロテオーム解析」日本線虫学会第 17 回大会、2009 年 9 月 4 日、崇城大学市民ホール (熊本県)
11. Shinya, R., Takeuchi, Y., Morisaka, H., Ueda, M., and Futai, K. Surface coat proteins of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. IUFRO 2009 International Symposium on Pine Wilt Disease, 22 July, 2009, 南京林業大学 (中国)

[図書] (計 1 件)

二井 一禎・竹内 祐子・山崎 理正 (京都大学学術出版会) 『微生物生態学への招待—森をめぐるミクロな世界』2012 年、353 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 祐子 (TAKEUCHI YUKO)

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：