

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658135

研究課題名（和文） マツノザイセンチュウ感染ウイルスの探索

研究課題名（英文） Detection of viruses infected the nematode *Bursaphelenchus xylophilus*.

研究代表者

横井 寿郎 (YOKOI TOSHIRO)

独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・主任研究員

研究者番号：60378867

研究成果の概要（和文）：本研究所で保存されているいくつかの系統のマツノザイセンチュウからウイルスの検出を行ったが、感染ウイルスを発見することはできなかった。また、他の生物を宿主とするウイルスを接種、あるいはエレクトロポレーション法により導入を試みたが、それでも感染するウイルスを見つけ出すことはできなかった。これらの結果から、マツノザイセンチュウはウイルス病に対してなんらかの強力な抵抗性を有していることが示唆され、まずはその解明が求められることとなった。

研究成果の概要（英文）：I tried to detect viruses in the nematode *Bursaphelenchus xylophilus* of some strains, but was not able to discover an infection virus. In addition, I inoculated the viruses which infected other creatures, or tried introduction those viruses by electroporation, but still was not able to find out virus which infected the nematode. From these results, it is suggested that *Bursaphelenchus xylophilus* has some kind of the systems of strong resistance for a viral disease, and at first the elucidation will be demanded.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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

マツ材線虫病は現在、北海道をのぞく日本全

土に広がり、年間約 60 万立米前後の松林の被害が続いている。おおまかな計算で年間

100万本の松が枯死していることになり、さらに日本の平均的な木造家屋に換算すると67000戸分に相当する。被害が甚大なため、これまでに多くの防除策が開発されてきた。現在主に用いられている防除手段は、病原のマツノザイセンチュウを対象とした樹幹注入、また、病原を媒介するマツノマダラカミキリに対する薬剤散布、伐倒駆除である。しかし、いずれの防除法も完全ではなく、また、環境への影響の懸念や材質の低下、あるいはコストの問題からこれらの防除事業への批判もある。

2. 研究の目的

(1) 1. の背景に記したような現状を打開する新しい防除法の開発として、申請者は天敵微生物としてウイルスを利用したマツノザイセンチュウの生物防除を考えた。

(2) ただし、マツノザイセンチュウに感染するウイルスはまだ発見すらされていない。本研究では、マツノザイセンチュウに感染能のあるウイルスを探索するとともに、既知の節足動物由来のウイルスを用いた人工接種により、その感染能を検証する。特に防除に効果的な、病原性の強いウイルスを選抜する。そして、ウイルスの感染・増殖時に宿主へ与える影響を明らかにする。それによって、さらなる病理学的な解析や、ウイルスの効率的な伝播法を考えることが可能になり、実用化をめざす研究へとつなげることができる。

(3) 本研究により、生物農薬として利用可能なマツノザイセンチュウ感染ウイルスを見つけ出すことができれば、安全で安価で確実なマツ材線虫病防除法として、従来の防除技術に代わる新技術開発の礎になると思われる。

(4) また、線虫寄生ウイルスはまだ研究がほとんど進んでいない分野である。マツノザイセンチュウに対してウイルスを生物農薬として利用する技術が確立できれば他の線虫病へも広く適用できる技術として応用することができるだろう。そしてそれらの研究成果を基にして、新たに線虫ウイルス学なる新分野が構築されることも予想される。

3. 研究の方法

(1) マツノザイセンチュウに感染するウイルスを探索する方法は、未知ウイルスを網羅的に検出する方法と、既知ウイルスを網羅的に接種する方法と二つの方法で行う。

(2) 自然界でマツノザイセンチュウに感染している未知のウイルスを検出する方法は、各地からさまざまな系統のマツノザイセンチュウを幅広く採集し、電子顕微鏡によりウイルス粒子の確認を行う。検出されたウイルスに関しては、ゲノム解読や理化学的性質の解明を行い、ウイルスの同定を行う。

(3) 既知のウイルスをマツノザイセンチュウに接種する方法は、自然界では他の生物を宿主とする既知のウイルスを接種し、その増殖を確認する。接種には、Mermithid 線虫や *Caenorhabditis elegans* で増殖が確認されたウイルスだけでなく、その他のウイルスも各種用い、より効果的なウイルスを探索する。その他のウイルスは、分類学上線虫と同じ脱皮動物上門に属する節足動物を宿主とするウイルスの中から、比較的宿主範囲が広いウイルスを選抜して用いる。そして、接種後の線虫体内でのウイルス量の増殖は、経時的にリアルタイムPCRによるウイルスゲノム核酸の定量を行うことによって明らかにする。

(4) 増殖の見られたウイルスに関して病原性を評価する。ウイルスの病原性のメカニズム、宿主生物のどの部分に作用するかを明らかにすることは、ウイルスを防除に用いる際の安全性確保のために避けて通れない。ウイルスゲノムへの変異の導入とウイルスタンパク質の大量発現によってウイルスの病原性因子を特定する。また、マツノザイセンチュウの cDNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、感染時・増殖時の線虫体内の発現解析を行う。発現量に差の見られた遺伝子は、ウイルスの病原性因子との相互関係を解析する。このようにして、生物農薬としてウイルスがマツノザイセンチュウにどのような作用機作をもつのか遺伝子レベルで明らかにする。

4. 研究成果

(1) 本研究は、天敵微生物としてウイルスを利用したマツノザイセンチュウの生物防除法を開発することを最終目的とし、まずマツノザイセンチュウに感染する病原性ウイルスの探索を行った。本研究所で保存されている4つの系統のマツノザイセンチュウの他に、全国から集めた各系統のマツノザイセンチュウからウイルスの検出を行ったが、自然界で感染しているウイルスを発見することはできなかった。

(2) また、他の生物を宿主とするウイルスのマツノザイセンチュウへの接種も試みた。外皮への接種、エサとともに経口摂取、どちらの方法でも感染を確認することはできなかった。さらに、ポリエチレングリコール存在下、あるいはエレクトロポレーション法により人工的に外皮に傷をつけ、その傷口を介したウイルスの導入を試みたが、それでも感

染するウイルスを見つけ出すことはできなかった。

(3) これらの結果から、マツノザイセンチュウはウイルス病に対してなんらかの強力な抵抗性を有していることが示唆された。ウイルスはあらゆる生物の細胞に感染するよう進化してきた完璧な寄宿主であるが、線虫に感染している報告例は少ない。唯一自然界で線虫に感染しているウイルスの報告は、1980年に Poinar らによって見つけられた Mermithid 線虫に感染している *Invertebrate iridescent virus* だけで、以来30年近く自然界の線虫ウイルスの報告はない。人工接種に成功した例も *Caenorhabditis elegans* に *nodavirus* を接種した例など数例を数えるのみである。

(4) 近年、一部の線虫が優れた RNAi の機構を有していることが明らかになってきており、それがウイルスの抵抗性に強く役立っていることも予想される。現在のところは、線虫とウイルスの相互作用に関しては、その RNAi の機構の一部しか明らかにされていないが、線虫はその細胞数・遺伝子数の少なさにもかかわらずさらにその他にも優れた抗ウイルス機構をいくつも有している可能性も考えられる。今後は、まずその解明が求められることとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 寿郎 (YOKOI TOSHIRO)

独立行政法人森林総合研究所・森林微生物
研究領域・主任研究院
研究者番号：60378867

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：