

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660121

研究課題名(和文)なぜ線虫が巨木を枯らすのか 遺伝学的手法を用いたマツ材線虫病病原メカニズムの解明

研究課題名(英文)How and why does the tiny nematode kill big pine trees?: Genetics-based approach to the pathogenic mechanism of pine wilt

研究代表者

竹内 祐子 (Takeuchi, Yuko)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80452283

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、森林流行病マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウにおいて、組換え近交系を用いた遺伝学的アプローチにより病原性決定因子の特定を試みた。

表現型評価の結果、病原性及び増殖力は多数の遺伝子群により制御される量的形質である一方、伝播昆虫への便乗能力すなわち移動分散能力はひとつもしくは少数の遺伝子支配を受ける質的形質であることが示唆された。また、表現型情報とRADシーケンスデータに基づいて検出されたSNPマーカーを用いた遺伝型情報を併せたゲノムワイド関連解析により、病原性決定因子としてシグナルペプチダーゼ遺伝子やDaf-1遺伝子を含む複数の候補遺伝子が絞り込まれた。

研究成果の概要(英文):The present study aimed to identify the pathogenic factor(s) of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, the causal agent of pine wilt disease, with a genetic approach by using a set of recombinant inbred lines (RILs) which was newly-generated by repeating full-sib mating of two inbred lines. Results of phenotyping of RILs showed that the virulence and reproduction may be quantitative, polygenic trait and that transmission ability is a qualitative trait which is controlled by a single or few genes. Based on a genome-wide association analysis by use of a single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping, several candidate genes of the pathogenic factor(s) such as signal peptidase gene and daf-1 gene were selected.

研究分野：樹木病理学

キーワード：マツノザイセンチュウ 組換え近交系 RADシーケンス ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

病原線虫マツノザイセンチュウ (以下、線虫) が伝播昆虫によってマツ属樹木に導入されることで起こるマツ材線虫病は、白砂青松を擁する日本古来の景観を壊滅状態に追い込み、今なお拡大を続けている。本病の病原機構が何に起因するのかがいまだ解明されておらず、対症療法に依存せざるを得ない現行の防除策は有効に機能していない。

国内各地のマツ林を荒廃させてきた真犯人が体長 1 mm に満たない線虫であると明らかになった 1971 年以降、森林病理学者はこぞって本病の発生メカニズム解明に取り組んできた。病原体、宿主樹木、媒介昆虫の三者、さらには関連微生物に至るまでが研究対象とされ、伝染環や発生過程等に関する膨大な情報が蓄積されてきた一方、いったい何がマツを枯死に至らしめる病原因子となっているのかがいまだ謎に包まれている。近年、研究技術の進歩に伴い分子レベルでの病原線虫研究が急ピッチで進められており、2007 年に線虫 EST (Kikuchi et al. 2007, *Molecular and Biochemical Parasitology*)、2011 年に同ドラフトゲノムが公開されるなど (Kikuchi et al. 2011, *PLoS Pathogen*) 分子基盤が急速に整いつつある。しかし、表現型としての病原性に着目し、それを転写レベル、タンパク質生成レベルのプロファイリングから記述しようとする試みが主流であり、線虫の遺伝的背景そのものに答えを求めようとした事例はない。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では古典遺伝学的アプローチにより、線虫の核ゲノム上にあると予想される病原性決定因子 (富樫ら 2009, 日本森林学会) を特定することで、いまだ謎の多いマツ材線虫病の病原メカニズムの全容解明を目指した。独自に作出した本線虫の組み換え近交系 (Recombinant Inbred Line: RIL) を実験材料に用い、その表現型と遺伝的多型とを結びつけることで病原性決定因子に迫った。

3. 研究の方法

(1) 線虫材料 RIL の準備

実験材料として適した遺伝的均一性を有する近交系 (inbred line: IL) 線虫 2 株 (強病原性系統 S10 株から連続兄妹交配により作出した P9 株ならびに弱病原性系統 OKD-1 から同様に作出した F7) より、本試験に供する組換え近交系 (RIL) を確立した。両 IL 株の交配によって得られた F2 世代を連続兄妹交配に供し、20 世代経たものを RIL とした。

(2) RIL 表現型の評価

関連解析の基盤となる線虫表現型の数値化を進めた。宿主マツに対する病原性に直結すると考えられる、主要な 3 形質を対象とした。

病原性

IL 及び RIL 各株の病原性を評価するために、3 ヶ月生のクロマツ実生苗を用いた接種検定を行った。苗の主軸に線虫 500 頭を含む懸濁液を接種し、接種苗 20 個体における 2 か月後の枯死率を評価した。実験は 4 回繰り返した。

増殖力

PDA 培地で培養した *Botrytis cinerea* 菌叢上での増殖力を評価した。IL 及び RIL 各株線虫 100 頭を接種し、25°C で 12 日培養したのちペールマン抽出を行い、実体顕微鏡下で線虫数を計測した。

移動分散能力 (伝播昆虫への便乗力)

試験管内でオオムギ及びおがくず上で予め培養しておいた青変菌 (*Ophiostoma minus*) に IL 及び RIL 各株線虫 100 頭を接種し、さらに 2 週間培養した。そこに線虫の伝播昆虫であるマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus*) の幼虫を導入して共培養し、カミキリ羽化後に虫体及び培地から線虫を抽出し、計数した。

(2) IL 表現型の評価 酸化ストレス耐性

本線虫が病原性を発揮する上で、宿主植物の防御反応の一環であるオキシダティブバーストから自らの身を守る能力が重要であると考えられる。そこで、線虫の酸化ストレス耐性を評価するとともに、その決定要因を精査した。

実験材料には、同じ強病原性系統 S10 株内で兄妹交配を繰り返すことで作出された近交系 2 株、P9 及び P3 を使用した。両株は遺伝的背景が非常に近く菌叢上での増殖力には違いがないが、一方、病原性ならびに樹体内での増殖力が著しく異なる系統であることが予め確認されている (いずれも P9 が著しく強い; Shinya et al. 2012, *Applied Entomology and Zoology*)。酸化ストレス耐性は、同調培養により生育ステージ別に用意した各 IL 株線虫 50 頭を 0 ~ 40 mM 過酸化水素水溶液に浸漬し、24 時間後の生存率として評価した。また、宿主組織と直接接触する線虫角皮について、走査型電子顕微鏡を用いた微細構造観察を行った。

(3) DNA マーカーの選抜 ~ 多型情報の取得

SSR (simple sequence repeat) マーカー

GeneDB のウェブサイト (<http://www.genedb.org/Homepage>) よりマツノザイセンチュウ Ka4 株のゲノム配列データ (ver1.2.) をダウンロードしてマイクロサテライト領域を探索し、各マーカーに特異的なプライマーを設計した。各 RIL より抽出したゲノム DNA を鋳型として、上記プライマーを用いて PCR 増幅した産物を電気泳動により分離し評価した。

SNP (single nucleotide polymorphism) マーカー

線虫材料より抽出したゲノム DNA を RAD-seq (Restriction-site Associated DNA sequence) 解析に供し、得られた RAD リードを基に、同様に公開されているゲノム配列をリファレンスとしてマッピングを行い塩基多型 (SNP) を探索した。

(4) ゲノムワイド関連解析

上記 (3) で検出された SNP のうち、全株で depth が 25 以上あり、かつヘテロを含まないものを (2) の表現型情報と併せて単回帰分析ならびに重回帰分析によるアソシエーション解析に供した。また、相関が認められた領域に含まれる遺伝子についてアノテーションを行った。

4. 研究成果

(1) 線虫材料 RIL の作出

病原力の大きく異なる IL 2 株 (P9 及び F7) より 17 株の組換え近交系 RIL を得た。そのうち 8 株は F7 × P9 由来であり、残り 9 株は P9 × F7 由来である。RIL では、両親株由来のゲノムがホモ接合の状態ランダムに、モザイク状に固定されていると考えられる。

(2) RIL 表現型の評価

病原力

クロマツ苗を対象とした接種検定により、RIL 及び親系統 IL 計 19 株の病原力を評価した。線虫接種後のマツ苗枯死率は 0% から 58% まで幅広い値をとった (図 1)。親株である F7 では枯死率 1%、P9 では 49% であり、両株から得られた RIL 接種後の枯死率は 2 株を除きその範囲内で連続的に分離した。このことから、本線虫の病原力は多数の遺伝子群により制御される量的形質であることが示唆された。



図 1. マツノザイセンチュウ組換え近交系における病原力の変異。接種後の感受性宿主枯死率を示す。

増殖力

増殖力は菌叢上培養後の線虫個体数を指標として評価した。RIL における増殖力は、両親株の値の間で連続的な分離を示しており (図 2)、P9 より著しく増殖力が高い系統も F7 より著しく増殖力の低い系統も認められなかった。の病原力と同様、本線虫の増殖力は多数の遺伝子群により制御される量的

形質であることが示唆された。

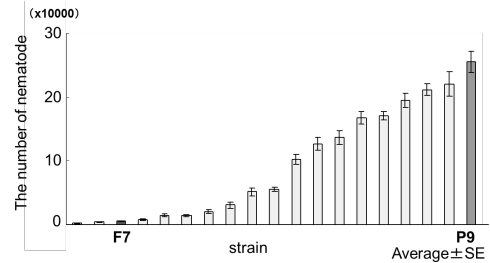


図 2. マツノザイセンチュウ組換え近交系における増殖力の変異。Botrytis cinerea 菌叢上で 12 日間培養後の個体数を示す。

移動分散能力 (伝播昆虫への便乗力)

両親株すなわち P9 と F7 においては移動分散能力が有意に異なっており、両者の病原力の強弱と対応していた (P9 が著しく高かった)。RIL の結果は大きく 2 つに分かれており、いずれかの親株に近い不連続な値を示した: 一方は F7 同様に著しく低く、もう一方は P9 同様に多数の線虫がカミキリ虫体への便乗を果たしていた (図 3)。このように、移動分散能力は上記 2 形質とは異なり離散的な分布を示したことから、ひとつもしくは少数の遺伝子支配を受ける質的形質であることが示唆された。

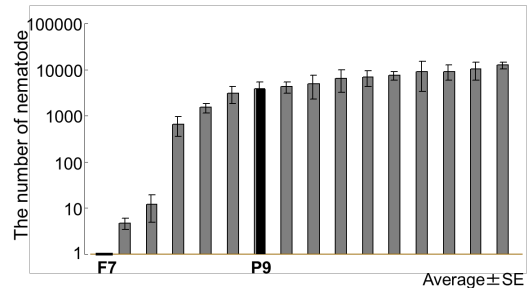


図 3. マツノザイセンチュウ組換え近交系における移動分散能力の変異。伝播昆虫と共培養を行った後の便乗数を示す (y 軸は対数表示)。

(2) IL 表現型の評価 酸化ストレス耐性

IL 2 株、P9 及び P3 における酸化ストレス耐性は両者の病原力の強弱と一致しており、全生育ステージにおいて P9 で高い耐性が示された。また、2 期幼虫から脱皮を繰り返すごとに過酸化水素存在下での生存率が上昇しており、酸化ストレス耐性が高まっていることが示された。

一方、宿主組織と直接接触する線虫角皮について走査型電子顕微鏡を用いた微細構造観察を行ったところ、系統間で角皮に構造上の違いはなくいずれも三層から構成されていたが、強病原力系統 P9 の角皮は弱病原力系統より厚く、特にその差は中間層で著しかった。以上より、宿主防御反応に伴い生成される活性酸素に対し、本線虫は角皮を肥厚化させることによる物理的防御をもって対抗している可能性が示唆された。

(3) DNA マーカーの選抜～多型情報の取得 SSR マーカー

線虫ゲノム上から 77 箇所のマイクロサテライト領域を抽出し、そのうちの 37 箇所に対してプライマーを設計した。PCR 増幅により F7 及び P9 の DNA サンプル間での多型確認を行ったところ、16 箇所のマーカーで明瞭な多型が確認されたことから、SSR マーカーとして RIL の遺伝子型解析に供した。これらのマーカーは異なる scaffold 上に存在するため、ゲノム上に散在するマーカー群である。

解析の結果、各 RIL はそれぞれ特有の遺伝子型をもち、ホモ接合体率は 0.88 ~ 1.00 (平均 0.99) と高い割合であることが確認されたことから、RIL 系統内の遺伝的均一性が示された。

SNP マーカー

RIL 及び両親株 IL 計 19 株の線虫より抽出したゲノム DNA を RAD シークエンスに供し、ゲノムワイドな遺伝子型の解析を行った。全株で合計約 3000 万リード (各株から平均約 150 万リード)、1,066 の遺伝子領域から 25,144 座位の SNP を検出した。

(4) ゲノムワイド関連解析

上記 (3) で検出した SNP のうち、全株で depth が 25 以上あり、かつヘテロを含まない 2,428 座位の SNP を単回帰分析に供したところ、これらの SNP の分離パターンは全 81 パターンあった。各パターンに対する回帰直線の P 値と相関係数 R を求め、(2) で数値化した 3 種の主要形質それぞれと相関のある遺伝子領域を推定した結果、最も低い P 値を示したのは pattern 11 と病原力及び増殖力 (R 値: 0.645、対病原力; 0.783、対増殖力)、pattern 35 及び pattern 37 と便乗力 (R 値: 0.841) であった。さらに重回帰分析を行った結果、病原力において寄与率の高い第 2 説明変数として pattern 2 が得られた (R² 変化量: 0.268)。

続いて、便乗力に関して特異的に相関が認められた pattern 14 を上記に加えた計 5 パターンについて、変異を含む遺伝子のアノテーションを行った。その結果、pattern 11 から胚発生や幼虫の生育に關与するシグナルペプチダーゼ遺伝子、pattern 35 から線虫が昆虫に便乗する際の形態形成に重要な役割を示す膜タンパクである *Daf-1* 遺伝子、pattern 2 からはコラーゲンやクチクラ形成に關与する遺伝子および抗酸化機能を持つ遺伝子等が候補として検出された。

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 2 件)

Juan E. Palomares-Rius, Isheng J. Tsai, Nurul Karim, Mitsuteru Akiba, Tetsuro Kato, Haruhiko Maruyama, Yuko Takeuchi, Taisei

Kikuchi. Genome-wide variation in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and its relationship with pathogenic traits. BMC Genomics, 査読有, Vol.16, No.845, 2015,

DOI: 10.1186/s12864-015-2085-0

Tetsuro Kato, Akira Kaneko, Ryoji Shinya, Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Phenotypic and genotypic traits of recombinant inbred lines of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Berichte 78 aus dem Julius Kühn-Institut, Vol.169, 2013, 74-78.

DOI: 10.5073/berjki.2013.169.000

[学会発表](計 18 件)

保谷 剛志・田中 克・浴野 泰甫・竹内 祐子. マツノザイセンチュウの増殖力因子の解析. 第 127 回日本森林学会大会, 2016 年 3 月 29 日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

浴野 泰甫・竹内 祐子. マツノザイセンチュウにおける角皮構造の系統間比較. 第 127 回日本森林学会大会, 2016 年 3 月 28 日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

保谷 剛志・田中 克・浴野 泰甫・竹内 祐子. マツノザイセンチュウ組換え近交系の孵化率の病原力への寄与. 日本線虫学会第 23 回大会, 2015 年 9 月 3 日, 中部大学三浦記念会館(愛知県名古屋市)

浴野 泰甫・竹内 祐子. 透過型電子顕微鏡を用いたマツノザイセンチュウ角皮構造の観察. 日本線虫学会第 23 回大会, 2015 年 9 月 3 日, 中部大学三浦記念会館(愛知県名古屋市)

Yuko Takeuchi, Akira Kaneko, Tetsuro Kato, Mie N. Honjo, Atsushi J. Nagano, Hiroshi Kudoh, Kazuki Mori, Taisei Kikuchi, Satoru Kuhara, Kazuyoshi Futai. An 'omics' based approach to the pathogenic mechanism of pine wilt disease. Society of Nematologists Fifty-fourth Annual Meeting, 2015 年 7 月 21 日, イーストラッシング(アメリカ合衆国)

Edward C. McGawley, Yuko Takeuchi, Charles C. Overstreet. Increase in the incidence of symptoms of pine wilt disease in southeast Louisiana. Society of Nematologists Fifty-fourth Annual Meeting, 2015 年 7 月 21 日, ミシガン(アメリカ合衆国)

田中 克・田中 龍聖・菊地 泰生・竹内 祐子. マツノザイセンチュウ各ステージ間の比較トランスクリプトーム解析. 第 126 回日本森林学会大会, 2015 年 3 月 27 日, 北海道大学(北海道札幌市)

竹内 祐子. マツノザイセンチュウの病原性規定因子にゲノミクスとプロテオミクスで迫る. 第 126 回日本森林学会大会, 2015 年 3 月 27 日, 北海道大学 (北海道札幌市)

竹内 祐子. なぜ線虫が巨木を枯らすのか—マツ材線虫病のメカニズムに遺伝学とゲノム科学で迫る. 松枯れ対策シンポジウム, 2014 年 10 月 31 日, ベルサール飯田橋ファースト (東京都文京区)

Suguru E. Tanaka, Ryusei Tanaka, Taisei Kikuchi, Yuko Takeuchi. RNA-seq analysis of comprehensive gene expression of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, at each propagative stage. Japan-Korea Joint Symposium on Nematology 2014, 2014 年 9 月 19 日, 文部科学省研究交流センター (茨城県つくば市)

Tetsuro Kato, Akira Kaneko, Mie N. Honjo, Atsushi J. Nagano, Hiroshi Kudoh, Kazuki Mori, Taisei Kikuchi, Satoru Kuhara, Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Phenotype/genotype association for pathogenesis of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Japan-Korea Joint Symposium on Nematology 2014, 2014 年 9 月 19 日, 文部科学省研究交流センター (茨城県つくば市)

田中 克・田中 龍聖・菊地 泰生・竹内 祐子. RNA-seq 法を用いたマツノザイセンチュウ増殖型各ステージの網羅的遺伝子発現解析. 日本線虫学会第 22 回大会, 2014 年 9 月 17 日, 文部科学省研究交流センター (茨城県つくば市)

浴野 泰甫・加藤 徹朗・金子 彰・竹内 祐子. マツノザイセンチュウにおける酸化ストレス耐性. 日本線虫学会第 22 回大会 2014 年 9 月 16~17 日, 文部科学省研究交流センター (茨城県つくば市)

加藤 徹朗・金子 彰・八杉 公基・本庄 三恵・永野 惇・工藤 洋・森 一樹・久原 哲・二井 一禎・竹内 祐子. RAD-seq を用いたマツノザイセンチュウ組み換え近交系の重要形質関連遺伝子群の探索. 第 125 回日本森林学会大会, 2014 年 3 月 29 日, さいたま市大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

浴野 泰甫・加藤 徹朗・金子 彰・竹内 祐子. 病原力が異なるマツノザイセンチュウ系統間での酸化ストレス耐性の差異. 第 125 回日本森林学会大会, 2014 年 3 月 29 日, さいたま市大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

加藤 徹朗・金子 彰・本庄 三恵・永野 惇・工藤 洋・森 一樹・菊地 泰生・久原 哲・二井 一禎・竹内 祐子. 組み換え近交系を用いたマツノザイセンチュウにおける重要形質のゲノム解析. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月 28 日, 高知大学朝倉キャンパス (高知県高知市)

Tetsuro Kato, Akira Kaneko, Ryoji Shinya, Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Phenotypic and genotypic traits of recombinant inbred lines of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. IUFRO 2013 -Pine Wilt Disease Conference, 2013 年 10 月 18 日, ブラウンシュヴァイク (ドイツ連邦共和国)

Yuko Takeuchi, Edward C. McGawley, Charles Overstreet, Addison R. Plaisance. Nematode fauna associated with trees grown in South Louisiana. Society of Nematologists Fifty-second Annual Meeting, 2013 年 7 月 16 日, ノックスビル (アメリカ合衆国)

〔図書〕(計 1 件)

Naoto Kamata, Yuko Takeuchi. Chapter 6. Pine Wilt Disease and Other Nematode Diseases. In: Infectious Forest Diseases (eds. Paolo Gonthier, Giovanni Nicolotti, 672 pp.). p 115-127. CABI Book, 2013.
DOI: 10.1079/9781780640402.0115

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