

平成30年6月6日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04521

研究課題名(和文) 侵入地と原産地のマツノザイセンチュウの比較ゲノムと生態的特性の解明

研究課題名(英文) Comparative genome analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* in introduced and native areas.

研究代表者

秋庭 満輝 (AKIBA, MITSUTERU)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：50353553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本におけるマツノザイセンチュウの進化史を明らかにするため、侵入地である日本と原産地である北米のマツノザイセンチュウについて、集団遺伝学的解析と全ゲノムの比較を行った。マイクロサテライトまたはSNPによる解析の結果、国内産のマツノザイセンチュウの多様性が高く、これまでに北米から日本へ複数回の侵入イベントがあったことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the evolutionary history of *Bursaphelenchus xylophilus*, the causal pathogen of the pine wilt disease, we performed population and comparative analyses of genomes of the nematodes using Japanese isolates and native North American isolates. Population analysis using microsatellite and SNPs suggested high genetic diversity among Japanese isolates and multiple introductions of the pathogen from North America to Japan.

研究分野：森林病理学

キーワード：マツノザイセンチュウ マツ材線虫病 比較ゲノム 侵入病害

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病は日本のマツ林に甚大な被害を及ぼしている極めて重要な樹木病害である。病原体であるマツノザイセンチュウは北米原産の侵入種であり、日本以外にも東アジア(中国・台湾・韓国)とヨーロッパ(ポルトガル・スペイン)に侵入し、世界的な問題となっている。

マツノザイセンチュウの個体群・集団レベルの解析は、その侵入経路の特定などを目的に、これまでも行われてきている。例えば、本課題の代表者らは、日本国内から収集した多数の線虫株のミトコンドリアと核の遺伝子の塩基配列の比較を行った。その結果、日本国内では比較的多様なハプロタイプが存在するが明確な地理的パターンはないこと、日本以外の東アジア、ヨーロッパではハプロタイプの多様性が低く、全て日本国内のハプロタイプと同一であることを明らかにした。これは、北米大陸から日本への複数回の侵入機会があり、その後起源の異なるマツノザイセンチュウ同士の交配が起こりつつ日本全国に拡大していったことを示している。

一方、原産地である北米大陸ではマツノザイセンチュウの種内に複数の生態的・生理的・形態的に異なる系統が存在する。例えば、線虫の尾の形態が異なる系統が存在し、R型(round=尾が丸い)とM型(mucronate=尾に突起がある)として区別されている。R型はマツを枯らすのに対し、M型はモミを枯らすというように、両者で病原性が異なることが報告されている(Wingfield et al. 1983)。一方、日本国内の線虫はR型であるとされているが、その中でもマツに対して病気を起こさない弱病原力株という系統も存在する。これらは、亜種レベルの差がある可能性もあるが、詳細な分類学的研究例はない。また、北米産株の日本在来のマツ科針葉樹に対する病原性についても検討されていない。

マツノザイセンチュウのゲノムが解読されて以来、国内の病原力が異なるアイソレイトについて全ゲノムを比較した研究例があるが(Palomares-Rius et al. 2015)、より幅広い国内のアイソレイト、さらに原産地のアイソレイトを対象とした研究はされていなかった。

2. 研究の目的

侵入地である日本と原産地である北米のマツノザイセンチュウを対象に、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) 日本に存在するマツノザイセンチュウの集団遺伝学的な特徴を明らかにする。

(2) 北米産の複数の系統のマツノザイセンチュウの株について、分類学的位置を明らかにする。

(3) 北米産と日本産の株についてゲノムレ

ベルで比較し、日本におけるマツノザイセンチュウの進化史を推定する。

3. 研究の方法

(1) 沖縄島の6地点のリュウキュウマツ林の材線虫病による枯死木から材片を採集し、枯死木1本当たり15頭以上のマツノザイセンチュウについて、Mallez et al. (2013)によって開発されたマイクロサテライトマーカーを用いた解析を行った。同時に、同じ枯死木から分離されたマツノザイセンチュウからアイソレイト(培養個体群)を作製し、確立されたアイソレイトについて、マイクロサテライトマーカーによる解析を行った。

次に、東北から沖縄までの日本全国から確立されたアイソレイトについて、マイクロサテライトマーカーによる解析を行った。これらの結果を基に、地理的・遺伝的に多様になるように考慮し、ゲノム解析に供する国内産の株を選択した。

(2) 保存されている北米産のアイソレイト6株について、形態の観察を行い、R型かM型か判定した。さらに、R型とM型のマツノザイセンチュウの交配試験を行った。また、核リボソーム遺伝子のITS領域とミトコンドリアCOI遺伝子のDNA配列を決定し、国内の株と比較した。

(3) (1)の結果から選択された国内の28アイソレイトと北米産の6アイソレイトについてDNAを抽出し、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列を取得した。リファレンスゲノム(日本産Ka4C1株)に対してマッピングしてSNPを特定し、それらのデータから系統解析を行った。解析には、国内産の強病原力株と弱病原力株のデータ(Palomares-Rius et al. 2015)を加えた。

4. 研究成果

(1) 沖縄島の6地点のマツ林のマツノザイセンチュウの場合、Mallezらのマイクロサテライトマーカーの16遺伝子座のうち、9遺伝子座でそれぞれ2~3個の対立遺伝子の多型が認められた。1本の枯死木の中での多様性が非常に低く、マツノザイセンチュウの感染時にボトルネックが働いていることが示唆された。同一地点の異なるマツから分離されたマツノザイセンチュウ間で類似する傾向があり、それぞれの地点内で少数の感染源から被害が拡大したことが推定された。枯死木から分離されたマツノザイセンチュウとそれらから確立されたアイソレイトを比較した場合、枯死木から分離されたマツノザイセンチュウで認められた対立遺伝子の大部分がアイソレイトで認められた。このことから、アイソレイトを用いてマツノザイセンチュウの多様性を評価することが可能であると

判断した。

次に、国内のアイソレイト 223 株についてマイクロサテライトマーカーによる解析を行ったところ、13 遺伝子座で 2~7 個の対立遺伝子が認められた。これらのデータから Structure 解析を行った結果、最適なクラスター数 (K) は 3 であると推定された。西日本のアイソレイトはこれら 3 つのクラスターが混ざり合った状態であるのに対し、東北など東日本のアイソレイトは 2 つのクラスターが混ざり合った状態であった。これらの結果から、ゲノム解析に供試する国内のアイソレイトとして、東北から沖縄までの 28 アイソレイトを選択した。

(2) 北米産のアイソレイトの尾部について光学顕微鏡による観察を行ったところ、カナダ産 1 株とアメリカ合衆国産 1 株が M 型であり、カナダ産 1 株とアメリカ合衆国産 3 株が R 型であった (図 1)。

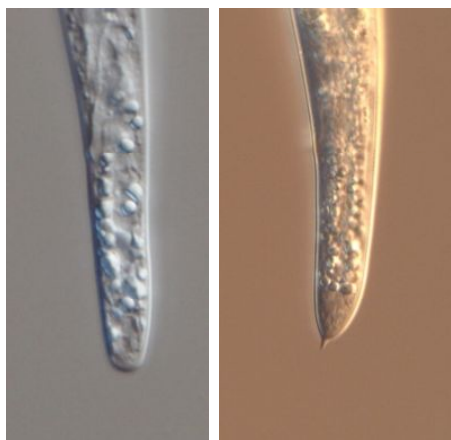


図 1 北米産のマツノザイセンチュウの雌成虫の尾端 (左 R 型、右 M 型)

なお、国内のアイソレイトの一部を観察したところ全て R 型であった。北米産の R 型のアイソレイトの中に、国内のアイソレイトと ITS または COI の配列 (ハプロタイプ) が同一のものが存在した。ITS と COI について系統解析したところ、M 型と R 型で明確に二分されることはなかった。また、M 型と R 型は交配可能であった。以上のことから、M 型と R 型は形態的な違いはあるが系統的な分化は認められず、分類学的に分けられる物ではないことが明らかになった。

(3) 国内と北米あわせて 34 株について解析したところ、リファレンス株 (KaC1) に対して、83~98% のマップ率のゲノムデータを取得した。リファレンスゲノムに対して約 34~200 万の SNP が認められ、それらを元に系統樹を作製したところ、北米株は M 型と R 型両方を含む一つのクレードを形成し、国内株では、それぞれ九州と近畿、沖縄、日本全国の株からなるクレードにおおまかに分けることが出来た。強病原力株は全て の

日本全国のクレードに含まれた。(1) の国内株のマイクロサテライト解析の結果と合わせて考慮すると、国内のマツノザイセンチュウが遺伝的に多様であり、これまでに海外から複数回の侵入があった可能性があることが考えられた。しかし、本データから日本産のマツノザイセンチュウの起源 (侵入原) を推定することは出来なかった。起源を明らかにするために、北米の広範な地域からマツノザイセンチュウを収集して解析する必要がある。

< 引用文献 >

Mallez et al. (2013) Plos One 8:e59165
Palomares=Rius et al. (2015) BMC Genomics 16:845
Wingfield et al. (1983) European Journal of Forest Pathology 13:360-372

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 5 件)

神崎菜摘、前原紀敏、秋庭満輝、田中克、井手竜也、マツノザイセンチュウとその近縁種の耐久型幼虫形態、森林防疫、査読有、Vol.66、2017、80-85

Gu J、Kanzaki N、Tomalak M、Proposal of *Bursaphelenchus wuae* n. comb. and its two junior synonyms、Nematology、査読有、Vol. 19、2017、869-870、DOI:10.1163/15685411-00003091

Esmaeili M、Heydari R、Golhasan B、Kanzaki N、*Aphelenchoides eldaricus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) isolated from *Pinus eldarica* in western Iran、Nematology、査読有、Vol.19、2017、605-616、DOI: 10.1163/15685411-00003074

Ide T、Kanzaki N、Parra Giraldo PP、Giblin-Davis RM、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the red ring nematode, *Bursaphelenchus cocophilus*、Nematology、査読有、Vol.19、2017、559-565、DOI: 10.1163/15685411-00003069

Sriwati R、Jauharlina J、Kanzaki N、Takeuchi-Kaneko Y、Aphelenchoidid nematodes associated with two dominant *Ficus* species in Aceh, Indonesia、Nematology、査読有、Vol.19、2017、323-331、DOI: 10.1163/15685411-00003051

[学会発表] (計 4 件)

秋庭満輝、神崎菜摘、大澤正嗣、日本に

おけるニセマツノザイセンチュウ2亜種の存在、第25回日本線虫学会大会、2017年

秋庭満輝、伊藤俊輔、佐橋憲生、南沖縄島におけるマツノザイセンチュウの遺伝的構造、第128回日本森林学会大会 2017年

秋庭満輝、伊藤俊輔、沖縄島におけるマツノザイセンチュウの遺伝的多様性、第24回日本線虫学会大会、2016年

秋庭満輝、神崎菜摘、ヒゲナガカミキリおよびマツノマダラカミキリからの *Bursaphelenchus firmae* および *Diplogasteroides andrassyi* の分離、第23回日本線虫学会大会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋庭 満輝(Akiba, Mitsuteru)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等
研究者番号：50353553

(2) 研究分担者

菊地 泰生(Kikuchi, Taisei)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：20353659

神崎 菜摘(Kanzaki, Natsumi)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等
研究者番号：70435585