

令和元年5月17日現在

機関番号：32682

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07161

研究課題名（和文）マツノザイセンチュウ性フェロモンの同定

研究課題名（英文）Identification of the sex pheromone in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*

研究代表者

新屋 良治（SHINYA, RYOJI）

明治大学・農学部・専任講師

研究者番号：30802798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：マツ材線虫病は病原体マツノザイセンチュウによって引き起こされる森林流行病である。本病の発病機構に関しては未だに不明な点が多いが、線虫の急速な増加がマツの枯死を引き起こす1つの重要因子となる。そこで本研究では、線虫の増殖に大きく関与する因子であるマツノザイセンチュウ性フェロモン物質を同定することを目的に行われた。その結果、本研究により4種の化合物がマツノザイセンチュウのフェロモン物質であることが明らかになった。これらはマツノザイセンチュウにおいて初めて同定された性フェロモン物質であると同時に、線虫全体においても初めて明らかにされた揮発性の性フェロモンである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウの性フェロモン物質が初めて明らかとなった。これらの物質は線虫の増殖（繁殖）において非常に重要な因子である。今回の研究成果を元に、今後線虫の交尾を攪乱するという新たな防除手法の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To identify the sex pheromones of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, GC-MS and chemotaxis assays were conducted. In this study, the four compounds were successfully identified as sex pheromones secreted by the female. This finding is useful for development of the new control method of the pine wood nematodes.

研究分野：線虫学

キーワード：マツノザイセンチュウ 性フェロモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病は病原体マツノザイセンチュウによって引き起こされる森林流行病で、長年に亘り日本国内のマツ林に甚大な被害を及ぼし続けてきた。近年では他の東アジア諸国およびヨーロッパ諸国にまで深刻な被害が拡大し、世界レベルでの重要性は高まる一方である。過去45年以上に亘るマツ材線虫病研究の中で、病原学的研究は数多く行われてきており、病気に関わる生理・生態的知見は着実に積み重ねられてきている。しかしながら、病原体であるマツノザイセンチュウ自身に関する基礎生物学的な知見は依然として限られている。このような背景のもと、研究代表者はマツノザイセンチュウの繁殖に注目し近年研究を進めてきた。マツノザイセンチュウがマツに感染した際、一定期間樹体内で線虫個体数が停滞した後、線虫個体数が爆発的に増加する。それに伴い宿主であるマツの病気が急速に進行し最終的にマツが枯死する。したがって、線虫が交尾を繰り返し爆発的に個体数が増える仕組みを理解することはマツ材線虫病の防除を目指す上で重要である。研究代表者はこれまでにマツノザイセンチュウの交尾行動を詳細に観察し、雄が雌体内の精子の有無を判別し、処女雌もしくは精子を使い果たした雌成虫にのみ誘引され選択的に交尾することを明らかにした (Shinya et al., 2015)。また、同論文において雄は未交尾雌もしくは精子を使い果たした雌だけが分泌する揮発性物質 (以後、性フェロモン) に誘引されていることを報告した。しかしながら、依然として性フェロモン物質の正体は不明である。

2. 研究の目的

本研究計画ではマツノザイセンチュウにおける処女雌特異的性フェロモン物質を同定し、性フェロモンに関連した新たなマツ材線虫病防除手法へ展開するための基盤研究を行うことである。

3. 研究の方法

本研究では、マツノザイセンチュウの処女雌が特異的に分泌する雄誘引性フェロモンをGC-MS解析により探索および同定し、その後フェロモン候補物質を使った詳細な線虫走化性検定を行うことでマツノザイセンチュウ揮発性性フェロモンを同定した。

具体的な研究の手順は以下の通りである。

1. 固相マイクロ抽出 (SPME) 法により様々な異なる線虫生育ステージごとに香気成分を捕集し、GC-MS解析によりマツノザイセンチュウ処女雌においてのみ特異的に検出される物質を探索および同定した。
2. 12種類のマツノザイセンチュウ処女雌特異的物質の存在が明らかになったが、その一部は既存のライブラリー内の化合物と一致しなかった。それらの化合物に関しては、有機合成により化合物を合成した。
3. マツノザイセンチュウの雄における性フェロモン候補物質への走化性を検定することで、性フェロモン物質を特定した。走化性検定は9cmシャーレ中に4%の寒天を敷いて使用した。各シャーレ内寒天の中心に約100頭ずつ雄を供試し、1時間暗室条件で静置した後、フェロモン候補物質に対する誘引性を評価した。

4. 研究成果

本研究期間において、当初予定していた全ての実験を終了し、最終目的であるマツノザイセンチュウの性フェロモン物質を初めて同定することに成功した。具体的には、オスを誘引する能力をもつメス成虫由来の匂い物質を捕集し、GC-MS/MS解析により計12種類の候補物質を見出した。その後、ライブラリーに存在しない化合物に関しては、有機合成を行い化合物の同定を行った。候補物質の同定後、フェロモンとしての機能を確認するために化合物を用いて走化性検定を行った。検定では、まずオス成虫を用いて高濃度から低濃度まで幅広い濃度帯の化合物に対する走化性を確認した。高濃度域においては多くの化合物に対して線虫は誘引を示したが、低濃度域においてオスを誘引した化合物は4種であった。次に、全ての候補化合物の性特異性を確認するために、メス成虫を用いて同様の走化性検定を行った。その結果、オスを誘引した4種の化合物は低濃度域でメスを誘引することはなかった。この結果から、これら4種の化合物はオス特異的に作用する物質であることが明らかになった。また、高濃度域におけるそれぞれの化合物に対する誘引反応は、メスに

においても確認されたためこれは性特異的な作用ではないと結論づけられた。以上の実験結果から、本研究で見出した有意にオスを誘引する4種の化合物は、マツノザイセンチュウのメスが分泌する性フェロモン物質であると結論づけられる。これらの物質はマツノザイセンチュウにおいて初めて同定された性フェロモン物質であると同時に、線虫全体においても初めて明らかにされた揮発性の性フェロモンとなった。

5. 主な発表論文等

Aoki, W., Matsukura, H., Yamauchi, Y., Yokoyama, H., Hasegawa, K., **Shinya, R.**, Ueda M. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. Scientific Reports 8, 10380 (2018) DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28653-x>

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。