

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04514

研究課題名(和文) マツ材線虫病被害拡大の主因、線虫の二型性に遺伝学と化学で迫る

研究課題名(英文) Genetic and chemical approach to the stage dimorphism of the pine wood nematode: the primary factor of expanding damage of pine wilt disease

研究代表者

竹内 祐子 (Takeuchi-Kaneko, Yuko)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80452283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)： マツ材線虫病の病原線虫マツノザイセンチュウの生活環における二型性に着目し、病害を起こす増殖型から被害拡大を担う分散型への移行メカニズム解明を目指した研究を行った。増殖型から分散型への人為的誘導に初めて成功するとともに、移行に伴う遺伝子発現挙動を解析することにより、マツノザイセンチュウにはモデル生物である*Caenorhabditis elegans*における耐久型誘導と同じく物質介在性の分散型誘導メカニズムが存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、マツノザイセンチュウの増殖型から分散型への人為的誘導に初めて成功し、この移行を司る因子が線虫由来の化学シグナルであることを突き止めた。これはすなわち、単木での発病から森林蔓延型の流行病化へとつながるマツノザイセンチュウの移動分散過程の鍵を握るのが特定の化学物質であることを示唆している。新規に開発した純度の高い線虫RNAの抽出法や精密な実験に適した線虫近交系の作出と併せて、今後のマツ枯れ研究に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： The present study aimed to clarify the switching mechanism from the propagative to the dispersal stages in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, the pathogen of pine wilt disease. We artificially induced the third-stage dispersal juveniles by adding crude nematode extracts and then analyzed the stage-specific transcriptome by RNA-seq technique to describe the gene expression dynamics during the stage transition. The results suggested that *B. xylophilus* has a chemical-signal mediated mechanism of induction of the dispersal stages, which is comparable with the dauer induction in the model organism *Caenorhabditis elegans*.

研究分野：森林病理学

キーワード：マツノザイセンチュウ 分散型 増殖型 近交系 トランスクリプトーム

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

### 1. 研究開始当初の背景

病原線虫マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*; 以下、線虫) が伝播昆虫によってマツ属の樹木に導入されることで起こるマツ材線虫病は、白砂青松を要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。被害拡大の鍵を握るのは線虫と伝播昆虫マツノダガラカミキリ (*Monochamus alternatus*; 以下、カミキリ) との巧妙な相利的便乗関係であるが、その成立プロセスの全容はいまだ詳らかになっていない。

線虫は増殖型と分散型という二型性の生活環をもっており、カミキリに便乗する際には分散型サイクルへと移行する必要がある。実際に虫体への便乗を行う分散型第4期幼虫 (DIV) は、乾燥や絶食に強く、カミキリの存在下でのみ出現する (Warren and Linit, 1993; Zhao *et al.*, 2013)。一方、増殖型から分散型への転換点である分散型第3期幼虫 (DIII) の出現要因に関しては未解明な部分が多く、その遺伝子制御に関する知見は皆無であった。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では本病流行メカニズムの根幹に迫る端緒として線虫生活環における二型性に着目した。これまで独自に蓄積してきた線虫材料及び分子情報を基盤として、線虫の分散型形成過程の背後にある分子動態を解き明かすことで、カミキリへの便乗に特化したステージ「分散型」への移行を司る制御因子の特定を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線虫材料の選抜

DIII 研究に適した線虫材料の選抜を行った。線虫の各種形質には種内変異が存在するため (Bolla, 1986)、DIII 誘導能も分化している可能性が高い。そこで、一般的に本病研究に使用されている線虫4系統 (強病原力系統の S10、T4、Ka4、弱病原力系統の C14-5) 各々について DIII 形成率を評価し、値の高い系統を選抜した。また、系統内の遺伝的多様性が高いことが想定されたため (Cheng *et al.*, 2008)、選抜系統から近交系を複数作出し、さらに DIII 形成率の高い系統を選抜した。

#### (2) 人為的な分散型線虫誘導系の確立

線虫 DIII はこれまで環境の悪化 (高温、個体群密度上昇、餌の不足) によって誘導されるとされていたが (Kiyohara and Suzuki, 1975)、実験に用いるための誘導及び脱皮時期の揃った個体を確保する方法は確立されていなかった。本実験では、少数の個体に対して、餌条件を均一かつ最低限度にした培養系を構築し、これに対して線虫培養株より得た粗抽出物を添加し、その後の脱皮状況の観察を行った。

#### (3) 簡便な線虫 RNA 抽出法の開発

精度の高い線虫トランスクリプトーム解析を行う上で、純度の高い RNA は不可欠である。従来の RNA 抽出法は一度の解析に数百頭程度の線虫材料を必要とするため、より対象個体を絞った解析には適用困難だった。そこで、より簡便な線虫 RNA 抽出手法を確立するとともに、他種線虫への応用可能性を確認した。

#### (4) 線虫各ステージの網羅的遺伝子発現解析

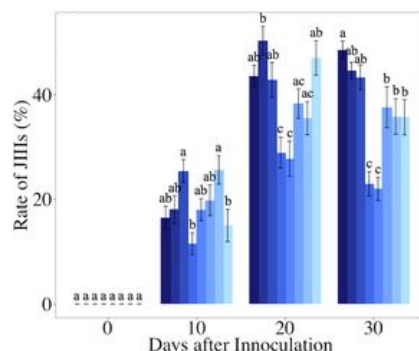
同調培養法 (Iwahori and Futai, 1985) ならびに上記2の方法により準備した各ステージの線虫を用いて、RNA-seq 法による全生育ステージの線虫を対象とした網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

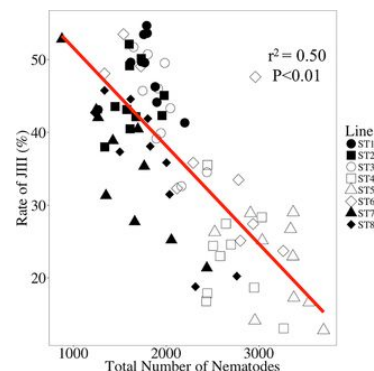
#### (1) 線虫材料の選抜

線虫の DIII 形成率を比較した結果、最も高い値を示した T4 系統を繰り返し兄妹交配することで、新規に8近交系統を作出した。これら近交系統間で DIII 形成率は大きく異なっており (図1)、また総頭数と DIII 形成率の間に負の相関があったことから (図2)、増殖能と DIII 形成能はトレードオフの関係にあることが示唆された。安定して高い DIII 形成率を示した ST2 系統を以降の実験に供した。

(左) 図1. T4由来の近交系8株のDIII形成率。

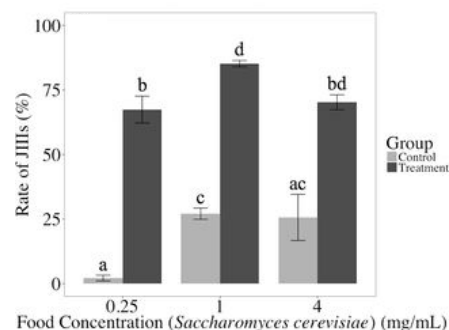


(右) 図2. T4由来の近交系8株における個体数とDIII形成率の相関。



## (2) 人為的な分散型線虫誘導系の確立

餌条件制御下の線虫に対して大量培養後の線虫より得た粗抽出液を濃縮して添加することにより、DIII 形成率が高くなることが確認された (図 3)。これは、本種において初めて人為的な DIII 誘導に成功した事例となる。同じ線形動物門に属するモデル生物 *Caenorhabditis elegans* の耐久型幼虫は、機能的に本線虫の DIII に対応しており、ダウモンと呼ばれる分泌物由来の化学シグナルによって誘導されることが知られる (Jeoung *et al.*, 2005)。本実験の結果から、本線虫においても同様に、このダウモン様物質を介した分散型誘導機構が存在することが示唆された。



Food Concentration (*Saccharomyces cerevisiae*) (mg/mL)

図 3. 様々な濃度の酵母上で培養した ST2 系統に線虫培養粗抽出物を添加した後の DIII 誘導率。

## (3) 簡便な線虫 RNA 抽出法の開発

従来手法に化学的消化を組み合わせることで新規の線虫 RNA 抽出法を確立した。この手法により、少数の線虫個体から RNA-seq 解析に用いるために質・量ともに十分な RNA を容易に抽出することが可能になった。本手法を他種線虫にも応用したところ、生きた植物体に生息する線虫種よりも土壌もしくは腐植に生息する線虫種への適用可能性が高く、化学的消化に対する耐性と RNA 抽出効率は概ね対応していることがわかった。

## (4) 線虫各ステージの網羅的遺伝子発現解析

DIII 線虫のみに特徴的な発現挙動を示す遺伝子群は少数であることが示唆されたものの、他のステージと比較して、酸化ストレス耐性、栄養代謝能共に発現量が上昇しており、枯死樹体内の不適環境下で長期間生存するために適した遺伝子発現パターンを示した。また、DIII 線虫及び DIV 線虫は増殖型各ステージの線虫とは大きく異なる遺伝子発現挙動を示しただけでなく、両者の間にも大きな違いがあることが明らかになった。*C. elegans* の耐久型幼虫にみられる遺伝子発現様式との比較から、*C. elegans* 耐久型幼虫のもつ能力がいわば分散型の第 3 期幼虫と第 4 期幼虫とに振り分けられる形で本線虫の特徴的な生活環を成立させていることが示唆された。

以上より、本線虫の増殖型から分散型への移行を司るのが線虫由来の、しかも *C. elegans* におけるダウモンとは異なる化学シグナルであり、ダウモンによる耐久型誘導系とは異なる経路により制御されていることが明らかになった。これはすなわち、単木での発病から森林蔓延型の流行病化へとつながるマツノザイセンチュウの移動分散過程の鍵を握るのが特定の化学物質であることを示唆している。新規に開発した純度の高い線虫 RNA の抽出法や精密な実験に適した線虫近交系の作出と併せて、今後のマツ枯れ研究に大きく寄与するものと考えられる。

## (5) その他、副次的成果

線虫の化学性を調査する中で、蛍光標識レクチン f-WGA による線虫の蛍光染色に基づいた樹体内のマツノザイセンチュウの分布評価手法を確立した。染色性は線虫のステージや接種後の病徴進展に応じて変化するのに対して、線虫横断面は安定して染色されることが示された。

マツ枯れと比較するため、MRI を用いた非破壊観察によって各種樹木の乾燥ストレスによる通水障害過程や樹液流速を可視化することに成功した。

病原メカニズムを研究する中で、近交系を用いた実験結果から、酸化ストレス耐性と病原力の間に相関があること、それが過酸化水素分解能だけでなく体表クチクラ層等の物理的要因にも起因することを明らかにした。

マツノザイセンチュウ近縁種群の耐久型幼虫を多数得るために行った試料採集の過程で、これら近縁種間の分散型幼虫における形態的差異を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Tanaka, S. E., Dayi, M., Maeda, Y., Tsai, I. J., Tanaka, R., Bligh, M., Takeuchi-Kaneko, Y., Fukuda, K., Kanzaki, N., Kikuchi, T. Stage-specific transcriptome of *Bursaphelenchus xylophilus* reveals temporal regulation of effector genes and roles of the dauer-like stages in the lifecycle. *Scientific Reports*, 査読有, vol. 9: 6080, 2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42570-7>

竹内祐子. マツ材線虫病診断法の変遷 潜在感染木への適用可能性 . 日本森林学会誌, 101(1): 17-25, 2019.  
<https://doi.org/10.4005/jjfs.101.17>

Ekino, T., Tanaka, S. E., Kanzaki, N., Takeuchi-Kaneko, Y. Tolerance to oxidative stress of inbred strains of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, differing in terms of virulence. *Nematology*, 査読有, vol. 20: 539-546, 2018.

Kanzaki, N., Tanaka, S.E., Ito M., Tanaka, K., Slippers, B., Tabata M. Some additional bionomic characters of *Deladenus nitobei*. *Nematology*, 査読有, vol. 20: 597-599, 2018.

<https://doi.org/10.1163/15685411-00003168>

Tanaka, S. E., Aikawa, T., Takeuchi-Kaneko, Y., Fukuda, K., Kanzaki, N. Artificial induction of third-stage dispersal juveniles of *Bursaphelenchus xylophilus* using newly established inbred lines. *PLoS ONE*, 査読有, vol. 12: e0187127, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187127>

Umebayashi, T., Yamada, T., Fukuhara, K. Endo, R., Kusumoto, D., Fukuda, K. In situ observation of pinewood nematode in wood. *European Journal of Plant Pathology*, 査読有, vol. 147: 463-467, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s10658-016-1013-8>

Ekino, T., Yoshiga, T., Takeuchi-Kaneko, Y., Kanzaki, N. Transmission electron microscopic observation of body cuticle structures of phoretic and parasitic stages of Parasitaphelenchinae nematode. *PLoS ONE*, 査読有, vol. 12: e0179465, 2017.

DOI: 10.1371/journal.pone.0179465

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

DOI: 10.1163/15685411-00003051

Voigt, D., Takanashi, T., Tsuchihara, K., Yazaki, K., Kuroda, K., Tsubaki, R., Hosoda, N. Strongest grip on the rod: tarsal morphology and attachment of Japanese pine sawyer beetles. *Zoological Letters*, 査読有, vol. 3: 16, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s40851-017-0076-5>

Kanzaki, N., Sakamoto, H., Maehara, N. *Diplogasteroides nix* n. sp. (Nematoda: Diplogastrodae), a cryptic species related to *D. andrassyi*, isolated from *Monochamus urussovii* (Coleoptera: Cerambycidae) from Hokkaido, Japan, with remarks on body surface structures. *Nematology*, 査読有, vol. 18: 753-773, 2016.

<https://doi.org/10.1163/15685411-00002990>

Kanzaki, N., Maehara, N., Akiba, M., Tanaka, S.E., Ide, T. Morphological characters of dauer juveniles of three species of *Bursaphelenchus fuchs*, 1937. *Nematology*, 査読有, vol. 18: 209-220, 2016.

<https://doi.org/10.1163/15685411-00002954>

Tsai, I. J., Tanaka, R., Kanzaki, N., Akiba, M., Yokoi, T., Espada, M., Jones, J. T., Kikuchi, T. Transcriptional and morphological changes in the transition from mycetophagous to phytophagous phase in the plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 査読有, vol. 17: 77-83, 2016.

DOI: 10.1111/mpp.12261

Kanzaki, N., Aikawa, T., Maehara, N., Pham, Q. T. *Bursaphelenchus kesiyae* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), isolated from dead wood of *Pinus kesiya* Royle ex Gordon (Pinaceae) from Vietnam, with proposal of new subgroups in the *B. fungivorus* group. *Nematology*, 査読有, vol. 18: 133-146, 2016.

DOI: 10.1163/15685411-00002949

Palomares-Rius, J. E., Tsai, I. J., Karim, N., Akiba, M., Kato, T., Maruyama, H., Takeuchi, Y., Kikuchi, T. Genome-wide variation in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and its relationship with pathogenic traits. *BMC Genomics*, 査読有, vol. 16: 845, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2085-0>

Kanzaki, N., Okabe, K., Kobori, Y. *Bursaphelenchus sakishimanus* n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae) isolated from a stag beetle, *Dorcus titanus sakishimanus* Nomura (Coleoptera: Lucanidae), on Ishigaki Island, Japan. *Nematology*, 査読有, vol. 17: 531-542, 2015.

DOI: 10.1163/15685411-00002887



[学会発表](計 22 件)

浴野泰甫・吉賀豊司・竹内祐子・市原 優・神崎菜摘. 「線形動物門における運動関連器官の性的二型。」第 63 回日本応用動物昆虫学会大会, 2019.

小笠真由美・平川雅文・市原 優・矢崎健一・飛田博順・福田健二. 「コンパクト MRI を用いた樹幹内水分分布の非破壊的観察手法の他樹種への適用。」第 130 回日本森林学会大会, 2019.

平川雅文・松下範久・福田健二・寺田康彦. 「MRI を用いたエンボリズムの発生・回復過程における水分通導の可視化。」第 130 回日本森林学会大会, 2019.

Takanashi, T., Yamazaki, K., Sigiura, S., Inoue, T., Tsuchihara, K. “Caterpillar mechanoreceptors: morphology, distribution and mechanical response of sensilla in various Lepidopteran larvae.” The 5th Annual Meeting of the Society for Bioacoustics, 2018.

Ekino, T., Yoshiga, T., Takeuchi-Kaneko, Y., Ichihara, Y., Kanzaki, N. “The cuticle ultrastructure of aphelenchoidid predators.” 33th Symposium of the European Society of Nematologists, 2018.

田中 克・鹿島 誠・横井寿郎・神崎菜摘・永野 惇. 「マツノザイセンチュウからの簡便かつ効率的な RNA 抽出手法。」日本線虫学会第 26 回大会, 2018.

田中 克・相川拓也・竹内祐子・福田健二・神崎菜摘. 「マツノザイセンチュウ分泌物の分散型 III 期誘導活性。」日本線虫学会第 25 回大会, 2017.

Ekino, T., Yoshiga, T., Takeuchi-Kaneko, Y., Kanzaki, N. “Transmission electron microscopic observation of body cuticle structure of phoretic and parasitic stages of Parasitaphelenchinae nematodes.” 12th International Symposium of the Russian Society of Nematologists ‘Nematodes and other Ecdysozoa under the growing ecological footprint on ecosystems’, 2017.

保谷剛志・田中 克・浴野泰甫・中村慎崇・竹内祐子. 「マツノザイセンチュウの増殖因子の解析。」第 128 回日本森林学会大会, 2017.

田中 克・田中龍聖・竹内祐子・神崎菜摘・菊地泰生・福田健二. 「マツノザイセンチュウ全ステージの網羅的遺伝子発現解析。」日本線虫学会第 24 回大会, 2016.

Hoya, T., Tanaka, S. E., Ekino, T., Takeuchi-Kaneko, Y. “Analysis of propagation factors of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*.” IUFRO Working Party 7.02.10 Pine Wilt Disease International Symposium, 2016.

Takeuchi-Kaneko, Y., McGawley, E. C., Overstreet, C. “Current situation of pine wilt disease in southeast Louisiana, U.S.A.” IUFRO Working Party 7.02.10 Pine Wilt Disease International Symposium, 2016.

Tanaka, S. E., Tanaka, R., Takeuchi-Kaneko, Y., Fukuda, K., Kanzaki, N., Kikuchi, T. “Stage-specific transcriptomic analysis of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*.” 32nd Symposium of the European Society of Nematologists, 2016.

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因子の解析。」第 127 回日本森林学会大会, 2016.

田中 克・田中龍聖・竹内祐子・神崎菜摘・菊地泰生・福田健二. 「カミキリによって誘導された耐久型線虫の遺伝子発現変化。」第 127 回日本森林学会大会, 2016.

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.

田中 克・神崎菜摘・相川拓也・田中龍聖・竹内祐子・福田健二. 「マツノザイセンチュウ T4 系統及びその純系株における分散型 III 期関連形質の調査。」日本線虫学会第 23 回大会, 2015.

Takeuchi, Y., Kaneko, A., Kato, T., Honjo, M. N., Nagano, A. J., Kudoh, H., Mori, K., Kikuchi, T., Kuhara, S., Futai, K. “An ‘omic’ based approach to the pathogenic mechanism of pine wilt disease.” Society of Nematologists 54th Annual Meeting, 2015.

McGawley, E. C., Takeuchi, Y., Overstreet, C. "Increase in the incidence of symptoms of pine wilt disease in southeast Louisiana." Society of Nematologists 54th Annual Meeting, 2015.

他 3 件

〔図書〕(計 2 件)

Kanzaki, N., Giblin-Davis, R. Chapter 7: Pine Wilt and Red Ring, Lethal Pant Diseases Caused by Insect-Mediated *Bursaphelenchus* Nematodes. In: Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens (edited by Brown, J. K.) APS Books, p. 87-107, 2016.

福田健二 編. マツの絵本. 農山漁村文化協会, p. 40, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：福田 健二

ローマ字氏名：( FUKUDA, Kenji )

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 30208954

研究分担者氏名：神崎 菜摘

ローマ字氏名：( KANZAKI, Natsumi )

所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究・整備機構

部局名：森林総合研究所

職名：主任研究員

研究者番号 ( 8 桁 ) : 70435585

研究分担者氏名：菊地 泰生

ローマ字氏名：( KIKUCHI, Taisei )

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 20353659

研究分担者氏名：土原 和子

ローマ字氏名：( TSUCHIHARA, Kazuko )

所属研究機関名：東北学院大学

部局名：教養学部

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 10300823

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：田中 克

ローマ字氏名：( TANAKA, Suguru )

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。