

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06145

研究課題名（和文）線虫をもって線虫を制する 捕食性線虫を用いた新規マツ枯れ制御技術の開発

研究課題名（英文）For control of nematodes with nematodes: development of a new pine wilt control technology using predatory nematodes

研究代表者

竹内 祐子（Takeuchi-Kaneko, Yuko）

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：80452283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウの近縁種である *Seinura caverna* は、高い線虫捕食能をもつ雌雄同体生殖種である。多様な生活史をもつ複数の近縁種と超微細構造を比較観察した結果、*S. caverna* とその近縁の捕食性線虫では共通して弾力に富んだ角皮構造をもつこと、またそれが捕食の為の口針射出に際して餌とそれ以外を識別する物理シグナルとして機能していることが推測された。また、*S. caverna* は *in vitro* 条件下でマツノザイセンチュウの個体数を有意に抑制し、生物防除資材としての利用可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

捕食性線虫でありながら培養が容易であり単一個体から増殖できるという *S. caverna* がもつ実験材料としてのアドバンテージを生かし、同種を線虫における捕食行動研究モデルとするための基礎的知見を集積し、研究基盤を整えた。また対峙培養によりマツノザイセンチュウに対する個体数抑制効果を確認し、生物防除資材としての利用可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：*Seinura caverna*, a species closely related to the pine wood nematode, the causative agent of pine wilt disease, is a hermaphroditic species with a high ability to prey on nematodes. As a result of comparing and observing the ultrastructure of several closely related Aphelenchoididae species with diverse life histories, we found that *S. caverna* and its related predatory nematode share a highly elastic cuticle structure. It is speculated that this functions as a physical signal that distinguishes preys from others when ejecting the stylet for predation. In addition, *S. caverna* significantly suppressed the population of the pine wood nematodes *in vitro*, suggesting its potential as a biological control material.

研究分野：Nematology

キーワード：マツ材線虫病 マツノザイセンチュウ 捕食性線虫 生物的防除

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*) が媒介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 (以下、マツ枯れ) は、最初の被害報告から 100 年余で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、今なお国内外で拡大を続けている。本病は感染後の致死率が高い上に伝播力が極めて強いため一旦被害が発生すると制御することは難しく、有効な防除策の確立が急務である。

マツ枯れは宿主であるマツ属樹木、病原体であるマツノザイセンチュウ、媒介者であるマツノマダラカミキリの複雑な相互作用のもとに成立する。治療法が確立されていないため、防除は病害蔓延を防ぐための様々な戦術を組み合わせで行われるが (抵抗性マツ育種、殺線虫剤の予防的樹幹注入、媒介昆虫に対する殺虫剤散布、枯死木の伐倒駆除など) いずれも一長一短がありいまだ完全な制御には至っていない。本病を効果的に防除するためには強固な伝染環を断ち切る必要がある。感染後の発病を阻止することが難しいのであれば、新たな感染が生じないようにするしかない。媒介昆虫ではなく病原体を標的として、枯死木内で病原体の増殖を制御することができれば、そこから媒介昆虫により病原体が拡散されるのを抑止できるはずである。

一方、鍾乳洞のコウモリグアノ (糞堆積物) から分離された *Seinura caverna* はマツノザイセンチュウと同じ Aphelenchoididae 科に属する近縁種であり、マツノザイセンチュウを含む多くの線虫種に対して高い捕食能力を示すことが確認されている (Kanzaki *et al.*, 2019)。本種は一般に培養が難しいとされる捕食性線虫でありながら既に人工培養系が確立されており、一個体から増殖できる雌雄同体生殖を行うため遺伝子解析や遺伝子操作を行う上でのアドバンテージがある。以上のような背景から、*S. caverna* を線虫の捕食行動研究の実験モデルとすること、さらに自ら捕食対象を探索して移動・増殖する *S. caverna* のもつ旺盛な捕食能を利用してマツノザイセンチュウに対する生物防除資材として活用することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、マツノザイセンチュウの近縁種である *Seinura caverna* の線虫捕食能に着目し、線虫における捕食行動研究のモデル化するなか実験材料化に必要な基礎情報を集積するとともに、マツノザイセンチュウの個体群制御技術に基づくマツ枯れの新規生物防除法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料に適した *Seinura caverna* 系統の準備

Seinura caverna はモデル生物 *Caenorhabditis elegans* と同じく雌雄同体生殖を行うため遺伝的純化が容易であり、研究材料としてのアドバンテージがある。そこで、遺伝学的解析や遺伝子操作等の分子レベルでの詳細な研究に適した個体群を得るため、単一個体からの増殖を何世代も繰り返すことで遺伝的に均一な近交系を新規に作出した。

(2) *Seinura caverna* の大量培養系の確立

S. caverna を生物防除資材として利用するためには大量かつ安定的な培養系の確立が必須となることから、餌線虫の選抜ならびに培養工程の簡略化を試みた。

(3) *Seinura caverna* の餌探索メカニズムの解析

S. caverna の捕食行動は細分化されており、捕食対象に対して頭部を接触させた後に口針を出し、貫通させ、消化液を注入し、対象線虫体内の内容物を吸引・捕食する。本種は捕食範囲が広いが、餌としない線虫と対峙させた場合には上記のような捕食行動をとらないことが観察された。捕食好適線虫もしくは同種を含む捕食不適線虫と対峙させた際に、どの段階でなにを基準に捕食対象を選別しているのか検証するために、近縁種を含む複数種の線虫他個体と接触した際の認識～行動観察を行うとともに、透過型電子顕微鏡を用いて餌線虫の体表クチクラ層の物理性を評価した。

(4) 新たな生物防除資材の探索

より適した生物防除資材となり得る候補線虫を探索するため、野外調査で採取した試料からの線虫分離を行った。得られた線虫は形態観察による種同定を行い、培養系を確立するとともに必要に応じて新種記載報告を行った。

(5) *Seinura caverna* によるマツノザイセンチュウ個体群制御効果の検証

マツノザイセンチュウ個体群に対する捕食者 *S. caverna* の影響を明らかにし、生物防除資材としての可能性を検討するため、培地及び木材基質上でマツノザイセンチュウと *S. caverna* の対峙培養試験を行った。また、*S. caverna* を用いてマツノザイセンチュウ個体群を人為的に制御することが可能か検証し、同種の生物防除資材としての可能性を検討するため、将来的な野外での応

用を視野に、徐々に実験系の規模を拡大した。

4. 研究成果

(1) 研究材料に適した *Seinura caverna* 系統の作出

Seinura caverna 単一個体からの増殖を 15 世代繰り返すことにより、遺伝的均質性が高いと想定される純系株（近交系）を新たに作製し、この線虫株を以後の実験株として使用した。また、野外調査において新たに *S. caverna* 複数株ならびに *Seinura* 属線虫複数種を分離し培養株を確立しており、*S. caverna* タイプ株の比較系として利用できるよう維持している。

(2) *Seinura caverna* の安定的な大量培養系の確立

S. caverna の安定供給を可能にするため、餌に好適な細菌食性線虫として *Acrobeloides* 属の単為生殖種を選抜し、安定的に培養可能であることを確認すると同時に、餌密度を調整することで大量培養法を確立した。また、遺伝子解析など、他線虫種の遺伝子混入が懸念される実験系においては、*C. elegans* の運動機能低下変異体を液体培養して用いることにより、材料を効率的に得られることを確認した。

(3) *Seinura caverna* の餌探索メカニズムの解析

S. caverna の捕食行動を観察し、近縁種との構造学的比較を行った結果、本種とその近縁の捕食性線虫では共通して他の近縁種、すなわち菌食性、植物寄生性、昆虫寄生性の Aphelenchoididae 科線虫よりも弾力に富んだ角皮構造をもっており、このことは系統解析から同科線虫における捕食性の獲得および消失と強く関連していることが示唆された。また、捕食の為の口針射出に関して、本種が化学シグナルのみならず物理シグナル、頭部が獲物に接触した際の「触感」を基準に餌とそれ以外を識別していることが推測された。

(4) 新種線虫の記載

新たな生物防除資材を探索する過程で検出した複数の新種線虫を記載するとともに *S. caverna* との生態比較を行った。*Seinura* 属とは系統的に近縁ながらも昆虫寄生性に進化した、同属及びその近縁系統群の高い可塑性を示す新属新種、*S. caverna* に近縁な雌雄異体種であり同種との生物学的比較系としての利用が可能と考えられる新種 *Seinura shigaensis*、同属近縁種である *S. italiensis* の国内株、特殊な形態をもち形態形成及び発生に関する解析材料として有望な細菌食性線虫、そして *Bursaphelenchus* 属の複数種などである。また、これまで *Seinura* に近縁の捕食性線虫と考えられていた *Berntsenu* 属に関して主に標本と分離記録に基づいて詳細な形態的、生態的解析を行った結果、マツノザイセンチュウを含む、*Bursaphelenchus* 属の一形態であることを明らかにした。上記のうち捕食種に関しては、防除資材としての利用可能性を検討している段階である。

(5) *Seinura caverna* によるマツノザイセンチュウ個体群制御効果の検証

培地及び木材基質上において対峙培養試験を行った結果、いずれにおいても *S. caverna* がマツノザイセンチュウ個体群密度を劇的に低下させることが確認された。続いて、より大型の木材すなわちマツ枯れの自然感染により枯死したマツから採取した丸太を対象に *S. caverna* を施用し、その後に羽化脱出したマツノマダラカミキリの保持するマツノザイセンチュウ個体数を計測し対照区と比較した。しかし、マツノザイセンチュウ保持数が全般に少なく、また高頻度に別種線虫 *Contortylenchus genitalicola* の混入が発生したため有意な結果が得られなかった。本病の被害丸太より羽化脱出したマツノマダラカミキリの保持するマツノザイセンチュウ個体数にはばらつきが大きく、林分の被害履歴や気象条件等多くの外部要因による影響を受ける。生物防除資材の有効性を検証するためには保持線虫数のばらつきを極力抑える必要があるが、本実験に使用した丸太ではその条件を満たせなかった。

今後、より実際の被害林分に近い環境下で検証を積み重ねた上で総合的に生物防除資材としての *S. caverna* の有効性を評価する必要があるだろう。

引用文献

Kanzaki, N., Ekino, T. and Masuya, M. (2019) *Seinura caverna* n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae), an androdioecious species isolated from bat guano in a calcareous cave. *Nematology*, **21**(2): 207-225. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003207>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kanzaki Natsumi、Kruger Meike S.、Greeff Jaco M.、Giblin-Davis Robin M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Bursaphelenchus suri n. sp.: A second Bursaphelenchus syconial parasite of figs supports adaptive radiation among section Sycomorus figs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0265339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanzaki Natsumi、Hamaguchi Keiko、Ide Tatsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparison of geographical isolates of Bursaphelenchus tadamiensis (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae) with remarks on its preferred habitat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 809 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maehara Noritoshi、Aikawa Takuya、Kanzaki Natsumi、Nakamura Katsunori	4. 巻 24
2. 論文標題 Transfer of four isolates of Bursaphelenchus doui into Monochamus alternatus and potential vector switching of the nematode	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 855 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichiishi Kanata、Ekino Taisuke、Kanzaki Natsumi、Shinya Ryoji	4. 巻 24
2. 論文標題 Predation drives convergent evolution of the thick and baggy cuticle in nematodes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi、Kosaka Hajime、Fujimori Yuta、Akiba Mitsuteru	4. 巻 25
2. 論文標題 On the phylogenetic status of <i>Contortylenchus genitalicola</i> Kosaka & Ogura, 1993	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Description of <i>Ruehmaphelenchus fujiensis</i> n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae) isolated from dead wood of <i>Quercus crispula</i> from Yamanashi, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 725~742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi、Ekino Taisuke、Kajimura Hisashi、Degawa Yousuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Description of <i>Bursaphelenchus microcarpae</i> n. sp. isolated from <i>Cryphalus abbreviatus</i> emerged from <i>Ficus microcarpa</i> , with a report of <i>B. carpini</i> re-isolation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 743~759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Nematode isolation from nitidulid beetles with proposal of <i>Sheraphelenchus heterophallus</i> n. comb.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 897~908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Description of <i>Basilaphelenchus pedrami</i> n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae) isolated from Kyoto, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 803 ~ 816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Li Hou-Feng, Ekino Taisuke, Takeuchi-Kaneko Yuko, Maehara Noritoshi, Aikawa Takuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Description of <i>Aphelenchoides roulingae</i> n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae) isolated from <i>Xylocopa collaris sauteri</i> collected from Yilan, Taiwan, with some notes on <i>A. xylocopae</i> Kanzaki, 2006	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Ekino Taisuke, Maehara Noritoshi, Aikawa Takuya, Giblin-Davis Robin M.	4. 巻 22
2. 論文標題 <i>Bursaphelenchus acaloleptae</i> n. sp. sharing tree and beetle carrier hosts with <i>B. luxuriosae</i> Kanzaki & Futai, 2003 in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 515 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-00003320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Giblin-Davis Robin M.	4. 巻 22
2. 論文標題 The genus <i>Berntsenus</i> Massey, 1974 is a junior synonym of <i>Bursaphelenchus</i> Fuchs, 1937	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 677 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-00003332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Hamaguchi Keiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Lenisaphelenchus ulomae n. gen., n. sp. (Rhabditida: Aphelenchoididae) isolated from the body cavity of Uloma marseuli Nakane (Coleoptera: Tenebrionidae) from Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 961 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Ekino Taisuke, Hamaguchi Keiko, Takeuchi-Kaneko Yuko	4. 巻 16
2. 論文標題 Three Seinura species from Japan with a description of <i>S. shigaensis</i> n. sp. (Tylenchomorpha: Aphelenchoididae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki Natsumi, Hamaguchi Keiko, Takeuchi-Kaneko Yuko	4. 巻 23
2. 論文標題 Chylorhabditis epuraeae n. gen., n. sp. (Rhabditida: Rhabditidae) isolated from <i>Eपुरaea</i> (<i>Haptoncus</i>) <i>ocularis</i> Fairmaire collected from sap on the bark of <i>Ulmus parvifolia</i> Jacq. in Kyoto, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1163/15685411-bja10051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Ryoji, Kirino Haru, Morisaka Hironobu, Takeuchi-Kaneko Yuko, Futai Kazuyoshi, Ueda Mitsuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative Secretome and Functional Analyses Reveal Glycoside Hydrolase Family 30 and Cysteine Peptidase as Virulence Determinants in the Pinewood Nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 640459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.640459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小池 孝良、塩尻 かおり、中村 誠宏、鎌田 直人	4. 発行年 2023年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 木本植物の被食防衛	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神崎 菜摘 (Kanzaki Natsumi) (70435585)	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 (82105)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浴野 泰甫 (Ekino Taisuke) (30843643)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------