

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02249

研究課題名（和文）ゲノムワイド関連解析を用いたマツノザイセンチュウの病原性因子の探索

研究課題名（英文）Search for virulence factors of Bursaphelenchus xylophilus using a genome-wide association study

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウの病原力等の表現型形質に関連する遺伝的因子の探索に向けてゲノムワイド関連解析（GWAS）を実施するために必要な情報を取得した。その結果、日本国内のマツノザイセンチュウには集団構造が認められないことが推定された。また、各株について80万以上のSNP情報と表現型形質情報（病原力、増殖力、性比）を取得した。今後の研究ニーズに対応するため、全ての株を凍結保存した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツ材線虫病に関しても今後GWASを用いた研究が進むようになると想定されるが、本課題はそのパイロット的な研究である。日本国内の広範囲から分離された株について高精度のSNP情報を取得できたが、あらゆる表現型形質に対するGWASにこれらの株を使用することが可能であり、学術的意義も高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：We obtained the information necessary to conduct a genome-wide association study (GWAS) to search for genetic factors associated with phenotypic traits, such as virulence, of the pinewood nematode, causal agent of pine wilt disease. As a result, it was inferred that no population structure is recognized in the pinewood nematode in Japan. In addition, more than 800,000 SNPs and phenotypic trait information (virulence, proliferation, and sex ratio) were obtained for each nematode isolates. All isolates studied were cryopreserved for future research needs.

研究分野：森林病理学

キーワード：マツノザイセンチュウ 病原力 GWAS マツ材線虫病

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病(マツ枯れ)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、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、今や世界的な問題となっている。これまでの長年に亘る研究により、マツノザイセンチュウとその媒介昆虫であるマツマダラカミキリの生態に関しては多くのことが明らかにされてきた。また、マツノザイセンチュウが宿主マツに侵入した後に起こる組織学・生理学的変化についても多くが理解されている。その一方で発病メカニズムの詳細、特に、マツへの侵入後にマツノザイセンチュウがマツ樹体内でどのような遺伝子を発現して発病させるのか?という病原性の本質については未だに明らかにされていない部分が多い。マツ材線虫病の発病メカニズムを解明する上で、宿主内の組織学・生理学的変化と宿主、病原体の遺伝子発現レベルの現象とを対応させていく必要がある。

マツ材線虫病が世界的な問題になったため、マツノザイセンチュウの病原性因子の探索研究が世界中(特に中国とヨーロッパ)で盛んに行われている。また、マツノザイセンチュウの全ゲノム配列の公表以降ゲノムレベルの解析が進められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日本国内各地から収集されたマツノザイセンチュウ野生株を用いてマツノザイセンチュウの病原性に関与する遺伝子群をゲノムワイド関連解析(GWAS: Genome-Wide Association Study)により明らかにすることである。そのために、以下のことを達成していく。

GWAS 解析のため、国内のマツノザイセンチュウの集団構造を把握する。

マツノザイセンチュウ野生株のゲノム配列情報および一塩基多型(SNP)情報を取得する。

病原性に関連する表現型形質(マツノザイセンチュウの病原力、増殖力など)を取得する。

3. 研究の方法

(1) 集団構造の推定とゲノム解読株の選定

森林総合研究所で保存されているマツノザイセンチュウ野生株と研究期間内に新たに分離された株の全 287 株について DNA を抽出し、ミトコンドリアのシトクロム C オキシダーゼサブユニット I 遺伝子(COI)の一部の配列の塩基配列を決定し、Network を用いてハプロタイプネットワークを解析した。各株の分離された場所と COI 配列を考慮し、そのうちの 182 株についてマイクロサテライト解析を実施した。線虫 1 頭から DNA を抽出し、Mallez ら(2013)のプライマーを用いて PCR 反応をし、genetic analyzer によりタイピングを実施した。さらに得られたマイクロサテライトデータから Structure によって集団遺伝構造を推定した。

(2) SNP 情報の取得

上記の結果を基に選定したマツノザイセンチュウ野生株 171 株について、全ゲノム配列のリシークエンスを行った。次世代シークエンサー(Illumina)を用いてショートリードを取得し、リファレンスゲノム(Ka4C1株 BXYJv5)に対するマッピング結果から SNP 情報を取得した。

(3) 表現型形質情報の取得

病原性を示す指標としてマツノザイセンチュウの病原力を測定した。宿主側の性質(マツノザイセンチュウに対する感受性)をそろえるためにクロマツの 1 個体の母樹から採取された種子由来の苗木を作製し、マツノザイセンチュウ 1000 頭を接種して人工気象器内に置いた。マツノザイセンチュウ 1 株につき 25 本のクロマツに接種し、その枯死率を病原力とした。一部の株について *Botrytis cinerea* (餌となる菌)上の増殖率と性比について調べた。

4. 研究成果

(1) 集団構造の推定

マツノザイセンチュウ野生株 287 株について COI の配列を決定したところ、全部で 14 のハプロタイプが存在することが明らかになり、これらは 4 つのグループにまとめられた。マツノザイセンチュウは北米から日本に侵入したと考えられているが、COI が複数のグループに分かれたことから、過去に日本に複数回の侵入イベントがあったことが推定された。マイクロサテライトデータの Structure による解析結果からも過去に複数回の侵入があったことが示唆されたが、明確な集団遺伝構造は認められなかった。一方、関西、九州などの材線虫病発生履歴の古い地域の方が東北などの発生履歴の新しい地域よりも遺伝的な多様性が高かった。以上の結果をまとめると、過去に複数回侵入したマツノザイセンチュウが日本国内で交配しつつ分布を拡大して行っ

たことが推定された。

(2) SNP 情報の取得

マツノザイセンチュウ野生株 171 株について各~5 Gb のショートリードを獲得した。これはゲノム全体の 70X をカバーし、SNP データを正確に取得するのに十分なデータ量である。獲得したリードをリファレンスゲノムにマッピングした結果、マッピング率はほとんどの株で 95%以上となった。SNP コールの結果全ての SNP 数は約 817 万となり、約 90%はホモの SNP であった。従来の国内のマツノザイセンチュウの解析例 (Palomares-Rius ら 2015) の SNP 数 (約 277 万) よりも多い SNP データを取得した。

(3) 表現型形質情報の取得

マツノザイセンチュウの病原力は 0~96%とかなりのばらつきを示した (図 1)。弱病原力株として試験によく使用される C14-5 株よりも低い病原力を示す株が存在する一方、強病原力株である Ka4 株程度の病原力を示す株も存在した。病原力は株によって連続的に変化していることから、病原力が量的形質であることが強く示唆された。GWAS は量的形質に関連する SNP 部位を探索するのに適した方法である。GWAS については現在解析中である。増殖率も株によって大きな違いが認められた。一方、性比は雌に偏るが、株間の差はそれほど認められなかった。尚、今回用いた株は精度の高い SNP 情報有する非常に貴重な株である。今回取得した形質以外の表現型形質についても新たに取得することにより、その表現型形質に関する GWAS 解析を実施することが可能である。今後の研究ニーズに応えるために、全ての株について凍結保存を行った。

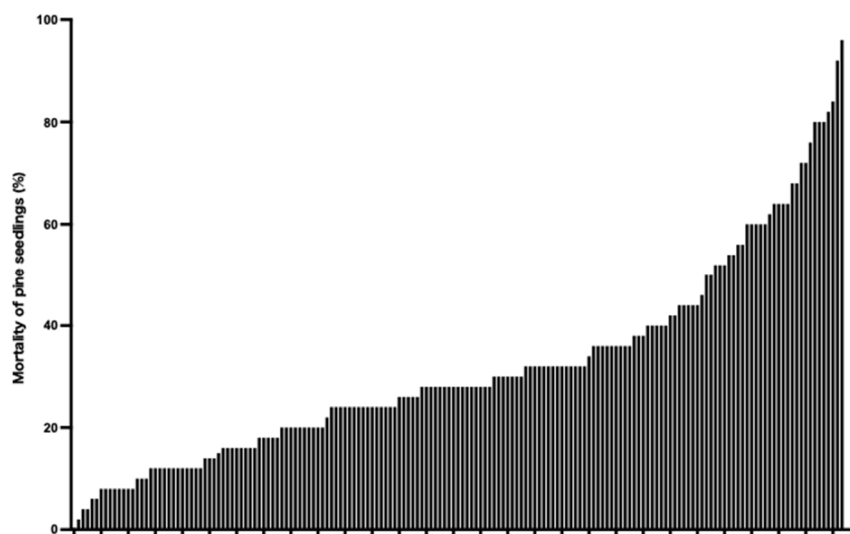


図 1. マツノザイセンチュウ野生株の病原力 (横軸は各株を示す)

引用文献

Mallez et al. (2013) PLoS One 8:e59165

Palomares-Rius et al. (2015) BMC Genomics 16:845

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 高村美月、桐野巴瑠、秋庭満輝、菊地泰生、新屋良治 |
| 2. 発表標題 マツノザイセンチュウの増殖力と性比の多様性 |
| 3. 学会等名 第28回日本線虫学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔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 | 菊地 泰生 (Kikuchi Taisei) (20353659) | 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 新屋 良治 (Shinya Ryoji) (30802798) | 明治大学・農学部・専任准教授 (32682) | |

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 |
|---------|---------|