

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450204

研究課題名(和文)酸化ストレス応答を指標とした、マツ・マツノザイセンチュウ・細菌の間に見られる攻防

研究課題名(英文) Genome and genetic analysis of the interactions between host (Pine tree), pathogen (pine wood nematode), and bacteria: focused on the oxidative stress responses

研究代表者

長谷川 浩一 (HASEGAWA, Koichi)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：10609837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：世界の森林生態系に大きな影響を与え続けるマツ枯れ病は、マツノザイセンチュウが種病原体であり、各地域のMonochamus属カミキリがベクターとなって病気を蔓延させている。本研究では、マツ枯れ病環境下におけるマイクロバイオームの多様性を示すだけでなく、植物における病原体感染時の初期防衛反応である酸化ストレス応答に注目しながら、細菌の有するユニークな生態学的機能を分子遺伝学的に示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The pine wilt disease continues devastating influence on the forest ecosystem of the world. The causal agent is the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, spread mainly in East Asia and Europa by *Monochamus* beetles. In this project, we showed the dynamics of microbiomes under the pine wilt disease environment. We also revealed its unique ecological function by molecular genetic approaches, focusing on the oxidative stress response that is the initial defense reaction in plants against pathogenic infection.

研究分野：森林科学

キーワード：マツ枯れ病 マイクロバイオーム ゲノム 酸化バースト 過酸化水素水 遺伝子ノックアウト マツノザイセンチュウ 植物内生細菌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 病原体の侵入を受けた宿主植物は、ヒドロキシラジカルや過酸化水素水といった酸化ストレス性化学物質を速やかに産生する酸化バーストによって、初期防衛反応として病原体に対抗することが一般的に知られている。マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウ(線虫の1種 *Bursaphelenchus xylophilus*)が、マツ樹木体内に侵入した瞬間から、線虫と宿主マツとの間で種々の攻防が繰り広げられる。このとき、マツ宿主では酸化バーストが検出され (Iwahori et al. 1993)、マツノザイセンチュウからは抗酸化酵素等の防衛タンパク質が多く分泌されることが報告されていた (Shinya et al. 2013)。したがって線虫の病原性やマツ宿主の抵抗性は、酸化ストレス応答を指標として説明することができるのではないかと当初考えていた。

(2) また、最近特にマイクロバイームに注目した研究は様々な生物学領域において非常に盛んであり、細菌の多様性だけでなく、宿主に対する重要な機能・役割に関する認識もますます高まってきている。世界の森林生態系に大きな影響を与え続けるマツ枯れ病を、マイクロバイームとその機能解析を通してみてゆくうえで、酸化ストレス防衛反応・解毒代謝機構に視点を当てれば、線虫・宿主マツ・細菌の3者間でみられる役割をはっきりと浮き彫りにすることができるのではないかと考えて本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

(1) マツ材線虫病の種病原体はマツノザイセンチュウであり、各地域に生息する *Monochamus* 属カミキリがベクターとなり、本病を伝播・拡大させている。マツノザイセンチュウには病原性の異なる系統が存在し、マツ実生苗を利用した人工接種試験によって、マツ枯死率の差として線虫系統間の有する病原性の強弱が明確に現れる。病原体侵入に対する植物の初期防衛反応である酸化バーストに耐えることができるかが、マツノザイセンチュウ系統間に見られる病原性の強弱を決定できる要素であることを発見した。本プロジェクトの前半に、マツノザイセンチュウにおける酸化ストレス関連遺伝子 (Catalase、Superoxide dismutase、Glutathione S-transferase など) の発現応答を実施し、またモデル生物である *Caenorhabditis elegans* にマツノザイセンチュウの当該遺伝子を組み込むことでその機能解析を実施し、上記発見を遺伝子レベルで説明することを試みた。

(2) 日本とヨーロッパにおける地理的差異や、マツが健全状態から枯死に至るまでの経過に沿って、線虫・ベクター昆虫・宿主マツの3者間におけるマイクロバイームの構成、

すなわちマツ枯れ病環境におけるマイクロバイームのダイナミクスについて、本研究プロジェクトと並行して実施することができた。培養可能な細菌35種類の特性を調べ、3種類 (*Serratia proteamaculans* 2種 LCN-4、-16 と *S. marcescens* 1種 PWN-146) の候補を選んだのち、これらのマツ枯れ病への関与について精査した。その結果、これらのマツノザイセンチュウ随伴細菌は線虫表面への強力な付着性がなく、若干量の随伴であっても細菌が抗酸化酵素を大量に分泌し、病原力の強弱関わらずすべてのマツノザイセンチュウ系統の酸化ストレス抵抗性を付与することを我々の選考研究で明らかになっていた (Vicente et al. 2013)。

したがって、ある種の細菌はマツノザイセンチュウに随伴し、宿主の酸化バーストから日和見的にマツノザイセンチュウを守り、病気の進行を補助している可能性が高いのではないかと考え、酸化ストレス防衛反応・解毒代謝機構に視点を当てながらその生態と機能について分子遺伝学的に解析することを目的に実験をおこなった。

## 3. 研究の方法

(1) 植物が酸化バーストの際に主に発生する過酸化水素水を、マツノザイセンチュウ各系統に処理したのち、処理濃度および時間と生存率を調べ、また各種酸化ストレス関連遺伝子 (Catalase、Superoxide dismutase、Glutathione S-transferase) の発現応答をリアルタイム qPCR によって評価した。また、植物宿主の酸化バーストに対する抵抗性を発揮する際に、特に重要だと考えられるカタラーゼ遺伝子であることがわかったので、マツノザイセンチュウゲノム中に存在していた2種類の当該遺伝子の CDS を取り出し、モデル生物である *Caenorhabditis elegans* のカタラーゼプロモーターおよび蛍光タンパク質 GFP と繋げた融合遺伝子を作成し、それぞれ *C. elegans* に組み込んだのち、過酸化水素水に対する抵抗性が付与されたかを調べた。

(2) これまでに本研究室で研究が進められてきている細菌3種 (LCN-4、-6、PWN-146) について、全ゲノムデータを取得して、その特性についてコンピューター解析をおこなった。また、これら細菌を GFP 蛍光標識したのち、マツ苗およびトマトの根に感染させ、植物体内における細菌の動態を調べた。細菌をマツ苗に感染させたのちに、病原力の異なるマツノザイセンチュウおよび非病原性のニセマツノザイセンチュウを感染させ、病徴進展を観察しながら発病前後に見られる細菌と線虫、および植物の酸化ストレス遺伝子の挙動を調べる。さらに、調べた細菌ゲノム情報をもとに酸化ストレス応答遺伝子ノックダウン株を作成し、樹木内生細菌としての植物側への作用や病徴進展に対するこれら

遺伝子の関与の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 病原力の強い系統は、弱い系統と比較して過酸化水素水に対する抵抗性が非常に高いことがわかった。また、2種類のカタラーゼ遺伝子 (ct1-1 および-2) 発現量が特に大きな差が出てきたことから、マツノザイセンチュウ系統間でみられる、酸化バーストに対する抵抗性と病原性の強さの差には相関があることが示された。また、マツノザイセンチュウのカタラーゼ遺伝子2種類をそれぞれ *C. elegans* に組み込んだところ、組み換え体線虫は過酸化水素水に対する抵抗性が付与されたことから、この2つの酵素の働きが大きいことが伺える。以上の成果は「Catalases induction in high virulence pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* under hydrogen peroxide-induced stress」のタイトルで2015年に PLOS ONE 誌に発表することができた。

(2) マツノザイセンチュウ表面から分離した細菌のなかには、カタラーゼ活性が高く酸化ストレス抵抗性も高いものが多く存在した。さらにマツノザイセンチュウ表面に随伴することで、マツノザイセンチュウの酸化ストレス抵抗性を付与する細菌も見出しており、ゲノム解析および逆遺伝学的解析によりその分子機構を解明することを目指して実験をおこなった。マツノザイセンチュウ随伴細菌の1種 *Serratia* sp. LCN16 のゲノム解析の結果、ゲノムサイズは 5.09 Mbp であり、予測遺伝子数は 4,804 遺伝子であった。遺伝子構成を見て、植物内生細菌の特徴を備えていたこと、酸化ストレス抵抗性遺伝子が揃っていたことが大きな特徴であり、本細菌の生態的特徴を反映しているといえる。また、カタラーゼ酵素をコードする *KatA* 遺伝子、およびその転写因子である *oxfR* 遺伝子をノックアウトさせると、随伴細菌としての特徴が欠失してしまうことが分かった。以上の成果は「The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*」のタイトルで2016年に BMC Genomics 誌に発表することができた。

もう1種類の細菌 *Serratia marcescens* PWN146 についてもゲノム解析を実施したところ、サイズは 5.48 Mbp であり、予測遺伝子数は 5,405 遺伝子であった。2つの巨大プラスミド (139 kb および 61kb) を有していたため、Roche Titanium 454 を用いた 3kb 長のペアエンドライブラリーによるシーケンスではギャップを埋めることができなかった。PacBio RSII を用いた 20kb ライブラリーによるシーケンスでゲノム配列を完成させた。ヒトや動物の日和見感染症の病原体でもある *S. marcescens*、*Serratia* sp. LCN16 と

同様、植物内生細菌の特徴を備え、かつ酸化ストレス抵抗性遺伝子が揃っていた。GFP で標識した細菌を植物に感染させると、体内に侵入し細胞間にとどまることも観察でき、植物内生菌としての生態も有することを示せ、また線虫とともに本細菌をマツ苗に接種すると、腰が促進されるという結果も見られた。以上の成果は「Evidences for an opportunistic and endophytic lifestyle of the *Bursaphelenchus xylophilus*-associated bacteria *Serratia marcescens* PWN146 isolated from wilting *Pinus pinaster*」のタイトルで2016年に Microbial Ecology 誌に発表することができた。

マツノザイセンチュウはもともと北米原産であると言われており、現地のマツに対しては明確な病原性を示さない。しかし近年、ヒトの経済活動が活発化し、マツ材の輸入とともに本線虫が東アジアおよびヨーロッパに移入し、共進化の歴史がない各地のマツに病原性を発揮してしまい、森林生態系に甚大な被害を及ぼしてしまった典型的な移入種による疫病である。植物の初期防衛反応である酸化バーストに注目しながら、宿主体内に侵入する生物を病原体か否かを認識し、そして防衛応答により排除するという一連の「線虫およびマツ宿主間の攻防」を分子レベルで明らかにできた。次の課題である、マツ宿主が線虫を病原体か否かを認識するメカニズムを調べれば、外来線虫種による在来マツ樹種への攻撃性や、あるいは在来種どうしの病原性を伴わない良好な関係といった、寄生・共生の進化を理解することができ、マツ材線虫病の本質にさらに迫ることができると考えている。

また、細菌は生物・無生物を問わず有機的無機的環境下に広く存在し、何らかの生物間相互関係を繰り広げながらその環境のバランスに影響を与えている。動物の腸内および皮膚に存在する常在細菌同様、宿主マツ、ベクターカミキリ、そして線虫といったマツ枯れ病環境下に存在する細菌の量および種の多様性は圧倒的であることが分かり、また酸化ストレス応答に注目することで、病気の進展にも大きく影響することをクリアに示すことができた。

このような手法や視点からマツ材線虫病を解析した研究は世界的にも例はなく、本研究プロジェクトによって切り拓くことができたと言える。

<引用文献>

Iwahori, H. & Futai, K. (1993) Jap J Nematol. 23, 79-89.

Shinya R, et al. (2013) PLOS ONE 2013 8, e67377.

Vicente CSL, et al. (2013) BMC Microbiology13, 299.

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計5件)

Vicente, C.S.L., Nascimento, F.X., Barbosa, P., Huei-Mien, K., Tsai, I.J., Hirao, T., Cock, P.J.A., Kikuchi, T., Hasegawa, K., Mota, M. (2016) Evidences for an opportunistic and endophytic lifestyle of the *Bursaphelenchus xylophilus*-associated bacteria *Serratia marcescens* PWN146 isolated from wilting *Pinus pinaster*. *Microbial Ecology* 72 (3), 669-681. 査読有  
DOI: 10.1007/s00248-016-0820-y

Vicente, C.S.L., Nascimento, F.X., Ikuyo, Y., Cock, P.J.A., Mota, M., Hasegawa, K. (2016) The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC Genomics* 17, 301. 査読有  
DOI:10.1186/s12864-016-2626-1

Alves, M., Pereira, A., Matos, P., Henriques, J., Vicente, C., Aikawa, T., Hasegawa, K., Nascimento, F., Mota, M., Correia, A., Henriques, I. (2016) Bacterial community associated to the pine wilt disease insect vectors *Monochamus galloprovincialis* and *Monochamus alternatus*. *Scientific Reports* 6, 23908. 査読有  
DOI:10.1038/srep23908

Vicente, C.S.L., Ikuyo, Y., Shinya, R., Mota, M., Hasegawa, K. (2015) Catalases induction in high virulence pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* under hydrogen peroxide-induced stress. *PLOS ONE* 10 (4), e0123839. 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0123839

Nascimento, F.X., Hasegawa, K., Mota, M., Vicente, C.S.L. (2015) Bacterial role in pine wilt disease development -review and future perspectives. *Environmental Microbiology Reports* 7 (1), 51-63. 査読有  
DOI:10.1111/1758-2229.12202

### [学会発表](計9件)

Vicente, C.S.L., Mota, M., Hasegawa, K. New insights into the biology of PWN-associated bacteria: genome analysis of *Serratia* sp. LCN16 and *Serratia marcescens* PWN146. IUFRO Pine Wilt Disease Symposium 2016, September 1<sup>st</sup>, 2016, Seoul Korea.

Vicente, C.S.L., Nascimento, F.X., Ikuyo, Y., Mota, M., Hasegawa, K. The Genome and Genetics of a High Oxidative Stress Tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. ASM Microbe 2016, June 19<sup>th</sup>, 2016, Boston, MA, USA.

Hasegawa, K., Vicente, C.S.L. Nematology and Microbial Ecology. Special lecture for Agrotechnology Department, Syiah Kuala University. September 15<sup>th</sup>, 2015. Syiah Kuala University, Banda Aceh, Indonesia.

Vicente, C.S.L., Nascimento, F.X., Ikuyo, Y., Peter, C., Mota, M., Hasegawa, K. (2015) Genomic analysis of nematode-bacteria interaction in Pine Wilt Disease. 日本線虫学会第23回大会, 2015年9月2日, 中部大学三浦記念会館, 愛知県・名古屋市.

Vicente, C.S.L., Nascimento F., Ikuyo, Y., Mota, M., Hasegawa, K. Study of nematode-bacteria interaction in Pine Wilt Disease. 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. June 8<sup>th</sup>, 2015, Maastricht, The Netherlands.

Cláudia Vicente, 田山地晃宏, Peter Cock, 幾代以子, Manuel Mota, 長谷川浩一. ゲノムから見るマツ枯れ病関連細菌 *Serratia marcescens* PWN-146 の役割. 第59回日本応用動物昆虫学会大会, 2015年3月27および28日, 山形大学, 山形県・山形市.

Vicente, C.S.L., Soga, K., Shinya, R., Mota, M., Hasegawa, K. Lack of the function for oxidative stress response in the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* low virulent strain. 日本線虫学会第22回大会, 2014年9月17日, 文部科学省研究交流センター, 茨城県・つくば市.

Vicente, C.S.L., Ikuyo, Y., Shinya, R., Mota, M., Hasegawa, K. Virulence and oxidative stress response of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. 6th International Congress of Nematology. May 5<sup>th</sup>, 2014, Cape Town, South Africa.

Francisco X. Nascimento, Cláudia S.L. Vicente, Pedro Barbosa, Margarida Espada, Paulo Vieira, Koichi Hasegawa, Manuel Mota. Ecological role of bacteria

associated with the pine wilt disease system. 6th International Congress of Nematology. May 5<sup>th</sup>, 2014, Cape Town, South Africa.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

中部大学応用生物学部長谷川浩一研究室

[https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hasegawa\\_koichi/](https://www3.chubu.ac.jp/faculty/hasegawa_koichi/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 浩一 (HASEGAWA, Koichi)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：10609837

### (2) 研究分担者

河合 都妙 (KAWAI, Tsutae)

中部大学・応用生物学部・助教

研究者番号：90610717

### (3) 研究協力者

幾代 以子 (IKUYO, Yoriko)

中部大学・応用生物学部・助手

田山地 晃宏 (TAYAMACHI, Akihiro)

中部大学・応用生物学研究科・大学院生