線虫、宿主マツ、媒介カミキリムシの3者関係から紐解くマツ枯れのメカニズム

2023 年 6 月 12 日

「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員　（主査）　農学部　専任准教授

氏名　　新屋　良治

（副査）　農学部　専任教授

氏名　　糸山　享

（副査）　農学部　専任准教授

氏名　　大里　修一

１　論文提出者

桐野　巴瑠

２　論文題名

The mechanism of pine wilt disease revealed by triadic relationship among *Bursaphelenchus xylophilus*, pine tree, and vector cerambycid beetle.

（邦文題）　線虫、 宿主マツ、 媒介カミキリムシの 3 者関係から紐解くマツ枯れのメカニズム

３　論文の構成

本論文は，次の６章および謝辞と引用文献リストから構成され，全７７ページからなる。

第 1 章 General introduction

第 2 章 Thaumatin-like proteins and a cysteine protease inhibitor secreted by the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* induce cell death in *Nicotiana benthamiana*

第 3 章 Novel functional analysis for pathogenic proteins of *Bursaphelenchus xylophilus* in pine seed embryos using a virus vector

第 4 章 How did nematodes acquire a specific relationship with their beetle vectors?

第 5 章 Novel functional analysis to identify the receptor genes for dauer-inducing signals in insect-borne nematodes, using germline transformation of *Caenorhabditis elegans*

第 6 章 General discussion

４　論文の概要

マツ材線虫病（通称：マツ枯れ）は，病原体であるマツノザイセンチュウとその媒介者である

マツノマダラカミキリによって引き起こされるマツ科樹木の感染症である。本病気は長年にわたり，日本国内で甚大な被害をもたらし続けており，現在では他のアジア諸国や欧州地域にも広がり，世界４大樹木病害の一つとされている。従来，本病気の防除には，媒介昆虫に対する殺虫剤の空中散布や病原線虫に対する殺線虫剤の樹幹注入が一般に使用されてきた。しかし，近隣住民の健康被害や高コストの問題から，利用可能な防除手法が急速に減少しており，持続可能な防除手法の開発が求められている。持続可能な防除手法の開発には，マツ材線虫病の発病の仕組みや病原線虫が媒介昆虫へ便乗する仕組みの解明が必須であるが，詳細な知見はまだ不十分であり，特に分子レベルでのメカニズム解明はほとんど行われていない。

本論文は，マツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウを主な研究対象とし，大きく分けて以下の２つの内容で構成されている。前半の第２章と第３章では，「病原線虫が宿主マツに病気を引き起こす仕組み」について，後半の第４章と第５章では，「病原線虫が媒介昆虫に便乗する仕組み」について，それぞれ詳細な実験を行い，新たな知見を得ている。

第１章では，マツ材線虫病の背景と研究の目的について論じている。最初に，病原体であるマツノザイセンチュウが北米原産の外来侵入種であり，２０世紀初頭に日本で初めて確認され，その後世界中に感染が広がった経緯を説明している。さらに，マツ材線虫病の感染拡大において，マツノザイセンチュウの病原性と媒介昆虫への便乗力が重要な要素であることを指摘している。しかし，これらの要素に関する分子機能解析手法が不十分であるため，そのメカニズムの大部分がまだ解明されていない。そこで，本論文では，第２章でモデル植物であるベンサミアナタバコを用いて，マツノザイセンチュウの病原因子のスクリーニングを行っている。また，第３章ではマツノザイセンチュウの自然宿主であるクロマツを用いて新たな機能解析手法を開発し，病原因子の解明に取り組んでいる。さらに，第４章ではマツノザイセンチュウにおける媒介昆虫への便乗力の進化メカニズムを理解するため，オキナワザイセンチュウという近縁種を用いて分散型幼虫が出現する刺激を調査している。最後に，第５章では前章の結果に基づいて，マツノザイセンチュウの分散型幼虫の誘導機構を解明するための手法開発に取り組んだことを述べている。

第２章では，マツノザイセンチュウの病原因子を特定するために，モデル植物であるベンサミアナタバコを使用してマツノザイセンチュウ病原候補因子のスクリーニング実験を行った。ベンサミアナタバコはアグロバテリウム感染により外来遺伝子を簡便に発現することができるため，他の病原性微生物を含むエフェクタースクリーニングによく利用される。本研究では，先行研究に基づきマツノザイセンチュウ分泌タンパク質の中から１５種類の病原候補因子を選び，これらの線虫病原候補因子をベンサミアナタバコに一過性発現させた。その結果，マツノザイセンチュウが分泌する５種類のタンパク質が植物体に過敏感細胞死を引き起こすことが明らかになった。また，共焦点レーザー顕微鏡を使用した分子局在解析により，これら５種類のタンパク質のうち３種類がタバコ細胞の小胞体に作用することで細胞死を引き起こすことが示された。

第３章では，マツノザイセンチュウの自然宿主であるクロマツを用いた新規の機能解析手法を開発し，病原因子の特定を試みた。前章で見つかった５種類の分子が実際に自然宿主であるマツにおいて同様の細胞死を引き起こすかについては不明であったため，本研究ではまず，培地上の

クロマツ種子胚においてマツノザイセンチュウ接種時に PR 遺伝子の発現が上昇することをリアルタイム PCR で確認した。特に，継続的に発現している *PR-2*, *PR-4*, *PR-5*, および *PR-6* 遺伝子を，マツノザイセンチュウ病原因子を探索する際のマーカー遺伝子として選択した。次に，上述の５種類の病原候補因子の完全長 cDNA 配列を組み込んだ ALSV（apple latent spherical virus）ベクターをパーティクルガン法によりクロマツ種子胚に射出した結果，２種類の thaumatin-like protein および１種類の GH-30 がクロマツにおいてマーカーPR 遺伝子の発現を顕著に上昇させることが明らかになった。本研究では，マツノザイセンチュウの自然宿主であるマツを用いた分子機能解析手法を初めて開発し，その手法を活用して３種類の病原因子を同定することに成功した。

第４章では，マツノザイセンチュウにおける媒介昆虫への高い便乗力がどのように進化してきたかを理解するために，本線虫種の近縁で遺伝学解析が可能であるオキナワザイセンチュウを用いて，どのような刺激により分散型幼虫が出現するかを調査した。オキナワザイセンチュウの分散型幼虫は，媒介昆虫が存在しない培地上でも出現し，カミキリムシへの便乗率はマツノザイセンチュウと比べて非常に低いことが知られている。このことから，オキナワザイセンチュウはカミキリムシとの密接な関係性を構築する進化の過渡期に位置する可能性が高いと考えられた。まず，個体群密度の指標として用いられる同種の水溶性フェロモンを添加した培地上でオキナワザイセンチュウを培養した結果，分散型幼虫の誘導率が有意に上昇した。次に，マツノマダラカミキリが羽化するまで共培養した結果，こちらも分散型幼虫の誘導率が有意に上昇した。以上より，オキナワザイセンチュウの分散型幼虫の誘導には同種の水溶性フェロモンおよび昆虫由来の物質の両方が関与していることが示された。しかし，カミキリムシによって誘導されたオキナワザイセンチュウの分散型幼虫の多くはカミキリムシに便乗できなかった。これらの結果は，元々水溶性フェロモンの存在下でのみ誘導されていた分散型３期幼虫が，カミキリムシ由来の物質によっても誘導されるように進化し，昆虫への便乗に特化した分散型４期幼虫が新たに出現したことを示唆する。

第５章では，前章の結果を受けて，マツノザイセンチュウ分散型幼虫の誘導機構を解明するための手法開発に取り組んだ。本研究では，モデル線虫として広く利用されている *Caenorhabditis elegans* を用いることで，マツノマダラカミキリが羽化時に発する揮発性物質を認識するマツノザイセンチュウの受容体を特定する技術の開発を試みた。本研究では，*C. elegans* において耐久型幼虫誘導刺激である水溶性フェロモンを受容することが知られている ASJ ニューロンに，揮発性物質であるジアセチル受容体 *odr-10* を発現させた。野生型の *C. elegans* においては，ジアセチルへの曝露によって耐久型幼虫が誘導されることはないが，*odr-10* を発現させた組み換え体線虫の一部では，ジアセチルへの曝露により耐久型幼虫が誘導されることが示された。この結果を受け，*C. elegans* を用いてマツノザイセンチュウにおける分散型幼虫誘導に関与する受容体をスクリーニングする新規の実験系を提案した。

５　論文の特質

本論文は，アジアや欧州地域において大きな問題となっているマツ材線虫病の病原体マツノザイセンチュウの病原性メカニズムと媒介昆虫への便乗メカニズムに関する数多くの重要な知見を

提供している。研究アプローチは一貫しており，まず長年の課題である技術的障壁を取り除き，その後開発した手法を用いて分子メカニズムの解明に取り組んでいる。開発された手法は，本研究における利用に留まらず，今後多くの研究者により利用される極めて重要な成果となる。また，本研究において初めてマツノザイセンチュウの病原因子の一部が明らかになったことで，今後新たなマツノザイセンチュウ防除技術の開発に発展することが期待できる。このような特徴を持つことから，本論文はマツノザイセンチュウに関する重要な研究成果であり，森林保護や害虫対策の分野において有益な情報を提供する。

６　論文の評価

本論文は，全章が英文で執筆されており，第２章と第３章は国際学術誌に掲載されている。これらの論文は国際的に高く評価され，引用数も着実に増加している。また，第４章の内容も国際学術誌に投稿済みであり，査読者からの評価も非常に高く，現在修正稿の段階である。研究内容の新規性，独創性，森林保護分野への貢献を総合的に鑑みて，本論文を極めて高く評価する。

７　論文の判定

本学位請求論文は，農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり，本学学位規程の手続きに従い，審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので，博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以　上

主査氏名（自署）＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿