

研究終了報告書

「寄生線虫性転換を誘導する環境/植物シグナルの解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究者：新屋 良治

1. 研究のねらい

植物寄生線虫は様々な農作物および樹木に対して病気を引き起こし、世界中の農林業において甚大な被害をもたらす植物病害虫の1グループであり、その農作物被害学は全世界で推定8兆円と推測されている。近年環境への悪影響の懸念から、線虫防除に有効な土壤消毒剤の使用が禁止もしくは制限され、さらに殺線虫農薬に対する線虫の抵抗性獲得が確認されていることからこれらに代わる全く新しい線虫防除手段の開発が急務となっている。

本提案研究の最終的な狙いは植物寄生線虫の特異な生態を利用した全く新しい線虫被害防除方法の確立を目指すことである。特に植物寄生性線虫の特殊な繁殖様式に焦点を絞り、その仕組みを明らかにするとともに、得られた基礎的知見を利用した新たな線虫防除手法の確立を長期的な目標とする。繁殖に関する2つの性質、1)性決定・性転換、2)性フェロモンに着目し、その基礎的な知見を得ることが本課題研究期間の目標である。

本研究成果を叩き台とし、将来的には人為的な線虫性比の制御や、交尾行動の阻害による線虫増殖抑制手法の開発を目指す。具体的には植物栽培環境のコントロール、線虫抵抗性作物の作出、擬似フェロモンを利用したアプローチである。この場合、線虫を殺さないことから抵抗性発達のリスクも低く環境への負担も極めて少ない。つまり本研究成果は、線虫防除における長年の課題である「殺す」防除から脱却し、多様な防除手法を組み合わせ「被害許容水準以下に抑える」線虫防除手法への転換を大きく推進するものとなることが期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本課題研究期間において複数の大きな成果が得られた。研究項目ごとに主要な成果について以下説明する。

研究テーマA「ネコブセンチュウ性転換を誘導する刺激の探索」

宿主であるトマトに対して様々なストレスを付与し、雄線虫出現への影響を調べることで、雄線虫が出現する環境条件を特定することを目指した。トマト水耕栽培を用いて雄出現数計数する手法を確立し、トマトを弱光条件下で栽培した際に、有意に雄線虫の出現数が多くなることを明らかにした。次に、弱光栽培条件下で雄出現が増加する仕組みを分子レベルで調べるために、新たにシロイヌナズナを用いたネコブセンチュウ感染系の構築とアッセイを行った。その結果、糖輸送関連遺伝子変異体で雄の割合が高くなることが明らかになった。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、ネコブセンチュウ幼虫が宿主根内に形成する巨大細胞の観察およびサイズ計測を行った。その結果、雄の巨大細胞は雌の巨大細胞と比べ有意に小さいことが明らかとなった。この結果は、線虫が摂取することができる栄養量に応じてその後性分化が起こることを支持するものである。

研究テーマ B 「性決定遺伝子の同定」

本研究では糸状菌食/植物食でありながら雌雄同体の生殖様式と短い世代期間を有するオキナワザイセンチュウを用いて、植物寄生性線虫グループの性決定機構を明らかにすることを試みた。EMS 処理により性決定変異体を探索し、4系統の独立した変異体の取得に成功した。NGS を用いた variant calling 解析により、4系統全ての変異体で *tra-1* に変異を有することを明らかにすることができた。これにより糸状菌食/植物食線虫グループにおいて初めて性決定遺伝子を明らかにすることに成功した。また、RNA-seq 解析により *tra-1* 以外に性決定に関与する因子を推定することもできた。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、ネコブセンチュウ性分化前後における線虫サンプルを集め、RNA-seq 解析を実施した。雄特異的に発現が増加もしくは低下する遺伝子を抽出した結果、*C. elegans* における性決定遺伝子のオルソログでは *tra-1* および *gld-1* が雌雄で異なる発現を示すことが明らかになった。また、複数の転写因子が雄得意的に発現増加することを確認するとともに、*C. elegans* における主要グルコーストランスポーターの発現が雄線虫特異的に増加することが示された。

研究テーマ C 「線虫揮発性性フェロモンの同定」

植物寄生性線虫の中には雌雄異体の生殖様式を有し、交尾により繁殖する種も多く存在する。これらの植物寄生線虫種の防除を目指し、正常な交尾行動に必須な性フェロモン物質を探索した。マツノザイセンチュウおよびオキナワザイセンチュウを用いた 2DGC 解析により、12種類の候補物質を絞りこんだ。これら12種類の化合物を用いて走化性検定を行い、4種類の化合物が雄特異的に誘引活性を有することを明らかにした。次に、線虫における揮発性性フェロモンの進化的保存性を理解するために、モデル線虫である *C. elegans* においても同様の揮発性性フェロモンが存在するかを精査し、雄を有意に誘引する化合物を特定することに成功した。

研究テーマ D 「ネコブセンチュウ性転換を誘導する化合物の探索」

線虫性比に影響を与える化合物を探索する目的で、ケミカルスクリーニングを行なった。これまでに 1,800 化合物の試験が終了し、性比に影響を及ぼす化合物は確認できていない。しかし、死亡、行動異常などの表現型異常を引き起こす化合物が複数確認できた。これらの中には新たな殺線虫農薬として期待できるものも存在するため、特許申請および実用化に向けた企業との共同研究を検討している。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ネコブセンチュウ性転換を誘導する刺激の探索」

サツマイモネコブセンチュウは多種多様な農作物に被害をもたらす重要害虫であり、基本的に雌単独の単為生殖により増殖する。環境条件によっては雄が出現する場合があることが知られているが、その仕組みは明らかになっていない。本研究課題では、宿主であるトマトに対して様々なストレスを付与し、雄線虫出現への影響を調べた。その結果、トマトを弱光条件下で栽培した際に、有意に雄線虫の出現数が増加することが明らかになった。このことは植物栽培の光条件がネコブセンチュウ増殖効率に影響を与えることを示唆している。

次に、ネコブセンチュウ雄の出現を誘導する宿主植物因子を理解するために、新たにシロイヌナズナを用いたネコブセンチュウ感染系の構築を行った（図1）。培地の栄養条件、水分含量、線虫接種方法を検討することで、15-20%程度の線虫感染を安定的に得られる実験系を確立することができた。確立した感染系を利用してネコブセンチュウ雄の出現を誘導する宿主植物因子の探索に取り組んでおり、糖輸送関連遺伝子変異体 (*stp12*, *sweet13*) やデンプンを蓄積できない変異体 (*adg1-1/tpt-2*) で雄の割合が高くなることを明らかにした。

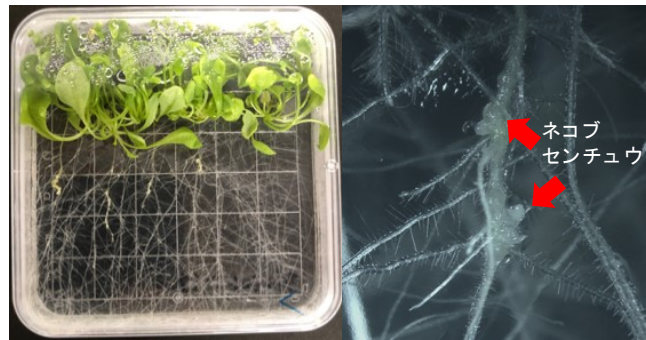


図1. シロイヌナズナを用いたネコブセンチュウ感染系

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、ネコブセンチュウ幼虫が宿主根内に形成する巨大細胞の観察およびサイズ計測を行った。ネコブセンチュウはこの巨大細胞からのみ、栄養を得ると考えられており、巨大細胞の大きさはその中に含まれる代謝産物(=線虫にとっての栄養)量と比例するはずである。ネコブセンチュウをシロイヌナズナに感染させた後、2週間後および4週間後の根を回収し、マイクロトームを用いて連続切片を作製した。雌雄幼虫別の巨大細胞サイズを測定したところ、雄の巨大細胞は雌の巨大細胞と比べ有意に小さいことが明らかとなった。この結果は、線虫が摂取することができる栄養量に応じてその後性分化が起こることを支持するものである。

研究テーマB「性決定遺伝子の同定」

ネコブセンチュウは絶対寄生性の性質と世代期間の長さから遺伝学解析を行うことが困難な生物である。そこで、本研究では糸状菌食/植物食でありながら雌雄同体の生殖様式と短い世代期間を有するオキナワザイセンチュウを用いて、植物寄生性線虫グループの性決定機構を明らかにすることを試みた。本研究では遺伝学基盤を整備するために、新たな系統の取得とゲノム解析を行った(Simo et al. 2020, Microbiology Resource Announcements)。EMS処理により性決定変異体を探索し、4系統の独立した変異体の取得に成功した。その後NGSを用いたvariant calling解析により、4系統全ての変異体が同一の遺伝子内に変異を有することを明らかにすることができた。この遺伝子はzinc finger型の転写因子で、モデル線虫 *C. elegans* の性決定カスケードにおけるターミナルレギュレーター (*tra-1*) のホモログであることが明らかになった。糸状菌食/植物食線虫グループにおいて初めて性決定遺伝子を明らかにすることに成功した。

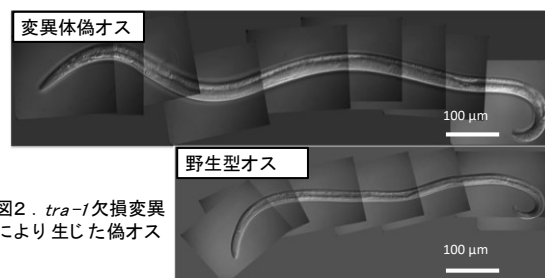


図2. *tra-1*欠損変異により生じた偽オス

遺伝学解析により *tra-1* 以外の性決定遺伝子を取得することができなかったため、上記で取得した性決定変異体における RNA-seq 解析を行うことで、植物寄生線虫における *tra-1*

以外の性決定遺伝子の探索することに取り組んだ。まず今回のゲノム解析により、*C. elegans* で明らかになっている性決定カスケード(11 遺伝子)の 8 遺伝子がオキナワザイセンチュウやその他の植物寄生性線虫に存在しないことがわかった。共通して存在していた 3 遺伝子は *tra-1*, *fem-2*, *tra-3* でいずれもカスケード下流に存在する遺伝子であった。*tra-1*, *fem-2*, *tra-3* は遺伝子発現レベルで *C. elegans* と比較した場合、雌雄間での遺伝子発現パターンは共通しており類似の機能を有していることが示唆された。また、*tra-1* 欠損変異体における RNA-seq の結果、*tra-1* 下流に存在する *mab-3* も性決定における機能を有していることが示唆された。一連の研究成果に関する論文は現在投稿中である。

次に、ネコブセンチュウにおける性分化前後における RNA-seq 解析に取り組んでいる。ネコブセンチュウの場合、宿主の根へ侵入後 10 日以内に性が決定することが知られている。性決定関連遺伝子を理解するためには、この時期(第 3 期幼虫前後)における線虫の遺伝子発現を理解する必要があると思われるため、まずは第 3 期幼虫において雌雄の判別を可能にする手法の確立に取り組んだ。先行研究に従い、根に侵入後の線虫を酸性フクシンにて染色し、生殖巣の形態の違いにて早期に雌雄判別ができることを確認した。しかし、RNA-seq 解析を行うためには非固定・非染色サンプルが望ましいため、微分干渉顕微鏡の明視野観察にて生殖巣の形態が判別できるよう手法の最適化を行った。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、ネコブセンチュウ性分化前後における線虫サンプルを集め、RNA-seq 解析を実施した。その結果、性分化前後の発育ステージ及び性別毎に発現プロファイルが明確に分離した、高品質なトランスクリプトーム情報を得た。得られた発現プロファイルを確認すると、性分化前幼虫と分化後幼虫は比較的類似した遺伝子発現パターンを示し、性分化直後の雄はそれらと明確に異なる遺伝子発現パターンを示した。次に、雄特異的に発現が増加もしくは低下する遺伝子を抽出した。その結果、*C. elegans* における性決定遺伝子のオルソログでは *tra-1* および *gld-1* が類似の雌雄で異なる発現を示すことが明らかになった。また、複数の転写因子が雄得意的に発現増加することを確認するとともに、*C. elegans* における主要グルコーストランスポーターの発現が雄特異的に増加することが示された。上記研究テーマ A において、線虫が接種する糖が性決定に関与することを示したことから、この結果は興味深いと考えている。今後はこれら性特異的に発現が変動する遺伝子の機能解析に取り組む。

研究テーマ C 「線虫揮発性性フェロモンの同定」

植物寄生性線虫の中には雌雄異体の生殖様式を有し、交尾により繁殖する種も多く存在する。これらの植物寄生線虫種の防除を目指し、正常な交尾行動に必須な性フェロモン物質を探索した。線虫では従来よりアスカロサイドと呼ばれる水溶性の糖脂質物質がフェロモン様の機能を有することが知られていた。しかし、研究代表者自身の以前の研究によりマツノザイセンチュウの雌は揮発性の性フェロモンを利用して雄を誘引することを見出した。そこで本研究ではこの揮発性の性フェロモンの同定を試みた。マツノザイセンチュウおよびオキナワザイセンチュウを用いた 2DGC 解析により、12 種類の候補物質を絞り込んだ(図 3)。これら 12 種類の化合物を用いて走化性検定を行い、4 種類の化合物が雄特異的に誘引活性を有することを明らかにした。この 4 種類の化合物を質量分析により同定することに成功した。これは線虫全体において初めて同定された揮発性の性フェロモン物質である。

次に、線虫における揮発性性フェロモンの進化的保存性を理解するために、モデル線虫である *Caenorhabditis elegans* においても同様の揮発性性フェロモンが存在するかを精査した。マツノザイセンチュウと同様のアプローチにより、これまでに3種類の候補物質を絞り込んだ。走化性検定によりこのうちの1つが雄を有意に誘引することが明らかになった。*C. elegans* を用いた行動遺伝学的研究により、雄特異的ニューロンである CEM を介してこの揮発性性フェロモンを受容していることが明らかとなった。

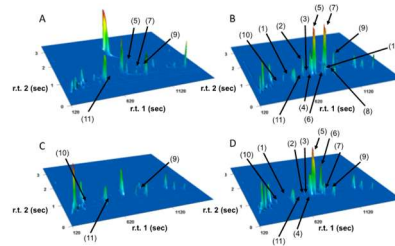


図3. 3次元ガスクロマトグラム
(A) (C) 雄を誘引しない雌から生じる匂い物質
(B) (D) 雄を誘引する雌から生じる匂い物質

研究テーマD「ネコブセンチュウ性転換を誘導する化合物の探索」

線虫性比に影響を与える化合物を探索する目的で、ケミカルスクリーニングを行なった。まずオキナワザイセンチュウを用いて 1st スクリーニングを行い、1,800 化合物の試験が終了した。死亡、行動異常などの表現型異常を引き起こす化合物は複数確認できたが、性比に影響を及ぼす化合物は確認できなかった。その後、オキナワザイセンチュウで表現型異常を引き起こした 96 化合物のネコブセンチュウに対する活性を評価した。その結果、両種に共通して死亡、行動異常を引き起こす化合物が複数確認できた。これらの中には新たな殺線虫農薬として期待できるものも存在するため、特許申請および実用化に向けた企業との共同研究を検討している。

研究テーマE「植物寄生性線虫における表現型可塑性」

植物寄生性線虫は、宿主植物に侵入後その環境に適した形や性質に変化することで宿主環境に適応すると考えられている。マツノザイセンチュウはマツ枯れの病原体であり、樹木の中でマツの生細胞や糸状菌を餌として生息する。餌の種類の違いにより、線虫にどのような変化が起こるかを理解するために、透過型電子顕微鏡を用いてマツに侵入した際の線虫の形態変化を微細構造レベルで調査した。その結果、マツに侵入したマツノザイセンチュウが、樹体内の三次元的な移動に適した形態へと変化していることが明らかとなった。この変化は宿主マツの防御応答を回避することに貢献すると考えられる。また、線虫が宿主マツに寄生した際に、腸の微絨毛が著しく萎縮することも確認し、この形態可塑性はマツノザイセンチュウの寄生戦略の1つであると考えられる。(Ekino et al., 2020 Scientific Reports)

3. 今後の展開

研究テーマA「ネコブセンチュウ性転換を誘導する刺激の探索」

今後は、シロイヌナズナーネコブセンチュウ感染系を用いて、雄線虫出現を誘導する変異体の探索を継続する。また、およそ200株の野生型のシロイヌナズナにおける雄線虫出現率も調べることで、ネコブセンチュウ性転換を誘導する宿主植物側の鍵物質を特定することを目指す。

研究テーマB「性決定遺伝子の同定」

オキナワザイセンチュウで同定できた性決定関連遺伝子について、ネコブセンチュウホモログの機能を精査する。ネコブセンチュウ性決定遺伝子機能阻害により多くの雄を生じさせることができればネコブセンチュウの増殖および植物加害を減少させることができる可能性がある。

研究テーマC「線虫揮発性性フェロモンの同定」

同定できたフェロモン物質およびその受容体阻害剤を用いた新たな防除手法の確立を目指して取り組んでいく。

4. 自己評価

研究目的の達成状況： 研究開始時の期間内達成目標は線虫性決定に関与する宿主植物由来シグナルを明らかにすること、そして線虫性決定メカニズムを明らかにすることであった。ネコブセンチュウにおいて低照度の光が雄を高頻度で誘導することを明らかにできた。さらに、糖輸送関連遺伝子変異体やデンプンを蓄積できない変異体において雄比が高くなることを明らかにした。期間内に線虫性決定に関与する宿主植物由来シグナルの特定には到っていないが、ここで得た結果は、糖などの光合成産物が線虫性決定のトリガーとなっていることを示唆する。また、植物寄生線虫性決定メカニズムに関しては、目標通り性決定に関与する遺伝子を複数同定することに成功した。これは菌食・植物食性線虫グループで初めての性決定遺伝子同定例であり、今回構築したモデル実験系は今後植物寄生性線虫において性決定・生殖分子メカニズムを解明していく上で大いに利用されることが期待できる。また、当初の計画にはなかったが想定を遥かに上回る進展を見せたのが、線虫フェロモンの研究であった。これまで揮発性の性フェロモンは存在は知られていたものの、長年物質の同定に成功していなかった。今回既知のフェロモンとは全く異なる新しいタイプの性フェロモンを同定できたことは大きな価値があると考えている。期間内において、本さがけ領域内の研究者との共同研究を複数行うことができ、その中で新たな殺線虫農薬の候補物質が見出された。以上、当初の研究目標の中で未達成の課題もあるが、本さがけ研究を通じて知り合った気鋭の研究者らと共同研究をスタートし、想定以上の成果や今後の発展につながるシーズが得られたと言える。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、その期間には雄が誘導する巨大細胞は雌に比べ有意に小さいことを示すとともに、ネコブセンチュウの RNA-seq データを取得することができた。以上のように延長期間中に予定していた計画に関しては、大部分を実施することができ、今後の研究の発展につながるデータを取得することができた。

研究の進め方： 海外からの帰国および研究室立ち上げとほぼ同時期に本課題研究がスタートした。プロジェクト開始当初は研究機器も人材も十分ではなく、計画通りに進まないことが多かった。しかしながら、研究費のサポートにより比較的速やかに体制を整備するとともに、2名の研究補助員を雇用することができたため研究遂行および研究室運営上とても助かった。また、領域会議において領域内アドバイザーからの的確な指摘や新たな研究者との出会いがあり、当初の計画とは異なる新たな方向へと研究が展開する機会が数多くあった。特に、これまでにほとんど接点のなかった植物科学や化学を専門とする研究者と新たな共同研究を開始できたことが今後の研究においても貴重な機会となったと考えている。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果： 期間内には 9 報の関連論文を出版したが、これらは本課題研究で得られた成果の一部であり、成果の多くは未だ論文化にいたっておらず、社会へ還元できていない。現在投稿中および投稿準備中の論文が複数あるので、一刻も早く論文化に結びつけたい。また、研究内で見出した新規殺線虫化合物に関してはすでに知財担当者や農薬企業との打ち合わせ段階に入っている。本研究で提案した、線虫性比のコントロールによる防除、フェロモン受容阻害による防除と合わせて今後化学技術および社会・経済に貢献していきたい。これらの技術が結実した際には、これまでとは全く異なる環境負荷低

減型の線虫防除手法となり、世界の農林業における線虫被害の低減に貢献できると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:9件

1. Ekino T, Kirino H, Kanzaki N, Shinya R [#] . [#] Corresponding author Ultrastructural plasticity in the plant-parasitic nematode, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> . <i>Scientific Reports</i> , 10 Article number: 11576 (2020)	植物寄生性線虫であるマツノザイセンチュウが宿主であるマツ樹体内環境に適応し、感染後速やかに形態を変化させることでマツ防御応答を回避することを示した。
2. Kirino H, Yoshimoto K, Shinya R [#] . [#] Corresponding author Thaumatococin-like proteins and a cysteine protease inhibitor secreted by the pine wood nematode <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> induce cell death in <i>Nicotiana benthamiana</i> . <i>PLoS ONE</i> , 15(10) e0241613 (2020)	植物寄生性線虫であるマツノザイセンチュウが分泌する Thaumatococin-like proteins and a cysteine protease inhibitor をタバコに一過的に発現させることで、過敏細胞死を引き起こすことを明らかにした。これらの分子のアミノ酸配列は、植物が所有する PR タンパク質に類似性が高いため、分子擬態により宿主防御応答が制御されている可能性を示した。
3. Shih PY*, Lee JS*, Shinya R [*] , Kanzaki N, Pires-da Silva A, Badroos MJ, Goetz E, Sapir A, Sternberg PW. [*] Co-first authors Newly identified nematodes from Mono Lake exhibit extreme arsenic resistance. <i>Current Biology</i> , 29(19): 3339–3344 (2019)	ヒ素に耐性を持つ線虫を米国のモノ湖から発見した。モノ湖は通常生物にとって有毒であるヒ素を豊富に含むことで知られている。モノ湖から分離された線虫は人間の約 500 倍に相当する高いヒ素耐性を持つことが明らかになり、その耐性メカニズムの一端を明らかにした。ヒ素による農作物汚染は世界的な問題となっており、本線虫をヒ素汚染土壌に処理することでヒ素汚染土壌浄化を行える可能性を示唆した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 桐野巴瑠, 新屋良治[#]. [#]責任著者
マツ枯れの発病メカニズム解明に向けた研究最前線と将来展望.
森林遺伝育種. (2021) 10: 14–19.
2. 新屋良治. “センチュウはどんな虫?” やさい畑 Pp. 86–91 (2019, 秋号)
3. Shinya R, Kikuchi T, Sternberg PW. “*Bursaphelenchus okinawaensis*: a genetically tractable system for the study of evo-devo and plant-parasitic nematodes” (selected for workshop speaker) 22nd International *C. elegans* Conference. Los Angeles, CA, USA

(June, 2019)

4. 新屋良治. “ネクストリーダー賞(線虫研究の未来を創る会)” 2018 年 8 月
5. “極限環境の湖からヒトの 500 倍のヒ素耐性を持つ線虫を発見 ～極限環境生物の適応メカニズムを解明する糸口に” 2019 年 9 月 30 日(プレスリリース)