

速報

リュウキュウマツ実生苗における マツノザイセンチュウの増殖と PR 遺伝子群の応答^{*1}

山口莉未^{*2}・桑江喬也^{*3}・伊藤貫太^{*3}・玉城雅範^{*4}・渡辺敦史^{*5}

山口莉未・桑江喬也・伊藤貫太・玉城雅範・渡辺敦史：リュウキュウマツ実生苗におけるマツノザイセンチュウの増殖と PR 遺伝子群の応答 九州森林研究 72：95－98, 2019 マツノザイセンチュウに感染したクロマツ樹体内では、線虫頭数の急速な増加に伴う自らの過剰な防御反応によって枯損に至るといふ仮説が提示されている。しかし、リュウキュウマツ樹体内における線虫の増殖過程やマツの防御反応については不明であった。本研究では、リュウキュウマツ実生苗に線虫を感染させ、樹体内の線虫頭数と植物の防御反応に関連する PR 遺伝子群の発現をそれぞれ経時的に評価した。感染初期において、リュウキュウマツでは少数の線虫に対して PR 遺伝子群が発現誘導されていたが、その強度は先行研究のクロマツの結果と比較すると低い傾向にあった。その後、線虫が爆発的に増殖した個体では PR 遺伝子群の顕著な発現上昇が認められたが、クロマツの結果と比較すると増加した線虫頭数は個体間でばらつきが大きい傾向を示した。これらの結果は、リュウキュウマツがクロマツとは異なる防御メカニズムを有する可能性を示唆している。

キーワード：リュウキュウマツ、マツノザイセンチュウ、遺伝子発現

I. はじめに

マツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ、*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle (以下、線虫) によって引き起こされる我が国最大の樹病である。本病の病徴進展過程は、樹体内に少数の線虫が分布し、内部の病徴進展が線虫侵入部位近傍に限定される「感染初期」と、爆発的な線虫頭数の増加に伴い樹体全体に病徴が顕れる「病徴進展期」の2つのステージに分類されることが報告されている (Fukuda, 1997)。

病徴進展期に移行する要因として、線虫に対してマツ樹体内で産生される防御物質が、線虫の増殖を抑制できない結果として生じる過剰な防御反応が示唆されてきた (二井, 1984; Myers, 1988)。Hirao *et al.* (2012) は、クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) の抵抗性および感受性クローンに線虫を感染させた結果、植物の防御反応に関連する感染特異的 (pathogenesis-related, PR) 遺伝子群の発現が感受性クローンにおいてより速やかに高レベルで誘導されることを明らかにした。さらに、これらの遺伝子群の発現は、線虫頭数の急速な増加に伴って樹体全体で高レベルで誘導される (Yamaguchi *et al.*, 投稿中) ことから、遺伝子発現レベルからも本仮説は支持された。しかし、本病に感受性を示すタイワンアカマツ (*P. massoniana* Lamb.) の抵抗性および感受性クローンを対象として網羅的遺伝子発現解析を行った結果、PR 遺伝子群の発現誘導に特定の傾向は認められなかったことから、樹種間で本病に対する防御メカニズムは異なる可能性が示唆されている (Liu *et al.*, 2017)。

南西諸島全域に自生するリュウキュウマツ (*P. luchuensis*

Mayr) も線虫に対して感受性を示すため、防除対策の一つとして抵抗性リュウキュウマツの育種に関する研究が行われている (中平・倉本, 2006; 酒井, 2010; 玉城・酒井, 2016)。しかし、樹体内の線虫挙動に対する防御反応については不明である。本研究では、リアルタイム PCR を用いてリュウキュウマツ樹体内での線虫頭数とマツの PR 遺伝子群の発現をそれぞれ経時的かつ定量的に評価し、クロマツで認められた結果 (Yamaguchi *et al.*, 投稿中) と比較することで、リュウキュウマツがクロマツと異なる防御メカニズムを有する可能性について検証した。

II. 材料と方法

2-1. 病徴進展の評価

供試苗は、森林総合研究所林木育種センター九州育種場 (熊本県合志市須屋) 内の苗畑で播種および育苗し、2018年1月に九州大学箱崎キャンパス (福岡県福岡市東区箱崎) 内でビニールポットへ移植したリュウキュウマツ2年生実生苗16個体 (平均苗高 32.0 ± 12.3 cm) を使用した。線虫 (Ka4 アイソレイト) は、*Botrytis cinerea* 上で培養後、ベールマン法により分離し、50 μ L あたり 10,000 頭に調整した。

2018年7月13日に九州大学箱崎キャンパス内の圃場において、各苗の地際から約5cmの部分に線虫懸濁液50 μ L を接種した。接種後、46日目まで3~4日おきに病徴を5段階で評価 (0: 異常なし, 1: 針葉の下垂, 2: 針葉の変色, 3: 部分枯れ, 4: 枯損) した。試験期間中の野外の平均気温は 30.1 $^{\circ}$ C であり (気象庁, 2018), 灌水は毎日十分に行った。

^{*1} Yamaguchi, R., Kuwae, T., Ito, K., Tamashiro, M. and Watanabe, A.: Multiplication of pine wood nematode and response of pathogenesis-related genes in *Pinus luchuensis* Mayr seedlings.

^{*2} 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sci. Biores. and Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka, 819-0395, Japan

^{*3} 九州大学農学部 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka, 819-0395, Japan

^{*4} 沖縄県森林資源研究センター Okinawa Pref. Forest Resources Res. Ctr., Nago, Okinawa 905-0012, Japan

^{*5} 九州大学大学院農学研究院 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka, 819-0395, Japan

2-2. リュウキュウマツ樹体内での線虫頭数と PR 遺伝子群の発現の評価

2-2-1. 供試材料と線虫接種

供試苗は、2-1 と同様で育成したリュウキュウマツ 2 年生実生苗（奄美 06）16 個体（平均苗高 20.0 ± 3.2 cm）を使用した。2018 年 7 月 24 日に九州大学箱崎キャンパス内の圃場において、12 個体に対し 50 μ L あたり 10,000 頭に調整した線虫（Ka4 アイソレイト）懸濁液を各苗の地際から約 5 cm の部分に接種した。同様に、対照として 4 個体に蒸留水を接種した。接種後 1・7・14・21 日目（days post inoculation, DPI）に、線虫を接種した 3 個体と水を接種した 1 個体をそれぞれ接種箇所下部から採取し（図-1）、液体窒素中で凍結させ、 -80°C で保存した。採取した個体についての情報は表-1 に示した。試験期間中の野外の平均気温は 30.2°C であり（気象庁, 2018）、灌水は毎日十分に行った。

2-2-2. リュウキュウマツ樹体内における線虫頭数の評価

線虫を接種した個体の接種箇所上部 0.1 g（約 2~4 cm）から、Yamaguchi *et al.*（投稿中）の手法に従って DNA を抽出し、StepOnePlus Real-time PCR System（Applied Biosystems, USA）を用いて TaqMan quantitative real-time PCR（qPCR）法による線虫の頭数測定に供試した。検量線は、線虫 1~10,000 頭の範囲で作成されたものを使用し、マーカーは *topoisomerase I*（Huang *et al.*, 2010）を使用した。リアルタイム PCR による測定は、各サンプルにつき 3 反復設けた。

2-2-3. リュウキュウマツ樹体内における PR 遺伝子群の発現解析

DNA を抽出した箇所の上部 0.1 g（約 2~4 cm）から、Yamaguchi *et al.*（投稿中）の手法に従って RNA を抽出後、cDNA の合成を行い、quantitative real-time reverse transcription PCR 法により PR 遺伝子群の発現解析を行った。14 DPI の個体 I と III、21 DPI の個体 III は材が変色しており（表-1）、RNA を抽出出来なかったため以後の解析から除外した。マーカーには Yamaguchi *et al.*（投稿中）の報告で使用された PR-2、PR-5、PR-6（Hirao *et al.*, 2012）を用いた。内在性コントロールは *elongation factor 1-alpha*（Hirao *et al.*, 2012）を用いた。使用した全てのマーカーは、事前にリュウキュウマツの cDNA を用いて増幅効率の確認を行った。リアルタイム PCR による測定は、各サンプルにつき 3 反復設けた。遺伝子の相対発現量について、各時点における水接種に対する線虫接種したサンプルの発現量を $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法（Livak and Schmittgen, 2001）によって算出した。

2-2-4. データ解析

解析には、R version 3.4.3（R Core Team, 2017）を用いた。リアルタイム PCR によって算出された線虫頭数と PR 遺伝子群の相対発現量の平均値（各サンプルについて 3 回の反復測定の平均値）はそれぞれ $\log_{10}(x+1)$ に変換され、各サンプルにおける線虫頭数と PR 遺伝子の相対発現量間のピアソンの積率相関係数を算出した。

表-1. 線虫頭数と PR 遺伝子群の発現の評価に用いた材料

接種源	DPI	個体番号	苗高 (cm)	地際直径 (mm)	病徴*
線虫	1	I	15.0	1.8	-
		II	19.5	4.0	-
		III	21.0	3.2	-
	7	I	16.0	3.3	-
		II	18.5	3.2	-
		III	21.5	2.5	-
	14	I	16.0	3.7	+
		II	19.0	3.3	-
		III	20.0	4.0	+
21	I	17.5	4.7	-	
	II	19.0	3.7	-	
	III	20.5	2.7	+	
蒸留水	1	-	23.0	3.0	-
	7	-	25.5	3.2	-
	14	-	27.0	4.2	-
	21	-	21.5	3.8	-

*健全個体を -、針葉や材の変色などが確認された個体を + でそれぞれ示す。

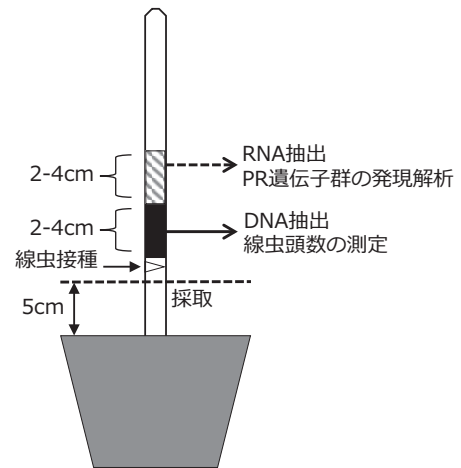


図-1. 線虫接種箇所およびサンプル採取箇所

III. 結果

3-1. 病徴進展の評価

線虫感染後のリュウキュウマツの病徴進展を評価した結果を図-2 に示した。11 DPI に初めて病徴を示す個体が確認された。14 DPI 以降、病徴を示す個体は急激に増加し、32 DPI には全ての個体が病徴を示した。46 DPI には約 60% の個体が枯損に至った。

3-2-1. リュウキュウマツ樹体内における線虫頭数の評価

1・7・14・21 DPI に接種箇所上部（図-1）から抽出した DNA を利用し、TaqMan qPCR 法によって検出された線虫頭数を表-2 に示した。樹体内の線虫頭数は個体間で大きくばらついており、時間経過に伴う特定の傾向は認められなかった。線虫頭数は 7 DPI の個体 I で最も多く約 1,300 頭が検出され、21 DPI の個体 I では検出されなかった。

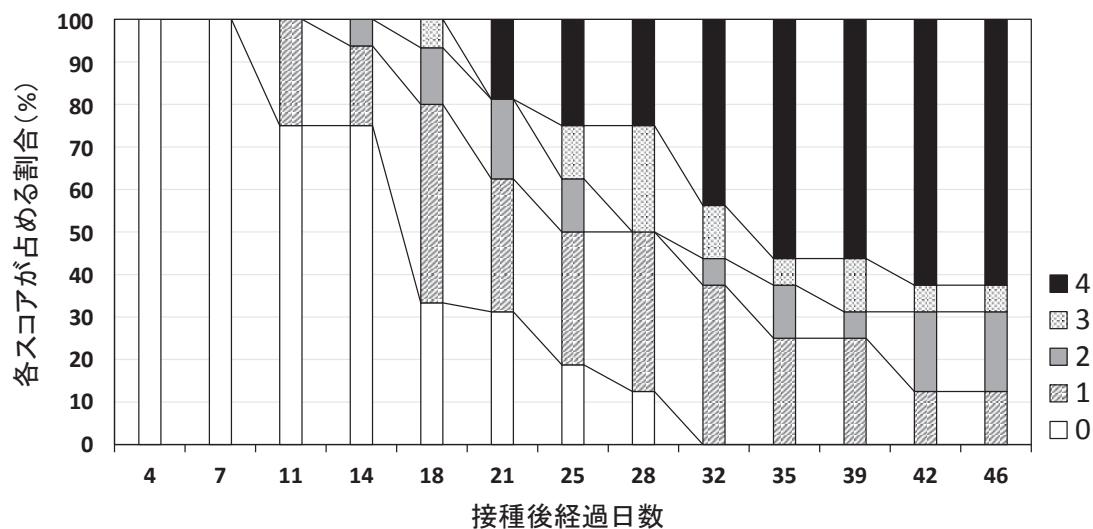


図-2. リュウキュウマツの病徴進展

各接種後経過日数における病徴を5段階（0：異常なし，1：針葉の下垂，2：針葉の変色，3：部分枯れ，4：枯損）で評価した結果を示す。

表-2. 線虫頭数と PR 遺伝子群の相対発現量

DPI	個体番号	線虫頭数 (/0.1g)	PR-2	PR-5	PR-6
1	I	142 ± 15	7.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
	II	53 ± 1	168.7 ± 9.1	31.3 ± 3.4	3.5 ± 0.3
	III	29 ± 1	164.8 ± 9.5	35.6 ± 4.0	1.6 ± 0.1
7	I	1341 ± 58	5370.3 ± 73.0	16455.0 ± 677.0	4878.6 ± 168.8
	II	25 ± 3	14.1 ± 0.9	13.2 ± 1.6	3.7 ± 0.3
	III	90 ± 16	168.9 ± 5.4	61.7 ± 7.3	12.7 ± 0.8
14	I	347 ± 21	-	-	-
	II	222 ± 37	242.0 ± 6.0	9.5 ± 1.2	19603.7 ± 567.0
	III	483 ± 99	-	-	-
21	I	0	0.7 ± 0.0	5.3 ± 0.4	46.5 ± 10.2
	II	348 ± 33	338.6 ± 8.2	666.6 ± 33.7	9226.7 ± 634.9
	III	239 ± 4	-	-	-

各値はリアルタイム PCR で算出された値の平均値 ± 標準偏差 (n=3) を示している。PR 遺伝子群の発現量は、各時点の水接種に対する相対発現量を示す。

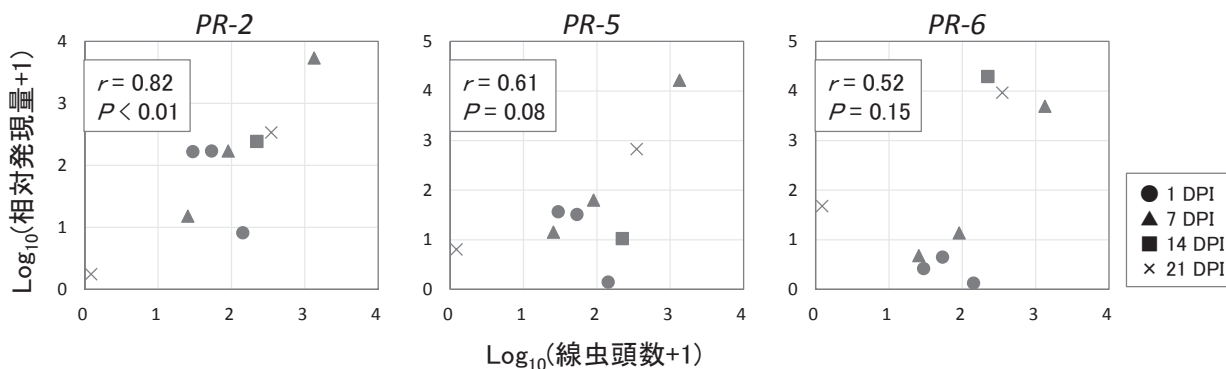


図-3. 線虫頭数と PR 遺伝子群の相対発現量との関連性

各接種後経過日数 (day post inoculation, DPI) における、線虫頭数と PR 遺伝子群の相対発現量の散布図および相関係数 (r) を示す。

3-2-2. リュウキュウマツ樹体内における PR 遺伝子群の発現解析

線虫頭数測定を行った箇所の上部 (図-1) における PR-2, PR-5, PR-6 の各時点の水接種に対する相対発現量を表-2 に示した。1 DPI では、個体Ⅱ・Ⅲにおいて PR-2, PR-5 の発現量はそれぞれ約 160 倍、約 30 倍と増加していた。7 DPI 以降の発現量は、個体と遺伝子間において大きく異なっており、7 DPI の個体Ⅰで各遺伝子の相対発現量は数千～数万倍と顕著な増加が認められた。

3-2-3. リュウキュウマツ樹体内における線虫頭数と PR 遺伝子群の発現との関連性

対数変換した線虫頭数と PR 遺伝子群の発現量の散布図と相関係数 (r) を図-3 に示した。線虫頭数と PR-2 の発現量間には強い正の相関が認められた ($r = 0.82$, $P < 0.01$)。その一方で、PR-5 および PR-6 では有意とはならなかったが、得られた相関係数はそれぞれ $r = 0.61$ ($P = 0.08$) と $r = 0.52$ ($P = 0.15$) であった。

IV. 考察

Yamaguchi *et al.* (投稿中) の報告では、クロマツ 2 年生実生苗に線虫 (Ka4 アイソレイト) を接種し、時間経過に伴う樹体内の線虫頭数と PR 遺伝子群 (PR-2, PR-5, PR-6) の発現量を定量的に評価している。試験に供試したクロマツの苗高 (21.7 ± 3.5 cm) や試験期間中の気温 (平均 29.8℃) については、リュウキュウマツ樹体内における線虫頭数と PR 遺伝子群の発現量の評価を行った本研究とほぼ同じ条件であった。

本研究では、1 DPI において、樹体内の線虫頭数は 30~140 頭程度であり、それに対して PR 遺伝子群の発現レベルは数倍~160 倍程度に増加していた (表-2)。Yamaguchi *et al.* (投稿中) の報告では、クロマツ苗の接種箇所近傍における 0.1 g あたりの線虫頭数は本研究におけるリュウキュウマツの結果と同程度であり、PR 遺伝子群の発現レベルは数十~数千倍に増加していた。したがって、クロマツの結果と比較すると、リュウキュウマツにおいても線虫侵入後、速やかに遺伝子発現レベルで防御反応が誘導されているが、その強度はクロマツほど顕著にはならない可能性がある。

クロマツを対象とした試験では、7 DPI に分析した個体の全て ($n=5$) の接種箇所近傍において数百~千頭程度の線虫が検出され、PR 遺伝子群の発現レベルも全個体において数千~数万倍に

増加した後、14 DPI には枯損に至ったことが報告されている。さらに、線虫頭数と PR 遺伝子群の発現量間に正の相関がある可能性が示されている (Yamaguchi *et al.*, 投稿中)。本研究では 7 DPI 以降、線虫頭数と PR 遺伝子群の発現レベルは接種後経過日数に関わらず、個体間でばらつきが生じていた (表-2)。しかし、線虫頭数が多く検出された個体において、PR 遺伝子群の発現量は大きくなる傾向にあった (図-3)。本結果は、リュウキュウマツにおいても線虫頭数が爆発的に増加することで防御反応が顕著となり枯損に至る可能性があることを示唆するものである。さらに、リュウキュウマツ 16 個体の病徴進展を評価した結果、14 DPI では 25% の個体のみ外部病徴が認められた (図-2) ことを併せて考慮すれば、リュウキュウマツはクロマツとは異なる防御メカニズムを有しており、早い段階での線虫頭数の顕著な増加を抑制する防御応答が作用している可能性がある。今後、リュウキュウマツのマツ材線虫病に対する防御メカニズムについて理解を深めるためには、より多くの個体を対象として樹体内における線虫の移動・増殖を評価するとともに、他の感受性樹種でも実施されている網羅的遺伝子発現解析が必要であると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、JSPS 科研費 16 K 07780 の助成によって行われた。

引用文献

- Fukuda K (1997) J For Res 2 : 171 - 181
 二井一禎 (1984) 95 回日林論 : 473 - 474
 Hirao *et al.* (2012) BMC Plant Biol 12 : 13
 Huang *et al.* (2010) Eur J Plant Pathol 127 : 89 - 98
 気象庁 (2018) 気象庁ホームページ,
<http://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>,
 参照 2018-07-24~08-14 (2018 年 9 月 20 日利用)
 Liu *et al.* (2017) Sci Rep 7 : 4693
 Livak and Schmittgen (2001) Methods 25 : 402 - 408
 Myers F (1988) J Nematol 20 : 236 - 244
 中平康子・倉本哲嗣 (2006) 沖林試研報 49 : 6 - 8
 R Core Team (2017) <https://www.R-project.org>
 酒井康子 (2010) 沖林試研報 53 : 5 - 9
 玉城雅範・酒井康子 (2016) 九州森林研究 69 : 187 - 188
 (2018 年 11 月 9 日受付 ; 2019 年 1 月 8 日受理)