

線虫の環境適応と植物感染機構に関する研究

新屋 良治 (明治大学農学部)

shinya@meiji.ac.jp

はじめに

線形動物（線虫）は、その個体数や多様性において最も繁栄した動物群の1つであり、多様な環境に普遍的に棲息する。海底、湖底、陸上には数多くの自由生活性線虫が棲息し、様々な動植物に寄生する線虫種も数多く存在する。線虫は如何にしてこれほど多様な環境に適応することができたのか？この疑問を明らかにするために、演者はこれまで植物寄生線虫と極限環境線虫に関する研究を進めてきた。本講演では、以下3つの研究について紹介する。

マツノザイセンチュウ宿主内環境への適応機構

日本国内では100年以上前から「マツ枯れ」による深刻な被害を受けている。マツ枯れとは、枯死を伴うマツ科樹木の感染症であり、マツノザイセンチュウと呼ばれる体調1mm以下の小さな寄生線虫によって引き起こされる。寄生線虫とマツ間の攻防を理解するためにこれまで多くの研究がなされてきたが、マツノザイセンチュウがどのようにしてマツ樹体内環境に適応し、病気を引き起こすのかに関しては未だ不明点が多く残されている。そこで演者は、マツノザイセンチュウのマツ樹への感染機構とマツ樹内における適応戦略を理解するために、生理及び形態レベルでの様々な研究を行ってきた。

まず、マツノザイセンチュウが宿主内で分泌するタンパク質の網羅的同定と特性の評価を行なった。寄生・病原性微生物の多くが、宿主防除応答を攪乱・回避するために、様々な分子を体外に分泌することが知られている。そこで演者はプロテオーム解析によって、宿主マツに侵入した後のマツノザイセンチュウが体表面に抗酸化酵素や解毒酵素を蓄積することを明らかにするとともに¹⁾、本線虫が体外に分泌する1,515種類の分泌タンパク質を同定した²⁾。この研究により、マツノザイセンチュウは他種寄生線虫種と比較して、ペプチダーゼや抗酸化・解毒酵素を数多く分泌していることが明らかになった。さらに、本線虫の分泌タンパク質には、ソーマチン様タンパク質など、アミノ酸配列が植物タンパク質に類似した分子（分子擬態候補分子）が含まれていた（図1）。

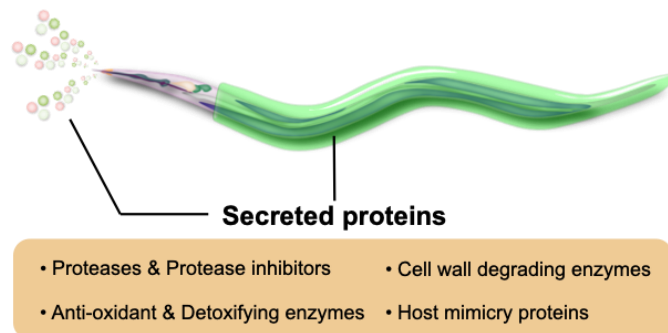


図1. マツノザイセンチュウの分泌タンパク質

上記研究により、マツノザイセンチュウにおいて特徴的な分泌タンパク質を明らかにできたため、続いて各分子の機能解析に取り組んだ。マツノザイセンチュウにおいて過酸化水素水処理した際に、抗酸化酵素の1つであるカタラーゼの遺伝子発現が顕著に上昇することを明らかにした。また、マツノザイセンチュウのカタラーゼ遺伝子をモデル線虫である *Caenorhabditis elegans* に発現させた結果、線虫の抗酸化耐性が顕著に上昇することを示し、本分子の抗酸化機能を証明した³⁾。マツノザイセンチュウ感染に伴い、宿主マツは活性酸素種を持続的に高レベルで生産することが知られており、このことが発病のきっかけになることが示唆されていることから、このカタラーゼ分子は宿主内環境適応に重要な分子であることが示唆される。また、分子擬態候補分子であるソーマチン様タンパク質や強病原力系統のマツノザイセンチュウが多く分泌する glycoside hydrolase family 30 に関しては、ベンサミアナタバコに一過的に発現させることで、宿主に細胞死を誘導することを明らかにした^{4,5)}。

次に、マツ感染時におけるマツノザイセンチュウの体構造レベルでの変化を明らかにするために、マツ細胞食ステージおよび菌食ステージの異なる条件下におけるマツノザイセンチュウにおいて、透過型電子顕微鏡を用いてマツノザイセンチュウの横断面の微細構造を観察した。その結果、菌食ステージと比べてマツ細胞食ステージのマツノザイセンチュウは、体表の左右を縦に走る側翼が大きく発達しており、腸の微絨毛は顕著に萎縮していることが明らかになった⁶⁾ (図2)。菌食ステージの側翼は平たく、滑らかな体表面をしているのに対し、マツ細胞食ステージの側翼はマッシュルーム型に大きく発達していた。この観察結果は、マツノザイセンチュウが生きたマツに侵入した際、側翼をマッシュルーム型に大きく発達させることで、より活発な運動を可能にすることを示唆する。マツノザイセンチュウはマツ侵入後、分子レベルでの変化だけでなく、側翼を発達させることで樹体内の三次元的な移動に適した形態へと戦略的に変化し、宿主の防御応答を回避することを明らかにした。

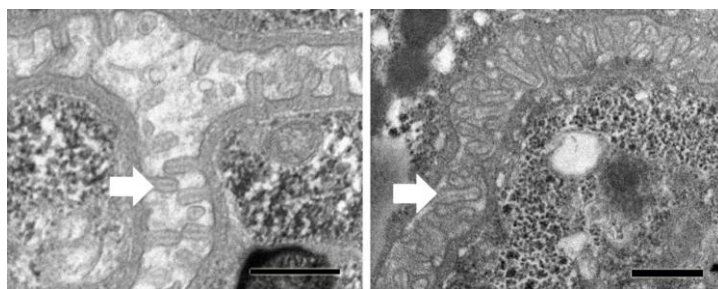


図2. マツ細胞食ステージの萎縮した腸微絨毛（左）と菌食ステージの発達した腸微絨毛（右）の電子顕微鏡像。白い矢印は腸微絨毛のひとつを示す。スケールバーは500 nm。

植物寄生線虫遺伝学モデル系の構築

マツ枯れの発病には、宿主マツに細胞死を引き起こすマツノザイセンチュウ由来分子が重要なだけでなく、樹体内分散能力、抗酸化能や増殖力など様々な要因が関係することが明らかになってきた。マツノザイセンチュウの感染機構をより詳細に理解することは新たな防除手法の確立のために重要であるが、そのためには遺伝学解析技術の確立が不可欠である。そ

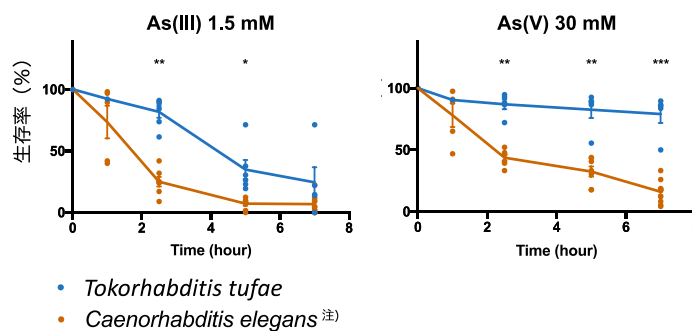
ここで、演者は 2012 年以降、マツノザイセンチュウの近縁種であるオキナワザイセンチュウ (*Bursaphelenchus okinawaensis*) においてゲノム情報や遺伝学基盤を整備し、マツノザイセンチュウの遺伝学モデルとして利用することを試みてきた。

オキナワザイセンチュウは 2008 年に単為生殖を行う新種の線虫として記載報告された。しかし、演者は本線虫の生殖様式をより詳細に調べることで、雌雄同体と雄の二性による繁殖様式を有することを明らかにした。この繁殖様式はモデル線虫 *Caenorhabditis elegans* と同じであり、順遺伝学的に変異体の分離が可能であることを示した⁷⁾。2020 年にはゲノム情報を整備するとともに、遺伝学解析に必要なリファレンス株の取得、SNP マーカーの整備を行った⁸⁾。今後、オキナワザイセンチュウをモデル材料として有効利用することで、マツ枯れのメカニズムのみならず、マツノザイセンチュウに関する様々な生物学的性質を、分子レベルの解像度で明確に理解することができるようになると期待できる。

高濃度ヒ素を含有する極限環境湖に棲息する線虫の発見と適応機構

極限環境生物に関する研究は、生物の環境適応機構を理解するために有用であるが、サンプリングや培養の難しさにより多細胞生物における研究報告は極めて限られている。多細胞動物の 1 つである線虫は、地球上の様々な環境へ進出しており、体のサイズも小さいため、環境適応機構を研究するための材料として適している。そこで、演者は高濃度のヒ素を含み、強アルカリ性塩湖であるモノ湖（米国カリフォルニア州）で棲息する線虫を探索した。モノ湖は生物の生存には極めて厳しい「極限環境」であるため、これまでに動物では 2 種のハエ（アルカリミギワバエ）とエビ（ブラインシュリンプ）しか棲息していないとされてきた。

演者はまず、モノ湖の異なる 3 地点において湖底の体積土壌や岸辺の土壌を採集して、土壌から線虫を分離し、形態観察および DNA 塩基配列解析により線虫種の推定を行った。その結果、本調査により確認できた線虫は 8 種であること、またその内の 5 種はこれまでに発見されていない未記載種であることを明らかにした。次に、モノ湖から採集された線虫の培養を試みたところ、1 種の線虫を実験室内で培養することに成功し、本線虫種のヒ素耐性能を調べた。その結果、モノ湖の線虫は人間の約 500 倍に相当する高いヒ素耐性を持つことが明らかになった（図 3）。また、他種線虫との遺伝子レベルでの比較解析から、高度ヒ素耐性は代謝関連酵素 DBT-1 における 1 アミノ酸変異によりもたら



注) *Caenorhabditis elegans* モデル生物として知られる線虫種で、通常土壌や果実などに生息する

図 3. ヒ素耐性アッセイ結果

されたことが示唆された⁹⁾ (Shih et al., 2019)。2021年には、本線虫種の分類学的記載を行い、本種を *Tokorhabditis tufae* として新属新種記載した¹⁰⁾。今回記載された *T. tufae* は、極限環境適応に加えて、胎生化の進化プロセスを理解するための優れたモデル実験系としても利用されることが期待される。

謝辞

本賞の受賞にあたり、明治大学農学部よりご推薦頂きました。竹本田持農学部長、半田高農学科長、糸山享准教授、大里修一准教授を始め関係者の皆様に深く感謝申し上げます。本講演で紹介する研究は、京都大学大学院農学研究科、中部大学応用生物学部、カリフォルニア工科大学、および明治大学農学部で行われました。京都大学の二井一禎名誉教授および植田充美教授、中部大学の長谷川浩一准教授、カリフォルニア工科大学の Paul W. Sternberg 教授には特に多くのご指導とサポートを賜りました。また、学生時代に研究の楽しさを感じるきっかけを与えてくださった帯広畜産大学の小池正徳教授にも深く感謝申し上げます。最後に、一連の研究の遂行上お世話になりました全ての共同研究者および研究室のスタッフ・学生の皆様にも厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Shinya R, Morisaka H, Takeuchi Y, Ueda M, Futai K. *Phytopathology* 100(12): 1289-1297. (2010)
- 2) Shinya R, Morisaka H, Kikuchi T, Takeuchi Y, Ueda M, Futai K. *PLoS ONE* 8(6): e67377. (2013)
- 3) Vicente CSL, Ikuyo Y, Shinya R, Mota M, Hasegawa K. *PLoS ONE* 10(4): e0123839. (2015)
- 4) Kirino H, Yoshimoto K, Shinya R. *PLoS ONE* 15(10) e0241613. (2020)
- 5) Shinya R, Kirino H, Morisaka H, Takeuchi-Kaneko Y, Futai K, Ueda M. *Frontiers in Plant Science*. 12: 640459. (2021)
- 6) Ekino T, Kirino H, Kanzaki N, Shinya R. *Scientific Reports* 10: 11576. (2020)
- 7) Shinya R, Hasegawa K, Chen A, Kanzaki N, Sternberg PW. *G3-Genes Genomes Genetics* 4(10): 1907-1917. (2014)
- 8) Sun S, Shinya R, Dayi M, Yoshida A, Sternberg PW, Kikuchi T. *Microbiology Resource Announcements* 9: e01000-20. (2020)
- 9) Shih PY†, Lee JS†, Shinya R†, Kanzaki N, Pires-da Silva A, Badroos MJ, Goetz E, Sapir A, Sternberg PW. *Current Biology* 29(19): 3339-3344. (2019) (†Co-first authors)
- 10) Kanzaki N, Yamashita T, Lee JS, Shih PY, Ragsdale EJ, Shinya R. *Scientific Reports* 11: 16470. (2021)