

氏名	たけもと しゅう へい 竹本 周平
学位(専攻分野)	博士 (農学)
学位記番号	農博 第 1626 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則 第 4 条 第 1 項 該当
研究科・専攻	農学研究科 地域環境科学専攻
学位論文題目	Studies on the virulence evolution of the pinewood nematode, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (マツノザイセンチュウ <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> の病原力の進化に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 二井 一 禎 教授 高藤 晃雄 教授 武田 博清

### 論 文 内 容 の 要 旨

マツノザイセンチュウは“マツ材線虫病”の病原体であり、マツ科樹種、とりわけクロマツやアカマツといった感受性のマツ属樹種に急激な萎凋症状を引き起こし、それらを枯死に至らしめる。本病は日本をはじめ、中国、韓国、台湾など東アジア地域のマツ林に甚大な被害をもたらしてきただけでなく、近年はヨーロッパのポルトガルにおいてもその発生が報告されており、被害拡大がグローバルな問題となっている。マツノザイセンチュウの病原力を制御することができれば本病の被害抑制に資する可能性があるが、そのためには病原力の進化過程を理解する必要がある。そこで本研究では、病原力の異なるマツノザイセンチュウアイソレイト間の浸透交雑に着目し、病原力多型の形成過程とその意義を明らかにした。論文は以下の4章よりなっている。

第1章では、マツノザイセンチュウ交雑集団中のアイソレイト特異的対立遺伝子頻度を推定する簡便法を確立した。はじめに、強病原力アイソレイトと弱病原力アイソレイトの線虫個体をさまざまな比率で混合したのち、それぞれに固有のヒートショック蛋白質 70A 遺伝子 (*hsp70A*) 断片の PCR-RFLP パターンを得た。続いて、それら各アイソレイトに特異的なバンドの相対強度の対数とそれら2系統の線虫の個体数比の対数とを用い回帰分析を行い、強い直線的関係を見出した。さらに、実際にこれらの回帰直線を利用し、実験集団における *hsp70A* 対立遺伝子の頻度の経時変化を調べた。観察された遺伝子頻度の変化は、超優性モデルでよく説明されることを示した。

第2章では、日本各地より集めたマツノザイセンチュウの29アイソレイトについて、*hsp70A* の PCR-RFLP パターンを調査し、このうち病原力のよく知られているアイソレイト、すなわち弱病原力アイソレイト2株と強病原力アイソレイト5株が、それぞれの病原力系統に固有の PCR-RFLP パターンを生じることを明らかにした。このことから、これらの異なる遺伝子マーカーは弱病原力系統および強病原力系統の祖先集団にそれぞれ典型的であったと結論した。また、残りの22株は殆どが強病原力系統に固有のパターンを示したが、強・弱の混合パターンを示すものが1株だけ見出された。さらに、かつて弱病原力アイソレイトが採取された関東地方の2地域で合計21の野外集団をサンプルし同様の方法で解析したところ、強病原力および弱病原力アイソレイトに典型的であった対立遺伝子を併せ持つ交雑集団がそれらの地域に普遍的に見出された。このような結果は、弱病原力系統が調査した地域のマツノザイセンチュウの遺伝子プールに一定の寄与をなしていたことを示唆するものである。

第3章では、実験的手法および数理的手法によりマツノザイセンチュウ集団間における病原力の進化の過程を明らかにした。まず、マツノザイセンチュウの強病原力アイソレイト (S10) と弱病原力アイソレイト (C14-5) を様々な混合比で培養した交雑集団を、クロマツ1年生および2年生苗に接種した。苗の枯死率は、接種源とした交雑集団内の強病原力アイソレイト (S10) に固有のヒートショック蛋白質 70A 対立遺伝子の頻度と正に相関し、集団の病原力がその遺伝的構成を反映することが確かめられた。従って、病原力の高い集団の選択は高い病原力そのものの選択とみなしてよいといえる。つぎに本線虫の伝染環を代数的にモデル化し、自然選択によって常に高い病原力と伝播率とが進化することを示した。一方、確率

過程を考慮した格子モデルによる解析では、線虫集団の平均病原力は病害の蔓延度に同調して振動した。全体としては、強病原力の進化と強病原力集団の絶滅とのバランスによって平均病原力は中程度に保たれることを明らかにした。これは、宿主個体群がまばらになると、強病原力の線虫集団は急速に除去されるが、弱病原力の集団は宿主個体群が再び増加するまで生き残った少数の宿主個体内で生きのびる可能性があるためだと考察した。本章で示した数理モデルの結果は野外のマツ林で病原力多型が見られる理由をよく説明するものである。

第4章では、実験的手法により、マツノザイセンチュウ集団内における病原力の進化の過程を究明した。まず、マツノザイセンチュウ強病原力アイソレート（S10）と弱病原力アイソレート（C14-5）を1：99の割合で混合して得られた交雑個体群を、クロマツ健全苗および熱湯で枯死させた苗へ接種した。前者および後者の苗から再分離された線虫集団各5株を、ここではそれぞれ「選択群」および「対照群」と呼ぶことにする。これらの再分離株をクロマツ3ヶ月生実生苗に接種したところ、枯死率に関しては群間に差がなかったが、苗への侵入率に関しては選択群が対照群にまさることが明らかになった。このことから、宿主への感染過程を通して、マツノザイセンチュウ集団内の個体間においては宿主マツへの高い侵入率が選択されるものと結論した。

### 論文審査の結果の要旨

“マツ材線虫病”（いわゆる“マツ枯れ”）の病原体であるマツノザイセンチュウには病原力の強い系統とほとんど病原力の無い系統が存在する事が知られている。また、それらは分子系統樹上では別のクレイドにグループ分けされることが報告されている。本論文ではこれら病原力の異なる二つの系統それぞれに固有の対立遺伝子に着目し、それらの頻度を推定する簡便な分子生物学的手法を実験個体群や野外個体群に応用することにより、これら二つの系統の浸透交雑を介した病原力の進化過程を検証するとともに、数理モデルを駆使することにより病原力の動向を考察したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. マツノザイセンチュウの交雑集団中に含まれる強病原力系統由来の対立遺伝子頻度と、弱病原力系統由来の対立遺伝子頻度を推定する簡便な実験方法を確立し、その信頼性を回帰分析により確認した。また、その方法を実験個体群に適用し、その実用性を証明した。

2. 日本各地から採集した29のマツノザイセンチュウアイソレートにここで開発した対立遺伝子頻度推定法を応用することにより、それらのうちの1系統が強病原力系統と弱病原力系統の交雑系統であることを明らかにした。さらに、この交雑系統が採取された地域から新たに多数の野外集団を採取し、それら野外集団の中に両系統の交雑比を異にする多様な個体群が存在することを証明した。このことは、マツノザイセンチュウの遺伝子プールにおいて、弱病原力系統の遺伝子が一定の寄与をしていることを示唆している。

3. 強病原力系統と弱病原力系統を様々な混合比で培養した場合、混合集団の病原力は混合集団に占める強病原力系統の構成比を反映していることを明らかにした。

4. 以上の調査結果や実験結果に基づき、本病の感染鎖を数理モデル化し、自然選択によりマツノザイセンチュウ集団内ではより強い病原力と、より高い伝播効率が進化することを示した。さらに、確率過程を考慮した格子モデルを用いることにより、生残りの宿主個体数に応じてマツノザイセンチュウの平均的な病原力が変動すること、つまり、本病の蔓延により宿主個体数が減少すると、強病原力の線虫個体群は集団から除かれるが、弱病原力系統は少数になった宿主個体に依存して生き残ることを予測した。

5. 強病原力系統と弱病原力系統の混合集団の宿主への侵入率が宿主への感染過程を経て上昇することを実験により証明した。また、この実験結果は数理モデルの一部を支持するものであった。

以上のように、本研究はマツノザイセンチュウの集団内に於ける病原力進化過程に考察を加えたのみならず、実験的な検証や数理モデルによる予測も交えた包括的な検証を行っており、その成果は微生物環境制御学、植物寄生線虫学、森林保護学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力

が十分あるものと認めた。