

論文の内容の要旨

森林科学 専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏 名 小松雅史

指導教員名 宝月岱造

論文題目 マツ材線虫病が引き起こす通水阻害における電解質漏出の意味

研究の背景・目的

マツ材線虫病 (Pine wilt disease) はマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, 以下, 線虫とする) によって引き起こされるマツ科樹木の萎凋病害である。線虫はマツノマダラカミキリ (*Monochamus alternatus* Hope) を媒介昆虫として枯死木から巧みなメカニズムによって健全木へと伝播・感染し, 枯死へといたらしめる。日本の代表的なマツ樹種であるクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) およびアカマツ (*P. densiflora* Sieb. et Zacc.) は侵入種であるマツノザイセンチュウに対し, 著しく感受性であり, 1979年に243万立方メートルのマツが枯損した。現在 (2005年) は年間約70万 m^3 のマツが枯損している。また, 韓国, 中国, 台湾などの極東地域での被害も問題となっているほか, ヨーロッパへの被害の拡大も危惧されており, 世界的な樹木病害に発展しつつある。マツ材線虫病の枯死機構に関する研究はマツノザイセンチュウが病原であることが発見された1969年以降現在まで40年間に渡って精力的に行われ, 感染した宿主においてどのような病徴を示すのかということについてはかなり明らかになっている。しかし, これらの観察された病徴間の因果関係については, いまだ解明されておらず, 特に, 線虫が細胞を変性させる要因や, 通水阻害の発生メカニズムは不明なままである。そこで, 本研究ではこうした現状の課題を踏まえた上で, (1) 線虫の動態を詳細にするためのツールの開発する, (2) 細胞の傷害と細胞死の関係を明らかにする, (3) 線虫の分布と細胞死の関係を明らかにする, (4) 変性と通水阻害の発生要因の関係を明らかにする, という目的のもとに実験を行うことで, 線虫の侵入から細胞の変性, そして通水阻害の発生という, 萎凋病であるマツ材線虫病のメインストリームとも言える病徴の流れを解明することを試みた。

マツノザイセンチュウの蛍光標識レクチンに対する染色性

マツノザイセンチュウの樹体内の動態を明らかにするにあたり, 樹体組織切片上の線虫を特異的に染め分ける方法が有効であると考えられた。そこで, 他の植物寄生性線虫において体表面に結合する性質があることが報告されている小麦胚芽レクチンの蛍光標識物であるF-WGAに着目し, F-WGAに対する線虫の染色性を調べた。その結果, (1)接種前に*Botrytis cinerea*で培養した線虫は陰門蓋や交

接刺などが、F-WGA に染まり体表面は染まらなかったが、クロマツポット苗に接種して、分離した線虫は体表面全体が F-WGA によって強く染まること、(2) 接種後の日数経過により染色率 (F-WGA に染まる線虫の割合) が高まる、(3) 接種点より離れた部位から分離された線虫個体群の染色率の方が高い、(4) 抵抗性の強いマツ苗や病原力の弱い線虫を用いると染色率が低くなる、(5) 熱処理や冷凍処理により死んだクロマツの枝に接種した線虫は F-WGA に染まらない、という結果が得られた。これより、マツノザイセンチュウの F-WGA 染色性は、宿主マツへの接種により獲得される性質で、接種後日数、接種点からの距離、宿主の抵抗性、線虫の病原力、宿主の生死、などの影響を受けることが示された。さらに、一度クロマツに接種して染色率が高い線虫個体群を再び接種すると接種 1 日後から 70% 以上の高い染色率が得られた。再接種を行った組織を固定し、作成した切片を F-WGA で染色したところ、組織切片内の線虫断片が特異的に蛍光染色されるのが観察された。こうした結果より、再接種の条件で F-WGA 染色を行う方法が樹体内の線虫動態の詳細を見るツールとして有効であることが示された。

マツ材線虫病における電解質漏出現象と細胞死

植物体はストレスに対し、その負荷の程度に応じて細胞膜の透過性を変化させる。本実験では、マツ材線虫病に感染したクロマツ組織の壊死過程における細胞膜の透過性の変化を調べるため、線虫を接種した当年生切り枝及び 3 年生苗の電解質漏出度と細胞核数を測定した。切り枝では、接種後 6 日から電解質の異常漏出が認められ、その後増大した。とくに木部では核数の減少より早い段階で異常漏出が引き起こされる傾向があった。一方、苗木では、電解質の異常漏出は部分枯れを示した接種枝のみで発生し、針葉の変色や著しい核数の減少とともに接種 30 日前後より急激に認められた。これらの結果から、電解質の異常漏出は材線虫病に関連して発生し、細胞死に先行、または同時に発生する現象であると考えられた。

また、樹皮片にも線虫を接種し、細胞死と電解質の関係を調べると共に、細胞核の変化を画像解析処理をおこなって追跡した。樹皮片においても細胞核数の減少に先立ち電解質の異常漏出が起こること、また細胞核数の減少は細胞核の分解によると思われる核サイズの減少を伴うことが明らかになった。

樹皮片におけるマツノザイセンチュウの分布と細胞死の関係

線虫の振る舞いが組織の壊死に及ぼす影響を明らかにするために、本研究により開発された F-WGA 染色法と DAPI 染色の二重染色を用いて樹皮片において線虫の分布と細胞死の分布を同時観察した。その結果、線虫の分布を中心として細胞死が発生するという症状は認められず、むしろ、線虫の分布に関係なく、樹皮片組織全体で一様に細胞死が進むという傾向が認められた。こうした結果から、樹皮片という数 mm~1cm 程度のサイズの組織においては、線虫の直接的な食害だけではなく、傷害を受けた植物や、線虫が分泌する物質などによる間接的な反応が強く影響しているのではないかと考えられた。

マツ材線虫病における樹液流への電解質漏出と表面張力の低下

線虫によって加害された細胞の変性が通水阻害を誘導するという仮説を検証するため、マツノザイセンチュウを接種したクロマツポット苗より加圧法により採取した樹液流の性質を調べた。その結果、マツ材線虫の病徴が進展し、針葉の萎凋が観察された苗から採取した樹液流において著しい電気伝導

度の高まりと、表面張力の低下が認められた。また、すべてのサンプルから採取した樹液流の電気伝導度の対数値と表面張力の間に負の相関があることがわかった。このことから、細胞からの電解質漏出現象は仮導管を流れる樹液流に影響を及ぼしていること、また樹液流の表面張力低下に、宿主マツ細胞からの漏出物が関与している可能性が示唆された。表面張力の低下は、植物の水分生理学において、キャビテーションを引き起こしやすくする一要因であると考えられており、マツ材線虫病においても、細胞の変性から誘導される表面張力の低下がキャビテーションを引き起こすという仮説を満たすこととなった。

まとめ

本研究では、マツ材線虫病における電解質漏出現象というものを傷害の指標として用いて研究を行った。そこから得られた結果およびこれまでの研究の蓄積より以下のような考察が示される。マツ樹体内に感染したマツノザイセンチュウは樹脂道を主な経路として全身へ分散し、その後各組織内へと侵入すると考えられる。そこで摂食活動を行うほか、線虫の分泌物や植物側の傷害に対する反応により、数ミリ程度にわたって細胞が変性する。その比較的早い段階において細胞膜の透過性が変化し、電解質が細胞外へと漏出する。細胞膜の透過性の変化は不可逆的な反応で、細胞核の分解および消失を伴い、細胞は死ぬ。また、細胞が線虫の影響により変性すると、細胞から隣接した仮導管へも物質が漏出し、その結果として樹液流の電気伝導度の高まりと表面張力の低下が引き起こされる。表面張力の低下はキャビテーションによる通水障害を引き起こす一要因と考えられており、マツ材線虫病においても、表面張力が通水障害の発生に関与しているのではないかという可能性が示唆された。

また、本研究では線虫の動態を見る方法の開発も行った。F-WGA を用いる染色法は有効なツールとなることが示された。そんな中、染色性を調べた結果、生育環境により線虫の表面構造が変化するという興味深い現象も得られた。同様の現象は、他の植物寄生性線虫においても認められており、寄生を成功させるために役立っているという説もある。今後はこうした染色性の変化の生理的な意義についても明らかにする必要があるだろう。