

# 学位論文要旨

氏名

鎌田 龍星

題目

日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統ならびに種特異性  
(Molecular phylogeny and species-specificity of Japanese entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria)

*Steinernema* 属および *Heterorhabditis* 属昆虫病原性線虫が示す高い殺虫活性は、*Xenorhabdus* 属および *Photorhabdus* 属の共生細菌に依存している。本研究では、日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統と両者の関係の特異性を明らかにするために系統解析と培養実験を進め、下記の知見を得た。

## 1. *Steinernema* 属線虫および *Xenorhabdus* 属細菌の分子系統と特異性

核のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の ITS 領域の塩基配列に基づく系統解析の結果、10 種の日本産 *Steinernema* 属線虫は 3 つのクレードに分けられ、そのうちの 1 つは 2 つのサブクレードに分けられた。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果、日本産 *Xenorhabdus* 属細菌は 4 つのクレードに分けられた。同種の線虫から分離された細菌はすべて同種であったが、別種の線虫から同種の細菌が分離される場合があった。両者の系統樹を比較した結果、一部の例を除いて、両者のクレード間で対応関係が認められ、両者は共種分化を遂げてきたことが推察された。

## 2. *Heterorhabditis* 属線虫および *Photorhabdus* 属細菌の分子系統と特異性

ミトコンドリア遺伝子の COI 領域の塩基配列に基づく系統解析の結果、日本産 *Heterorhabditis* 属線虫は *H. megidis* と *H. indica* に分かれた。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析により、日本産 *H. megidis* からは *P. temperata* のみが検出され、日本産 *H. indica* からは *P. luminescens* subsp. *akhurstii* または臨床分離株 *P. asymbiotica* の新亜種が検出された。両者の系統樹を比較した結果、系統間には対応関係が認められなかった。線虫と細菌の組み合わせを変えて二者培養実験を行った結果、*H. megidis* および *H. bacteriophora* は、*H. megidis* および *H. bacteriophora* の共生細菌と、*H. indica* は *H. indica* の共生細菌および *P. asymbiotica* の臨床分離株との間に共生関係を構築できることが示された。これらの結果から、*Heterorhabditis* 属線虫は複数種の *Photorhabdus* 属細菌と種特異的に共生関係を持つことが明らかになった。また、感染経路が未知であった臨床分離株の *P. asymbiotica* は、*H. indica* の共生細菌に由来することが示唆された。

本研究の結果、日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統および種特異性が明らかになり、両者の共進化ならびに共種分化の生物学的意義をさらに深く解明するための基礎が築かれた。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Ryusei Kuwata
題 目	Molecular phylogeny and species-specificity of Japanese entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria (日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統ならびに種特異性)

The pathogenicity of entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* depends largely on their symbiotic *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria, respectively. However the majority of domestic entomopathogenic nematodes in Japan has not been described, information on their symbiotic bacteria is limited, and no information is available on phylogeny and species-specific relationship of the two organisms. Aiming at a solution of molecular phylogeny and species-specific relationship between the nematodes and symbiotic bacteria, phylogenetic analyses and monoxenic culture experiments were conducted in the present study.

### 1. Molecular phylogeny and specificity of *Steinernema* and *Xenorhabdus*

Based on the DNA sequences of ITS region of nuclear rDNA, ten Japanese steinernematid nematode species were classified into three clades, one of them was further divided into two subclades. The Japanese *Xenorhabdus* bacteria were classified into four clades, based on the sequences of 16S rDNA. All species of the bacteria isolated from a single nematode species were the same, however, in some cases, the same bacterial species was isolated from different nematode species. With a few exceptions, the phylogenetic trees of Japanese *Steinernema* and *Xenorhabdus* showed good coincidence, being indicative of co-evolution of the two organisms.

### 2. Molecular phylogeny and specificity of *Heterorhabditis* and *Photorhabdus*

Based on the DNA sequences of the CO I region of mitochondria, Japanese heterorhabditid nematodes were divided into two species, *H. meigidis* and *H. indicica*. The 16S rDNA-based phylogenetic analyses indicated that the former species retained *P. temperata*, while the latter retained one of the two bacteria species, *P. luminescens* subsp. *akhurstii* and a new subspecies of *P. asymbiotica*. No clear relationships were detected in the molecular phylogeny of *Heterorhabditis* and *Photorhabdus*. The co-culture experiments of nematodes and bacteria in various combinations showed species-specific relationships of *H. meigidis* and *H. bacteria* with the bacteria *H. meigidis* and *H. bacteria*, respectively. There were specific relationships of *H. indicica* with its symbiotic bacteria and the clinical isolates of *P. asymbiotica*. These results indicated the mutualistic relationships of *Heterorhabditis* nematodes with several species of *Photorhabdus* bacteria in addition to a species-specific relationship. The discovery of *P. asymbiotica* from *H. indicica* indicates that the human-pathogenic bacterium, *P. asymbiotica*, could be originated from the symbiont of *H. indicica*.

A series of the present phylogenetic and pathological studies revealed a molecular phylogeny of Japanese *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes and the species-specific relationships with their symbiotic bacteria, leading to a better understanding of biological significance of co-evolution and co-speciation of the two organisms.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	鯨田龍星
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 近藤 栄 造
	副査 佐賀 大学 教授 鈴木 信 彦
	副査 鹿児島 大学 教授 津 田 勝 男
	副査 宮崎 大学 教授 上運天 博
	副査 佐賀 大学 教授 大 島 一 里
審査協力者	
題 目	日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統ならびに種特異性 (Molecular phylogeny and species-specificity of Japanese entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria)
<p>害虫防除に利用される <i>Steinernema</i> 属および <i>Heterorhabditis</i> 属の昆虫病原性線虫は、昆虫に対して高い殺虫活性を示し、その殺虫活性は、感染態3期幼虫が宿主昆虫の血体腔内に運び込む <i>Xenorhabdus</i> 属および <i>Photorhabdus</i> 属の共生細菌に依存している。しかし、わが国に棲息する昆虫病原性線虫には未記載種が多く、共生細菌に関する知見は乏しく、線虫と共生細菌の系統や両者の種特異的な関係には未知のことが多い。そこで、本研究では、日本産昆虫病原性線虫と共生細菌の分子系統と両者の間の種特異的な関係を明らかにすることを目的として、分子系統解析と培養実験を進めた。</p> <p>1 <i>Steinernema</i> 属線虫および <i>Xenorhabdus</i> 属細菌の分子系統と特異性</p> <p>国内の15道・都・県から分離された <i>Steinernema</i> 属線虫10種28分離株について、近隣結合法、最大節約法ならびに最尤法により分子系統を解析した。核のリボソームRNA (rRNA) 遺伝子のITS領域の塩基配列に基づく系統解析の結果、日本産 <i>Steinernema</i> 属線虫は3つのクレードに分けられ、そのうちの1つのクレードは2つのサブクレードに分けられた。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果、日本産 <i>Xenorhabdus</i> 属細菌は4つのクレードに分けられた。同種の線虫から分離された細菌の</p>	

種類はすべて同一であったが、別種の線虫から同種の細菌が分離される場合があった。日本産 *Steinernema* 属線虫と *Xenorhabdus* 属細菌の系統樹を比較した結果、一つの分離株 (MY7) を除いて、両者のクレード間に対応関係が認められたことから、両者は共種分化を遂げてきたと推察された。

## 2 *Heterorhabditis* 属線虫および *Photorhabdus* 属細菌の分子系統と特異性

国内9県および国外で分離された *Heterorhabditis* 属線虫3種18分離株について、分子系統を解析した。その結果、ミトコンドリア遺伝子の COI 領域の塩基配列に基づく系統解析の結果、日本産 *Heterorhabditis* 属線虫は *H. megidis* と *H. indica* に分かれた。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析により、*H. megidis* は *P. temperata* のみを保持し、*H. indica* は *P. luminescens* subsp. *akhurstii* または *P. asymbiotica* の新亜種を保持することが明らかになった。しかし、*Heterorhabditis* 属線虫と *Photorhabdus* 属細菌の分子系統樹の間に対応関係は認められなかった。そこで、線虫と細菌の間の親和性を明らかにするために、線虫と共生細菌の組み合わせを変えて二者共存培養を行った結果、*H. megidis* および *H. bacteriophora* は *H. megidis* および *H. bacteriophora* の共生細菌と、*H. indica* は *H. indica* の共生細菌および人体の罹患部位から分離された *P. asymbiotica* の臨床分離株との間に特異的な親和性が示された。ハチノスツズリガ (*Galleria mellonella*) の幼虫を宿主昆虫として線虫接種実験を行った結果、死亡幼虫の体色は *P. asymbiotica* の場合は青みを帯びた灰色、他の *Photorhabdus* 属細菌の場合は赤色を呈した。これらの結果から、*Heterorhabditis* 属線虫は、*Photorhabdus* 属細菌と種特異的な関係を有する一方で、*Photorhabdus* 属細菌の複数種と親和性を持つことが明らかになった。また、人体への感染経路が未知であった *P. asymbiotica* は、*H. indica* の共生細菌に由来することが示唆された。

以上のように、本研究は、日本産 *Steinernema* 属および *Heterorhabditis* 属線虫の分子系統と共生細菌との関係における特異性を明らかにし、両者の共進化ならびに共種分化の生物学的意義をさらに深く解明するための基礎を築くとともに、害虫防除手段としての昆虫病原性線虫の有効利用に資するものであり、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値があるものと認定した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	鯀 田 龍 星
審査委員	主査 佐賀 大学 教授 近 藤 栄 造
	副査 佐賀 大学 教授 鈴 木 信 彦
	副査 鹿児島 大学 教授 津 田 勝 男
	副査 宮崎 大学 教授 上 運 天 博
	副査 佐賀 大学 教授 大 島 一 里
審査協力者	
実施年月日	平成 19 年 1 月 18 日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;"><input checked="" type="checkbox"/> 口答・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成 19 年 1 月 18 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれの質問に対しても満足できる回答を得た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	鍬田龍星
-------------	------

【質問1】 実験に用いた昆虫病原性線虫 *Heterorhabditis indica* の分離場所はどこか。

【回答1】 千葉と沖縄である。本種は、USA とオーストラリアでも分離されているが、いずれの場合も海岸近くで分離されていることから、海流に乗って線虫が移動分散した可能性が考えられている。

【質問2】 PCR 産物の解析において、少数の塩基の違いを論じている部分があるが、系統を論じる上で十分な違いと言えるか。

【回答2】 塩基の違いは小さいが、ダイレクトシーケンスの結果に基づいて解析した結果、明瞭に区分されたので、系統を論じる上での問題はないと考える。

【質問3】 図 13 で四つのクレードに分かれたと述べているが、得られた数値データから判断すると、三つ目のクレードが支持されない可能性はないか。

【回答3】 三つ目のクレードについては値がやや小さいので、他の方法による詳細な分析が必要になるかも知れない。

【質問4】 三つの方法で線虫の分子系統を解析しているが、どの方法が最適と考えるか。

【回答4】 種レベルの解析を目的とした研究では、MP が最適と考える。

【質問5】 三つの方法で得られた系統樹が一致しているので問題はないと思うが、分析法により結果に違いが生じた場合、どのように考えるか。

【回答5】 系統樹の妥当性については、分析方法の特徴に基づいた検証が必要と考える。

【質問6】 線虫の地理的分布と分子系統解析で得られた結果との関係については、どのように考えるか。

【質問6】 16S に基づく系統解析は種間距離が離れている場合には有効とされているが、本研究では、線虫の地理的分布と分子系統で得られた結果との間には明瞭な関係は認められていない。現在、他の方法による検討を進めている。

【質問7】 MY 7 の場合だけ線虫と共生細菌の分子系統間に対応が認められていない理由は何か。

【回答7】 同一宿主に複数の線虫が感染することなどにより、細菌の置き換えが起きた可能性が高いと考える。このことについては、二者培養実験により、共生細菌の置き換えが可能であることを確認しているが、*Steinernema* 属に比べて *Heterorhabditis* 属の線虫は共生細菌の置き換えは難しい。

【質問8】 二者培養に用いた共生細菌の分離は、どのようにして行ったのか。

- 【回答 8】表面殺菌した感染態 3 期幼虫から、個体別に、共生細菌を分離した。
- 【質問 9】線虫には集団内変異があるため、標本数が少ないと偏りが出ると思うが、その点についてはどのように考えるか。
- 【回答 9】各調査対象地域から十分量の線虫を分離することは困難であるが、サンプル数を増やして、供試した線虫分離株が各地域における線虫集団を代表するものか否かについての検証が必要と考える。
- 【質問 10】各調査地における線虫密度は、どのようにして調べるのか。
- 【回答 10】ハチノスツズリガ幼虫に感染させる方法で土壌中に棲息する線虫を採集している。そのため、土壌中の線虫密度を正確には把握していない。
- 【質問 11】分与を受けた線虫を実験に用いているが、その理由は何か。線虫の分離自体が困難なためか。
- 【回答 11】ご指摘の通りである。本研究の目的は、線虫の分子系統の解析と、線虫と共生細菌の共進化について考察することにあるため、分与を受けた線虫を用いて解析を進めた。今後の研究においては、自分で採取した線虫を含めて、さらに検討を進めたい。
- 【質問 12】分子系統の解析に COI を用いているが、その理由は何か。
- 【回答 12】核の遺伝子よりミトコンドリアの遺伝子の方が変異の蓄積が多いと考え、プライマーを設計して、COI を用いた解析を行った。
- 【質問 13】線虫を無菌化すると、殺虫性は失われるのか。
- 【回答 13】*Heterorhabditis* 属線虫の場合、表面殺菌卵から孵化した幼虫を感染態幼虫まで無菌的に発育させることができないため、無菌線虫の病原性は確認していない。
- 【質問 14】*Photorhabdus asymbiotica* の人に対する病原性は確認されているか。
- 【回答 14】既知の *Photorhabdus asymbiotica* は患者から分離されたものであり、感染実験等による人への病原性の確認はまだ行われていない。
- 【質問 15】害虫防除を目的として、昆虫病原性線虫は市販されているのか。
- 【回答 15】数種 *Steinernema* 属線虫に加えて、一部の *Heterorhabditis* は市販されているが、*Heterorhabditis indica* は市販されていない。
- 【質問 16】昆虫病原性線虫の繁殖様式と共種分化の間に関係があると思うか。
- 【回答 16】第一世代の繁殖様式は、*Steinernema* 属は両性生殖、*Heterorhabditis* 属は単為生殖で、前者の方が後者より種類数は多いが、繁殖様式と共種分化との直接的な関係については、まだ説明できない。