

実験と数理モデリングを組み合わせた植物ウイルス研究

宮下 脩平 (東北大学 大学院農学研究科)

shuhei.miyashita.d7@tohoku.ac.jp

作物の病害は糸状菌や細菌、ウイルスといった病原体の感染により引き起こされる。そのうち植物ウイルスに対しては直接的に作用する農薬がなく、防除には特有の難しさがある。筆者らは実験と数理モデリングを組み合わせた研究により、植物ウイルス特有の生存戦略を明らかにするとともに、それを標的とする新しい防除技術開発に向けた研究を行ってきた。また植物がもつウイルス抵抗性遺伝子が集団抵抗性をもたらしている可能性を明らかにし、ウイルス抵抗性遺伝子の進化過程の理解を深めるとともに、その農業上の活用につながりうる知見を得た。これらについて紹介する。

1. 植物ウイルスの細胞間移行における小さい MOI の発見と、その意義

多くの植物ウイルスは植物の葉肉組織に感染し、感染細胞から隣接細胞にプラズモデスマータ (原形質連絡) を通って細胞間移行して感染を拡大する。各感染細胞では $10^6 \sim 10^7$ 分子のウイルスゲノム分子 (=ウイルス個体) が複製により作られ、その一部が隣接細胞に移行して複製を始めるが、どの程度の数のウイルスゲノム分子が隣接細胞で複製を開始しているのかは明らかではなかった。そこで筆者らは、ムギ萎縮ウイルスについてその数を推定した。ムギ類萎縮ウイルスのゲノムは RNA1 と RNA2 の 2 分節からなる。このうち RNA2 を蛍光タンパク質遺伝子である YFP (yellow fluorescent protein) 遺伝子と CFP (cyan fluorescent protein) 遺伝子でそれぞれ標識した誘導体 RNA2-YFP および RNA2-CFP を作製し、RNA1 とともにコムギおよび *Chenopodium quinoa* 葉に混合して接種して蛍光観察した (図 1a)。

その結果いずれの植物においても、RNA2-YFP と RNA2-CFP は混合感染した最初の細胞から細胞間移行を繰り返すにしたがって分離し、それぞれ単独感染した。この分離は、新しい細胞に感染するウイルスゲノム分子数が非常に小さいことにより、確率的に RNA2-YFP あるいは RNA2-CFP のみの細胞感染が起こることで生じるものと考えられた (図 1b)。そこで *C. quinoa* 葉での 1 回目と 2 回目の細胞間移行における分離の頻度を数値化して統計的に解析したところ、細胞に感染するウイルスゲノム分子数 (MOI: multiplicity of infection) は 1 回目の細胞間移行後で 5.97 ± 0.22 、2 回目の細胞間移行後では 5.02 ± 0.29 と推定された(1)。

このように小さい MOI での細胞感染は一見するとウイルスにとって不利なように思えるが、実は植物ウイルスの生存戦略上不可欠な現象であることが、数理モデルを用いたシミュレーションで明らかになった。ウイルスは宿主細胞内で遺伝子発現し、複製する。この際 RNA ウイルスでは特に複製時の変異率が高いため、細胞内に多様な配列をもつ変異体が生じるが、それらの遺伝子産物は一部

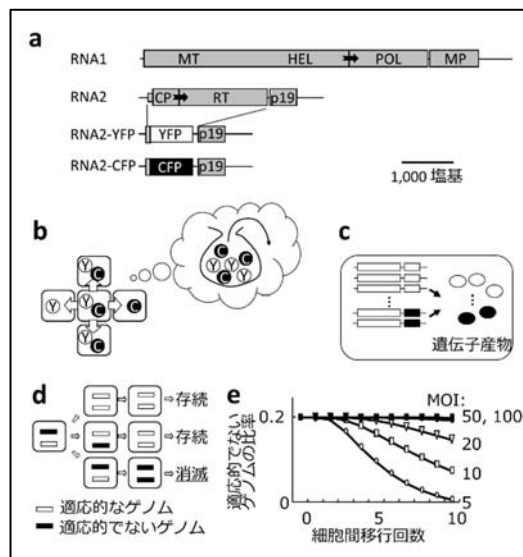


図1 植物ウイルスの細胞間移行における小さい MOI の発見と、ウイルス生存戦略上の意義のシミュレーションによる検討

の例外を除いて細胞内のウイルス集団で共有利用される (図 1c)。そのため適応的な変異をもつウイルスゲノム分子が複製時に偶然生じて、その分子は自らの遺伝子産物が他と共有されるため変異のメリットを享受できない。逆に、適応上不利な変異をもつウイルスゲノム分子は細胞内の他のウイルスゲノム分子由来の遺伝子産物を利用して生き残る可能性がある。これに対し小さい MOI での細胞感染は、適応上有利なウイルスゲノム分子と不利なウイルスゲノム分子を確率的に分離することで遺伝子産物の共有利用を制限し、選択を実現する可能性があると考えられた (図 1d)。そこで数理モデルを作成してシミュレーションしたところ、MOI が 5 の場合は迅速に選択が実現する一方、MOI が 50 や 100 の場合は選択がほとんど起こらないことが予測された (図 1e)。このことから、小さい MOI での細胞感染は植物ウイルスの生存戦略上不可欠な現象であることが示唆された(1)。

上述のシミュレーション結果を裏付けるように、それぞれ非分節、3 分節の RNA をゲノムとするトマトモザイクウイルス (ToMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV) のタバコ (*Nicotiana tabacum*)、*N. benthamiana* 感染においても細胞間移行後の MOI はそれぞれ 3.95 ± 0.27 、 5.72 ± 0.24 と共通して小さいことを明らかにしたほか(2, 3)、海外グループとの共同研究では一本鎖 DNA をゲノムとするトマト黄化葉巻ウイルスでも細胞感染における MOI が 2.60 ± 0.05 と小さいことを示すことができた(4)。また ToMV を用いた研究では、プロトプラスト接種や *in vitro* 複製系(5)を用いた実験に基づいて ToMV 細胞感染過程のシミュレーションモデルを作成し、細胞に侵入した数千分子のウイルスゲノムのうち平均 4 分子程度のみが確率的に複製を開始して蓄積することや、細胞内での確率的な感染過程が適応的なゲノムとそうでないゲノムの分離をさらに促進している可能性を示した(2)。

以上の一連の研究は、細胞内集団における遺伝子産物の共有利用が植物ウイルスにとっての大きな弱点となりうることを強く示唆する。筆者らは遺伝子産物の共有利用をめぐるウイルスが多数決型の意思決定をしていることを明らかにし、最近ではウイルスの多数決型意思決定を標的とする防除技術の開発に取り組んでいる (論文未発表)。講演ではこれらの研究についても紹介したい。

2. 陸上植物の NLR 型 R 遺伝子による抗ウイルス集団抵抗性

R 遺伝子 (*Resistance gene, R gene*) は植物の優性病害抵抗性遺伝子の総称で、その大半は NB (nucleotide-binding) ドメインと LRR (leucine-rich repeat) ドメインをもつレセプタータンパク質 (NB-LRR receptor, NLR) をコードする NLR 型 R 遺伝子である。陸上植物は数十から数百の NLR 型 R 遺伝子を持ち、これらが様々な病原体に対する抵抗性を付与している。多くの場合、NLR 型 R 遺伝子の産物は病原体由来の特定のタンパク質を特異的に認識し、直接的あるいは helper NLR タンパク質を介して間接的に抵抗性を誘導する。NLR タンパク質がウイルス感染を検知して誘導する応答としては、過敏感反応 (HR, hypersensitive response) がよく研究されている。ウイルスに対する HR では接種葉でのプログラム細胞死による局部壊死病斑の形成と、接種葉以外の部位へのウイルスの全身感染の阻害が観察される。これらの観察から HR でみられる細胞死は全身感染の阻害に寄与するとされることが多いが、これに疑問を投げかける観察も多数ある。例えばシロイヌナズナの NLR 型 R 遺伝子である *RCY1* は CMV の外被タンパク質 (CP) を認識して抵抗性を誘導するが、*RCY1* を過剰発現した場合には CMV 感染に対し細胞死が誘導されず、一細胞レベルでウイルス蓄積が抑制されて全身感染が起こらないことから(6)、細胞死誘導はウイルスの全身感染阻害に必須でないことが示唆されている。また CMV に対する抵抗性遺伝子 *RCY1* をもつシロイヌナズナの *dnd1* 変異体では細胞死誘導なしに CMV の全身感染が阻害されることなどからも(7)、細胞死がウイルスの全身感染の阻害に寄与するとは考えにくい。そのため NLR 型 R 遺伝子がウイルス感染に対して誘導する細胞死が生存戦略上どのような意義を持つ

かは明らかでなかった。

筆者らは CMV をシロイヌナズナでの応答を再現する *RCY1* 由来 *R* 遺伝子をもつ形質転換体 *N. benthamiana* [以下 *Nb(R+)*] と *R* 遺伝子をもたない野生型の *N. benthamiana* [以下 *Nb(R-)*] に接種し、1~2 回目の細胞間移行後の MOI を推定したところ、*Nb(R-)* では 5.72 ± 0.24 だったのに対して *Nb(R+)* では 4.08 ± 0.22 であった。このことは *R* 遺伝子が誘導する抵抗性により MOI が 28.7% 低下したことを示す。この MOI の低下は接種後 20 時間以内、すなわち細胞死が誘導されるより前の段階で観察されることから、やはり細胞死は HR におけるウイルスの感染性の低下に必須ではないことが支持された。技術的な限界のため 3 回目以降の細胞間移行後の MOI の推定はできないが、HR 誘導時には細胞間移行が進むにしたがって MOI が徐々に低下し、最終的には 0 になって感染域の拡大が停止するものと考えられた。そしてウイルス（ウイルスタンパク質）がある程度以上蓄積した細胞において事後的に細胞死が起こるとすると、（その意義は不明であるものの）これまでの観察を合理的に説明できるものと考えられた(3)。

また筆者らは CMV を接種した *Nb(R+)* 個体で突然変異により出現した CMV CP-T45M 変異体では、*R* 遺伝子による MOI 低下率が 12.7% と低く、その結果として *Nb(R+)* や *RCY1* をもつシロイヌナズナに感染した場合にはウイルスの全身感染後に *R* 遺伝子依存的に全身壊死が起こる SHR (systemic HR) が誘導されることを見出した。SHR は圃場でも報告があり、「抵抗性の失敗とされる」。CMV CP-T45M 変異体は *R* 遺伝子による認識を部分的に逃れるものと考えられるが、圃場や自然界においても同様のウイルス変異が生じて SHR が誘導されることはごくありふれた現象であると想像される。そのように考えると、ウイルス抵抗性 NLR 型 *R* 遺伝子は自然界では迅速に淘汰されてしまうように思えるが、実際にはウイルス抵抗性 NLR 型 *R* 遺伝子は *RCY1* 以外にも野生植物から多数見つかっていることから、SHR が誘導されることが陸上植物にとって適応的である必要があると筆者らは考えた。

そこで思い至ったのが、NLR 型 *R* 遺伝子が誘導する細胞死が集団レベルの抵抗性として機能している可能性である (図 2a)。植物ウイルスの多くは微小昆虫や線虫、変形菌といった媒介生物によって水平伝搬されるものが大半であるが、これらの移動距離は大きくない。このような状況においては SHR 誘導でウイルス感染細胞が細胞死することが周囲の植物体への感染源を除去することにつながるというアイデアである。またこの考えに基づけばウイルスがある程度以上蓄積した細胞で「事後的な細胞死」が起こる意義を SHR、HR の場合を問わず合理的に説明できる。一般に、自己犠牲を伴う形質はその原因遺伝子が自己犠牲と同時に消滅してしまうため選択され得ない

とされる。しかし陸上植物のように局地的に繁殖を行う生物では遺伝的に近縁な個体が群生するため、個体の自己犠牲が周囲の「兄弟姉妹」を守ることにつながり、原因遺伝子の選択をもたらす可能

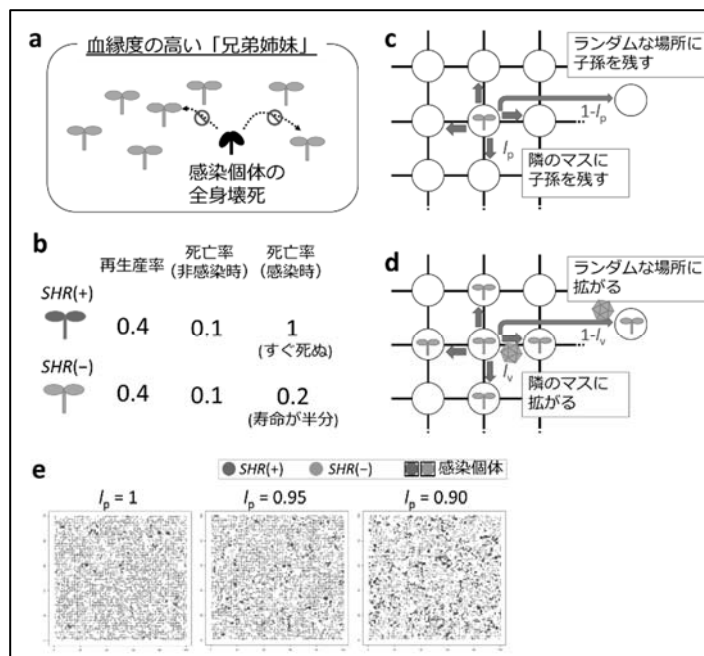


図 2 陸上植物の NLR 型 *R* 遺伝子による抗ウイルス集団抵抗性のアイデアと、シミュレーションによる検討

性がある。そこで数理モデルを作成してシミュレーションで検討したところ (図 2b-d)、繁殖の局地性依存的に SHR 誘導が進化的に有利になりうることを示された。このことは自己犠牲を伴う集団抵抗性が陸上植物特有の生存戦略として成立した可能性を示唆する(3)。

一連の研究から、ウイルス抵抗性 NLR 型 R 遺伝子をもつ植物がウイルスに感染した際に、感染細胞のふるまいには少なくとも2つのフェーズが存在するものと考えられた。すなわち、まずウイルス蓄積を抑制してその植物個体内での感染拡大を防ごうとするフェーズと、抑制に失敗した場合に細胞死によって集団内への感染拡大を防ごうとするフェーズである。現在筆者らはその2つのフェーズ間の移行で起こる変化やそのメカニズムを明らかにすることを試みている。将来的にはフェーズ移行の人為的制御手段を確立することで、農業現場でより広く・安定してウイルス抵抗性 NLR 型 R 遺伝子が活用できるようにしたいと考えている。

おわりに

上で紹介した2つの研究は対象とする現象のスケールが大きく異なるため、MOI 推定という技術的な共通項はあるものの、基本的には無関係な研究に見えるかもしれない。しかし自然選択が起こる単位を人間が定義する「個体」に限定せず「集団」にも拡張して理解しようとしている点で通底している。この視点は生命現象の本質的な理解だけでなく、遺伝的にかなり均一な生物の集団を人為的に栽培・生産する農業の現場においても重要であると筆者は考えている。

謝辞

本賞にご推薦くださいました東北大学大学院農学研究科長 北澤春樹教授、日本植物病理学会会長 平塚和之教授ならびに関係者の皆様に深謝いたします。本研究は東京大学アジア生物資源環境研究センター 白子幸男教授の研究室に筆者が学生として在籍していた時に始めたものです。その後、農業生物資源研究所 (現農研機構) 石川雅之博士の研究室に学生・ポスドクとして、東北大学大学院農学研究科の高橋英樹教授の研究室に助教として在籍し、現在まで研究を継続することができています。この間、東京大学の岸野洋久教授にもご指導を賜りました。先生方のご指導とご支援に心より御礼申し上げます。また農研機構 石橋和大博士をはじめとする諸先輩方、東北大学の学生諸氏のほか、多くの関係者の皆様にご助言・ご助力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Miyashita S.* and Kishino H.: J Virol 84:1828–1837 (2010)
- 2) Miyashita S.*, Ishibashi K., Kishino H., and Ishikawa M.: PLoS Biol 13:e1002094 (2015)
- 3) Abebe D. A., van Bentum S., Suzuki M., Ando S., Takahashi H., and Miyashita S.*: Commun Biol 4: 947 (2021)
- 4) Ren R., Zheng L., Han J., Carvalho C. P., Miyashita S., Zhang D., and Qu F.*: PLoS Pathog 19: e1011365 (2023)
- 5) Komoda K., Naito S., and Ishikawa M.*: Proc Natl Acad Sci USA 101:1863–1867 (2004)
- 6) Sekine K-T., Kawakami S., Hase S., Kubota M., Ichinose Y., Shah J., Kang H. G., Klessig D. F., and Takahashi H.*: Mol Plant Microbe Interact 21:1398–1407 (2008)
- 7) Takahashi H.*, Kai A., Yamashita M., Ando S., Sekine K-T., Kanayama Y., and Tomita H.: Physiol Mol Plant Pathol 79:40–48 (2012)