

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14862

研究課題名(和文)植物ウイルス病原体間の共進化機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of co-evolution between plant viruses

研究代表者

大島 一里 (Kazusato, Ohshima)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：00176869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自然界では、病原体が一個体の植物に単独感染より混合感染がしていることが多い。ウイルスの混合感染では一般的に、異種ウイルスとの混合感染により強い症状を示し、同種ウイルスの異なる系統の混合感染により干渉作用が関与して弱い症状を示す。これらの現象に着目し、病原体間の「共進化」現象を調査することを目的とした。異種ウイルスが混合感染したアブラナ科やユリ科植物を全国から採集後、それらウイルスゲノムを解析し、ゲノムインフォマティクスを用いて解析した。その結果、混合感染したウイルスのゲノムに見られる変異が共進化に関与すること、それらのウイルスが日本の各地域に共進化しながら拡散したことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Plants are often mixedly infected with two or more pathogens in nature. Mixed infection of different virus species generally shows severe symptoms, whereas single infection with same virus species shows mild symptoms due to the interference effects. Focusing on these phenomena, we conducted a research aimed at elucidating "co-evolution" between different virus species. We collected crucifers and lily plants showing mosaic symptoms, infected with two or more different viruses, in Japan. We determined the two or more viral genomes from mixedly infected plants and analyzed them using the latest genome-informatics. We found that some mutations in the cruciferous and narcissus virus genomes probably involved in "co-evolution", and some of the viruses probably co-evolved and co-migrated from the origin to other parts of Japan.

研究分野：植物保護科学

キーワード：ウイルス 分子進化 共進化 病原体間

## 1. 研究開始当初の背景

微生物学関連分野における分子進化の最先端研究としては、細菌とファージの実験系を用いた「共進化」の研究であり、今後さらに発展する重要テーマと考えられていた。「共進化」に関わる研究は、幾つかの方向に分けられるが、主流は病原体と宿主間での「共進化」現象の解明である。ウイルスは他の病原微生物に比べて宿主の代謝系に強く依存するために、宿主からより影響を強く受け今日まで適応してきたと考えられている。「病原体 = 赤の女王モデル」のもとでは、病原体との共進化レースを続ける宿主集団において、耐病性遺伝子に高い変異性があることも予測されている。最近の植物ウイルス病研究分野では、スペインの Fernando García-Arenal 教授らの研究グループによる研究が先行研究として知られ、特にシロイヌナズナとウイルスの「共進化」関係についてはその代表的な研究である。また植物の転写開始因子などの抵抗性遺伝子とポティウイルスのゲノム結合タンパク質の共進化、最近ではトマトモザイクウイルスと抵抗性遺伝子との関係についても、国内外で精力的に研究が進められている。一方もう一つの解明すべき「共進化」現象は、病原体間の「共進化」であるが、混合感染している様々な感染植物を採集し、既に世界の様々な研究室でそれらについて調査されているとの情報はあがるが、未だ明瞭な論文となって報告されておらず、混合感染による生物学的な現象、混合感染個体内動態の調査や適応研究などについて散見されているに過ぎない。

## 2. 研究の目的

自然界では、病原体が一個体の植物に単独感染より混合感染がしている場合が多い。ウイルスの混合感染では一般的に、異種ウイルスとの混合感染により強い症状を示し、同種ウイルスの異なる系統の混合感染により干渉作用が関与して弱い症状を示すことが知られている。応募者はこれらの現象に着目し、異なる2種のウイルスが混合感染した240個体以上のアブラナ科やユリ科植物を採集してき

た。それらの一部から2種のウイルスを分離後、両ウイルスゲノムを調査したところ「共進化」に関わる様な塩基変異に気がついたことから、さらに多くの混合感染ウイルスを採集後それらのゲノム構造を明らかにして、それらを統計学的に有為かなど確認するとともに、未だ明らかでない病原体間の「共進化」現象について様々な角度から調査することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ウイルスが混合感染している植物体を既に多数全国から採集しているが、さらに引き続き採集するとともに、2種以上の異種ウイルスが混合感染している植物個体からそれらを生物学的に或いは遺伝的に分離し、多数のゲノム構造を決定した。その後最新のゲノムインフォマティクスを用いて、混合感染しているウイルスの種類、単独感染ウイルスと混合感染ウイルス間に見られるゲノム変異の違い、宿主による変異の違い、ウイルスの進化速度、さらに系統樹での分岐年代(時間軸)などの違いを調査し、ゲノム上に現れてくる未だ検討されていない病原体間(ウイルス種間)の「共進化」現象を調査した。さらに強「共進化」してきたと思われるウイルス株を選抜し特徴を把握後、ウイルス病防除への基盤研究を最終目標として、混合感染ウイルスの特徴などについて進化的・病理学的に考察した。

## 4. 研究成果

地理的あるいは進化的に考慮して、さらに多くの混合感染植物を全国から採集した。具体的には、アブラナ科ウイルス間の共進化、ユリ科(ヒガンバナ科)ウイルス間の混合感染植物を全国から採集した。その後これまでゲノムの全塩基配列を決定してきた分離株に加えて、さらに多くのウイルスゲノムの全塩基配列を決定すると共に、ゲノムインフォマティクスを用いて病原体の「共進化」現象の探査を行った。

(1) アブラナ科植物のウイルスの共進化：

平成28年度および平成29年度に、引き続き混合感染したウイルスを全国から採集した。平成28年度においては30分離株の各カブモザイクウイルス (TuMV) とキュウリモザイクウイルス (CMV) ゲノムの全塩基配列の決定を行い、平成29年度においては40分離株の各TuMVとCMVゲノムの全塩基配列を決定した。また、ゲノムインフォマティクスによる継続的な探査を行ったところ、幾つかの変異が混合感染により特異的に見られたものの、お互いのウイルスゲノムに共通に見られるような変異は、すべての混合感染している両ウイルスゲノムの一アミノ酸変異に限定的に認められるというよりも、幾つかの変異が相互的に多数みられ、それら変異の組合せが、関係しているように思われた。以上の結果は、解析ゲノム数がまだ不足していることも原因と考えられたために、引き続き両ウイルスゲノムの全塩基配列の決定を行って統計学的に検討している。

一方、それら両ウイルスが同じ拡散をしていることが明らかとなれば「共進化」現象を説明できると思われたために、両ウイルスの拡散についてBEASTソフトウェアを用いて検討すると、同一の場所から同一空間を移動し同一の場所に侵入してきた混合感染したTuMVとCMV分離株が認められた。なおCMVの日本における拡散経路について図1に示した。現在以上の結果をまとめて、原著論文として投稿の準備を進めている。

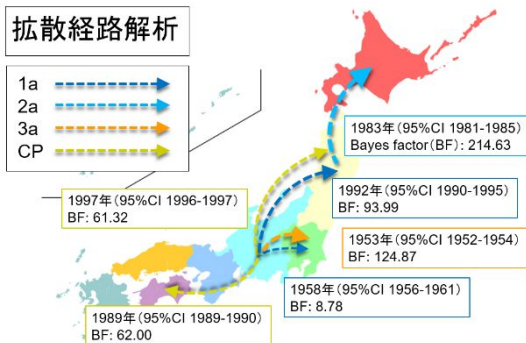


図1 CMVの拡散経路とその年代

(2) ユリ科(ヒガンバナ科)植物のウイルスの共進化：

多くのウイルスが混合感染して共進化していると思われるユリ科植物を日本全国から選抜した。中でも栄養繁殖性のスイセンウイルスについて検討した。ウイルスが混合していると思われる植物を全国から採集後、混合感染しているウイルスの種をまず明らかにした(表1)。同種ウイルスと思われていた異種のスイセン黄色条斑ウイルス (NLSV) や *Narcissus late season yellows virus* (NLSYV) が常時混合感染し、共進化してきたと思われた。最新のゲノムインフォマティクスを用いて様々な角度から分子進化学的な検討をしたところ、同植物のスイセンのみを主に宿主としており、それらのスイセンウイルスが同一宿主に複数種混合感染しているだけでなくそれらウイルスゲノムが組換えも起こしており、また分子系統樹において一つのクラスターを形成していることから、その中の異種と思われるウイルス、同種と思われるウイルスが共進化しながら現在のような集団になったと考えられた。さらにウイルスの進化速度などについても「共進化」という視点で検討した。これらの「共進化」現象については、既に2報の論文で公表している。

表1 混合感染植物と共進化ウイルス

Plant (isolate) <sup>a</sup>	Number of clones selected	Detected virus <sup>b</sup>				
		Potyvirus		Macluravirus		
		TuMV group	OYDV group	NLSV	NLSYV	NLV
NaF1	10 <sup>c</sup> (9 <sup>d</sup> )	3 (3)	3 (3)	0	4 (3)	0
NaF8	9 (3)	9 (3)	0	0	0	0
NaKG1	10 (10)	0	10 (10)	0	0	0
NaKG2	9 (6)	6 (3)	3 (3)	0	0	0
NaKM1	10 (9)	0	10 (9)	0	0	0
NaKM9	10 (9)	2 (2)	0	0	8 (7)	0
NaM1 <sup>e</sup>	3 (3)	0	0	0	0	3 (3)
NaM2	7 (4)	0	6 (3)	1 (1)	0	0
NaN9	7 (5)	2 (2)	0	0	5 (3)	0
NaN14	9 (5)	1 (1)	7 (3)	0	1 (1)	0
NaN15	10 (6)	4 (3)	6 (3)	0	0	0
NaN19	15 (7)	4 (3)	1 (1)	10 (3)	0	0
NaOI4	9 (3)	9 (3)	0	0	0	0
NaOI12	9 (6)	3 (3)	6 (3)	0	0	0
NaSG8	9 (9)	2 (2)	0	0	7 (7)	0
NaSG12	9 (6)	3 (3)	0	0	6 (3)	0
Total	145 (100)	48 (31)	52 (38)	11 (4)	31 (24)	3 (3)

<sup>a</sup>Populations' isolate. RT-PCR products were not amplified from the saps of NaKG4, NaKG7, NaKG8, NaM3, NaM5, NaN2, NaN6, NaN13, NaOI14 and NaSG10 narcissus plants (see Table S1), thus those were not listed.

<sup>b</sup>NLSV: *Narcissus late season yellows virus*, NLSYV: *Narcissus yellow stripe virus*, CyEVA: *Cyrtanthus elatus virus A*, NLV: *Narcissus latent virus*

<sup>c</sup>Number of the plasmid clones selected for sequencing approximately 650-700 nucleotides in nuclear inclusion b (NIb) protein coding regions.

<sup>d</sup>Number of the plasmid clones selected for sequencing from the middle of NIb protein coding regions to 3' end of the genome.

<sup>e</sup>Only three colonies appeared after transformation perhaps because slight amplification of RT-PCR products.

## < 引用文献 >

Ohshima K, Nomiya R, Mitoma S, Honda Y, Yasaka R, Tomimura K. Evolutionary rates and genetic diversities of mixed potyviruses in Narcissus. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 45, 2016, pp.213-223.

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

Ohshima K, Mitoma S, Gibbs AJ, The genetic diversity of narcissus viruses related to turnip mosaic virus blur arbitrary boundaries used to discriminate potyvirus species *PLoS ONE*, Vol. 13(1) e0190511. 査読有 , 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190511>

Yasaka R, Fukagawa H, Ikematsu M, Soda H, Korkmaz S, Golnaraghi A, Katis N, Ho SYW, Gibbs AJ, Ohshima K. The time of emergence and spread of turnip mosaic potyvirus. *Scientific Reports*, Vol. 7: 4240, 査読有 , 2017, DOI:10.1038/s41598-017-01934-7.

Ohshima K, Nomiya R, Mitoma S, Honda Y, Yasaka R, Tomimura K. Evolutionary rates and genetic diversities of mixed potyviruses in Narcissus. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 45, 査読有 , 2016, pp.213-223. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.036>

### [ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

八坂亮祐・大島一里 カブモザイクウイルスのユーラシア大陸における出現中心からアジアへの拡散経路; 2018 年 03 月 日本植物病理学会本大会

松岡弘記・三苦真一郎・大島一里 カブモザイクウイルス分子系統グループの遺伝的多様性と分子進化; 2018 年 03 月 日本植物病理学会本大会

Yasaka R, Korkmaz S, Golnaraghi A, Katis N, Ho S, Gibbs A, Ohshima K. The time of

emergence and dissemination of turnip mosaic virus; 2017 年 07 月 International Congress of Virology, Singapore

八坂亮祐・大島一里 カブモザイクウイルスの同義置換部位を用いた塩基置換速度および分岐年代の推定; 2017 年 04 月 日本植物病理学会本大会

八坂亮祐・大島一里 カブモザイクウイルス侵入時期の年代推定: 長崎産の一分離株を例として; 2017 年 02 月 九州病害虫研究会

八坂亮祐・大島一里 小アジアとその周辺諸国におけるカブモザイクウイルスの拡散時期; 2016 年 11 月 日本植物病理学会九州部会

### [ その他 ]

ホームページ等

<http://plantvirology.ag.saga-u.ac.jp/index.html>

<http://research.dl.saga-u.ac.jp/profile/ja.d9e4832763b5fa2d59c123490551be02.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

大島一里 ( OHSHIMA, Kazusato )

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号 : 00176869