

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19257

研究課題名(和文)自然界への適応が植物に齎した制約と、その解消に関する研究 ～病害抵抗性を例に～

研究課題名(英文) Discovery and dissolution of the constraints that have been derived to plants during their adaptation process to nature

研究代表者

宮下 脩平 (Miyashita, Shuhei)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：60556710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物は様々な病原体を認識し、抵抗性を誘導するR遺伝子を多数持っている。このR遺伝子によってウイルス抵抗性が発揮される際に自発的な細胞死が起こる場合が多く知られており、細胞死がウイルスの封じ込めに寄与するとされるが、本研究では細胞死が起こる以前に細胞に感染するウイルスゲノム数(MOI)の低下が観察されることを明らかにした。また、R遺伝子による抵抗性が不完全に発揮された場合、自発的な細胞死により植物体全体が壊死してしまう場合がある。この現象は、自然界においては周囲の血縁度の高い個体への感染源になることを避ける自殺戦略として集団レベルで機能していることを、数理モデルを用いたシミュレーションで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての植物に備わっているR遺伝子によるウイルス抵抗性を、数字(MOI)で記述できる可能性を本研究で示すことができた。これにより例えば、ウイルス抵抗性機構へのそれぞれの遺伝子の寄与を数字で評価できるようになる可能性がある。このことは、新しいウイルス抵抗性作物の作出に寄与する可能性がある。また、不完全な抵抗性誘導であっても自然界においては集団レベルでの生存戦略として機能する可能性を本研究で示すことができた。このことは、R遺伝子の進化過程の学術的理解に大きく寄与するものであるとともに、応用研究においては新奇R遺伝子の探索に新たな可能性を与えるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plant genomes contain many R genes, of which products function as receptors to detect pathogens to induce resistance against them. In many cases, R-gene mediated resistance cause autonomous cell death, which might contribute for inclusion of the pathogens to the infected regions. The current study showed that MOI, the average number of viral genomes that establish infection in a new cell, decreases in the presence of an R gene, even before the occurrence of cell death. A simulation model was developed to show that systemic necrosis, which occurs upon insufficient induction of resistance, can function as a suicide strategy against pathogens, by helping the infected individuals avoid becoming an infection source to neighbor plants, which are often kins in the case of plants.

研究分野：植物病理学/農学

キーワード：進化 栽培化 数理モデリング

1. 研究開始当初の背景

野生植物は常に大きく変動する自然環境にさらされており、そのような環境への適応の過程で分子レベルから集団レベルにいたる複雑なシステムを形成してきた (右図上段)。しかし作物としての植物の利用を考えた場合、圃場のように変動の少ない環境では植物が対処すべき課題は非常に少ないため、そのような複雑なシステムは無駄が多く、むしろ植物個体の生育にとっての制約になっている可能性があると考えた(右図中段)。現存の栽培作物に残されたそのような制約を発見し解消することで、作物の圃場適合性が飛躍的に向上し、農業生産の増大や省コスト化が実現する可能性がある (右図下段)。特に植物の病害抵抗性については、栽培化前の植物に常に多様な選択圧がかかってきたと考えられることから、重要な制約が残っていると研究代表者は考えた。そこで研究代表者が得意とする分子生物学的手法と数理モデリングを組み合わせた研究方法で解析を行い、制約の発見・解消による応用に向けた考え方の道筋をつけたいと考えた。

2. 研究の目的

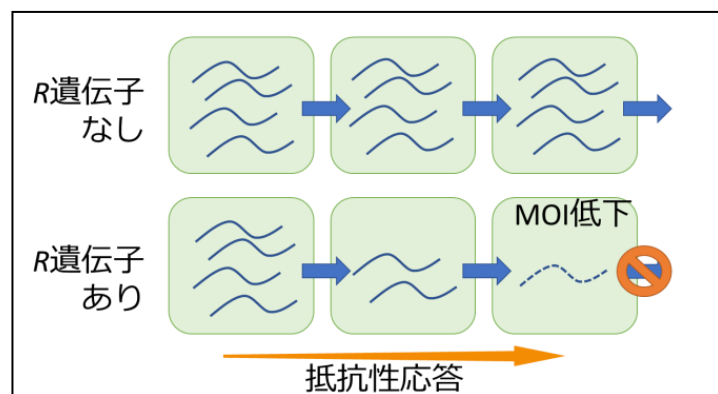
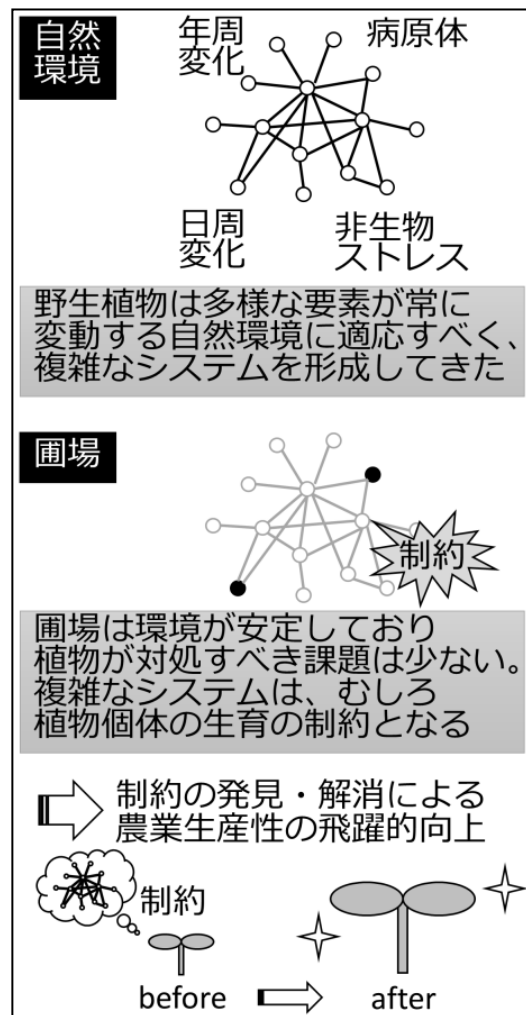
本研究では、自然界への適応で生じた複雑なシステムが齎した制約を解消しうるかどうかを実証的研究で検討するとともに、そのような複雑なシステムが形成される過程を理論的研究で検討することを目的とした。より具体的には、前者では植物がもつ R 遺伝子によるウイルス抵抗性について、自発的な細胞死と感染域でのウイルスの封じ込め現象の切り分けを目指した検証を行った。後者では、自発的な細胞死が場合によってもたらす全身壊死が自然界において生存戦略として機能しうるかをシミュレーションにより検討することで、R 遺伝子とそれによる抵抗性の進化の一過程を普遍的に説明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) キュウリモザイクウイルス (CMV) を認識するシロイヌナズナ由来の R 遺伝子を導入した形質転換体 *Nicotiana benthamiana* に YFP あるいは CFP 遺伝子で標識した CMV を混合接種し、両者の感染域の確率的な分離を数値化して解析することで、CMV の細胞間移行における MOI を推定した。これによって得られた推定値を野生型 *N. benthamiana* における推定値と比較した。  
 (2) R 遺伝子による抵抗性誘導にはサリチル酸 (SA) 経路が部分的に関与することが知られていることから、サリチル酸アナログであるアシベンゾラル S メチル (BTH) を処理した野生型 *N. benthamiana* における MOI も推定した。  
 (3) 空間構造を考慮した植物・ウイルスの増殖モデルを作成し、全身壊死が植物の集団レベルでの生存戦略として機能しうるかどうか、さらにどのような条件で機能しうるかを検討した。

4. 研究成果

(1) R 遺伝子導入形質転換体 *N. benthamiana* では野生型と比べて MOI が有意に低下することが明らかとなった (右図)。MOI の低下は自発的な細胞死が起こるよりも早い時点で観察されることから、このような MOI の低下がウイルスの感染拡大を停止する現象の直接的な説明になるものと考えられた。この結果は、R 遺伝子によるウイルス抵抗性を数字 (MOI) で記述できる可能性を示すものである。これにより例えば、ウイルス抵抗性機構へのそれぞれの遺伝子の寄与を数字で評価できるようになる可能性がある。

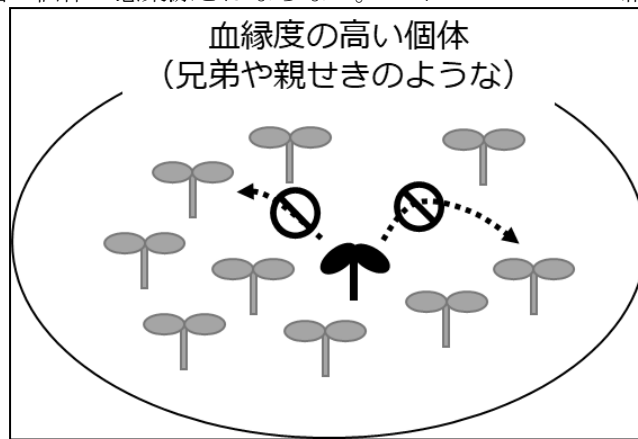


これにより例えば、ウイルス抵抗性機構へのそれぞれの遺伝子の寄与を数字で評価できるようになる可能性がある。

(2) BTH 処理した野生型 *N. benthamiana* では、対照処理をおこなった野生型 *N. benthamiana* と比べて CMV の MOI が有意に低下した。このことは、*R* 遺伝子による MOI の低下に SA 経路が寄与する可能性を示唆する。

これまでに研究代表者らは、植物ウイルスの細胞間移行における MOI は 3~6 程度と小さいことを明らかにし、このように小さい MOI で感染することがウイルスの迅速な適応を実現するために不可欠であることを明らかにしてきた (引用文献①②)。今回 (1) (2) で得られた結果は、*R* 遺伝子によるウイルス抵抗性で MOI が低下することでウイルスは感染を継続できなくなり、感染拡大を停止していることを示唆する。見方を変えると、*R* 遺伝子非存在下での MOI がもともと小さくなければ、*R* 遺伝子によるウイルス抵抗性は機能しにくいものと考えられる。宿主植物だけでなくウイルスも適応のための強い制約を受けており、それが植物-ウイルス間相互作用の進化に大きな影響を与えてきたことが伺われる。

(3) ウイルスに感染すると寿命が短くなる植物とすぐに死亡する植物を想定し、モデル上の空間でこれらの植物集団が存続できるかどうかをシミュレーションにより検討した。前者の植物は感染しても低い効率で子孫を残せる一方、周囲の個体の感染源でもありつづける。後者の植物は自らの子孫を残せないものの、周囲の個体の感染源とはならない。シミュレーションの結果、植物の繁殖がローカルに起こる場合 (親個体の近傍にほとんどの子孫を残す場合) には後者の植物が集団中に存続できるが、繁殖がローカルでなくなるにしたがって存続が難しくなることが示唆された。繁殖がローカルに起こる場合、血縁度の高い (兄弟や親せきのような) 集団が近傍に集まって生育する状況が生じる。このような状況では、すぐに死亡することは周囲のそういった植物個体の感染源となることを防ぐ「自殺戦略」として機能しうることをこの結果は示す (右図)。



(1)~(3)の結果を合わせると、*R* 遺伝子によって誘導されるウイルス抵抗性は 2 つの異なる利益をもたらす抵抗性に切り分けられることができるものと考えられた。すなわち 1 つは個体の利益となる「ウイルスの MOI を低下させて感染域の拡大を抑える抵抗性」、もう 1 つは集団の利益となる「自発的な細胞死により周囲の個体の感染源となることを防ぐ抵抗性」である。例えば圃場においては個々の作物個体の健全な育成が重要であるため、後者の抵抗性は意義が大きくないうえに、全身壊死の「リスク」となりうる。一方で前者の抵抗性を強化することは、一細胞レベルでウイルスの増殖を抑える高度抵抗性につながるものと考えられる。これらを切り分けて制御することができれば、圃場で有効に利用できる技術の開発につながる可能性がある。

<引用文献>

① Miyashita S and Kishino H (2010) J Virol 84(4): 1828-1837

② Miyashita S et al. (2015) PLOS Biol 13(3): e1002094.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Hanbal Sara E.、Miyashita Shuhei、Ando Sugihito、Sidaros Samir A.、Takahashi Hideki、First identification and characterization of cucumber mosaic virus from *Corchorus olitorius* in Japan, Journal of Plant Pathology、査読有、Vol. 100、2018、561-565  
DOI: 10.1007/s42161-018-0099-6

② Hanbal Sara E.、Takashima Keisuke、Miyashita Shuhei、Ando Sugihito、Ito Kumiko、Elsharkawy Mohsen M.、Kaneko Toshiro、Takahashi Hideki、Atmospheric-pressure plasma irradiation can disrupt tobacco mosaic virus particles and RNAs to inactivate their infectivity、Archives of Virology、査読有、Vol. 163、2018、2835-2840  
DOI: 10.1007/s00705-018-3909-4

③ Takahashi H.、Tian A.、Miyashita S.、Kanayama Y.、Ando S.、Kormelink R.、Survey of the response of 82 domestic landraces of *Zea mays* to cucumber mosaic virus (CMV) reveals geographical region-related resistance to CMV in Japan、Plant Pathology、査読有、Vol. 67、2018、1401-1415

DOI: 10.1111/ppa.12848

- ④MIYASHITA S.、Studies on replication and evolution mechanisms of plant RNA viruses、*Japanese Journal of Phytopathology*、査読なし、Vol. 84、2018、149  
DOI: 10.3186/jjphytopath.84.149
- ⑤MIYASHITA S.、Studies on replication and evolution mechanisms of plant RNA viruses、*Journal of General Plant Pathology*、査読なし、Vol. 84、2018、427-428  
DOI: 10.1007/s10327-018-0806-3

〔学会発表〕(計12件)

- ①宮下脩平・安藤杉尋・高橋英樹、植物ウイルス-植物個体群相互作用における空間構造の効果のシミュレーションによる検討、平成31年度日本植物病理学会大会、2019年
- ②宮下脩平・Michael F Seidl・Jasper RL Depotter・安藤杉尋・高橋英樹・Bart PHJ Thomma、植物病原性 *Verticillium* 属菌から検出された複数の RNA ウイルスのゲノム全塩基配列決定、第72回北日本病害虫研究発表会、2019年
- ③Shuhe Miyashita、A simple evolution model of MOI unveils the distinct biological principles behind different classes of viruses、*International Neovirology Mini-symposium Series IV*、2019年
- ④Shuhe Miyashita、Social aspects in viral ways of life, analyzed by wet experiments and dry simulations、*WUR-TU Plant Science Workshop 2018*、2018年
- ⑤宮下脩平・Michael F Seidl・Jasper RL Depotter・安藤杉尋・高橋英樹・Bart PHJ Thomma、植物病原性 *Verticillium* 属菌から検出された複数の RNA ウイルスのゲノム全塩基配列決定、平成30年度日本植物病理学会東北部会、2018年
- ⑥宮下脩平、植物病原性 *Verticillium* 属菌の RNA ウイルス、*ネオウイルス学ミニシンポジウム 1*、2018年
- ⑦Shuhe Miyashita、Evolution of strategies in space: the never-ending quests for higher fitness by viruses and the hosts driven by differences and changes in spatial structures、*The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity*、2018年
- ⑧Shuhe Miyashita、Majority decisions by four or five members: social rules that can be formed and maintained in viral populations to exclude free riders、*Seminaire BGPI CIRAD*、2018年
- ⑨ Shuhe Miyashita, Akira Sasaki, Machi Suzuki, Sietske van Bentum, Sugihiko Ando, Masayuki Ishikawa, and Hideki Takahashi、Majority decisions by four or five members: rules that can be formed and maintained in viral populations to exclude free riders、*2018 Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology & the Japanese Society for Mathematical Biology*、2018年
- ⑩鈴木万智・Sietske van Bentum・安藤杉尋・高橋英樹・宮下脩平、細胞間移行における CMV の MOI は R 遺伝子による抵抗性誘導時に低下する、平成30年度日本植物病理学会大会、2018年
- ⑪西條悠希・安藤杉尋・高橋英樹・宮下脩平、R 遺伝子による認識を免れる変異型 CMV CP のアラニンスキャニングによる探索、平成30年度日本植物病理学会大会、2018年
- ⑫宮下脩平、植物 RNA ウイルスの複製と進化機構に関する研究、平成30年度日本植物病理学会大会、2018年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/ppathol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 万智、Sietske van Bentum、西條 悠希

ローマ字氏名：Machi Suzuki, Sietske van Bentum, Yuki Saijo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。