

研究報告書

「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 宮下 脩平

1. 研究のねらい

ウイルスは複製時の高い変異率により、宿主の交替や温度の変化、抗ウイルス剤の投与といった環境の変化に適応した変異体を生み出している。しかし一方で、ランダムに生じる変異のほとんどはウイルスにとって不利な変異であることが知られている。そのため、適応的なゲノムを選択し適応的でないゲノムを集団から迅速に排除することは、ウイルスの生存戦略上非常に重要な課題であるといえる。本研究で特に注目したのは、細胞内のウイルス集団に共有利用されるウイルス遺伝子や因子の選択である。ウイルスは宿主の細胞内で増殖するため、一部の遺伝子産物や因子は細胞内ウイルス集団に共有利用される。そのため、変異により生じた適応的でないウイルスゲノムが他のウイルスゲノムの遺伝子産物や因子を利用して生き残る状況や、適応的な変異をもつウイルスゲノムがその変異による利益を受けられず選択されない状況が生じる可能性がある。これに対してウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することで適応的なゲノムと適応的でないゲノムを確率的に分離し、細胞内集団単位での選択を可能にしているという仮説を立て、これを示すことを目指した。さらに、細胞に感染するゲノム数が決定する仕組みを、数理モデルを用いて明らかにし、その結果に基づいてウイルスの進化機構を操作する手法を確立することで、ウイルスの防除や利用に有効な手段を提案することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

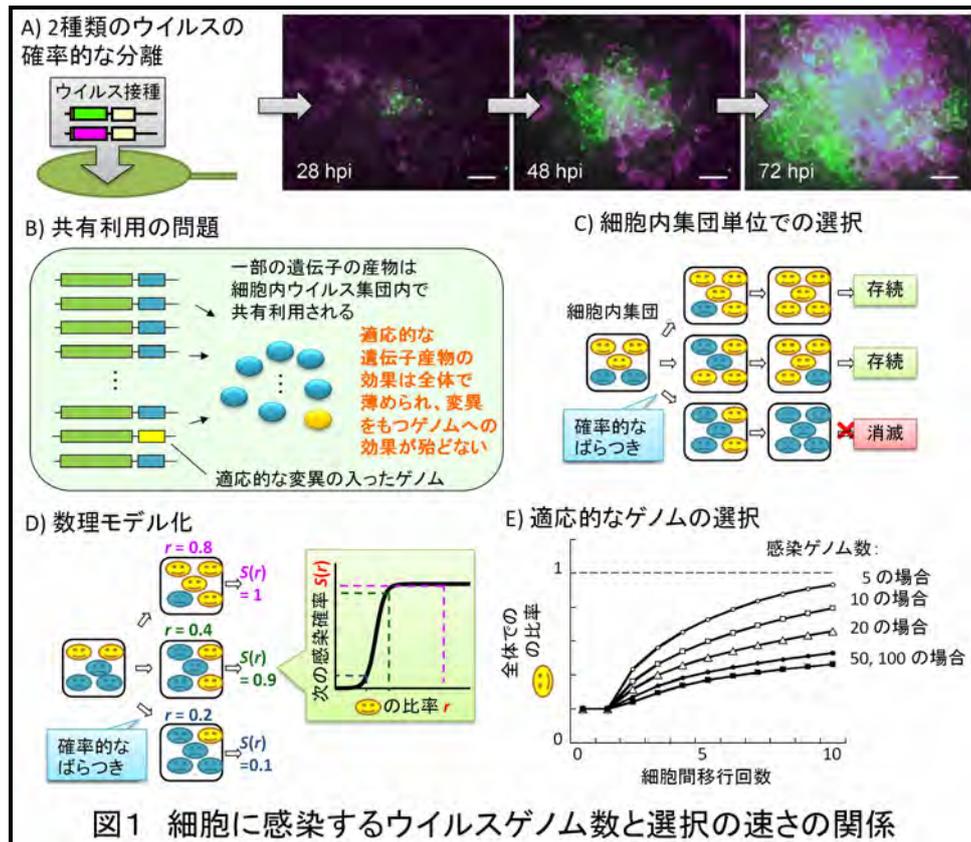
植物 RNA ウイルスが細胞間移行後に細胞に感染するゲノム数は平均で 5～6 と少ない数であることを実験により示し、この現象がウイルスの適応の実現に不可欠である可能性を数理モデルにより示した。次に細胞感染成立過程の数理モデルを作成し、感染ゲノム数が決定する仕組みを提案した。さらにこのモデルから、適応を促進する2つの重要な現象が予測されたため、実験によりそれらが実際の細胞感染で起こることを示した。また、宿主植物の生育温度を下げることや RNA サイレンシングに関わる宿主因子のノックダウンにより感染ゲノム数を大きくすることができる可能性を明らかにし、感染ゲノム数操作によるウイルス進化機構の操作につながる手がかりを得た。

(2) 詳細

研究テーマA 「細胞間移行後の感染ゲノム数とウイルスの適応戦略における意義」

植物RNAウイルスの一つであるムギ類萎縮ウイルスのRNA2を2種類の蛍光タンパク質遺伝子(YFP遺伝子およびCFP遺伝子)でラベルし、これらを *Chenopodium quinoa* の葉にRNA1とともに混合接種した。その結果、最初の細胞が混合感染した箇所でも細胞間移行を繰り返して感染域が広がるに従い2種類のRNA2が分離して、YFPあるいはCFPの蛍光だけが観察される細胞が増えてくることが分かった(図 1A)。この現象は、細胞間移行後に細胞に感染する

ゲノム数(感染ゲノム数)が小さいことにより確率的に起こるものと考えられ、観察結果の解析から感染ゲノム数は平均で 5~6 と推定された。ウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することにより、確率的に適応的なゲノムと適応的でないゲノムを分離して共有利用の問題(図 1B)を解決し、適応を実現している可能性が考えられた(図 1C)。そこで、簡単な数理モデルを用いてこれを検討した(図 1D)。その結果、感染ゲノム数が 5 であれば 10 回の細胞間移行の間に適応的なゲノムの選択が起こるのに対し、感染ゲノム数が 50 や 100 であればほとんど選択が起こらないことが示唆された(図 1E)。(原著論文1、総説1)



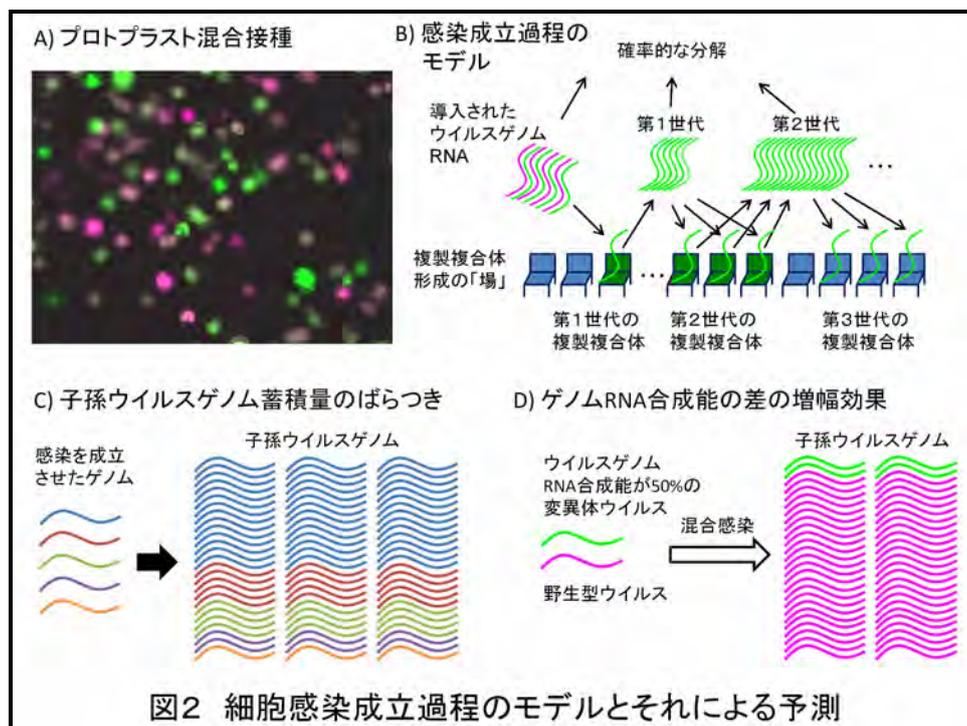
研究テーマB 「感染ゲノム数が決定する機構」

感染ゲノム数が平均で 5~6 程度になる仕組みについて、ムギ類萎縮ウイルスと同じ科に属するトマトモザイクウイルス(ToMV)とタバコプロトプラスト(単離した細胞)を使った実験で検討した。タバコプロトプラストにYFPまたはCFP遺伝子でラベルしたToMVをエレクトロポレーションにより混合接種すると、細胞間移行の場合と同様に確率的な単独感染が観察された(図 2A)。また、接種に使用するウイルスゲノム量の調整により感染ゲノム数を5程度とすることができることが分かった。放射性同位体でラベルしたウイルスゲノムRNAを接種する実験で、この接種条件では1細胞あたり7,200程度のウイルスゲノムRNAが導入されることが分かった。また、ウイルスゲノムRNAを鋳型として合成される相補鎖RNAの数は一細胞あたり10,000程度であることが実験により示された。近縁のウイルスに関する研究によりウイルスの複製複合体(ウイルス複製タンパク質などからなる複合体で、ウイルスゲノムRNAを合成する)1つあたり1分子の相補鎖RNAが含まれると考えられることから、細胞内では複製複合体が10,000程度作られており、複製複合体が形成されるための場の数が感染ゲノム数を直接

的に決定するわけではない、ということが分かった。これらの結果から、細胞には 10^2 オーダーのウイルスゲノムRNAが入るが、そのほとんどは複製を始める前に分解され、平均で5~6だけが複製複合体を形成して複製を開始し、複製複合体で作られた子孫ウイルスゲノムRNAが細胞内で第2世代以降の複製複合体を形成し、複製複合体形成の場が全て占められるまでこれを繰り返すものと考えられた(図2B)。そこで、単位時間に各々のウイルスゲノムRNAが分解される確率、複製複合体形成の場に複製複合体を形成する確率をパラメータに加え、細胞感染成立過程を再現する数理モデルを作成した。この数理モデルにより、今回の実験系のように導入されるウイルスゲノムRNAの数や複製複合体形成の場数が十分に大きい場合、ウイルスゲノムRNAが分解される確率と複製複合体形成の場に複製複合体を形成する確率の比が感染ゲノム数を決定する可能性が明らかになった。さらにこの数理モデルを用いたシミュレーションから、二つの重要な現象が予測された:

- 1) 感染を成立させたゲノム間で、ウイルスゲノムRNA合成能に違いがなくても、細胞内での子孫ウイルスゲノムRNAの蓄積量が確率的に大きくばらつく
- 2) ウイルスゲノムRNA合成能の差がある場合、複数サイクルの複製複合体形成の効果でその差が増幅され、最終的な子孫ウイルスゲノムRNAの蓄積量では大きな差となる

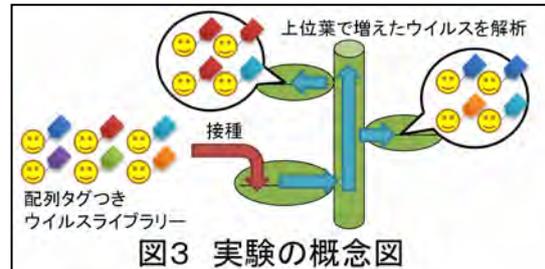
という現象である(図2C, D)。これらの予測に対応する実験としてそれぞれ、ランダムな10塩基の配列タグを挿入したウイルスライブラリーを接種して感染細胞で蓄積したウイルスのタグ配列を検出する実験と、ウイルスゲノムRNA合成能が野生型の0.5倍程度になる変異を5' UTRにもつウイルスと野生型5' UTRをもつウイルスの混合接種実験を行い、予測された現象が実際の細胞感染においても起こることを示した。(1)(2)の現象はそれぞれ、細胞内ウイルス集団に共有利用される遺伝子・因子と共有利用されない遺伝子・因子について、適応的なゲノムの選択を促進する。そのため、ウイルスがこのような感染様態を採ることは適応戦略上非常に合理的であると考えられた。また、複製複合体形成の場の数や細胞に侵入するウイ



ルスゲノム数、あるいはウイルスゲノム RNA 分解効率の値がある程度変わった場合でも、複製複合体形成効率を調節することで同様の感染様態を作り出せることから、ToMV と類似の複製機構を持つウイルスは適切な複製複合体形成効率を採ることでそれぞれの宿主や環境に適応できている可能性が考えられた。(論文投稿準備中; 主要な学会発表 1,2)

研究テーマC 「感染ゲノム数の操作」

感染ゲノム数を操作することでウイルスの適応戦略を制御できる可能性がある。そのため、本研究では次に、感染ゲノム数の操作に取り組んだ。10 塩基の配列タグを挿入した ToMV ライブラリーをタバコ植物体に接種した。感染した植物の葉や根からウイルス RNA を回収して配列タグを次世代シーケンサーで



検出した(図 3)。その結果、接種葉で検出される配列タグのうち一部だけが上位葉で検出されること、上位葉の間で検出される配列タグは異なることなどが分かった。この結果は、葉に感染するゲノム数が小さいことにより生じているものと考えられた。さらに、タバコの生育温度を通常の 25°Cより低い 15°Cにして同様の実験を行うと、接種葉および上位葉で検出される配列タグの種類が増え、葉に感染するゲノム数が大きくなっていることが分かった。また、RNA サイレンシングに関与する宿主遺伝子 RDR1、RDR6 をそれぞれノックダウンした植物体においても同様の傾向がみられたことから、温度や RNA サイレンシング関連の宿主遺伝子の発現量で葉に感染するゲノム数を制御できる可能性が明らかになった。ただし葉に感染するゲノム数は細胞に感染するウイルスゲノム数だけでなく、葉での感染箇所数によっても変化するものと考えられ、この両者を切り分けることはできていない。今後新しい実験系を作って検討したいと考えている。

共同研究テーマ 「ウイルスと宿主植物の共進化」

農業生物資源研究所の石橋和大博士らは ToMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1*に関する研究で、従来知られていた *Tm-1* 抵抗性打破ウイルス株にも抵抗性を示す新たな *Tm-1* アリル群をトマト野生種から見出した。しかしこの *Tm-1* アリルによる抵抗性も、新しいウイルス変異株の出現により打破されることが分かった。宮下は、石橋博士による実験結果に基づき、抵抗性を持たない植物体(感受性植物体)におけるそれぞれのウイルス株の相対的な適応度を、簡単な数理モデルを用いて推定した。その結果、いずれの抵抗性打破株も野生型ウイルスに比べて適応度が低いこと、抵抗性打破できる範囲が広がった新規ウイルス株で特に適応度が低いことが示された。したがって、ToMVによる *Tm-1* 抵抗性の打破は元の宿主における適応度の低下というコスト(代償)を伴うプロセスであり、これが実際の自然環境において感受性を含む複数の *Tm-1* アリルが共存する原因である可能性が示唆された。(原著論文 2)

3. 今後の展開

本研究では、細胞感染レベル、細胞間移行レベルでの数理モデルを作成して植物ウイルス

生態を表現し、その適応における合理性を明らかにした。また、葉への感染ゲノムが小さい現象は、全身感染レベルでの適応機構として機能している可能性があり、これについても数理モデルを作成して検討を行いたい。さらに、細胞・接種葉・植物体での変異の蓄積を調べることで、それぞれのレベルの適応機構の寄与を数量的に明らかにしたい。これにより数理モデルを統合して、植物 RNA ウイルスの適応機構の全容を明らかにすることができると考えている。また、感染ゲノム数を操作した条件でも同様の変異蓄積の解析を行い、ウイルスの適応機構が攪乱されているかどうかを確認したい。感染ゲノム数を操作することでウイルスにとって不利な変異体を集団内に増やすことができれば、弱毒ウイルス(変異により病原性が低くなったウイルスで、これを予め植物に接種しておくことで野生型ウイルスによる感染を防ぐことができる)の効率的な作出や、ウイルスベクターによる植物体内での安定的なタンパク質発現系の開発といった応用研究につながる。これに向けた試験も行っていきたい。

4. 自己評価

研究テーマ A はさきがけ研究開始以前から継続してきた課題であるが、さきがけ研究のおかげで良い形でまとめることができた。研究テーマ B では(+)鎖 RNA ウイルスの細胞感染を再現する数理モデルを作成した。この数理モデルからは、ウイルスの適応戦略の重要な側面を明らかにすることができ、予想以上の成果が得られたと考えている。一方で多様な実験を必要とする内容であり、新しい実験系の確立に予想以上の時間がかかってしまった。研究テーマ C では宿主の生育温度や RNA サイレンシング関連遺伝子の発現制御により感染ゲノム数が制御できる可能性が示唆されたが、研究テーマ B の内容を生かした研究(複製複合体形成や RNA 分解に関与する宿主遺伝子の発現制御による感染ゲノム数制御)や応用に向けての検討が間に合わず残念である。また、共同研究テーマでは実験を中心に構成された研究の中で数理モデルを有効に利用することができたと考えている。

5. 研究総括の見解

ウイルスは宿主細胞内で増殖するため、一部の遺伝子産物や因子は細胞内のウイルス集団に共有利用されることから、不利な変異ゲノムも適応度を下げないと考えられるが、実際にはウイルスは非常に早く進化することがよく知られている。この謎を解くために、ウイルスはあえて少ない数で細胞に感染することで適応的なゲノムと適応的でないゲノムを確率的に分離し細胞内集団単位での選択を可能にしているという仮説を立て、それを検証することを目指した。まず、植物 RNA ウイルスを用いた感染実験の結果から、細胞間移行後の感染ゲノム数は 5、6 個であることを統計的に推定した。このボトルネック効果と細胞内ウイルス集団間の競争を組み入れた数理モデルを用いて、感染ゲノム数が 5-10 であれば 10 回程度の細胞間移行の間に適応的でないゲノムは排除されることを示し上記の仮説の妥当性を確認した。さらにこのボトルネックの原因は細胞内に入ったウイルスゲノムのほとんどが分解され、ごく少数のみが複製開始に至るためであることを突き止めた。このようにウイルスの進化機構について新規な問題を発掘し、独創的なアプローチで実験と理論の両側面から解明したことは高く評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Miyashita, S and Kishino, H. “Estimation of the Size of Genetic Bottlenecks in Cell-to-Cell Movement of *Soil-Borne Wheat Mosaic Virus* and the Possible Role of the Bottlenecks in Speeding Up Selection of Variations in *trans*-Acting Genes or Elements”, *Journal of Virology*, 2010, 84(4), 1828–1837

2. Ishibashi, K, Mawatari, N, Miyashita, S, Kishino, H, Meshi, T, and Ishikawa, M. “Coevolution and hierarchical interactions of *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*”, *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10), e1002975

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “Detailed analysis of the genetic bottlenecks in single-cell infections of Tomato mosaic virus”, *International Congress of Virology*, September 2011

2. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “A model for the course of establishment of single-cell infections by an RNA virus”, *American Society for Virology Meeting*, July 2012

招待講演

1. 宮下脩平 「Modeling dynamics of plant RNA viral population in a host plant」、明治大学 MEEセミナー、2010年5月

2. Miyashita, S, Ishibashi, K, Kishino, H, and Ishikawa, M. “Genetic bottlenecks in cell-to-cell movements and single-cell infections of plant RNA viruses”, *日本進化学会*, 2012年8月

3. 宮下脩平 「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解」、植物ウイルス病研究会、2013年3月(予定)

総説

1. 宮下脩平 「植物RNAウイルスの進化機構の数理モデル」、*応用数理*、2012年6月

2. Ishibashi, K, Miyashita, S, Katoh, E, and Ishikawa, M. “Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA”, *Current Opinion in Virology*, 2012, 2(6), 699–704

3. 宮下脩平 「数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解」、植物ウイルス病研究会レポート、2013年3月(予定)

科学コミュニケーション活動

1. 宮下脩平、「進化のスピードの速いやつ～ウイルスの進化のしくみ～」、農業生物資源研究所 サイエンスカフェ、2012年4月

