HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	系統樹駆動型研究アプローチの確立による植物ウイルス進化機構の解明［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	川久保，修佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15755号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91942
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kawakubo_Syusuke_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　川久保　修佑

学 位 論 文 題 名

系統樹駆動型研究アプローチの確立による植物ウイルス進化機構の解明

植物ウイルスは、感染した宿主植物に適応するため進化戦略を動的に変化させる。この進化機構の解明は、農業現場におけるウイルス病の防除対策や抵抗性品種の作出などに大きく寄与する。ウイルスは宿主細胞に依存して自己複製と翻訳を行い、伝播様式を媒介生物に依存するものも多く存在する。従ってウイルスは外界とのマルチスケールな相互作用と選択圧のもとで自身の適応度を上げる方向に進化すると考えられる。そのため、進化機構の包括的な理解には分子生物学的手法に代表されるミクロスケールの実験と分子系統学や大規模ゲノム疫学調査などによるマクロスケールの情報解析の融合研究が重要である。しかし、それぞれの手法による研究は個別の報告に留まることが多く、スケールを貫いた融合事例は未だ少ない。分子系統樹は塩基・アミノ酸配列情報をもとに進化の歴史を示す図だが、系統樹構築の手法はベイズ法の導入によって著しく発展した。特に、進化速度を推定する分子時計の概念と形質進化の過程を推定する系統比較法の導入により、分子レベルの遺伝子進化を生物学的解釈の得やすい表現型進化として捉えることが可能になった。植物ウイルスはヒトの病原ウイルスの場合と比べて、感染情報のリアルタイムな追跡が困難であることが多い。そのため、感染動態や病原性獲得過程の理解には系統樹によって構築された進化の道筋をもとに、背後にある進化的制約について仮説を立て、それらを実験的に検証することが有効な研究アプローチとなりうる。本研究では、系統樹を主導とした情報解析から実験までをマルチスケールに貫く系統樹駆動型研究アプローチを確立させ、複数の植物ウイルスを対象としてその進化機構の解明を目指した。

ポティウイルス属は201のウイルス種によって構成される植物RNAウイルス最大の分類群であり、単子葉植物から双子葉植物まで極めて多様な宿主域を持つ。ウイルスの宿主域は、種分岐に沿って系統的に変化してきたわけではなく、進化の過程で何度も独立に獲得・喪失を繰り返している。ウイルス種によって宿主域の広さも様々であることから、植物ウイルスの宿主がどのように決定されるかを一様に解明することは容易ではなく、未だ明らかでないことが多い。ポティウイルス属の１種リーキ黄色条斑ウイルス（leek yellow stripe virus: LYSV）は、ニンニクにおける重要病原ウイルスであり、感染すると鱗片の大きさを縮小させて収量低下を引き起こす。ニンニクは栄養繁殖性作物であり、一度ウイルスが感染すると世代を超えて垂直伝播するため、ウイルスはニンニク集団内で容易に蔓延する。従って、市場で流通しているニンニクの多くが既にウイルスに感染している。LYSV はニンニク以外のネギ属植物でも感染が報告されているが、異なる宿主植物への適応過程や、その背後にある分子機構は明らかにされてない。そこで、LYSV が感染しているネギ属植物を採集し、それら LYSV ゲノム配列の一部を決定後、公共データベース GenBank で利用可能な全ての LYSV ゲノムデータを加え、各ウイルス分離株の採集年代と地理および宿主情報を統合したデータセットを作成した。そして、uncorrelated relaxed clock model を用いてベイズ法による時間系統樹の構築を行なった。その結果、LYSV は P1 遺伝子に 68 アミノ酸の欠失を持つ S-type と欠失を持たない N-type に対応した２つの分子系統グループに 13 世紀ごろ分岐したことが明らかになった。また、birth-death model を用いた適応度推定により S-type の方が N-type よりも高い適応度を持つことが示された。このことは、S-type が N-type よりも広い宿主域を持つという本邦の野生ネギ属植物を対象とした疫学調査、および S-type の P1 タンパク質が N-type に比べて高い RNA サイレンシングサプレッサー（RSS）活性を持つという実験結果によっても支持された。また、N-type の分離株の中にはリーキ特異的に感染する LYSV からなる単系統グループが存在することが明らかになった。リーキの変異種であるジャンボニンニク、およびジ

ャンボニンニクとニンニク、リーキの異種間交雑種を調査すると、リーキ特異的系統グループに属する LYSV 分離株の感染が確認された。しかし、RT-PCR の結果からこれら LYSV 分離株はリーキ細胞内では極低濃度で存在する一方で、ジャンボニンニク、および交雑種の細胞内では、高濃度で存在することが明らかになった。祖先状態復元により祖先宿主の推定を行ったところ、LYSV の共通祖先は分岐初期においてリーキを宿主としていた可能性が高いことが示唆された。そこで、宿主適応における進化方向性を決定する重要因子として、ポティウイルスが持つ主要な RSS タンパク質である P1 と HC-Pro に着目し、アグロインフィルトレーション法によるタンパク質発現系で RSS 活性を定量した。リーキ特異的系統グループに属する LYSV がコードする P1 と HC-Pro をリーキ細胞で共発現させると、ニンニクに感染する LYSV よりも高い RSS 活性を示した。この現象はタマネギと *Nicotiana benthamiana* を宿主として用いた実験では確認されなかった。RSS 活性を変化させることにより、異なる宿主に適応しそれが進化方向性を決定する一因であることを、系統樹情報の解析と分子生物学実験を融合したアプローチにより示した。

また、LYSV と同じポティウイルス属の１種カブモザイクウイルス（turnip mosaic virus: TuMV）と、アレキシウイルス属のニンニク病原ウイルスも研究対象とし、同様の研究アプローチにより進化機構の解析を行った。

アブラナ野菜の重要病原ウイルスである TuMV は、温帯・亜熱帯地域を中心に世界中に広く分布するが、地中海沿岸部を発生中心としシルクロードの痕跡を辿りユーラシア大陸を東に横断してきたと報告されている。TuMV のゲノム配列を用いた時空間的系統地理学解析と組換え解析により、TuMV の本邦への侵入は江戸時代後期であること、東アジアには３つの異なる分子系統グループが存在するが、本邦における TuMV 集団の 90%がそれらの組換え体であることが明らかになった。そして、そのほとんどが日本独自に分布する組換え型であり、TuMV においては組換えが大きな進化推進力となっていることを示した。

アレキシウイルス属は 8 種のウイルスから構成される。ベイズ系統解析により、アレキシウイルス属共通祖先からの種分岐過程初期において、CRP 遺伝子の上流に 10~20 塩基挿入された系統群が出現したことが明らかになった。そして、この挿入領域の有無が、RSS タンパク質である CRP の発現様式と細胞内局在を変化させ、相互排他的な進化方向性を生み出したことを示した。

本研究において、分子系統解析が従来果たしてきた意義を大幅に拡張させ、系統樹を基盤とした情報解析と実験的手法のマルチスケールな融合研究アプローチを確立した。そして、複数の植物ウイルス種を対象に、宿主適応過程、進化推進力、進化方向性の一端を解明することに成功し、系統樹駆動型研究アプローチが広範に有用であることを示した。