

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成18年3月15日発行（隔月1回15日発行）

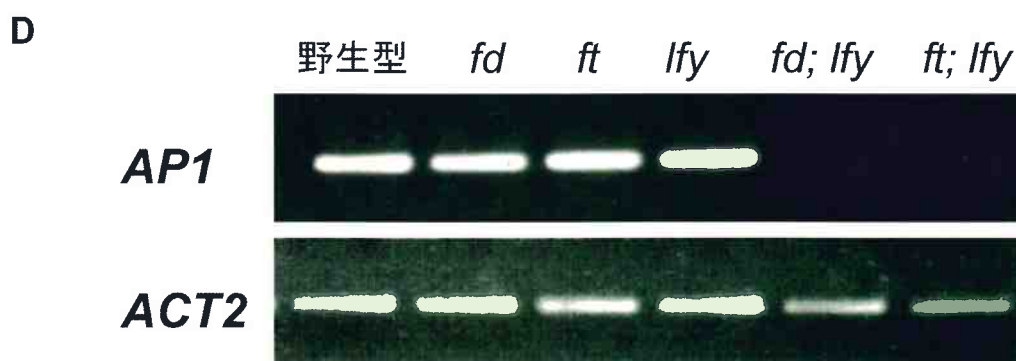
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.114

15 MARCH, 2006

ブレインテクノニュース



*ft; lfy*二重変異体ならびに *fd; lfy*二重変異体の表現型（シロイヌナズナ）

花芽形成メカニズムの理解にむけて

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻
阿部 光知・荒木 崇

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）



目 次

特 集「メタボローム解析」

- 1 メタボローム解析—基本原理と代謝物分析・データ解析技術の現状 1
草野 都¹・斉藤 和季^{1,2} (¹(独) 理化学研究所 植物科学研究センター, ²千葉大学
大学院薬学研究院)
- 2 ツールとしてのメタボロミクス—ゲノム機能科学への応用と今後の展望 7
平井 優美¹・峠 隆之¹・斉藤 和季^{1,2} (¹(独) 理化学研究所 植物科学研究センター,
²千葉大学 大学院薬学研究院)

国内情報

- 花芽形成メカニズムの理解にむけて 13
阿部 光知・荒木 崇 (京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻)
- 生体分子のデジタル精密計測—ライフサーベイヤ 19
松永 是・田中 剛 (東京農工大学 大学院共生科学技術研究院)
- 倒伏抵抗性極強の水稲長稈品種の育成経過および水稲育種における作物学の果たす役割 23
大川 泰一郎 (東京農工大学 大学院農学教育部)
- 森林セラピーの生理的リラックス効果ならびにガン抑制効果 28
李 卿¹・川田 智之¹・朴 範鎮²・宮崎 良文² (¹日本医科大学, ²(独) 森林総合研究所)
- 有毒アオコ原因藍藻ミクロキスティス属に感染するウイルスの発見 33
長崎 慶三¹・高島 ゆかり²・外丸 裕司¹・白井 葉子¹・高尾 祥丈³・広石 伸互²・
吉田 天士² (²(独) 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 赤潮環境部,
²福井県立大学 生物資源学部 海洋生物資源学科, ³甲南大学 大学院自然科学研究科)
- 農業機械の性能と価格の統計的分析 37
大西 正洋 ((独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援
センター)

地域の先端研究

- 低グルテリン米新品種「ゆめかなえ」の育成 41
齋藤 幸一¹・林 玲子¹・西川 康之¹・長島 正¹・渡邊 智子²・土橋 昇² (¹千葉県
農業総合研究センター, ²千葉県立衛生短期大学)

文献情報

- 加熱乾燥精子頭部のウシ成熟卵子細胞質内への顕微授精後の体外での発生能 45
K. B. Lee et al. (*Biology of Reproduction*, 74: 146-152, 2006) 抄訳: 下司 雅也
- 耐塩性モデル植物 ソルトクレス 46
Q. Gong et al. (*The Plant Journal*, 44: 826-839, 2005) 抄訳: 岩井 純夫
- X線小角散乱を用いた, セルラーゼの多面的な立体構造分析 47
V. Receveur et al. (*J. Biol. Chem.*, 277, 40887-40892, 2002) 抄訳: 目瀬 友一朗
- コイ骨格筋由来普通筋及び血合筋の生化学的性状 48
T. Okagaki et al. (*Journal of Biochemistry*, 138(3): 255-262, 2005) 抄訳: 水口 亨

表紙の説明

シロイヌナズナを用いた花芽形成の制御メカニズム解明に関する実験。fd ; Ify二重変異体 (C) では、野生型 (A) と異なり花芽が作られず、ft ; Ify二重変異体の表現型 (B) と酷似しており、花芽形成のスイッチをオンにするAPI遺伝子の発現レベルも著しく低下していた (D)。このことから、FT遺伝子によるAPI遺伝子の発現誘導がFD蛋白質を介してなされることが証明された。詳細については、13頁をご覧ください。

◀特集▶「メタボローム解析」1

メタボローム解析—基本原理と代謝物分析・ データ解析技術の現状

¹独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター²千葉大学 大学院薬学研究院草野都¹・斉藤和季^{1, 2}

メタボロミクスは、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスなどと並び「オーム科学」のひとつであり、ポストゲノム科学として近年脚光を浴びている新規分野である。本分野は創薬・医療分野のみならず、植物分野や遺伝子組み換え生物の研究にも応用されつつある。しかし、代謝産物自体が存在量・物性ともに非常に多様性に富み、その解析にはさまざまな種類の機器分析とバイオインフォマティクスの組み合わせが要求される。本稿では、メタボロミクスの基本原理および解析技術の現状について紹介する。

1. はじめに

20世紀後半から現在にかけて様々な生物の個々の遺伝子およびゲノム解析が進み (<http://www.genomesonline.org/>), 得られた膨大な配列データを基礎としたポストゲノム研究が推進されている。その中で中心をなすのが分子生物学のセントラルドグマに従った各階層でのオーム科学である「トランスクリプトミクス」「プロテオミクス」, そして「メタボロミクス」である。これらの網羅的かつ包括的解析にはバイオインフォマティクス分野との技術融合が不可欠である。核酸やたんぱく質は化学的には比較的シンプルな化学物性を有するため、抽出から解析までの自動化開発が急速に進んだ。しかし、代謝産物はその存在量のダイナミックレンジおよび物理化学的性質が多岐にわたるため、目的とする代謝産物群に応じた抽出法・分析機器の組み合わせが非常に重要になる。さらに各種分析機器から出力されたデータは異なるアルゴリズムから算出されたものであり、マイクロアレイのような一括した解析方法の確立は容易ではない。このような背景の中、現在世界

KUSANO Miyako¹, SAITO Kazuki^{1, 2}¹〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22²〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33

および日本で精力的に行われているメタボロミクス研究の解析技術の説明を通して、メタボロミクスの基本原理および将来性について紹介したい。

2. メタボロミクスデータ取得のための解析技術

(1) 生物材料と試料調製

メタボロミクスでは対象となる生物の全代謝産物群(メタボローム)が、目的とする実験条件因子以外の要因で変動しないように、非常に厳しい環境コントロール下で実験することが不可欠である。サンプリングに関しては生育条件、サンプリング時間および組織・器官の品質についての均一化が求められる。測定に供するまでにしばらく時間を要する場合には、 -80°C での極低温下保存もしくは凍結乾燥後の保存が推奨される。一方、メタボロミクスではトランスクリプトミクスやプロテオミクスに比べて比較的少量のサンプル(植物の場合、数mg)からの分析が可能である。現在の分析技術において機器がもたらす分析技術の変動は非常に小さく($\text{SD} \leq 10\%$)¹⁾, 生物学的変動は通常これよりもはるかに大きい²⁾。メタボロミクス研究を行う上で、これがより多くの生物学的な複数検体

数を必要とする理由である。個々のサンプルが有する生物学的変動を最大限考慮して研究を行う点が、メタボロミクスと他のオーム科学研究との相違点であるといえる。研究コスト面においても、少量サンプルの分析が比較的安価にかつ容易に可能であるため、トランスクリプトミクスやプロテオミクスに比べて実現可能である。また、メタボロミクスといっても様々な分析レベルがある（表1）。故にフィンガープリンティング的解析から詳細解析までどのような研究を行いたいかを研究者自身が熟考した上でパイロット実験を行い、方針を決定することは非常に重要である。

（2）抽出および分画

代謝産物の抽出から分画分析までには、代謝産物の物理化学的性質の多様性、各種異性化合物の存在および各代謝産物のダイナミックレンジ等、考慮しなければいけない多くの因子が存在する。現在のところ抽出方法に関しては、一度に可能な限り多くの化合物を抽出するため一相抽出を選択する場合と、目的とする化合物群の極性に応じて二相抽出するなど抽出条件をカスタマイズする場合がある。さらに用いる分析系の性質（GC-MS, CE-MS, LC-MSおよびNMR等）を考慮したうえで、最終的に抽出方法が決定される。なお、試料破碎後に抽出を行

表1 メタボロミクスの用語と小分類

用語	定義
Metabolome	生物あるいは細胞の中に含まれる生体小分子総体を指す。
Metabolomics	本来のメタボロミクスの定義に最も近い手法。生体内に存在する代謝産物を可能な限り網羅的に定性・定量することを目指す。また、ゲノム機能との対応付けが求められる。
Metabonomics	病態生理学的刺激や遺伝子組み換え等に対する、多細胞システムの経時的代謝反応を定量的に測定する手法。
Metabolic fingerprinting	サンプル間の比較または判別分析を第一目的とし、生物や組織の代謝産物構成についてハイスループットに定性分析する手法。必ずしも代謝物の同定を目的としないため、サンプル調製・分離から測定までをできる限りすばやく行うことが重要視される。しばしば metabolic profiling の予備実験としても用いられる。
Metabolic profiling	生体内に存在する代謝産物の同定および定量分析。現状では物質測定・同定技術の問題より、多変量解析の結果から示唆された代謝産物群もしくは生合成経路上の関連代謝産物群に焦点を絞って行われている。
Targeted analysis	特定の代謝産物に焦点を当てた分析。メタボロミクス解析に続いて行われるか、もしくは目的代謝産物について予備知識を持っている場合に適用される。対象となる代謝産物が微量であることが多いため、しばしば天然物化学的手法を用いた分画操作を必要とし、また目的代謝物に特化した高感度・高選択的な分析が求められる。微量植物ホルモンの分析や特定の代謝酵素遺伝子の機能解析等に用いられている。

う実験系の場合（植物試料・動物器官等），試料破碎ステップについてもその後の抽出効率と再現性に注意を払う必要がある。ミキサーミルを用いて粉碎および抽出を一括して行う方法が主流となっている。

（3）機器分析技術

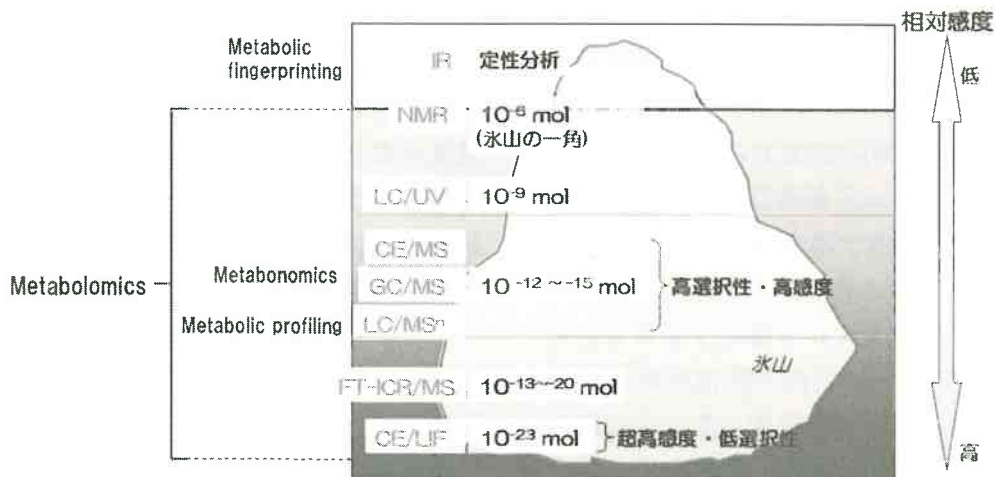
得られた抽出物の分析については，これまで様々な化学分析に用いられてきた各種質量分析計（MS）およびNMRといった各種機器分析法が用いられる。動物での薬物代謝や動態分析に関するメタボロミクスについてはNMRが主要機器として用いられ，代謝産物の多様性が非常に大きい植物メタボロミクスではMSを中心としたメタボロミクス解析が使用される傾向にある。各種機器分析が測定可能なダイナミックレンジは，氷山に例えると理解しやすい。メタボ

ロミクスの小分類と各種機器分析が持つダイナミックレンジとの関連を図1に示す。メタボロミクスの目指すゴールは，「氷山」の全貌を，様々な機器分析から得られるデータの情報を組み合わせることで明らかにすることである。

以下の項目において，メタボロミクスで使用される主な機器分析方法について紹介する。

（4）ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）

GC-MSを用いたメタボロミクス解析は，植物メタボロミクスのみならず他のメタボロミクス分野でも広く適用されている。その理由としては，本法が特定化合物の一斉分析や微量化合物分析に用いられてきた歴史を持ち，様々なピーク分離アルゴリズムが開発されソフトウェアとして普及しているため，一度に数百ピークを



略語

IR: Infrared spectroscopy

NMR: Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

LC/UV: Liquid Chromatography/Ultra-Violet spectroscopy

CE/MS: Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry

GC/MS: Gas Chromatography/Mass Spectrometry

LC/MSⁿ: Liquid Chromatography/Massⁿ Spectrometry

FT-ICR/MS: Fourier Transform – Ion Cyclotron Resonance/Mass Spectrometry

CE/LIF: Capillary electrophoresis/Laser Induced Fluorescence

図1 各種分析技術に対する相対感度の比較と適応メタボロミクス分野 これらの関係について氷山を例として示す。

取り扱うメタボロミクス研究に適していたことが挙げられる。また、誘導体化を行うことによりアミノ酸、糖、有機酸といった極性一次代謝産物を熱安定な揮発性物質に構造変換すれば、一斉分析を行うことが可能である。本来揮発性物質である化合物群に対しても、近年固相マイクロ抽出法自動化システムが開発され、煩雑な操作を行うことなく揮発性物質の一斉分析が可能となった。

GC-MSで最も一般的に用いられている電子衝撃イオン化 (EI) 法は定量性に優れ、気化を伴うGCとの相性が良い。装置を小型化できるというメリットから四重極型質量分析計とEI法を組み合わせたものが広く普及している。近年の高速パルス技術の進歩により、データ取り込み数が向上したため分析時間が短く高分解能で高感度な時間飛行 (TOF) 型を搭載した装置が開発され大きな成果を挙げている。より高分解能の分析を行うために、2次元GC-MSを用いたメタボロミクス法が注目されており、今後の応用が期待される。

(5) 液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS)

LC-MSではGC-MSで通常分析することのできない比較的分子量の大きい不揮発性の代謝産物 (分子量2000程度まで) を測定することが可能である。そのみならず、LC部分のカラム選択と溶媒系、および各種イオン化方法の組み合わせにより、フラボノイドや脂質等、多種多様な代謝産物群に焦点を絞った一斉分析を可能にする。代謝物を分離するカラムクロマトグラフィー部分に関しては、これまで用いられてきた粒子充填型C18逆相カラムクロマトグラフィー技術に加え、親水クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography: HILIC) やモノリス型シリカゲル逆相キャピラリーカラムなどの新型カラムの登場により代謝物分離能が向上し、これまで測定が困難であった化合物群に対するメタボロミクス研究を行うことができるようになった。また、高速液体ク

ロマトグラフィー (HPLC) よりさらに高い圧力で送液を行うことでハイスループットかつ良好な分離分析を可能にした超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) や、前述の高い送液圧力を要しないモノリス型キャピラリーカラムとナノフロー液体クロマトグラフィーを組み合わせた微量分析装置がメタボロミクス分析に応用されている。

分離した代謝産物はそれぞれの極性に応じ、各種イオン化法 [高極性物質にはエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization; ESI) 法, 中極性物質には大気圧化学イオン化 (Atmospheric pressure chemical ionization; APCI) 法, 低極性物質には大気圧光イオン化 (Atmospheric pressure photoionization; APPI) 法] を適宜選択することにより、親イオンもしくは開裂イオン測定を行う。分析計については、非常に高い分解能および感度での測定を可能にする四重極-TOF型や、高感度に精度良くMS開裂パターン分析 (MSⁿ分析) を行うことができるイオントラップ-TOF型等が発売されている。特に、TOF型は非常に高感度・高分解能に正確精密質量を測定できることから、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型分析計 (FT-ICR-MS) と並んでメタボロミクス研究に幅広く導入されている。

(6) キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)

代謝経路中で、解糖系やTCAサイクル等の基礎代謝経路を担っている化合物や多くの基礎代謝系の分岐点に位置するハブ化合物の多くは電荷を有するイオン性化合物 (例えば、糖リン酸、有機酸、アミノ酸、アミン類、ヌクレオチドなど) である。CE-MS分析はそのハイスループット性だけでなく、高選択性・高感度な分析を行うことができ、イオン性化合物の一斉分析が可能とする。現在CE-MSは単一ピークを測定しており、得られる情報は親イオンと保持時間のみであるが、MS/MS分析装置と連結することでMSフラグメント情報を得ることが可

能となり、これまで未同定であった化合物の同定に効力を発揮する。なお、MSイオン分離にはLC-MSと同じく、イオントラップ型、TOF型等、目的に応じた質量分析計を選択できる。また、オリゴサッカライド類の測定³⁾や、誘導体化による炭化水素類の測定も可能となりつつあり、今後の発展が非常に期待される測定技術である。

(7) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT-ICR-MS)

本法 (以下FT-MSと略記) の特徴は、他の測定法に類を見ない非常に高い分解能 (>1,000,000) と高精度測定を可能にする点である。弱点として組成式が同一である位置異性体および幾何異性体の区別は原理的に不可能であること、イオン抑制や付加イオンが生成するという問題が挙げられるが、この問題もあらかじめ各種クロマトグラフィーを用いて分離後解析を行えば、ある程度軽減可能である。現実的な技術融合としては、LC技術とFT-MS技術を組み合わせたLC-FT-MSがメタボロミクス研究分野に適用されつつある。上記のような利点を持つFT-MSであるが、超伝導磁石を必要とするため装置自体が大型かつ高価であり、維持費も高額である。ごく最近、電場型FT-MSが開発された。本装置は従来の磁場型FT-MSと比較して質量精度が若干劣るものの、装置がコンパクトで設置場所に悩まされることもなく維持費も比較的 low です。様々なMS分析を併用することにより、メタボロミクス研究がより高度なレベルに達することを考えると、FT-MSの本分野への普遍的な導入が期待される。

(8) 高分解能核磁気共鳴吸収分光計(NMR)

NMRは特に薬理および薬物代謝分野のメタボロミクス (metabonomics; メタボノミクス) において多細胞システム動態研究を行う際に用いられている。コンピュータによる波形解析やケモメトリクスソフトウェアが充実しているため、得られたスペクトルデータの帰属および代

謝産物の同定をスムーズに行うことができる。MS技術と比較して感度が低いためダイナミックレンジが小さいという欠点はあるものの、代謝物を構成する炭素・水素原子それぞれの結合状態を計測可能であること、核スピンを持つ原子 (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P 等) の情報を得ることができること (多核NMR)、固体そのものを測定可能なこと (magic angle spinning; MAS) 等、NMR測定でのみ得られる情報も多い。感度の問題については、より強磁場 (現在の最高磁場: 21.9T) で動作する高分解能NMRの開発の他に、プローブの検出コイルとプリアンプを低温にすることで熱雑音を減少させ、感度を従来の2~4倍向上できる超低温プローブの開発等、様々な取り組みがなされている。他の技術との組み合わせとしては、LCと連結することで分離・溶出した溶液をNMRで測定するLC-NMR法があり、メタボロミクス研究で実際に使用されている。

3. データ解析: データ変換, バイオインフォマティクスとデータベース

これまで述べてきた各種分析技術により、大量の分析データが蓄積される。従来のターゲット分析と比較して、メタボロミクス分析データは一度に測定する検体数・得られるピーク数が非常に多く、手動でのデータマイニングおよび代謝物同定は現実的に不可能である。NMRデータについてはすでに様々なデータ解析用ソフトウェアが開発されている。しかしMSデータ解析については未だ開発途上であり、新たなソフトウェア開発が望まれている。全くプロセッシング (ノイズ除去やベースライン補正) 等を行わない生データ (クロマトグラム情報) を用い、データ情報のある一定のルールに従って多変量データ行列化する。その行列を多変量解析やその他の統計解析に供することにより、分析した機器に付属しているソフトウェアデータ形式の違いに左右されない *in silico* なデータの取り扱いが必要となる。このようなデータ変換ソフトとしてごく最近数種の商業ソフトウェア

(Profiler, MetAlign等)が開発され、メタボロミクス研究に使用されている。筆者らも、金谷重彦教授(奈良先端大・情報科学)らと共同でMetabolixR(仮称)というデータプロセッシングソフトウェアを開発している。

プロセッシング後のデータ行列に対し、多変量解析によるデータ視覚化および差異を生み出す原因ピーク群の特定が行われる。メタボロミクスデータは他のオーム科学データにおいて使用されているものと同様の手法、主成分分析(PCA)や階層的クラスター分析(HCA)等を用いて解析することが可能である。ここでの説明変数 x はMSデータの場合、それぞれの測定されたMSイオンピーク強度に相当する。タイムコース実験や遺伝子ノックアウトラインのように、あらかじめ目的変数 y に差異があると仮定でき、かつ y が複数の説明変数 x (測定ピーク)によって決定される場合、部分的最小2乗法(PLS)のような回帰分析法が適用可能である。なお、多変量解析と平行して、従来行われている t 検定法や分散分析による有意差検定が実行される。

多くのピークを一括で扱うメタボロミクス研究では、バイオインフォマティクスを駆使した統計処理・データ視覚化ツールの存在と同時にデータベースの構築が不可欠である。得られた代謝物情報はデータベースとして随時蓄積され、代謝物の同定に用いられることになる。GC-MSデータベース(DB)としては、2005年にドイツのMax Planck研究所がGMD@CSB.DBを公開している⁴⁾。本DBは植物代謝物のGC-MS測定データに関するもので、相対保持時間(Retention Index; RI)を基準にデータ管理を行うことにより他の研究グループとの情報共有が可能であり、未知代謝物の情報共有に威力を発揮している。筆者らのグループでも、メタボロミクスを基礎とする統合ゲノム機能科学のツールボックスおよびGC-MS, LC-MSおよびNMRをはじめとする実測データを格納したデータベースであるPRIME(<http://prime.psc.riken.jp/>)の開発を行って

いる。このように、複数のグループがツールボックスやデータベースを提供・共有することでより信用性の高いDBの構築が可能となる。その他、研究ニーズに応じた解析ツールの開発が進むことにより、メタボロミクス研究の発展に大きく寄与すると考えられる。

4. 今後の展望

本稿で述べてきたように高品質の代謝産物分析—情報科学的アプローチとの融合がメタボロミクス研究の両輪である。様々な分析技術を駆使し、得られたデータを統合することで測定可能な代謝産物の質と量の向上を図ることができる。その高品質代謝産物データをデータベースとして世界中の研究グループと共有できるようになれば、ある代謝産物の同定に役立つだけでなく、新たな遺伝子機能(新規酵素や転写因子)を予測したり、新たな遺伝子—代謝産物および代謝産物—代謝産物ネットワークの発見など、これまでのゲノム研究とは異なるアプローチを可能にする。

メタボロミクスはその歴史の幕を開けたばかりであるが、ポストゲノム研究における機能ゲノム科学の一分野として、今後の発展が多いに期待される。将来的には、メタボロミクスが生物をシステムとして理解するシステムバイオロジー研究の発展にも大きく貢献すると期待される。

文 献

- 1) Hall, R.D. et al. (2006) *New Phytologist*, 169, 453-468
- 2) Morgenthal, K. et al. (2005) *Metabolomics*, 1, 109-121
- 3) Che, F. Y. et al. (1999) *J. Chromatogr. A*, 858, 229-238
- 4) Kopka, J. et al. (2005) *Bioinformatics*, 21, 1635-1638

◀特集▶ 「メタボローム解析」 2

ツールとしてのメタボロミクス— ゲノム機能科学への応用と今後の展望

¹独立行政法人 理化学研究所 植物科学研究センター

²千葉大学 大学院薬学研究院

平井 優美¹・峠 隆之¹・斉藤 和季^{1, 2}

メタボロミクスは生命科学者にとっての研究推進の強力なツールになりうる。たとえばトランスクリプトミクスとの統合により、未知遺伝子の機能同定を包括的に行うことが可能である。本稿では、著者らの研究例をもとにメタボロミクスのゲノム機能科学への応用を紹介し、さらに今後のシステムバイオロジーへの展開についても考察する。

1. はじめに

前章ではメタボローム解析の基本について主に技術的な観点から詳述した。本章では、メタボロミクスをツールとして利用する生命科学者の立場で、そのいまできることと今後の可能性について述べる。メタボロームデータは、最終的には化合物IDとそのシグナル強度の一覧表になるはずであり、この点はアレイ解析により得られるトランスクリプトームデータと全く同じと言ってよい。メタボローム解析では、現状では化合物としては未同定のまま蓄積量データ（検出ピークのシグナル強度）が得られることが多いが、実はこれもアレイ解析でアノテーションがunknown proteinとしかつけられない遺伝子について発現データが得られるのと同じである。アレイ解析をディファレンシャルスクリーニングの一種として利用することがあるように、ある条件で蓄積量の増える（減る）代謝産物を探す目的でメタボローム解析をすることも可能であるが、著者らは統計的に有意な変化を示す遺伝子や代謝産物だけをリストアップするのではなく、できるだけ多数の遺伝子や代謝産物のデータを使って植物代謝の全体像を推

HIRAI Masami Yokota¹, TOHGE Takayuki¹,

SAITO Kazuki^{1, 2}

¹〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

²〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33

定しようとしている。

トランスクリプトームデータやメタボロームデータは膨大なデータの中に必ずやいくつもの未発見の生物学的事実を内包しているはずである。このデータの山に埋もれた宝石、つまり何らかの生物学的新知見を発見できるかどうかは生物学者の腕の見せ所であるが、素手で山をほじくり返すのはきわめて困難であり、何らかの道具が必要である。ここでの道具はバイオインフォマティクスであるが、後述するように道具自体がまだまだ開発途上である。必要になったときに、その場面において有用なツールを情報科学者と一緒に生み出す、というのが生物学者にとってのバイオインフォマティクスのあり方であると著者は思っている。あとは努力と根性(!)であり、「必ず発見する」という粘りがデータの山を宝の山に変える。

2. 未知遺伝子の機能同定—比較的探しやすい宝

モデル植物においてはゲノム塩基配列の解読完了によりほぼ全ての遺伝子が明らかになった。植物科学の次なるチャレンジはそれらの機能を解明するゲノム機能科学である。著者らはマイクロアレイによるトランスクリプトームデータとメタボロームデータを統合解析することで、主に二次代謝産物の代謝に関わる遺伝子機

能を包括的に予測する方法論を確立した。二次代謝産物とは、生存に必須な糖やアミノ酸、有機酸、脂質…などを指す一次代謝産物に対する言葉で、生存には必ずしも必要ではないが限られた種の植物が特異的に生産する代謝産物を指す。以下に著者らの2つの研究例を紹介する。

(1) グルコシノレート生合成関連遺伝子群

著者らは硫黄栄養欠乏に対する植物の応答反応に興味を持っている。硫黄は動植物にとって必須元素であり、タンパク質の高次構造形成や触媒作用発現において主要な役割を果たすほか、種々の酸化還元反応に関わる代謝産物やビタミン類などにも含まれ、細胞機能全般において中心的な役割を果たしている。土壌からの硫黄栄養（硫酸イオン）の供給が乏しい場合、植物はさまざまな応答反応を行って正常に生育しようとする。この応答反応の全体像を明らかにする目的で、モデル植物シロイヌナズナを硫黄欠乏処理してメタボロームとトランスクリプトームを経時的に解析した。メタボローム解析は、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析（FT-ICR-MS）をインフュージョン法で行った。この方法では、植物抽出物をクロマトグラフィーによる分離を行わずに混合物のままFT-ICR-MSの装置に導入する。FT-ICR-MSの質量分解能と精度が極めて高いため、シロイヌナズナの場合1サンプルあたり延べ数千個のイオンピークの精密質量（誤差1 ppm以下）を観測することができる。精密質量から組成式を推定し、データベースに照会してそれがどんな化合物であるかを推定する。一方、トランスクリプトーム解析は市販のシロイヌナズナ22kマイクロアレイを使って行った。

冒頭で述べたように、トランスクリプトームデータとメタボロームデータは遺伝子または化合物IDとそのシグナル強度の一覧表という同じ体裁をとっている。本研究では、硫黄十分培地で育てた場合と比べて硫黄欠乏培地で育てた場合に遺伝子発現・代謝産物蓄積が何倍変化したかという値（対数比）を各遺伝子と各代謝産

物について計算し、統合して1つの一覧表にした。本実験は硫黄欠乏処理開始から6点のタイムポイントをとったもので、各遺伝子・代謝産物は6つの対数比が与えられている。つまり縦約22,000行（約20,000遺伝子プラス約2,000代謝産物）、横6列（6タイムポイント）の一覧表を得た。

さて、この一覧表の膨大な数字の羅列から何かを発掘しなければならない。ここではデータを単純化・視覚化するための道具として一括学習自己組織化マッピング法（BL-SOM）という方法を使った^{1) 2)}。これは多変量解析の方法の1つであり、クラスタリング（グループ分け）を行うための精度・再現性ともに優れた方法である。本研究では経時変化のパターンにしたがって遺伝子と代謝産物をグループ分けするのに利用した。この例では結果として得られた“フィーチャーマップ”は40×29の箱からなる格子であり（図1上）、同じ経時変化を示す遺伝子・代謝産物は同じ箱の中に、互いに似た経時変化を示す遺伝子・代謝産物は互いに近くの箱の中に分類された。この箱の中身を確認していくうち、グルコシノレートと呼ばれる代謝産物群が互いに近くの箱の中に分類されていることに気が付いた（図1左下）。グルコシノレート類は主にアブラナ科植物に見られ、病虫害などの忌避作用があるほか硫黄の貯蔵形態であるとも考えられている二次代謝産物である（図2）。さらに、グルコシノレートの分解産物であるイソチオシアネート類が互いに近くの箱の中に入っていることがわかった（図1左下）。これらの蓄積の経時変化をグラフにしてみると、グルコシノレート類のパターンとイソチオシアネート類のパターンはミラーイメージになっており（図1右下）、グルコシノレート類の代謝が硫黄欠乏条件下で同調的に制御されていることを示していた。

代謝産物が同調的に変化しているのならば、それに関わる遺伝子発現の変化も同調的なはずである。そこで次にグルコシノレート生合成酵素遺伝子群がフィーチャーマップ上でどこに分

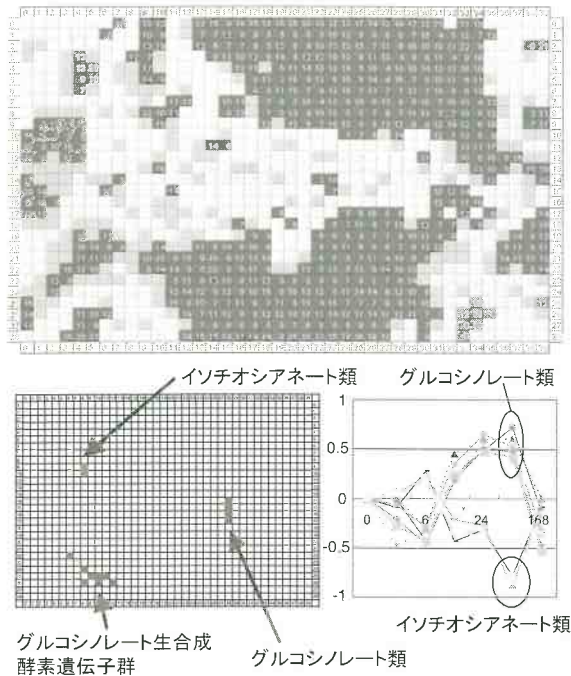


図1 (上) BL-SOMの結果として得られた
“フィーチャーマップ”

(左下) 上のフィーチャーマップ上でグルコシノレート類、イソチオシアネート類、グルコシノレート生合成酵素遺伝子群が分類されている箱を色つきで示す。

(右下) グルコシノレート類とイソチオシアネート類の蓄積量（通常条件に対する対数比）相対値の経時変化を示す。

類されているかを調べた。シロイヌナズナではグルコシノレート生合成の主経路上の酵素遺伝子の主なものが同定されており、これらは互いに近傍に分類されていた（図1左下）。このことは、硫黄欠乏条件下でグルコシノレート生合成酵素遺伝子群が同調的に制御されていることを示している。これらの遺伝子群とフィーチャーマップ上で同じ箱に分類される遺伝子の中に、putative sulfotransferaseというアノテーションの付いた遺伝子が3つ存在した。シロイヌナズナゲノムには18個のputative sulfotransferase遺伝子が存在するがその大部分が機能未知であった。本結果およびputative sulfotransferase遺伝子の分子系統樹から、我々が注目した3遺伝子はデスルホグルコシノレートを基質とするsulfotransferaseをコードすることが予測された（図2）。そして実際、同遺伝子の組換えタンパク質を用いた*in vitro*活性測定で、この予測が正しいことが証明された³⁾。本研究からは上記3遺伝子のほか、転写制御因子を含むグルコシノレート生合成関連遺伝子が多数予測されており、現在そのひとつひとつについて分子生物学、生化学、逆遺伝学などの手法で予測機能の検証実験を行っている。

本研究のポイントは、分析対象（遺伝子、代謝産物）を事前に特定しない非ターゲット解析によって特定の代謝経路に関わる代謝産物群と遺伝子群を包括的に明らかにしたことにある。この同じデータの山にはまだまだ多くの宝石が眠っているはずであり、実際、知識を補充して臨むたびに新たな発見がある。

(2) フラボノイド糖転移酵素・アシル基転移酵素遺伝子群

著者らはまた、上記とは独立にフラボノイド類の生合成に関する研究を行っている。フラボノイドの一種であるアントシアニン類は、植物にとっては強光から細胞を守ったり花卉に着色して受粉者を誘引したりするなどの機能を持つ赤-紫色系統の色素である。形質転換により導入されたエンハンサー配列の働きで*myb*様転写因子遺伝子*PAP1*を過剰発現するシロイヌナズナ*pap1-D*株は、アントシアニンを過剰蓄積しており、アントシアニン生合成酵素遺伝子のいくつかが高発現していることが報告された⁴⁾。しかし他の大多数の遺伝子発現や代謝産物蓄積の変化は不明であった。著者らは、ひとつの転写因子の過剰発現がトランスクリプトームおよ

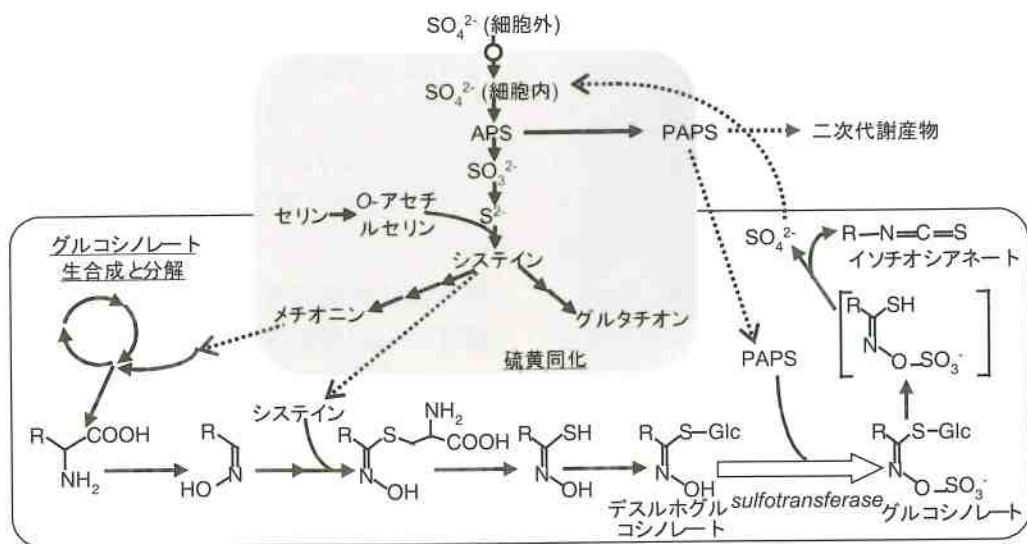


図2 グルコシノレート合成・分解経路と硫黄同化経路
PAPS：3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸。

びメタボロームに与える影響を解明するモデルケースとして、*pap1-D*株およびPAPI-cDNAをカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター制御下で構成的に発現する形質転換株をいくつかの条件下で栽培し、その葉と根のメタボロームをFT-ICR-MSで、トランスクリプトームを22kマイクロアレイで解析した。またフラボノイド類にターゲットした一斉分析をLC-フォトダイオードアレイ(PDA)-MSを用いて行った⁵⁾。

トランスクリプトーム解析からは、PAPI遺伝子転写産物の過剰蓄積により発現誘導を受けるのはアントシアニン類の生合成や蓄積に関与する少数の遺伝子のみであることがわかり(図3上)、PAPI転写因子による制御の特異性が明らかになった。FT-ICR-MSによるメタボローム解析結果もこれを裏づけ、代謝産物蓄積の全体的なプロファイルは野生株と比べてほとんど変化していなかった。一方、フラボノイド類のターゲット一斉分析の結果からはアントシアニン生合成に関する詳細な知見が得られた。第一に、シロイヌナズナの葉では、シアニジン骨格を有しその水酸基の配糖体化やアシル化の種類と程度が異なる11種のアントシアニンが蓄積

することがわかった(図3下)。その多くはこれまでに報告のない新規代謝産物であった。第二に、野生型株と*pap1-D*株およびPAPI-cDNA発現株の器官別のトランスクリプトームデータとメタボロームデータ(とりわけフラボノイド類の一斉分析データ)を1対1対応することにより、上記11種のアントシアニン類の配糖体化およびアシル化に関与するglycosyltransferase遺伝子およびacyltransferase遺伝子をほぼすべて推定することができた。シロイヌナズナゲノムはputative glycosyltransferase遺伝子およびputative acyltransferase遺伝子をそれぞれ107個および64個持っており、さまざまな代謝産物の糖転移・アシル基転移反応をそれぞれ触媒していると考えられるが、どの遺伝子が何を基質としているかについては不明な点が多かった。しかしながら本研究の結果で、それらのうちの特定の遺伝子のみが発現誘導を受けていたため、アントシアニン生合成に関わる6つの転移酵素遺伝子の特定が可能となった。また各サンプルによって11種のアントシアニン類の蓄積パターンや転移酵素遺伝子の発現パターンに違いがあり、それぞれのトランスクリプトームデータ・メタボロームデータを1対1対応すること

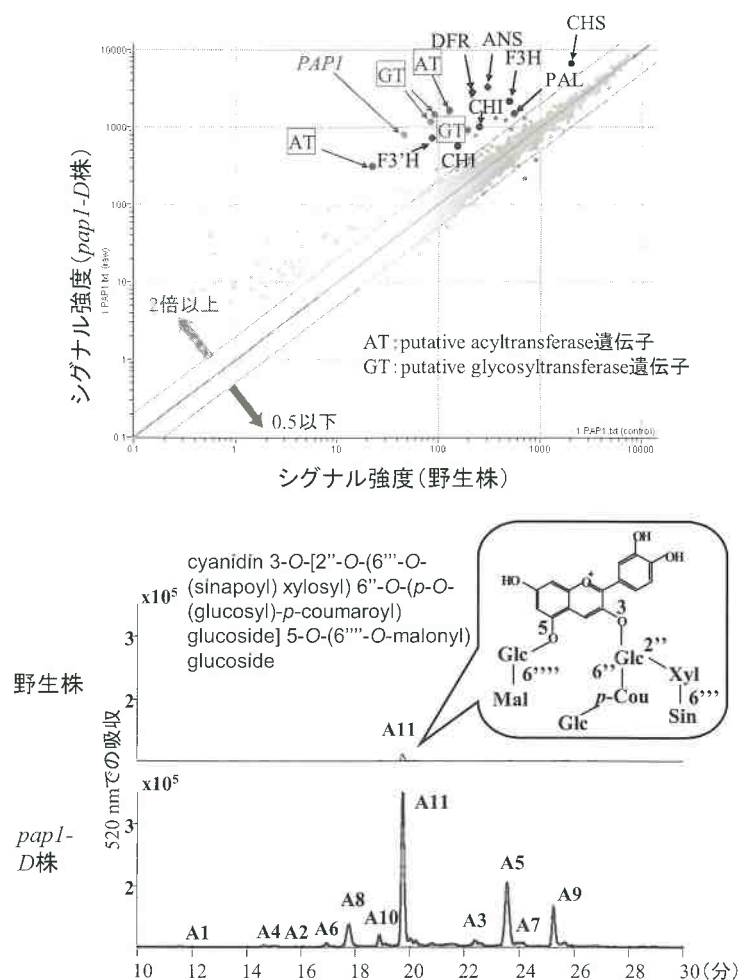


図3 (上) アレイ解析により明らかになった *pap1-D* 株での遺伝子発現変化
PAL, CHS, CHI, F3H, F3'H, DFR, ANSはいずれもアントシアニン合成酵素遺伝子を示す。

(下) LC-PDA-MSにより得られた波長520nmでのクロマトグラム

A1～A11はそれぞれアントシアニン類の異なる分子種をあらわす。シロイヌナズナの葉で検出されたアントシアニン類のうち、配糖体化やアシル化の程度の高い分子種 (A11) の構造を示す。Glc: グルコシル基, Xyl: キシロシル基, Mal: マロニル基, p-Cou: p-クマロイル基, Sin: シナポイル基。A1～A10はA11の修飾基のいくつかが付加していない生合成中間体であると考えられる化学構造であった。

で6遺伝子についてそれぞれがどの転移反応を触媒するかという機能を予測することができた。その機能予測の正しさは、生化学的および逆遺伝学的実験ですでに4つについては証明し(未発表データを含む)、残り2つについても検証中である。

以上(1),(2)の2つの研究例で示した方法は他のさまざまな実験系に応用できる。アレイが利用できない植物種についてもcDNA-

AFLP, デイファレンシャル・ディスプレイ, PCR-セレクトサブトラクションなどによりトランスクリプトームデータを得ることで未知遺伝子の機能を推定することができる。

3. 代謝ネットワークの解明—まだ見ぬ宝を求めて

上記で示した2つの例はいずれも二次代謝産

物生合成に関わる遺伝子の機能予測であった。二次代謝産物の植物にとっての役割を考慮すると、それらは必要なときにいっときに大量生産すべきものであると思われ、その蓄積量の増減は主に生合成関連遺伝子群の同調的転写制御によりなされていることが多いと考えられる。このような代謝経路では、転写産物プロファイルが代謝産物プロファイルを規定しているために「わかりやすい」データが得られる。つまりトランスクリプトームデータとメタボロームデータの対応により遺伝子機能予測や代謝産物同定が比較的容易に行え、代謝制御機構も推定できるのである。

これに対し、例えば炭素代謝などの生命活動の根幹をなす代謝経路では、環境の変動に対して頑強であること（ロバストネス）が重要である。そのため転写レベルの制御のみならず、転写産物の安定性・タンパク質への翻訳速度・タンパク質の分解速度・酵素活性などのさまざまなレベルでの制御による微調整が必要となる。また代謝フラックスの制御も重要な要素である。これらの制御はおそらく、それぞれ数千～数万種の転写産物・タンパク質・代謝産物の各々が相互に影響しあうことでなされている。それらを解明する手がかりの一部はトランスクリプトームデータやメタボロームデータの中にも隠されているはずであるが、人間の頭脳だけでは完全には理解できないほど複雑であろう。代謝フラックスの増減に関しては、現在のメタボローム解析技術で得られる代謝スナップショットデータだけでは解析できない。それらの解明に向けての情報科学からの先駆的アプローチやフラックス解析手法もあるが、植物個体全体を理解するための道具立てとしてはまだまだ発展途上である。分析化学・分子生物学・情報科

学など複数の学問領域の垣根を越えた方法論、いわゆるシステムバイオロジーの方法論の開発が急務である。生命をシステムティックに理解するための取り組みにおいて、メタボロミクスはこれまでになかった新しい切り口での豊富な情報を与えるだろう。

4. おわりに

オーム科学により得られる膨大なデータをまるごと放り込めば未発見の生物学的事実をたちどころに明らかにしてくれる、という便利な道具はあり得ない。コンピューターは人間がつくった判断基準にしたがって計算をするだけであり、真に新しい知見はやはり人間の目で地道に見つけるしかないからである。分子生物学や生化学、順・逆遺伝学などによる個別研究にもとづいたバイオインフォマティクス開発、それを利用したオーム科学による全体像の予測、そしてまた要素を扱う個別研究に戻って予測の検証…というスパイラルがポストゲノム研究のあり方であろう。

文 献

- 1) Kanaya, S. et al (2001), *Gene* 276, 89-99
- 2) Abe, T. et al. (2003), *Genome Res.* 13, 693-702
- 3) Hirai, M. Y. et al. (2005), *J. Biol. Chem.* 280, 25590-25595
- 4) Borevitz, J. O. et al. (2000), *Plant Cell* 12, 2383-2394
- 5) Tohge, T. et al. (2005), *Plant J.* 42, 218-235.

◀国内情報▶

花芽形成メカニズムの理解にむけて

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻

阿 部 光 知 ・ 荒 木 崇

植物は、光や温度といった環境情報を手がかりに花を咲かせる時期を決定している。なかでも、光（日長）に対する反応は光周性の発見の契機となった現象であり、古くから多くの植物研究者の興味を集めてきた。しかしながら、今日に至るまで、そのメカニズムは長距離花成刺激（フロリゲン）の分子の実体も含め、多くが謎のまま取り残されている。本稿では、シロイヌナズナを用いた最近の研究によって明らかにされつつある、日長に依存的な花芽形成のメカニズムに関して、新たな知見を紹介する。

1. はじめに

花成（flowering）と呼ばれる現象は、栄養成長から生殖成長への発生プログラムの切り換えを指し、茎頂分裂組織からは、栄養器官（葉）に替わり、生殖器官（花芽）が形成されるようになる。適切な時期に花を咲かせることは、植物の繁殖戦略上も極めて重要な点であり、外的（温度、日長など）・内的（植物ホルモン、齢など）要因によって、複雑かつ精妙に制御されている。なかでも、適当な日長に晒された植物が花芽を形成する光周性花成のメカニズムは、葉で作られた花成刺激（フロリゲン）が茎頂部に運ばれ、花芽形成を誘導するためと考えられてきた。

近年のシロイヌナズナを用いた研究によって、花成を制御する複数の経路ならびに、それらの制御経路からの情報を統合する遺伝子（経路統合遺伝子）の存在が明らかにされている^{3), 14)}。われわれは、経路統合遺伝子の一つである *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 遺伝子が、光周期依存的な花成制御経路において鍵となる転写調節因子 *CONSTANS* (*CO*) の標的遺伝子であり、光周性花成における重要な花成促進因子であることをこれまでに報告してきた⁹⁾。以下に、長日植物シロイヌナズナが日長を葉で感

ABE Mitsutomo, ARAKI Takashi

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

知してから花芽の形成を実行するまでの過程について、長距離花成刺激の実体である可能性を秘めた *FT* 遺伝子を中心に、その分子機構の一端を紹介する。

2. 光周期制御経路における *FT* 遺伝子の位置づけ

FT 遺伝子は、温度や日長といった複数の環境情報の収束点に位置づけられるが、さまざまな環境情報の中でも、特に日長を感知して花を咲かせる過程において主要な役割を果たしている¹¹⁾。*FT* 機能喪失変異体は、花成誘導条件である長日条件下で花成促進効果を示さないために、遅咲きの表現型を示す。さらには、*FT* 遺伝子の過剰発現植物は光周期非依存的に早咲きの表現型を示すことから、*FT* 遺伝子は光周期依存的な花成制御経路における重要な花成促進因子として位置づけられている^{8), 9)}。

FT 遺伝子は、ホスファチジルエタノールアミン結合蛋白質 (PEBP) ファミリーに属する蛋白質をコードしている^{8), 9)}。植物においては、PEBP ファミリーの生化学的機能に関して、現在までほとんど明らかにされていない。一方、*FT* 遺伝子の発現制御に関しては、現在までに次のような結果が報告されている。*FT* 遺伝子の発現は短日条件下ではほとんど観察されないが、長日条件下では子葉ならびに本葉の維管束

篩部において観察される¹⁶⁾。この維管束篩部でのFT遺伝子の転写誘導に直接関わっているのが、CO蛋白質である^{13), 21)}。概日時計と光条件による相互作用の結果、CO蛋白質は維管束篩部に蓄積し、FT遺伝子などの標的遺伝子の転写を活性化することが報告されている^{5), 6), 15), 17), 22)}。

花成生理学では、葉で行われる光周期の受容から長距離花成刺激の産生までの過程（花成誘導）と、茎頂部で行われる花芽の分化過程（花成惹起）が明確に区別されており、両過程を結びつける存在として、長距離性の花成刺激物質の存在が想定されてきた（図3A）。CO遺伝子の発現は茎頂部と維管束篩部において観察されているが、CO機能の組織特異的な回復実験によって、CO機能が必要とされる部位は、茎頂部ではなく、葉の維管束篩部であることが示された²⁾。この結果は、CO遺伝子が、葉で起こる花成誘導過程において鍵となる役目を果たし、長距離花成刺激の産生に関与している可能性を強く示唆することとなった。すなわち、FT遺伝子を含め、CO遺伝子の下流でおこる作用機構の解明が、長距離花成刺激の分子実体の理解につながるものと期待される。そこで、われわれはCO蛋白質の直接の標的遺伝子であるFT遺伝子に注目し、その機能を分子レベルで解明することに取り組んだ。

3. FT遺伝子の機能的パートナーFD遺伝子

われわれは、FT遺伝子の機能を理解するために、FT過剰発現植物の早咲き表現型を利用し、遺伝学的手法によってFTの機能的パートナーを探索することを進めた。その候補として単離された遺伝子がFD遺伝子である。FDは、花成制御に関する遺伝子座としてKoornneefらによってすでに報告されていた遺伝子座である¹¹⁾。fd変異体が示す遅咲き表現型は、比較的弱いものであるが、fd変異はFT過剰発現による極端な早咲き表現型に対しては、強い抑圧効果を示す^{1), 20)}。この結果は、FTが花成を促進するた

めには、FD機能が必要であることを示している。そこで、われわれは、FTの機能的パートナーとしてFD遺伝子をクローニングし、その機能の詳細な解析を行った。

FD遺伝子はbZIP型の転写調節因子をコードしており、FD蛋白質が核に局在することから、FDは標的遺伝子の転写を制御することによって、花成の制御に関わることが予想された^{1), 20)}。一方で、われわれはFT蛋白質の細胞内局在様式を検討している過程において、FT蛋白質が核と細胞質に存在することを発見し、植物細胞内でFT蛋白質とFD蛋白質が共に核に存在し、蛋白質間相互作用することをBimolecular fluorescent complementation (BiFC) 法を用いて確認することに成功した¹⁾。こうした知見から、FTの花成促進機能におけるFD機能依存性は、核内におけるFT-FD間の蛋白質間相互作用に起因し、FT蛋白質は核内でFD蛋白質と結合することでFDの活性を調節し、FDの標的遺伝子を介して花成を促進しているという興味深いモデルがもたらされることになった。

4. FD蛋白質の制御標的

前述のとおり、FD遺伝子は転写調節因子（bZIP蛋白質）をコードしていることから、花成に関わる標的遺伝子の転写を制御していると考えられる。FD蛋白質の直接の転写制御の対象となり、花成の制御に関与しているのはどのような遺伝子なのだろうか？ FD蛋白質の制御標的を探索する上での手がかりとなったのは、花芽分裂組織のアイデンティティー決定が不十分になるleafy (lfy) 変異体とft変異体との間で作成した二重変異体の表現型である。ft; lfy二重変異体は、花芽形成のスイッチをオンにするAPETALA1 (API) 遺伝子の発現が著しく低下しているために、花芽を形作らない（図1）。このことから、FT遺伝子とLFY遺伝子は冗長的に働いてAPI遺伝子の発現を誘導するとこれまで考えられてきた¹²⁾。LFY遺伝子は、植物に特有の転写調節因子をコードしており、直接の制

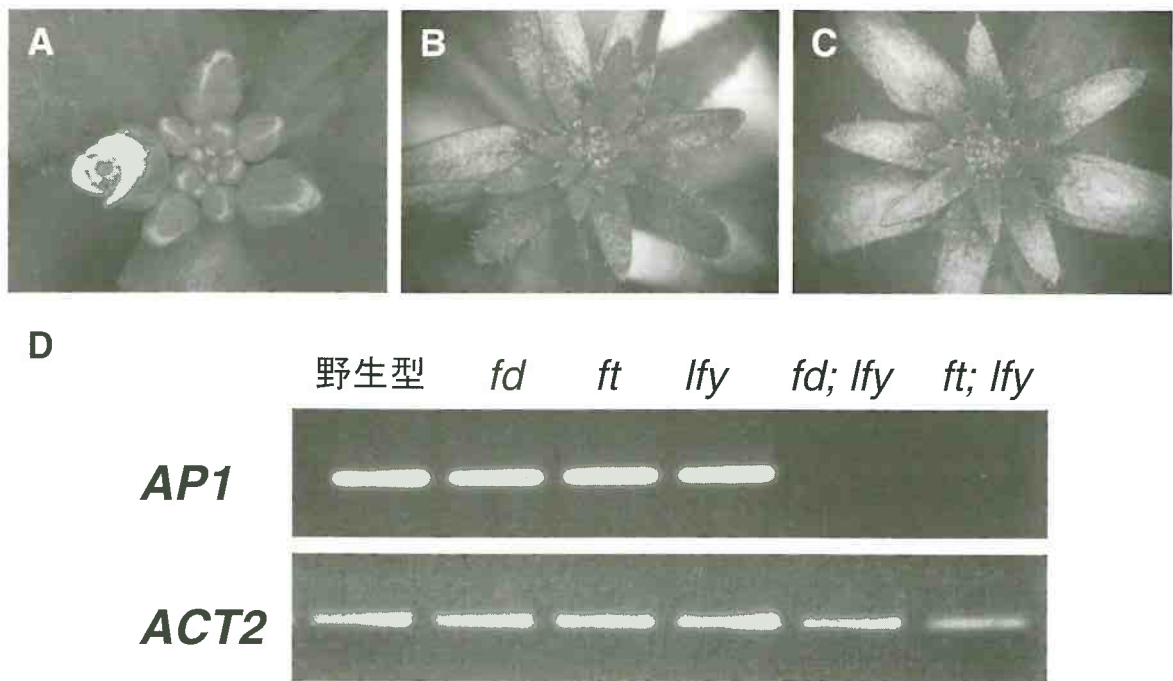


図1 *ft; lfy*二重変異体ならびに*fd; lfy*二重変異体の表現型
野生型植物 (A) とは異なり, *ft; lfy* (B), *fd; lfy* (C) の各二重変異体では花芽が作られず, *API*遺伝子の発現も著しく低下している (D)。

御標的の一つが*API*遺伝子である^{18), 19)}。一方で, *FT*遺伝子が, いかにして*API*遺伝子の発現を誘導するのかは, これまで明らかにされてこなかった。しかし, *FT*が機能するために必要なbZIP転写因子FDの存在が明らかになったことで, *FT*遺伝子による*API*遺伝子の発現誘導が, FD蛋白質を介する可能性が生じてきた。この仮説が正しいものであることは, 実際に*fd; lfy*二重変異体の表現型が, *ft; lfy*二重変異体のそれと酷似しており, *API*遺伝子の発現レベルが著しく低下していたことから証明されることとなった^{1), 20)} (図1)。さらに, FD蛋白質によって*API*遺伝子の転写が誘導されること, *API*遺伝子の転写制御領域にはbZIP蛋白質の結合配列が存在しており, この配列がFDによる*API*遺伝子の発現誘導に重要であることも明らかにされた^{1), 20)}。これらの結果は, *FT*が転写調節因子FDを介して*API*遺伝子の発現を誘導し, 花芽分化を起動するスイッチをオンにしていることを示す大変興味深いものである。

5. FT蛋白質の機能領域

花芽が形成される場合は, 茎頂部において他にはない。前節までで述べたように, *FT*蛋白質がFD蛋白質と結合し, 花芽分化を誘導するためには, *FT*とFDが共に茎頂部で機能する必要性が生じてくる。*FD*遺伝子の発現は発芽直後から茎頂部全体で観察され, 直接の制御標的である*API*遺伝子の発現領域とも重なっている¹⁾。一方, 先に述べたように, *FT*遺伝子は子葉と葉の維管束節部でのみ発現しており, 茎頂部では, その発現が確認されない。この事実にしたがえば, *FT*遺伝子の発現領域 (葉の維管束節部) と, *FT*蛋白質がFDと共に機能する領域 (茎頂部) の間には, 空間的なギャップが存在することとなり, このギャップを埋めるためには*FT*が細胞非自律的機能をもつことが求められる。そこで, *FT*機能の細胞非自律性を検証するために, *ft*変異体において組織特異的なプロモーターで*FT*遺伝子を発現させる実験を行った。

ft 変異体

野生型 ft 変異体

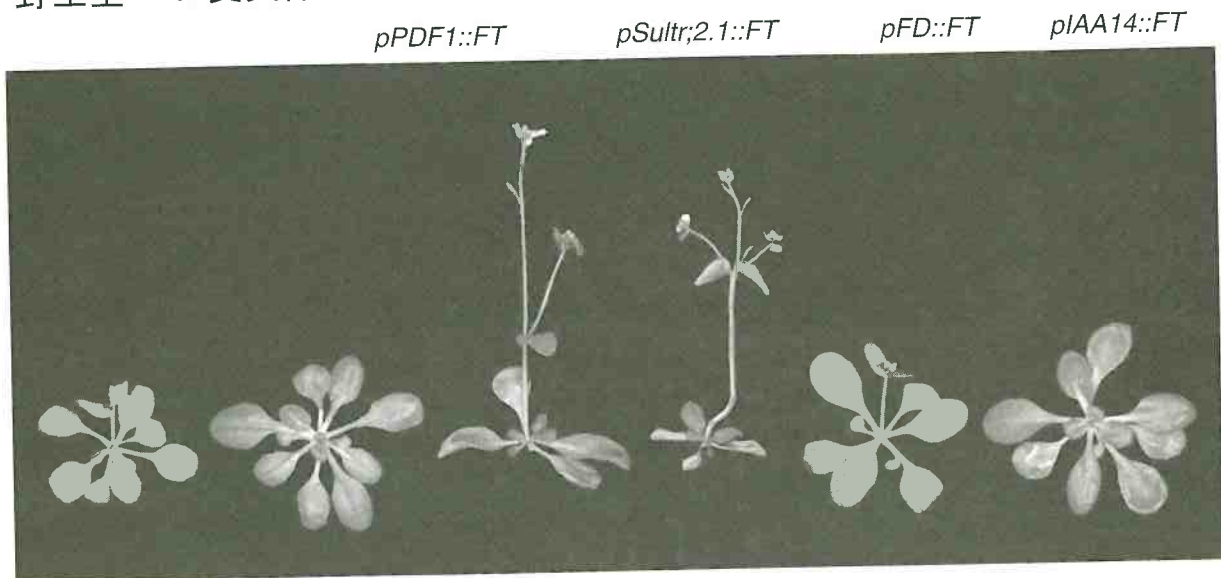


図2 ft変異体における組織特異的FT機能回復実験

ft変異体の遅咲き表現型は、葉の維管束篩部 (*pSultr2;1::FT*)、FD遺伝子の発現領域 (*pFD::FT*)、茎頂部の最外層 (*pPDF1::FT*) においてFT機能を回復させた際には相補可能であるが、根で回復させた場合 (*pIAA14::FT*) には相補することができない。

その結果、本来のFT遺伝子同様に葉の維管束特異的なプロモーターで発現させた場合に加えて、FD発現領域（茎頂部全体）あるいは茎頂部の最外層（L1層）で発現させた場合にも、FT機能を相補し、遅咲き表現型を回復させることができた¹⁾（図2）。一方、FD遺伝子について同様の実験を行うと、FD遺伝子は細胞非自律的機能を示さず、本来の発現部位である茎頂で発現させた場合を除いて、FD機能を相補することができなかつた¹⁾。

これまでの知見を総合すると、子葉、本葉の維管束篩部で発現したFT遺伝子産物は何らかの形で茎頂まで移動し、転写調節因子であるFD蛋白質と核内で結合する。その結果として、FD蛋白質の制御標的であるAPI遺伝子の転写を促進し、花芽形成の初期過程を誘導するという、花成制御におけるFT遺伝子を介した分子機構の輪郭がおぼろげながら見えてくる（図3B）。この一連の過程は、FT遺伝子産物そのものが、

長らく謎であった長距離花成刺激（フロリゲン）の実体である可能性を強く予想させるものであると考えている。

6. FT機能の種を超えた保存性

シロイヌナズナとならぶモデル植物である短日植物イネにおいても、FT遺伝子のオーソログ (*Hd3a*遺伝子) が、光周期依存的な花成制御過程に関わっていることが報告されている^{7), 10)}。FT遺伝子のオーソログは、イネ以外の植物種においても存在することが確認されていることから、シロイヌナズナで明らかになりつつある分子機構と同様の機構が、他の植物種においても存在する可能性が大いに考えられる。今後、複数の植物種において、FTオーソログが関与する花成制御機構が明らかにされ、長距離花成刺激を介した共通の花成制御機構の存在が示されるものと期待している。

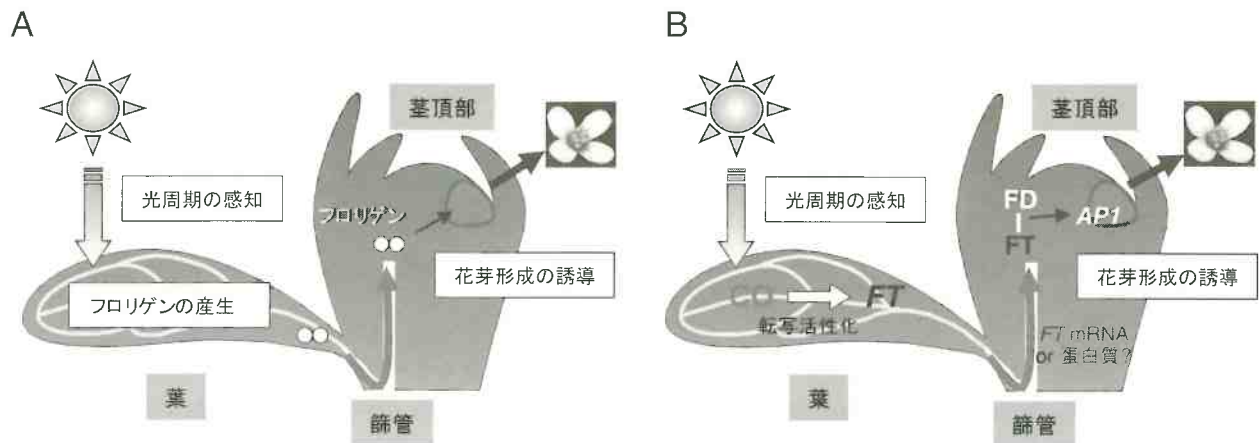


図3 光周性花成の分子メカニズム

(A) 花成生理学によって得られた知見を基に考えられてきた従来のメカニズム。葉で日長が感知された後、葉において「フロリゲン」という未知の物質がつけられ、篩管を通して茎頂部に運ばれ、花芽形成を促す。(B) シロイヌナズナの最新の知見を踏まえて作られたモデル。葉で日長が感知された後、葉の維管束篩部の細胞でFT遺伝子が転写される。茎頂部でFT蛋白質がFD蛋白質と結合し、AP1遺伝子をオンにすることで花芽形成が開始される。FT遺伝子産物が葉から茎頂部に運ばれる経路は、まだ実証されていない。

7. おわりに

近年のシロイヌナズナを用いた花成研究は、その多くが遺伝学的解析に主眼を置いたものであった。そのために、光周性花成の制御過程を明確に区分し、空間的な要素も加味した上で理解に努めてきた花成生理学者には、容易に受け入れがたい側面もあったと推察される。しかしながら、現在シロイヌナズナの花成研究は、単離された各花成制御因子の機能を、組織・細胞レベルで議論する段階にまで成熟しつつある。その結果として、シロイヌナズナの花成研究が、植物科学における長年の未解決問題のひとつに対して、こうして興味深い答えを出そうとしている状況にあるのではないだろうか。筆者らの研究グループの成果から、FT遺伝子産物(mRNAあるいは蛋白質)が長距離作用性の花成刺激の実体である可能性が示され、フロリゲンの分子実体が大きな注目を集めることになった。さらに、われわれの報告に前後して、FT遺伝子のmRNAが葉から茎頂へ移動する可能性を示した論文がスウェーデンのグループによって公表されている⁴⁾。現時点では、FT

mRNAが移動するという決定的な証明および、その移動経路(篩管)についての実験的根拠が不十分であると、筆者らは考えており、今後の課題として、移動する分子の実体(mRNAなのか蛋白質なのか?)ならびに移動の分子機構についての厳密かつ精緻な検証を重ねる必要があると考える。

文献

- 1) Abe, M. et al. (2005), *Science*, 309, 1052-1056
- 2) An, H. et al. (2004), *Development*, 131, 3615-3626
- 3) Araki, T. (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 63-68
- 4) Huang, T. et al. (2005), *Science*, 309, 1694-1696
- 5) Imaizumi, T. et al. (2003), *Nature*, 426, 302-306
- 6) Imaizumi, T. et al. (2005), *Science*, 309, 293-297
- 7) Izawa, T. et al. (2002), *Genes Dev.*, 16,

- 2006-2020
- 8) Kardailsky, I. et al. (1999), *Science*, 286, 1962-1965
- 9) Kobayashi, Y. et al. (1999), *Science*, 286, 1960-1962
- 10) Kojima, S. et al. (2002), *Plant Cell Physiology*, 43, 1096-1105
- 11) Koornneef, M. et al. (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 229, 57-66
- 12) Ruiz-García, L. et al. (1997), *Plant Cell*, 9, 1921-1934
- 13) Samach, A. et al. (2000), *Science*, 288, 1613-1616
- 14) Simpson, G. G. et al. (2002), *Science*, 296, 285-289
- 15) Suárez-López, P. et al. (2001), *Nature*, 410, 1116-1120
- 16) Takada, S. and Goto, K. (2003), *Plant Cell*, 15, 1-11
- 17) Valverde, F. et al. (2004), *Science*, 303, 1003-1006
- 18) Wagner, D. et al. (1999), *Science*, 285, 582-584
- 19) Weigel, D. et al. (1992), *Cell*, 69, 843-859
- 20) Wigge, P. A. et al. (2005), *Science*, 309, 1056-1059
- 21) Yamaguchi, A. et al. (2005), *Plant Cell Physiology*, 46, 1175-1189
- 22) Yanovsky, M. J. and Kay, S. A. (2002), *Nature*, 419, 308-311

◀国内情報▶

生体分子のデジタル精密計測—ライフサーベイヤ

東京農工大学 大学院共生科学技術研究院

松 永 是 ・ 田 中 剛

21世紀に期待される生命科学は、膨大な情報を有機的に統合し、生命現象を統括的に理解することにある。筆者らは個々の細胞内の分子を網羅的かつ定量的に解析する技術、デジタル精密計測技術の開発に着手し、新たなアプローチによる生命理解“ライフサーベイヤ”を目指している。本稿では1細胞中に含まれるmRNAの塩基配列を1つ1つ個別に決定するデジタル精密計測技術を例とし、ライフサーベイヤについて概説する。

1. ライフサーベイヤを目指して

2003年に宣言されたヒトゲノム配列解析完了により、プロテオミクス、バイオインフォマティクスなどポストゲノム技術が今後の生命科学の発展に大きく貢献していくことは間違いない。一方で、21世紀に期待される生命科学はDNAやタンパク質を各々分析するだけでなく、膨大な情報を有機的に統合し、生命現象を統括的に理解することにある。有機的なデータ統合には、人それぞれを個性づけるように個々の細胞の個性を分子1つ1つ計測することにより解析する必要がある。これには全く新たなアプローチが必要である。筆者らはこのアプローチを“ライフサーベイヤ”と称し、次世代の生命工学技術の確立を進めている。これまでは生体組織という細胞の集団から抽出して得られるmRNAやタンパク質、代謝産物を解析することが行われてきた。これは組織の中に含まれる細胞情報の平均値としての生命理解であり、生命活動や機能システムの統合的理解ではない。個々の細胞内の分子を網羅的かつ定量的に解析する技術、デジタル精密計測技術の開発に着手し、1細胞に含まれる種々の分子の動的解析から細胞間の情報交換や相互作用をモニターすることによる生命理解“ライフサーベイヤ”を目指している。

MATSUNAGA Tadashi, TANAKA Tsuyoshi
〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

2. 1細胞内の全mRNAのデジタル精密計測

mRNAの発現解析にはDNAチップ解析が用いられてきた。細胞群から抽出されたmRNAを用いて蛍光の比較解析を行うことで相対的なmRNAの発現量比は得られるものの、定量的ではなく、コピー数の低いmRNAについては検出できなかった。そこでDNAチップを凌駕する定量的な方法として、1細胞から得られる全mRNA (10^6 分子) をメガ/ギガプレートに希釈・分配し、1分子レベルで分配されたウェル内のmRNAの塩基配列を決定することでデジタル精密計測を実現することを目的とした(図1)。mRNAのシークエンス結果は全ゲノムデータベースと照合することで同定することが可能である。さらにウェル内に入ったmRNAの個数をデジタルカウントすることで1細胞内のmRNAを網羅的に解析することができる。ここでヒトゲノム計画を支えた技術に高速DNAシークエンスがある。自動化の進展、蛍光色素の利用、平板型電気泳動部からキャピラリー型への転向を経て、DNAシークエンスの高速化が実現された。このサンガー法に基づく塩基配列決定方法は、現在96本キャピラリー型DNAシークエンスを用いて50万塩基/24hr以上の処理能力を有する。しかしながら、サンガー法を用いて1細胞内の全mRNA (約 10^6 分子) の配列を決定するにはキャピラリー数を 10^6 本

まで増やす必要があり、事実上不可能である(図2)。

3. バイオナノ磁気微粒子を用いた塩基配列決定

近年、サンガー法に代わる新たな塩基配列解析法として塩基の伸長反応をリアルタイムで解析するSequencing by synthesisと呼ばれる手法が報告されている。蛍光標識した各dNTPを基質として伸長反応を行い、反応後の蛍光を計測する方法、塩基伸長の際に放出されるピロリン酸を検出するパイロシーケンシング法などである¹⁾。パイロシーケンシングは塩基伸長反応で放出されるピロリン酸 (PPi) からATP

スルファリラーゼによりATPを合成し、それをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の発光によって検出する方法である。この方法は100~150塩基の迅速かつ正確な配列解析が可能であり、その特徴から長い配列を解読する必要のないSNPs²⁾や16S rDNA³⁾、塩基のメチル化⁴⁾などの解析に応用されてきた。全ゲノムデータからmRNAを同定するためには20塩基程度が解読できればよいため、このパイロシーケンシング法を利用したmRNAのデジタル精密計測開発を行っている。

パイロシーケンシングの反応系では未反応の塩基やその他の基質の洗浄操作が要求されるため、反応場に加えられた遊離状態の酵素の流出は避けられない。そこでパイロシーケンシ

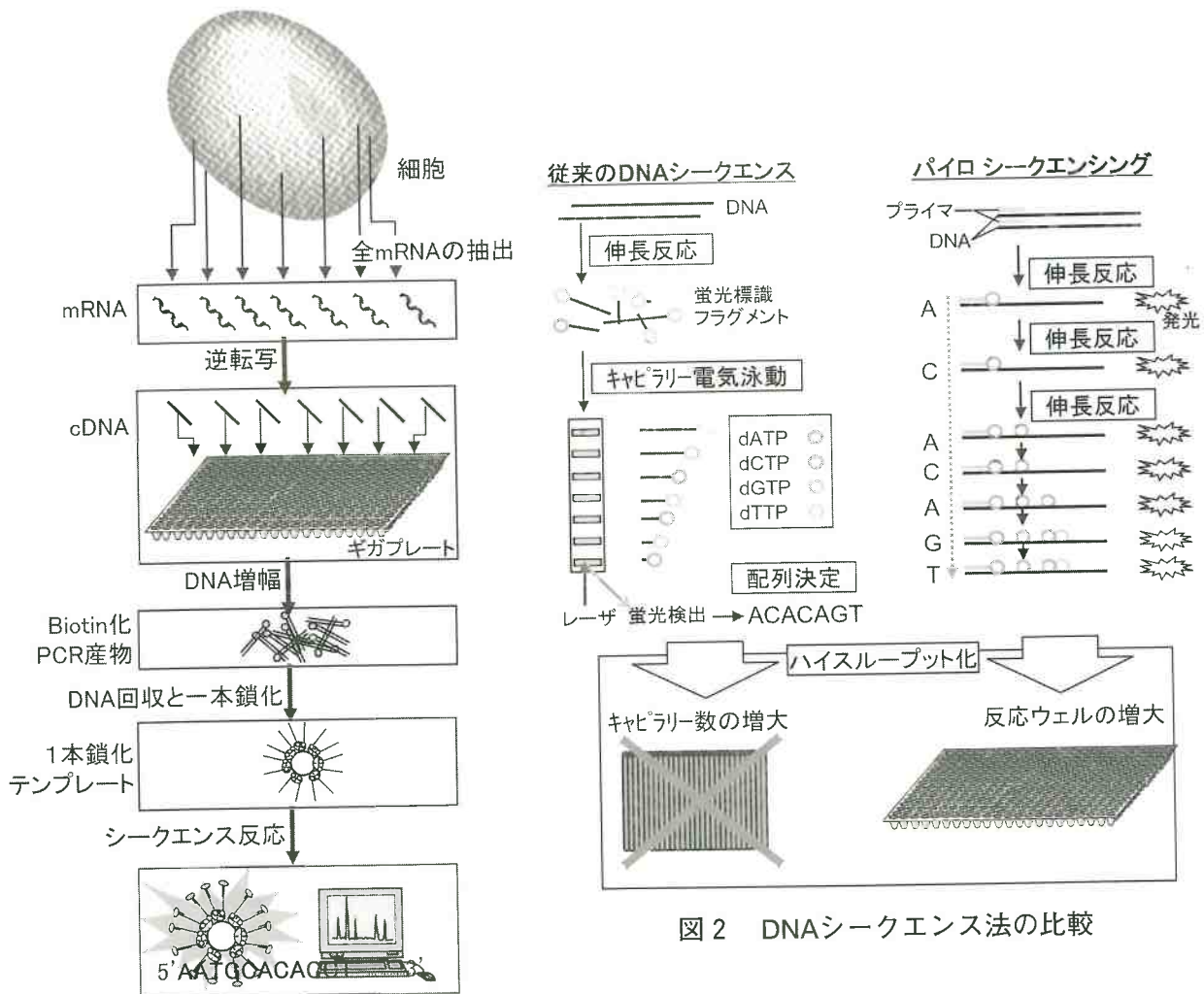


図1 デジタル精密計測に基づく1細胞内の個々のmRNAの解析

図2 DNAシーケンス法の比較

ングに用いる複数の酵素を固定化したナノサイズの磁気微粒子を開発し、プレート内に粒子を磁気固定することで酵素を再利用する技術の開発を行っている。筆者らのグループでは磁性細菌が体内に生合成するナノサイズの磁気微粒子の工学的応用について研究を行ってきた。磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1は菌体内に粒径50~100nmの脂質二重膜で覆われた磁気微粒子を合成する。さらに磁性細菌の遺伝子組み換え技術により、目的とする外来タンパク質を磁気微粒子上へ発現することが可能となっている。具体的には、磁気微粒子膜に局在するタンパク質をアンカー分子として用いて、この遺伝子に外来タンパク質の遺伝子を融合することで酵素や受容体などの様々なタンパク質を磁気微粒子上にディスプレイできることが示されている⁵⁻⁹⁾。これまでにC末端、N末端ともに磁気微粒子膜の外側に配向しているアンカー分子にアセテートキナーゼとルシフェラーゼ

を融合発現した磁気微粒子を創製し、アセテートキナーゼによるATP合成反応、ルシフェラーゼによるATPの加水分解・発光反応を共役した連続発光系の実現が可能であることが示されている。同様にパイロシークエンシングに用いるキナーゼとルシフェラーゼを近接場にディスプレイした磁気微粒子を遺伝子組み換え技術により創製し、パイロシークエンシングにおける発光反応の効率化と酵素の再利用について検討を行っている(図3)。ナノメートルサイズの磁気微粒子を用いることで、メガ/ギガプレート内での極めて微小な反応量(ピコリットルオーダー)での酵素利用が可能である。

4. おわりに

近年、米国立ヒトゲノム研究所は“Thousand-dollar Genome”, “全ゲノムの塩基配列決定にかかるコストを今後10年間で1000ド

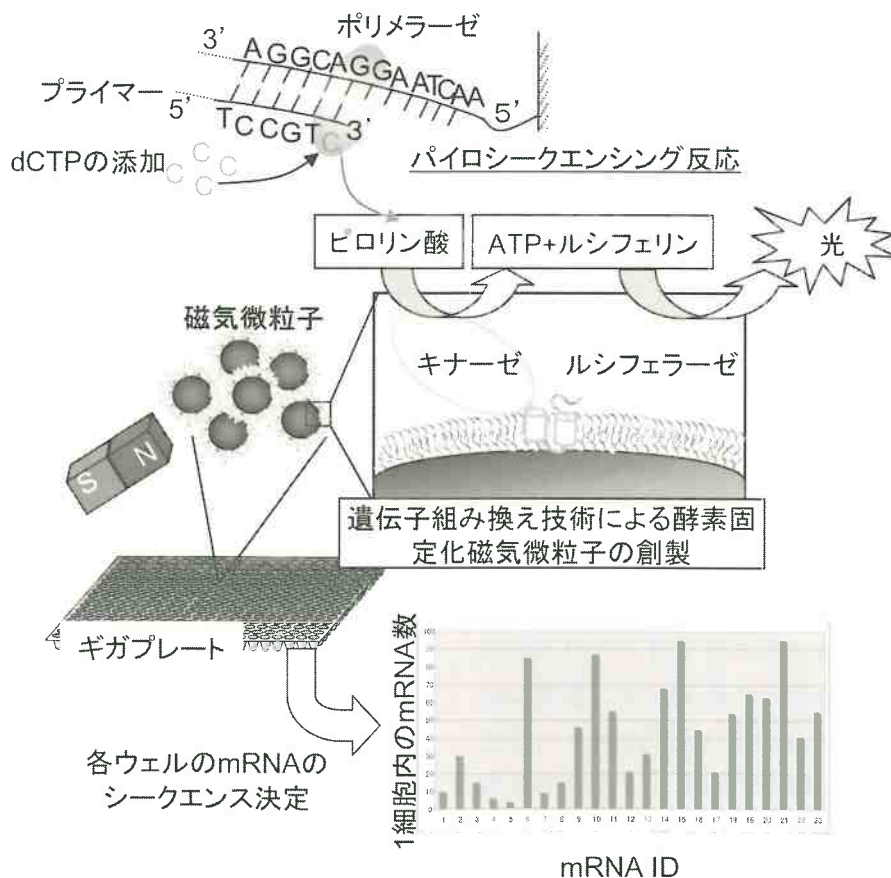


図3 遺伝子組み換え磁気微粒子の創製とmRNAデジタル精密計測への応用

ルに削減すること”を目的としたプロジェクトを立ち上げ、それに関連した技術開発がなされている。Sequencing by synthesisはその一例である。先に述べたサンガー法で全ゲノム解析を行うためには1000万~5000万ドルかかると試算されているのに対し、本稿で述べたパイロシークエンシングなどを用いた解析手法により低コスト化が実現できる可能性がある。将来、個人の全ゲノムシーケンス情報を基にしたテーラーメイド医療を行うための必須技術といえる。ライフサーベイヤは新たな生命理解への道筋をつけるアプローチであるとともに、このような次世代医療・診断を実現するための要素技術の創出がなされる研究領域としても期待される。

文 献

- 1) Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998) *Science* 281, 363-365.
- 2) Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., and Lundeberg, J. (2000) *Ana. l Bioche. m* 280, 103-110.
- 3) Monstein, H., Nikpour-Badr, S., and Jonasson, J. (2001) *FEMS Microbiol Lett* 199, 103-107.
- 4) Yang, A.S., Estecio, M.R., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E.H., and Issa, J.P. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32, e38.
- 5) Tanaka, T., and Matsunaga, T. (2000) *Anal Chem.* 72, 3518-3522.
- 6) Matsunaga, T., Togo, H., Kikuchi, T., Tanaka, T. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* 70 704-709.
- 7) Arakaki, A., Webb, J., and Matsunaga, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 8745-8750.
- 8) Yoshino, T., Takahashi, M., Takeyama, H., Okamura, Y., Kato, F., Matsunaga, T. (2004) *Appl Environ. Microbiol.* 70, 2880-2885.
- 9) Yoshino, T., and Matsunaga, T. (2006) *Appl Environ. Microbiol.* 72, 465-471.

◀国内情報▶

倒伏抵抗性極強の水稲長稈品種の育成経過および
水稲育種における作物学の果たす役割

東京農工大学 大学院農学教育部

大川 泰一郎

東京農工大学と農研機構・作物研究所は、倒伏抵抗性極強の飼料用新品種「リーフスター」を共同育成した。この品種の育成にあたって、日印交雑を含めたいろいろな系統の品種を用い、耐倒伏性に関与する形質の精度の高い検定方法を確立し、この検定法を利用して個体選抜を繰り返す、乾物生産能力の高い長稈品種に極めて強い倒伏抵抗性の付与に成功した。リーフスターのような極強稈性の長稈品種を利用すれば、バイオマス生産量および収量の高い品種の育成が期待できる。

1. はじめに

20世紀後半の水稲多収性品種の育成においては、耐倒伏性、受光態勢および収穫指数を高める目的で短稈化が進められてきた。本学作物学研究室においては、日印交雑など幅広い系統の品種を用いて、多収性品種の備えるべき生理生態的性質を検討している過程で、長稈穂重型品種は草高が高いことにより個体群内の葉の分布密度を表す葉面積密度が小さく、個体群内のCO₂拡散効率のよい個体群構造をもち¹⁾、主茎と分けつ茎の葉の老化が遅く、光合成速度が高く維持される²⁾など高いバイオマス生産をあげうる有利な性質を有することを見出した。長稈品種の倒伏しやすい欠点を克服することを目的に、耐倒伏性の品種間差異をもたらす諸要因を追究、解明し、耐倒伏性に関わる個々の形質について、精度の高い検定方法を確立した。ここでは、この検定方法を用いたリーフスターの育成経過、およびこの品種のバイオマス生産と耐倒伏性について述べ、最後に今後の水稲を含む品種改良における作物学の果たす役割について考察することとした。

2. 水稲の耐倒伏性を支配する要因の解明および耐倒伏性の検定法の確立

水稲の倒伏には、「挫折型」倒伏と「たわみ型」倒伏とがあるが、とくに挫折型倒伏は著しい収量の低下をもたらす。水田における倒伏程度は、主稈の地上部の長さおよび重さの積である地上部モーメントと、主稈基部の伸長節間の挫折強度を表す葉鞘付挫折時モーメントの比である倒伏指数と密接に関係する。日印交雑を含めた国内外多数の品種を用いて、耐倒伏性の品種間差異をもたらす要因を解析した結果、我が国の食用品種は稈がいずれも細く、稈基部の葉鞘付挫折時モーメントが小さく、短稈化によって地上部モーメントを小さくしたことを除けば、稈基部の挫折強度はほとんど改良されていないことがわかった。一方、日印交雑によって育成された我が国の多用途品種や国外の品種では、稈基部の葉鞘付挫折時モーメントが我が国の食用品種に比べて約2倍大きい品種があり、その要因は品種によって異なった。すなわち、①密陽23号、中国117号のように稈の太さを表す断面係数が大きい、②台中189号、台農67号のように稈組織中のリグニン密度が大きく、折れにくい材質であることを表す曲げ応力が大きいことによって、稈の挫折時モーメント（断面係数×

OOKAWA Taiichiro

〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

曲げ応力) が大きい品種, ③アケノホシのように葉の老化が遅く, 葉鞘補強度が大きいことによって葉鞘付挫折時モーメントの大きい品種があることが明らかになった^{3), 4)}。以上のように, 水稲の耐倒伏性はそれを構成するパラメーターに分解でき, 主稈についてそれぞれのパラメーターを正確に測定することによって数値化することが可能であり, この数値化できる検定方法を利用することによって耐倒伏性品種を育成できるのではないかと考えた。

3. 極強稈性長稈品種「リーフスター」の育成経過

開発した耐倒伏性の検定方法により, 多くの品種の中から稈基部の挫折強度を表す葉鞘付挫折時モーメント, 稈の挫折時モーメントの大きい多収系統中国117号をスクリーニングし, 1991年に中国117号を母本, コシヒカリを父本として交配を行った。つぎに, この検定方法を用いて, F₂ 150個体から稈の太さを表す断面係数と折れにくい材質であることを表す曲げ応力がともに大きく, 稈の挫折時モーメントの著しく大きい3個体を選抜した。この性質はF₃にも遺伝し, 遺伝率は高く⁵⁾, このことはこの品種育成ができた一つの要因と考えている。さらに遺伝的な固定を進めるため, 1995年から農林水産省中国農業試験場稲育種研究室坂井真氏らとの共同育成を開始した。その後, 1997年から農業研究センター稲育種研究室, 2002年から農業生物系・特定産業技術研究機構(農研機構)作物研究所多用途稲育種研究室加藤浩氏らにより「関東飼215号」の系統名で飼料用イネとして収量等特性評価試験が行われてきた。2005年に農研機構と東京農工大学との官学共同出願を行い, 11月に農林水産省において「リーフスター」と命名され, 水稲農林413号に登録された^{6), 7), 8)}(図

1)。

リーフスターの黄熟期の地上部バイオマス生産量は風乾重で21.4t/ha, 乾物重で19.1t/haと, 従来の飼料イネ品種と比べて最高水準である(図2)。とくに茎葉部のバイオマスが大きく, 牛が利用できる可消化養分総量(TDN)は1.17t/haと既存育成品種の中で最も高い特性をもつ⁶⁾。

2005年に耐倒伏性に関与する形質について両親と比較した。8月下旬から9月下旬の3回にわたる大型台風の強い風雨によって, コシヒカリは登熟期に挫折型あるいはたわみ型で著しく



図1 水稲農林413号「リーフスター」の稲株
左「コシヒカリ」(父本), 中央「リーフスター」, 右「中国117号」(母本)

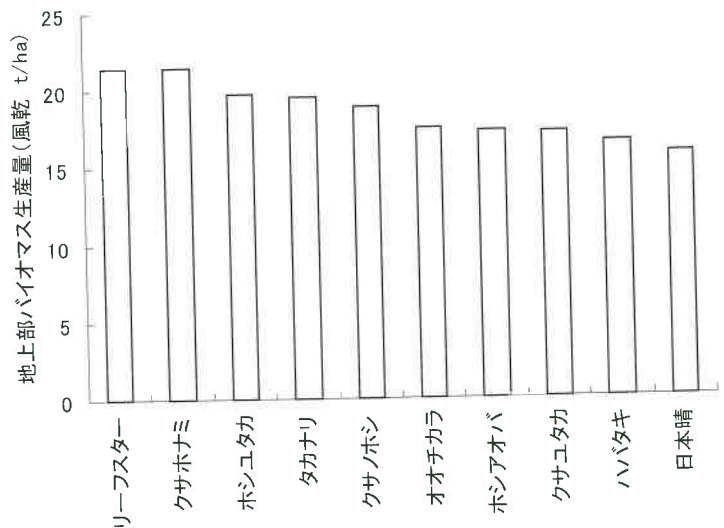


図2 飼料イネ品種の育成地における地上部バイオマス生産量の比較(加藤2006⁶⁾を改変)

倒伏したが、リーフスターは中国117号と同様に収穫まで全く倒伏しなかった。リーフスターの挫折型倒伏抵抗性を表す稈基部の葉鞘付挫折時モーメントは3462g・cmで、コシヒカリより約3.2倍大きく、倒伏指数は最も小さくなった。このリーフスターの葉鞘付挫折時モーメントは、国内外多数の長稈および短稈品種中の強稈品種と比べても、著しく大きかった(図3)。リーフスターの葉鞘付挫折時モーメントが大きいのは、主として稈の挫折時モーメントが2857g・cmと著しく大きいからであった。リーフスターの断面係数、曲げ応力はそれぞれ中国117号、コシヒカリ並に大きく、その結果稈の挫折時モーメントは両親より大きかった。なお、リーフスターはコシヒカリよりリグニン密度が少なくても曲げ応力がコシヒカリ以上に大きい特性をもっていた。たわみ型倒伏抵抗性を表す葉鞘付曲げ剛性は、いずれの節間でも両親に比べて著しく大きかった。

以上のことから、リーフスターは断面係数と曲げ応力がともに高く、稈の挫折時モーメント

は3,000g・cm近くと極めて折れにくい形質を有し、極めて曲がりにくい稈の特性を有していることがわかった。現在、これらの強稈性に関わる形質の生理的解析、および量的形質の発現を支配する遺伝子座(QTL)の解析を行っている。

リーフスターのような極強稈性の高いバイオマス生産能力をもつ飼料イネを利用することにより、水田での粗飼料生産量を高め、ひいては我が国の低い飼料自給率を高め、さらに耕畜連携の循環型農業を通じて耕地の環境保全への貢献が期待できる。

4. 今後の水稲育種における作物学の果たす役割

我が国の水稲品種は、その改良過程において、限られた優良在来品種が繰り返し交配に使われたので、遺伝的に近縁で、品種間の収量やバイオマス生産に関わる性質などの相違は小さい。そのため、このような量的形質に着目して、我

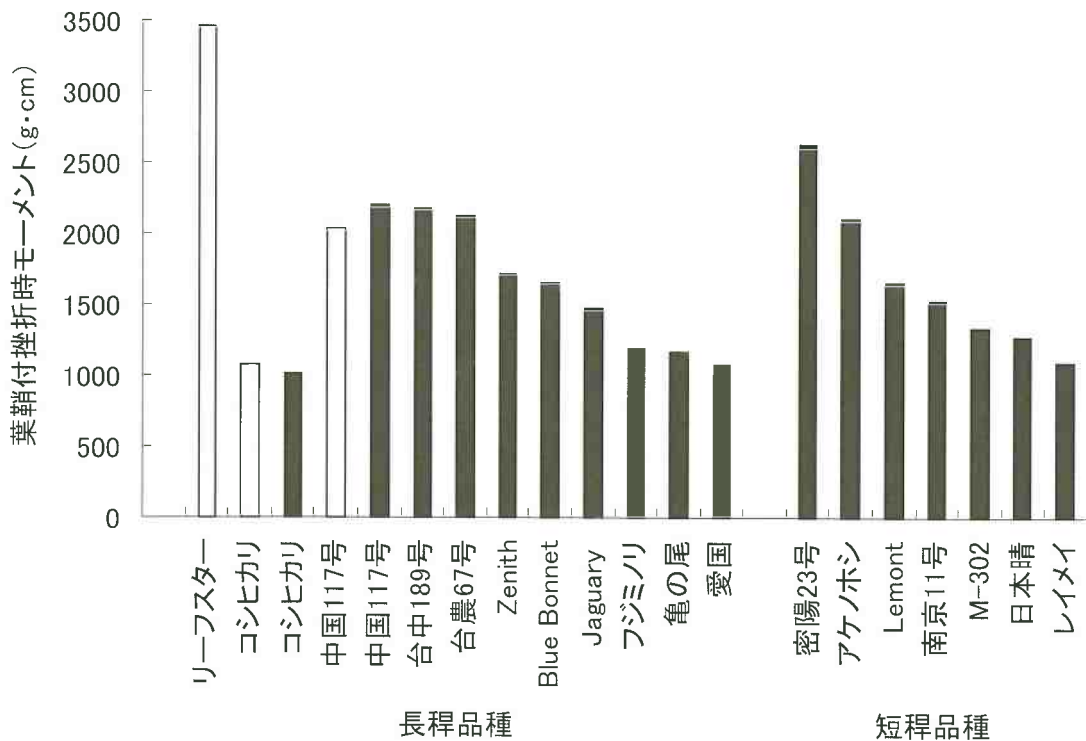


図3 登熟期(出穂後20日)における稈基部第V節間の葉鞘付挫折時モーメントの比較
白棒は2005年、黒棒は1990年のデータ³⁾を示す。

が国で栽培されている水稲の品種間差異を生理生態的に解析し、その検定方法を確立することは著しく困難であると考えられてきた。したがって作物学では、品種改良の基礎としての品種間差異についての研究は、とくに1960年代以降著しく少なくなっていた⁹⁾。

本学作物学研究室では、1980年代に入ってから、我が国の品種だけでなく遺伝的性質が非常に異なる日印交雑品種をはじめ、国外のいろいろな系統を用いて、多収性品種の備えるべき生理生態的研究を始めた。この研究過程で、すでに述べたように、長稈穂重型品種の乾物生産における優れた性質を見出し、この性質を發揮させるために必要な耐倒伏性の形質を明らかにし、その形質の精度高い検定方法を確立する一連の成果をあげることができた。そこで、これらの成果を基礎にして、長稈穂重型で、極強稈性で乾物生産能力が高い品種を育成することを目的に研究を始め、耐倒伏性形質の遺伝力が強かったことにも助けられ、リーフスターを育成することができた。

現在、遺伝的に異なるインド型イネなどを交配親に用いたり、DNAマーカーにより野生イネも含めていろいろな系統のイネから優れた形質を導入する手法が開発され、今まで活用できなかった形質を品種改良に利用できることが可能になっている。このようないろいろな手法を効率的に利用するためには、リーフスターの育成経過からわかるように、作物学的研究手法を駆使して、改良すべき具体的な形質を明らかにし、その形質を選抜するための精度高い検定方法を確立することが必要、不可欠である。すなわち、多くの遺伝子が関与し複雑な遺伝子発現の制御が行われていると考えられる。たとえば多収性、光合成能力、あるいは低温、乾燥などの環境抵抗性などに関わる質的、量的形質を支配する生理生態的要因を解明し、その形質の検定方法を確立することが、現在開発されつつある新しい技術を用いた育種が成功するかどうかの鍵をにぎっているといっても過言ではない。

水稲多収性について、もう少し具体的に述べ

れば、生理生態的研究から、多収性品種の乾物生産が高い要因として、①初期生育が旺盛で乾物生産が高く、出穂前に茎葉に蓄積された同化産物量が多い¹⁰⁾ (南京11号)、②葉が直立し、受光態勢がよい^{11), 12)} (密陽23号, タカナリ)、③草丈が高く個体群内の葉面積密度が小さく、個体群内へのCO₂拡散効率がよい¹⁾ (台農67号)、④葉の光合成能力が高い¹³⁾ (タカナリ)、⑤根の生理的活性が高く根から地上部に運ばれるサイトカイニン量が多いため葉の老化が遅く、光合成速度の低下が小さい^{14), 15), 16)} (アケノホシ)、などが明らかとなっている⁹⁾。

このうち、最も収量の高いタカナリはこれらの性質をいくつか併せもっている^{12), 13)}、この個々の性質に関わる生理的要因を遺伝子および遺伝子の発現制御のレベルまで解析し、その検定方法を確立した上で、これらの性質を一つの品種に集積することにより、バイオマス生産能力が高く超多収の品種育成が可能となると考える。

今後、圃場における個体群から細胞、蛋白、分子レベルまでの生理生態的機能を解析し、解明することを担う作物学と、その精度の高い解析情報をもとに育種方法の開発を含めた品種改良を担う育種学とのコラボレーションに期待したい。

謝 辞

本稿の取り纏めにあたり、東京農工大学石原邦名誉教授には貴重な御助言を賜った。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 黒田栄喜ら (1989), 日作紀, 58, 374-382
- 2) 大川泰一郎ら (1991), 日作紀, 60, 413-420
- 3) 大川泰一郎ら (1992), 日作紀, 61, 419-425
- 4) 大川泰一郎ら (1993), 日作紀, 62, 378-

- 384
- 5) 大川泰一郎ら (1997), 日作紀, 66, 603-609
- 6) 加藤 浩 (2006), 農及園, 81, 169-174
- 7) 東京農工大学HPプレスリリース (2005), <http://www.tuat.ac.jp/social/press/2005/051122.html>
- 8) 農研機構作物研究所HPプレスリリース (2005), <http://nics.naro.affrc.go.jp/press/press-17.html>
- 9) 石原 邦 (1997), 農及園, 72, 555-560
- 10) 齊藤邦行ら (1991), 日作紀, 60, 255-263
- 11) 石原 邦ら (1987), 育種学最近の進歩28, 11-20
- 12) 徐 銀発ら (1997), 日作紀, 66, 42-50
- 13) 徐 銀発ら (1997), 日作紀, 66, 616-623
- 14) 蔣 才忠ら (1988), 日作紀, 57, 139-145
- 15) Soejima, H. et al. (1995), *Plant Physiol.*, 100, 1724-1729
- 16) Ookawa, T. et al. (2004), *Crop Sci.*, 44, 2107-2115

◀国内情報▶

森林セラピーの生理的リラックス効果
ならびにガン抑制効果

¹日本医科大学, ²独立行政法人 森林総合研究所
李 卿¹・川田 智之¹・朴 範鎮²・宮崎 良文²

林野庁は1982年に「森林浴構想」を発表したが、その効果に関する生理的データの蓄積は極めて少ないのが現状である。本稿では、森林セラピーがもたらす生理的リラックス効果ならびにNK（ナチュラルキラー）細胞活性を指標とした発ガン効果を調べた結果を示す。森林セラピーによって、前頭前野活動の鎮静化、副交感神経活動の昂進、ストレスホルモン（コルチゾール）濃度の低下等が認められ、生理的にリラックスすることが分かった。さらに、NK細胞活性の昂進が明らかとなり抗ガン効果も期待できることが明らかとなった。

1. 森林セラピーの生理的リラックス効果

1. はじめに

人は、ヒトとなって500万年経過する。仮に産業革命以降を都市化、人工化と仮定した場合、その99.99%以上を自然環境下で過ごしてきたことになる。自然環境に適応した我々の体が急激な都市化に伴う人工環境に適応できず、常に緊張を強いられるストレス状態にあることは論を待たない。森林等の自然環境要素に触れたとき、強すぎる緊張状態、高すぎる交感神経活動が抑制されリラックスした感じをもつのであろう。人としての本来のあるべき姿に近づき、それが快適感となって認識されるのである。

これまでは、森林セラピーの快適性を論ずる場合、主として、種々の物理測定や質問紙による主観評価を行うことにより、人の快適性増進効果に置き換えてきたのが現状である。それに対し、最近、人の状態の評価法の確立が進み、森林セラピー等の自然由来の快適性増進効果を

Li Qing¹, KAWADA Tomoyuki¹,
PARK Bumjin², MIYAZAKI Yoshifumi²

¹〒113-0022 東京都文京区千駄木1-1-5

²〒305-8687 つくば市松の里1

脳活動、自律神経活動、ストレスホルモン、免疫能等から明らかにできるようになってきた。

これらの進歩を受け、日本では昨年、林野庁が中心となって「森林セラピー基地」構想が作られた。

<http://forest-therapy.jp/>

1982（昭和57）年、22年前に林野庁は「森林浴構想」を発表したが、その効果に関するデータの蓄積は極めて少ないのが現状であった。世界的に見ても他にデータの蓄積はない。

本構想では、森林セラピー基地候補地において近隣の都市部をコントロールとして生理実験を行い、その森のもつ「森林セラピー効果」を明らかにする。その上で基地としての認定を行おうという構想である。本年は36カ所の市町村等から申請があり、書類審査、ヒアリングを経て、10カ所の森林セラピー基地候補地が選定され生理実験を実施した。市町村の活性化を含めた日本の森林全体の利用促進に寄与するものと期待されている。

本稿では、森林セラピーがもたらすリラックス効果ならびにNK（ナチュラルキラー）細胞活性を指標として発ガン効果を調べた実験例を紹介する。

2. 森林セラピーの生理的リラックス効果

1) 千葉県立清和県民の森での森林セラピー実験

昨夏、千葉県立清和県民の森にて、森林セラピー実験を行った。光を用いた脳活動（図1）、血圧、脈拍等の自律神経活動、唾液を用いたストレスホルモン（コルチゾール）濃度等を指標として全身的計測を行った。森の中で座っていたり、歩いていたとき（図2）の生理的な変化を都市部（千葉駅前）と比較したところ、高次の精神活動に関連する前頭前野の活動が鎮静化し（図3）、血圧も低下し、ストレスホルモン濃度も低下することが分かった。つまり、前頭前野を含め全身的に生体が鎮静化することが明らかとなった。さらに、興味深いことに、被験者は、森林に行くか、都市部に行くか知っているだけでストレスホルモン濃度にも前頭前野の活動にも違いが見られたのである。出発前にホテルで一斉に測定を行ったところ、質問紙による主観的な快適感等の気分には差がないにも関わらず両指標とも森林に行くグループでは低下しており、すでにリラックスしていること



図1 森林セラピーにおける脳活動測定風景



図2 森林セラピー歩行風景

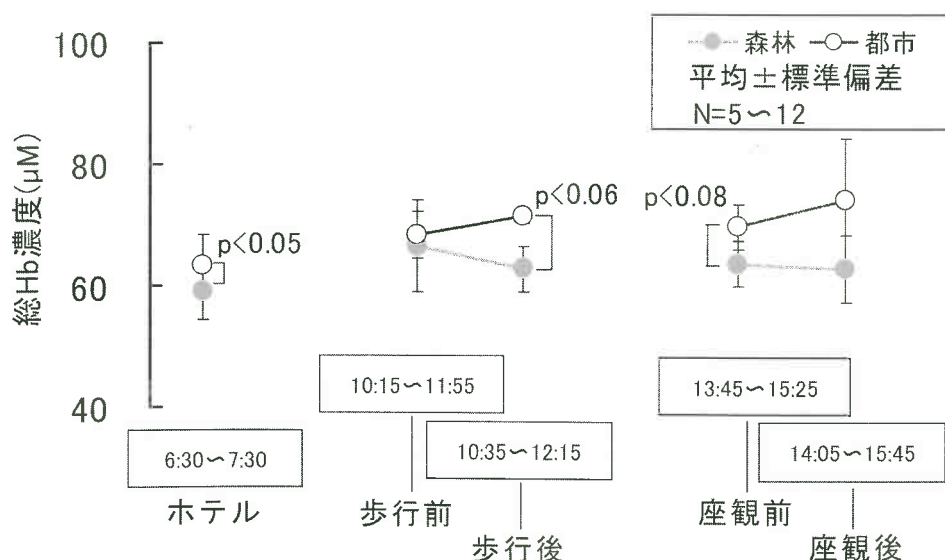


図3 森林浴による前頭前野の活動の鎮静化

朴範鎮他 森林浴の生理的効果(1) - 唾液中コルチゾールならびに脳活動 (TRS) を指標として - (日本生理人類学会誌 9 (2) 44-45 2004)

が観察された。これも感性を介して感じた自然のリラククス効果を生理的に捉えた例といえよう。

2) 森林セラピー基地候補地における生理実験

既に、4月から10月にかけて、10カ所の森林で生理実験を終了しているが、ここでは、データの整理が終了した3カ所について示す。

基本的な実験デザインは測定指標を除き、上記の千葉県での森林セラピー実験と同様とした。測定した生理指標は、1) 心拍変動性(HRV)による交感神経活動、副交感神経活動、2) 唾液を用いた代表的なストレスホルモンであるコルチゾール濃度、3) 同じく唾液を用いた免疫グロブリンA濃度等とした。

①山形県小国町における森林セラピー実験

12名の男子大学生を被験者とし、対照としての都市部実験はJR新潟駅の周辺にて実施した。

その結果、森林セラピーによって、1) 心理的リフレッシュ感が向上すること、2) リラククスしたときに昂進する副交感神経活動が高まること、3) ストレス状態において昂進する交感神経活動は低下すること、ならびに4) ストレス時に高まるコルチゾール濃度は低下することが分かった。

②高知県四万十川上流域における森林セラピー実験

12名の男子大学生を被験者とし、対照としての都市部はJR高知駅前とした。その結果、森林セラピーにおいて、1) 唾液中コルチゾール濃度が低下すること、ならびに2) ストレッサーによって短期的には高まることが知られている唾液中分泌型免疫グロブリンAの濃度が低下することが明らかになった。

③長野県上松町における森林セラピー実験

12名の男子大学生を被験者とし、対照としての都市部は松本市内とした。その結果、森林セ

ラピーによって、1) 副交感神経活動は高まること、2) 交感神経活動は低下すること、3) コルチゾール濃度が低下すること、ならびに4) 免疫グロブリンAの濃度も低下することが認められた。

以上の3カ所の実験データから森林セラピーによって、生理的に生体がリラククスすることが明らかとなった。

II. 森林セラピーによるガン抑制効果

1. はじめに

森林浴は血糖値及び血圧を低下させ、リラククス効果をもたらすことが報告されているが、免疫機能、特に抗がん作用のあるナチュラル・キラー(Natural killer; NK)細胞への影響については不明である。NK細胞は3種類の抗がんタンパク質パーフォリン(Perforin)、グランザイム(Granzyme A, B等)、グラニューライシン(Granulysin)を放出してがん細胞を傷害すると考えられている。まずPerforinががん細胞の膜に穴を開けそこからGranzymeやGranulysinが細胞内に入り、がん細胞のアポトーシス(細胞死)を誘導する。NK細胞の機能が高まれば、生体の抗がん能力も高まると考えられる。

この背景の下に、本研究では森林浴がヒトNK細胞活性及びPerforin, Granulysin, Granzymeに影響を与えるかどうかを明らかにした。

2. 方法

本研究の対象者は、ストレス状態にある東京都内大手企業に勤める37~55才の12名男性社員である。測定項目はクロム解離法によるNK活性の測定、Flow cytometry法によるリンパ球内の抗癌たんぱく質濃度の測定、ELISA法による血中各種インターロイキンの濃度測定、体動計による睡眠状況の計測及び万歩計による

運動量の計測である。本研究は日本医科大学の倫理委員会の審査を受け、承認された。本研究の実施に当たって、全ての被験者から文書でインフォームド・コンセントの手続きを取っている。

対象者は長野県飯山市の森林環境中に2泊3日間滞在し、3種類の森林遊歩道を散策した。初日の朝、新幹線で東京を出発し、午前中現地に着き、午後から最初の2.5キロの森林遊歩道を2時間かけて散策した(図4)。散策については日頃の運動量を考慮した上で、散策コースと距離を設定した。宿泊地は森林遊歩道の近くのホテルとした。2日目の朝8時に採血して、血液を日本医科大学に持ち帰り上記の検査を行った。対象者は引き続き午前2時間、午後2時間ずつ、それぞれ2.5キロの森林遊歩道を散策した。3日目の朝8時に採血して、血液を日本医科大学に持ち帰り同様の検査を行った。また、森林浴前のデータは出発の3日前に採取した。

3. 結果

1) 森林浴がヒトのNK活性を増強させた。

図5は森林浴によるNK活性への効果を示している。棒グラフの左は森林浴前のNK活性を、中央は森林浴後1日目のNK活性を、右は森林浴後2日目のNK活性を示しており、森林浴後1日目と2日目はいずれも森林浴前より有意に高いNK活性を認めた。さらに森林浴後2日目は1日目よりも有意に高いNK活性を示した。具体的には、森林浴前に比べて、森林浴1日目で26.5%、2日目で52.6%増強した。これは森林浴がヒトのNK活性を増強させたことを意味する。

2) 森林浴がヒトのNK細胞数を増加させた。

森林浴はNK細胞数を増加させた。森林浴後1日目と2日目はいずれも森林浴前より有意に高いNK細胞数を示し、さらに森林浴後2日目は1日目よりも有意に高



図4 森林中での休憩風景

いNK細胞数を示した。NK細胞数は、森林浴前に比べて、森林浴1日目で20.7%、2日目で32.5%増強した。これは森林浴がヒトのNK細胞数を増加させたことを意味する。

一般的に運動がヒトのNK活性及びNK細胞数に影響を与えると報告されているが、今回の実験では、各被験者の森林浴時の運動量を平日の運動量に合わせて設定したので、運動によるNK活性及びNK細胞数への影響は排除されると考えられる。また一般的にNK活性は日内変動があると報告されている。この日内変動の影響を排除するために、今回の実験では、採血時間は全ての調査日において朝8時とした。飲酒によるNK細胞機能への影響を排除するために、実験期間中に被験者全員に禁酒してもらった。従って今回の森林浴後のNK活性及びNK細胞数の上昇は森林浴によるものと考えられる。

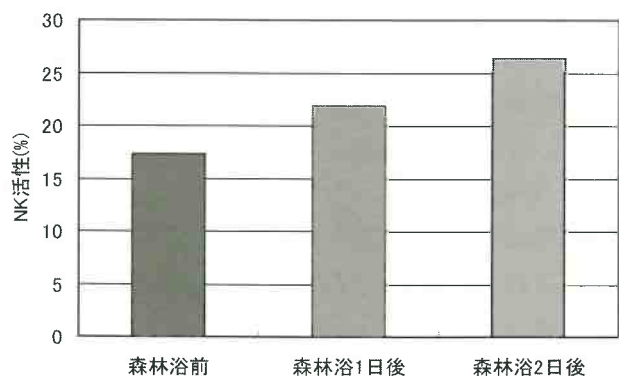


図5 森林浴がヒトのNK活性を増強させる

3) 森林浴がヒトリンパ細胞内の抗がんたんぱく質を増加させた。

森林浴によるNK細胞活性増加のメカニズムを検討するために、細胞内の抗がんたんぱく質 Perforin, Granulysin, Granzyme A/B のレベルを測定した。

森林浴はヒトリンパ細胞内の抗がんたんぱく質のレベルを増加させた。森林浴後1日目と2日目はいずれも森林浴前より有意に高いレベルを示し、さらにGranzyme Aにおいて森林浴後2日目は1日目よりも有意に高いレベルを示した。これは森林浴がヒトリンパ細胞内の抗がんたんぱく質を増加させたことを意味する。

4) 森林浴が末梢血のリンパ球とマクロファージを増加させ、顆粒球を減少させた。

ヒトにおいて副交感神経が優位の状態（いわゆるリラックス状態）では、末梢血のリンパ球が増え、顆粒球が減少すると報告されている。今回の結果は間接的に森林浴によるリラックス効果を実証したといえよう。

結論として

- ①森林浴がヒトのNK活性を増強させた。
- ②森林浴がヒトのNK細胞数を増加させた。
- ③森林浴がヒトリンパ細胞内の抗がんたんぱく質を増加させた。

以上の結果より、森林浴はNK活性を増強させることがわかり、それによるがん抑制効果が期待される。

4. おわりに

現在、林野庁が推進している森林セラピー基地構想の後押しを受け、17年度は全国11カ所で森林浴実験を実施した。18年度は20カ所で実験が予定されており、森林浴に関する生理的データが着実に蓄積されつつある。今日の人工環境下におけるストレス社会において、今後、ます

ます、森林セラピー等の自然由来の刺激の重要性が高まるものと思われる。

文 献

- 1) 宮崎良文, 森林浴はなぜ体にいいか, 文春新書, 文藝春秋, 180pp 2003
- 2) 朴範鎮他, 森林浴の生理的効果 (I) — 唾液中コルチゾールならびに脳活動 (TRS) を指標として—日本生理人類学会誌, 9 (2) 44-45, 2004
- 3) 朴範鎮他, 森林浴の生理的効果 (2) — 1) HRVを指標として—日本生理人類学会誌, 10 (1) 32-33, 2005
- 4) 恒次祐子他, 森林浴の生理的効果 (2) — 2) 唾液中コルチゾールならびに分泌型免疫グロブリンAを指標として—日本生理人類学会誌, 10 (1), 34-35, 2005
- 5) 李妍受他, 生理指標を用いた森林浴の評価 (2) — 唾液中コルチゾールならびに分泌型免疫グロブリンAを指標として—日本森林学会関東支部会講演要旨集 第57回, 14, 2005
- 6) 恒次祐子他, 生理指標を用いた森林浴の評価 (1) — 2) 唾液中コルチゾールならびに分泌型免疫グロブリンAを指標として—日本森林学会関東支部会講演要旨集 第57回, 13, 2005
- 7) 朴範鎮他, 生理指標を用いた森林浴の評価 (1) — 1) HRV (心拍変動性) を指標として—日本森林学会関東支部会講演要旨集 第57回, 13, 2005
- 8) 李卿, 川田智之, 宮崎良文他, 森林浴がヒトNK活性及びリンパ球内Perforin, Granulysin, Granzymeを増加させる。第5回分子予防環境医学研究会抄録集 2005
- 9) Li Q, Miyazaki Y, Kawada T. et al. A FOREST Bathing trip enhances human natural killer activity. 28th ICOH, 2006. Milan, Italy.

◀国内情報▶

有毒アオコ原因藍藻ミクロキスティス属に 感染するウイルスの発見

¹独立行政法人 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所 赤潮環境部,
²福井県立大学 生物資源学部 海洋生物資源学科, ³甲南大学 大学院自然科学研究科
長崎 慶三¹・高島 ゆかり²・外丸 裕司¹・白井 葉子¹
・高尾 祥丈³・広石 伸互²・吉田 天士²

アオコは、湖沼や池などで藍藻が大量に増殖し水が緑色に着色する現象である。ミクロキスティス (*Microcystis*) 属は、世界各地に普遍的に分布するアオコ原因藍藻であり、肝臓毒の一種であるミクロシスチンを産生する^{2), 12)}。筆者らは、ミクロキスティス属に感染し死滅させるウイルス (シアノファージ) を世界で初めて単離することに成功し、その生理学および分子生物学的特性を解明した¹³⁾。本稿では、このウイルスの基本的性状および将来的な研究展望を概説する。

1. はじめに

近年、アオコと呼ばれる藍藻類の大量発生現象が世界中の内水面 (天然および人工の湖沼や池など) で頻発している。なかでも代表的なアオコ形成種として知られるミクロキスティス属は、肝臓毒ミクロシスチン (発癌プロモータ活性を有する環状ペプチド毒素) を産生し、しばしば水源の強毒化の原因となる^{2), 12)}。水源の毒化は人体への健康被害を引き起こすという点で重大であるのみならず、家畜・野生生物のへい死や植物の成長阻害を引き起こすなど、畜産業・水産業・農業の分野においても深刻な問題として認識されつつある^{2), 12)}。1996年にブラジル カルアル市の人工透析センターで発生した中毒事故 (血液透析用の水へのミクロシスチン混入により50名が死亡) は、アオコ毒による人体への健康被害のうち最も悲惨な事例の一つである。またカナダでは、海面養殖のサケのへい

NAGASAKI Keizo¹, TAKASHIMA Yukari²,
TOMARU Yuji¹, SHIRAI Yoko¹,
TAKAO Yoshitake³, Hiroishi Shingo²,
YOSHIDA Takashi²

¹〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5

²〒917-0003 福井県小浜市学園町1-1

³〒658-8501 兵庫県神戸市東灘区岡本8-9-1

死にミクロシスチンが関与しているとの報告 (ミクロシスチンそのものの由来は未解明) がなされ、水産学的視点からのアオコ毒研究の重要性が指摘された^{2), 12)}。こうした事例に鑑み、世界保健機構 (WHO) では、飲料水中のアオコ毒の暫定的なガイドライン値を $1 \mu\text{g/L}$ 以下と定めた²⁾。幸いなことに、これまでのところ、わが国ではミクロシスチンによる人体への健康被害は報告されていないものの、近年、強毒性のミクロキスティス株の出現やアオコ発生池での野鳥の死亡事例が報じられるなど、予断を許さない状況にある⁸⁾。したがって、消費者の水資源・水産資源への信頼を確保するためには、有毒アオコへの具体的な対策の構築が危急の課題であるといえる。

藍藻は光合成を行い増殖する。したがって、藍藻個体群の挙動には、日照・温度などの物理的要因、窒素・リンを初めとする各種栄養塩などの化学的要因、ならびに捕食生物などの生物学的要因が大きく影響すると考えられる^{2), 12)}。一方、近年の研究により、海洋においてウイルスが植物プランクトンの動態を制御する重要な因子であることが明らかとなってきた⁷⁾。例えば二枚貝のへい死を引き起こす海産赤潮プランクトンであるヘテロカプサ・サーキュラリスカーマの消長には、ある種のRNAウイルスによ

る感染が大きな影響を与えることが知られている⁶⁾。しかしながら、アオコ原因藍藻に対してウイルスが及ぼす影響に関する研究事例はきわめて希少であった^{4), 10)}。

こうした背景の下、筆者らは、代表的な有毒アオコ原因藍藻であるミクロキスティス属に対して感染するウイルスを世界で初めて分離・培養し、その性状を解明することに成功した。

2. 新奇シアノファージMa-LMM01

筆者らは、ミクロシスチンを生産するミクロキスティス株 (*M. aeruginosa*) に対して特異的に感染・溶藻するウイルスを自然水中から探索し、その株化ならびに培養系構築を行った。ウイルス株は、ミクロキスティス属によるアオコが頻発する福井県三方湖および京都府広沢池から単離された。得られたウイルス株のうち、代表株 (シアノファージMa-LMM01) の性状を詳細に調べた結果、頭部および尾部からなる典型的なファージ様構造を呈すること (図1 A, B)、ならびに本ウイルスの感染性が株特異的であることが明らかとなった。ウイルス感染後

6~12時間以内に、1個の宿主細胞内で約50~120個の娘ファージが複製され (図1 C, D)、細胞外に放出された¹³⁾。また、ウイルス感染を受けた細胞の核域では、宿主DNAの顕著な分解が観察された (図2)。これらの結果から、本ウイルスは、現場環境中において宿主である *M. aeruginosa* 細胞に感染し、複製しているものと推察された。Ma-LMM01の感染性が株特異的であることから、現場環境中にはおそらく様々な種内宿主特異性を備えたウイルス群が存在しており、それらがミクロキスティス個体群に対して量的および質的な影響 (バイオマスおよびクローン構成の変動に対する影響) を与えているものと予想される^{6), 7), 10)}。

ショットガンシーケンスの結果、本ウイルスのゲノム (約162kbpの直鎖状2本鎖DNA¹³⁾) には、約180個の遺伝子がコードされていることが明らかとなった (長崎ら、未発表)。またMa-LMM01ゲノムは、実験に供試した14種類の制限酵素に対して感受性であったことから、ゲノム構成塩基のメチレーション頻度は低いと予想された¹³⁾。BLASTサーチを用いた相同性解析の結果、詳細なゲノム解析がなされている

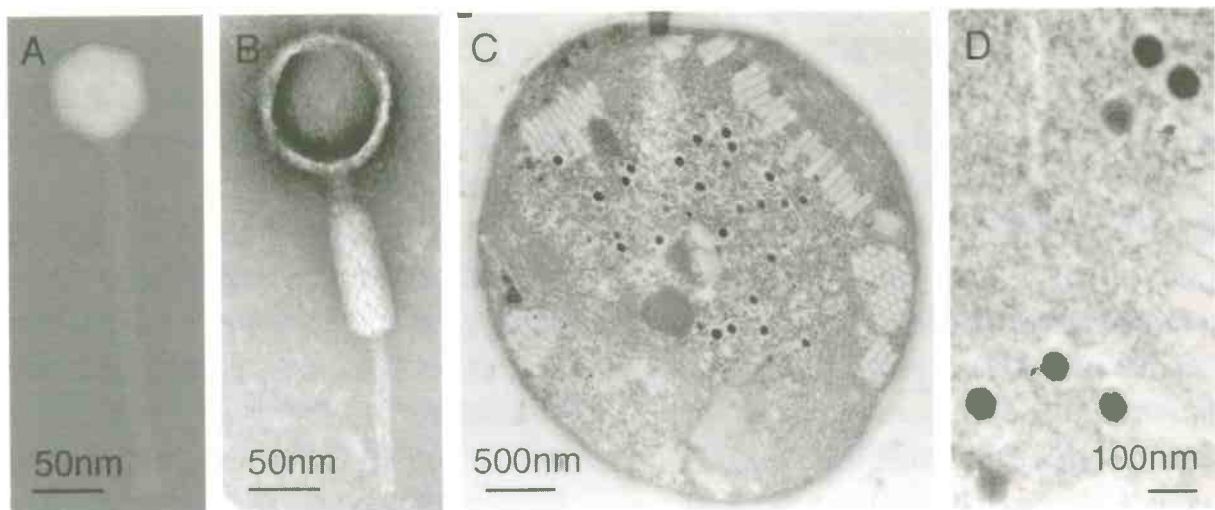


図1 シアノファージMa-LMM01の電子顕微鏡像

(A) インタクトな (尾部の鞘構造が伸張した状態の) ウイルス粒子の陰性染色像, (B) 尾部の鞘構造が収縮したウイルス粒子の陰性染色像 (頭部の変形が顕著), (C) ウイルス感染を受けた *Microcystis aeruginosa* 細胞の断面像 (細胞質内に点在する黒い粒子が複製途上のウイルス頭部構造), (D) ウイルス細胞質内で複製するウイルス粒子の拡大像。

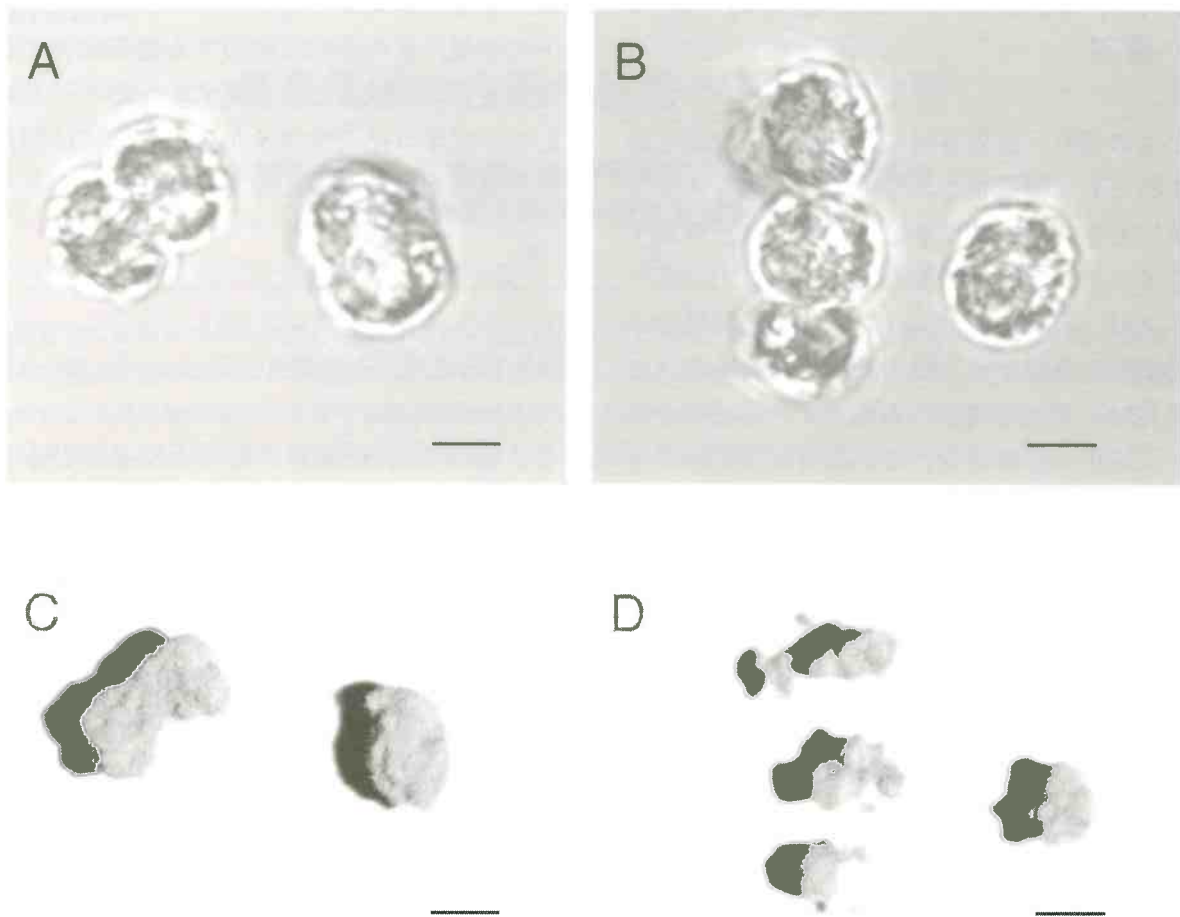


図2 シアノファージMa-LMM01による感染を受けた*Microcystis aeruginosa*細胞のゲノムDNAの分解

ウイルス非感染細胞 (A, C) とウイルス感染後12時間目の細胞 (B, D) の光学顕微鏡像 (A, B), および2本鎖DNA特異的な蛍光試薬DAPIによる染色を施した細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察による核域三次元像 (C, D)。スケールバーは2 μm 。

大腸菌感染性のウイルス (T4ファージ)⁵⁾と同様、ウイルスの複製および形態形成を司る遺伝子群は、ゲノム上でそれぞれ偏在していることが示唆された (長崎ら, 未発表)。DNA合成に不可欠な酵素であるリボヌクレオチドリダクターゼの α および β サブユニットのアミノ酸配列について系統解析を行った結果、海産および淡水産藍藻との単系統性が強く支持された。また、DEAD-likeヘリカーゼの系統解析では、T4様ファージ群との単系統性が比較的低いブートストラップ値で支持された。一方、鞘タンパク質 (図1 A, B) に関する系統解析の結果は、T4様ファージ群およびプロファージ群と

の単系統性を全く支持しなかった。こうした相同性解析および系統解析の結果から、Ma-LMM01ゲノムには藍藻・細菌・ファージなど種々の生物群に由来する遺伝子がキメラ状に配置されていること、ならびに本ウイルスが形態的に類似したT4様ファージ群とは遺伝学的に離れている可能性がそれぞれ示唆された¹³⁾ (一部 長崎ら, 未発表)。今後、各遺伝子の機能解明、転写および翻訳メカニズムの解析、ウイルスの遺伝子伝播能^{11, 3)}に関する検討などを行うことで、本ウイルスと宿主との関係をより詳細に理解することが可能であろう。

3. アオコ感染性ウイルス研究の今後の展望

上述の通り，世界各地の水源において毒化原因生物として問題視されているミクロキスティス属に対して選択的に感染・溶藻し自己複製するウイルスが，世界で初めて単離された。本ウイルスは，*M. aeruginosa*に対して株特異的かつ効率的に作用する天然の致死因子である。この発見は，天然環境中の有毒アオコ個体群がファージ感染の影響を受けている可能性を示すものであり，将来的には「有用ファージを用いた*M. aeruginosa*防除による水源管理」を目的とした技術開発の端緒となることが期待される。さらに，本ウイルスに関する生理・生態・分子生物学的研究をさらに推進するとともに，別種のアオコ原因藍藻に感染するウイルスの単離を試みることで，様々な有毒アオコ原因種による水源の毒化を人為的に防止するための技術開発に繋がると考えられる。また，毒産生能に係るジーントランスファーを促す因子としてのシアノファージの機能研究も，有毒アオコの生態を理解する上できわめて重要な課題の一つとして位置付けられよう^{1), 3)}。

世界水会議2000では，2025年には人口の40%が深刻な水不足に直面することが，また国連環境計画（UNEP）ではアジアでの深刻な水不足の発生がそれぞれ予測されており，21世紀には「安全な水」が最も貴重な資源になる可能性が示されている²⁾。また医療分野においては，かつて不可能と考えられていた「ファージ療法（ファージを用いた細菌症治療技術）」の有効性が見直されており⁹⁾，環境改善分野におけるウイルス利用についてもその実用化が期待されている⁷⁾。有毒藍藻の繁茂抑制による安全な水資

源の確保，水資源を巡る紛争の回避，浄水コストの削減，水の毒化に起因する健康被害に掛かる医療費の削減などを実現するための一方策として，アオコ感染性ウイルスの研究には相当の投資価値があるといえるだろう。

文 献

- 1) Boyd, E. F. (2002), *Trends in Microbiol.*, 10, 521-529
- 2) 彼谷邦光 (2001), 飲料水に忍びよる有毒シアノバクテリア, 裳華房, 東京
- 3) Lindell, D. et al. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (30), 11013-11018
- 4) Manage, P. et al. (1999), *Hydrobiologia*, 411, 211-216
- 5) Miller, E. S., et al. (2003), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67 (1), 86-156
- 6) Nagasaki, K. et al. (2004), *Aquat. Microb. Ecol.*, 34 (3), 219-226
- 7) 長崎慶三ら (2005), ウイルス, 55 (1), 127-132
- 8) 佐野友春 (2005), 月刊海洋, 37 (5), 344-350
- 9) Thiel, K. (2004), *Nature biotechnology*, 22, 31-36
- 10) Tomaru, Y. et al. (2004), *Aquat. Microb. Ecol.*, 34 (3), 227-238
- 11) Tucker, S. & Pollard, P. (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 629-635
- 12) 渡辺真利代ら (2002), アオコ その出現と毒素, 東京大学出版会, 東京
- 13) Yoshida, T. et al. (2006), *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (2), 1239-1247

◀国内情報▶

農業機械の性能と価格の統計的分析

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター
大 西 正 洋

農業資材にかかるコストが農家の経営に大きな影響を与えており、農業の活性化を図るためには、農業機械についても、開発段階からコストの適正化について積極的に取り組むことが必要となっている。そのなかで、農業機械の性能および諸元等が価格に及ぼす影響を評価する手法を検討し、重回帰分析により、現在市販されているトラクタ、自脱型コンバイン、乗用田植機の基本性能と希望小売価格の関係を明らかにした。

1. はじめに

農業機械の開発および利用技術の発展によって、作業の高速化、省力化が図られる等、農業の生産性は大幅に向上し、農業機械は農業生産にとって、なくてはならない存在となっている。しかし、一方では、農業経営費全体に占める農業機械費の割合が高いことから明らかなように、農業生産において、農業機械にかかるコストが農家の経営に大きな影響を与えている。それは、農業機械への投資は一度に多額のものであるため、それぞれの経営に適した農業機械を選択しないと、過剰投資になりやすいことが大きな理由であると考えられる。

農業機械への過剰投資を防ぐためには、開発段階から、農業者が必要とする性能とそれに係わるコストの適正化について積極的に取り組むとともに、農業者が機械を選択する際に、農業者に対して必要な情報を的確に提供することによって、低廉な農業機械の普及拡大を図ることが重要である。

そこで、農業機械のコスト形成に関与する要因を把握し、様々な性能・機能の多面的な視点から費用便益分析等を行うため、農業機械の性能・諸元等が価格に及ぼす影響を評価する手法について検討するとともに、現在市販されてい

OHNISHI Masahiro

〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

るトラクタ、自脱型コンバイン、乗用田植機の性能・諸元等と希望小売価格の関係を定量的に明らかにしたので、その概要を紹介する。

2. 農業機械価格の特質

我が国の農業構造は、言うまでもなく、家族経営、兼業主体、労働力の高齢化と婦人化といった、他の産業に見られない特異な性質を持っている。この特異な性質を支えているのが、作業の大幅な省力化を可能にした農業機械であるが、同時に、農業機械の進展もこの特異な性質に影響を受けている。

世の中に出回っている製品を大まかに、日常生活の中で使用するもの（消費財）と、ものやサービスを生産したり提供したりするために使用するもの（生産財）に分けると、農業機械は生産財にあたる。しかし、マーケティングの視点で見ると、農業機械は、農業者が自家用車等と価格感覚を比較する等、消費財の感覚で選択、購入されることもある。

利潤回収のための投資という意識が薄いことは、家族経営が多いことに起因すると考えられる。特に小規模農家層において、兼業農家が大多数を占めるということもあり、農業機械への投資は、農業経営内での合理的判断に基づいたものではなく、農外所得も含めた一家の経済全体での判断によることも指摘されている^{1) 2) 3)}。

従って、需要と供給の関係から、自由市場で売買が成立しているという理由だけで、現在の農業機械コストが適正であると評価するのは早計である。機械コストの適正化を進めるためには、農業機械の各機能、性能におけるコストを調査し、そのそれぞれについて、費用便益分析を行っていくことが必要である。

3. ヘドニックアプローチの適用

費用便益分析を行うために、財の価値を定量化しようとする試みは、数多くなされており、そのなかの一つにヘドニックアプローチがある。

ヘドニックアプローチとは、製品の価格をその製品の様々な特性によって回帰することによって、特性の有する価値を明らかにしようとした手法であり^{4) 5)}、Waugh⁶⁾がアスパラガスの価格を茎の長さ、莖数、芽の直径のばらつきといった属性で回帰し、消費者の評価を明らかにしようとしたのが始まりである。現在では、一般消費財に限らず、土地や住宅、環境といったものの価値評価にも適用されている。

農業機械においても、同一機種間での価格差は、基本的には、機能および性能、諸元の各要素によって形成されていると想定される。そのため、農業機械の価格に対してこのヘドニックアプローチの考え方を利用して、希望小売価格をその製品の各要素で回帰することによって、農業機械の価格が、性能、諸元等の各要素によって説明できることを証明するとともに、農業機械の各機能、性能が価格に及ぼす影響を把握することとした。

4. 使用データと分析方法

農業機械の機能および性能、諸元等のうち、仕様表等によって公表されているデータを、ここでは、基本性能と呼ぶこととし、「農機価格ガイド16年版（株農機産業調査研究所）」および「平成16年版農業機械の仕様と特長（全国農業協同組合連合会）」等のカタログリストから

希望小売価格および基本性能データを収集した。対象機種はトラクタ（機関出力36kW未満のもの）、自脱型コンバイン、乗用田植機とし、それぞれ派生型式を含む、トラクタ651型式、自脱型コンバイン301型式、乗用田植機324型式のデータを使用した。

回帰モデルは次のような線形重回帰モデルとし、解析を行った⁷⁾。重回帰分析を行うプログラムはSPSS 11.5J for Windowsを用いた。

$$Y=A+\sum B_i X_i+e$$

Y：目的変数

A：定数項

B_i：回帰係数

X_i：説明変数

e：説明変数以外の要因による変動

今回、重回帰分析を行う目的は、各説明変数が目的変数に及ぼす影響度を調べることであり、できるだけ多くの説明変数を取り入れることに留意して、強制投入法による重回帰モデルを設定した。しかし、カタログリストから得られる基本性能データすべてを説明変数としてモデルに組み込むと、多重共線性の問題が発生する。そのため、各データ間の相関関係を調べ、相関係数が0.9以上のもの的一方を取り除いて、モデルに組み込むこととした。

また、トラクタを例にとると、基本性能には「ROPSの種類（安全フレームか安全キャブか）」「走行部型式（車輪式か半装軌式か）」といった質的変数のものもある。その各群の効果も、量的変数と同様に重回帰式に導入するため、質的変数を、その群に属する場合に1、属さない場合に0をとるダミー変数に展開し、重回帰モデルに組み込むこととした。

重回帰分析によって得られる偏回帰係数とは、他の要因が一定であった場合に、説明変数を1単位変動させた（質的変数においては、各群に属した）場合に、目的変数が変動する大きさを示している。つまり、その説明変数による回帰直線の傾きの大きさであり、説明変数が目的

変数に及ぼす影響の大きさを示すものである。

しかし、この偏回帰係数は、説明変数毎に変数の分散が異なるため、説明変数間の影響度の比較には用いることができない。そのため、各説明変数間の影響度の比較は、変数の分散が1になるように変換したときの偏回帰係数である標準化偏回帰係数を用いて行った。

一方、相関係数はその直線的傾向を示す指標であるため、目的変数と説明変数間の関係の強さを調べることができる。このとき、単相関係数は、みかけの相関も含めた、直接的影響および間接的影響の関係の強さであり、偏相関係数は他の変数による間接的影響を除いた直接的影響の関係の強さである。

5. 重回帰分析による解析結果

それぞれの機種重回帰分析結果を表に、希望小売価格と重回帰モデルによる予測値との関係を図に示す。

今回解析のために作成した重回帰モデルの決定係数 R^2 はトラクタ0.943、自脱型コンバイン0.992、乗用田植機0.943であり、それぞれ価格の変動をよく説明できていることから、これら農業機械の価格は基本的に性能および諸元等によって説明できると考えられた。

トラクタにおいては、偏回帰係数の値から、モデルに組み込んだ他の性能項目が一定という仮定をした場合、「機関出力」が1kW増加すると約10万円増加するといったことや、安全フレームと安全キャブの違いによって約85万円差が生じるといったように、各項目の価格に対する影響度を把握することができた。

各項目の影響力の強さを標準化偏回帰係数で比較すると、今回、モデルに組み込んだ基本性能の中では「機関出力」や「ROPSの種類」が価格に及ぼす影響が比較的強いということが明らかとなった。また、偏相関係数から、基本性能項目の中では「機関出力」や「ROPSの種類」といった項目が価格と関係が強いということも明らかとなった。

自脱型コンバインにおいては、「刈取条数」が1条分増加すると、価格が約32万円高くなるといったことや、グレンタンクの有無で約54万円差がある、キャビンの有無で約100万円差がある等といったことが明らかとなった。標準化偏回帰係数で比較すると、「機関出力」が価格に及ぼす影響が強いということが明らかとなった。また、偏相関係数から、「機関出力」「キャビン」「グレンタンク」といった項目が、価格と関係が強いということも明らかとなった。

乗用田植機においては、「植付条数」が1条

表 重回帰分析の結果

機種	説明変数	偏回帰係数	標準誤差	標準化偏回帰係数	有意確率	相関係数 単	相関係数 偏
トラクタ	(定数)	77594.3	224188.1		0.73		
	機関出力(kW)	103000.1	2578.8	0.60	0.00	0.89	0.84
	前進最高速度(m/s)	8066.6	2408.9	0.05	0.00	0.69	0.13
	前進変速段数(段)	30319.4	2298.8	0.19	0.00	0.71	0.46
	燃料消費率(g/kWh)	-288.8	751.8	0.00	0.70	-0.27	0.02
	ROPS (0:安全フレーム、1:安全キャブ)	854890.9	24054.5	0.36	0.00	0.64	0.81
	走行部型式 (0:車輪式、1:半装軌式)	289538.9	59839.4	0.05	0.00	0.03	0.19
	前輪増速機構 (0:無、1:有)	70883.5	39426.8	0.02	0.07	0.26	0.07
	自脱型コンバイン	(定数)	-312256.9	97646.6		0.00	
刈取条数(条)		318033.6	41389.9	0.12	0.00	0.95	0.41
機関出力(kW)		139697.0	3269.1	0.76	0.00	0.99	0.93
グレンタンク (0:無、1:有)		538253.7	40918.0	0.08	0.00	0.46	0.61
キャビン (0:無、1:有)		1038929.7	68995.1	0.10	0.00	0.64	0.66
前進最高速度(m/s)		136315.2	40761.3	0.03	0.00	0.73	0.19
接地圧(kPa)		4654.8	4200.3	0.01	0.27	0.24	0.06
乗用田植機	(定数)	-859234.6	67787.9		0.00		
	植付条数(条)	327977.7	9539.1	0.63	0.00	0.86	0.89
	機関出力(kW)	74817.5	5783.8	0.28	0.00	0.76	0.59
	粒状施肥機 (0:無、1:有)	425751.9	22911.2	0.28	0.00	0.24	0.72
	ペースト施肥機 (0:無、1:有)	432535.4	24964.8	0.26	0.00	0.10	0.70
	2段ペースト施肥機 (0:無、1:有)	610400.4	28361.4	0.31	0.00	0.18	0.77
	植付方式 (0:クランク式、1:ロータリ式)	322245.7	64586.0	0.08	0.00	0.40	0.27
	前進最高速度(m/s)	14261.1	17415.2	0.02	0.41	0.47	0.05

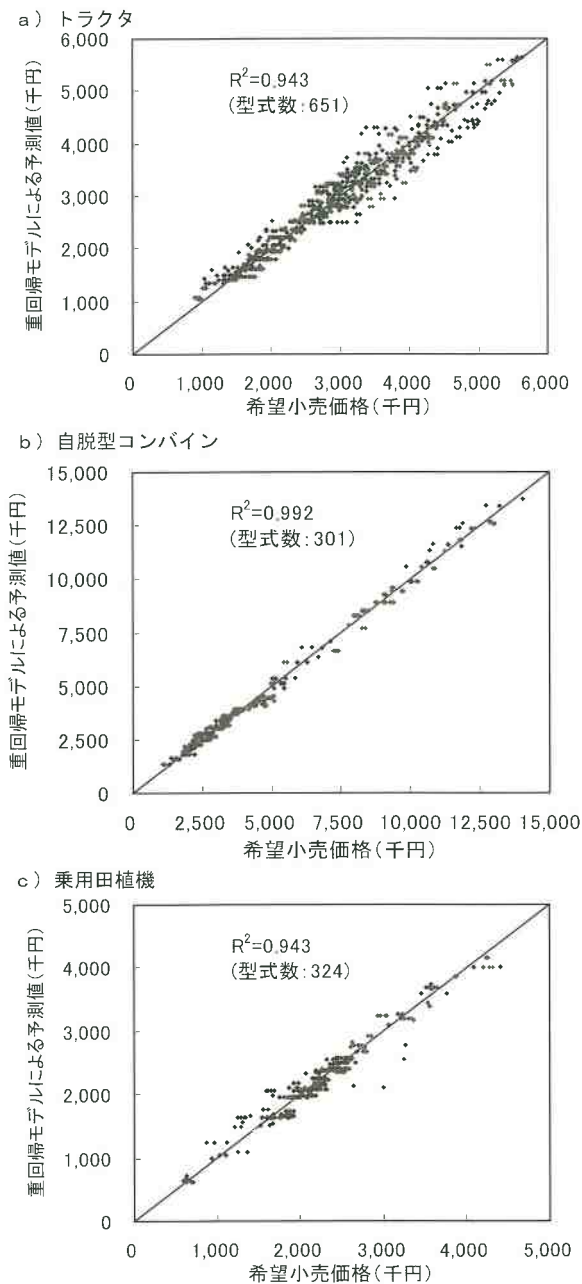


図 重回帰モデルによる
農業機械価格の予測値

分増加すると、価格が約33万円高くなるといったことや、「粒状施肥機」や「ペースト施肥機」が付くと、施肥機のないものに比べて、43万円ほど高くなり、「2段ペースト施肥機」が付くと、61万円ほど高くなるといったこと等が明らかとなった。また、標準化偏回帰係数から「植付条数」が価格に及ぼす影響が強いということが明らかとなった。また、偏相関係数から、「植付条数」や「機関出力」「施肥機」といった項目

が、価格と関係が強いことも明らかとなった。

これらの価格と基本性能の関係把握によって、価格に及ぼす影響が大きい要因を見出すことができた。また、今回得られた価格との関係と、それぞれの基本性能に対する農業者のニーズ・便益を分析することによって、農業機械コスト適正化に活用することができると考えられる。

6. おわりに

今回は、ヘドニックアプローチの考え方を利用して、農業機械の価格データと基本性能データから、機種毎に希望小売価格に影響を及ぼしている要因の把握を行った。しかし、さらに詳細な検討を行うために、各機種を機関出力クラスや使用目的等で分けした分析も考えられる。

今後は、今回適用した手法以外にも、費用便益分析で用いられている様々な手法の農業機械への適用を検討し、農業機械の安全性、耐久性、環境性等の社会的性質に関する費用の定量化を進めるとともに、ニーズや便益の把握も試みて、農業機械のコストに關与する費用便益分析をすることによって、農業機械コスト適正化のための指針をとりまとめる予定である。

文 献

- 1) 保木本利行 (1999) 山形大学紀要農学, 13-2, 117-143
- 2) 寺内光宏 (1991) 農村研究, 72, 37-47
- 3) 杉山道雄 (1989) 農業と経済, 55-2, 15-21
- 4) 肥田野登 (1997) 環境と社会資本の経済評価, 17-18, 勁草書房, 東京
- 5) 浅野耕太 (1997) 農村計画学会誌, 16-1, 31-39
- 6) Frederick V. Waugh (1928) Journal of Farm Economics, 10, 185-196
- 7) 奥野忠一 (1978) 応用統計ハンドブック, 120-149, 養賢堂, 東京
- 8) 生研センター (2005) 平成16年度事業報告, 26-27

◀地域の先端研究▶

低グルテリン米新品種「ゆめかなえ」の育成

¹千葉県農業総合研究センター，²千葉県立衛生短期大学

齋藤 幸一¹・林 玲子¹・西川 康之¹・長島 正¹・渡邊 智子²・土橋 昇²

稲新品種「ゆめかなえ」は、早期栽培に向く良食味の低グルテリン米である。動物実験により「ゆめかなえ」の米タンパク質消化吸収率が一般品種より有意に低いことを認め、臨床試験で「ゆめかなえ」の摂取が腎不全患者の血液成分の改善に有効なことを確認した。「ゆめかなえ」がタンパク質の摂取を制限される腎不全患者の食事療法の中で活用されるよう、現在、生産・流通・利用にかかわる課題解決のための共同研究に取り組んでいる。

1. 低グルテリン米新品種開発の目的

低グルテリン米は、腎不全患者の主食として期待されている新形質米である。最近の調査によると、腎機能の低下が疑われる成人は全国に480万人程度いると推定され、人工透析患者も年々増加している。これら腎不全患者は、腎機能の低下を防ぐためタンパク質などの摂取を制限する食事療法が必要とされ、タンパク質は1日当たり30～50gに制限されることが多い。タンパク質の給源としては卵・肉・魚介類などがまず注目されるが、タンパク質を制限した献立では、主食から摂取するタンパク質の割合が高まるため、主食の低タンパク質化が重要課題に位置付けられる。低グルテリン米は、易消化性タンパク質の一つであるグルテリンの割合が一般品種の約1/2で、難消化性タンパク質であるプロラミンの割合が一般品種の約2倍と高い。そのため米タンパク質の消化吸収率が一般品種より低くなることから、主食の低タンパク質化を実現する食材として注目を集めている。

農業生物資源研究所放射線育種場は低グルテリン米品種「エルジーシー1」を育成した。低

¹〒287-0822 千葉県佐原市佐原二325

²〒261-0014 千葉市美浜区若葉2-10-1

グルテリン米が腎不全患者の食事療法に有用であることが明らかになると、米の消費減退に悩む本県の水稲生産者の間にも低グルテリン米に対する関心が広がった。しかし、放射線育種場が育成した「エルジーシー1」は「コシヒカリ」より成熟期が遅く、「コシヒカリ」が晩生種に位置づけられる本県の早期栽培にあっては、水利面で栽培が難しいと判断された。また、食味にも改善の余地があると考えられた。そこで、千葉県農業総合研究センター（千葉農総研）は、本県の作期に向く良食味の低グルテリン米品種を育種目標に、「エルジーシー1」の早生化と食味改善に取り組むこととした。

2. 低グルテリン米新品種の育成経過

千葉農総研は、平成8年度に「機能性食品用品種の育成」の研究課題を起し、低グルテリン米新品種の育成に着手した。8年度と9年度には、「LGC-1」（後の「エルジーシー1」）を母本、本県の奨励品種である良食味の「ふさおとめ」、「ひとめぼれ」、「コシヒカリ」等を父本にして4組合せの人工交配を行った。F₁～F₃世代は育種年限を短縮するため世代促進温室で養成し、F₄世代で個体選抜を実施した。その後、単独系統選抜を経て12年度以降は、系統群系統選抜並びに生産力検定、さらに地域適応性検定試験を実施して、形質の固定を図るとともに有

望系統の選抜を進めた。個体選抜には4組合せ合計8,000個体、単独系統選抜には227系統を供試した。

この間、個体選抜 (F₄世代)、系統選抜 (F₅世代以降) では、低グルテリン株を選抜するため米のタンパク質組成を分析した。分析はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とクマシー染色によって行った。

このようにして、「LGC-1/ひとめぼれ」の組合せの中から、本県の早期栽培に適する良食味の低グルテリン米系統を一つ選抜して、これに「佐系新8」の系統名を付した。さらに、千葉県立衛生短期大学 (千葉衛生短大) が、ラットを用いた動物実験により「佐系新8」の栄養学的特性を明らかにし、同系統が育種目標に合う系統であると認めて育成を完了した。千葉県は同系統を17年3月に「ゆめかなえ」として種苗登録出願し、同年11月に登録出願が公表された。

3. 低グルテリン米新品種「ゆめかなえ」の特徴

「ゆめかなえ」は、成熟期が「エルジーシー1」より12日、「コシヒカリ」より9日早い、早晩性が「早の中」に属す梗品種である。千葉県の早期栽培では中生品種に区分される。稈長は「コシヒカリ」より短く、穂長は長い。穂数はやや多く、草型は「偏穂数型」である (表1)。

耐倒伏性は「コシヒカリ」より強く「やや強」

である。いもち病抵抗性遺伝子型はPia及びPiiと推定され、葉いもち圃場抵抗性は「中」、穂いもち圃場抵抗性は「弱」である。障害型冷害に対する耐冷性は「やや弱」、穂発芽性は「難」である。

玄米千粒重は「コシヒカリ」より1g程度重く、玄米の外観品質は良好である。収量は「コシヒカリ」よりやや少ない。

炊飯米の粘りは「エルジーシー1」より強く、味、外観なども「エルジーシー1」に優り、食味の総合評価は「初星」並みである (図1)。

玄米のタンパク質組成は「エルジーシー1」と同等である。玄米タンパク質に占める易消化性タンパク質の割合は「コシヒカリ」より明らかに低く、難消化性タンパク質の割合は明らかに高い。このことから、「ゆめかなえ」の米タンパク質の吸収率は「コシヒカリ」より低いと考えられるが、これを確かめるため動物実験を実施した。動物実験では、白米を炊飯し凍結乾燥後に粉碎して幼ラットに与えた。2週間の摂取期間におけるタンパク質出納を調査した結果、「ゆめかなえ」のタンパク質吸収率は「コシヒカリ」より有意に低いことが明らかになった (表2)。

以上のように、「ゆめかなえ」は千葉県の早期栽培に向く良食味の低グルテリン米品種で、タンパク質を制限される人の主食として有用なことが示唆された。

「ゆめかなえ」には、いもち病抵抗性や耐冷性などやや不十分な特性もあるが、過去5か年

表1 「ゆめかなえ」の生育、収量

品種	出穂期 (月/日)	成熟期 (月/日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	収量 (kg/a)	玄米 千粒重 (g)	玄米外 観品質
ゆめかなえ	7/25	9/2	70	20.2	460	54.5	22.5	2.3
コシヒカリ	7/30	9/11	88	18.3	420	56.7	21.3	4.3
エルジーシー1	8/4	9/14	72	19.2	439	57.7	23.9	4.0

注) 育成地における平成13~15年の成績。移植は4月18~25日、施肥は標準量。玄米外観品質は1 (上・上) ~9 (下・下)。

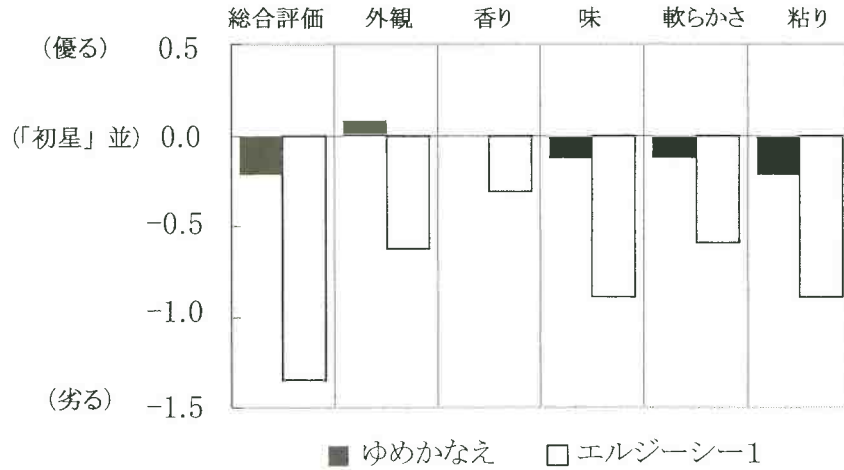


図1 「ゆめかなえ」の食味

注)「初星」を基準として評価。各項目を-3～+3の範囲で判定。
数値は3か年の平均。

表2 玄米タンパク質組成と幼ラットによるタンパク質利用の比較

品種	玄米粗タンパク質含有率(%)	玄米タンパク質組成 (%)		幼ラットによるタンパク質利用の比較	
		易消化性	難消化性	飼料の粗タンパク質含有率 (%)	みかけのタンパク質吸収率 (%)
ゆめかなえ	7.65	49.3 (23.6)	50.7	6.74	77.2 ^b
コシヒカリ	7.70	72.0 (51.5)	28.0	6.37	83.4 ^a
エルジーシー1	7.92	50.5 (25.3)	49.5	—	—

注1)平成15年産米を分析

2)易消化性タンパク質の()内はグルテリン(新潟県環境衛生研究所)

3)みかけのタンパク質吸収率=(摂取タンパク質-糞タンパク質)/摂取タンパク質×100(吸収率の差は統計的に有意, p<0.05。千葉県立衛生短期大学)

の生産力検定試験の結果から、多肥栽培や極端な早植えを避ければ安定生産は十分に可能と考えられる。

4. 「ゆめかなえ」の普及に向けた取り組み

「ゆめかなえ」がタンパク質を制限される人の主食として有用なことが示唆されると、県内の米産地に低グルテリン米の生産に取り組む動きが生まれ、普及に向けた取り組みが本格化した。

低グルテリン米は、医師や栄養士の指導のもとで食事療法の中で適切に利用されなければならない。そのため、生産にあたっては適正な品質の保持が、また利用にあたってはその特性の正しい理解が重要である。そこで千葉農総研は、「ゆめかなえ」の需要を開発するとともに、「ゆめかなえ」に適する生産・流通・利用方法を明らかにするため、千葉衛生短大をはじめ各分野の専門家の協力を得て、共同研究に取り組むこととした。共同研究には、水稻の育種・栽培の研究者、腎臓病の専門医、栄養学の専門家をはじめ、米穀流通関係者や県内自治体の農政担当

者が参画している。現在、この共同研究は農林水産省の「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の研究課題として、平成17年度から3か年の計画で実施中である。

共同研究では、1. 玄米タンパク質含量低減のための栽培法の確立、2. 医療分野における実用性の評価、3. 低グルテリン米の生産と流通の3課題に取り組んでいる。栽培法に関しては、玄米粗タンパク質含有率（乾物換算）7%以下、玄米収量10a当たり510kgを目標に窒素施肥法を中心に検討している。医療分野における実用性に関しては、すでに、臨床試験を実施して「ゆめかなえ」の摂取による人工透析患者の血液成分の改善を確認している。現在は、対象を保存期の患者に移して長期摂取の影響を調査しているところである。また、動物実験では、成熟ラット、老齢ラットによるタンパク質出納実験を実施し「ゆめかなえ」のタンパク質消化吸収率を明らかにするとともに、「ゆめかなえ」の摂取効果を多面的に検討している。さらに、生産と流通に関しては、特殊用途で生産量の限

られる「ゆめかなえ」の種子生産方式について検討し、あわせて病院給食や病態食などに関わる専門家を講師に招いて、低グルテリン米の販路開拓の方向性などについて検討を進めている。

現在、タンパク質の摂取を制限されている人の主食として、米中のタンパク質を取り除いた加工米飯やタンパク質調整米が流通している。「ゆめかなえ」はタンパク質の摂取抑制効果ではこれらの食材に及ばない。しかし、食事療法を継続するには主食の食味が重要で、食品メーカーから「ゆめかなえ」のもつ自然な食感に期待が寄せられている。また、臨床試験に協力いただいた患者からは購入希望も寄せられている。千葉農総研と千葉衛生短大は、このような期待に応えるため、共同研究によって低グルテリン米「ゆめかなえ」の生産と流通・利用を早期に実現したいと考えている。そして、低グルテリン米が正しく理解され、腎不全患者の食事療法の中で大いに活用されることを願っている。

◀文献情報▶

加熱乾燥精子頭部のウシ成熟卵子細胞質内への顕微授精後の体外での発生能

Fertilization and Development In Vitro of Bovine Oocytes Following Intracytoplasmic Injection of Heat-Dried Sperm Heads

Kyung-Bon Lee and Koji Niwa

Department of Animal Science, the Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

Biology of Reproduction, 74(2006) : 146-152

哺乳動物の精子は、運動能力がなくなると卵子への進入能力を失う。しかし、そのような精子でも、卵細胞質内への顕微授精により受精し、胚発生する能力を持っている。また、凍結乾燥させた精子を顕微授精することによって、胚発生あるいは産子までの発育が可能であることも数多く報告されている。しかしながら、加熱して乾燥させた哺乳動物精子を顕微授精した場合の胚発生等の報告はなかった。そこで、本論文では、加熱によって乾燥させた精子頭部のウシ卵子細胞質内への顕微授精後の胚の発生能について検討が行われた。50、56、90あるいは120℃の乾熱オープンを用いて精子懸濁液を乾燥させた場合、それぞれ8、6、1.5時間あるいは20分で0.3g H₂O/gまで乾燥した。50あるいは56℃で乾燥させて25℃で7～10日保存した精子を顕微授精した場合のほうが、90℃あるいは120℃で乾燥させて保存した精子を用いた場合よりも、活性化率、卵割率及び桑実胚期への発生率が高かった。また、50℃で16時間乾燥させた精子を顕微授精した場合には、8あるいは10時間乾燥させた精子を用いた場合に比べて、活性化率、雄性前核形成率、卵割率及び桑実胚期への発生率は低くなり、胚盤胞期への発生も認められなかった。50℃で8時間乾燥後4℃で7～10日間保存した精子を顕微授精した場合のほ

うが、25℃で保存した精子を顕微授精した場合よりも卵子の発生率は高かった。7日～12ヶ月間の長期間保存した加熱乾燥精子を顕微授精した場合、卵子の活性化後の雄性前核形成率には保存期間による変化は認められなかったが、顕微授精後の胚盤胞期への発生率は、3ヶ月以上保存した場合に有意に低くなった。以上の結果から、加熱乾燥精子は顕微授精により受精可能であり、体外培養により少なくとも胚盤胞期までは発育することが明らかとなった。

加熱して乾燥させるという単純な方法で乾燥させても、ウシ精子は顕微授精によって胚盤胞期まで発生する能力を持つことを示した初めての報告である。加熱乾燥という簡単な方法で精子の保存が可能であれば、いつでもどこでも精子の保存が可能となる。しかしながら、各種条件を検討することにより、より長期間の保存も可能となるかもしれないものの、現段階では、この方法で乾燥させた精子の数ヶ月以上の長期保存は厳しいようである。この技術を実用化するためには、最適な乾燥条件、保存条件、発生した胚の染色体等の正常性、移植によって産子が得られるかどうかの検討等、数多くの課題が残されており、今後の研究進展に期待したい。(抄訳：下司雅也, GESHI Masaya, 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所)

◀文献情報▶

耐塩性モデル植物 ソルトクレス

Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*
Qingqiu Gong, Pinghua Li, Shisong Ma, S. Indu Rupassara and Hans J. Bohnert
The Plant Journal, 44 : 826-839 (2005)

生命科学が爆発的な進展を見せるとき、そこには、研究を進めるに最適な生物(モデル生物)との幸運な出会いがある。エンドウマメとショウジョウバエは遺伝学を、大腸菌は分子生物学を産んだ。目を植物科学に転じると、光合成は光合成細菌と藻類の、細胞工学はタバコの、現代植物科学はシロイヌナズナの恩恵の下にある。では、全世界の耕地の6%が塩類集積土壌であるため、実際上からも純科学上からも、その解明が待たれる耐塩性機構のモデル植物には何があるだろうか? 多少なりとも組織的に研究がなされてきたのは多肉植物のアイスプラントに限られ、現在EST収集プロジェクトが進行している。だが、残念なことに、この植物は世代時間の長い多年生多肉植物であり、変異体の作出や分子生物学的取り扱いがシロイヌナズナほど容易ではなく、モデル植物としては適当ではなかった。そこで、塩類に対して耐性のない「中性植物」であるシロイヌナズナを使っての耐塩性研究がなされる場合が多い。しかし、耐塩性機構は耐塩性を持つ「塩性植物」を利用しなければ分かる筈もない。この分野の停滞の一因はモデル植物が存在しないことにある。

ソルトクレス(英名salt cress, 和名は不明)は、500mMもの塩化ナトリウムを含む培土でも生育が可能な「塩性植物」であり、かつて*Arabidopsis halophila*と命名(1999年に*Thellungiella*属に再分類された)されていたことでも想像がつくようにシロイヌナズナとは近縁の種であり、葉および葉柄が細長いことを除けば形態的に極めて似通っている。自殖性植物で世代時間は2-2.5ヶ月と短く、一個体当たりの種子生産量も8000近くと高い。染色体数は7でゲノムサイズはシロイ

ヌナズナの約2倍と小さく、何よりも、全ゲノムの塩基配列の90-95%がシロイヌナズナと同じであり、形質転換も容易でシロイヌナズナで築き上げられた財産がふんだんに使え、耐塩性のモデル植物としては最適である(Bressanら, 2001)。高塩濃度下でのソルトクレスの遺伝子発現の網羅的解析は理研の篠崎グループの論文(2004)を嚆矢とするが、長年、アイスプラントで耐塩性研究を行い、そのESTプロジェクトの中心人物であるアリゾナ大学のBohnertグループがソルトクレスのマイクロアレイによる網羅的発現解析の結果を今回発表した。アイスプラントがソルトクレスに主役の座を譲ったことを明瞭に示すものである。(Bohnertの名誉のために付け加えておくが、彼はすでに2001年にソルトクレスについては言及し、2004年にはモデル植物として適格であることを述べている。しかし、耐塩性機構研究としては本報告が初めてある。)

シロイヌナズナを150mMの塩化ナトリウム(生育可能な限界濃度)で、ソルトクレスは150, 250mMの塩化ナトリウムで3ないし24時間処理し、RNAを抽出、250種以上のオリゴヌクレオチドを貼り付けたマイクロアレイにハイブリダイズする。マイクロアレイの結果、発現量に際が生じた転写産物の一部は定量的RT-PCRによって確認している。

転写産物の約40%が中性植物と塩性植物で同じ挙動を示し、残りは両種で異なる。タンパク質のホールディングや翻訳後修飾に関する遺伝子がソルトクレスで強く発現しており、タンパク質の構造が耐塩性に大きな役割を演じていることが読み取れる。また、ソルトクレスでは強く発現するが、TAIRデータベースには登録されていない遺伝子が多く存在しており、ひょっとしたら、これらの遺伝子が耐塩性に深く関わっているのかもしれない。

中性植物を使っても耐塩性はわからないと言うことを雄弁に物語っている。耐塩性研究の新しい頁が開かれようとしている。

(抄訳：岩井純夫, IWAI Sumio, 鹿児島大学農学部)

◀文献情報▶

X線小角散乱を用いた、セルラーゼの多面的な立体構造分析

Dimension, Shape, and Conformational Flexibility of a Two Domain Fungal Cellulase in Solution Probed by Small Angle X-ray Scattering

Véronique Receveur, Mirjam Czjzek, Martin Schülein, Pierre Panine, and Bernard Henrissat

Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier

J. Biol. Chem. 277, 40887-40892 (2002)

セルロースは地球上でもっとも豊富にあるバイオマスである。セルラーゼによって触媒される酵素的加水分解は産業的にも環境にも大変重要であり、ほとんどの酵素はモジュラー構造を持っている。セルラーゼの触媒モジュールはいくつかの明確なアミノ酸配列の類似性を基にして糖質加水分解ファミリーにクラス分けされている。同様にセルロース結合モジュール(CBM)も外形でファミリー分けされる。個々のセルラーゼのモジュールの構造データはここ数年で急速に蓄積され、それらの三次元構造は9つの触媒モジュールと、7つのCBMに分類される。

触媒モジュールとCBMは一般的にグリコシド結合により結合している。そして(推定上の)柔軟なリンカーペプチドを備えている。

これまでに様々な方法を用いて複数のドメインを持つセルラーゼの立体的な全体構造の解析を試みたが、すべて不十分であった。1980年の終わりに、Plizとco-workersがsmall angle x-ray scattering (SAXS)を用いた先駆的な研究を発表した。これは短時間で実に明瞭な三次元構造を得ることができたが、全てを解明するには不十分であった。

本報では、セルロース結合モジュール

(CBM)と触媒モジュールから成る、カビ *Humicola insolens*由来のセルラーゼCel45を用いて、三次元立体構造解析に重要な知見を示した。36アミノ酸からなるリンカーペプチドで分離されている、2つのモジュールから成るこのタンパク質の全長と、リンカーの空間的な配置による柔軟性に関する答えは、既知である個々のモジュールの三次元立体構造とX線小角散乱構造解析を組み合わせて解析した。

筆者らはCel45とその部分変異体(Cel45 core, ΔCBM, CBM, PP, ΔS219-T235)を用いて、Guinier解析に基づいてSAXSのデータからCel45の外観を決定付けた。Cel45 Wildを用いて、2つのモジュール間を最大限伸ばし、量子力学的にリンカーの伸縮性を計測した。リンカーの糖鎖付加がこの柔軟性のキーポイントであり、本酵素のリンカーに存在する5つの連続したプロリン残基が剛性に関わっていると考えられてきたが、変異体Cel45 PPを利用して証拠付けた。

このことからリンカーペプチドは酵素の立体構造の空間的保持に関わっており、その空間的な構造が、酵素の活性に対して極めて重要であることが判明した。

これまでブラックボックスであったリンカーペプチドの三次元的役割りと、酵素の立体構造解析の貴重な情報を、本報から得ることができた。三次元立体構造解析の益々の発展に期待する。

(抄訳：目瀬友一郎, MESE Yuichiro, 広島大学 大学院生物圏科学研究科)

◀文献情報▶

コイ骨格筋由来普通筋及び血合筋
の生化学的性状Biochemical Properties of Ordinary and Dark
Muscle Myosin from Carp Skeletal MuscleTsuyoshi Okagaki, Masaki Takami, Kiyo
Hosokawa, Miyuki Yano, Sugie Higashi-
Fujime, and Atsushi OoiDepartment of Bioresources, Mie University,
Kamihama 1515, Tsu, Mie 514-8507*Journal of Biochemistry*, 2005, 138(3) :
255-262

脊椎動物の骨格筋分類方法の1つとして運動性による分類がある。ヒトの場合では収縮速度が速い方が速筋（または白筋）、遅い方が遅筋（赤筋）として分類されている。魚類ではそれぞれ普通筋、血合筋と呼ばれている。

ヒトでは速筋と遅筋の割合は遺伝により決まることが明らかとなっているが、魚類では、種によって普通筋に対する血合筋割合は大きく異なり、キスの1.6%からマイワシ31.1%と幅広い。速筋は主として無酸素下で機能するため、解糖系の酵素活性が高く乳酸を生成し、遅筋は主に有酸素下で機能するためミトコンドリア、ミオグロビンが多く存在し、赤みを帯びている。

筆者らは魚類の普通筋と血合筋の生化学的性状、特にメカノケミカル（Mechanochemical）的な性状を明らかにするため、コイの普通筋と血合筋それぞれからミオシンを精製し、ATPase活性とin vitroで運動性を分析、他の魚種や哺乳類と比較評価した。

コイ普通筋由来ミオシンにおけるATPase活性のVmaxは血合筋の1.6倍、滑り速度は1.5倍と僅かに高いという結果であった。これまでにサバ普通筋のATPase活性は血合筋の5.8倍、ブリは3.2倍という報告があるが、これは実験条件の違いによるものである。魚類のミオシンに対し、哺乳類における速筋ミオシンのATPase活性は3～10倍高い活性を有する。滑り速度において、ラット速筋ミオシンは遅筋ミオシンの

4倍で、トリ速筋ミオシンの最大収縮速度は遅筋より10倍速い。興味深いことに、コイ普通筋の滑り速度は哺乳類やトリと同じであるが、遅筋ミオシンの滑り速度は哺乳類の遅筋ミオシンの2倍であった。魚類は通常の遊泳では血合筋のみ使用し、普通筋は摂餌といった突然動くような場合に使用する。このような行動特性から魚類血合筋ミオシンのATPase活性や滑り速度は哺乳類の遅筋ミオシンより速くなるとされている。また本論文では電子顕微鏡や遠心分離によってミオシン会合体の調査を行い、普通筋は血合筋や哺乳類速筋より会合されにくいことを見出し、このような現象は魚類骨格筋の特徴的な細胞機能の反映を示唆している。

本報告のように、ATPase活性や滑り速度等をさまざまな魚種の普通筋と血合筋と比較することにより、魚類の遺伝的、生息環境を含めた運動機能的特性などの解明につながると考えられる。更には機能と関連して成分的な解析が進むことにより、未だ確立されていない血合筋の著しい死後変化による水産物の品質低下を制御する技術が望まれるところである。

（抄訳：水口 亨，MIZUGUCHI Toru，日本水産株式会社 中央研究所）

編集後記

第114号をお届けします。本号では、ポストゲノムの重要分野の一つ「メタボローム解析」を特集に取り上げ、草野都氏（理化学研究所）ら、及び平井優美氏（同）らにその基本原理と解析技術、並びにゲノム機能科学への応用についてご紹介戴きました。

植物の花芽形成メカニズムについては、本誌第111号の文献情報において既に抄訳が紹介されたところですが、今回、改めて国内情報において研究者ご本人である阿部光知氏（京都大学）らにその研究の動向を詳説して戴きました。その他の研究情報としては、大川泰一郎氏（東京農工大学）に倒伏抵抗性の水稲長稈品種の育成、宮崎良文氏（森林総合研究所）らに森林セラピーの効果、長崎慶三氏（瀬戸内海区水産研究所）らに有毒アオコ原因藍藻に感染するウイルスの発見、大西正洋氏（生研センター）に農業機械の性能と価格の統計的分析、齋藤幸一氏（千葉県農業総合研究センター）らに低グルテリン米新品種の育成など、バラエティに富みそれぞれ興味深い研究情報をご紹介戴きました。

また、本号の文献情報は、下司雅也氏（畜産草地研究所）、岩井純夫氏（鹿児島大学）、目瀬友一朗氏（広島大学）、水口亨氏（日本水産（株））にご執筆戴きました。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。 （渡辺記）

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース 第114号

平成18年3月15日発行

発行人 朝比奈 清

編集人 吉奥 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971