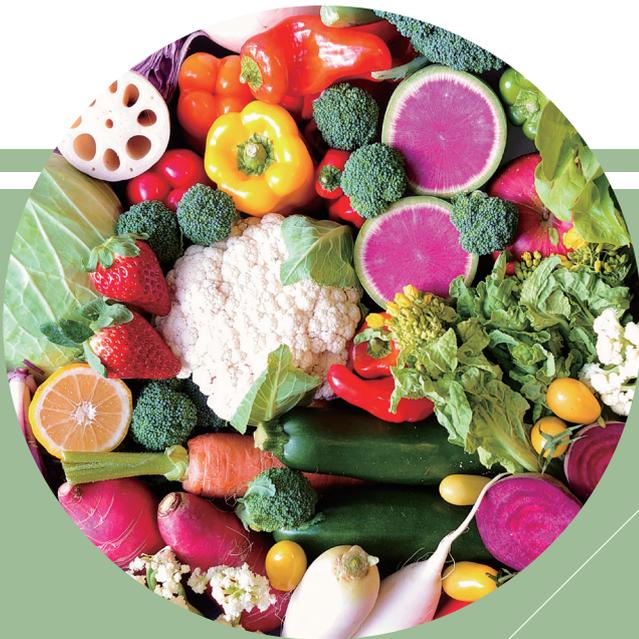


Meijo University No.59,2023
Scientific Reports of the
Faculty of Agriculture

名城大学農学部 学術報告

第59号
2023年3月



目 次

原 著

ナノポアシーケンスによるII型赤果肉リング形質原因遺伝子 <i>MdMYB110a</i> の転写領域の検討 中村月泉・杉山華奈子・太田垣駿吾	1
ジュート (<i>Corchorus capsularis</i> L.) の生長・発育および繊維組織の発達に及ぼす窒素無施肥の影響 道山弘康	9
ニホンジカによるミヤコザサの採食がネズミとオサムシ群集に及ぼす影響 - 奈良県大台ヶ原での8年間の学生実習の結果分析 - 日野輝明	25
総 説	
病害抑止土壌における微生物と生態系機能 藤原和樹	33
資 料	
遊泳行動から探る鯨類の体密度～栄養状態の指標として～ 榑崎友子	41
大規模DNA配列解析の実践的ノウハウ 兒島孝明	47
名城大学農学部 業績紹介 (2021)	i
名城大学農学部学術報告第59号 (2023) 査読者一覧	ix
名城大学農学部学術投稿規程	x
名城大学農学部学術報告執筆要項	xi
名城大学農学部学術報告投稿原稿の送り状	xiii

CONTENTS

Original Articles

Characterization of *MdMYB110a* transcripts, the gene responsible for the type-2 red flesh trait in apple, using a Nanopore sequencing technology.
Tsukimi Nakamura, Kanako Sugiyama, Shungo Otagaki 1

Effect of no nitrogen fertilization on growth, development and fibrous tissue development in jute (*Corchorus capsularis* L.)
Hiroyasu Michiyama 9

Influence of Sika deer on the mice and carabid communities through grazing Sasa bamboos
– Analysis of the eight-year results from the student field training in Mt. Ohdaigahara, Nara Prefecture, Japan –
Teruaki Hino 25

Review Articles

Microbial and ecological functions in disease suppressive soils
Kazuki Fujiwara 33

Note

Estimating body density of whales from their swimming behaviour as indicators of lipid-store body condition
Tomoko Narazaki 41

Practical know-how for large-scale DNA sequence analysis
Takaaki KOJIMA 47

List of Contributions (2021) i

List of Editors in No.59,2023 ix

Submission of the Manuscripts x

Preparation of the Manuscripts xi

Invoice Form of the Manuscripts xiii

原 著

ナノポアシーケンスによる II 型赤果肉リンゴ形質原因遺伝子 *MdMYB110a* の転写領域の検討

中村月泉^a, 杉山華奈子^a, 太田垣駿吾^{a,b,*}

要約 アントシアニンの蓄積により果肉が赤色を呈し、かつ果肉の着色が葉や果皮などの組織や器官の着色とは遺伝的に独立に制御されているリンゴを II 型赤果肉リンゴとよぶ。II 型赤果肉形質の原因遺伝子である *MdMYB110a* 遺伝子は果実成熟中期から後期の果肉で特異的に発現するものの、その転写制御機構については明らかとなっていない。本研究では *MdMYB110a* 遺伝子の発現を制御しうる転写因子の絞り込みを目的とし、果実成熟ステージ別にサンプリングした II 型赤果肉リンゴの果肉組織を用いた RNA-seq 解析を実施した。その結果、*MdMYB110a* 遺伝子と連動した発現様式を示す 53 個の転写因子を同定した。また RNA-seq 解析の結果を精査した結果、リンゴ参照ゲノムで予測されている *MdMYB110a* 遺伝子領域の上流に多数のリードがマッピングされていることを確認した。そこでナノポアシーケンサーを用いた cDNA-PCR Sequencing を実施して *MdMYB110a* 転写産物のカタログ化を試みた結果、リンゴ参照ゲノムの予測と一致する転写産物に加えて、より上流領域からの転写開始を示唆する複数のリードが検出された。今後はこれらの結果をもとに *MdMYB110a* 遺伝子のプロモーター領域の単離と転写因子結合モチーフ配列の解析などを行うことで、*MdMYB110a* 遺伝子の果肉特異的な発現制御機構を明らかにできると期待された。

キーワード：II 型赤果肉リンゴ, MYB 転写因子, RNA-seq, Nanopore シーケンス, PCR-cDNA シーケンス

Characterization of *MdMYB110a* transcripts, the gene responsible for the type-2 red flesh trait in apple, using a Nanopore sequencing technology.

(Tsukimi Nakamura¹, Kanako Sugiyama¹, Shungo Otagaki^{1,2,*}.)

Abstract Type 2 red-fleshed apples accumulate anthocyanin in their cortex, and the coloration of the cortex is regulated genetically independently of the coloration of other tissues and organs, such as a leaf and fruit skin. The *MdMYB110a* gene, a causal gene of the type 2 red-fleshed trait, is expressed specifically in the cortex during the middle and late stages of fruit development. However, the regulation mechanism of the *MdMYB110a* gene is unclear. In this study, we performed an RNA-seq analysis of the cortex at four fruit developmental stages, and identified 53 transcription factor candidates that could regulate the *MdMYB110a* gene expression. Furthermore, as many RNA-seq reads were mapped on the upstream region of the annotated *MdMYB110a* gene location, we investigated the presence of the novel *MdMYB110a* transcripts using the nanopore cDNA-PCR sequencing. As a result, we identified the reads not only identical with the *MdMYB110a* annotation but also covered the annotated *MdMYB110a* region and its upstream region in the single molecule. These results could be helpful in the isolation of the *MdMYB110a* promoter and the identification of the transcription factors which regulate the *MdMYB110a* expression in the future.

Key words: Type-2 red-fleshed apple, MYB transcription factor, RNA-seq, Nanopore sequencing, PCR-cDNA sequencing

^a 名古屋大学大学院生命農学研究科園芸科学研究室

^a Laboratory of Horticultural Science, Department of Plant Production Sciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University.

^b 名城大学農学部

^b Laboratory of Horticultural Science, Department of Agrobiological Resources, Faculty of Agriculture, Meijo University.

〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口1-501 名城大学農学部

* sotagaki@meijo-u.ac.jp

2022年12月5日受付 2023年1月20日受理

緒言

アントシアニンフラボノイド系の植物色素の1つであり、フェニルアラニンを出発基質として細胞質にて種々の酵素反応を経て生合成され、最終的には配糖化された状態で液胞に蓄積する (Passeri et al., 2016)。アントシアニンは分子種により赤色、青色、紫色など様々な色味を呈することが知られているほか、高い抗酸化作用を持つ機能性二次代謝産物としても知られており、II型糖尿病発症リスクの低減効果や抗がん作用、冠動脈疾患の予防効果などが報告されている (Guo and Ling, 2015; Toufektsian et al., 2008)。着色の鮮やかさが収穫果の商品価値を左右する重要な要素の1つとなっているリンゴ果皮の赤い着色も、主にアントシアニンの一種であるシアニジン 3-ガラクトシドの蓄積によるものである (Tsao et al., 2003)。近年ではアントシアニンの蓄積により可食部である果肉が赤色を呈する赤果肉リンゴ品種も数多く育成されており、その見た目の新奇性と機能性二次代謝産物を豊富に含む食材という観点から、我が国におけるリンゴ消費量の拡大に貢献する素材として注目されている。

赤果肉リンゴは、果肉以外にも葉や花弁など様々な器官が赤色を呈するI型赤果肉リンゴと、果肉着色とその他の器官の着色とがそれぞれ独立に制御されているII型赤果肉リンゴの2つに大別される。このうちI型赤果肉形質については、第9染色体上に座乗しR2R3型MYB転写因子をコードする*MdMYB10* 遺伝子が原因遺伝子であること、およびプロモーター領域中に6個の*MdMYB10* 結合モチーフ配列が存在するために*MdMYB10* 遺伝子は自己の転写量を増強する機構を有することが明らかとなっている (Espley et al., 2007; Espley et al., 2009)。一方、II型赤果肉形質については第17染色体上に座乗しR2R3型MYB転写因子をコードする*MdMYB110a* 遺伝子が原因遺伝子として同定されている (Chagné et al., 2013; Umemura et al., 2013)。しかしながら、白果肉リンゴゲノムとII型赤果肉リンゴゲノムの間で*MdMYB110a* のアミノ酸配列の変化を伴うようなDNA多型や*MdMYB110a* 遺伝子近傍での大規模な挿入・欠失変異などの構造多型は検出されず、*MdMYB110a* 遺伝子がII型赤果肉リンゴの果肉でのみ発現する機構については明らかとなっていない (Chagné et al., 2013)。

このような背景の下、本研究では*MdMYB110a* 遺伝子の発現を制御する転写因子の絞り込みを目的とし、長野県果樹試験場で育成されたII型赤果肉リンゴ系統長果34の果肉組織を対象とした果実成熟ステージ別RNA-seq解析を実施した。その結果、*MdMYB110a* 遺伝子の発現様式と連動した発現を示す53個の転写因子を同定した。またRNA-seq解析結果を精査した結果、長果34では参照ゲノムに登録されている*MdMYB110a* 遺伝子領域に加えて上流領域も転写されていることが示唆された。そこで、ナノポアシーケンサーを用いたPCR-cDNAシーケンスにより

着色期のII型赤果肉リンゴの果肉組織で発現している転写産物の配列決定を実施した結果、*MdMYB110a* 遺伝子領域とその上流領域を一分子中に合わせ持つ複数のリードが検出された。

材料および方法

供試植物

長野県高山村に植栽されているII型赤果肉リンゴ系統長果34について、2020年の満開後129日目(9月9日)、満開後150日目(9月30日)、満開後171日目(10月21日)、および満開後192日目(11月11日)に果実をサンプリングした。また長野県須坂市に植栽されているII型赤果肉リンゴ品種‘なかののきらめき’について、2021年の満開後201日目(11月8日)に果実をサンプリングした。果実の縦断面の写真を撮影した後、果肉組織のみを凍結粉砕して-80℃で保存した。

アントシアニンの定量

0.6 gの果肉組織に3 mlの1%塩酸メタノールを加え、4℃で16時間静置して得られた上清をアントシアニン抽出液とした。分光光度計(V-550, 日本分光)を用いて550 nmと657 nmの吸光度を測定し、Wolfe et al. (2003)の方法を改変した以下の式で、シアニジン 3-グルコシド等量としてアントシアニンを定量した。

$$[(OD_{530} - OD_{657}) / \epsilon] \times MW \times V \times 1/gFW$$

この時、 ϵ は1%塩酸メタノール溶解時のシアニジン 3-グルコシドの吸光係数である34,300 (Siegelman and Hendricks, 1958)を、MWはシアニジン 3-グルコシドの分子量である449.38を、Vは抽出液の液量を、gFWは抽出液作成に用いた果実の新鮮重量をそれぞれ表す。

核酸抽出

Nucleon PhytoPure (cytiva)を用い、長果34の葉からゲノムDNAを抽出した。また、Chang et al. (1993)の方法に従い、CTAB法により果肉凍結粉砕試料からTotal RNAを抽出した。

RT-PCR および RNA-seq

500 ngのTotal RNAを鋳型に、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ)を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAを鋳型に、Go-Taq (Promega)を用いて初期変性94℃ 30秒、94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 1分の3ステップを35サイクル、72℃ 10分の条件でPCRを行った。プライマーにはリンゴ参照ゲノムGDDH13 v1.1の*MdMYB110a*予測コード領域の上流に設計した*MdMYB110a_up_InDel_F4* (5'-GAAGCCTAAGAATTTGCCAGAG-3')

および *MdMYB110a_up_Indel_R2* (5'-GCTGGTAGGAAGTAGGAAGATTG-3')を用いた。

RNA-seq には 2020 年にサンプリングした長果 34 果肉組織由来の Total RNA を用い、満開後 129 日目と満開後 150 日目は 4 反復、満開後 171 日目と満開後 192 日目は 3 反復で解析を行った。かずさ DNA 研究所に委託し、Truseq Stranded mRNA Library Prep Kit (illumina) を用いたシーケンスライブラリの作成と DNBSEQ-G400 (MGI) による配列判読を実施した。配列判読は 2×150 bp の条件で行った。Trimmomatic (Bolger et al., 2014) を用いてアダプタ配列と低クオリティリードを除去した後、HISAT2 (Kim et al., 2019) により GDDH13 v1.1 参照配列に対してリードをマッピングし、各遺伝子にマップされたリード数を featureCounts (Liao et al., 2014) にて集計した。クラスタリング解析および発現変動遺伝子の抽出には、R の TCC パッケージ (Sun et al., 2013; Tang et al., 2015) を用いた。マッピング結果は Integrative Genomics Viewer (Thorvaldsdóttir et al., 2013; 以下、IGV) で可視化した。

PCR-cDNA シーケンス

満開後 192 日目の長果 34 果肉組織もしくは満開後 201 日目の 'なかののきらめき' 果肉組織から CTAB 法にて抽出した Total RNA を用い、SQK-PCS109 (Oxford Nanopore Technologies, 以下、ONT) を用いてシーケンスライブラリを調整し、MinION フローセル (ONT) にて配列判読を行った。Guppy v6.1.7 (ONT) を用いてベースコーリングを実施した後、minimap2 (Li, 2018) を用いて GDDH13 v1.1 参照配列に対してリードをマッピングし、featureCounts による各遺伝子にマップされたリード数の集計と IGV によるマッピング結果の可視化を実施した。

結果および考察

MdMYB110a と連動した発現様式を示す転写因子の探索

果実成熟期中期から後期にかけて 4 回に分けて長果 34 をサンプリングして果肉色を調査した結果、満開後 129 日目と満開後 150 日目はやや黄色みがかかった白色であったものが満開後 171 日目には薄桃色へ、さらに満開後 192 日目には赤色へと変化した (図 1a)。果肉中のアントシアニン蓄積量は果肉色の変化と合致しており、満開後 150 日目までは蓄積量が少なかったのに対して満開後 171 日目から満開後 192 日目にかけては段階的に蓄積量が増加していた (図 1b)。一方、RNA-seq 解析にて実施したサンプル間の階層型クラスタリングでは 4 つのサンプリングステージが全て異なるクラスターを形成しており、果肉が未着色であっても満開後 129 日目と満開後 150 日目とでは果肉中の遺伝子の発現様式が明瞭に異なることが示された (図 1c)。

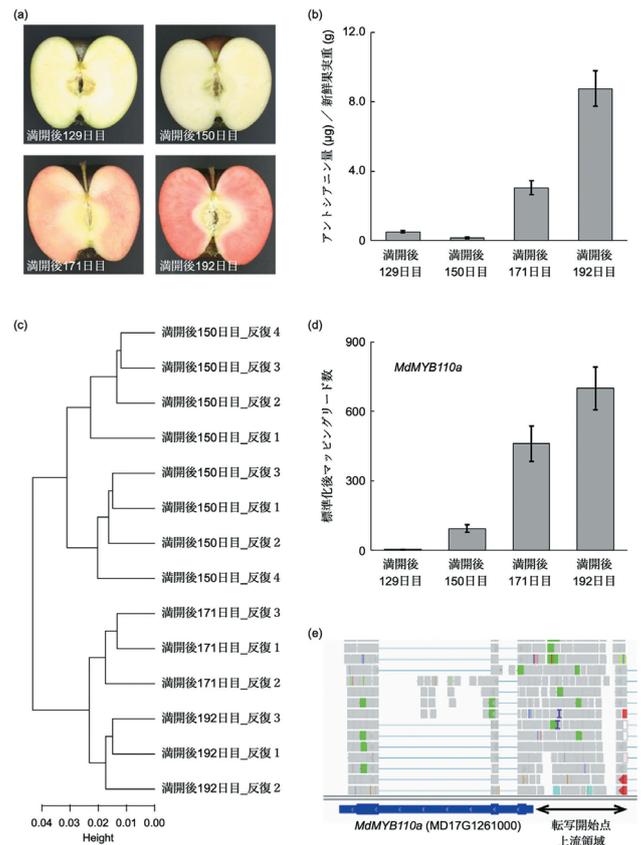


図 1. II 型赤果肉リング系統長果 34 果肉組織の変化と果実成熟ステージ別 RNA-seq 解析. (a) 満開後日数の経過に伴う果肉色の変化. (b) 満開後日数の経過に伴う果肉中のアントシアニン蓄積量の変化. (c) RNA-seq のサンプル間クラスタリング. (d) *MdMYB110a* 遺伝子領域にマッピングされたリード数の経時変化. (e) *MdMYB110a* 遺伝子領域近傍にマッピングされた RNA-seq リードの可視化.

また、満開後 129 日目では *MdMYB110a* 遺伝子の発現がほとんどみられなかったのに対し、満開後 150 日目から満開後 192 日目にかけては *MdMYB110a* 遺伝子の発現量が連続して増加していた (図 1d)。続いて、*MdMYB110a* 遺伝子と類似した発現様式を示す転写因子として、満開後 129 日目と比較して満開後 150 日目以降の 3 ステージ全てで 2 倍以上の発現増加が見られるものを探索した結果、表 1 に示す 53 遺伝子が見出された。これまでに、アントシアニン生合成を正に制御する *MYB* 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子として同定されているものは *MdEIL1* などごく少数に限られており (An et al., 2018)、本研究で見出した 53 個という多くの転写因子から構成されるリストは *MdMYB110a* 遺伝子の果肉特異的発現機構を解明する上で重要な手がかりになると期待される。

表 1 *MdMYB110a* 遺伝子と連動した発現様式を示す転写因子群

遺伝子名	遺伝子機能予測	発現量 ($\log_2(\text{normalized_count} + 1)$)			
		満開後129日目	満開後150日目	満開後171日目	満開後192日目
MD00G1104700	myb domain protein 42	6.90	81.26	118.53	258.10
MD01G1123300	C2H2-type zinc finger family protein	0.51	4.56	2.65	9.48
MD01G1177100	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	1075.44	2552.26	2172.07	3220.13
MD03G1043000	zinc-finger protein 2	11.70	33.60	40.57	71.27
MD03G1143600	bZIP transcription factor family protein	49.43	230.99	255.88	240.70
MD04G1009000	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	16.52	37.69	54.84	87.25
MD04G1034500	Transcriptional factor B3 family protein	0.00	1.27	10.43	8.65
MD04G1034600	Transcriptional factor B3 family protein	0.50	4.05	20.72	30.83
MD04G1064700	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein	150.15	666.55	548.87	804.29
MD05G1113000	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	3.82	26.77	91.88	494.16
MD06G1053600	ERF family protein 38	0.00	1.28	3.01	2.06
MD06G1187600	homeobox 1	1011.19	2958.83	5883.27	14243.31
MD06G1211100	TCP family transcription factor	0.25	1.54	9.96	59.34
MD07G1025300	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	5.42	13.52	20.68	21.17
MD07G1053500	Ethylene insensitive 3 family protein	110.19	230.30	326.66	393.50
MD07G1192000	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	32.75	69.28	71.24	114.78
MD07G1203300	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	1.46	5.65	7.20	9.43
MD07G1224200	myb domain protein 73	6.66	16.02	36.14	98.10
MD08G1107400	myb domain protein 73	0.00	3.04	10.44	6.32
MD08G1174200	bZIP transcription factor family protein	24.51	147.19	420.88	391.58
MD09G1051000	myb domain protein 30	552.43	1622.30	1383.87	2801.09
MD09G1053700	NAC domain containing protein 100	192.38	421.08	654.58	1040.52
MD09G1278400	myb domain protein 113	5.65	12.97	20.63	25.73
MD10G1146100	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	6.49	44.01	75.47	270.14
MD10G1198400	NAC domain containing protein 1	3.71	13.99	12.26	72.48
MD12G1183300	NAC domain containing protein 20	141.64	357.45	444.80	348.58
MD13G1064600	C2H2-like zinc finger protein	183.15	681.85	691.42	570.10
MD13G1069200	NAC-like	258.88	848.47	1109.64	2499.85
MD13G1074800	Homeobox-leucine zipper protein family	77.76	175.23	234.12	348.65
MD13G1079500	homeobox 1	16.96	39.46	58.69	85.25
MD13G1130700	related to AP2 61	966.65	2710.22	2777.21	2688.36
MD14G1010400	WUSCHEL related homeobox 11	87.44	193.34	183.18	271.97
MD14G1063300	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	20.79	42.93	76.00	62.30
MD14G1064200	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	8.38	39.73	90.25	121.54
MD14G1149600	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0.99	3.57	4.18	16.32
MD14G1150900	NAC domain containing protein 83	8.68	21.40	22.02	51.91
MD14G1209000	C2H2-like zinc finger protein	74.51	216.93	353.05	673.32
MD15G1013200	C2H2-like zinc finger protein	1.47	30.46	80.82	72.40
MD15G1025600	RAD-like 6	1.20	5.87	5.72	10.00
MD15G1078200	WRKY DNA-binding protein 7	31.29	136.98	157.13	306.90
MD15G1092500	GATA transcription factor 12	1.01	6.60	24.60	42.90
MD15G1253800	basic leucine-zipper 44	1.47	5.88	7.12	10.64
MD15G1260000	RAD-like 6	0.00	2.29	1.73	3.06
MD15G1283700	heat shock factor 4	212.53	691.86	645.94	1868.88
MD15G1334200	nuclear factor Y	8.78	18.64	41.81	43.48
MD15G1334900	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	72.22	402.51	289.16	721.75
MD15G1384500	AGAMOUS-like 24	1426.17	3020.13	2956.04	3799.70
MD17G1048400	WRKY DNA-binding protein 72	1.22	6.10	5.97	10.95
MD17G1099000	WRKY family transcription factor	4.08	16.99	40.49	165.14
MD17G1138100	WRKY DNA-binding protein 28	2.27	8.41	18.37	20.88
MD17G1261000	myb domain protein 113	4.17	93.62	460.64	699.71
MD17G1278000	sequence-specific DNA binding transcription factors	0.00	38.77	197.70	454.28
MD17G1278100	WRKY DNA-binding protein 23	22.73	86.73	147.62	272.57

ナノポアシーケンスによる *MdMYB110a* 転写産物の特徴付け

RNA-seq 解析の際に参照ゲノムとして用いた GDDH13 v1.1 において、*MdMYB110a* 遺伝子 (5'-UTR, CDS, および 3'-UTR) は第 17 染色体の 32,150,472 bp から 32,153,462 bp の領域にアンチセンス方向で座乗する。しかしながら、前述の RNA-seq 解析で得られたリードのマッピング結果を IGV にて可視化した結果、非常に興味深いことに *MdMYB110a* 遺伝子領域に加えてその上流領域 (第 17 染色体の 32,153,463 bp 以降) にも多数のリードがマッピングされていた (図 1e)。そこで *MdMYB110a* 転写開始点上流領域を標的とするプライマーを作成して長果 34 の果肉組織について RT-PCR を実施した結果、逆転写酵素を加えた反応液でのみ、ゲノム DNA を鋳型とした際と同じ長さの増幅断片が得られた。また、*MdMYB110a* が発現している満開後 171 日目および満開後 192 日目と比較して *MdMYB110a* がほとんど発現していない満開後 129 日目では RT-PCR 産物の増幅量が少ない傾向にあった (図 2a)。これらの結果は、II 型赤果肉リングではゲノム配列

から予測された領域よりも上流から *MdMYB110a* の転写が開始されている可能性を示唆しており、ナノポアシーケンスによりその真偽を検証することとした。

ナノポアシーケンスは ONT により開発・提供されている技術であり、1 分子の核酸の塩基配列を決定できるという特徴を持つ。このシーケンス技術では、人工膜に埋め込まれている大きさ数ナノメートルの生体タンパク質 (ナノポア) を核酸が通過する際に生じる各塩基固有の人工膜の電流値変化をもとに塩基配列情報を取得する。ナノポアを通過する 1 分子の核酸の塩基配列を物理的な切断部位まで連続して読み取ることができるため、テロメアやセントロメアなど従来のシーケンス技術では配列判読が困難であった反復性の高い染色体領域の塩基配列も判読可能であり、植物ゲノムの解読精度を向上させることができる (Michael et al., 2018; Belser et al., 2021)。

また、ナノポアシーケンスのもう 1 つの活用方法として、細胞内に存在する転写産物のカタログ化が挙げられる。転写産物の配列決定方法としては、RNA を直接判読する Direct RNA Sequencing, cDNA を直接判読する Direct cDNA Sequencing, cDNA を PCR で増幅したものを判読する cDNA-PCR Sequencing の 3 つの手法が存在し、いずれの手法でもスプライシングバリエーションや参照ゲノム配列からは予測されていない新規転写産物の検出が可能となる。植物ではこの中でも cDNA-PCR Sequencing の利用例が多く、これまでにイチゴの果実成熟に関連する転写産物やアスパラガスの塩耐性に関連する転写産物のカタログ化が実施されている (Zhang et al., 2021; Chen et al., 2022)。そこで本研究では二次代謝産物を豊富に含む収穫期の II 型赤果肉リング果肉組織を材料に、リング果実に対する cDNA-PCR Sequencing の適用性の評価と *MdMYB110a* 転写産物のカタログ化を実施した。

cDNA-PCR Sequencing のライブラリーは、満開後 192 日目の長果 34 果肉組織から抽出した 50 ng の Total RNA、もしくは満開後 201 日目の 'なかののきらめき' 果肉組織から抽出した 300 ng の Total RNA をもとに作成した (表 2)。シーケンスの結果、前者からは 1,830,968 本のリードが、後者からは 2,113,573 本のリードがそれぞれ得られ、そのうち 77.4% もしくは 80.1% のリードが読取精度 80% 以上と判定された (表 2)。また、これらフィルタリング後のリードの平均長は 972.6 bp もしくは 937.5 bp, N50 は 1,092 bp もしくは 1,083 bp とほぼ同一であり、用いた品種や Total RNA 量の違いによる影響は見られなかった

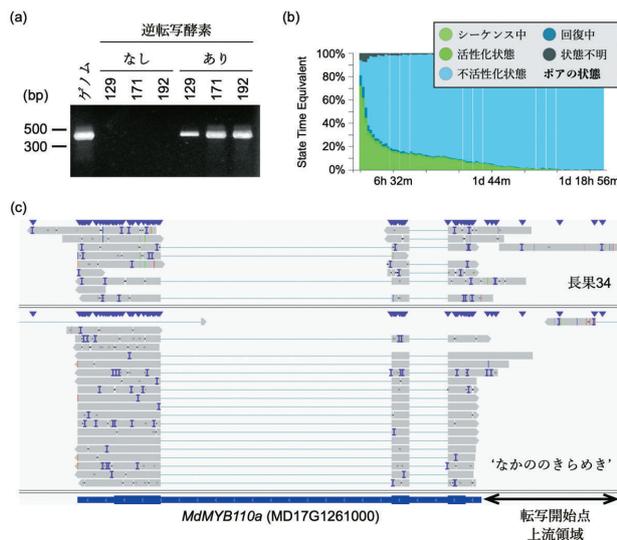


図 2. 新規 *MdMYB110a* 転写産物の同定. (a) *MdMYB110a* 上流領域を標的とした II 型赤果肉リング果肉組織の RT-PCR. 各レーンの数字はサンプリング日 (満開後日数) を示す. (b) cDNA-PCR Sequencing を実施した際の MinION ポアの状態変化. (c) *MdMYB110a* 遺伝子領域近傍にマッピングされた cDNA-PCR Sequencing リードの可視化.

表 2 ナノポアシーケンス結果の概観

実施回	品種・系統	満開後日数	RNA量 (ng)	総判読数	リード数				リード長 (bp)	
					フィルタリング後	>Q7	>Q12	>Q15	平均値	N50
1 回目	長果34	192	50	1,830,968	1,417,840	1,417,840	875,394	93,603	972.6	1,092.0
2 回目	'なかののきらめき'	201	300	2,113,573	1,693,949	1,693,949	995,818	157,863	937.5	1,083.0

(表2). 続いて minimap2 を用いてフィルタリング後リードのマッピングを行った結果, 長果34を用いた場合には96.0%のリードが, 'なかののきらめき'を用いた場合には93.9%のリードが参照ゲノム GDDH13 に対してマッピングされた. 読取精度の低さ (Phred score の低さ) はナノポアシーケンスの問題点の1つとしてしばしば指摘されるが, 今回のマッピング率の高さから, 得られたリードは転写産物のカタログ化を行うのに十分な正確性を持つと考えられた. そこで2回の cDNA-PCR Sequencing について参照ゲノム中の *MdMYB110a* 遺伝子近傍にマッピングされたリードを解析した結果, 参照ゲノムで予測されている *MdMYB110a* 遺伝子領域にマッピングされた24本のリードに加えて, *MdMYB110a* 遺伝子予測領域から上流領域にかけてマッピングされたリードが8本, *MdMYB110a* 遺伝子上流領域にのみマッピングされたリードが2本, それぞれ検出された (図2c). 特に *MdMYB110a* 遺伝子予測領域から上流領域にかけてマッピングされた8本のリードの存在は, II型赤果肉リンゴではゲノム配列から予測された領域よりも上流から *MdMYB110a* の転写が開始されているという仮説を裏付けるデータと考えられた.

まとめ

本研究ではII型赤果肉リンゴ果肉組織の経時的な RNA-seq 解析により, II型赤果肉形質の原因遺伝子である *MdMYB110a* 遺伝子の発現を制御する可能性のある53個の転写因子を同定した. また cDNA-PCR Sequencing からはII型赤果肉リンゴにおいて *MdMYB110a* 遺伝子は参照ゲノムにて予測されるゲノム領域よりも上流から転写が開始されていることを強く示唆するデータが得られた. 今後は5'-RACEにより *MdMYB110a* 遺伝子の転写開始点を決定した上で *MdMYB110a* 遺伝子のプロモーター領域の単離とレポーターアッセイを行う事で, *MdMYB110a* 遺伝子の果肉特異的な発現を司る分子機構を明らかにしたいと考えている. また, RNA-seq と cDNA-PCR Sequencing とで各遺伝子にマッピングされたリード数を比較したところ, 相関係数0.799と強い正の相関がみられた (図3). 一方で cDNA-PCR Sequencing でのみリードが検出

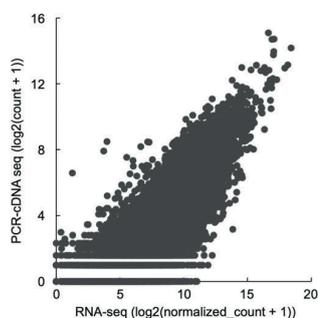


図3. RNA-seq と cDNA-PCR Sequencing のマッピング結果の相関

されなかった遺伝子も数多く見られ (図3), 現状では cDNA-PCR Sequencing を発現解析技術として用いるのは難しいと判断された. これは, cDNA-PCR Sequencing ではライブラリ作成時に PCR を行うために低発現遺伝子よりも高発現遺伝子を検出しやすくなるという技術的な制約に加え,

シーケンス中および活性化状態のポアの数が多いシーケンス中に急速に減少してしまい, 取得リード数が少なくなってしまうことも影響していると考えられた (図2b). 植物細胞には多糖類やポリフェノールなどの二次代謝産物が多く存在しており, これら夾雑物が多く存在する核酸を用いて調整したライブラリはすぐにポアが不活性化してしまうことから, 読取塩基数を増加させるためには Poly(A) 精製などの方法でライブラリ作成に供試する RNA の純度と品質を高めることが有効と考えられた. RNA-seq 解析では約1,000万リードで検出される発現遺伝子の数はほぼ飽和状態に達するという報告もあることから (Yang et al., 2015), 今後の条件検討で取得リード数を約5倍に増加させることができれば, 細胞内に存在する転写産物の量比をより正確に反映した解析が実施できるようになると期待された.

謝辞

供試植物をご提供頂いた長野県果樹試験場の笹脇彰徳氏, 金丸京平氏, ならびに山口維尚氏, また RNA-seq を実施頂いたかずさ DNA 研究所の磯部祥子博士ならびに白澤健太博士に厚く御礼申し上げます. 本研究は JSPS 科研費 JP26850015 および JP22K05612 の助成を受けたものです.

引用文献

- An JP., XF. Wang, YY. Li, LQ. Song, LL. Zhao, CX. You and YJ. Hao (2018) EIN3-LIKE1, MYB1, and ETHYLENE RESPONSE FACTOR3 act in a regulatory loop that synergistically modulates ethylene biosynthesis and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.* **178** : 808-823.
- Belser C., FC. Baurens, B. Noel, G. Martin, C. Cruaud, B. Istace, N. Yahiaoui, K. Labadie, E. Hřibova, J. Doležel, A. Lemainque, P. Wincker, A. D'Hont and JM. Aury (2021) Telomere-to-telomere gapless chromosomes of banana using nanopore sequencing. *Commun. Biol.* **4** : 1047.
- Bolger AM., M. Lohse and B. Usadel (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* **30** : 2114-2120.
- Chagne D., K. Lin-Wang, RV. Espley, RK. Volz, NM. How, S. Rouse, C. Brendolise, CM. Carlisle, S. Kumar, N. De Silva, D. Micheletti, T. McGhie, RN. Crowhurst, RD. Storey, R. Velasco, RP. Hellens, SE. Gardiner and AC. Allan (2013) An ancient duplication of apple MYB transcription factors is responsible for novel red fruit-

- flesh phenotypes. *Plant Physiol.* **161** : 225-239.
- Chang S., J. Puryear and J. Cairney (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11** : 113-116.
- Chen Q., X. Lin, W. Tang, Q. Deng, Y. Wang, Y. Lin, W. He, Y. Zhang, M. Li, Y. Luo, Y. Zhang, X. Wang and H. Tang (2022) Transcriptomic complexity in strawberry fruit development and maturation revealed by Nanopore sequencing. *Front. Plant Sci.* **13** : 872054.
- Espley RV., RP. Hellens, J. Putterill, DE. Stevenson, S. Kutty-Amma and AC. Allan (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, *MdMYB10*. *Plant J.* **49** : 414-27.
- Espley RV., C. Brendolise, D. Chagné, S. Kutty-Amma, S. Green, R. Volz, J. Putterill, HJ. Schouten, SE. Gardiner, RP. Hellens and AC. Allan (2009) Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *Plant Cell.* **21** : 168-183.
- Guo H. and W. Ling (2015) The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: experimental evidence and clinical perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **1** : 1-13.
- Kim D., JM. Paggi, C. Park, C. Bennett and SL. Salzberg (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37** : 907-915.
- Li H. (2018) Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* **34** : 3094-3100.
- Liao Y., GK. Smyth and W. Shi (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* **30** : 923-930.
- Michael TP., F. Jupe, F. Bemm, ST. Motley, JP. Sandoval, C. Lanz, O. Loudet, D. Weigel and JR. Ecker (2018) High contiguity *Arabidopsis thaliana* genome assembly with a single nanopore flow cell. *Nat. Commun.* **9** : 541.
- Passeri V., R. Koes and FM. Quattrocchio (2016) New challenges for the design of high value plant products: stabilization of anthocyanins in plant vacuoles. *Front. Plant Sci.* **7** : 153.
- Siegelman HW. and SB. Hendricks (1958) Photocontrol of alcohol, aldehyde, and anthocyanin production in apple skin. *Plant Physiol.* **33** : 409-413.
- Sun J., T. Nishiyama, K. Shimizu and K. Kadota (2013) TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics.* **14** : 219.
- Tang M., J. Sun, K. Shimizu and K. Kadota (2015) Evaluation of methods for differential expression analysis on multi-group RNA-seq count data. *BMC Bioinformatics.* **16** : 361.
- Thorvaldsdóttir H., JT. Robinson and JP. Mesirov (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* **14** : 178-192.
- Toufeksian MC., M. de Lorgeril, N. Nagy, P. Salen, MB. Donati, L. Giordano, HP. Mock, S. Peterek, A. Matros, K. Petroni, R. Pilu, D. Rotilio, C. Tonelli, J. de Leiris, F. Boucher and C. Martin (2008) Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Nutr.* **138** : 747-752.
- Tsao R., R. Yang, JC. Young and H. Zhu (2003) Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* **51** : 6347-6353.
- Umemura H., S. Otagaki, M. Wada, S. Kondo and S. Matsumoto (2013) Expression and functional analysis of a novel MYB gene, *MdMYB110a_{JP}*, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit. *Planta.* **238** : 65-76.
- Wolfe K., X. Wu and RH. Liu (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* **51** : 609-14.
- Yang J., X. Chen, C. Zhu, X. Peng, X. He, J. Fu, L. Ouyang, J. Bian, L. Hu, X. Sun, J. Xu and H. He (2015) RNA-seq reveals differentially expressed genes of rice (*Oryza sativa*) spikelet in response to temperature interacting with nitrogen at meiosis stage. *BMC Genomics.* **16** : 959.
- Zhang X., H. Gao, Y. Liang and Y. Cao (2021) Full-length transcriptome analysis of asparagus roots reveals the molecular mechanism of salt tolerance induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Environ. Exp. Bot.* **185** : 104402.

原 著

ジュート (*Corchorus capsularis* L.) の生長・発育および繊維組織の発達に及ぼす窒素無施肥の影響

道 山 弘 康

要約 ジュートの生長・発育および繊維組織の発達に及ぼす窒素無施肥の影響を研究した。窒素無施肥によって開花が遅れて主茎葉数がやや増加するが、主茎の最終長、各節間長および節間直径が短くなり、開花期付近の繊維層数および茎一周の繊維束数が減少し、繊維の収量と品質が低下することがわかった。これらは、主茎の伸長、肥大および出葉、伸長開始節間の上昇および各繊維層の先端の存在する節間位の上昇において速度が遅くなることが原因であった。ジュートには主茎の先端周辺で葉や節間の生長が開始していても繊維細胞壁の肥厚が未だ開始していない節間があり、窒素無施肥によってその節間の数が減少した。しかし、各繊維層の発達の間隔には窒素無施肥の影響が明確でなかった。茎一周の繊維束数は繊維組織の内層ほど多く、上位節間ほど多かったが、窒素無施肥区ではそういう増加が少ないために、対照区より繊維束数が少なくなることが明らかになった。発育完了した繊維細胞の直径は14.1～19.3 μm、繊維細胞壁の厚さは4.5～7.6 μmの範囲で変異することがわかったが、節間位および繊維層位による違い並びに窒素無施肥の影響は不明確であった。

キーワード：窒素肥料, ジュート (*Corchorus capsularis* L.), 生長発育, 繊維細胞, 繊維組織.

Effect of no nitrogen fertilization on growth, development and fibrous tissue development in jute (*Corchorus capsularis* L.)

Hiroyasu Michiyama

Abstract The effects of no nitrogen fertilization on growth, development and fibrous tissue development in jute were studied. Without nitrogen fertilization, flowering was delayed and the number of main stem leaves increased slightly, but the final length of the main stem, internode length and internode diameter were shortened, and the number of fiber layers and the number of fiber bundles around the stem decreased. These were caused by the slowing of main stem elongation and thickening, the slowing of emergence of new-leaf positions, the slowing of elevation of elongation-starting internode positions and the slowing of elevation of the positions of the internode where the tip of each fibrous layer exists. Without nitrogen fertilization, the number of internodes with fiber-cell wall not yet started thickening decreased around the tip of the main stem. The number of fiber bundles around the stem was higher in the inner layer of fibrous tissue and higher in the upper internodes. The number of fiber bundles in the nitrogen-deficit plot was smaller than that in the control plot because such an increase was small. It was found that the diameter of fully developed fiber cells varied from 14.1 to 19.3 μm and the thickness of the fiber-cell wall varied from 4.5 to 7.6 μm, and the effect of no nitrogen fertilization was unclear.

Key words: fiber tissue, fiber cell, growth and development, jute (*Corchorus capsularis* L.), nitrogen fertilizer.

緒言

人類はさまざまな植物から繊維を採取して利用してきた。繊維作物のうちジュート (*Corchorus capsularis*

L. および *C. olitorius* L.) は、種子に繊維 (綿毛) を発達させるワタとは異なり、茎の韌皮部に繊維を発達させる作物である (西川 1960)。このような韌皮繊維作物は、ジュートの他にアマ (亜麻, *Linum usitatissimum* L.), ラミー (苧麻, *Boehmeria nivea* Gaud.), タイマ (大麻, *Cannabis sativa* L.), サンヘンブ (クロタラリア, *Crotalaria juncea* L.), ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L.), ロゼル (*Hibiscus sabdariffa* L.) およびイチビ (ボウマ, *Abutilon theophrasti* Medik.) など多数ある (西川 1960)。しかし、生産量からみるとジュート繊維はこれらの作物より圧倒的に多く、繊維作物全体の中で

元名城大学農学部作物学研究室
著者連絡先：〒948-0134 新潟県十日町市上新井11-1
Former Professor, the Laboratory of Crop Science, Faculty of Agriculture, Meijo University
Address : Kamiarai 11-1, Tokamachi, Niigata, 948-0134 Japan
E-mail : michy753@me.com
2022年12月15日受付 2023年1月21日受理

もワタに次いで生産量の多い重要な作物である (FAO 2020).

さまざまな韌皮繊維作物の繊維組織を見ると、アマ、ラミー、タイマおよびサンヘンプのように繊維組織が韌皮内で層状に発達せずに一層しか発達しない作物もあるが、ジュート、ケナフ、イチビおよびロゼルなどは韌皮内で繊維組織が層状に発達することが知られている (Esau 1977, 松林・平尾 1953, 西川 1949; 1960). 著者はさまざまな文献をあたったが、ジュートのような層状に発達する繊維組織について立体構造にまでせまる記載を見つけれなかった。そこで、著者はまずジュートの層状に発達する繊維組織の立体構造とその発達の経過を明らかにした (道山 2020). 次に、それらに及ぼす栽培環境の影響を明らかにして、ジュート栽培に貢献できる基本的知見を得たいと考えた。ジュートのような一年生普通作物の栽培にとって重要な栽培環境は播種期、栽植密度および施肥であるが、食用の普通作物に比べて生産量の少ないジュートのような作物においては収量への影響だけが着目され、その途中経過としての生長・発育の経過に及ぼす影響はほとんど知られていないのが現状である。そこで、著者は繊維組織が層状に発達する作物であるジュート、ケナフおよびイチビの3作物をとりあげ、茎葉の生長経過と開花に及ぼす播種期の違いの影響を明らかにした (道山 2022 a). なお、ロゼルについては温帯で生育を完了できる品種が手に入らなかったため扱わなかった。次いで、これらの作物の代表としてジュートを選び、繊維組織および繊維細胞の発達経過に及ぼす播種期の影響を明らかにした (道山 2022 b). 残る栽培環境は栽植密度と施肥であるが、本研究では肥料、特に肥料成分で最も重要な窒素肥料をとりあげることとした。しかし、ジュートの世界生産のほとんどを占めるバングラデシュからインドにまたがるベンガル地方は河川の氾濫で有機物の供給が毎年繰り返される地域であり、それによってこの地域では多くの場合無肥料で安価にジュート栽培が行われている (西川 1960). また、栽培現地とはまったく環境の異なる日本において窒素施肥に関して研究可能な範囲は、窒素栄養の基本的な影響を知ることまでと著者は考えた。そのため、本研究においてはジュートの生長・発育の経過、開花および繊維組織の発達経過に対する窒素施肥の有無の影響について明らかにすることにした。

材料および方法

栽培

1989年に愛知県名古屋市内の名城大学農学部構内の網室で、名城大学農学部作物学研究室で毎年栽培採種してきたジュート丸実種 (*Corchorus capsularis* L.) を用いて実験を行った。長さ 39 cm, 幅 69 cm, 深さ

10 cm のプラスチック製プランターを各区 3 個ずつ用意して、肥料が施されていない市販の園芸用培土を 18.2 kg 詰め、対照区には硫酸アンモニウムを 43.2 g, 粒状過リン酸石灰を 60.5 g, 塩化カリを 15.9 g 施した。窒素無施肥区には対照区と同量の粒状過リン酸石灰および塩化カリを施したが、窒素成分の肥料である硫酸アンモニウムは施さなかった。プランターの両端から 4.5 cm ずつのスペースを空け、条間を 20 cm とし長さ 39 cm の条を 4 条設定した。各条に株間 2.5 cm とし深さ約 1 cm の点播用の植え穴を作った。5月26日に各植え穴に 5~6 粒の種子を播き、覆土を行った後に手で土壌を鎮圧した。出芽後、適宜間引きを行い、1株1本植とした。栽培期間中は土壌の乾燥程度および植物の生育状況を観察しながら 1日1回以上灌水を行って栽培した。

茎葉の生長調査および開花調査

対照区および窒素無施肥区とも平均的な生育の個体を 10 個体ずつ選んで、6月3日 (播種 8 日後) から 9月14日 (播種 111 日後) まで、3~4日に一度、主茎長、1次側枝茎長、主茎および側枝のすべての葉長、節間長および節間直径を測定した。葉長の測定結果から、基準長を 10 mm とし *Plastochron Index* (P.I.) (Erickson and Michelini 1957) を計算してこれを葉齢の指標とし、長さ 10 mm を超えた葉を展開葉とした。また、出蕾期以降は毎日開花を調査し、個体中で主茎花房の花が最初に開花するため、その開花始期および主茎全節数を記録した。なお、栽培期間中に台風などの強風によって植物体が損傷したため、対照区および窒素無施肥区の測定個体数は最終的にそれぞれ 9 個体および 6 個体になった。

本研究において、主茎葉位、節位および節間位には、それぞれ子葉、子葉節および胚軸を第 0 葉、第 0 節および第 0 節間とし、主茎の上位に向かって番号を付した。すなわち、ある節間に対してその先端側の節およびそこに着生する葉が同じ番号になるように番号を付けた。また、ジュートは主茎先端に花房を分化すると主茎の上位数枚の葉の葉腋から側枝を発生させて、それらのうち最上位節側枝が主茎の代替のように主軸として生長することがわかっている (道山 2022 a). そのため、枝については最上位節側枝を第 1 節側枝とし、下方の側枝に向かって番号を付した。

繊維組織および繊維細胞の調査

繊維組織の発達状況を観察するために、対照区では 6月21日から 8月30日までに約 7 日おきに 11 回、窒素無施肥区では 6月22日から 8月24日までに約 7 日おきに 10 回、平均的な生育の個体を各区各回 3 個体ずつ採取した。これらの個体についても主茎および側枝のすべての葉長、節間長および節間直径を測定した。

この時、茎頂付近に発達開始した葉のうち 10 mm を超えた葉を最上位展開葉とし、節間長が約 1mm を超えて肉眼で観察して明らかに節間と判断できた節間を伸長開始節間として葉位および節間位を記録した。その後、カミソリの刃を使って、主茎および側枝のすべての節間について各節間下部より約 1 cm 上の部分の横断切片を徒手で作成した。長さが 1cm に満たない節間は節間中央部の横断切片を作成した。横断切片は速やかにサフラニンで染色して、顕微鏡の 2 種類の倍率（対物 4 倍および対物 40 倍）で繊維組織および繊維細胞を写真撮影し、撮影した繊維組織および繊維細胞と同じ倍率で対物マイクロメーターの写真も撮影した。

ジュートの茎の繊維組織は図 1 に示したように繊維束が表皮側から形成層側に向かって層状に並ぶように発達しており（道山 2020）、最も表皮側の層を第 1 層として形成層側に向かって各層に番号を付けた。主茎および側枝における各節間の横断切片の顕微鏡写真から、各節間における繊維層数を測定し、その結果から各層の繊維束の最先端が存在する節間位を求めた。また、各節間の各繊維層における茎一周の繊維束数を測定した。なお、前報（道山 2020）から、同じ層位の繊維束が集合と離散を繰り返して繊維束 1 束あたり繊維細胞数は常に大きく変化するため、繊維束 1 束あたりの繊維細胞数は測定しなかった。

以上の繊維組織の測定にあたって、具体的には以下のように行った。繊維細胞は原細胞が分化した後にまず伸長生長が起こり、伸長がほぼ完了した後に繊維細胞壁が肥厚開始する（Esau 1977）。ジュートの場合、細胞壁が肥厚開始すると細胞壁がサフラニンで赤く染まるため、細胞壁が肥厚開始した時点で繊維細胞と判定できる。しかし、一つの節間の茎一周の横断切片を観察すると、場所によって繊維層数が異なった。そこで、各節間の繊維層数については、繊維細胞が茎一周にわたって発達した層までの数を繊維層数とした。すなわち、一つの節間の横断切片のうち層数の最も少ない場所の繊維層数をその節間の繊維層数とした。各層の繊維束の先端がある節間の判定に関しては、一つの層の繊維束に着目して各節間の横断切片を下位節間から上位節間に向けて観察し、サフラニンで赤く染まった繊維細胞が茎一周にわたっている最先端の節間をその層の繊維束先端の存在する節間と判定した。さらにそれらの結果から、最上位展開葉位、最上位伸長開始節間位および繊維組織第 1 層の繊維束先端がある節間位について、相互間の節間位の差を個別に測定した（図 1）。また、各層の繊維束のうち隣接する繊維層の繊維束について、繊維束先端が存在する節間位の差を測定した。

以上の繊維組織の発達経過の解析に際して、図 9 と図 10 の展開葉数、伸長節間および各層の繊維束先端の存在する節間位の増加に関する結果においては最上

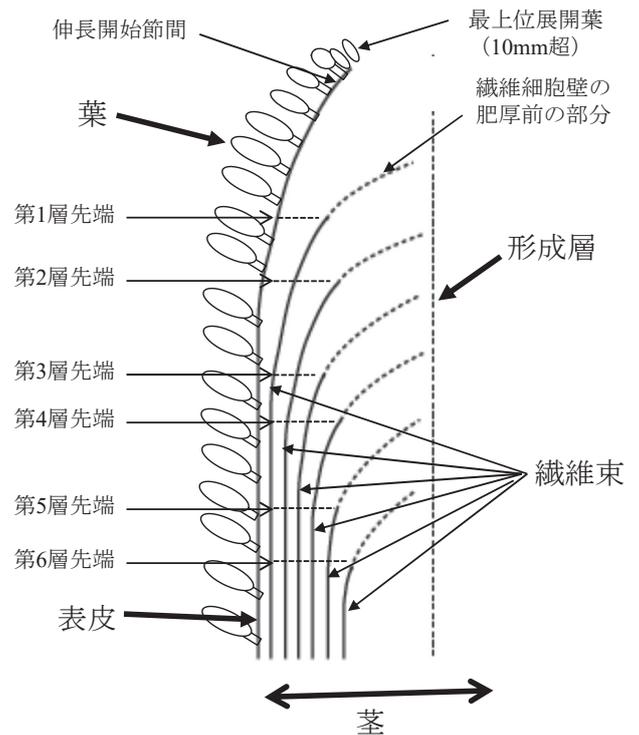


図 1. ジュート茎の放射方向の縦断切片の模式図と本実験の繊維組織調査の説明。本実験では繊維細胞の細胞壁が肥厚を開始した部分の繊維組織および繊維細胞のみを測定の対象とした。

位節側枝が主茎の上位に接合した形としてデータを処理した。すなわち、最上位節側枝の第 1 葉および第 1 節間を主茎最終葉位 + 1 および主茎最終節間位 + 1 として、最上位節側枝の葉位および節間位に番号を付けた。

さらに繊維組織の発達経過の解析を進めるにあたって、最上位展開葉位、最上位伸長開始節間位および繊維組織第 1 層の繊維束先端がある節間位の関係を示した図 11 においては、第 1 層繊維束先端が第 0 節間に観察された播種後 26 または 27 日からのデータを採用した。また、最上位節側枝は一見して主茎の延長に見えるが、葉および花房の着生のしかたおよび開花期付近以後の展開葉、伸長開始節間および繊維束第 1 層の関係から見て最上位節側枝は単なる主茎の延長とは考え難いと判断した。そして、結果を側枝の繊維組織についてはデータに使用せずに主茎内における発達の範囲内とするために、対照区では主茎の最上位葉が 10 mm に達する直前の播種後 61 日の 7 月 26 日まで、窒素無施肥区では播種後 76 日の 8 月 10 日までのデータを採用した。

また、これまでの観察（道山 2022 b）から第 0 節間には未だ第 1 節間まで入り込んで発達していない繊維層が多く蓄積しているために、繊維層の発達初期に外層と内層の繊維束先端の差が 0 になることが多いことがわかっている。そこで、図 12 の各層の繊維束先端が

存在する節間位の関係を解析するにあたっては、対象とする2層の繊維束先端が第1節間以上に発達した日から後で、2つの層の繊維束先端が主茎内に存在する日までのデータを採用することにした。例えば繊維束第1層と第2層の比較のときは、両区とも播種後40日の7月5日から、対照区は播種後68日の8月2日まで、窒素無施肥区は播種後82日の8月16日までのデータを用いた。

各層の繊維細胞の直径および繊維細胞壁の厚さについては、高い倍率の写真から測定した。繊維細胞の直径の測定に関しては、横断切片に見える繊維細胞にはさまざまな大きさのものがあるが、繊維細胞を立体的にみると紡錘形をしていることから (Esau 1977)、1枚の横断切片に見える最も大きなものが繊維細胞の中央部を切ったものと考えられた。そこで、横断切片の写真における各層の繊維細胞の中で、異常に大きなものは除いて、最も大きな繊維細胞が繊維細胞の中央部の切片の映像と判断して、その直径を測定した。このとき、横断切片にみられる繊維細胞は正確な円ではないため、繊維細胞の長径と短径を測定してそれらの平均値を繊維細胞の直径とした。また、繊維細胞壁の厚さの測定は直径を測定した繊維細胞について測定を行った。各繊維層の先端に近い部分の繊維細胞は細胞壁の肥大が完了していないため、節間および繊維層位による違いについての結果を示す時に (表4および5) 統計処理には加えなかった。

結果

茎葉の生長経過に及ぼす窒素無施肥の影響

主茎および側枝の伸長経過をみると (図2)、主茎は開花始期までS字状曲線を描くように伸長して開花始期後に伸長がほぼ停止し、代わって主茎先端数節から側枝が発生して伸長した。この経過については対照区と窒素無施肥区で同じであった。対照区と窒素無施肥区の主茎長を比較すると、生育初期の播種後19日までは両区の差が有意になった日もあったが、有意でない日もあった。しかし、播種後23日 (5回目の測定日) 以降は両区の差がいずれの測定日でも有意になり、窒素無施肥区の主茎長が対照区より短かった。また、対照区では播種後23日以降主茎長の増加速度がそれまでよりやや速くなり、播種後40日以降は著しく速くなること示された。これに対して窒素無施肥区では主茎長の増加速度が播種後日数の増加に伴って対照区ほど速くならなかった。そのため、両区の差は播種後日数の増加に伴って大きくなること示された。側枝は両区とも開花始期と関係して生長開始するため窒素無施肥区が対照区より遅れて生長開始し、側枝長の増加速度が遅く、最終長が短かった。開花始期は対照区が播種後70日の8月4日であったが、窒素無施肥区

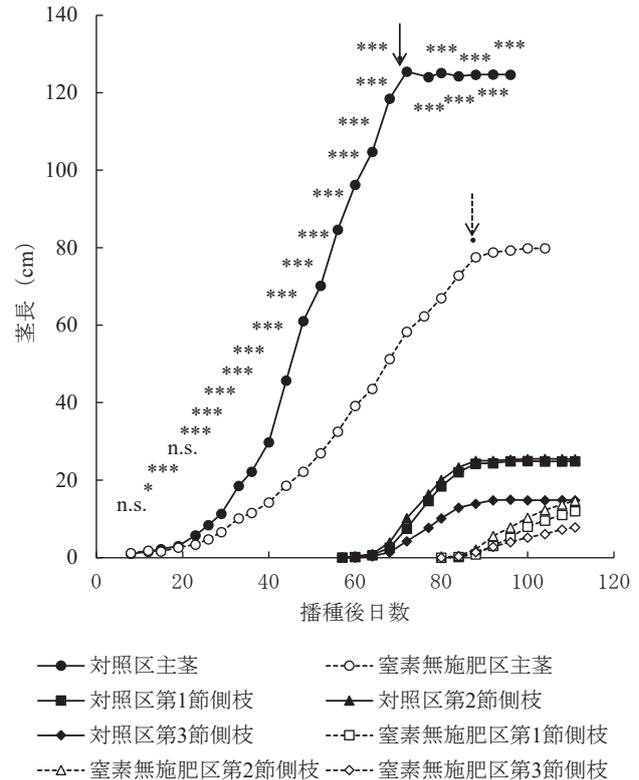


図2. ジュートにおける主茎および側枝の生長経過に及ぼす窒素無施肥の影響。実線矢印は対照区、破線矢印は窒素無施肥区の開花始期を示す。側枝は最上位節側枝を第1節側枝として下方に向かって番号を付した。窒素無施肥の影響について測定日別に t 検定を行い、有意差無しを n.s., 5%レベルで有意差有りを *, 0.1%レベルを *** で示した。

は播種後87日の8月21日であった (表1)。また、主茎本葉数については対照区が25枚、窒素無施肥区が27枚で窒素無施肥区が対照区よりわずかに多かった。このように窒素無施肥区は対照区より開花始期が17日遅れて、伸長期間が長期化し、葉数が多かったにもかかわらず、最終の主茎長は窒素無施肥区が79.9 cmで、対照区の124.7 cmより約45 cmも短くなった。主茎長と同様に最上位節側枝の長さも窒素無施肥区が対照区より短かった。主茎の各節間の最終長は対照区の第8~17節間および窒素無施肥区の第11~18節間にあたる主茎中央部の節間がやや長い傾向で、それらより下部と上部はやや短い傾向であった (図3)。そして、最上位節側枝の節間長は第1節間を除いて上位節間ほど短くなった。いずれの節間も窒素無施肥区が対照区より短かく、主茎第7節間および側枝第2節間を除いてその差が有意であった。

主茎葉齢 (Plastochron index, P.I.) はS字状ではなく直線に近い形で増加した (図4)。P.I. はいずれの測定日でも窒素無施肥区が対照区より小さい傾向であったが、生育の初期から播種後29日までは窒素無施肥区

表1. ジュートにおける開花およびその関連形質に及ぼす窒素無施肥の影響.

	開花始期	開花始期 (播種後 日数)	主茎 本葉節数	主茎長 (cm)	最上位節 側枝長 (cm)
対照区	8月4日	70.3	25.0	124.7	24.9
窒素無施肥区	8月21日	87.3	27.0	79.9	12.0
		**	***	***	***

数値の下に示した**および***は、*t*検定により両播種期の間それぞれ1%レベルおよび0.1%レベルでの有意差があることを示す。なお、主茎本葉節数には子葉節を含まない。主茎本葉節数には子葉節を含まない。

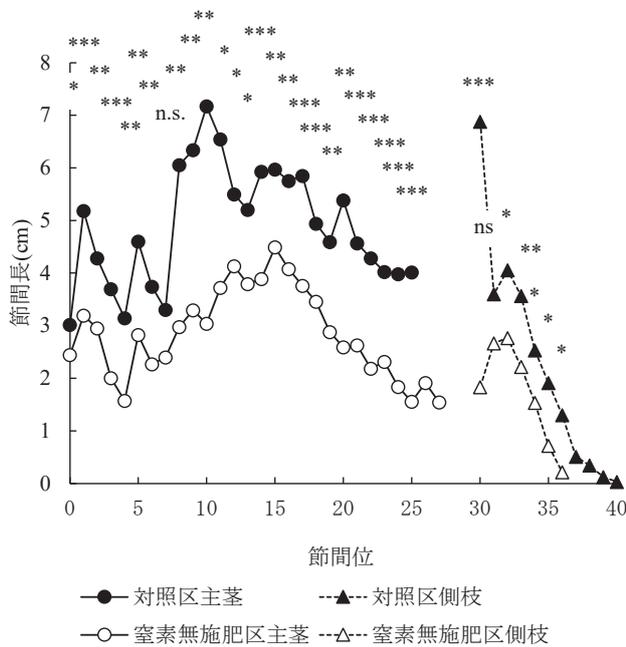


図3. ジュートにおける主茎および最上位節側枝の各節間の最終長に及ぼす窒素無施肥の影響。窒素無施肥の影響について節間別に *t* 検定を行い、有意差無しを n.s., 5%レベルで有意差有りを *, 1%レベルを **, 0.1%レベルを *** で示した。第0節間とは胚軸をさす。

と対照区の P.I. の差が 1.0 未満で小さく、その差が有意でない日もあった。播種後 33 日以降は両区の差が播種後日数の増加に伴って大きくなり、いずれの測定日でも差が有意であった。播種後 33 日以降は対照区の増加速度が以前よりやや速くなる傾向であったのに対して窒素無施肥区では増加速度が以前と比べてあまり変化しなかったことが、それらの原因であった。個別に両区の P.I. 増加速度を計算してみると (図5)、著しく変異が大きかったが、生育前期の対照区では増加速度が 0.6 以下の場合が多かったのに対して生育後期にな

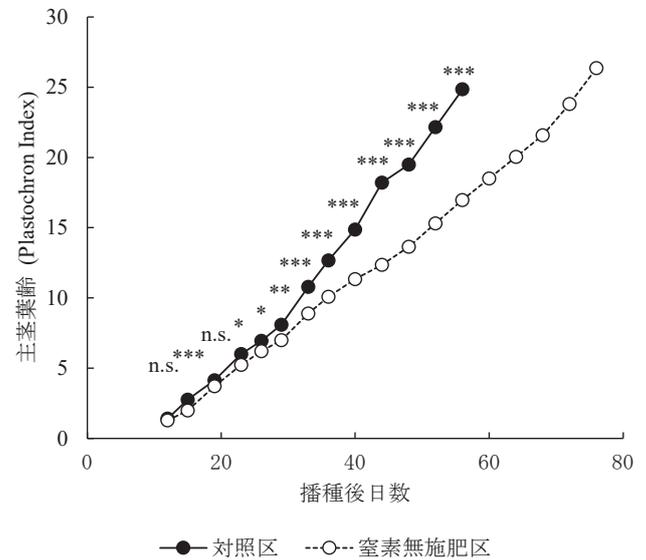


図4. ジュートにおける主茎の葉齢(Plastochrone Index, P.I.)の増加経過に及ぼす窒素無施肥の影響。窒素無施肥の影響について測定日別に *t* 検定を行い、有意差無しを n.s., 5%レベルで有意差有りを *, 1%レベルを **, 0.1%レベルを *** で示した。

ると 0.6 を超える場合が多く、生育後期の増加速度は大きくなる傾向であった。これに対して、窒素無施肥区では生育前期の P.I. 増加速度が対照区よりわずかに小さい傾向であったが、生育前期と後期の速度の違いが不明瞭であり、後期になると対照区より明らかに速度が小さい場合が多くなった。

主茎の葉長は対照区で第11葉くらいまで、窒素無施肥区では第16葉くらいまで上位葉ほど長くなり、主茎上位葉はほぼ同程度の長さであった(図6)。最上位節側枝の葉長では対照区で第6葉以上、窒素無施肥区で第5葉以上で上位葉ほど短くなった。子葉および第1葉を除くすべての葉で窒素無施肥区が対照区よ

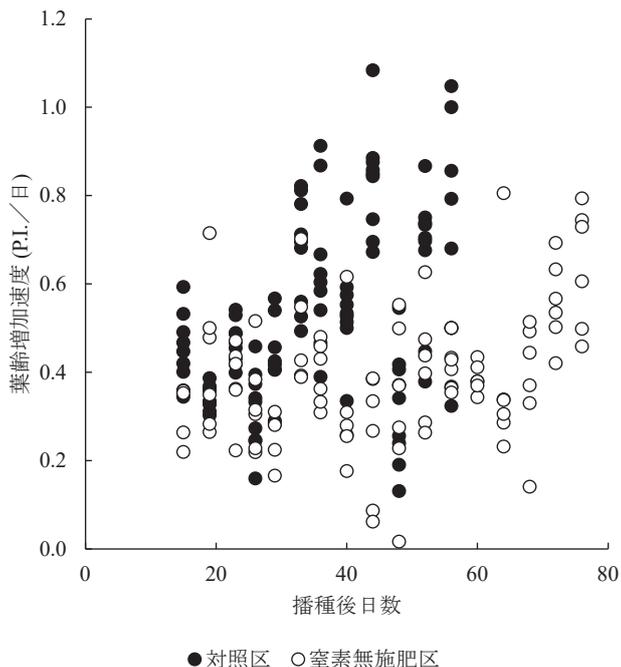


図5. ジュートにおける主茎の葉齢増加速度 (P.I./日) の推移に及ぼす窒素無施肥の影響. 一回前の測定日から横軸の測定日までの増加速度を示した.

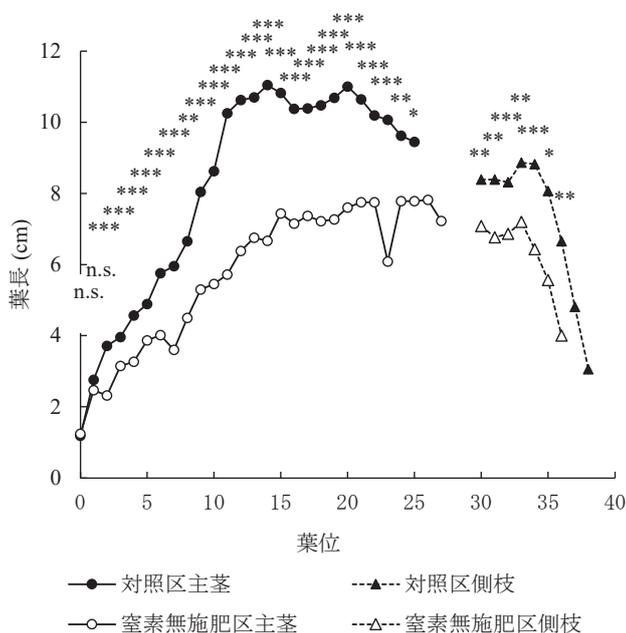


図6. ジュートにおける主茎および最上位節側枝の各葉の最終長に及ぼす窒素無施肥の影響. 窒素無施肥の影響について節間別に *t* 検定を行い, 有意差無しを n.s., 5% レベルで有意差有りを *, 1% レベルを **, 0.1% レベルを *** で示した. 第0葉とは子葉を示す.

り有意に短かった. 窒素無施肥区と対照区の差は, 主茎第11葉が4.5 cmで最大であり, それ以上では第20葉までは3.4 cm くらいの差が保持された.

主茎第1節間の直径は, 生育の全期間にわたって窒素無施肥区が対照区より有意に細かった(図7). 播種後36日までは両区の差が小さかったが, それ以降は対照区の肥大速度が大きくなったのに対して窒素無施肥区はあまり大きくならなかったために, 窒素無施肥区の直径は対照区より著しく細くなった. 開花約1週間後に両区とも肥大が停止し, 窒素無施肥区は肥大停止が遅れたが, 窒素無施肥区の直径が対照区より細いことに変化は無かった. 主茎各節間の最終直径を図8に示したが, 両区とも上位節間ほど細くなり, いずれの節間でも窒素無施肥区は対照区より有意に細かった.

繊維組織各層の発達

対照区および窒素無施肥区それぞれの展開葉位, 伸長開始節間位および繊維組織各層の繊維束先端が存在する節間位の播種後日数の経過に伴う変化を図9上, 下に示した. 繊維組織第1層の繊維束先端は, 対照区が播種後26日の6月21日, 窒素無施肥区が播種後27日の6月22日に第0節間(胚軸)に観察された. そして, 両区とも最上位展開葉位, 伸長開始節間位, 繊維組織第1層の繊維束先端, 次いで順次内層の繊維束先端の順に, 数節の間隔をもって発達することが明ら

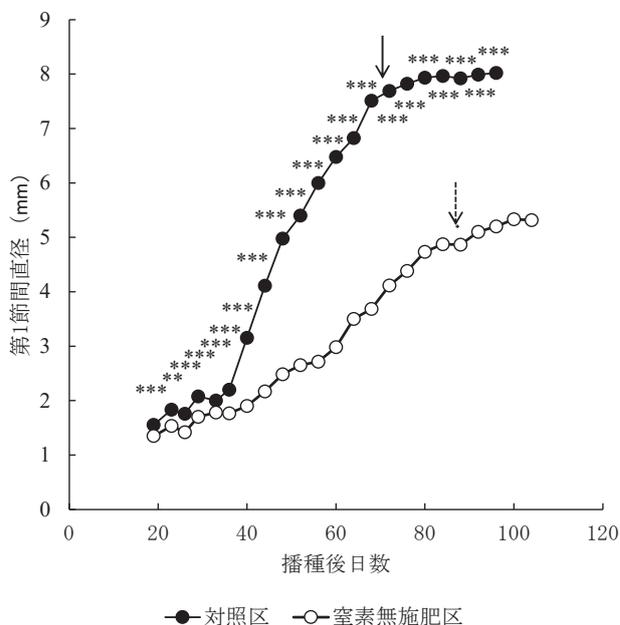


図7. ジュートにおける主茎第1節間の直径の肥大経過に及ぼす窒素無施肥の影響. 実線矢印は対照区, 破線矢印は窒素無施肥区の開花始期を示す. 窒素無施肥の影響について節間別に *t* 検定を行い, 1% レベルで有意差有りを **, 0.1% レベルを *** で示した.

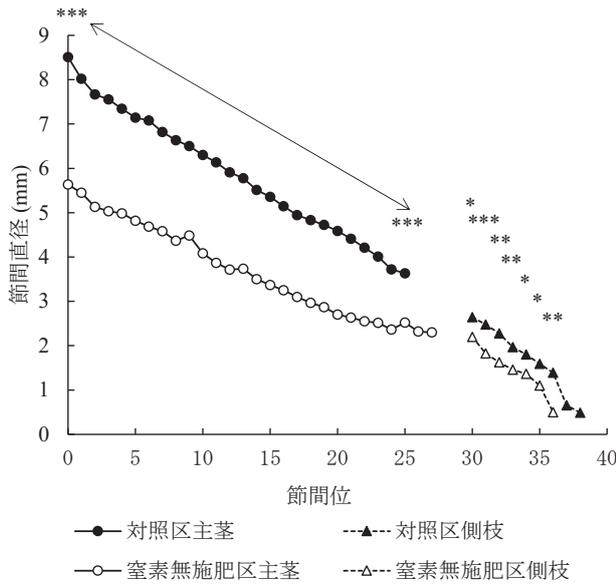


図 8. ジュートにおける主茎および最上位節側枝各節間の最終直径に及ぼす窒素無施肥の影響. 窒素無施肥の影響について節間別に *t* 検定を行い, 5%レベルで有意差有りを *, 1%レベルを **, 0.1%レベルを *** で示した. 主茎の節間はすべて 0.1%レベルでの有意差があった. 第 0 節間とは胚軸をさす.

かであった. また, 葉の展開および節間の伸長が開花 2 週間後頃に終了するが, 繊維組織の発達はそれらより約 1 週間遅くまで続いた. また, 対照区および窒素無施肥区ともに, 開花始期付近で最上位展開葉位および伸長開始節間が側枝に移行するところから, 展開葉位および伸長開始節間位と第 1 層繊維束先端の節間位との差が縮まった. 対照区と窒素無施肥区を比較するために両区を同じグラフに表すと, 展開葉位, 伸長開始節間および各層の繊維束先端が存在する節間位は, いずれも窒素無施肥区が対照区より増加速度が遅く, 同じ測定日で比較すると窒素無施肥区のほうが低いことが明らかであった (図 10 上, 下). しかし, 横軸に伸長開始節間位をとって同じ層位の繊維束の先端の位置を比較すると, 発達の初期から中期までは窒素無施肥区が対照区より発達が速く, どの層位でも窒素無施肥区の繊維束先端の位置が対照区より上位節間にあった (図 11). しかし, 発達の後期には窒素無施肥区の発達が対照区より遅れるようになり, 繊維束先端の位置が下位節間側になった.

茎葉の展開, 伸長開始節間の上昇および繊維組織各層の先端の上昇は順に間隔をおいて起こることから, それらの間隔の変化の経過を明らかにし, それらに及ぼす窒素無施肥の影響を知るために, まず最上位展開葉位, 伸長開始節間位および第 1 層繊維束先端の節間位のうち二者の差を計算し, それらの播種後日数に伴う変化を図 12 に示した.

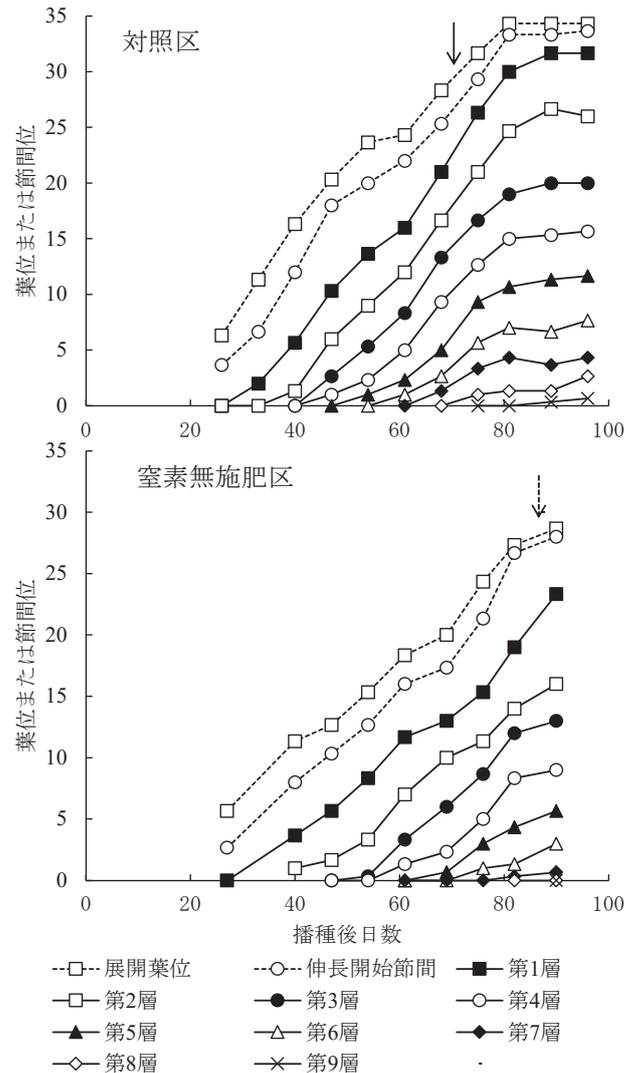


図 9. ジュートの対照区および窒素無施肥区における展開葉位, 伸長開始節間位および繊維組織の層別にみた繊維束先端のある節間位の上昇経過. 矢印は開花始期を示す.

播種後 26 または 27 日においては最上位展開葉位と伸長開始節間位の差は対照区が 2.7, 窒素無施肥区が 3.0 で両区に有意差が無かった (図 12 上). その後対照区における両者の差は 3.7 ~ 4.7 でやや大きい傾向の日が観察されたが, 2, 3 の日もあり変異が大きかった. 一方, 窒素無施肥区は変異が小さく 2.3 ~ 3.3 の間で変動し, 対照区より少ない傾向の日が続いた.

最上位展開葉位と第 1 層繊維束先端の節間位の差に関しては, 播種後 26 日および 27 日にはそれぞれ 6.3 および 5.7 で, 有意差は無いが窒素無施肥区が対照区よりわずかに少ない傾向であった (図 12 中). 対照区ではその後 9.3 ~ 10.5 で有意に増加した. しかし, 主茎第 24 葉が 10 mm になった播種後 61 日には 8.3 まで減少した. これに対して窒素無施肥区では, 播種後 27 日以降差がやや増加する傾向であったが 6.7 ~ 7.7 で

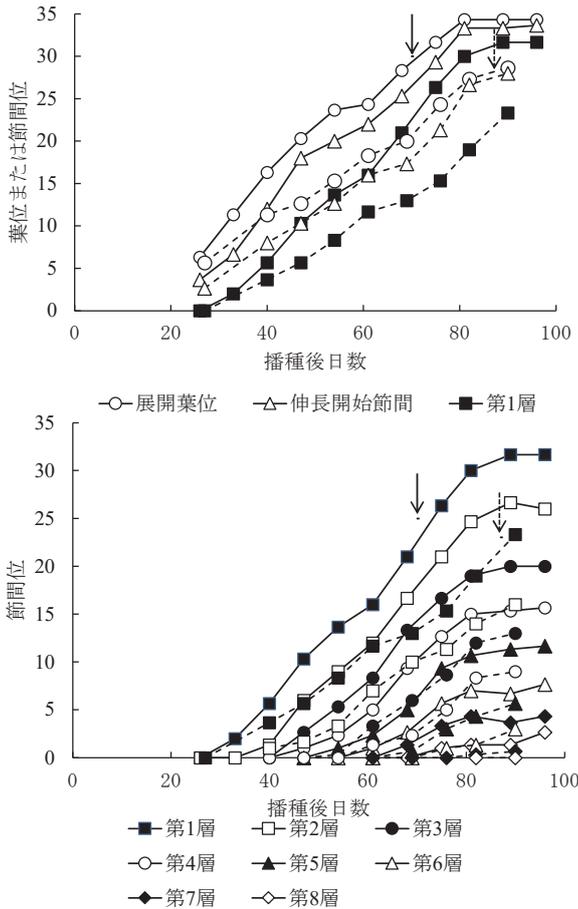


図 10. ジュートにおける展開葉位, 伸長開始節間位および繊維組織の層別に見た繊維束先端のある節間位の上昇経過およびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響. 実線は対照区, 破線は窒素無施肥区を示し, 矢印はそれらの開花始期を示す.

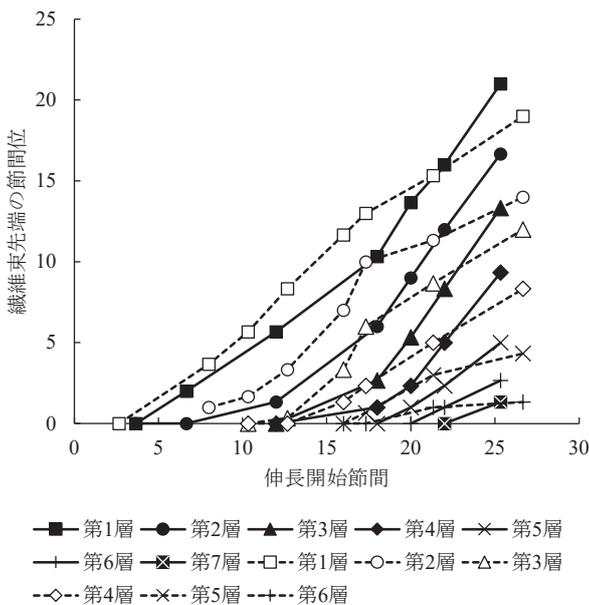


図 11. ジュートにおける伸長開始節位の上昇に伴う繊維組織の層別に見た繊維束先端のある節間位の上昇経過およびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響.

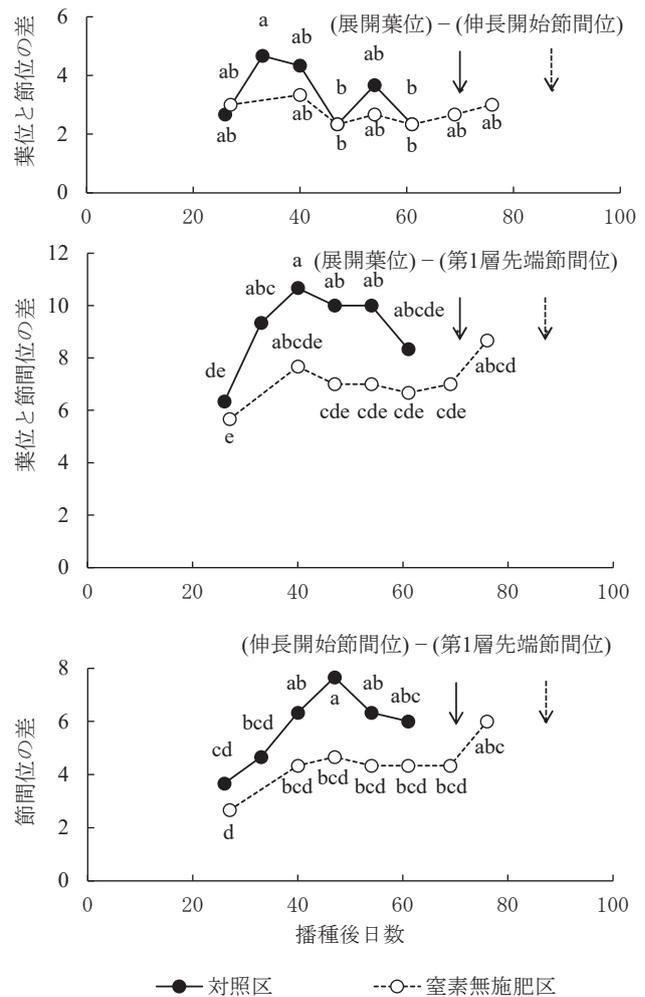


図 12. ジュートにおける展開葉位, 伸長開始節間位および第1層繊維束先端が存在する節間位の差の生育に伴う変化およびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響. この図では主茎最上位葉が10mmに到達する前(対照区は播種後61日の7月26日まで, 窒素無施肥区は播種後76日の8月10日まで)のデータを使用した. 実線矢印は対照区, 破線矢印は窒素無施肥区の開花始期を示す. 同一グラフ内で同じアルファベットの付いた数値間には Tukey 法による5%レベルでの有意差が無いことを示す.

変化が小さく, 対照区より有意に少ない日が多かった. ただし, 主茎第24葉が10mmになった播種後76日には8.7に増加して, 対照区との差が無くなった.

伸長開始節間位と第1層繊維束先端の節間位の差に関しては, 対照区が播種後26日に3.7, 窒素無施肥区は播種後27日に2.7であり, 有意差は無いが窒素無施肥区が対照区よりわずかに少ない傾向であった(図12下). 対照区は, それ以降播種後40日に差が6.3まで有意に増加し, 播種後47日にはさらに増加して7.7になった. その後はやや減少して6.0~6.3になった. これに対して窒素無施肥区では, 播種後27日以降差

が4.3～4.7にわずかに増加する傾向であったが有意ではなく、対照区よりは有意に小さかった。しかし、播種76日後には差が対照区とほぼ同程度の6.0に大きくなった。

繊維組織各層の先端の上昇も間隔をおいて起こるため、それらの間隔を明らかにし、それらに及ぼす窒素無施肥の影響を知るために、隣接する層位の繊維束先端節間位の差を測定し、それらの播種後日数に伴う変化を図13に示した。

第1層と第2層の繊維束先端の節間位の差は、対照区では4.3～5.0で安定していた(図13上)。窒素無施肥区では播種後40日と69日に差が2.7および3.0で対照区より小さかったが、他は4.0～5.0で対照区と同程度であった。第2層と第3層の繊維束先端の節間位の差は対照区では3.3～4.7の範囲であり、生育に伴う変化に有意差がなかった(図13中上)。窒素無施肥区では播種後69日までは対照区との差が無く3.7～4.0であったが、その後はやや減少して2.7～2.0になった。第3層と第4層の繊維束先端の節間位の差は、対照区では3.7～4.7であった(図13中下)。窒素無施肥区でも播種後61日は2.0で対照区より有意差が無いがやや小さかったが、その後は対照区と同程度の3.7でほぼ一定であった。第4層と第5層の繊維束先端の節間位の差は、対照区では播種後54日および61日に2.0であったが播種後68日に4.0になった(図13下)。窒素無施肥区も播種後76日が2.0であり、播種後82日には4.0になり、いずれの場合も有意差が無かった。

茎一周の繊維束数

茎一周の繊維束数について対照区は開花直後にあたる播種後75日の8月4日、窒素無施肥区は播種後90日の8月24日におけるデータを用いて、層位毎に節間位による繊維束数の違いを示した(図14)。全体的に見ると、層位が高くなると繊維束数が増加し、同じ層位では節間位が高くなると繊維束数が増加する傾向であった。また、対照区では内層の繊維束になるほど繊維束数が増加する傾向にあるが、窒素無施肥区では増加が小さいことが明らかであった。さらに、第2層および第5層の上位節間で対照区では繊維束が発達していたのに窒素無施肥区では発達しておらず、窒素無施肥区では繊維層数が対照区より少ないことが示された(図15)。

節間位による変化について統計処理の結果を見やすくして詳細に検討するために、層位別のグラフを図15に示した。対照区の第1層では第1節間が85.0個であり、第16節間の188.3個まで上位節間ほど繊維束数が多くなった(図15上)。しかし、第21節間は第16節間と同程度であった。これに対して、窒素無施肥区の第1層では第1節間が77.0個であり、第6節間は125.7個で第1節間より有意に多くなったが、第6節

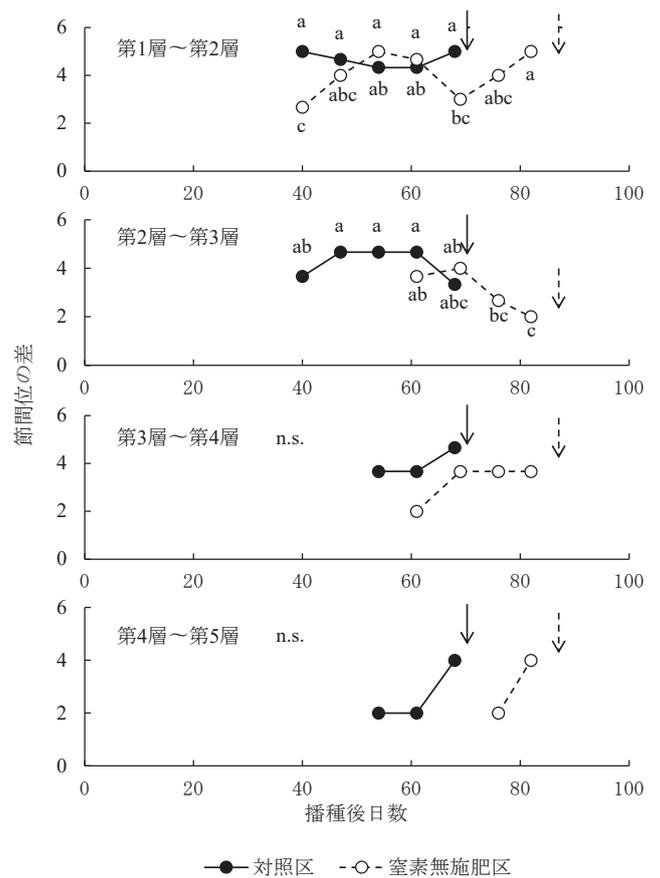


図13. ジュート繊維組織における各繊維束先端が存在する節間位の隣接する層位間の差の生育に伴う変化およびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響。この図では繊維第1層が主茎の先端に到達する前(対照区は播種後68日の8月2日まで、窒素無施肥区は播種後82日の8月16日まで)のデータを使用した。実線矢印は対照区、破線矢印は窒素無施肥区の開花始期を示す。同一グラフ内で同じアルファベットの付いた数値間にはTukey法による5%レベルでの有意差が無いことを示す。n.s.の付いたグラフ内の数値間には有意差が無いことを示す。

間～第21節間はほぼ同程度であった。それらの結果、窒素無施肥区の第1層において第1節間では対照区と同程度であったが、第6節間以上の節間でいずれも対照区より少ない傾向で、第11節間から第21節間の間ではそれらの差が有意であった。第2層においては、対照区の第1節間が103.0個で第1層の第1節間よりわずかに多い傾向であり、第6節間が190.7個で大きく増加し、それ以上の節間でも第16節間の275.0個まで上位節間ほど有意に増加した(図15中上)。窒素無施肥区の第2層は第1節間が81.0個であり、第6節間は127.3個で第1節間より多かったが、第11節間は第6節間と同程度であった。窒素無施肥区の第2層ではすべての節間で少ない傾向であり、第1節間では有意差が無いが第6節間以上では有意に少なかった。第3

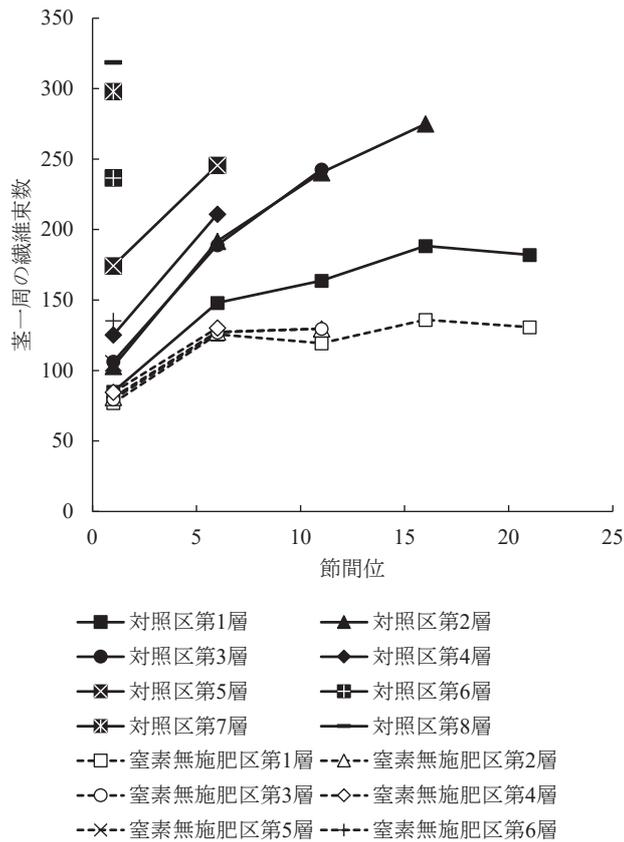


図 14. ジュート繊維組織における層位別にみた茎一周の繊維束数の節間位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響. 茎一周の繊維束数は繊維細胞壁の肥厚が開始した後は変化が無いいため, 本図では開花直後にあたる対照区は播種後 75 日の 8 月 9 日, 窒素無施肥区は播種後 90 日の 8 月 24 日に採取した試料のデータを使用した.

層の繊維束数は第 2 層とまったく同様であった. (図 15 中), 第 4 層 (図 15 中下) および第 5 層 (図 15 下) の繊維束数は上位節間ほど有意に多く, 窒素無施肥区が対照区より有意に少なかった.

次に, 節間別に層位による繊維束数の変化を全体的に見ると (図 16), 節間が高くなるといずれの層位でも繊維束数が多くなり, いずれの節間でも第 2 層と第 3 層の繊維束数は同程度であったが, 他は層位が上昇すると (繊維組織の内層になると) 繊維束数が増加することが明らかであった. 特に第 1 節間を見ると, 第 4 層より内層で層位の上昇に伴う繊維束数の変化は著しく大きかった. また, 窒素無施肥区はいずれの節間でも層位の上昇に伴う繊維束数の増加が少なく, 同じ層位で比較すると対照区より束数が少なくなることが明らかであった. さらに, 第 1 節間, 第 6 節間および第 16 節間の最内層で対照区では繊維束が発達していたのに窒素無施肥区では発達しておらず, 窒素無施肥区では繊維層数が対照区より少ないことが示された (図 16).

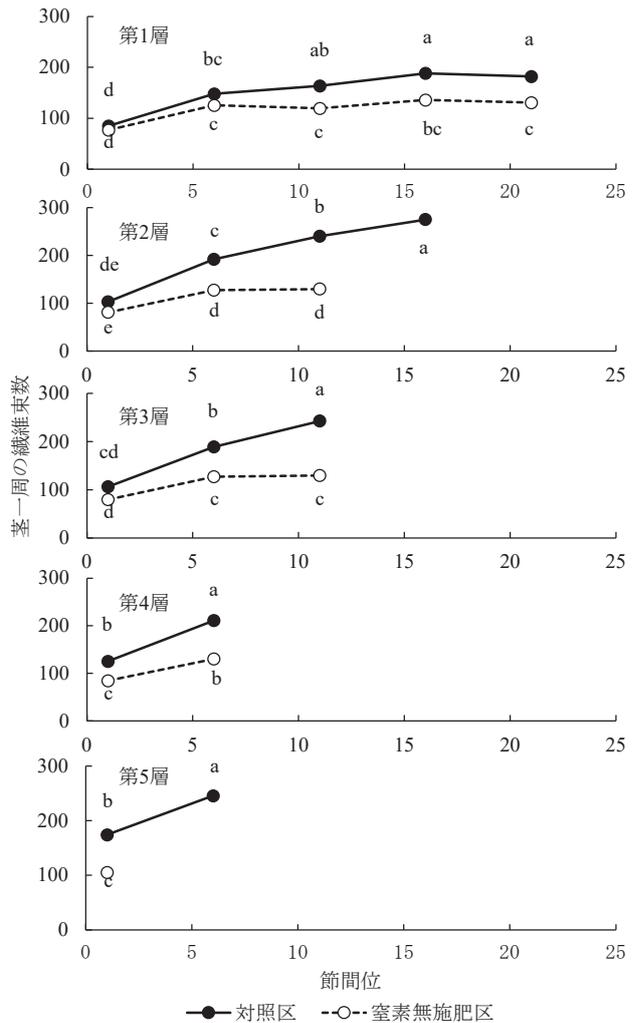


図 15. ジュート繊維組織における茎一周の繊維束数の節間位による違い — 図 13 の統計処理の結果. 同一グラフ内で同じアルファベットの付いた数値間には Tukey 法による 5% レベルでの有意差が無いことを示す.

統計処理の結果を見やすくして層位による繊維束数の変化を詳細に検討するために, 節間別のグラフを示した (図 17). 第 1 節間では, 対照区の第 1 層が 85.0 個で, 第 2 層は 103.0 個に増加する傾向であったが, 第 2 層と第 3 層の差は小さく, 第 4 層は再び 125.3 個に増加する傾向であった (図 17 下). しかし, これらの差にはいずれも有意ではなかった. 第 5 層以上 (内層) になると第 5 層が 174.3 個で第 4 層より有意に増加し, 第 8 層の 318.7 個まで束数が大きく有意に増加した. しかし, 窒素無施肥区の第 1 節間では, 第 1 層が対照区よりわずかに少ない傾向の 77.0 個であり, 第 2 層~第 4 層はいずれも繊維束数が同程度であった. さらに内層では第 6 層の 135.3 個まで内層ほど繊維束数が増加する傾向であったが有意ではなかった. 窒素無施肥区の繊維束数はいずれの層位でも対照区より少ない傾向であり, 第 1 層~第 4 層ではその差が有意でなかつ

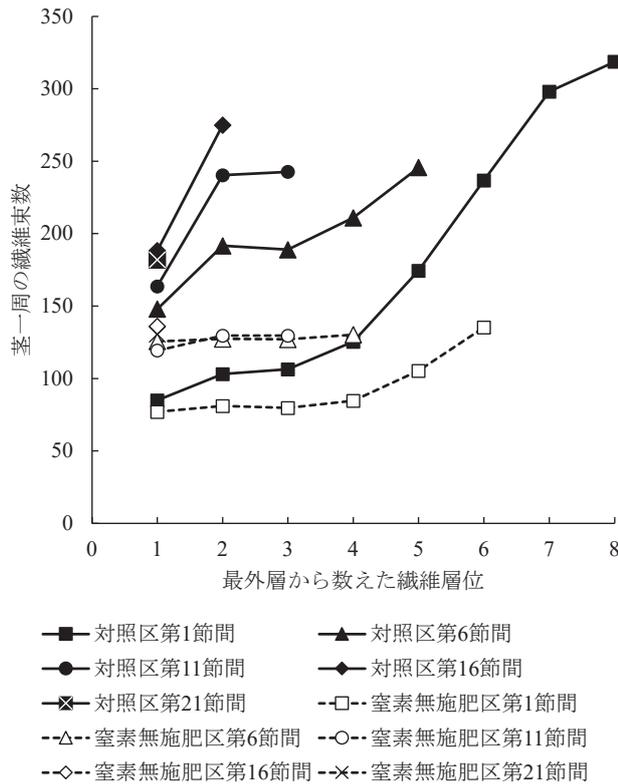


図 16. ジュート繊維組織における節間別にみた茎一周の繊維束数の繊維層位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響。茎一周の繊維束数は繊維細胞壁の肥厚が開始した後は変化無いため、本図では開花直後にあたる対照区は播種後 75 日の 8 月 9 日、窒素無施肥区は播種後 90 日の 8 月 24 日に採取した試料のデータを使用した。

たが、第 5 層以上では有意になった。第 6 節間においては、対照区の第 1 層が 148.0 個であり、第 2 層は 191.7 個で第 1 層より有意に多かったが、第 3 層は第 2 層と同程度であり、第 4 層はわずかに多い傾向であったが有意差は無かった (図 17 中下)。さらに内層の第 5 層は 245.7 個で第 4 層より有意に多かった。これらに対して窒素無施肥区の第 6 節間では、第 1 層から第 4 層まで 125.7 ~ 130.3 個で層位による変化が無かった。その結果、いずれの層位でも繊維束数は対照区より少ない傾向であり、第 2 層 ~ 第 4 層では対照区との差が有意であった。さらに上位の第 11 節間では、対照区の第 1 層が 163.7 個であり、第 2 層が 240.3 個に有意に増加したが第 3 節間は下位節間と同様に第 2 節間と同程度であった (図 17 中)。一方、窒素無施肥区は第 1 層 ~ 第 3 層が 119.3 個 ~ 129.7 個で同程度であり、すべての層位で窒素無施肥区の繊維束数が対照区より有意に少なかった。第 16 節間においては、対照区で第 1 層が 188.3 個に対して第 2 層が 275.0 個有意に多く、窒素無施肥区は第 1 層しかなく、繊維束数は 136.0 個で対照区より有意に少なかった (図 17 上中)。第 21

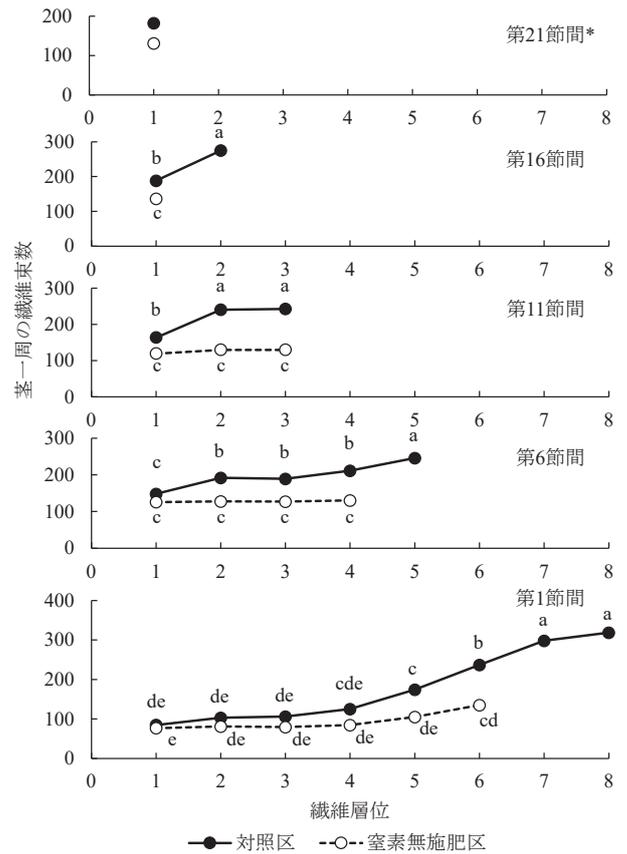


図 17. ジュート繊維組織における茎一周の繊維束数の節間位による違い — 図 15 の統計処理の結果。同一グラフ内で同じアルファベットの付いた数値間には Tukey 法による 5% レベルでの有意差が無いことを示す。第 21 節間* は 2 区しかなかったため *t* 検定を行ったが、5% レベルでの有意差があった。

節間では両区とも第 1 層しか発達しておらず、対照区が 182.0 個、窒素無施肥区が 130.7 個であり、窒素無施肥区が対照区より有意に少なかった (図 17 上)。

繊維細胞の大きさおよび細胞壁の厚み

繊維細胞の直径と繊維細胞壁の厚さの増加経過の代表として、対照区および窒素無施肥区の第 6 節間における経過を図 18 に示した。繊維細胞の直径に関しては、前報 (道山 2022 b) と同様に細胞壁がサフラニンで赤く染まり、繊維細胞と認識された時から細胞の直径はほとんど変化しないことが示された。また、繊維細胞壁の厚さに関しては、繊維細胞壁が赤く染まって初めて繊維細胞と認識されるが、その 1 週間前の繊維細胞壁が未だ赤く染まらず繊維細胞とはわからない時から数えると 2 ~ 3 週間で繊維細胞壁の厚さが最大に近くなりそれ以降は変化しないことが示された。これらは対照区および窒素無施肥区で共通していた。また、これらのグラフからは、細胞壁が肥厚完了した時の繊維細胞の直径および繊維細胞壁の厚さに対する層位の影

響および窒素無施肥の影響は不明であった。

繊維細胞の直径の節間位による違いおよび窒素無施肥の影響について、統計処理の結果とともに表2に繊維層位別にとりまとめた。第1層においてだけ有意差が認められ、多くの節間の繊維細胞が16.0～17.6 μmであったが、対照区の第11節間、第16節間および窒素無施肥区の第16節間が18.8～19.3 μmでそれらよりわずかに大きい傾向、窒素無施肥区の第11節間が14.1 μmでわずかに小さい傾向であり、これらの大きい細胞と小さい細胞の間の差は有意であった。他の層では14.3～18.8 μmの間で変異し、節間による繊維細胞直径の違いおよび窒素無施肥の影響について有意差がみられなかった。しかし、窒素無施肥区と対照区の違いを比較できる部位を検討すると、全19カ所のうち窒素無施肥区が小さかった部位は13カ所あった。

繊維細胞直径の繊維層位による違いおよび窒素無施肥の影響については表3に節間別にとりまとめた。第11節間において対照区の第1層および窒素無施肥区の第1層以外は14.3～16.4 μmであったが、対照区の第1層が19.3 μmでわずかに大きく、窒素無施肥区の第

1層が14.1 μmでわずかに小さく、この両者の間の差は有意であった。他の節間では14.5～19.1 μmの範囲で変異したが、繊維層位による違いおよび窒素無施肥の影響には有意差がみられなかった。

繊維細胞壁の厚さの節間位による違いおよび窒素無施肥の影響について、統計処理の結果とともに表4に繊維層位別にとりまとめた。繊維細胞壁の厚さにおいても、第1層においてだけ有意差が認められ、対照区の第11節間および第16節間が7.6 μmで厚い傾向、対照区の第1節間、窒素無施肥区の第1節間および第11節間がそれぞれ4.8, 5.2, 5.2 μmで薄い傾向であり、これらの厚い細胞と薄い細胞の間の差は有意であった。他の節間の細胞は5.7～6.7 μmであった。他の層では4.5～6.7 μmの間で変異し、これらの繊維層では節間による違いおよび窒素無施肥の影響について有意差がみられなかった。

繊維細胞壁の厚さの繊維層位による違いおよび窒素無施肥の影響については表5に節間別にとりまとめた。いずれの節間においても繊維層位による違いおよび窒素無施肥の影響は有意差が無く、4.5～7.6 μmの範囲で変異した。

考察

ジュートは主茎先端の花房の開花期頃が収穫適期とされるが(西川1960)、本実験の結果、窒素無施肥による窒素栄養の不足によって開花が遅れて主茎葉数がわずかに増えるが(表1)、すべての節間の最終の長さ太さが減少し(図3, 8)、収穫部位である主茎が短く、細くなること became 明らかになった(表1, 図2, 7)。開花期付近の繊維組織においては、窒素栄養の不足によって茎一周の繊維束数が減少するだけでなく、繊維組織の繊維層数も減少することが明らかになった(図14, 15, 16, 17)。これら茎葉の生長および繊維組織の発達の状況から、窒素栄養の不足によって収量が低くなることは明らかであった。また、茎中の繊維細胞はお互いにペクチンで接着して繋がって繊維束になっているので、茎が短いことは「繊維束の長さ」という繊維の品質も劣ることになると考えられた。

主茎の伸長と肥大の経過をみると、対照区の主茎は播種後40日以降伸長速度が著しく増加し(図2)、節間直径は播種後36日以降肥大速度が増加するが(図7)、窒素無施肥区ではそのような速度の増加が明確でなく、全生育期間にわたって窒素無施肥区の主茎の伸長および肥大の速度が対照区より小さいことが本実験で示された。そして、窒素無施肥区の開花始期が17日も遅れて(表1)伸長および肥大の期間が延長しても、主茎の最終の長さ太さが対照区に追いつかないくらいその速度の減少が大きいことも示された(図2, 7)。本実験では測定していないが、窒素無施肥区は葉の葉

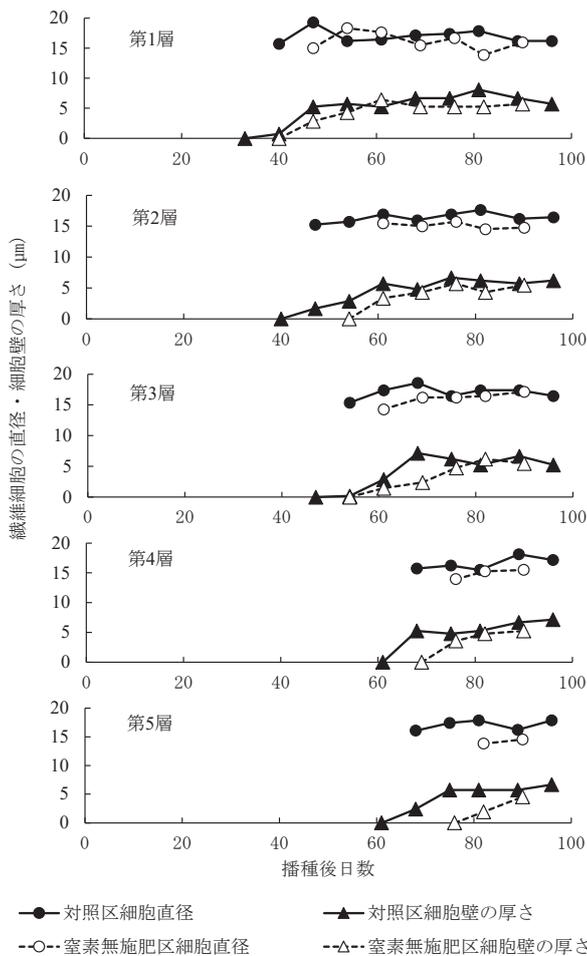


図18. ジュート第6節間の繊維組織における層位別にみた繊維細胞の直径および繊維細胞壁の厚さの生育に伴う変化およびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響。

表2. ジュート繊維組織における繊維細胞直径の節間位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響.

		第1節間	第6節間	第11節間	第16節間	第21節間
第1層	対照区	16.0 ab	17.4 ab	19.3 a	19.1 a	17.6 ab
	窒素無施肥区	17.4 ab	16.0 ab	14.1 b	18.8 a	16.7 ab
第2層	対照区	15.3	16.9	16.4	17.8	n.s.
	窒素無施肥区	18.4	14.8	16.0	15.0	
第3層	対照区	16.9	16.4	16.4	16.9	n.s.
	窒素無施肥区	17.6	17.2	15.7	-	
第4層	対照区	18.6	16.2	16.4		n.s.
	窒素無施肥区	16.2	15.5	14.3		
第5層	対照区	17.9	17.4			n.s.
	窒素無施肥区	18.8	14.5			
第6層	対照区	17.2	17.2			n.s.
	窒素無施肥区	18.8	-			
第7層	対照区	18.1				n.s.
	窒素無施肥区	16.7				
第8層	対照区	16.4				
	窒素無施肥区	-				

本表に示したデータは開花開始直後にあたる対照区は播種後75日の8月9日、窒素無施肥区は播種後90日の8月24日に試料採取したものをを用いた。各節間の横断切片の顕微鏡写真から各層の繊維細胞で最大のものを選び、その長径と短径を測定して平均した。「-」は細胞壁が未だ肥厚していないため繊維細胞が判別できなかった部位を示す。本表では繊維層位別に統計処理を行った。同じ層内で同じアルファベットが付いた数値間には Tukey 法による 5%レベルでの有意差が無いことを示す。n.s. は同じ層内の数値間に 5%レベルでの有意差が無いことを示す。第7層は2区しかなかったため t 検定の結果を示した。

表3. ジュート繊維組織における繊維細胞直径の繊維層位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響.

		第1層	第2層	第3層	第4層	第5層	第6層	第7層	第8層
第1節間	対照区	16.0	15.3	16.9	18.6	17.9	17.2	18.1	16.4
	窒素無施肥区	17.4	18.4	17.6	16.2	18.8	18.8	16.7	-
第6節間	対照区	17.4	16.9	16.4	16.2	17.4	17.2		n.s.
	窒素無施肥区	16.0	14.8	17.2	15.5	14.5	-		
第11節間	対照区	19.3 a	16.4 ab	16.4 ab	16.4 ab				
	窒素無施肥区	14.1 b	16.0 ab	15.7 ab	14.3 ab				
第16節間	対照区	19.1	17.8	16.9					n.s.
	窒素無施肥区	18.8	15.0	-					
第21節間	対照区	17.6							n.s.
	窒素無施肥区	16.7							

本表では表2のデータを節間別に並べ替えて、同じ節間のデータについて統計処理を行った。「-」は細胞壁が未だ肥厚していないため繊維細胞が判別できなかった部位を示す。統計処理の結果の表示法については表2を参照。第21節間は2区しかなかったため t 検定の結果を示した。

表4. ジュート繊維組織における繊維壁の厚さの節間位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響.

		第1節間	第6節間	第11節間	第16節間	第21節間
第1層	対照区	4.8 b	6.7 ab	7.6 a	7.6 a	(4.3)
	窒素無施肥区	5.2 b	5.7 ab	5.2 b	6.2 ab	(1.3)
第2層	対照区	4.8	6.7	6.0	6.2	n.s.
	窒素無施肥区	6.0	5.5	6.7	(1.6)	
第3層	対照区	5.2	6.2	5.2	(3.3)	n.s.
	窒素無施肥区	5.7	5.5	5.2	-	
第4層	対照区	5.2	4.8	(3.9)		n.s.
	窒素無施肥区	4.6	5.2	(1.2)		
第5層	対照区	4.8	5.7			n.s.
	窒素無施肥区	5.2	4.5			
第6層	対照区	5.2	(3.3)			n.s.
	窒素無施肥区	5.7	-			
第7層	対照区	5.7				n.s.
	窒素無施肥区	4.6				
第8層	対照区	(4.3)				
	窒素無施肥区	-				

表2に示したデータと同じ繊維細胞について細胞壁の厚さを測定したものを示した。「-」は細胞壁が未だ肥厚していないため繊維細胞が判別できなかった部位を示す。()付きの数値は各層の繊維束の先端部分にあたり、繊維細胞壁の肥厚途中の部位の測定値を示す。本表では()付きの数値を除いて、繊維層位別に統計処理を行ったが、その結果の表示法については表2を参照。第6層および第7層は2区しかなかったため *t* 検定の結果を示した。

表5. ジュート繊維組織における繊維細胞壁の厚さの繊維層位による違いおよびそれらに及ぼす窒素無施肥の影響.

		第1層	第2層	第3層	第4層	第5層	第6層	第7層	第8層
第1節間	対照区	4.8	4.8	5.2	5.2	4.8	5.2	5.7	(4.3)
	窒素無施肥区	5.2	6.0	5.7	4.6	5.2	5.7	4.6	-
第6節間	対照区	6.7	6.7	6.2	4.8	5.7	(3.3)		n.s.
	窒素無施肥区	5.7	5.5	5.5	5.2	4.5	-		
第11節間	対照区	7.6	6.0	5.2	(3.9)				n.s.
	窒素無施肥区	5.2	6.7	5.2	(1.2)				
第16節間	対照区	7.6	6.2	(3.3)					n.s.
	窒素無施肥区	6.2	(1.6)	-					
第21節間	対照区	(4.3)							n.s.
	窒素無施肥区	(1.3)							

本表では表4のデータを節間別に並べ替えて、同じ節間のデータについて統計処理を行った。「-」は細胞壁が未だ肥厚していないため繊維細胞が判別できなかった部位を示す。()付きの数値は各層の繊維束の先端部分にあたり、繊維細胞壁の肥厚途中の部位の測定値を示す。本表では()付きの数値を除いて、繊維層位別に統計処理を行ったが、統計処理の結果の表示法については表2を参照。第21節間は2区しかなかったため *t* 検定の結果を示した。

緑素含量が少ないと考えられ、また葉の大きさもすべての葉位で対照区より小さく (図 6), 植物体全体での光合成量が少ないことが生長速度低下の大きな原因と思われる。しかし、対照区で主茎の長さ太さの生長が増加した転換点はそれぞれ 7 月 5 日および 7 月 1 日であり、窒素栄養が十分な対照区の高気温が熱帯原産のジュートの生育を促進し、両区の違いを拡大したことも考えられた。

以上のように窒素栄養の不足によって茎の伸長速度および肥大速度が抑制され (図 2, 7), すべての節間の最終の長さ太さが減少し (図 3, 8), 最終の主茎の長さ太さが減少することが明らかになったが (表 1, 図 2, 7), 本実験から葉齢 (P.I.) の進行 (図 4), 最上位展開葉位の上昇 (図 10) および伸長開始節間の上昇 (図 10) についても速度が減少することも明らかになった。さらに、繊維組織の各層の繊維束先端の存在する節間位の上昇速度も減少した (図 10)。すなわち、本実験で与えた窒素栄養不足は茎葉の伸長生長抑制だけでなく、新葉や新節間の分化および繊維組織の発達についてもそれらの速度を抑制することがわかった。ただし、主茎の全葉数は減少せずにわずかであるが増加し、主茎先端に花房分化する特性を持つジュートでは出葉の遅さが影響して開花が遅れ、主茎の伸長期間の長期化に繋がることも明らかになった。

茎葉の発達と層状に発達する繊維組織の発達経過をみると (図 9), 窒素無施肥区, 対照区の両区とも最上位展開葉位, 伸長開始節間位, 繊維組織第 1 層の繊維束先端, 次いで順次内層の繊維束先端の順に、数節の間隔をもって発達することが明らかになった。また、葉の展開および節間の伸長が開花 2 週間後頃に終了するが、繊維組織の発達はそれらより約 1 週間遅くまで続き、開花始期付近で最上位展開葉位および伸長開始節間が側枝に移行するところから、展開葉位および伸長開始節間位と第 1 層繊維束先端の節間位との差が縮まることが明らかになった (図 9)。これらの窒素栄養不足の影響をみた本研究で明らかになったことは、前報 (道山 2022 b) の播種期の影響をみた研究で観察されたことと同様であり、さまざまな環境下でのジュートの繊維組織の発達経過で共通した現象であると考えられた。また、これらの発育経過を窒素無施肥区と対照区で比較するために同じグラフに示したところ (図 10), 窒素無施肥による窒素栄養の不足によって茎葉の発育速度が遅くなるが、各繊維束の先端の存在する節間位の上昇の速度も同様に遅くなることがわかった。

茎葉の発育と繊維組織の発達の関係を見るために、グラフの横軸に伸長開始節間をとって各繊維束の先端の存在する節間位の上昇との関係を見た (図 11)。同じ伸長開始節間位の時で比較すると、繊維束発達の初期から中期では窒素無施肥区の繊維束の発育が対照区

より速いことが示された。また、最上位展開葉位, 伸長開始節間および第 1 層の繊維束先端の存在する節間位の二者間の差をみると、いずれの場合も窒素無施肥区が対照区より小さくなることがわかった (図 12)。このとき、対照区では最上位展開葉位と伸長開始節間の差が最大 4.7 まで増加し、最上位展開葉位と第 1 層の繊維束先端の存在する節間位の差が生育に伴って大きく変化して最大で 10.5 まで増加し、伸長開始節間と第 1 層の繊維束先端が存在する節間位の差も最大で 7.7 まで増加した。これに対して、窒素無施肥区では最上位展開葉位と伸長開始節間の差が 2.3 ~ 3.3, 最上位展開葉位と第 1 層の繊維束先端の存在する節間位の差が 6.7 ~ 7.7, 伸長開始節間と第 1 層の繊維束先端の存在する節間位の差が 4.3 ~ 4.7 で比較的安定していた。これらの結果から、窒素栄養が十分あるときは茎葉の発育および繊維組織の発達ともに速くなるが、茎葉の発育が繊維組織の発達より速く進むことによって、茎の先端部位で葉や茎の生長が開始しているが、繊維組織の発達が細胞壁の肥厚開始にまで到達していない節間が増えることが考えられた。一方、窒素栄養が不足すると、茎葉の発育速度が遅くなるが繊維組織の発達は茎葉の発育ほど遅くならず、茎の先端部位で葉や茎の生長が開始しているが、繊維組織の発達が細胞壁の肥厚開始にまで到達していない節間の数が減ることが考えられた。

各層の繊維束の発達の関係についてみると、どの層の間でも繊維束先端が存在する節間位の差は変異が大きかったが、多くの場合 3 ~ 5 節間であり、窒素無施肥の影響がはっきりしないことがわかった (図 13)。すなわち、繊維組織の繊維層は最外層繊維束先端がある節間から 3 ~ 5 節間下の節間で一つ内側の層が順次発達するという各層繊維束の発達の間隔があると考えられた。この各層繊維束の発達の間隔については窒素無施肥の影響が明確でなく、茎葉の発育と繊維組織の発達の関係には窒素栄養不足の影響があったが、繊維組織の各層の間の発達の間隔への窒素栄養不足の影響は小さいようであった。しかし、この問題に関しては各採取日の試料が各区 3 個体しかとれなかったことが影響して明確な結論に達することができなかった。今後、観察の焦点を絞り試料の個体数を増やした実験が必要と考えられた。

層別にみた茎一周の繊維束数は繊維束が茎一周に発達した後は繊維束数の変動がほとんど無いことがわかっているため (道山 2022 b), 本実験においては開花直後の試料採取日のデータを用いた。繊維束数は同じ層位でみると節間位が上昇すると増加すること、第 16 節間と第 21 節間は同程度であることが再確認された (図 14, 16, 道山 2022 b)。また、同じ節間では内層ほど繊維束数が多いが、第 2 層から第 4 層では第 4 層がわずかに多い傾向であるがほぼ同程度であること

および第5層より内側の層では繊維束数の増加が著しいことも再確認された(図14, 16, 道山2022b)。しかし、窒素無施肥区においては、いずれの層位でも第1節間に比べて第6節間の束数が多いが、それ以上の節間では節間による束数の変化が無かった(図14, 15)。また、窒素無施肥区では、いずれの節間でも最内層の第6層を除いて第2層～第5層の繊維束数が第1層と比較して有意ではなかった(図16, 17)。これらの結果、窒素無施肥による窒素栄養不足によって、節間位の上昇による繊維束数の増加が小さくなり、層位の上昇(内層に向かう)による繊維束数の増加も著しく小さくなることによって、いずれの節間および層位においても繊維束数が対照区より少なくなることが明らかになった。また、窒素栄養不足による繊維束数の減少は上位節間ほど、また内層ほど影響が大きくなることが明らかになった。このような窒素栄養不足による繊維束数の減少は繊維収量に大きな影響を及ぼすと考えられた。

本実験から、繊維細胞壁がサフラニンで赤く染まり繊維細胞と認識された時からその直径はほとんど変化しないこと、また、窒素施肥の有無にかかわらず繊維細胞が認識される1週間前から数えると2～3週間で繊維細胞壁の厚さが最大に近くなりそれ以降は変化しないことが再認識された(図18, 道山2022b)。繊維細胞の直径においては繊維組織第1層における節間による違いおよび第11節間における繊維層位による違いに有意差がみられ(表2, 3)、また、繊維細胞の細胞壁の厚さでは繊維組織第1層における節間による違いのみに有意差がみられた(表4, 5)。しかし、これらの有意差の発生のほとんどには、第11節間の第1層の対照区における繊維細胞の直径が19.3 μmで大きく、細胞壁の厚さが7.6 μmで厚かったのに対して、窒素無施肥区の繊維細胞の直径が14.1 μmで小さく、繊維細胞壁の厚さが5.2 μmで薄かったことが関連していた。他の多くの場合、繊維細胞の直径および繊維細胞壁の厚さともに、節間による違いおよび層位による違いが有意ではなく、窒素無施肥の影響も有意ではなかった。これらから、本実験の範囲では、繊維細胞の直径は14.1～19.3 μmの範囲で(表2, 3)、繊維細胞壁の厚さは4.5～7.6 μmの範囲で(表4, 5)変異し、節間による違い、層位による違いおよび窒素無施肥の影響は無い可能性が高いと考えられた。ただし、本実験では各採取日および処理区の測定数が3個と少ないことから、繊維細胞の直径に関しても測定項目を絞って試料数を増やした実験を行って一層検討することも必要と考えられた。

謝辞

本研究は名古屋大学および名城大学の元教授である故・山本良三先生の懇切丁寧なご指導とご援助のも

とで行われた。また、本研究の遂行にあたって名城大学農学部作物学研究室の1988年(予備試験)および1989年の4年生たちが、本研究を卒業論文のテーマとした学生もそうでなかった学生もあわせて全員体勢で、昼夜を問わず常識を超えて熱心に協力してくださった。彼らの協力がなければこの膨大な研究の作業は完結できなかったものである。ここに深く感謝いたします。

引用文献

- Esau, K. (1977) The stem: Secondary State of Growth and Structural Types, in Anatomy of Seed Plants. p. 295-319. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- FAO (2020) FAOSTAT - Crop. FAO.
- 松林実・平尾ちょう蔵 (1953) ケナフの生育特に繊維組織の發育について. 日本作物学会紀事, 21: 331 - 333.
- 道山弘康 (2020) ジュート (*Corchorus capsularis* L.) における韌皮繊維組織の發達過程. —立体解析から見える繊維組織の形態形成—. 名城大学農学部学術報告, 56: 1 - 6.
- 道山弘康 (2022 a) ジュート (*Corchorus capsularis*), イチビ (*Abutilon theophrasti*) およびケナフ (*Hibiscus cannabinus*) の生長と發育に及ぼす播種期の影響. 名城大学農学部学術報告, 58: 1 - 21.
- 道山弘康 (2022 b) ジュート (*Corchorus capsularis*) における植物単位を基準とした繊維組織の發達経過の特徴および播種期の影響. 名城大学農学部学術報告, 58: 31 - 44.
- 西川五郎 (1949) 黄麻莖韌皮繊維組織の發育について (第一報) (要旨). 日本作物学会紀事, 18 (2 - 4): 1-5.
- 西川五郎 (1960) 工芸作物学. 第2章 繊維料類. 各説第1節 紡織用繊維. p.65-192. 農業図書, 東京.

原 著

ニホンジカによるミヤコザサの採食がネズミとオサムシ群集に及ぼす影響 - 奈良県大台ヶ原での8年間の学生実習の結果分析 -

日 野 輝 明

要約 奈良県大台ヶ原における1年生の野外実習として、ニホンジカ (*Cervus nippon*) による下層植生のミヤコザサ (*Sasa nipponica*) の採食がネズミとオサムシ群集に及ぼす影響を明らかにするための調査を2011年度から2019年度まで行った。柵外のミヤコザサはニホンジカの採食によって現存量が減少したが、稈と葉のサイズを減少させる代わりに稈と葉の数を増加させた。また、ミヤコザサ現存量とニホンジカ個体数との間には遅れをともなう周期的変動が示された。捕獲された3種のネズミのうち、植食者であるスミスネズミ (*Eothenomys smithii*) は、防鹿柵内で個体数が多くササ現存量との正の関係が示されたことから、ニホンジカの個体数変化による影響が大きかったが、種子や昆虫を主要な餌とするアカネズミ (*Apodemus speciosus*) とヒメネズミ (*A. argenteus*) への影響は小さかった。オサムシの種数は防鹿柵外で多く、個体数はミヤコザサ現存量が中程度のときに最大となった。本研究では、学生実習として行われた調査であっても、同じ調査地で継続的にデータを集めていくことで学術的に価値のある結果を得ることができることが示された。

キーワード：オサムシ ニホンジカ ネズミ ミヤコザサ 学生実習

Influence of Sika deer on the mice and carabid communities through grazing *Sasa* bamboos
- Analysis of the eight-year results from the student field training in Mt. Ohdaigahara, Nara Prefecture, Japan -

Teruaki Hino

Abstract From 2011 to 2019, we have conducted a comparative study in and outside a deer-proof fence in Mt. Odaigahara, Nara Prefecture, as a field training for first-year students, to clarify the effects of grazing on dwarf bamboo (*Sasa nipponica*), the dominant species of the understory vegetation, by sika deer (*Cervus nippon*), on rodent and carabid beetle communities. The amount of dwarf bamboo decreased by the deer's grazing, but the number of culms and leaves increased instead of decreasing the size of culms and leaves. A cyclic dynamics in abundance with a lag was observed between deer and dwarf bamboo. Among the three rodent species captured, *Eothenomys smithii*, a herbivore, was most affected by changes in deer density because it was more abundant inside the fence and increased in number with the sasa biomass, whereas the other two species (*Apodemus speciosus* and *A. argenteus*), whose main preys were seeds and insects, were less affected. The species richness of carabid beetles was higher outside the fence, and the abundance was at its maximum when the amount of sasa was moderate. This study shows that the continuous collection of data at the same survey site could yield scientifically valuable results, even though the survey was conducted as a student field training.

Key words: carabid beetle, deer, dwarf bamboo, rodent, student field training

緒言

国内外の多くの森林では、近年、シカの個体数増加や生息分布の拡大とともに、植生への被害が深刻化し、その健全性や生物多様性が失われつつある。シカの個体数増加にともなう森林植生への影響については、嗜好植物の現存量低下や消失、不嗜好植物による置換、樹木の更新阻害、剥皮による樹木枯死などが明らかにされてきている (Russell et al., 2001; Takatsuki, 2009)。また、シカによる下層植生の変化が、森林に生息する動物の個体数や群集構造を変えることが報告されてき

ている (Rooney and Waller, 2003; Hino, 2000)。紀伊半島の吉野熊野国立公園の核心部である大台ヶ原には、国内分布の南限にあたるトウヒ (*Picea jezoensis* var. *hondoensis*) 林と西日本最大級のブナ (*Fagus crenata*) 林など学術的にも貴重な森林が存在することから、環境省国立公園特別保護区に指定されている。この大台ヶ原の森林もまた、1960年代以降に増加してきたニホンジカ (*Cervus nippon*) による樹幹剥皮と後継樹採食がもたらす枯死木の増加と更新の阻害のために衰退が著しい。このような森林植生の衰退はまた、森林に生育・生息する多くの動植物の多様性や物質循環に大きな影

響をもたらしており、多くの研究成果が蓄積されている(日野ら, 2003; 柴田・日野, 2009)。

名城大学農学部生物環境科学科では、2011年度から2019年度まで、奈良県吉野郡上北山村の大台ヶ原において、1年生の野外実習としてニホンジカによる下層植生の採食が森林生態系に及ぼす影響についての調査を行ってきた。環境省自然再生事業によって設置されている防鹿柵の内外で、森林下層植生の優占種であるミヤコザサ (*Sasa nipponica*) の刈り取り調査と下層を生息場所とするネズミとオサムシの捕獲調査を行うことで、シカによる採食の有無の影響を比較するのが目的である。また、ニホンジカの個体数は環境省による捕獲の程度によって年度ごとに変化するため(近畿地方環境事務所, 2019)、実習で得られた追跡調査の結果は、ニホンジカによる森林生態系への影響の年変化についての分析が可能になる。本論文では、初年度を除いて同じ場所で行った2年目からの実習におけるニホンジカ、ミヤコザサ、ネズミ群集、オサムシ群集との間の相互関係についての防鹿柵内外の比較と年変化をまとめた結果について報告する。

方法

調査地

調査を行ったのは、吉野熊野国立公園の核心部である大台ヶ原(703 ha)で、環境省によって国立公園特別保護地区および鳥獣保護区特別保護地区に指定されている(図1)。標高1,300 - 1,700 mの山岳地帯にありながら、緩やかな台状地形(隆起準平原)を形成し、周縁部は急な崖となっている。気象条件は年平均気温5.7℃、年間平均降水量4,700 mmと寒冷かつ多雨である(横田, 2009)。植生については、周辺地域のほとんどがスギ (*Cryptomeria japonica*) とヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) の人工林と落葉広葉樹の二次林に変わっていった中で、国内分布の南限であるトウヒの純林や西日本で最大規模のブナ林などの原生的な自然林が孤立した形で残されている。現存植生は、大きく分けると、林冠木の種類によって東部のトウヒ林と西部のブナ・ウラジロモミ (*Abies homolepis*) 林に分けられる。さらに林床には、優占種としてミヤコザサとスズタケ (*Sasamorpha borealis*) が分布しており、林冠木と林床の組み合わせによって、トウヒ・ミヤコザサ、ブナ・ウラジロモミ・ミヤコザサ、ブナ・ウラジロモミ・スズタケの3つの主要群落に分けることが

できる(横田, 2009)。

名城大学農学部生物環境科学科における1年生の野外実習が、2011年度から2019年度までの8月下旬から9月上旬に1泊2日の野外実習が2クラスで連続4日間行われた。初年度は大台ヶ原駐車場から約300 m離れた西斜面で行ったが、2年目からは約1 km離れたナゴヤ岳の南斜面と南東斜面で行った(図1)。環境省によって設置された植生保護用の防鹿柵の内部(南東斜面)と外部(南西斜面)にそれぞれ70 m x 70 mの調査区を設け、調査区において10 m間隔に8本の調査ラインを設置した。

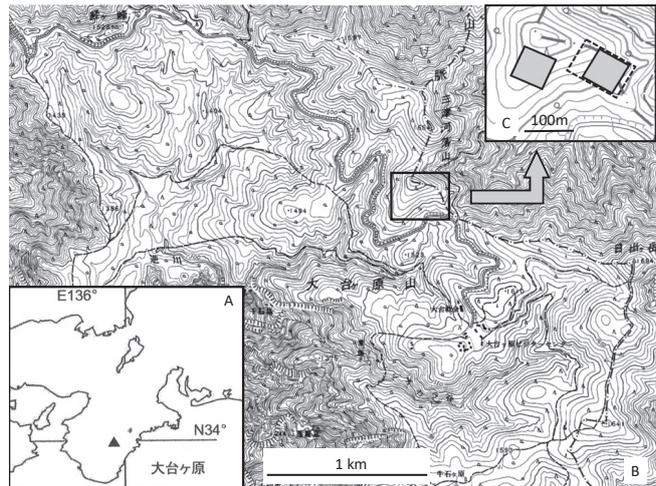


Fig.1 A: Location of the study area in Kii Peninsula (black triangle). B: Location of the study area in Mt. Ohdaigahara (lined square). C: the survey sites inside and outside (gray squares) of deer-proof fence (dashed square). Adapted from a topographic map of 1:25,000 by the Geospatial Information Authority of Japan.

現地調査

1) ニホンジカの糞塊数調査

防鹿柵外に設置した8本の70 mの調査ラインに沿って、50 mメジャーを使って斜面の上部から50 mまでと下部から50 mまでのラインを交互に4本ずつ設置し、各ライン上の長さ50 m、幅1 mの範囲内のシカの糞を計数した。10粒以上固まって観察された糞の集まりを糞塊とし、大台ヶ原の調査に基づいて作られた下記の回帰式(Goda et al., 2008; Ito et al., 2014)を用いて、ニホンジカの個体数密度を推定した。

推定個体数密度(頭/km²) = 8.90 ln(100m²あたりの糞塊数 + 1)

2) ミヤコザサの刈り取り調査

下層の優占植物であるミヤコザサの刈り取りを、柵内外に設置した8本の調査ライン上で行った。各ライ

ン上の1箇所において、ミヤコザサが均等に生えている場所を選んで、柵内では50cm四方、柵外では25cm四方の枠内の稈を根際から剪定ばさみで切り取って採取した。採取用の枠は4本の塩ビパイプにプラスチック紐をとおしてあらかじめ作成したものを使用した。現地で採取したサンプルは実験室に持ち帰り、柵内外の葉と稈に分けてそれぞれの本数と最大長を計測した。計測が終わったサンプルは紙封筒に入れて、乾燥重量(60°C、96時間)を計測した。

3) ネズミの捕獲調査

防鹿柵内外に設置した8本の調査ライン上に10m間隔の8箇所(ネズミ用の生け捕り罠(シャーマントラップ)を設置し、餌にはエン麦を使用して捕獲調査を3昼夜連続で行った。トラップの設置数は、柵外の調査区では64箇所、柵内の調査区では柵の形状のために設置できなかった4箇所を除く60箇所である。捕獲された個体については、種・性・繁殖状態の判別とバネばかりによる体重計測を行った。

4) オサムシの採集調査

地上徘徊性甲虫のオサムシの採集調査を、柵内外でミヤコザサの刈り取り調査を行った場所の付近で、落とし穴トラップ法による採集を行った。各採集地点において、1m間隔で2×4に配置した合計8個のトラップを設置し2日後に回収した。トラップには上部内径80mm、高さ120mmのプラスチック・コップを使用し、ドリルを用いてコップが入る程度の穴を地中に空けて、上面が地上と同じ高さになるように設置した。コップの底面と側面には水抜き用の穴が空けてあり、雨が直接コップに入り込まないように10cm四方のプラスチック板に割箸を刺したものをトラップの横に設置した。採集された個体は研究室に持ち帰り、種同定と計数を行った。

3. 統計的検定

ミヤコザサの形質値(現存量、稈長、葉長、稈数、葉数)、ネズミ3種の個体数、オサムシの個体数についての柵内外比較においては、対応のあるt検定を行い、オサムシの種数についてウィルコクソン符号順位和検定を行った。ネズミ個体数の3種間での多重比較においては、ボンフェローニ補正を行った。年度ごとの柵外のミヤコザサ現存量とニホンジカの個体数、柵内外のミヤコザサ現存量とネズミ個体数、オサムシの個体数・種数との関係については、ピアソンの相関分析を行い、ネズミ個体数の調査期間内の変化については、スピアマンの順位相関分析を行った。また、オサムシ個体数とササ現存量との関係については、二次回帰分析を行った。

結果

ニホンジカ個体数とミヤコザサ現存量との関係

1m²当たりのミヤコザサ現存量は、年によって柵内で214gから496gまで、柵外で135gから289gまで変化し、柵内外の平均現存量には有意な差があった($t=4.19$, $P=0.004$, 図2b)。ミヤコザサの最大稈長と最大葉長は柵内で有意に大きく(稈長: $t=16.9$, $P<0.0001$, 図3a; 葉長: $t=30.7$, $P<0.0001$, 図3b)、稈数と葉数は逆に柵外で有意に大きかった(稈数: $t=-9.11$, $P<0.0001$, 図3c; 葉数 $t=-7.15$, $P<0.0001$, 図3d)。

糞塊法によって推定された1km²当たりのニホンジカの個体数密度の8年間の平均値は 23.7 ± 4.3 頭で、年によって19頭から32頭まで変化した(図2a)。ニホンジカの年度ごとの個体数密度は柵外のミヤコザサ現存量が多い年に有意に増加する一方で($r=0.829$, $P=0.011$, 図4a)、柵外のミヤコザサの現存量はニホンジカが多い年の翌年には有意に減少するという関係があった($r=-0.992$, $P<0.0001$, 図4b)。

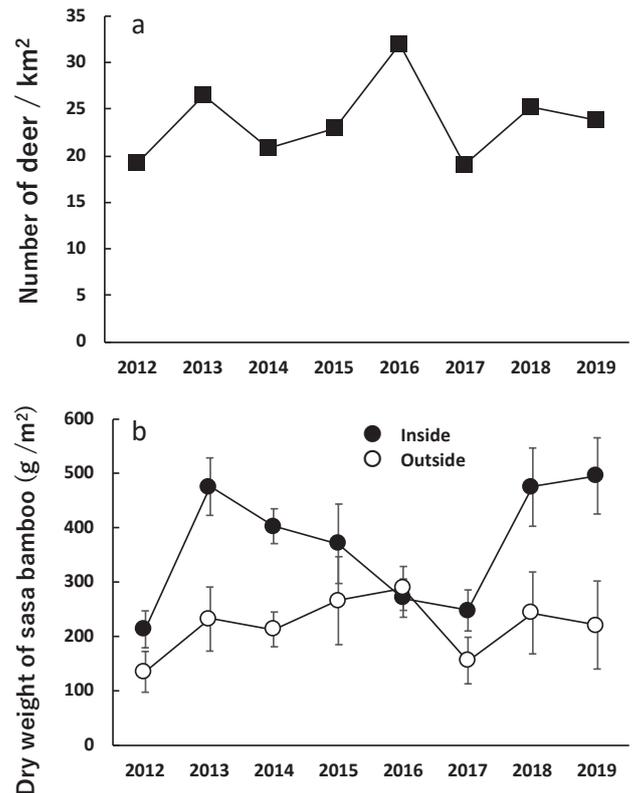


Fig. 2 Annual changes in deer density (a) and average biomass (with SD) of sasa bamboo inside and outside the deer-proof fence (b).

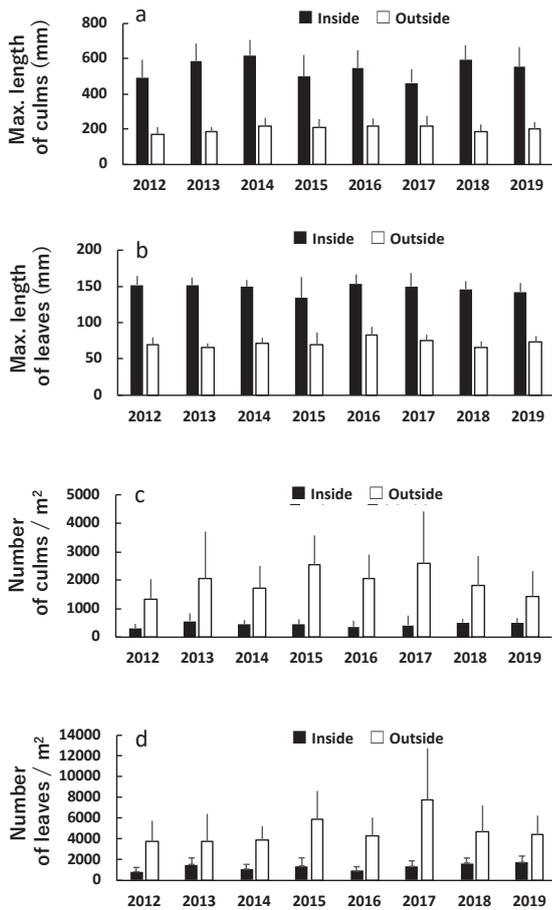


Fig. 3 Annual changes in average maximum lengths (with SD) of culms (a) and leaves (b), and average numbers (with SD) of culms (c) and leaves (d) in sasa bamboo inside and outside the deer-proof fence.

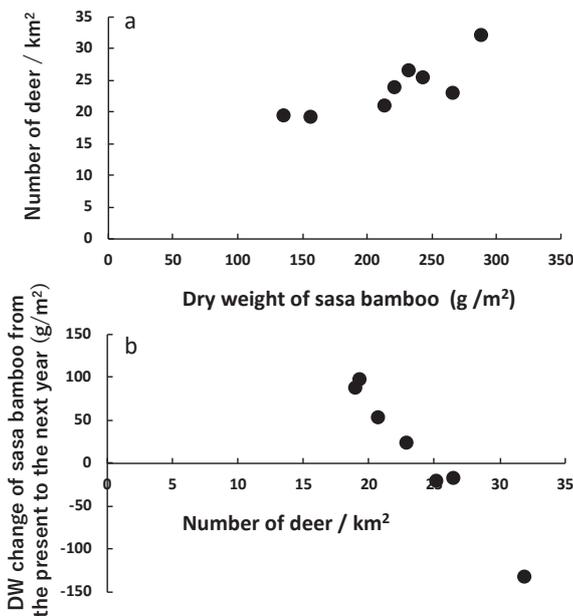


Fig. 4 Relationship between sasa biomass and deer density (a) and between deer density and sasa biomass change from the present to the next year (b). DW = dry weight

ネズミ群集とミヤコザサ現存量との関係

スミスネズミ (*Eothenomys smithii*) の100トラップ・ナイトあたりの個体数は、柵外では8個体以下で年変化は小さかったが、柵内では4個体から45個体までで年によって大きく変化し、柵内外で有意な差があった ($t=4.55$, $P=0.003$, 図 5a). 調査期間全体における柵

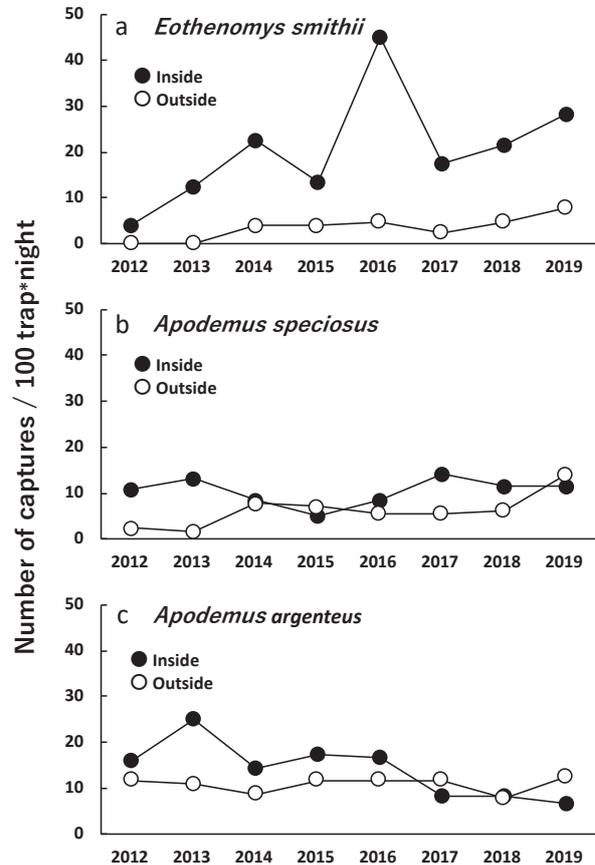


Fig. 5 Annual changes in number of individuals captured inside and outside the deer-proof fence in three species of rodents.

内外のスミスネズミ個体数とササ現存量の間に有意な正の相関があった ($r=0.545$, $P=0.029$, 図 6a). アカネズミ (*Apodemus speciosus*) の100トラップ・ナイトあたりの捕獲個体数は、柵外で2個体から14個体、柵内で5個体から14個体で年による変化は小さく、統計的に有意ではなかったが柵内で多くなる傾向にあった ($t=2.23$, $P=0.061$, 図 5b). 調査期間全体における柵内外のアカネズミ個体数とササ現存量の間においても、統計的には有意ではなかったが弱い正の関係があった ($r=0.441$, $P=0.087$, 図 6b). ヒメネズミの100トラップ・ナイトあたりの捕獲個体数は、柵外で8個体から13個体、柵内で7個体から25個体で年による変化は小さく、柵内外で有意な差がなかった ($t=1.48$, $P=0.182$, 図 5c). 調査期間全体における柵内外のヒメネズミ個体数とササ現存量の間に有意な関係はなかった ($r=0.162$, $P=0.549$, 図 6c).

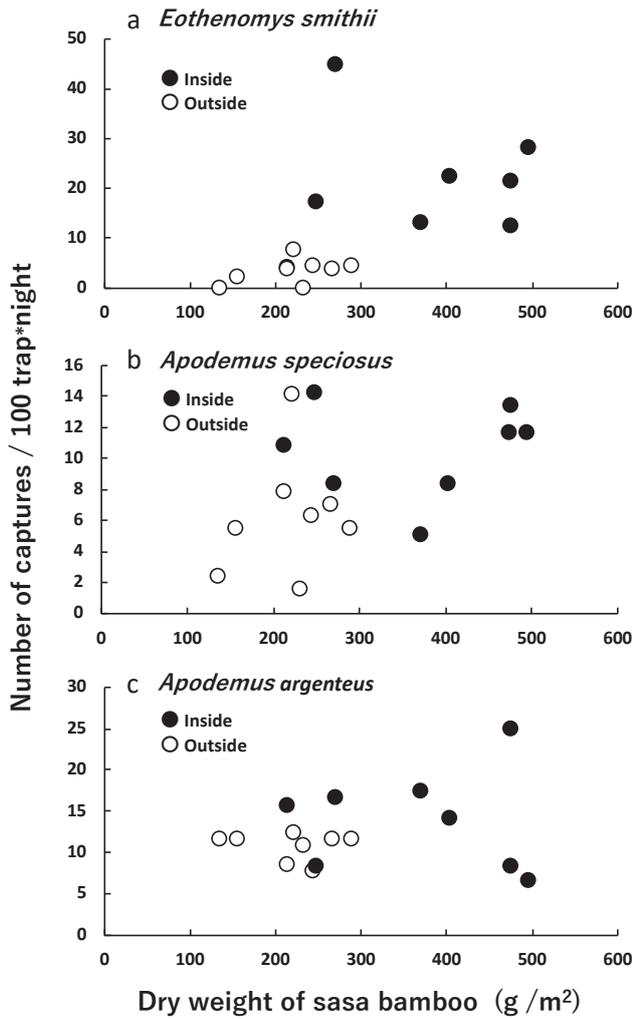


Fig. 6 Relationship between sasa biomass and the number of individuals captured inside and outside the deer-proof fence in three species of rodents.

オサムシ群集とミヤコザサ現存量との関係

8年間の調査期間において、採集された種の合計数は柵内外ともに13種であったが、年ごとの種数は柵内で1種から7種、柵外で5種から8種まで変化し、平均種数は柵外で多かった(表1: $T=3; 0.05 < P < 0.1$)。年ごとの100トラップ・ナイトあたりの全種の合計個体数は、柵内で29個体から130個体、柵外で32個体から170個体まで変化し、平均個体数は柵外で多かった($t=-2.82, P=0.026$, 表1, 図7)。柵内外の両方で

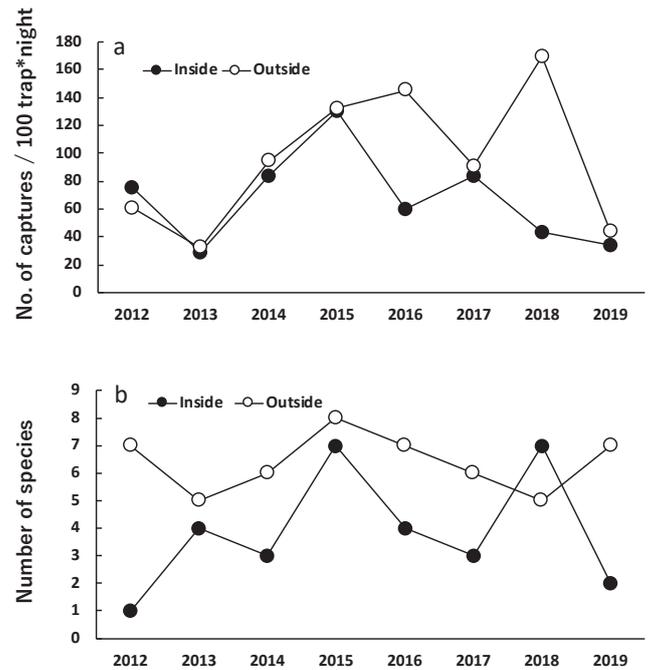


Fig. 7 Annual changes in number of individuals (a) and species (b) captured inside and outside the deer-proof fence in carabid beetles.

Table 1. Annual changes in the number of individuals /100 trap*night of each and all species, and the number of species in carabid beetles collected inside and outside deer-proof fences in Odaigahara from 2012 to 2019.

Species	Scientific name	Inside										Outside									
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Avg	SD	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Avg	SD
オオクロナガオサムシ	<i>Leptocarabus kumagaii</i>	75.0	25.0	79.7	95.5	57.8	81.3	38.3	31.3	60.48	24.63	53.1	24.2	80.5	96.4	112.5	74.2	160.2	37.5	79.83	40.96
イワキオサムシ	<i>Carabus iwawakianus</i>	0	0	0	0	0	1.6	0.8	0	0.29	0.54	2.3	0	0	1.8	1.6	0	0	1.6	0.91	0.93
サドマルクビゴミムシ	<i>Nebria sadana</i>	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.10	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
アカガネオオゴミムシ	<i>Myas cuprescens</i>	0	2.3	3.1	2.7	0.8	0	0.8	2.3	1.51	1.17	0.8	2.3	5.5	2.7	18.8	6.3	0	0.8	4.63	5.73
オオクロツヤゴモクムシ	<i>Trichothichnus lewisi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0.8	0.10	0.26
オオクロツヤヒラタゴミムシ	<i>Synuchus nitidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0	0	0.8	0	0	0	0	0	0.10	0.26
クロツヤヒラタゴミムシ	<i>Synuchus cycloderus</i>	0	0	0	0	0	1.6	0	0	0.20	0.52	0	0	0	0	0	0	1.6	0	0.20	0.52
コクロツヤヒラタゴミムシ	<i>Synuchus melantho</i>	0	0	0	2.7	0	0	0.8	0	0.43	0.89	0	0	0	3.6	4.7	1.6	2.3	0.8	1.62	1.67
ヒメクロツヤヒラタゴミムシ	<i>Synuchus dulcigradus</i>	0	0	0	1.8	0.8	0	0	0	0.32	0.61	1.6	2.3	3.1	4.5	2.3	2.3	1.6	0	2.22	1.21
コモリヒラタゴミムシ	<i>Nipponagonum amphinomum</i>	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0.10	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
コガシラナガゴミムシ	<i>Pterostichus microcepharus</i>	0	0.8	0.8	10.7	0.8	0	0	0	1.63	3.45	0.8	0	1.6	1.8	3.1	0	0	0	0.91	1.09
オオダイナガゴミムシ	<i>Pterostichus ohdaisanus</i>	0	0	0	11.6	0	0	0	0	1.45	3.84	1.6	2.3	3.1	19.6	0	0.8	0	0.8	3.53	6.18
フジタナガゴミムシ	<i>Pterostichus fujitai</i>	0	0	0	5.4	0	0	0	0	0.67	1.77	0	0	0	0	0	0	3.9	0	0.49	1.29
ヒョウゴナガゴミムシ	<i>Pterostichus sphaeriformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0.10	0.26
マルガタナガゴミムシ	<i>Amara macronota</i>	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0.10	0.26	0	0.8	0	1.8	2.3	5.5	0	1.6	1.49	1.73
ヌレチゴミムシsp	<i>Patrabinae sp.</i>	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0.10	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00
No. of individuals / 100 trap*night		75.0	28.9	83.6	130.4	60.2	83.6	43.8	33.6	67.37	31.19	60.9	32.0	94.5	132.1	145.3	90.6	169.5	43.8	96.11	46.40
No. of species		1	4	3	7	4	3	7	2	3.88	2.03	7	5	6	8	7	6	5	7	6.38	0.99

最も個体数が多かったのは、オオクロナガオサムシ (*Leptocarabus kumagaii*) で全体の約90%を占めた(表1)。調査期間全体における柵内外の種数と個体数のいずれにおいても、ササ現存量の間に直線的な有意な関係はなかった(種数: $r=-0.231$, $P=0.390$; 個体数: $r=-0.276$, $P=0.301$, 図8a)。しかし、個体数とササ現存量との間の二次回帰分析では、ササ現存量が $300\text{g}/\text{m}^2$ 前後で最大個体数となる有意な関係が得られた(図8a)。

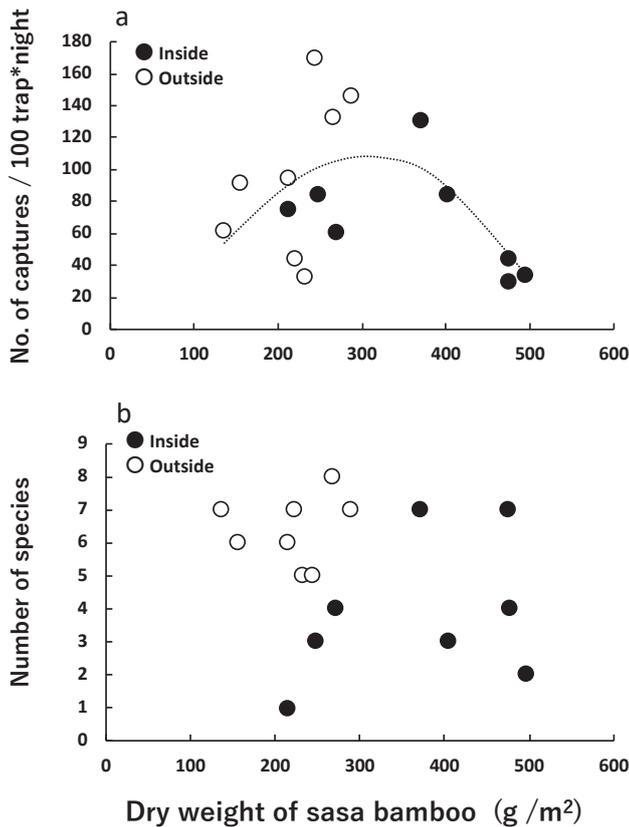


Fig. 8 Relationship between sasa biomass and the number of individuals (a) and species. quadratic regression equation: $y = -0.002x^2 + 1.228x - 78.64$ ($R^2=0.3417$, $P<0.01$). (b) captured inside and outside the deer-proof fence in carabid beetles.

考察

ニホンジカとミヤコザサとの関係

柵内外でのミヤコザサの形質値の比較から、柵内では柵外よりも稈長が2.3倍、葉長が約2倍大きいものに対して、柵外では柵内よりも稈数が3.6倍、葉数が2.6倍大きく、その結果として柵内の現存量は柵外の1.2倍程度であった(図3)。この結果は、ミヤコザサがニホンジカの採食にともなう稈と葉のサイズの減少を補うために、稈と葉の数を増加させることで、C/F(非同化器官重/同化器官重)比を小さくして光合成を効

率よく行うための対抗戦術の一つであると考えられる(Yokoyama and Shibata, 1998)。国内に分布するササには大きく分けて、新しい稈が古い稈の上部で出芽するタイプと地中もしくは地面近くで出芽するタイプがある(紺野, 1984)。前者は草食者に稈の上部を採食されると枯死してしまうのに対して、後者は新しい稈の展開が可能となるため存続可能である。大台ヶ原に生育するササのうち、前者タイプのスズタケはニホンジカの個体数増加によってほとんどの群落が消滅してしまっただけでなく、後者のタイプのミヤコザサの群落は維持されている。

調査地におけるニホンジカの密度($/\text{km}^2$)は24頭の平均値を中心にして、年度ごとにプラスマイナス4頭前後で変動した(図2a)。環境省が自然再生事業の一環として2003年から行っている糞粒法によるニホンジカの個体数調査の報告書(近畿地方環境事務所, 2019)では、捕獲による個体数調整によって大台ヶ原全域の密度($/\text{km}^2$)が50頭前後から10頭前後まで減少してきていることが示されている。同報告書ではまた、本研究が調査を行った場所のように下層がミヤコザサによって被われているところでは、そうでない場所よりもニホンジカの密度が高いことが示されている。本研究では、ミヤコザサ現存量が増えるとニホンジカ個体数が増え、その翌年にはミヤコザサ現存量が減少するという遅れをとともなう周期的変動の関係が得られた(図4b)。この関係は、ニホンジカとミヤコザサとの喰う喰われる関係において、双方の個体数と現存量が変動を繰り返しながら維持されていることを示している。喰う-喰われる関係では、遅れをとともなう個体数の周期的変動は理論的に予想されており、肉食者と植食者との間や寄生者と宿主との間においては実証例が多い(Wangersky, 1978)。しかしながら、植食者と植物との周期的な変動についての報告は少なく、8年間の追跡調査によって明らかにすることができた重要な成果だといえるだろう。

ネズミとオサムシの群集とミヤコザサとの関係

大台ヶ原に生息する3種のネズミのうち、スミスネズミでは柵外よりも柵内で個体数に有意に多く、アカネズミにおいても統計的には有意ではなかったものの、柵内で個体数が多い傾向を示したのに対して、ヒメネズミでは柵内外で個体数に有意な差はなかった。スミスネズミが柵内で個体数が多かったのは、本種がイネ科草本の根を主要な餌とするため(Ohdachi et al., 2009)であると考えられる。アカネズミとヒメネズミは、昆虫や種子を主要な餌とするために、ササに対する餌としての依存度は低い。しかしながら、アカネズミは地表で主に採食するために、下層植生が発達している場所で個体数が増えることが知られており(関島, 1999)、本研究で得られた結果も本種の生息場所の

選好性と関係づけることができる。ヒメネズミは、地上だけでなく樹上でも採食できるために、他の2種ほどに下層植生の量に影響を受けないのであろう。

オサムシの個体数と種数はいずれにおいても柵内よりも柵外で多く、また、個体数がミヤコザサ現存量が中程度のときに最大となる関係が示された。森林中の土壤水分は、ミヤコザサ現存量が少ないときには地表乾燥によって、多いときには蒸散作用によって減少し、中程度のササ現存量で最大になることが知られている(古澤ら, 2006)。その結果、オサムシの餌となる土壤中や地表に生息する無脊椎動物もまた、ミヤコザサ現存量が中程度のときに最大となることが知られていることから(上田ら, 2009)、オサムシの個体数はササ現存量が中程度で最大になると考えられる。また、オサムシ科のほとんどが飛翔できない地表徘徊性の種であることから、ササ現存量が一定量を超えると移動をとまなう活動が難しくなることも個体数減少の原因となり、その影響は体サイズが小さくなるほど大きくなると推測できる。そのため、採集されたオサムシの中で最も体サイズの大きなオオクロナガオサムシが柵内外で優占種であったのに対して、体サイズの小さな多くのゴムシの多くが柵内よりも柵外で個体数が多くなったと考えられる。

まとめ

本調査は学生実習と行われたため、データの信頼性は通常の学術的調査に比べると高くない。しかしながら、同じ調査地で継続的にデータを集めていくことで、通常の調査では難しい長期的なデータを得ることができた。その結果として、ニホンジカ個体数とミヤコザサ現存量との間の周期的な変動を明らかにすることができた。また、ネズミの種ごとの個体数やオサムシの種数と個体数のササ現存量との関係や年変化を調べることで、ニホンジカによる影響を明らかにすることができた。コロナ感染対策のために、宿泊をとまなう本実習が中止になり継続的なデータが中断することになったのは残念であるが、同じ調査地で継続的にデータを集めていくことで学術的にも価値のある結果を得ることができたと考えられる。

謝辞

この調査は、生物環境科学科1年生による生物環境科学実習の一環として2011年度から2019年度まで実施された。各年度の実習において調査を行った1年生全員とサポートを行った名城大学農学部環境動物学研究室の大学院生と4年生に感謝する。また、大台ヶ原ビジターセンターの皆様には、本実習を実施するにあたり多大なるご協力をいただいた。2名の査読者には原稿に対して有益なご指摘をいただいた。本実習で

実施したミヤコザサの刈り取り、ネズミとオサムシの捕獲採集については、環境省近畿地方環境事務所と吉野管理事務所の許可を得て行った。本実習は、名城大学の「教育の質の保証」および「学びのコミュニティ」のプロジェクトによる成果の一部である。

引用文献

- Ando, M., Yokota, H. and Shibata, E. (2004) Why do sika deer, *Cervus nippon*, debark trees in summer on Mt. Ohdaigahara, central Japan. *Mamm. Stud.* 29:73-83.
- 古澤仁美・日野輝明・金子真司・荒木誠 (2006) 大台ヶ原においてニホンジカとミヤコザサが表層土壌の温度・水分環境に及ぼす影響. *森林立地* 48: 91-98
- Goda, R., M. Ando, H. Sato, and E. Shibata. (2008) Application of fecal pellet group count to sika deer (*Cervus nippon*) population monitoring on Mt. Ohdaigahara, central Japan. *Mamm. Stud.* 33:93-97.
- Hino, T. (2000) Bird community and vegetation structure in a forest with a high density of sika deer. *Jpn J. Ornithol.* 48:197-204.
- 日野輝明・古澤仁美・伊東宏樹・上田明良・高畑義啓・伊藤雅道 (2003) 大台ヶ原における生物間相互作用にもとづく森林生態系管理. *保全生態学研究*, 8:145-158.
- Ito, H., Hino, T. and Takahashi, H. (2014) Optimal deer density for survival of tree seedlings. *J. Wildl. Manag.* 78:739-746.
- 環境省近畿地方環境事務所 (2019) 平成30年度大台ヶ原自然再生に係わる調査・検討業務報告書. 環境省近畿地方環境事務所, 大阪.
- 久野英二 (1986) 動物の個体群動態研究法 I- 個体数推定法 -. 共立出版, 東京
- 紺野康夫 (1984) 日本産ササ属植物の生活史. 河野昭一編 植物の生活史と進化. 培風館, 東京
- Ohdachi, S.D., Ishibashi, Y., Iwasa, M.A. and T. Saitoh (2009) *The Wild Mammals of Japan*. Shoukadoh, Tokyo.
- Rooney, T.P. and Waller, D.M. (2003) Direct and indirect effects of white-tailed deer in forest ecosystems. *For. Ecol. Manag.* 181:165-176.
- Russell, F.L., Zippin, D. B and Fowler, N.L. (2001) Effects of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) on plants, plant populations and communities: A review. *Amer. Midl. Natural.* 146:1-26
- 関島恒夫 (1999) ヒメネズミ *Apodemus argenteus* とアカネズミ *Apodemus speciosus* の微生物環境利用の季節変化. *哺乳類科学* 39:229-237.
- 柴田叡式・日野輝明 (2009) 大台ヶ原の自然史 - 森

- の中のシカをめぐる生物間相互作用－. 東海大学出版会, 東京.
- Takatsuki, S. (2009) Effects of sika deer on vegetation in Japan: A review. *Biol. Conserv.* 142:1922–1929.
- 上田明良・日野輝明・伊東宏樹 (2009) ニホンジカによるミヤコザサの採食とオサムシ科甲虫の群集構造との関係. *日林誌* 91:111-119.
- Wangersky, P.J. (1978) Lotka-Volterra population models. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 9:189-218.
- 横田岳人 (2009) 大台ヶ原の植生とその現状. (柴田 叡弍・日野輝明編) 大台ヶ原の自然史. p.2-14. 東海大学出版会, 東京.
- Yokoyama, S. and Shibata, E. (1998) The effects of sika-deer browsing on the biomass and morphology of a dwarf bamboo, *Sasa nipponica*, in Mt. Ohdaigahara, central Japan. *For. Ecol. Manag.* 103:49-56.

総 説

病害抑止土壌における微生物と生態系機能

藤 原 和 樹

要約 病害抑止土壌は、土壌伝染性の病害を抑止または低減できる土壌として知られている。これまでに、土壌微生物が病害抑止性の獲得に大きく寄与することが明らかとなっており、病害抑止性を保有する微生物生態系における微生物叢や機能性の解明に注目が集まっている。また、病害抑制土壌の農業現場での利用を目指した実践的な研究も展開されている。本稿では、病害抑制性と微生物の生態系機能との関連に着目しつつ、病害抑止土壌の研究動向と今後の展望について解説する。

キーワード：病害抑止土壌、微生物生態系、生態系機能、発病抑止性、土壌病害

Microbial and ecological functions in disease suppressive soils

Kazuki Fujiwara

Abstract Disease suppressive soil is capable of the suppression or reduction in the incidence of soil-borne diseases. It has been revealed that soil microorganisms contribute to disease suppressiveness, and attention has been focused on elucidating the microbial community structure and functional diversity underlying disease suppressiveness. In addition, practical research for the creation of agricultural disease control soil has received growing attentions. In this article, we describe the research trends and future perspectives of disease suppressive soils, focusing on the relationship between disease control and microbial ecosystem function.

Key words: suppressive soils, microbial community, ecological function, disease suppressiveness, soil-borne disease

病害抑止土壌とは

自然界には土壌病害が発生しない病害抑止土壌（または発病抑止土壌）が存在し、また農業における人為的な活動によっても抑止土壌は形成される。この抑止土壌の存在は古くから知られており、醸造用ブドウの生産が行われていた古代ローマ時代にまで遡る (Schlegel, 1973)。今日、病害抑止土壌は、“病原体が定着できない土壌”、“病原体は定着するが病害が発生しない土壌”、または、“病原体が定着し、しばらくの間は病害が甚発生するが、その後に病原体が土壌中に存続しているものの、病害の発生が激減する土壌”と定義されている (Baker and Cook, 1974)。病害抑止土壌に関する初めての報告は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* が引き起こすワタ立枯病に対する病害抑止土壌である (Atkinson, 1892)。それ以降、細菌や糸状菌、さらには原生生物に至る土壌伝染性の病原微生物に対する病害抑止土壌が数多く報告されてきた (表 1)。これまでに、病害抑止土壌の多くの事例において、土壌の物理性、化学性、生物性の3つの要素に関する研究が展開され (Weller et al., 2002; Gómez Expósito et al., 2017; Jayaraman et al., 2021)、

中でも、病害抑止土壌における微生物学的な研究アプローチが Henry 氏によって提唱されたことで (Henry, 1931a; 1931b)、薬剤や熱処理、土壌移植 (1–10% w/w)、拮抗微生物の分離などによって土壌の生物性が検証され、病害抑止性における微生物の重要性が明らかになっている (Weller et al., 2002; Philippot et al., 2013)。すなわち、病害抑止土壌において非生物学的もしくは生物的条件が病原体に有利な条件である場合には、土壌病害に対する抑止性は獲得されず、病害は容易に発生する。近年では、病害抑止土壌を対象に、ゲノム情報を基礎として、生体内分子を網羅的に解析するオミックス (omics) 研究が展開され、病害抑止土壌の微生物生態系を構成する微生物種の多様性や機能性の解明に加えて、微生物間での相互作用に介在する化合物が微生物生態系に及ぼす影響についても様々な情報が蓄積されてきたことで、病害抑止土壌における微生物性と生化学性との関連について理解が深まりつつある (Mendes et al., 2013; Gómez Expósito et al., 2017; Schlatter et al., 2017; Jayaraman et al., 2021)。

表1 病害抑止土壌の発見と略歴

Suppressive soil to pathogen	Characteristics of suppressiveness	References
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>tritici</i>	General or Specific	Raaijmakers and Weller, 1998; De Souza et al., 2003
<i>Fusarium oxysporum</i>	General or Specific	Scher and Baker, 1980; Alabouvette, 1986; Klein et al., 2013
<i>Fusarium solani</i>	specific	Burke, 1954; Kobayashi and Komada, 1995
<i>Rhizoctonia solani</i>	specific	Wijetunga and Baker, 1979; Chern and Ko, 1989; Postma et al., 2010; Mendes et al., 2011
<i>Verticillium dahliae</i>	specific	Keinath and Fravel, 1992
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	specific	Workneh and Van Bruggen, 1994
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	specific	Rodriguez et al., 2015
<i>Alternaria triticina</i>	specific	Siddiqui, 2007
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	general	Broadbent and Baker, 1974
<i>Pythium ultimum</i>	specific	Martin and Hancock, 1986
<i>Aphanomyces euteiches</i>	specific	Persson and Olsson, 2000
<i>Streptomyces scabies</i>	specific	Menzies, 1959; Weinhold et al., 1964; Meng et al., 2012; Rosenzweig et al., 2012
<i>Ralstonia solanacearum</i>	specific	Shiomi et al., 1999
<i>Agrobacterium radiobacter</i> var <i>tumefaciens</i>	specific	New and Kerr, 1972
<i>Plasmiodiophora brassicae</i>	specific	Hjort et al., 2007
<i>Meloidogyne incognita</i>	specific	Pyrowolakis et al., 2002; Giné et al., 2016
<i>Heterodera schachtii</i>	specific	Olatinwo et al., 2006
<i>Heterodera glycines</i>	specific	Song et al., 2016
<i>Cricodemella xenoplax</i>	specific	Kluepfel et al., 1993

病害抑止土壌の特徴

抑止土壌における病害抑止性は、general suppressiveness と specific suppressiveness に大別され、対応する和語は無いものの、強いて言うなれば、非特異的抑止性と特異的抑止性であろう。この2つの病害抑止性は、その抑止作用の獲得性と伝搬性に特徴的な違いがある。General suppressiveness は、抑止土壌を他の土壌に移植しても病害抑止作用が伝搬されないのに対して、specific suppressiveness は、抑止土壌の移植や分離された特定の微生物種を施用することにより病害抑止作用が伝搬される。このことから、general suppressiveness は微生物コミュニティの働きで (Mazzola, 2002; Weller et al., 2002), specific suppressiveness は特定の微生物群の存在によって獲得されていると考えられている (Raaijmakers and Mazzola, 2016; van der Voort et al., 2016)。

General suppressiveness は、土壌微生物の集団的な働きに起因し、病原体と微生物群集との間における養分などの競合より、病原体の生存性が抑制されると考えられている (Mazzola, 2002; Weller et al., 2002)。この general suppressiveness は、有機物を土壌に施用すること (organic amendment) で抑止作用が高められ、またその作用を維持できることが報告されている (Bonanomi et al., 2010; Klein et al., 2013;

Postma and Schilder, 2015; Tomihama et al., 2016)。さらに、有機物の施用により、栽培作物の有無に関わらず病害抑止性が獲得されることも知られている。General suppressiveness に関する代表的な事例は、*Phytophthora cinnamomi* により引き起こされるアボカド根腐病に対する病害抑止土壌である (Baker and Cook, 1974)。オーストラリアのクイーンズランド州で1940年初期に設立されたアボカド園では、近隣の園地がアボカド根腐病による甚大な被害が発生しているにもかかわらず、40年以上にもわたり大きな被害が発生しなかった。この園地では、土壌に有機物を混和しており、鶏糞やトウモロコシの茎残渣、その他の植物バイオマスを大量に施用することで、土壌中の炭素 (C) / 窒素 (N) 比が約 12% に維持されていた。このことから、土壌の微生物生態系において恒常的に有機物の分解性を活性化することと、土壌病害に対する抑止性の獲得との間に何らかの関連があることが指摘されている (Cook, 2014)。近年、*Streptomyces* 属細菌のような特定の土壌微生物種を微生物資材として有機物と併用することで、general suppressiveness の効果が向上されることも報告されており、栽培現場での実用可能性について注目を集めている (Klein et al., 2013; Tomihama et al., 2016)。しかしながら、general suppressiveness の抑止性メカニズムについては、特定の微生物種の抑止作用に由来しないことから、微生物生態系の構造的および機能的な特徴を総合的に理解する必要があり、未だ不明な点が多いのが現状である。

Specific suppressiveness は、土壌に由来する特定の微生物群の働きにより獲得される。さらに、抑止

名城大学農学部

〒468-8502 愛知県名古屋市長区塩釜口1-501

Faculty of Agriculture, Meijo University, Nagoya 468-8502, Japan

E-mail: fujikazu@meijo-u.ac.jp

2022年11月7日受付 2023年1月25日受理

土壌において特定の微生物群が安定的に維持されることで、長期間にわたり病害抑止性が持続することも知られている (Weller et al., 2002). この Specific suppressiveness の大きな特徴は、長期間にわたる単一作物の連作や発病圃場における連作によって病害抑止性が誘導されることである (Hornby, 1983, 1998; Weller et al., 2002). また、general suppressiveness とは対照的に、少量の抑止土壌を一般的な土壌に混合することによって病害抑止作用を他の土壌に伝搬することができる (Mendes et al., 2011; Raaijmakers and Mazzola, 2016; van der Voort et al., 2016). 例えば、麦類における立枯病 (take-all disease) に対する病害抑止土壌は、コムギやオオムギの連作に伴う立枯病の大発生に続いて病害抑止性が誘導されることで形成される (Weller et al., 2002). また、フランスのシャトーレナル地方にある病害抑止土壌では、複数の地域においてフザリウム病に対する病害抑止性が認められており、長期間にわたる単一作物の連作に加えて、病害に対して高い感受性を示す栽培品種の利用や罹病残渣の土壌への鋤き込みによりフザリウム病の発生を助長させることで、病害抑止性を誘導し、持続的な病害抑止性が獲得されている (Hornby, 1983, 1998; Weller et al., 2002). その他にも、農業生産上の重要な病原体に対して特異的な抑止作用を示す土壌が世界中で確認されている (図 1; Weller et al., 2002). Specific suppressiveness の抑止性については、*Rhizoctonia solani* AG2 が引き起こすテンサイ根腐病に対する病害抑止土壌を対象として、オランダの研究グループが中心となり、オミックス解析を用いた先導的な研究が展開されている. この病害抑止土壌では、根圏細菌叢に由来する *Paraburkholderia* 属, *Pseudomonas* 属, および *Streptomyces* 属細菌の病原菌に対する初期応答の重要性が明らかになっている (Mendes et al., 2011; Cordovez et al., 2015). また、抑止土壌で生育した宿主植物における内生細菌叢のうち、*Burkholderiaceae* 科, *Flavobacteriaceae* 科, および *Chitinophagaceae* 科に由来する細菌群が分泌する二次代謝産物が病害抑止性に寄与することも明らかになっている (Carrion et al., 2019). その他にも、specific suppressiveness における主要な抑止因子として抗生物質や揮発性化合物などの二次代謝産物の存在が数多く報告されている (Weller et al., 2002; Gómez Expósito et al., 2017; Garbeva and Weisskopf, 2020; van Agtmaal et al., 2018). その一方で、specific suppressiveness の持続性については、単一作物の連作を止めると、その抑止作用が消失もしくは著しく低減することが知られており (Weller et al., 2002), 宿主植物, 土壌微生物, および病原体間で特異的に獲得される病害抑止メカニズムの更なる理解に期待が持たれる.

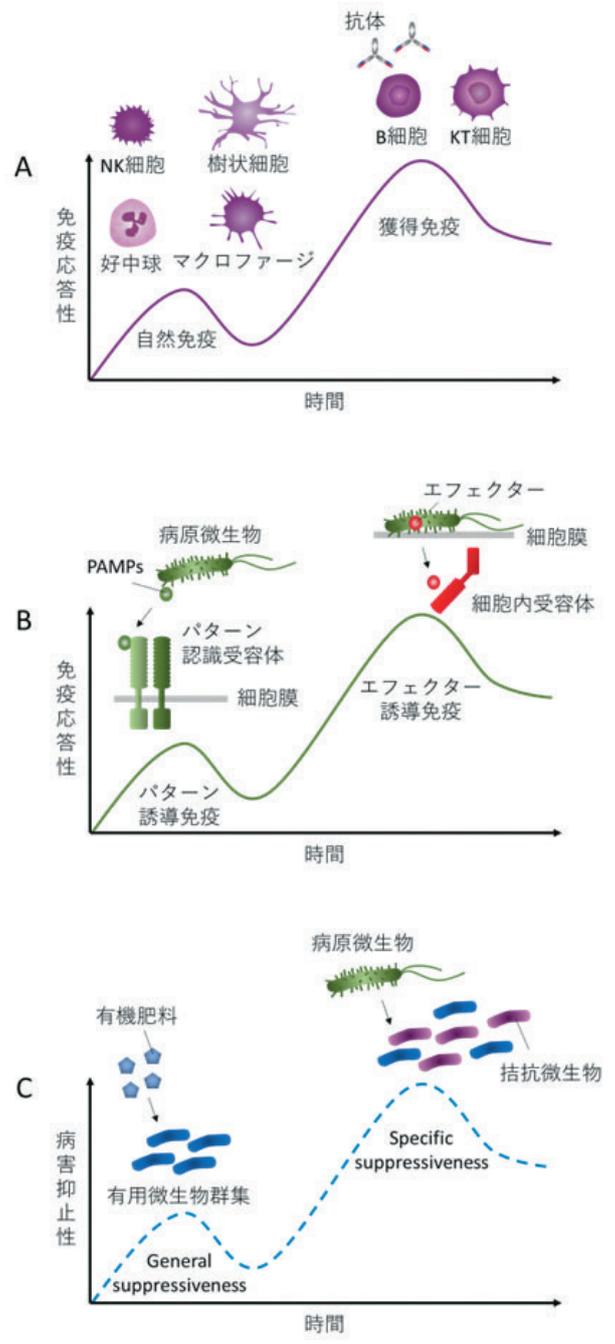


図1 免疫応答性と土壌病害抑止性との類似点
 A, 動物における免疫応答機構. B, 植物における免疫応答機構. C, 病害抑止土壌における病害抑止性. 病害抑止土壌では、動物と植物の免疫応答機構との類似性から、土壌における“免疫応答”という新たな概念が創出されている. 動物と植物の免疫応答と土壌における病害抑止性は、一次応答が打破されると、より強力な二次応答が獲得される共通点が認められる.

免疫応答性と土壤病害抑止性との類似点

土壤の病害抑止性は、general suppressiveness と specific suppressiveness に区別されることが多いが、自然界や農業現場では2つの病害抑止性は協調的に働いていると考えられている (Baker and Cook, 1974; Weller et al., 2002; Gómez Expósito et al., 2017). また、微生物生態系が獲得する土壤病害抑止性の性状について、general suppressiveness では、病原体に対して非特異的に抑止作用が示されるものの、specific suppressiveness では、特定の病原体に対して特異的な抑止性が獲得されることから、動物や植物の免疫応答との共通性が指摘されている (Raaijmakers and Mazzola, 2016).

動物では、体内に侵入した異物や病原体などの非自己分子に広く反応する自然免疫応答と、侵入してきた非自己分子を特異的に認識することで獲得される獲得 (適応) 免疫が存在する (図 1A; Paludan et al., 2021). 自然免疫は基礎的な免疫応答として備わっており、体内に侵入した異物に対して好中球やマクロファージ、樹状細胞などの食細胞やNK細胞 (Natural Killer cells: ナチュラルキラー細胞) が排他的な作用を担っている。獲得免疫では、自然免疫で記憶した異物情報に対して、KT細胞 (Killer T cells: キラーT細胞) やB細胞が細胞性免疫や液性免疫を獲得し、標的となる異物を排除する。このうち、液性免疫は獲得免疫の中心的な役割を担っており、B細胞から産生される抗体が標的を特異的に識別し排除する。病原体に対する免疫応答系において、自然免疫応答および獲得免疫応答は、病原体に由来するPAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) と呼ばれるパターン分子や、病原性に関与する毒素やタンパク質などのエフェクター (Effector) と呼ばれる分子を免疫細胞の細胞膜または細胞内に存在するパターン認識受容体 (PRRs: pattern recognition receptors) が認識することで誘導される (Ausubel, 2005; Stuart et al., 2013; Liston et al., 2017). 従って、病原体のPAMPsが免疫細胞のPRRsに結合し、細胞内でのシグナル伝達が活性化されることで、宿主における一連の免疫反応や炎症反応が生じる (Jones et al., 2016; Paludan et al., 2021; Roudaire et al., 2021). 植物における免疫応答は、病原体に由来するPAMPsに加え、一般的な微生物に由来するMAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern) に応答するパターン誘導免疫 (Pattern-triggered immunity: PTI) と、病原体が分泌するエフェクターと呼ばれる病原因子を特異的に認識し獲得されるエフェクター誘導免疫 (Effector-triggered immunity: ETI) が存在する (図 1B; Ausubel, 2005; Tena, 2021). このPTIとETIは、微生物や病原体に由来する分子を免疫センサーである受容体が認識することで獲得される。さらに、PTIとETIが局所的に

誘導されることにより、プライミング反応とよばれる二次刺激に対する応答性が活性化される (Jung et al., 2009). 従って、動物と植物には、一次的で非特異的な応答と、二次的で特定の病原体に対する特異的な応答に起因する2つの協調的な免疫応答機構が存在する。

病害抑止土壤における抑止性は、動物と植物における免疫応答との類似性から、土壤における“免疫応答”という新たな概念が創出され、体系的な理解に向けた取り組みが進んでいる (図 1C; Raaijmakers and Mazzola, 2016). これは、微生物生態系という複合的で多様な集団において、動物や植物で構築されている免疫応答と類似した仕組みにより、外部から侵入してくる微生物に対して排他的な性状が獲得されていることを示唆するものである。実際に、general suppressivenessにおいて、複数の異なる病原体に対する非特異的な抑止作用が報告されている (Baker and Cook, 1974; Weller et al., 2002; Mazzola et al., 2015). さらに、general suppressivenessが打破された圃場において、その後の病原体の人為的な接種により、新たにspecific suppressivenessが獲得されている (Baker and Cook, 1974). 従って、general suppressivenessとspecific suppressivenessは、微生物生態系における2つの独立した異なる抑止システムではなく、協調的かつ連動的に機能していると考えられる。病害抑止性と免疫機構との共通性において、動物の獲得免疫応答や植物のエフェクター誘導免疫が特定の病原体に対する「記憶」として免疫を獲得すると同様に、土壤微生物が単一作物の連作による発病を経て獲得した「記憶」としてspecific suppressivenessが構築される視点は興味深い。ここで、病害抑止性の獲得メカニズムにおいて大胆な仮説を立てると、微生物生態系という一つの集団において、病害抑止性に関与する微生物種は、動物の免疫応答における免疫細胞のような役割を担って可能性がある。例えば、動物の免疫細胞には病原体への直接的または特異的な作用や、免疫細胞から産生される抗体を介して他の免疫細胞へ標的を指示する作用がある。また、獲得免疫の誘導においては、自然免疫で得た情報を樹状細胞がリンパ節に伝達することで二次的な免疫が獲得される (Paludan et al., 2021; Roudaire et al., 2021). 同様に、specific suppressivenessにおいて重要性が示されている拮抗微生物や関連する微生物には、病原体に対する直接的な殺菌作用や標的に対して特異的な拮抗作用を指示する何等かの役割を担っているのかもしれない。さらに、微生物生態系の病害抑止性の獲得においても、病原体から得た情報を伝達する役割を担っている微生物が存在し、微生物間での相互作用を通じてspecific suppressivenessの獲得に関与しているのかもしれない。近年、病原因子や免疫応答の誘導因子とし

て知られている PAMPs や Effector が、微生物間での相互作用にも介在することが報告され、新たな機能的役割が示唆されている (Ipcho et al., 2016; Snelders et al., 2018, 2020). 今後、動物や植物の免疫応答機構における生化学的メカニズムのように、病害抑止土壌の微生物叢における抑止性の獲得メカニズムが明らかになることで、微生物生態系という「混沌」を制御可能になるきっかけが得られることを期待したい。

さいごに

本稿では、土壌病害抑止性における general suppressiveness と specific suppressiveness について代表的な事例を挙げつつ、病害抑止性に対する新たな見解についても触れることで、病害抑止土壌の研究動向について紹介した。病害抑止土壌は、微生物生態系の潜在的な機能性を理解するためのモデル生態系としてだけではなく、農業分野における環境保全型の生産体系の一つとして高い関心が寄せられている。これまでに、病害抑止土壌を対象として、古典的および先進的な手法を巧みに利用することで、微生物が保有する病害抑止作用の解明が加速している。近年では、病害抑止性を保有する微生物生態系を水中や土壌鉱物などの無機多孔質の担体において構築できる手法も開発され、病害抑止土壌の再現性に関する新たな研究も展開されている (Fujiwara et al., 2012; Fujiwara et al., 2013; Meeboon et al., 2022). かつて、Lourens Baas-Becking が微生物生態系について述べた一説 “Everything is everywhere, but the environment selects” で提示されたように、微生物生態系の形成は環境要因に大きく影響を受ける (de Wit and Bouvier, 2006). 病害抑止土壌においては、これまでに病害抑止性の動的な因子である主要な微生物群に関して多くの知見が蓄積されてきたが、微生物生態系の制御に関与するであろう生態系因子 (ecological factor) の存在については未だ不明である。もしも個々の微生物種が協調的に働く微生物生態系が形成されることで病害抑止性という生態系機能が獲得されるのであれば、この生態系において駆動し、病害抑止性の獲得に作用する因子は存在するのだろうか。今後の研究動向に注目したい。

引用文献

- Alabouvette, C. (1986) Fusarium-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. *Agronomie* **6**: 273-284.
- Atkinson, G. F. (1892) Some Diseases of Cotton, Vol. 41. Agricultural Experiment Station of the Agricultural and Mechanical College, 65.
- Ausubel, F. M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* **6**: 973-979.
- Baker, K., and Cook, R. J. (1974) Biological Control of Plant Pathogens. Freeman and Company, 433.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., and Scala, F. (2010) Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 136-144.
- Broadbent, P., and Baker, K. F. (1974) Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. *Crop Pasture Sci.* **25**: 121-137.
- Burke, D. (1954) “Pathogenicity of *Fusarium solani* f. *phaseoli* in different soils”, in *Phytopathology*, ed. K. V. Subbarao. American Phytopathological Society, 483-483.
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., de Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., Raaijmakers, J. M. (2019) Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science* **366**: 606-612.
- Chern, L., and Ko, W. (1989) Characteristics of inhibition of suppressive soil created by monoculture with radish in the presence of *Rhizoctonia solani*. *J. Phytopathol.* **126**: 237-245.
- Cordovez, V., Carrion, V. J., Et alo, D. W., Mumm, R., Zhu, H., van Wezel, G. P., and Raaijmakers, J. M. (2015) Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front. Microbiol.* **6**: 1081.
- Cook, R. J. (2014) Plant Health Management: Pathogen Suppressing Soils. In: Alfen V (ed) Neal K. Academic Press, Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 441-455.
- De Souza, J. T., Weller, D. M., and Raaijmakers, J. M. (2003) Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathol.* **93**: 54-63.
- de Wit, R. and Bouvier, T. (2006) ‘Everything is everywhere, but the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say?. *Environ. Microbiol.* **8**: 755 - 758.
- Fujiwara, K., Aoyama, C., Takano, M., Shinohara, M. (2012) Suppression of *Ralstonia solanacearum* bacterial wilt disease by an organic hydroponic

- system. *J. Gen. Plant Pathol.* **78**: 217–220
- Fujiwara, K., Iida, Y., Iwai, T., Aoyama, C., Inukai, R., Ando, A., Ogawa, J., Ohnishi, J., Terami, F., Takano, M., Shinohara, M. (2013) The rhizosphere microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Microbiologyopen* **2**: 997–1009.
- Garbeva, P., and Weissskop, L. (2020) Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. *New Phytologist* **226**: 32–43.
- Giné, A., Carrasquilla, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., and Sorribas, F. J. (2016) Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in plastic greenhouse. *Front. Plant Sci.* **7**: 164.
- Gómez Expósito, R., de Bruijn, I., Postma, J., and Raaijmakers, J. M. (2017) Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils. *Front. Microbiol.* **8**:2529.
- Henry, A. (1931a) Occurrence and sporulation of *Helminthosporium sativum* PKB in the soil. *Can. J. Res.* **5**: 407–413.
- Henry, A. (1931b) The natural microflora of the soil in relation to the foot-rot problem of wheat. *Can. J. Res.* **4**: 69–77.
- Hjort, K., Lembke, A., Speksnijder, A., Smalla, K., and Jansson, J. K. (2007) Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. *Microb. Ecol.* **53**: 399–413.
- Hornby, D. (1983) Suppressives soils. *Annu. Rev. Phytopathol.* **21**: 65–85.
- Hornby, D. (1998) Take-all of Cereals: A Regional Perspective. CAB International, Wallingford, U.K.
- Ipcho, S., Sundelin, T., Erbs, G., Kistler, H. C., Newman, M. A., Olsson, S. (2016) Fungal Innate Immunity Induced by Bacterial Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *G3 (Bethesda)* **6**: 1585–95.
- Jayaraman, S., Naorem, A. K., Lal, R., Dalal, R. C., Sinha, N. K., Patra, A. K., Chaudhari, S. K. (2021) Disease-Suppressive Soils—Beyond Food Production: a Critical Review. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **21**: 1437–1465.
- Jones, J. D., Vance, R. E., and Dangl, J. L. (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* **35**: aaf6395.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J. T. (2009) Priming in Systemic Plant Immunity. *Science*. **324**: 89–91.
- Keinath, A. P., and Fravel, D. R. (1992) Induction of soil suppressiveness to verticillium wilt of potato by successive croppings. *Am. Potato J.* **69**: 503–513.
- Klein, E., Ofek, M., Katan, J., Minz, D., and Gamliel, A. (2013) Soil suppressiveness to fusarium disease: shifts in root microbiome associated with reduction of pathogen root colonization. *Phytopathol.* **103**: 23–33.
- Kluepfel, D., McInnis, T. M., and Zehr, E. I. (1993) Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Criconemella xenoplax*. *Phytopathol.* **83**: 1240–1240.
- Kobayashi, N., and Komada, H. (1995) Screening of suppressive soils to Fusarium wilt from Kanto, Tozan and Tokai areas in Japan, and analysis of their suppressiveness. *Soil Microorg.* **45**: 21–32.
- Liston, A. and Masters, S. L. (2017) Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**: 208–214.
- Martin, F., and Hancock, J. (1986) Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathol.* **76**: 1221–1231.
- Mazzola, M. (2002) Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 557–564.
- Mazzola, M., Hewavitharana, S. S., and Strauss, S. L. (2015) Brassica seed meal soil amendments transform the rhizosphere microbiome and improve apple production through resistance to pathogen reinfestation. *Phytopathol.* **105**: 460–469.
- Meeboon, J., Ando, A., Ogawa, J., Miyamoto, K., Kato, Y., and Shinohara, M. (2022) Generation of *Fusarium oxysporum*-suppressive soil with non-soil carriers using a multiple-parallel-mineralization technique. *Sci. Rep.* **12**: 7968.
- Mendes, R., Garbeva, P., and Raaijmakers, J. M. (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 634–663.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., and Schneider, J. H. M. (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* **332**: 1097–1100.
- Meng, Q., Yin, J. F., Rosenzweig, N., Douches, D., and Hao, J. J. (2012) Culture-based assessment of microbial communities in soil suppressive to potato common scab. *Plant Dis.* **96**: 712–717.
- Menzies, J. (1959) Occurrence and transfer of a biological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathol.* **49**: 648–652.
- New, P., and Kerr, A. (1972) Biological control of

- crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *J. Appl. Microbiol.* **35**: 279–287.
- Olatinwo, R., Yin, B., Becker, J. O., and Borneman, J. (2006) Suppression of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii* by the fungus *Dactylella oviparasitica*. *Phytopathol.* **96**: 111–114.
- Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L. (2021) Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **21**: 137–150.
- Persson, L., and Olsson, S. (2000) Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1141–1150.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., and van der Putten, W. H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 789–799.
- Postma, J., Scheper, R. W. A., and Schilder, M. T. (2010) Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 804–812.
- Postma, J., and Schilder, M. T. (2015) Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in sugar beet by organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* **94**: 72–79.
- Pyrowolakis, A., Westphal, A., Sikora, R. A., and Becker, J. O. (2002) Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Appl. Soil Ecol.* **19**: 51–56.
- Raaijmakers, J. M., and Mazzola, M. (2016) Soil immune responses. *Science* **352**: 1392–1393.
- Raaijmakers, J. M., and D. M. Weller (1998) Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 144–152.
- Rodríguez, M. A., Rothen, C., Lo, T. E., Cabrera, G. M., and Godeas, A. M. (2015) Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAF1646. *Biocontrol Sci. Technol.* **25**: 1388–1409.
- Rosenzweig, N., Tiedje, J. M., Quensen, J. F., Meng, Q., and Hao, J. J. (2012) Microbial communities associated with potato common scab-suppressive soil determined by pyrosequencing analyses. *Plant Dis.* **96**: 718–725.
- Roudaire, T., Héloir, M-C, Wendehenne, D., Zadoroznyj, A., Dubrez, L., and Poinssot, B. (2021) Cross Kingdom Immunity: The Role of Immune Receptors and Downstream Signaling in Animal and Plant Cell Death. *Front. Immunol.* **11**: 612452.
- Scher, F. M., and Baker, R. (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**: 1567–1573.
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., and Paulitz, T. (2017) Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. *Phytopathol.* **107**: 1284–1297.
- Schlegel, W. (1973) *Der Weinbau in der Schweiz*. Wiesbaden: Steiner, 24–92.
- Shiomi, Y., Nishiyama, M., Onizuka, T., and Marumoto, T. (1999) Comparison of bacterial community structures in the rhizosphere of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3996–4001.
- Siddiqui, Z. (2007) Biocontrol of *Alternaria triticina* by plant growth promoting rhizobacteria on wheat. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **40**: 301–308.
- Snelders, N. C., Kettles, G. J., Rudd, J. J., and Thomma, B. P. H. J. (2018) Plant pathogen effector proteins as manipulators of host microbiomes?. *Mol. Plant Pathol.* **19**: 257–259.
- Snelders, N. C., Rovenich, H., Petti, G. C., Rocafort, M., van den Berg, G. C. M., Vorholt, J. A., Mesters, J. R., Seidl, M. F., Nijland, R., Thomma, B. P. H. J. (2020) Microbiome manipulation by a soil-borne fungal plant pathogen using effector proteins. *Nat. Plants.* **6**: 1365–1374.
- Song, J., Li, S., Xu, Y., Wei, W., Yao, Q., and Panet, F. (2016) Diversity of parasitic fungi from soybean cyst nematode associated with long-term continuous cropping of soybean in black soil. *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci.* **66**: 432–442.
- Stuart, L. M., Paquette, N., Boyer, L. (2013) Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 199–206.
- Tomihama, T., Nishi, Y., Mori, K., Shirao, T., Iida, T., Uzuhashi, S., Ohkuma, M., and Ikeda, S. (2016) Rice bran amendment suppresses potato common scab by increasing antagonistic bacterial community levels in the rhizosphere. *Phytopathol.* **106**: 719–728.
- van Agtmaal, M., Straathof, A. L., Termorshuizen, A., Lievens, B., Hoffland, E., de Boer, W. (2018) Volatile-mediated suppression of plant pathogens is related to soil properties and microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* **117**: 164–174.
- van der Voort, M., Kempenaar, M., van Driel, M.,

- Raaijmakers, J. M., and Mendes, R. (2016) Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecol. Lett.* **19**: 375–382.
- Weinhold, A. R., Oswald, J. W., Bowman, T., Bishop, J., and Wright, D. (1964) Influence of green manures and crop rotation on common scab of potato. *Am. Potato J.* **41**: 265–273.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B., Thomashow, L. S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 309–348.
- Wijetunga, C., and Baker, R. (1979) Modeling of phenomena associated with soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* **69**: 1287–1293.
- Workneh, F., and Van Bruggen, A. (1994) Microbial density, composition, and diversity in organically and conventionally managed rhizosphere soil in relation to suppression of corky root of tomatoes. *Appl. Soil Ecol.* **1**: 219–230.

資 料

大規模 DNA 配列解析の実践的ノウハウ

兒 島 孝 明

要約 ビッグデータの解析技術の浸透に伴い、膨大な生物学的情報から有用な知見を得るアプローチの重要性が生物分野においても日々高まっている。ゲノム情報をはじめとする大規模 DNA 配列データの解析には、バイオインフォマティクスに関連する多様な基礎知識が必要となる。そこで本資料では、大規模データ解析を志す研究者の背中を後押しするため、関連する解析手法の紹介や具体的な解析例を交えつつ大規模 DNA 配列解析の概要について述べる。

キーワード：次世代 DNA シーケンシング, バイオインフォマティクス, BLAST, Python

Practical know-how for large-scale DNA sequence analysis

Takaaki KOJIMA

Abstract The importance of approaches to obtain useful knowledge from vast amounts of biological information is increasing day by day in the biological field with the spread of big data analysis technologies. The analysis of large-scale DNA sequence data, including genomic information, requires diverse basic knowledge related to bioinformatics. Therefore, in order to encourage researchers who are interested in large-scale data analysis, this manuscript provides an overview of large-scale DNA sequence analysis, including an introduction to related analysis methods and specific examples of analysis.

Key words: Next Generation Sequencing, Bioinformatics, BLAST, Python

緒言

次世代 DNA シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) が 2000 年代に開発されて以来、DNA 配列の大規模解析が爆発的に進められるようになった。2005 年当時、博士課程の学生だった著者は、思い通りにいかない実験結果と向き合い続ける悶々とした研究生活を送っていた。その状況にさらに追い打ちをかける出来事があった。後に Roche 454 と呼ばれ、NGS の嚆矢的プラットフォームとなる全く新しい DNA 配列の並列解析技術に関する論文を目にした時、著者は大変な衝撃を受けた。この手法は、微小なエマルジョン液滴中でビーズ上に一分子由来の DNA を増幅固定化する方法 (エマルジョン PCR) を要素技術としていた (Margulies et al., 2005)。この “*in vitro* でビーズ上に DNA をクローニングする” というコンセプトが、著者らが当時確立を試みていた技術とほぼ同じだったのだ (Kojima et al., 2005)。大変幸いなことに、著者らのエマルジョン PCR の目的が異なっていたため、実施していた研究がお蔵入りになるという最悪の事態は免れたものの、当時執筆中だった論文に上

記の報告を参照論文として慌てて加えるなどの対応を行なったことを今でもよく憶えている。

その後、20 年近く経過し、様々なシーケンシング原理に基づく解析プラットフォームが考案され、NGS 自体も世代交代を経た。分子生物学分野では、NGS によって取得した大規模 DNA 配列データの解析はもはや当たり前ものとなりつつある。これは、分子生物学分野においてもビッグデータ時代に柔軟に対応していくことの重要性を意味する。この潮流に伴い、大規模配列データのハンドリングに日々頭を悩ます研究者の数は増加傾向にある。実際、大規模配列データ解析には、解析環境の構築、適切な解析方法の選択・実施、得られた結果の要約・可視化、など各ステップにおいてバイオインフォマティクスに関連する多様な基礎知識が必要となる。本稿では、著者自身の経験と具体的な例を交えつつ大規模 DNA 配列解析を概観的に述べる。本稿がバイオインフォマティクスへの心の敷居を少しでも下げる一助になれば幸いである。

なお、“次世代”シーケンシング (NGS) という用語は世代交代を経た現行のシーケンシングプラットフォームを指すにはもはや適していないかもしれな

い。しかしながら、この言葉が人口に膾炙していることを考慮し、本稿ではNGSで統一させて頂くことを予めご理解いただきたい。

1) はじめに - NGS による配列データの出力量 -

Roche 454 の他、これまでに様々な NGS プラットフォームが開発されている。現行の主なプラットフォームにおける配列データの出力量等の比較を表 1 に示した (上述の Roche 454 プラットフォームは終売済み)。ジデオキシヌクレオチド法 (サンガー法) を用いた場合、使用機種や解析条件によって多少のばらつきはあるものの、1 サンプルあたり 800 b 程度のデータの取得が一般的である。96 サンプルを同時解析し、解析にかかる 1 ランあたりの時間を 2 時間とすると、1 ランあたり 80 Kb、1 日あたりに換算しておおよそ 1 Mb 程度のデータを取得できることになる。一方、NGS のプラットフォームの一種であり、illumina 社が提供する最新のプラットフォーム NovaSeq X Plus は、1 ランにおおよそ 2 日を要するものの、最大 16 Tb のデータを出力する。しかしながら、1 ランあたりのデータ量が 80 Kb と 16 Tb では桁が違い過ぎて出力量の違いを実感し辛い。そこで、ここでは簡単な例えを用いたい。もし、仮にサンガー法を用いて、解析装置を 24 時間 365 日稼働し続け、1 Mb/day のペースを維持したままデータを取得し続けた場合 (もちろん現実

には不可能である)、いつから始めれば 16 Tb のデータに辿りつけるだろうか。実際に計算してみると、なんと 40,000 年、時代区分ならば旧石器時代から配列解析をスタートし、現代までデータを休みなしに取り続けるる必要があることがわかる ($16 \times 10^{12} / 1 \times 10^6 / 365 \div 40,000$)。この数値は、昨今の NGS によるデータの出力量の大きさを端的に示している。

2) NGS を用いた大規模 DNA 配列解析の概略

この項目では、大規模配列データの最も一般的な解析手順として、配列データの取得からマッピングまでの概要を NGS に関連する基礎知識を交えつつ紹介する。マッピング以降の手順はその実験目的に応じて多岐に渡るため、これらについて本稿では触れないという点を予めご容赦いただきたい。

2-1) 大規模配列解析のデータ取得方法

DNA 配列を大規模に解析するためには、まずその配列情報の取得が必要である。その場合、研究目的に応じて、1) NGS 解析によって目的の DNA 配列データを新たに取得する、2) 公共の DNA 配列データベースにある既存のデータを用いる、の二種類のアプローチがある。

1) の場合、受託解析サービスを提供する企業や所属機関の共通機器の担当者に依頼するケースが多い一

表 1. 主な DNA シーケンシングプラットフォームの比較

主な DNA シーケンシングプラットフォーム(メーカー)*	1 ランあたり最大出力量 (解析時間)	備考	/サンガー法 (年)**
NovaSeq X Plus (illumina)	16 Tb (48 hrs)	・ショートリード ・高いシーケンシング精度	~40,000
MiSeq (illumina)	15 Gb (56 hrs)	・ペアエンド法を適用可能	~40
Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific)	25 Gb (8.5 hrs)	・ショートリード ・迅速な結果の取得	~70
Revio (PacBio)	360 Gb (24 hrs)	・ロングリード ・高いシーケンシング精度	~1,000
MinION*** (Oxford Nanopore Technologies)	50 Gb (72 hrs)	・ロングリード ・コンパクトな解析デバイス	~140
サンガー法	~80 Kb (2 hrs) (96 キャピラリー)	・1 サンプルあたりのリード長: ~800 b	-

*2022 年 11 月の時点の各メーカーの公表情報をもとに一例として記載。この時点での販売予定のプラットフォームを含むこと、また、解析条件によってデータの出力量等が異なる場合があることを予めご容赦いただきたい。

**2 時間/ランとして換算した。

***上位機種の PromethION は 72 時間あたり最大 14 Tb のデータを出力する。

能を含むため、著者は日頃からこのソフトウェアをかなり重宝している。Trimmomatic は、任意のアダプター配列の削除が可能であるほか、ショートリードのペアエンド解析に対応した QC (トリミングした際にペアエンドのリードが両方残ったものと残らなかったものとを分けて出力) を行える。このため著者は、ペアエンドリードの配列データのトリミングを行う場合は必ずこの Trimmomatic を用いている。

2-4) リードデータのマッピング

NGS のデータ解析におけるマッピングとは、取得したリードデータが参照 (既知の) ゲノム上のどの部位に対応するかを網羅的に特定する作業である。既存のゲノム配列と標的ゲノム配列を比較するリシークエンス解析や発現変動遺伝子を網羅的に同定する RNA-Seq などでは必ずこのマッピング作業を経由する (図 2)。これまでにマッピングを目的とした様々なプログラムが開発されており、用いた実験材料や目的に応じて適切に使い分ける必要がある。現行の代表的なマッピングプログラムの詳細に関しては、著者らの総説を参照されたい (Uesaka et al., 2022)。

通常、マッピング結果は SAM (Sequence Alignment/Map) と呼ばれる形式で出力される。この SAM ファイルのバイナリ版が BAM (Binary Alignment/Map) ファイルである。これらの形式には、どのリードデータが参照ゲノム上のどこに、そしてどのようにマッピングされたかという情報が格納される。SAM ファイルと BAM ファイルの相互変換は、SAMtools を用いて実行できる (Li et al., 2009)。BAM ファイルはバイ

ナリ形式で記述されているため、テキストエディタなどを用いて中身を見てもその内容を理解することはできない。その一方で、対応する SAM ファイルよりもデータサイズがコンパクトな BAM ファイルを用いることで、より効率的な解析処理が可能となる。このため、後述のゲノムブラウザを用いたマッピングされたリードの可視化など、マッピング以降の解析では主に BAM ファイルを用いるのが一般的である。

2-5) マッピングされたリードの可視化

ゲノムブラウザとは通常、ゲノム上の標的領域を表示するツール全般を指す。NGS で取得したリードのマッピング状況を“ブラウジング”する場合、NGS 解析専用のゲノムブラウザ、IGV (Integrative Genomics Viewer) が汎用される (Thorvaldsdóttir et al., 2013)。この IGV はマウスで操作できる GUI ツールであり、直感的な操作でマッピングされたリードを可視的に確認できる (図 3)。その機能は多岐にわたり、提供元のサイト <<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>> に詳細な使用方法が掲載されているため、具体的な使用例の紹介は割愛する。ここで強調すべきことは、マッピングを経由する NGS データ解析の場合、ゲノムブラウザを用いて必ず可視化し、たとえ部分的であっても自分自身の目でマッピング状況を確認するという点である。FASTQ ファイルは勿論のこと、SAM ファイルですらその内容を眺めただけでは、得られたリードデータが自身の目的に合致したものになっているのか、適切に把握することは極めて困難である。このため、マッピング結果を俯瞰し、

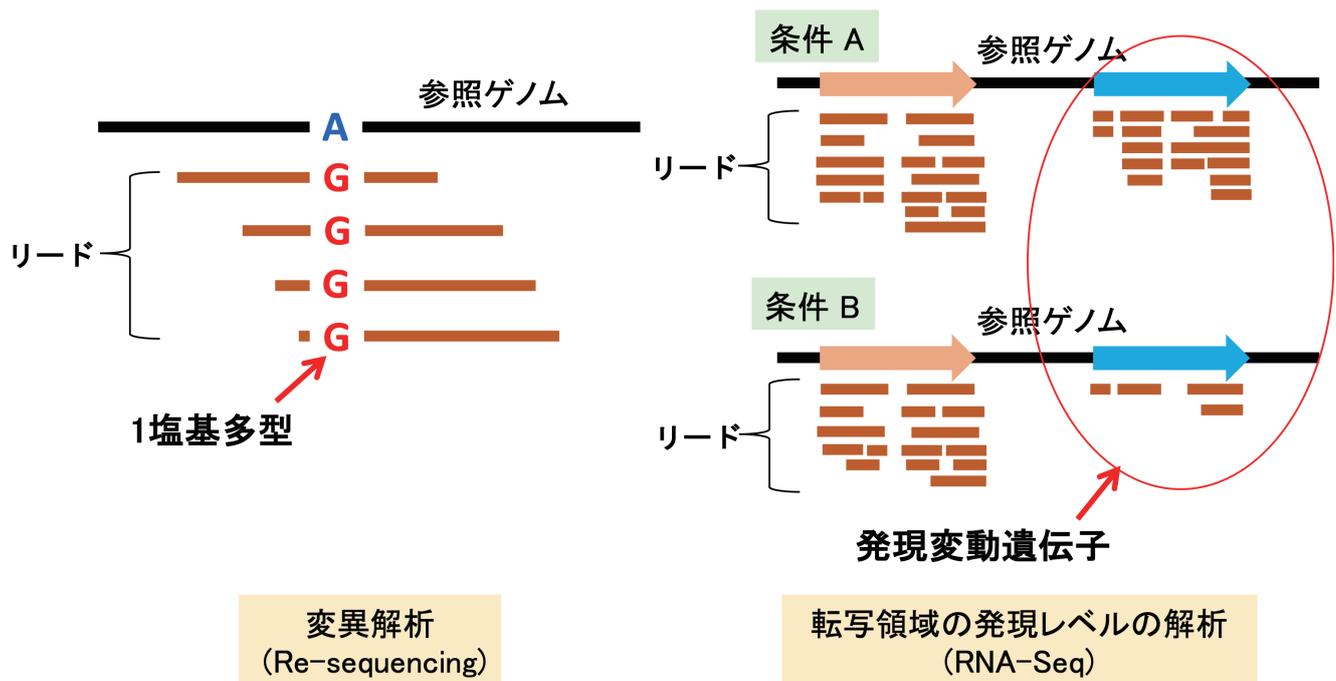


図 2. マッピングの概念図

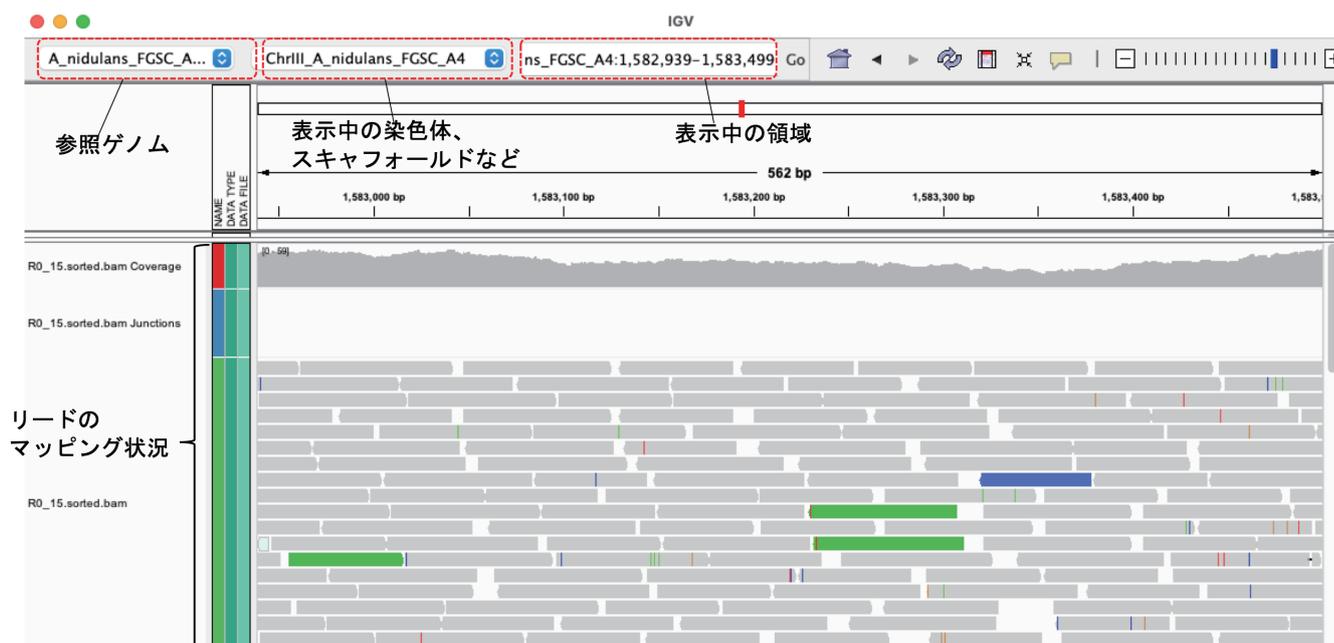


図 3. IGV を用いたリードデータの可視化の例

リード数は十分であったか、マッピングされた部位や染色体に偏りはなかったか、などの点を予め確認した上で、実験目的に応じた以降の解析に進むことが重要である。

3) BLAST+ を用いた相同配列の網羅的検索

NGS の用途は多様である。全ゲノム配列の構築や、発現変動解析に限らず、NGS は様々な目的で活用されている。例えば、著者らは標的転写因子の結合部位を網羅的に同定するために NGS を活用してきた (Kojima et al., 2016; Oka et al., 2019)。この場合、転写因子の結合部位近傍の大量の配列情報が取得される。では、この結合部位がどの遺伝子上流領域に該当するのか、効率的に対応付けするにはどうすればよいのだろうか。その手段の一つとして、ここでは標的配列のデータベースをカスタマイズできる同源性検索プログラム、BLAST+ を用いる例を紹介する。

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) は、予め構築された配列データベース中から問い合わせ (クエリ) 配列と相同性が高い候補領域を高速に検索するプログラムとして、NCBI 提供のサイトをはじめ、様々なウェブデータベースで広く用いられている (Altschul et al., 1990)。これらのウェブデータベースを活用することで、NGS によって取得した配列情報をクエリ配列としてその相同配列を同定することは可能である。しかしながら、用いるクエリ配列と相同性を示す配列がそのウェブデータベース中に必ずしも存在するとは限らない。また、大量の配列データの場合、ネットワーク環境などの問題によりスムーズに結果を

取得できないケースも多い。このような問題点を一挙に解決できるのが BLAST+ である。このプログラムを用いることで、目的に合ったデータベースを自身の PC 内で構築し、BLAST をローカルで実行することができる。この BLAST+ は NCBI のサイト <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download> よりインストールできる。

BLAST+ の手順は主にデータベース構築と BLAST 検索の 2 ステップで構成され、操作はコマンドを入力する CUI 形式で行われる。ここでは、blastn を実施した例を示した (図 4)。まずはじめに、仮想のデータセットとして 15,000 種類の 1,000 b のランダム配列で構成されるデータベース配列 (Database_seq.fasta, プロモーター配列のデータセットを想定) と 100 種類の 50 b の配列で構成されるクエリ配列 (Query_seq.fasta, NGS で取得した標的領域のデータセットを想定) をそれぞれ後述の Python を用いて作成した。なお、このクエリ配列は、BLAST の実行結果をより明瞭にするため、Database_seq.fasta より配列とその領域をランダムに選択した上で、一定頻度でミスマッチを導入した配列データで構成されている。次に、

```
makeblastdb -in Database_seq.fasta -dbtype nucl
```

と入力・実行することで Database_seq.fasta を用いたデータベースを構築した。“makeblastdb” はデータベース作成のためのコマンドであり、“-in Database_seq.fasta” によってデータベース配列、“-dbtype nucl” によってデータベースが塩基配列で構成されることをそれぞれ指定している。次に、

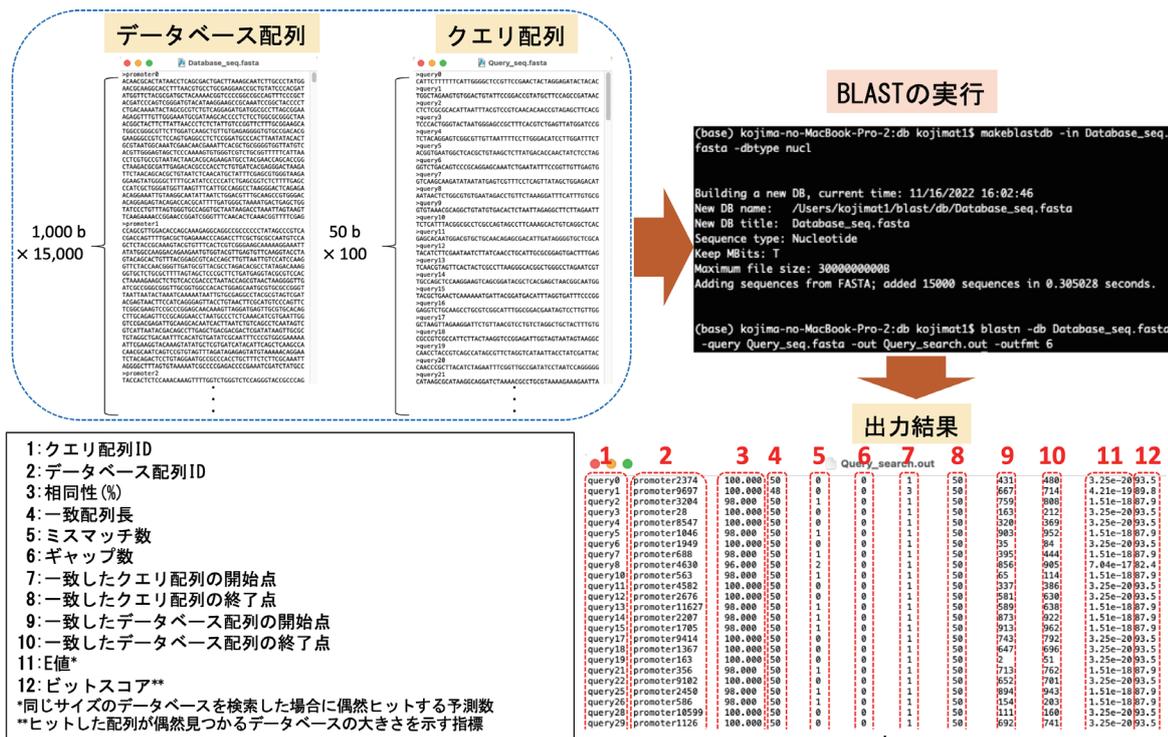


図 4. ローカル環境における BLAST による相同配列の網羅的検索の例

`blastn -db Database_seq.fasta -query Query_seq.fasta -out Query_search.out -outfmt 6`

と入力・実行することで blastn の結果を出力した。ここでは、クエリ配列、データベース配列がともに塩基配列のため、blastn を用いている。なお、クエリ配列 / データベース配列が、アミノ酸配列 / アミノ酸配列の場合は blastp、塩基配列 (翻訳) / アミノ酸配列の場合は blastx、アミノ酸配列 / 塩基配列 (翻訳) の場合は tblastn、塩基配列 (翻訳) / 塩基配列 (翻訳) の場合は tblastx をそれぞれ用いる。“-db Database_seq.fasta” と “-query Query_seq.fasta” によってデータベース配列とクエリ配列をそれぞれ指定し、“-out Query_search.out” と “-outfmt 6” を加えることで、解析結果が表形式で Query_search.out というファイル名で出力される。この出力ファイルに、クエリ配列 ID、データベース配列 ID、同一性などの情報がタブ区切りで記載される (図 4)。

BLAST+ を用いることにより、複数の配列 × 複数の配列の同一性の比較を迅速かつ簡便に実施できる。NGS によって取得した大量のクエリ配列を網羅的に解析したい場合などにこの BLAST+ の活用をぜひお勧めしたい。

4) 大規模配列データ解析における Python の活用

DNA やタンパク質の大規模配列データを扱う際、自身の目的と全く合致するソフトウェアを手軽に使用できるとは限らない。その場合、用途に応じたプログラムを作成する必要が生じる。しかしながら、全くの

ゼロベースからプログラムを作成することは高度な専門知識を要する。そのため、より使い勝手が良いプログラミング言語を用いることが望ましい。この観点から、近年のバイオインフォマティクス解析で広く用いられているのが Python である。他のプログラミング言語に比べて文法がシンプルであり、初心者にも比較的ハードルが低い。また、様々な用途に応じたライブラリが充実している点も大きな利点である。とりわけ、生物学的データの解析に特化したライブラリ、Biopython<<https://biopython.org>> はバイオインフォマティクス御用達のツールの一つである。

この Python を用いた解析でさらに特筆すべき点は、Web ブラウザを介したクラウド上での実行環境である Google Colaboratory (Google Colab) <<https://colab.research.google.com>> を利用できる点である。これは、ネットワーク環境さえあれば、目的の解析環境をスムーズに構築でき、バイオインフォマティクス解析者にとって往々にして大きなストレスとなる、煩雑な解析環境の構築に要する作業量を大幅に低減できることを意味する。また、異なる PC 間で全く同一の実行環境を共有できることも大きな魅力である。例えば、解析プログラムを記載した Google Colab 上での実行ファイル (ipynb ファイル) を Google Drive 経由で共有するだけで、同じ研究室内に限らず作業内容やその実行結果の共有が容易にできる。

上述の BLAST+ の項目では、Python を活用して生成した任意の大規模配列データセットを用いた例を述

べたが、図5では、ランダムな配列から構成されるプライマー設計のためのPythonコードを例として示した。このコードは、どんな配列でもよいプライマーを設計する際、「何でもよい配列」のためにかえってその設計が難しくなってしまったという経緯から著者が作成したものである。コード内容の概要を以下に示す。

1) DNAを構成する4塩基から1塩基を無作為に選択し、連結する操作を19回繰り返した後、最後の塩基は水素結合を3本保持するCもしくはGを無作為に選び、20塩基から構成されるオリゴDNA配列をデザインする。2) このオリゴDNA配列作成の操作を2回実施したのち、生成したオリゴDNAそれぞれのGC含量、TM値を算出する。3) オリゴDNAの名前、配列、GC含量、TMを記載した内容をエクセルファイルとして出力する。このコードを記載したipynbファイルを研究室内で共有することで構成員が自身でランダムプライマーを簡便にデザインできるようになった。

このように、Google Colabを活用することで、大

規模配列データ解析に限らず、研究室のちょっとしたルーチンワークも手軽に効率化できる。興味ある方にはぜひとも導入をお勧めしたい。

おわりに

初めてfastqファイルを受け取った際、中身を確認するためにファイルを開くだけで10分以上かかり、その後何をどう操作して良いか全くわからず、途方に暮れてしまった研究者がいた。何を隠そう、2014年頃の著者である。このような情けない状況の打開には、解析用PCの準備と関連情報の収集のみならず、専門家の適切なアドバイスが必要不可欠だった。その過程で、多様なバイオフィォマティクスの解析技術に関する情報共有やサポート体制の重要性を痛感した。この経験から、著者らは2017年に有志とともにバイオフィォマティクス相談部会を立ち上げ、現在もその活動を継続している。この部会の活動の一環として、

```
[1] !pip install biopython

Looking in indexes: https://pypi.org/simple, https://us-python.pkg.dev/colab-wheels/public/simple/
Requirement already satisfied: biopython in /usr/local/lib/python3.7/dist-packages (1.79)
Requirement already satisfied: numpy in /usr/local/lib/python3.7/dist-packages (from biopython) (1.21.6)

[2] import random
from Bio.Seq import Seq
from Bio.SeqUtils import GC
from Bio.SeqUtils import MeltingTemp as mt
import openpyxl

N = 19 #For 20 b oligos. Adjust the length as appropriate.
Oligo_1 = ""
Oligo_2 = ""
for i in range(N):
    base_1 = random.choice(["A", "T", "G", "C"]) # Oligo1
    Oligo_1 = Oligo_1 + base_1
    base_2 = random.choice(["A", "T", "G", "C"]) # Oligo2
    Oligo_2 = Oligo_2 + base_2
Term_1 = random.choice(["G", "C"]) #The 3' end is G or C.
Oligo_1 = Oligo_1 + Term_1
Term_2 = random.choice(["G", "C"]) #The 3' end is G or C.
Oligo_2 = Oligo_2 + Term_2
print(Oligo_1)
print(Oligo_2)
# GC content
Oligo_1_Seq = Seq(Oligo_1)
GC_1 = (GC(Oligo_1_Seq))
print(GC_1)
Oligo_2_Seq = Seq(Oligo_2)
GC_2 = (GC(Oligo_2_Seq))
print(GC_2)
# TM calculation(NN method)
Oligo_1_TM = round(mt.Tm_NN(Oligo_1_Seq), 1)
print(Oligo_1_TM)
Oligo_2_TM = round(mt.Tm_NN(Oligo_2_Seq), 1)
print(Oligo_2_TM)
#Output as an Excel file
Designed_oligos = openpyxl.Workbook()
Designed_oligos.active = Designed_oligos.active
Designed_oligos.active.cell(column = 1, row = 1, value = "Oligo_name")
Designed_oligos.active.cell(column = 2, row = 1, value = "Sequence")
Designed_oligos.active.cell(column = 3, row = 1, value = "GC_content")
Designed_oligos.active.cell(column = 4, row = 1, value = "TM")
Designed_oligos.active.cell(column = 1, row = 2, value = "Oligo_1")
Designed_oligos.active.cell(column = 2, row = 2, value = str(Oligo_1))
Designed_oligos.active.cell(column = 3, row = 2, value = str(GC_1))
Designed_oligos.active.cell(column = 4, row = 2, value = str(Oligo_1_TM))
Designed_oligos.active.cell(column = 1, row = 3, value = "Oligo_2")
Designed_oligos.active.cell(column = 2, row = 3, value = str(Oligo_2))
Designed_oligos.active.cell(column = 3, row = 3, value = str(GC_2))
Designed_oligos.active.cell(column = 4, row = 3, value = str(Oligo_2_TM))
Designed_oligos.save("Designed_oligos.xlsx")

ATCTGATGGGATGACCGGGG
CCATGTATAGGAGGGGGCAC
60.0
60.0
55.2
53.4
```

Google Colab上で
表示された実行結果

Designed_oligos.xlsx

	A	B	C	D
1	Oligo_name	Sequence	GC_content	TM
2	Oligo_1	ATCTGATGGGATGACCGGGG	60	55.2
3	Oligo_2	CCATGTATAGGAGGGGGCAC	60	53.4
4				

図5. ランダムオリゴプライマーの設計用コードの例

Biopythonの導入

関連ツールのインポート

オリゴDNA配列長と オリゴ名の指定

オリゴDNA配列の 生成と配列の表示

生成したオリゴDNA配列の GC含量とTM値の算出・表示

エクセルファイル (Designed_oligos.xlsx)への 結果の出力

バイオインフォマティクス解析に関する相談窓口を運営している <https://www.sbj.or.jp/division/division_bioinfo.html>. もし大規模データ解析で頭を悩ませているならば、この相談窓口の利用もぜひ検討されたい。

謝辞

バイオインフォマティクスに関連する技術の習得の過程で、著者を常に温かく見守って下さった名古屋大学大学院生命農学研究科の中野秀雄教授に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** : 403–410.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8** : 186–194.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30** : 2114–2120.
- Kojima, T., Kunitake, E., Ihara, K., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2016) A Robust Analytical Pipeline for Genome-Wide Identification of the Genes Regulated by a Transcription Factor: Combinatorial Analysis Performed Using gSELEX-Seq and RNA-Seq. *PLOS ONE* **11** : e0159011.
- Kojima, T., Takei, Y., Ohtsuka, M., Kawarasaki, Y., Yamane, T., and Nakano, H. (2005) PCR amplification from single DNA molecules on magnetic beads in emulsion: Application for high-throughput screening of transcription factor targets. *Nucleic Acids Res.* **33** : e150.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25** : 2078–2079.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437** : 376–380.
- Oka, H., Kojima, T., Ihara, K., Kobayashi, T., and Nakano, H. (2019) Comprehensive investigation of the gene expression system regulated by an *Aspergillus oryzae* transcription factor XlnR using integrated mining of gSELEX-Seq and microarray data. *BMC Genomics* **20** : 16.
- Shen, W., Le, S., Li, Y., and Hu, F. (2016) SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLOS ONE* **11** : e0163962.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., and Mesirov, J. P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14** : 178–192.
- Uesaka, K., Oka, H., Kato, R., Kanie, K., Kojima, T., Tsugawa, H., Toda, Y., and Horinouchi, T. (2022) Bioinformatics in bioscience and bioengineering: Recent advances, applications, and perspectives. *J. Biosci. Bioeng.* **134** : 363–373.

The Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Meijo University is published annually. All communications are to be addressed to the Faculty of Agriculture, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468-8502, Japan.

名城大学農学部学術報告は年1回発行されています。
本報告に関する問い合わせは下記にお願いします。

〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口一丁目501番地
名城大学農学部学術委員会

日野 輝明 (委員長)
湊 健一郎
山岸 健三
兒島 孝明
近澤 未歩
汪 光熙

名城大学農学部学術報告59号

令和5年3月26日 印刷
令和5年3月31日 発行

編集兼
発行所

名城大学農学部
名古屋市天白区塩釜口一丁目501番地
TEL (052)832-1151(代)

印刷

常川印刷株式会社
〒460-0012 名古屋市中区千代田二丁目18番17号
TEL (052)262-3028(代)



**Scientific Reports of the Faculty of Agriculture
Meijo University
No.59,2023**

Published by

THE FACULTY OF AGRICULTURE,
MEIJO UNIVERSITY

Nagoya 468-8502, JAPAN