

光合成研究

第28巻 第3号 (通巻83号) 2018年12月
NEWS LETTER Vol. 28 NO. 3 December 2018

THE JAPANESE SOCIETY OF PHOTOSYNTHESIS RESEARCH

巻頭言	光合成学会会長を終えるにあたって	高橋 裕一郎 (岡山大)	138
トピックス	エチオプラストの発達と葉緑体への分化過程におけるガラクト脂質の役割	藤井 祥 他 (東京大 他)	139
解説	光化学系 I 複合体の分子集合機構の解明の進展	ネレパリ・スリーダー 他 (岡山大)	148
解説特集	「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新発見」		157
序文		伊福 健太郎 (京大)	158
解説	極低温共焦点顕微鏡による光合成研究の新展開	柴田 穰 (東北大)	159
解説	植物における 1 細胞・組織レベルでの遺伝子発現解析	廣畑 敦洋 他 (京大 他)	171
解説	ゲノミックセレクションおよびハイスループットフェノタイピングを用いた 作物育種の効率化・高速化	郭 威、岩田 洋佳 (東京大)	180
表紙の紹介	南極露岩域に生育する光合成生物の光阻害の波長依存特性	小杉 真貴子 他 (中央大 他)	194
特別企画	第5回「修行 in ボストン」	近藤 徹 (東北大)	195
報告記事	The 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis 参加報告	キム ウンチュル (基生研)	202
報告記事	第1回アジア・オセアニア国際若手の会開催報告	神保 晴彦 (東京大)	204
報告記事	International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 参加報告	石川 規子 (京大)	205
事務局からのお知らせ			207
日本光合成学会会員入会申込書			208
日本光合成学会会則			209
「光合成研究」投稿規定			211
幹事会名簿			212
編集後記・記事募集			213
「光合成研究」編集委員・日本光合成学会 2018 年度役員			214
賛助法人会員広告			

巻頭言

光合成学会会長を終えるにあたって

日本光合成学会会長・高橋裕一郎
(岡山大学・異分野基礎科学研究所)

2015年から日本光合成学会会長をお引き受けし、学会の運営に携わって4年がたちました。2015年の事務局長の鹿内利治さん、2016年以降は園池公毅さんに主な運営でお世話になりました。また、2015-16年の編集長の西山佳孝さん、2017-18年の編集長の伊福健太郎さんに「光合成研究」の編集ではお世話になりました。さらに、常任幹事や編集委員の皆さんのご協力により、毎年の年会と2回のワークショップを開催し、年3回の会報「光合成研究」を発行し、4年間の運営を大きな問題が起こることなく終わることができました。どうも有り難うございます。特に、年会ではシンポジウム、ポスター発表、ポスター賞、機器展示など、大きな学会の年会に比肩する企画を実施し、光合成研究の発展に少しかもしれないが貢献できたのではないかと自負しています。また、会報も幅広い光合成研究の最新の知見を広めるのに大きな貢献をしていると思います。この2つの活動は日本光合成学会の大きな柱で、今後もできる限り継続していくことが必要だと感じています。

会長を引き受けたときには、色々な活動をしようと思いついていたのですが、いくつかの企画は任期中に終わることができなかつたことをお詫びします。中でも光合成の教科書を作る企画は遅れながらも進行中ですので、私の退任後になりますが完成させたいと思っています。皆さんのご協力を依頼することがあると思いますが、そのときはよろしくお願い致します。

来年からは京都大学の鹿内利治さんが会長を引き継ぎます。私に不足していた企画力と活力で日本光合成学会の更なる発展に貢献して頂けるものと信じています。今後も学会に対する会員の皆さんのご協力と積極的な参加をお願いします。

トピックス

エチオプラストの発達と葉緑体への分化過程における
ガラクト脂質の役割¹ 東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻² 日本女子大学 理学部 物質生物科学科³ 大阪府立大学 高等教育推進機構藤井 祥¹、永田 典子²、増田 建¹、和田 元¹、小林 康一^{3,*}

暗所で発芽した被子植物は、子葉細胞内にエチオプラストとよばれる葉緑体の前駆体を形成する。エチオプラスト内には、脂質二重層をベースにクロロフィル中間体などを蓄積したプロラメラボディ (PLB) がプロチラコイドと共に発達する。子葉が光を受けると、PLB の急速な崩壊とチラコイド膜の形成がおり、エチオプラストは葉緑体へと分化する。エチオプラストと葉緑体の脂質組成は似ており、どちらも、ガラクト脂質であるモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) を主要構成成分とする。発芽時から光環境下で生育した植物では、これらのガラクト脂質が光合成やチラコイド膜の形成、葉緑体の発達に重要な役割を果たすことが明らかにされてきたが、暗所発芽時のエチオプラストの形成や PLB の発達における MGDG や DGDG の重要性は不明であった。また、エチオプラストから葉緑体に分化する際におこる PLB からチラコイド膜へのダイナミックな膜変換において、ガラクト脂質がどのように関わるのかも分かっていなかった。今回、我々は MGDG や DGDG の合成能力が低下したシロイヌナズナを用いて、エチオプラスト発達時にガラクト脂質が担う役割を明らかにした。また、エチオプラストから葉緑体への分化過程における MGDG と DGDG の関与についても研究を進めており、最新の結果について考察する。

1. はじめに

地中などの暗所で発芽した被子植物は緑化せず、胚軸が著しく伸長した、いわゆるモヤシ (黄化芽生え) の形態をとる。このとき、子葉細胞内では葉緑体の前駆体としてエチオプラストが発達し、その内部には、扁平なプロチラコイドとともに、プロラメラボディ (PLB) とよばれる規則正しい格子状の膜構造が形成される。これらの膜にはクロロフィルの合成中間体であるプロトクロロフィリド (Pchl_{id}) と、それを光依存的にクロロフィリド (Chl_{id}) へと変換する Pchl_{id} 還元酵素 (LPOR) が蓄積する。Pchl_{id} の多くは膜上で LPOR および NADPH と光活性型の三者複合

体を形成し、光の照射を待っている^{1,2)}。ちなみに、被子植物以外の植物や藻類、シアノバクテリアの多くは暗所でも活性を有する Pchl_{id} 還元酵素を持つため、暗所でクロロフィルを作れないのは、LPOR しか持たない被子植物の特徴である³⁾。

暗所で発芽した被子植物の黄化子葉が光を受けると、光活性型複合体中の Pchl_{id} は直ちに Chl_{id} に変換され、その後さらにクロロフィルへと代謝される⁴⁾。大量に蓄積していた LPOR は速やかに分解される一方、光化学系複合体タンパク質をはじめとする光合成関連タンパク質が色素とともに合成される。PLB が急速に崩壊すると同時にチラコイド膜の活発な構築が起り、結果としてエチオプラストは葉緑体へと分化する。この過程は、LPOR による Pchl_{id} の光変換に加え、

*連絡先 E-mail: kkobayashi@las.osakafu-u.ac.jp

光合成関連遺伝子の転写、光合成タンパク質や色素の合成、光合成装置の形成と光合成反応系の活性化、さらに PLB からチラコイド膜への膜変換を含み、これらの過程が非常にダイナミックかつ迅速に起こるため、光合成反応系の構築や葉緑体の発達機構を調べるためのモデル系として盛んに研究されてきた。

PLB とチラコイド膜はまったく異なる構造をしているが、どちらも脂質二重層をベースにした膜構造であり、興味深いことに、それらの脂質組成も非常に似ている (図 1)。これらの膜脂質の大部分は植物やシアノバクテリアに特有の糖脂質であり、ジアシルグリセロールにガラクトースが 1 分子結合したモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) と、MGDG にガラクトースがもう 1 分子結合したジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG) が、それぞれ全体の約 50% と 30% を占める^{5,6)}。MGDG は疎水性尾部に対して親水性頭部が相対的に小さいコーン型の立体構造を持つため、単独ではラメラ構造を作れず、代わりにヘキサゴナル II とよばれる非二重層構造を作るノンラメラ脂質である。それに対し、DGDG は親水性頭部と疎水性尾部のバランスがよく、シリンダー型の立体構造を持つため、水溶液中で二重層構造を形成するラメラ脂質である⁷⁾ (図 2)。チラコイド膜の MGDG/DGDG 比は 2 に近い値をとることが知られており、この組成がチラコイド膜特有の構造に重要である可能性が示唆されている。PLB やプロチラコイドの形成に

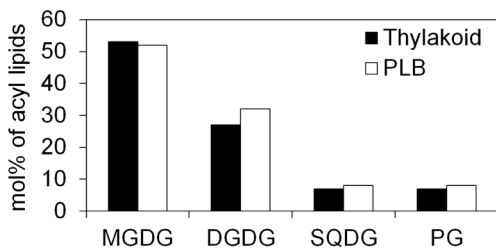


図1. チラコイド膜とPLBの脂質組成の比較
ホウレンソウから単離された葉緑体のチラコイド膜⁵⁾とコムギ黄化芽生えから単離されたエチオプラストのPLB⁶⁾の脂質組成。主要な膜脂質のみを記載。

対しても、MGDG/DGDG 比が重要である可能性が言及されてきたが⁸⁾、その詳細は定かではない。

これまでの変異体などを用いた解析から、光環境下で生育した植物に関しては、ガラクト脂質が光合成やチラコイド膜の形成、葉緑体の発達に重要な役割を果たすことが明らかにされてきたが、暗所下でのエチオプラストの形成やPLBの発達、Pchl_{id}eの合成とLPORとの複合体形成における脂質の重要性は不明であった。今回、我々はMGDGやDGDGの合成能力が低下したシロイヌナズナを用いて、ガラクト脂質が暗所で担う役割を調べたのでその成果を紹介する。また、暗形態形成後、エチオプラストから葉緑体へ分化する過程にガラクト脂質がどのように関与するのか、特にPLBからチラコイド膜へのダイナミックな膜変換にどのような役割を果たすのかについても取り組んでおり、その最新の結果も併せて紹介したい。

2. エチオプラスト発達における MGDG の役割

植物の MGDG 合成は色素体包膜に局在する MGDG 合成酵素によって行われる。シロイヌナズナには色素体内包膜に局在する MGD1 と、外包膜に局在する MGD2 と MGD3 の 3 種の MGDG

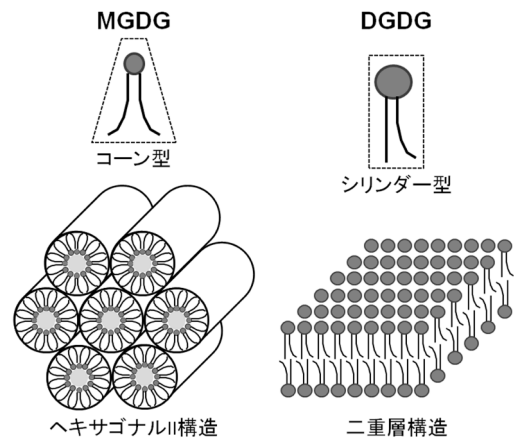


図2. MGDGによるヘキサゴナルII構造とDGDGによる二重層構造

疎水性尾部に対し極性頭部の体積の占める割合が小さいMGDGはコーン型をしており、ヘキサゴナルIIとよばれる、極性頭部を内側に集合した構造をとりやすい。DGDGはシリンダー型をしており、水溶液中で二重層構造を形成する。

合成酵素が存在し、葉などの緑色組織では、MGDGの大部分はMGD1によって合成される^{9,10}。MGDGはDGDG合成の基質としても使われることから、MGD1はDGDGの合成にも必要不可欠であり、チラコイド膜に供給されるガラクト脂質の合成の大半を担っている。MGD2とMGD3は、リン欠乏時に色素体外に供給されるDGDGの合成に主に貢献すると考えられ、チラコイド膜のガラクト脂質の合成への寄与は極めて限定的である^{11,12}。

MGD1遺伝子を完全に欠いたノックアウト変異体ではガラクト脂質がほとんど合成されないため、チラコイド膜の形成がおこらず、植物体の生育にも深刻な影響が生じる¹⁰。芽生えの段階で致死となることに加え、MGD1のノックアウト変異は胚形成も強く阻害し、子葉の形成不全を引き起こすため¹³、この変異体の黄化芽生えを用いた解析は不可能であった。そこで我々は、MGD1 mRNAをターゲットとした人工マイクロRNA (*amiR-MGD1*) をデキサメタゾン (DEX) 依存的に発現させる系を用い¹⁴、MGD1の発現抑制がエチオプラストの発達にどのような影響を与えるのかを調べた¹⁵。

amiR-MGD1 形質転換体を暗所で発芽後4日間

生育させたところ、DEX処理した個体 (+DEX) では、MGD1のmRNAレベルが未処理個体 (-DEX) の35%にまで抑制された。そこで脂質組成を分析したところ、+DEXのDGDG含量は-DEXとほとんど変わらなかったが、MGDGの量は-DEXの65%にまで低下していた。そのため、-DEXで1.5程度であったMGDG/DGDG比が+DEXではほぼ1 (MGDGとDGDGが等量) になった。次に、このMGDGの減少がエチオプラストの形態に与える影響を調べた。+DEXではPLBの格子構造はわずかに乱れたが、PLBの発達そのものには大きな影響を与えなかった (図3)。この結果から、PLBの形成にはMGDG/DGDG比の厳密なコントロールは必要で無いことが判明した。PLBのサイズは、LPORの蓄積量に大きく左右されることが知られている²。+DEXサンプルでMGDGが減少しても、LPORの蓄積によりPLBのサイズは変わらなかったと考えられる。一方、プロチラコイドの発達は+DEX個体で大きく阻害された (図3)。+DEXでは膜の主要脂質成分であるMGDGが減少したにもかかわらずPLBは通常のサイズに近いレベルまで発達したことから、その分、プロチラコイドの形成に使えるガラクト脂質の量が不足したのかもしれない。

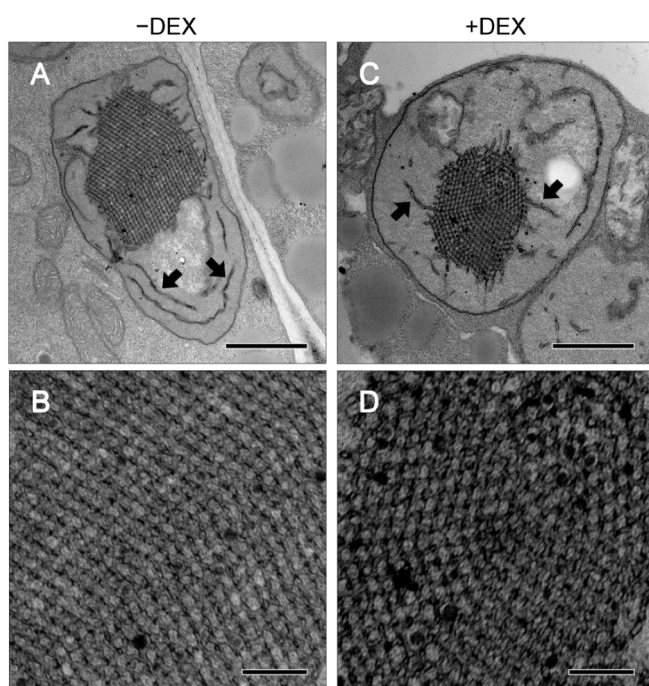


図3. *amiR-MGD1*の黄化子葉におけるエチオプラストの形態とPLBの構造

(A, B) DEX 未処理コントロール (-DEX)と(C, D)DEX処理しMGD1を抑制したサンプル(+DEX)。(B)、(D)はそれぞれ(A)、(C)のPLBの拡大図。矢印はプロチラコイドを示す。スケールバーは1 μm (A, C)と0.2 μm (B, D)。(Fujii et al., 2017¹⁵)を改変。www.plantphysiol.org. Copyright American Society of Plant Biologists.)

次に、MGDG の減少が Pchl_{id}e の合成や蓄積、複合体形成にどのような影響を与えるのかを調べた。+DEX の黄化芽生えでは、Pchl_{id}e の量が -DEX の約 60%にまで減少していた。そこで、Pchl_{id}e 合成の律速段階の生成物である 5-アミノレブリン酸 (ALA) を黄化芽生えに過剰に与えることで、Pchl_{id}e 合成経路の状態を調べた。-DEX では、ALA 処理により暗所での最終産物である Pchl_{id}e が顕著に増加したが、+DEX では Pchl_{id}e の蓄積量が少なく、代わりに中間体である Protoporphyrin IX (Proto IX)、Mg-Proto IX、Mg-proto IX monomethyl ester (Mg-Proto IX ME) が蓄積した (図 4)。この結果から、Proto IX に Mg を配位する Mg-chelatase (MgCh)、Mg-Proto IX をメチルエステル化する Mg-Proto IX monomethyl esterase (MgMT)、次に 5 番目の環構造を導入し divinyl Pchl_{id}e を作る Mg-ProtoIX ME cyclase (MgCY) による代謝経路が阻害されていることが示唆された。特に、+DEX では Mg-Proto IX の蓄積が顕著であり、その中間体の蓄積プロファイルが MgMT の変異体とよく似ていたことから、MGDG の減少は MgMT が触媒す

るステップに大きな影響を及ぼしたと考えられる。

Pchl_{id}e の分析から、+DEX では光活性型の Pchl_{id}e が特に減少していることも明らかとなった。MGDG の減少により Pchl_{id}e が LPOR や NADPH とうまく複合体を作れていない可能性が考えられる。さらに、光活性型の三者複合体は膜上で集合し多量体を形成することが知られているが、+DEX の黄化芽生えでは、三者複合体の多量体化も阻害されていることが分かった。これらの結果は、MGDG が Pchl_{id}e-LPOR-NADPH 三者複合体の形成や、その多量体化に重要であることを示している。

以上の結果から、MGDG の若干の減少は PLB の形成には大きな影響を与えないが、プロチラコイドの形成や Pchl_{id}e の合成、光活性型の三者複合体の形成を強く阻害することが明らかとなった¹⁵⁾。

3. エチオプラスト発達における DGDG の役割

MGDG 合成と同様、DGDG の合成も色素体包膜で行われる。UDP-Gal から MGDG にガラク

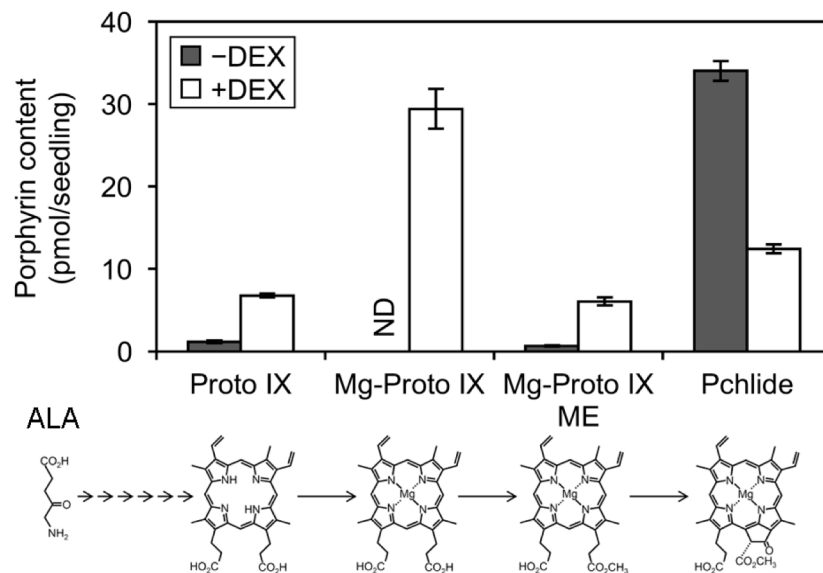


図 4. ALA 処理後の *amiR-MGD1* における Pchl_{id}e 合成中間体の蓄積

黄化芽生えに ALA を 24 時間処理した後の Pchl_{id}e 合成中間体の蓄積量を -DEX と +DEX サンプルで比較した。Pchl_{id}e の合成経路と各中間体の構造をグラフの下に示した。(Fujii et al., 2017¹⁵⁾を改変。
www.plantphysiol.org. Copyright American Society of Plant Biologists.)

トース 1 分子を転移する DGDG 合成酵素は、シロイヌナズナには DGD1 と DGD2 の 2 種が存在する。どちらも色素体の外包膜に局在するが、緑色組織の DGDG の大半を合成するのは DGD1 である^{16,17}。DGD2 は MGD2 や MGD3 と共に働き、リン欠乏時の DGDG 合成に主に寄与する^{11,16}。光環境下で育った *DGD1* のノックアウト変異体 (*dgd1*) では、DGDG 含量は野生株の 10% 以下に減少し、個体が矮化するなど植物体の生育にも強く影響するが、葉緑体の発達には致命的な影響は与えず、クロロフィル量や光合成活性のある程度の減少や、チラコイド膜が湾曲するといった障害がみられる程度である¹⁷。ちなみに、*dgd1* の矮化に関しては、ジャスモン酸の過剰生産が原因であることが分かっているが¹⁸、なぜ DGDG の減少がジャスモン酸の過剰生産を引き起こすのかについては、今のところ不明である。

amiR-MGD1 を用いた我々の研究から、MGDG の若干の減少が Pchl_{ide} の合成や蓄積、三者複合体の形成に大きな影響を与えることが分かったが¹⁵、DGDG がエチオプラストの発達においてどのような役割を果たすのかについては未解明であった。そこで我々は *dgd1* 変異体を用い、DGD1 の欠損がエチオプラストの発達にどのよ

うな影響を与えるのかを調べた¹⁹。黄化芽生えにおける DGD1 の寄与が分かっていなかったため、まず *dgd1* の黄化芽生えの脂質組成を調べたところ、DGDG の含量が野生株の 20% 程度にまで低下していた。この結果から、エチオプラストにおいても DGD1 が主要な DGDG 合成酵素であることが明らかとなった。*dgd1* のエチオプラストを観察したところ、PLB は野生株と同程度の大きさまで発達していたが、内部の格子構造は大幅に乱れていた (図 5)。また、野生株のエチオプラストは大抵 1 つの大きな円状 (実際には球状) の PLB しか持たなかったが、*dgd1* では歪な PLB が複数みられることが多く、PLB の真円度も著しく低下していた。複数みえる PLB は、完全に断片化しているのか、切片外のところにつながっているのかは分からないが、PLB の形態に異常が生じていることは明らかである。この PLB の形態異常は、内部の格子構造の乱れと関係するのかもしれない。また、*dgd1* ではプロチラコイドの形成もほとんど見られなかったが、*amiR-MGD1* のケースと同じく、ガラクト脂質の大半が PLB の形成に使われたため、プロチラコイドを作る脂質が不足した可能性が考えられる。

次に、Pchl_{ide} の蓄積や合成経路の状態を調べ

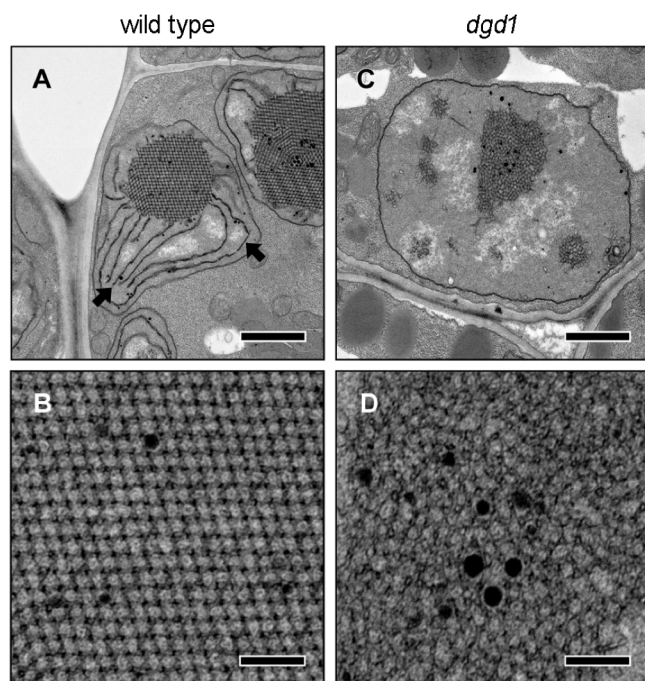


図 5. *dgd1* の黄化子葉におけるエチオプラストの形態と PLB の構造

(A, B) 野生株 (wild type) と (C, D) *dgd1*。(B)、(D) はそれぞれ (A)、(C) の PLB の拡大図。矢印はプロチラコイドを示す。スケールバーは 1 μm (A, C) と 0.2 μm (B, D)。(Fujii et al., 2018¹⁹) を改変。
www.plantphysiol.org. Copyright American Society of Plant Biologists.)

た結果、*amiR-MGD1* の場合と同様、*dgd1* では Pchl_{ide} の蓄積量が少なく、ALA の添加実験から Mg-Proto IX のモノメチルエステル化のステップが特に阻害されていることが分かった (図 6)。MgMT の担うステップはガラクト脂質の減少の影響を特に受けやすいと考えられるが、具体的にどのような阻害が起こるのかについては今後の課題である。また、*dgd1* では光活性型の Pchl_{ide} の割合が減少していた。これも *amiR-MGD1* の +DEX と同様であるが、Pchl_{ide} の合成阻害も光活性型の減少も、*amiR-MGD1* の方がより顕著であった。それぞれの脂質の減少の程度 (+DEX *amiR-MGD1* では MGDG が 35%の減少、*dgd1* では DGDG が 80%の減少) も併せて考えると、Pchl_{ide} の合成や光活性型の蓄積に対する影響は、MGDG の方が強いと考えられる。*amiR-MGD1* の +DEX では三者複合体の多量体化が阻害されていたが、そのような現象は *dgd1* では見られなかった。一方、*amiR-MGD1* と異なり、*dgd1* 変異体では Pchl_{ide} の光変換後の Chlide-LPOR 複合体の挙動に異常が生じていた。フラッシュ照射後、Chlide-LPOR 複合体の多量体は二量体へと解離

していきが、*dgd1* ではその過程が遅くなっていた。これらの結果から、MGDG と DGDG はどちらも光活性型三者複合体の形成に重要であるが、その関わり方は異なると考えられる。

4. エチオプラストから葉緑体への分化時におけるガラクト脂質の役割

シロイヌナズナの黄化芽生えでは、光照射後 1 時間の時点で PLB の格子構造が大きく乱れ、4 時間後には PLB の名残もほとんど観察されなくなる。この際、PLB の管状の構造が直接扁平な薄膜構造に変換され、プロチラコイド (もしくはチラコイド膜の前駆体) が顕著に発達することが明らかにされている²⁰⁾。PLB とチラコイド膜は非常に似た脂質組成を持ち、どちらもガラクト脂質を主成分とするが (図 1)、このダイナミックな膜変換にガラクト脂質がどのような役割を果たすのかはよく分かっていない。そこで我々は *amiR-MGD1* と *dgd1* の黄化芽生えの緑化過程を観察することで、この過程におけるガラクト脂質の重要性を調べた (未発表)。

緑化時の脂質量の経時的な分析を行ったとこ

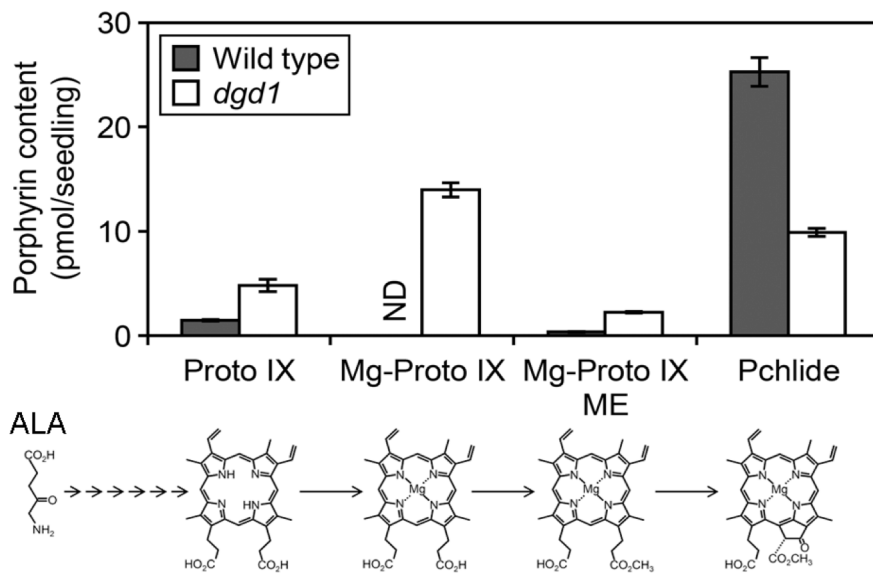


図 6. ALA 処理後の *dgd1* における Pchl_{ide} 合成中間体の蓄積

黄化芽生えに ALA を 24 時間処理した後の Pchl_{ide} 合成中間体の蓄積量を野生株と *dgd1* で比較した。Pchl_{ide} の合成経路と各中間体の構造をグラフの下に示した。(Fujii et al., 2018¹⁹⁾を改変。www.plantphysiol.org. Copyright American Society of Plant Biologists.)

ろ、光照射前から光照射 12 時間後までは、芽生えのガラクト脂質の含量は野生株においてもほとんど増えないことが分かった。このことから、PLB からチラコイド膜への変換はガラクト脂質の増加を必要としないことが示された。また、+DEX *amiR-MGD1* と *dgd1* ではそれぞれ MGDG と DGDG の量が緑化過程を通して常に低いレベルに抑制されていた。これらの植物体において、光照射後の子葉の色素体の構造変化を電子顕微鏡で経時的に観察したところ、+DEX *amiR-MGD1* では PLB の消失は-DEX と同様に速やかに起きたが、その後のチラコイド膜形成が強く阻害された。それに対し、*dgd1* では PLB の残留物がなかなか消失せず、その後のチラコイド膜の形成も阻害されることが分かった。どちらの植物体においても、LPOR のレベルは光照射後に速やかに減少した一方、クロロフィルや LHCII の主要タンパク質である LHCB1 の蓄積は強く阻害された。

なぜ、*amiR-MGD1* と *dgd1* の間では、PLB からチラコイド膜への変換、特に PLB の消失において、大きな違いが見られたのだろうか。1 つの可能性として、DGDG がラメラ脂質であるのに対し、MGDG は単独で脂質二重層を形成できないノンラメラ脂質であることが挙げられる (図 2)。DEX 処理した *amiR-MGD1* の黄化芽生えでは MGDG の含量が特異的に減少しているため、DGDG の割合が通常よりも高い状態になっている。DGDG は単独でラメラ構造をとることができるので、光照射後は LPOR の分解に伴い PLB の格子構造が崩壊し、PLB はそのまま DGDG や他のラメラ脂質により扁平な薄膜構造に変換されるのだろう。しかし、その後は LHCII などの光合成膜タンパク質が蓄積せず、またガラクト脂質合成の抑制も続くので、葉緑体形成は阻害されたままになると推測される。一方、*dgd1* 変異体では DGDG の量が顕著に減少しているため、PLB では MGDG の割合が異常に高い状態になっている。光照射後、LPOR は分解され PLB の格子構造は崩れるが、残された MGDG は単独でラメラ構造をとれないので、PLB を作っていた膜はラメラに変換されることなく凝集したまま長く残るのかもしれない。しかしながら、*dgd1* において

も時間の経過と共に PLB は消失しチラコイド膜が発達する。*in vitro* の実験から、ノンラメラ脂質の MGDG も LHCII と相互作用することでラメラ構造を作れることが知られている²¹⁾。光環境下で生育した *dgd1* は野生株と同程度に LHCII を蓄積できることから²²⁾、徐々に蓄積した LHCII などが MGDG と相互作用することで、ラメラ脂質である DGDG をほとんど欠いても最終的にはチラコイド膜を形成できるのかもしれない。

上記の推測がどこまで正しいのかに加え、なぜガラクト脂質の欠損によってクロロフィル合成経路や光合成タンパク質の蓄積が阻害されるのかは不明である。また、我々は、クロロフィルの合成に加え、核や色素体コードの光合成遺伝子の mRNA 蓄積もガラクト脂質の合成阻害によって抑制されることを見出しているが^{12,14)} (未発表)、それがどのようなメカニズムで起こるのかも明らかでない。ガラクト脂質に加え、チラコイド膜には酸性脂質であるホスファチジルグリセロールとスルホキノボシルジアシルグリセロールが主要構成成分として含まれるが、エチオプラストの発達や葉緑体への分化の過程におけるこれらの酸性脂質の役割も、解明すべき課題として残されている。今後さらに研究を進め、これらの疑問を明らかにしていきたい。

謝辞

日本女子大学の小林恵さんには、電子顕微鏡解析において多大なる貢献をいただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 (16J10176、26711016、26440170) の助成を受けて行われました。

Received Nov 15, 2018; Accepted Nov 20, 2018; Published Dec 31, 2018.

参考文献

1. Solymosi, K. and Schoefs, B. (2010) Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: The dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth. Res.* 105, 143–166.

2. Masuda, T. and Takamiya, K. (2004) Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Photosynth. Res.* 81, 1–29.
3. Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 411–421.
4. Tanaka, R., Kobayashi, K. and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* 9, e0145.
5. Dorne, A., Joyard, J. and Douce, R. (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 71–74.
6. Selstam, E. and Sandelius, A.S. (1984) A comparison between prolamellar bodies and prothylakoid membranes of etioplasts of dark-grown wheat concerning lipid and polypeptide composition. *Plant Physiol.* 76, 1036–1040.
7. Shipley, G.G., Green, J.P. and Nichols, B.W. (1973) The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 531–544.
8. Selstam, E. (1998) Development of thylakoid membranes with respect to lipids, in *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (Siegenthaler, P.A. and Murata, N., Eds.) pp 209–224, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
9. Kobayashi, K. (2016) Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J. Plant Res.* 129, 565–580.
10. Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M. and Ohta, H. (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17216–17221.
11. Kobayashi, K., Awai, K., Nakamura, M., Nagatani, A., Masuda, T. and Ohta, H. (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J.* 57, 322–331.
12. Kobayashi, K., Narise, T., Sonoike, K., Hashimoto, H., Sato, N., Kondo, M., Nishimura, M., Sato, M., Toyooka, K., Sugimoto, K., Wada, H., Masuda, T. and Ohta, H. (2013) Role of galactolipid biosynthesis in coordinated development of photosynthetic complexes and thylakoid membranes during chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 73, 250–261.
13. Kobayashi, K. and Ohta, H. (2008) Possible requirement of galactolipids for embryogenesis, in *Photosynthesis. Energy from the Sun* (Allen, J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B., Eds.) pp 783–786, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
14. Fujii, S., Kobayashi, K., Nakamura, Y. and Wada, H. (2014) Inducible knockdown of *MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE1* reveals roles of galactolipids in organelle differentiation in *Arabidopsis* cotyledons. *Plant Physiol.* 166, 1436–1449.
15. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T. and Wada, H. (2017) Monogalactosyldiacylglycerol facilitates synthesis of photoactive protochlorophyllide in etioplasts. *Plant Physiol.* 174, 2183–2198.
16. Kelly, A.A., Froehlich, J.E. and Dörmann, P. (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* 15, 2694–2706.
17. Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. and Benning, C. (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7, 1801–1810.
18. Lin, Y., Chen, L., Herrfurth, C., Feussner, I. and Li, H. (2016) Reduced biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol, a major chloroplast membrane lipid, leads to oxylipin overproduction and phloem cap lignification in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28, 219–232.
19. Fujii, S., Kobayashi, K., Nagata, N., Masuda, T. and Wada, H. (2018) Digalactosyldiacylglycerol is essential for organization of the membrane structure in etioplasts. *Plant Physiol.* 177, 1487–1497.
20. Kowalewska, Ł.M., Mazur, R., Suski, S., Garstka, M. and Mostowska, A. (2016) Three-dimensional visualization of the internal plastid membrane network during runner bean chloroplast biogenesis. *Plant Cell* 28, 875–891.
21. Simidjiev, I., Stoylova, S., Amenitsch, H., Javorfi, T., Mustardy, L., Lagner, P., Holzenburg, A. and Garab, G. (2000) Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1473–1476.

22. Härtel, H., Lokstein, H., Dörmann, P., Grimm, B. and Benning, C. (1997) Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 1175–1184.

Role of galactolipids in etioplast development and etioplast-to-chloroplast differentiation

Sho Fujii¹, Noriko Nagata², Tatsuru Masuda¹, Hajime Wada¹ and Koichi Kobayashi^{3,*}

¹Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, ²Faculty of Science, Japan Women's University,

³Faculty of Liberal Arts and Sciences, Osaka Prefecture University

解説

光化学系 I 複合体の分子集合機構の解明の進展[‡]

岡山大学 異分野基礎科学研究所

ネレパリ・スリーダー、小澤真一郎、高橋裕一郎*

酸素発生型光合成電子伝達系において、光エネルギーを利用してプラストシアニンもしくはシトクロム *c* を酸化し、フェレドキシンを還元する光化学系 I (PSI) は、11-15 サブユニットと 100-300 のコファクターから構成される複雑な構造をもつ複合体である。PSI 複合体の構成成分の生化学的解析と構造解析は大きく進展したが、生合成の分子機構の解明は遅れている。PSI 複合体の蓄積に重要であると考えられてきた葉緑体コードの 2 つの因子 (Ycf3 と Ycf4) が、PSI 複合体のサブユニットの分子集合に関与することを示す直接的な証拠が示された。本解説では、筆者らの PSI 複合体の分子集合の最近の研究を中心に紹介する。

1. はじめに

水を酸化し NADP⁺ を還元する酸素発生型光合成電子伝達系は、光エネルギーを利用して直列に機能する 2 つの光化学系により駆動される。光化学系 II (PSII) は強い酸化力を形成し水を分解しプラストキノンを (PQ) を還元するが、光化学系 I (PSI) はプラストキノンを (PQ) とシトクロム *b₆f* (Cyt *b₆f*) からの電子をプラストシアニン (Pc) もしくはシトクロム *c* (Cyt *c*) を介して受け取り、フェレドキシン (Fd) を還元する。還元型 Fd はフェレドキシン NADP 酸化還元酵素 (FNR) に電子を伝達し NADPH を生成する。このような直鎖型電子伝達系 (リニア電子伝達系) により酸素が発生し、炭酸固定反応に必要な還元力である NADPH を生成する。また、この反応と共役してチラコイド膜を介したプロトン駆動力 (*pmf*) が形成され、ATP 合成酵素の働きで ATP が合成される。一方、Fd を還元した電子は Cyt *b₆f* へ伝達され再び PSI を還元する経路がある。これは NADPH を生成しないが ATP 合成に必要な *pmf* を形成し、循環的電子伝達系 (サイクリック電子伝達系) と呼ばれている。PSI の還元側では

NADP⁺ 以外にも窒素や硫黄を還元する経路に電子が伝達されたり、葉緑体の酵素の活性を還元力により調節するレドックス制御に必要な電子を供給したりする。このように PSI の還元側は多機能であり、光合成電子伝達系の電子の分配において中心的な機能を果たしている。

光化学系複合体の生合成の解析は容易ではないが、PSII は代謝回転が速いため、分子集合機構の解析は比較的進んでいた。これに対して、PSI は代謝回転が遅く、複合体の生合成の解析は容易でない。しかし、PSI 複合体の生合成を担うと考えられる因子 (分子集合因子) の同定が進み、これらの因子を欠損した変異株の解析から PSI 複合体の生合成の分子機構の解明が少しずつ進展している。

2. PSI 複合体のサブユニット構造

PSI 複合体は多数のサブユニットから構成される (表 1)。サブユニット組成の異なる複合体の定義を図 1 にまとめた。反応中心複合体 (PSI RC) は、反応中心サブユニット PsaA と PsaB から構成される。チラコイド膜を強い界面活性剤 (低温で低濃度の SDS) で可溶化すると、反応中心 (RC)

[‡]シンポジウム「チラコイド膜超複合体の構造とダイナミクス」

*連絡先 E-mail: taka@cc.okayama-u.ac.jp

表1 光化学系I複合体のサブユニット

サブユニット	植物	クラミドモナス	遺伝子の場所	シアノバクテリア	膜貫通ヘリックス数 もしくは存在部位	機能・コメント
PsaA	+	+	葉緑体	+	11	反応中心 (P700、A ₀ 、A ₁ 、F _X 、コアアンテナ色素)
PsaB	+	+	葉緑体	+	11	反応中心 (P700、A ₀ 、A ₁ 、F _X 、コアアンテナ色素)
PsaC	+	+	葉緑体	+	0	ストロマ側 鉄硫黄タンパク質 (F _A 、F _B)
PsaD	+	+	核	+	0	ストロマ側 フェレドキシン結合サイト
PsaE	+	+	核	+	0	ストロマ側 フェレドキシン結合サイト
PsaF	+	+	核	+	1	主にルーメン側 プラストシアニン結合サイト ²
PsaG	+	+	核	-	2	LHCIの結合安定化
PsaH	+	+	核	-	1	ステート遷移、LHCIIの結合
PsaI	+	+	葉緑体 ¹	+	1	
PsaJ	+	+	葉緑体	+	1	
PsaK	+	+	核	+	2	LHCIの結合安定化
PsaL	+	+	核	+	3	ステート遷移、LHCIIの結合 (植物・クラミドモナス) 3量体の安定化 (シアノバクテリア)
PsaM	-/+	-		+	1	裸子植物、コケ植物、藻類に存在
PsaN	+	+	核	-	0	ルーメン側 プラストシアニン結合
PsaO	+	+	核	-	2	ステート遷移、LHCIIの結合
PsaP	+	-	核	-	2	リン酸化タンパク
PsaX	-	-		+	1	
Lhca1 ⁴	+	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca2 ⁴	+	+	核	-	4	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca3 ⁴	+	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca4 ⁴	+	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca5 ⁴	+	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質 ³
Lhca6 ⁴	+	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質 ³
Lhca7 ⁴	-	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca8 ⁴	-	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質
Lhca9 ⁴	-	+	核	-	3	クロロフィルa/bタンパク質

1. クラミドモナスでは核遺伝子 2. シアノバクテリアではプラストシアニン (シトクロムc) の反応に関与しない
3. 植物ではNDHのリンカー 3. 名前は同じでも植物とクラミドモナスでは必ずしも相同ではない

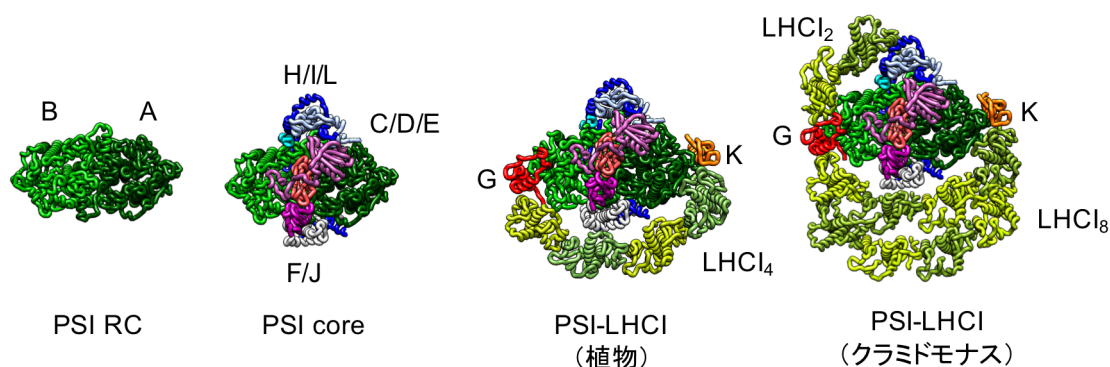


図1. ストロマ側から見た PSI 複合体のサブユニット構成

PSI RC : 反応中心サブユニット PsaA と PsaB から構成される PSI 反応中心複合体。PSI core : 反応中心複合体に他の PSI サブユニットを結合する PSI コア複合体。ストロマ側に PsaC/D/E サブユニットがクラスター構造を形成する。下側には PsaF と PsaJ が存在し、PsaF はルーメン側に親水的な構造をもち、プラストシアニン結合部位を形成する。PsaF の反対側の極には PsaH/PsaI/PsaL がクラスター構造を形成する。PSI-LHCI : 植物では PSI core の PsaF/PsaJ 側に 4 量体のアンテナ複合体 LHCI (LHCI₄) が結合する。クラミドモナスの PSI-LHCI には 8 量体の LHCI (LHCI₈) と PsaG と PsaH の間に 2 量体の LHCI (LHCI₂) が存在する。PsaG と PsaK は LHCI₄ および LHCI₈ の結合を安定化する。エンドウの PSI-LHCI 構造 (5L8R) を基にして作成した。

サブユニットにクロロフィルが結合したクロロフィルタンパク質 (CPI) が単離される。PSI コア複合体 (PSI core) は PSI サブユニットのほとんどを結合した複合体である。酸素発生型光合成生物の PSI core に 10 サブユニット (PsaA-F, PsaI-L) が保存される (表 1)。PsaG, PsaH, PsaN, PsaO は植物や緑藻 (クラミドモナス) に存在するが、シアノバクテリアには存在しない。それに反して、PsaM と PsaX は主にシアノバクテリアに存在する。PsaP は植物に存在するリン酸化タンパク質である。PSI コア複合体には約 100 分子の Chl *a*、約 20 分子の β -カロテン、2 分子のナフトキノン (フィロキノン、5-モノヒドロキシフィロキノン、もしくはメナキノン-4)、3 つの 4Fe-4S 型の鉄硫黄中心 (F_x , F_A , F_B) が存在し、光捕集・光化学反応・電荷分離の安定化・電子伝達成分 (Pc や Cyt C および Fd) の酸化・還元反応を行う。シアノバクテリアのチラコイド膜を温和な界面活性剤で可溶化すると、3 量体のコア複合体が単離される。3 量体構造の安定化に PsaL が重要な役割を果たしている。一方、植物と緑藻のコア複合体は単量体で、PsaF/PsaJ サブユニット側に集光性クロロフィルタンパク複合体 (LHCI) を結合し、PSI-LHCI 超複合体を形成する。LHCI の PSI core への結合は安定で、植物と緑藻のチラコイド膜を温和な界面活性剤で可溶化して分画すると、PSI-LHCI が得られる。

コア複合体の主要な部分の構造は、シアノバクテリアと植物でよく保存されている。反応中心複合体 (PSI RC) は膜貫通ヘリックスを 11 もつ 2 つの相同な反応中心サブユニット (PsaA と PsaB) から構成され、初期電子供与体の P700、複数の電子受容体、ほとんどのアンテナクロロフィル (コア・アンテナ) を結合する。最終的な電子受容体である F_A と F_B は、ストロマ側の表面に存在する PsaC に結合する。PsaC は PsaD と PsaE 共にストロマ側にフェレドキシン結合領域を形成する。一方、膜貫通ヘリックスを 1 つもつ PsaF は、その N 末側の親水領域をルーメン側に大きく張り出し、ルーメン側の表面に結合する PsaN と共にプラストシアニン結合部位の一部を形成する。

PsaJ は膜貫通ヘリックスを 1 つもつ小さなサブユニットで、PsaF に隣接する。

3. PSI 複合体の分子集合は多段階過程である

これまでに、PSI サブユニットをコードする遺伝子の転写や翻訳制御の解析は活発に進められてきたが、合成されたサブユニットやコファクターが複合体へ分子集合する機構の解明は遅れていた。PSI 複合体の構造から、各構成サブユニットは順序正しく段階的に分子集合すると期待される。複合体の中心に存在する反応中心サブユニットがヘテロダイマーである PSI RC の形成が最初の分子集合過程である。葉緑体コードの PsaA, PsaB, PsaC の欠損変異株をそれぞれ用いたタンパク質のプルスラベルの実験から、最初に PsaB がチラコイド膜に挿入され、それを核として PsaA が付加され、その後に PsaC が結合すると報告されている¹⁹⁾。しかし、分子集合過程は極めて速く進行するため、分子集合中間体を検出することは難しい。光合成器官を活発に合成する対数増殖期の細胞を用いた解析から、PsaG と PsaK をもたない PSI-LHCI subcomplex でわずかに蓄積することが示された^{9,18)}。これは、PsaG と PsaK の結合速度が遅いため検出された分子集合中間体である。PSI 複合体の分子集合過程の解析を更に進めるには、新たな手法を用いることが必要である。

4. PSI 複合体の分子集合に関与する因子

多数の PSI サブユニットが複雑な複合体に正確に分子集合する過程は、自発的に起こるとは考えにくい。PSI サブユニットの分子集合を介添える因子 (分子集合因子もしくは分子シャペロン) が存在するはずである。表 2 にまとめた因子が PSI 複合体の分子集合に関与すると考えられる根拠は、(1) 欠損株では PSI 複合体の蓄積が大きく減少するが、PSI サブユニットをコードする遺伝子の発現は影響をほとんど受けない、(2) PSI サブユニットと相互作用する、などである。特に後者では免疫沈殿法や酵母ツーハイブリッドシステム (Yeast Two-Hybrid System) による間接的

表2 PSI複合体の分集因子

分子集因子	遺伝子			欠損株のPSI蓄積量			存在部位	特徴
	植物	クラミドモナス	シアノバクテリア	植物	クラミドモナス	シアノバクテリア		
Ycf3	C	C	+	蓄積せず	蓄積せず	不検出	ストロマ側	TPRドメインをもつ
Y3IP1/CGL59	N (Y3IP1)	N (CGL59)	-	20%	<10%	-	膜貫通ヘリックスが1つ	Ycf3 Interacting Protein 1
Ycf4	C	C	+	10-20%	0%	減少	膜貫通ヘリックスが2つ	Ycf3より蓄積量が多い、オリゴマーを形成
PYG7/CGL71/ Ycf37	N (PYG7)	N (CGL71)	+	著しく減少	好気条件下で減少	減少	ストロマ側	TPRドメインをもつ、好気条件下でのPSI複合体生成に重要
PSA2	N	N	-	著しく減少	-	-	ルーメン側	Photosystem I Assembly 2、250 kDaの複合体を形成
PSA3	N	N	-	10-20%	-	-	ストロマ側	Photosystem I Assembly 3、PsaCと相互作用
PPD1	N	N	-	-	-	-	ルーメン側	PsbP-Domain 1、PsaA/Bのルーメン側のループと相互作用

N: 核遺伝子, C: 葉緑体遺伝子

な方法による相互作用が報告されている。Ycf3^{1,6,11)}、Ycf4^{1,4,8,16)}、PYG7/CGL71/Ycf37 (植物/クラミドモナス/シアノバクテリアでの名称)^{3,13,17)}は真核光合成生物とシアノバクテリアに保存されているため、特に重要な役割を担っていると推測される。真核光合成生物ではYcf3とYcf4は葉緑体ゲノムにコードされているが、Y3IP1/CGL59 (植物/クラミドモナスでの名称)は核ゲノムにコードされている。その他の因子Y3IP1^{4,7)}、PSA2^{2,15)}、PSA3¹²⁾、PPD1⁵⁾は植物と藻類に見出され、核ゲノムにコードされている。Ycf3とY3IP1/CGL59はTPR (tetratricopeptide repeat) ドメインをもち、他のタンパク質と相互作用する可能性が考えられる

5. Ycf3とY3IP1はモジュールを形成し反応中心の分子集に必須である

葉緑体ゲノムに存在する *ycf3* (hypothetical chloroplast open reading frame 3) は、真核光合成生物に保存される読み取り枠 (ORF) として同定され、シアノバクテリアにも保存されている。その後、チラコイド膜の表在性タンパク質であるYcf3をコードすることが示された¹⁾。葉緑体形質転換により *ycf3* 遺伝子をノックアウトしたクラミドモナスとタバコの形質転換体にはPSIが全く蓄積しないため、Ycf3はPSI複合体の分子集に必須の因子である^{1,11)}。Ycf3は部分的に変性したPSI反応中心サブユニットPsaAやコア複合体サブユニットのPsaDと相互作用することを示す *in vitro* の解析結果が報告された⁶⁾。タンパク質間の相互作用に関わると考えられているTPRドメインをもつYcf3は、PSI複合体の分子集

に関わる必須因子であることは確かであるが、どのようにPSI複合体を分子集させるのかについてはほとんど不明であった。

そこで、筆者らはHA (Human influenza hemagglutinin) タグ (YPYDVDPYA) をC末端に融合したYcf3 (Ycf3-HA) を葉緑体に発現させたクラミドモナス葉緑体形質転換体を作出し、Ycf3と相互作用するタンパク質をアフィニティー精製した (図2A)。得られたYcf3-HA標品にはY3IP1 (Ycf3 Interacting Protein 1) が見出された。Y3IP1はタバコYcf3とプルダウンするタンパク質として既に報告されている⁴⁾。クラミドモナスではアフィニティー精製により高い純度の標品が得られ、Ycf3とY3IP1がほぼ当量存在することが明らかになった。しかし、PSIポリペプチドはほとんど検出されなかった。ところが、感度の高いウェスタン分析と質量分析を行うと、PSI反応中心サブユニット (PsaAとPsaB) が検出された⁷⁾。

全細胞タンパク質を放射性同位元素の³⁵Sの存在下で培養し短時間標識 (パルスラベル) した後、細胞を破碎し、チラコイド膜を精製し、それを界面活性剤で可溶化して、Ycf3-HAをアフィニティー精製した。するとかなり強くラベルされたPSI RCサブユニットが検出され、新規に合成されたPSI RCサブユニットがYcf3に特異的に結合していることが分かった。次に細胞を無標識の³²Sの存在下で移し、新規合成されたタンパク質を追跡 (チェイス) すると、Ycf3-HA標品のPSI RCサブユニットのラベルは大きく減少した。従って、Ycf3はY3IP1とモジュールを形成し、新規に合成されたPSI RCサブユニットを一過性

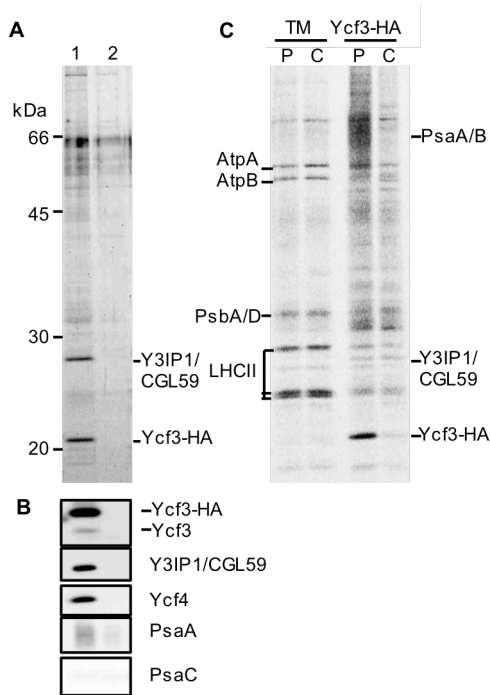


図 2. Ycf3-Y3IP1 モジュールは PSI RC の分子集合に必須である

A: アフィニティー精製した Ycf3-HA のタンパク質組成。1: Ycf3-HA を含むチラコイド膜を可溶化して精製した標品。2: 野生型のチラコイド膜を可溶化して精製した標品 (対照実験)。B: Ycf3-HA 精製標品のウェスタン分析。C: タンパク質のパルス・チェイス実験。全細胞タンパク質を ³⁵S でパルスラベルした後、チラコイド膜および Ycf3-HA を精製し、ラベルされたタンパク質を検出した (P)。同様にチェイスした後にチラコイド膜および Ycf3-HA を精製し、ラベルされたタンパク質を検出した (C)。

的に結合し、PSI RC の分子集合を介添えする因子であると結論した⁷⁾。

パルスラベルの実験から Ycf3-HA は速く合成されるが不安定で、Y3IP1 は遅く合成されるが安定であることも明らかになった。Ycf3 の代謝回転速度は Ycf3 に結合する反応中心サブユニットのそれとほぼ同じであったが、代謝回転が速いことの機能的な理由は不明である。Y3IP1 は膜貫通領域をもつタンパク質であるが、Y3IP1 欠損株でも Ycf3 はほぼ正常に蓄積し、Ycf3 のチラコイド膜への結合の安定性は正常であった。従って、Y3IP1 は Ycf3 のチラコイド膜への結合を安定化させるのではなく、代謝回転する Ycf3 がチラコ

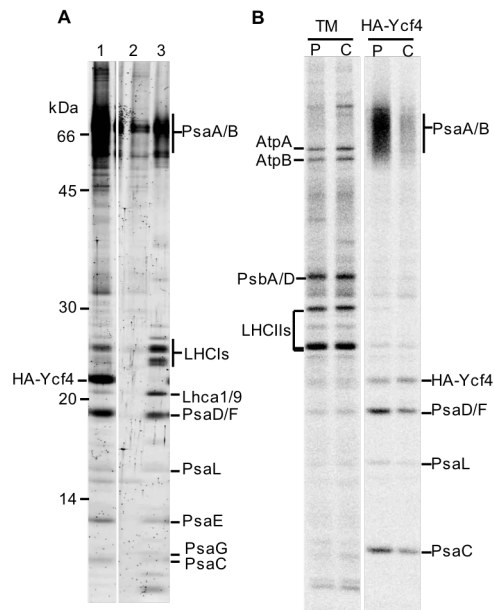


図 3. Ycf4 モジュールは PSI core と PSI-LHCI の分子集合に関与する

A: アフィニティー精製した HA-Ycf4 のタンパク質組成。1: HA-Ycf4 を含むチラコイド膜を可溶化して精製した標品。2: 野生型のチラコイド膜を可溶化して精製した標品 (対照実験)。3: 精製した PSI-LHCI 標品。PSI と LHCI のポリペプチドが検出される。B: タンパク質のパルス・チェイス実験。全細胞タンパク質を ³⁵S でパルスラベル (P) もしくはチェイス (C) した後、チラコイド膜 (TM) および HA-Ycf4 を精製し、ラベルされたタンパク質を検出した。

イド膜上の正しい位置に存在させる役割をもつのかもわからない。

6. Ycf4 モジュールは PSI コアと PSI-LHCI 複合体の分子集合に関与する

PSI RC の分子集合に引き続き周辺部のコアサブユニットが分子集合される。この過程に必要なのが Ycf4 であることが明らかになった。Ycf4 は N 末端付近に 2 つの膜貫通ヘリックスをもち、Ycf3 より安定にチラコイド膜に結合する。チラコイド膜を温和な条件で可溶化してショ糖密度勾配超速心法で Ycf4 を分離すると、見かけの質量が 1,000kDa 程度のかなり大きな構造を形成していることが分かった⁷⁾。そこで、葉緑体形質転

換法により Ycf4 の N 末端に HA タグを融合させた HA-Ycf4 を大量発現させ、可溶化したチラコイド膜から短時間にアフィニティー精製すると、PSI 複合体の分子集合中間体を結合した HA-Ycf4 標品が単離できた⁷⁾。そのポリペプチド組成を調べると、前述の Ycf3-HA 標品に比べて存在する PSI サブユニットの数がかかなり多かった(図 3)。このことは Ycf3-Y3IP1 モジュールによる反応中心複合体の分子集合に引き続く過程に Ycf4 モジュールが関与していることを示す。精製した HA-Ycf4 標品には多くの PSI コアサブユニットの他に LHCI サブユニットも存在した。ウェスタン分析で調べると、PsaG、PsaK、PsaN、PsaO 以外のコアサブユニットはすべて検出された。また、Lhca2 と Lhca9 以外の 7 種の LHCI サブユニットも検出された。従って Ycf4 モジュールは PSI core の分子集合だけでなく、PSI-LHCI の分子集合にまで関与していることが示された。パルス・チェイス実験は、PSI コアサブユニットが一過性的にラベルされることを示し、新規合成された PSI サブユニットが HA-Ycf4 へ結合していることが確かめられた。しかし、LHCI サブユニットはラ

ベルされなかった。

精製した HA-Ycf4 をショ糖密度勾配超遠心法にかけると、PSI core と PSI-LHCI に相当する画分に緑のバンドが分離された(図 4)。それぞれのポリペプチド組成を解析すると、PSI コアに相当するバンドは、PsaG、PsaK、PsaN、PsaO 以外のコアサブユニットはすべて検出された。一方、PSI-LHCI に相当する画分には上記の PSI コアサブユニットの他に Lhca2 と Lhca9 以外の 7 種の LHCI サブユニットが検出された。これらの結果は、HA-Ycf4 は PSI core と PSI-LHCI subcomplex に相当する分子集合中間体を結合していることを示している。PSI core のサブユニットはタンパク合成に伴いかなり短時間に複合体に組み込まれるが、チラコイド膜にプールされていた少量の LHCI サブユニットが PSI core に結合したと考えられる。PSI 欠損株のチラコイド膜にはオリゴマー状態の LHCI が安定に蓄積する¹⁴⁾。おそらく LHCI サブユニットの合成は PSI core サブユニットの合成と完全には共役しておらず、活発に光合成器官を合成している葉緑体では LHCI がわずかではあるがプールされていると考えられる。

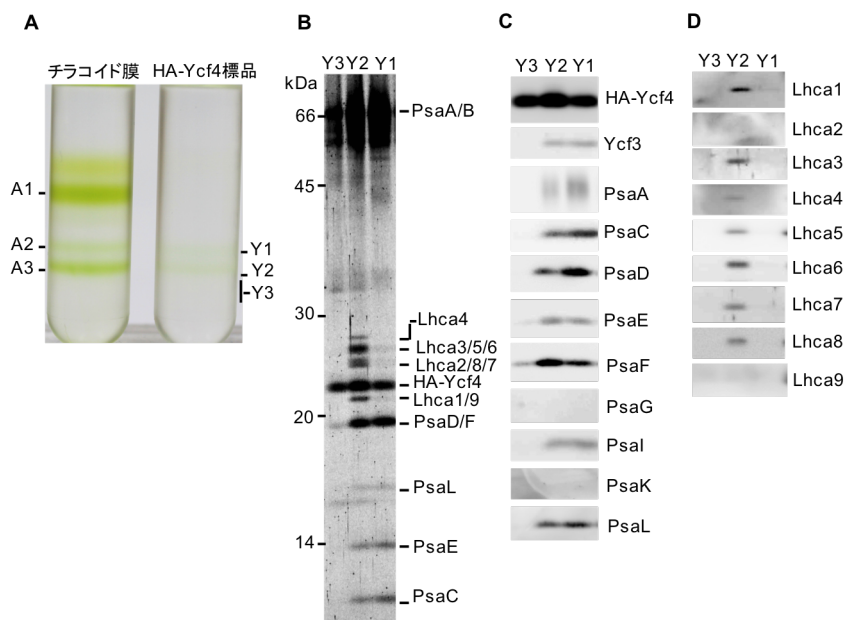


図 4. Ycf4 モジュールと結合する PSI 分子集合中間体

A: 精製した HA-Ycf4 標品から分離された PSI 分子集合中間体。Y1 と Y2 はクロロフィルとカロテノイドを含むが、Y3 は無色で HA-Ycf4 のみを含む。B: Y1-Y3 のポリペプチドを染色して検出。C: Y1-Y3 の PSI ポリペプチドをウェスタン分析により検出。D: Y1-Y3 の LHCI ポリペプチドをウェスタン分析により検出。

7. PSI 複合体の分子集合モデル

これまでに得られた分子集合の解析結果から、クラミドモナスの PSI 複合体の分子集合過程を図5にまとめた。反応中心サブユニット PsaA と PsaB は合成と同時に膜へ挿入され PSI RC を形成すると考えられる。Ycf3-Y3IP1 モジュールはこの PSI RC 分子集合に必須な役割を果たす。この過程において、反応中心のストロマ側では CGL71/Pyg7/Ycf37³⁾と PSA3¹²⁾が、ルーメン側では PPD1⁵⁾と PSA2^{2,15)}が必須ではないが重要な役割を果たしている。特に PYG7/CGL71/Ycf37 は好気条件下では重要であるため、酸素が阻害する分子集合過程に関わっているらしい。その過程として考えられるのは、電子受容体の鉄硫黄中心の組み込みである。F_Xは PsaA と PsaB に結合するが、F_Aと F_Bは PsaC に結合する。いずれも鉄硫黄中心は単離した PSI core 標品では安定であるが、サブ

ユニットを解離させると酸素に対して極めて不安定になる。従って、PYG7/CGL71/Ycf37 はオリゴマーを形成して、鉄硫黄中心の合成部位から酸素を除去する役割を果たしているのかもしれない。PSI RC の合成は疎水性が高い反応中心サブユニットを分子集合し、多数のコファクターを結合させるため、最も困難な分子集合段階であり、そのため多数の分子集合因子が関与していると考えられる。一方、PSI RC が合成されると、他の PSI サブユニットの分子集合は比較的容易であると推測されるが、この過程に重要な役割を果たすのが Ycf4 モジュールである。PSI サブユニットが PSI RC に正しく結合する過程を介添えし、さらに不安定な分子集合中間体をプロテアーゼなどによる分解から守っているのかもしれない。Ycf4 モジュールは LHCI の結合にも関与している。クラミドモナスの PSI-LHCI は LHCI を 10 サ

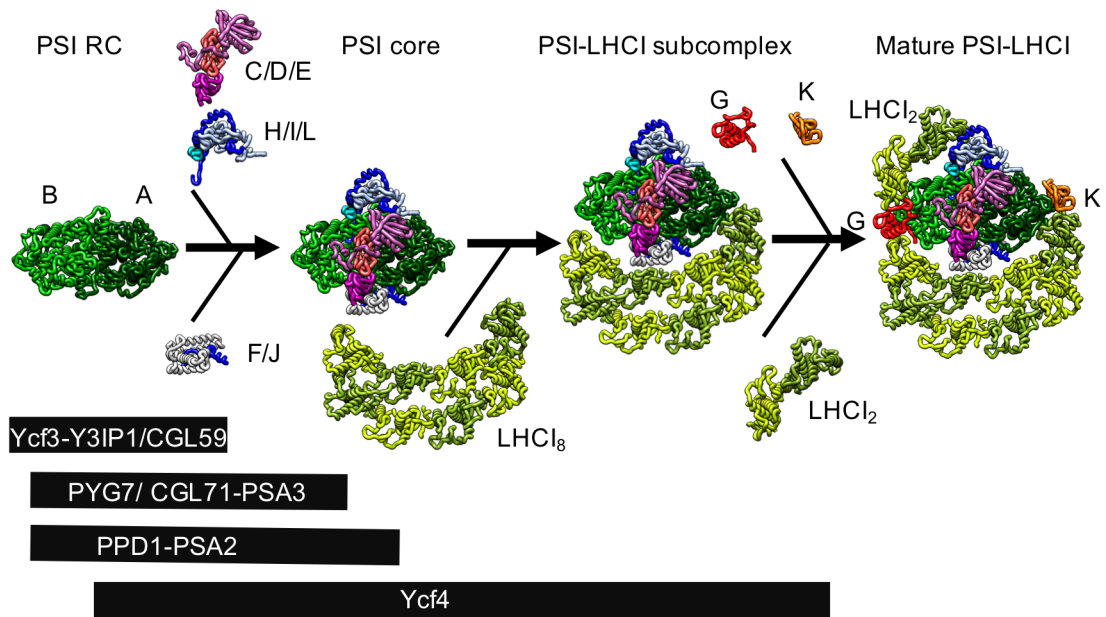


図5. クラミドモナスの PSI 複合体の段階的分子集合

2つの反応中心サブユニット PsaA と PsaB から反応中心複合体への分子集合に Ycf3-Y3IP1/CGL59 モジュールは必須の役割を果たす。この過程に PYG7/CGL71 と PSA3 がストロマ側から、PPD1 と PSA2 はルーメン側から関与すると考えられている。引き続き反応中心の周縁に存在する小型のサブユニットが分子集合し、PSI core が生成される。シアノバクテリアの PSI core 複合体は三量体を形成し分子集合過程は完了する。クラミドモナスでは、PSI core に LHCI₈ が PsaF 側に結合し、PSI-LHCI の中間体 (PSI-LHCI subcomplex) が形成される。その後、PsaG と PsaK がオリゴマー-LHCI の両端に、LHCI₂ が PsaH/PsaG/PsaB の近傍に結合し、PSI-LHCI の分子集合が完了する。PSI core から PSI-LHCI の分子集合過程には主に Ycf4 モジュールが関与する。

ブユニット結合する¹⁰⁾。PSI core の分子集合とは独立して LHCI の 8 量体である LHCI₈ を形成し、PSI core の PsaF/PsaJ 側に結合し PSI-LHCI subcomplex を形成する。少なくともこの分子集合段階まで Ycf4 モジュールが関与する。最後の分子集合過程は、LHCI₈ の結合を安定化する PsaG と PsaK と残りの 2 量体である LHCI₂ の結合である。この過程により PSI-LHCI が完成し、Ycf4 モジュールから解離する。PSI 複合体にはコファクターが多数存在するが、この分子集合過程のモデルにはコファクターの組み込みの分子機構は含まれていない。この過程の大部分は未解明のままであり、その解明は今後の研究の進展に期待したい。

Received Dec 11, 2018; Accepted Dec 13, 2018; Published Aug 31, 2018.

参考文献

- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M. and Rochaix, J.D. (1997) The chloroplast ycf3 and ycf4 open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J.* 16, 6095–6104.
- Fristedt, R., Williams-Carrier, R., Merchant, S.S. and Barkan, A. (2014) A thylakoid membrane protein harboring a DnaJ-type zinc finger domain is required for photosystem I accumulation in plants. *J. Biol. Chem.* 289, 30657–30667.
- Heinzel, M. *et al.* (2016) Tetratricopeptide repeat protein protects photosystem I from oxidative disruption during assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2774–2779.
- Krech, K. *et al.* (2012) The plastid genome-encoded Ycf4 protein functions as a nonessential assembly factor for photosystem I in higher plants. *Plant Physiol.* 159, 579–591.
- Liu, J. *et al.* (2012) PspP-domain protein1, a nuclear-encoded thylakoid lumenal protein, is essential for photosystem I assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4992–5006.
- Naver, H., Boudreau, E. and Rochaix, J.D. (2001) Functional studies of Ycf3: its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. *Plant Cell* 13, 2731–2745.
- Nellaepalli, S., Ozawal, S. I., Kuroda, H. and Takahashi, Y. (2018) The photosystem I assembly apparatus consisting of Ycf3-Y3IP1 and Ycf4 modules. *Nat. Commun.* 9
- Ozawa, S. *et al.* (2009) Biochemical and structural studies of the large Ycf4-photosystem I assembly complex of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 21, 2424–2442
- Ozawa, S., Onishi, T. and Takahashi, Y. (2010) Identification and characterization of an assembly intermediate subcomplex of photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 285, 20072–20079
- Ozawa, S. I. *et al.* (2018) Configuration of Ten Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex I Subunits in *Chlamydomonas reinhardtii* Photosystem I. *Plant Physiol.* 178, 583–595
- Ruf, S., Kossel, H. and Bock, R. (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J. Cell Biol.* 139, 95–102
- Shen, J., Williams-Carrier, R. and Barkan, A. (2017) PSA3, a Protein on the Stromal Face of the Thylakoid Membrane, Promotes Photosystem I Accumulation in Cooperation with the Assembly Factor PYG7. *Plant Physiol.* 174, 1850–1862.
- Stockel, J., Bennewitz, S., Hein, P. and Oelmüller, R. (2006) The evolutionarily conserved tetratricopeptide repeat protein pale yellow green7 is required for photosystem I accumulation in *Arabidopsis* and copurifies with the complex. *Plant Physiol.* 141, 870–878.
- Takahashi, Y., Yasui, T.A., Stauber, E.J. and Hippler, M. (2004) Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 43, 7816–7823.
- Wang, Y.W. *et al.* (2016) The DnaJ-Like Zinc Finger Domain Protein PSA2 Affects Light Acclimation and Chloroplast Development in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 7, 360.
- Wilde, A. *et al.* (1995) Inactivation of a *Synechocystis* sp strain PCC 6803 gene with homology to conserved chloroplast open reading frame 184 increases the photosystem II-to-photosystem I ratio. *Plant Cell* 7, 649–658.
- Wilde, A., Lunser, K., Ossenbühl, F., Nickelsen, J. and Borner, T. (2001) Characterization of the

- cyanobacterial *yef37*: mutation decreases the photosystem I content. *Biochem. J* 357, 211–216.
18. Wittenberg, G. *et al.* (2017) Identification and characterization of a stable intermediate in photosystem I assembly in tobacco. *Plant J.* 90, 478–490.
19. Wostrikoff, K., Girard-Bascou, J., Wollman, F.A. and Choquet, Y. (2004) Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 23, 2696–2705.

Recent Progress in the understanding of the molecular mechanism for the photosystem I complex assembly

Sreedhar Nellaepalli, Shin-ichiro Ozawa, and Yuichiro Takahashi*

Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

解説特集

光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新知見

Editor: 伊福 健太郎 (京都大学・生命科学研究科)

序文	伊福 健太郎 (京都大)	158
解説 極低温共焦点顕微鏡による光合成研究の新展開	柴田 穰 (東北大)	159
解説 植物における1細胞・組織レベルでの遺伝子発現解析 廣畑 敦洋 ¹ 、上本 恭平 ¹ 、遠藤 求 ^{2,*} (1京都大、2奈良先端大)		171
解説 ゲノミックセレクションおよびハイスループットフェノタイピングを用いた 作物育種の効率化・高速化	郭 威、岩田 洋佳 (東京大)	180

解説特集

序文[†][†]伊福 健太郎(京都大学・生命科学研究所)

いつの時代も新たな技術革新が科学に新しい知見と飛躍的な発展をもたらす。近年では、次世代シーケンサーを用いた超並列遺伝子配列解析が、様々な生物のゲノム情報や mRNA 発現情報の取得、変異遺伝子同定を可能とし、基礎研究のみならず、医学や農学といった応用に近い分野においても革新をもたらした。また、TALEN や CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発展は、ゲノム上での任意の遺伝子の改変を可能とし、現代生物学の様相と進歩のスピードを一変させている。さらにはクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による構造解析技術は、X 線結晶構造解析では困難なタンパク質複合体構造解明の可能性を大きく広げるとともに、構造解析そのものの敷居を下げると思われる。光合成研究の分野においても、そうした技術革新の恩恵は大きく、これまで本誌でも記事として紹介してきた。さらに今後の研究分野の発展のためには、我々、研究者は新しい技術革新への挑戦とともに、開発される新技術へのアンテナを常に張っておく必要がある。

そこで本特集記事では、「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新知見」と題して、様々な分野で活発に研究されている 3 グループに話題提供をお願いした。まず、東北大学の柴田穰博士には、ご自身で開発された極低温共焦点顕微鏡を用いた最新の成果をご紹介頂いた。そこでは、ステート遷移などのチラコイド膜タンパク質のダイナミクスを直接観察できる可能性のみならず、光合成膜タンパク質の単分子分光により、PSI 周辺のエネルギー移動のダイナミクス（揺らぎ）を議論できることが示された。また、奈良先端大の遠藤求博士のグループからは、組織・細胞レベルでの遺伝子発現解析の手法を概説頂いた。遠藤博士のグループは、独自に開発された迅速組織分離技術を用いて、これまでに植物の概日時計の組織特異性を明らかにされてきた。本記事では、柵状組織と海面状組織の光合成における機能分化など、光合成研究者に馴染みやすい話題から始まって、最新の 1 細胞トランスクリプトーム技術まで解説いただいた。そして最後に、東京大学の岩田洋佳博士のグループに、作物育種の高速化と効率化を可能とする 2 つの技術、ゲノミックセレクション (GS) とハイスループットフェノタイピング (HP) について、その仕組みと現状をご紹介頂いた。最新の育種技術の背景にある予測モデルの精密な理論に驚かされるとともに、GS における植物の環境応答のモデル化や HP における計測項目・測定技術などにおいては、光合成研究者とのコラボレーションの可能性を感じた。

以上、分子、細胞、組織、そして個体のレベルで、その特性を抽出し、現象の原因を理解するための新しい技術と、そこから得られる知見を紹介した。現段階では光合成研究との関係は明確でないものもあるかもしれないが、いずれも新しい潮流を生む可能性があると考えている。本特集記事がきっかけとなって、異分野間の交流や新しい分野への挑戦につながれば幸甚である。

最後に、本特集の編集にあたっては、お忙しい中、執筆者、査読者の方々に大変お世話になった。特に、遠藤グループ、岩田グループの著者の皆様には、異分野の雑誌からの突然の依頼にも関わらず、快く記事の執筆を引き受けて頂いた。この場を借りて、全ての皆様に深く御礼申し上げる。

[‡]解説特集「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新知見」[†]連絡先 E-mail: ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp

解説

極低温共焦点顕微鏡による光合成研究の新展開[†]

東北大学大学院 理学研究科

柴田 穰*

我々が開発してきた極低温共焦点顕微鏡により得られた最近の成果について報告する。80 Kでは光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII) の蛍光スペクトルが二つのピークに分離する。このことを利用して、クラミドモナスの光合成タンパク質各成分の細胞内分布を光学顕微鏡により可視化することに初めて成功した。ステート遷移前後における周辺アンテナが PSI、PSII のどちらと共局在するのかを検証した。また、PSI の蛍光収率が高くなる 80 Kにおいて、*Synechocystis* sp. PCC6803 から単離した単一の PSI 三量体からの蛍光スペクトルの時間変化を測定することに成功した。蛍光強度、ピーク位置の揺らぎが観測され、PSI のアンテナ系のダイナミックな側面を明らかにした。

1. はじめに：光合成分野における極低温での顕微鏡観察の有用性

本記事では、筆者らが開発を進めてきた極低温顕微鏡を利用して行ってきた光合成研究の最近の成果について紹介する。以前から、光学顕微鏡を用いた葉緑体内部のグラナ構造の観測^{1, 2)}や、環境変化に伴うグラナサイズの変化の観測^{3, 4)}などが報告されてきた。こうした知見は、チラコイド膜の構造自体が変動し、それに引きずられてチラコイド膜に埋め込まれたタンパク質超複合体の構造も再構築される、というダイナミックな描像の必要性を示唆している。こうした報告以前にも、例えばステート遷移においては、周辺アンテナ系である LHCII (Light-Harvesting Complex of Photosystem II) のチラコイド膜内の移動が想定されていたり、光阻害を受けた光化学系 II (PSII) はグラナマージンに運ばれて修復を受けると考えられていたり、チラコイド膜内部のタンパク質超複合体のダイナミックな存在様式は広く認識されてきた。しかし、“ダイナミックな存在様式”というものの実態はどのようなものか、と問

われた時、はっきりとした答がある訳ではないのが現状ではないだろうか。光学顕微鏡による観測は、チラコイド膜のダイナミクスを解明するための直感的情報を提供するものであり、上記の問題に対するヒントを提供すると期待される。

一方で、クロロフィルの自家蛍光を検出する蛍光顕微鏡の場合でも、光化学系 I (photosystem I:PSI) と PSII を区別してそれぞれの細胞内分布を可視化することは、いくつかのトリッキーな手法^{5, 6)}を用いなければ困難であった。室温では PSI の蛍光収率は非常に低く、また PSII のピークと分離していないことが困難の主要な原因である。我々が開発した極低温顕微鏡では、液体窒素などの冷媒を用いた冷却により 80 K 程度の温度での顕微鏡観察が可能である⁷⁾。よく知られるように、80 K では多くの光合成生物で PSI と PSII は明確に分離した蛍光スペクトルを示すことから、適当な分光装置があれば PSI と PSII を区別して観測することが可能となる。LHCII が PSI と PSII の間を往来していると考えられているステート遷移などの現象を解析する場合に、PSI と PSII のチラコイド膜内の局在を可視化できることは非常に有効となる。この記事では、筆者らが行ってき

[†]解説特集「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新発見」

*連絡先 E-mail: shibata@m.tohoku.ac.jp

たステート遷移における LHCII の細胞内分布の可視化の研究⁸⁾を紹介する。

もう一つの極低温顕微鏡の応用例として、光合成タンパク質を対象とした単一分子分光の研究^{7,9)}を紹介する。単一分子からの蛍光信号を検出することは、多数の分子からの信号を検出する場合に平均化により隠されてしまう分子毎のバラつきを観測することを可能にする。単一分子検出により得られるもう一つの重要な情報は、分子の時間に依存した揺らぎに関するものである。単一の光合成タンパク質複合体からの蛍光スペクトルの経時変化を追跡すると、室温でも極低温でも頻繁に揺らぎが観測されることが報告されている⁹⁻¹³⁾。揺らぎの検出は、光合成タンパク質のダイナミックな存在様式を明らかにすることに繋がる。

2. 極低温顕微鏡の開発

顕微鏡の空間分解能は、対物レンズの開口数 (Numerical Aperture: NA、図 1 参照) で決まる。横方向には波長の半分を NA で割った程度のサイズ、光軸方向には波長を NA の二乗で割った程度のサイズが、分解できるおよその限界となる。光学顕微鏡において高い NA を得るには、1) 対物レンズとサンプルとの距離を短くする、または 2) サンプルと対物レンズの間の空間を高い屈折率の物質 (油などの液体) で満たすことが必要となる。2) を実現するため、室温では屈折率の高い液体で対物レンズとサンプルの間の空間を満たす液浸レンズが採用されるが、極低温では今のところこの方式の報告はない。1) を実現する方法として、液体ヘリウムなどの冷媒のなかにサンプルと一緒に満たしてしまう方法がある。熔融石英は、熱膨張係数が非常に小さい物質であり、極低温にしても収縮や変形が起こらないため、極低温での使用に耐えるレンズを実現することができる¹⁴⁾。ちなみに、液体ヘリウムの屈折率は 1.025 程度で空気と大差なく、液浸対物レンズとしての効果はほとんど得られない。この方式の問題点は、色収差の補正が困難であることにある。屈折率の波長依存性から生じる色収差の補正を行うためには、複数のレンズを組み合わせた組立レンズを

用いることが有効となるが、複数レンズを固定する鏡筒の金属が極低温で歪んだり、レンズを鏡筒に固定する接着剤も極低温に耐えられなかったりするため、ハードルはかなり高い。1 枚の熔融石英製のレンズで色収差を抑える方式として、お椀型をした熔融石英の内部反射を利用した反射型のレンズが報告されている¹⁵⁾。この場合には、屈折による色収差がかなり抑えられており、有効性が示されている。

我々は、複数レンズからなる対物レンズを断熱真空槽に設置する方式を採用した顕微鏡を開発してきた⁷⁾。図 1 に開発した極低温顕微鏡の概略図および実際の装置写真を示す。サンプルホルダと対物レンズ間の空間は高真空に保たれるため熱伝導が抑えられ、対物レンズ自体は冷却されない。このため、色収差補正および像面湾曲収差補正が施された Plan Apo 型の対物レンズを採用することが可能となった。サンプル溶液は 2 枚の石英ガラスで挟まれた空間に密閉されるので、真空にさらされるわけではない。この方式の採用により、開発した当時には極低温顕微鏡として世界最高の NA0.9 を実現し、空間分解能として横方向約 350 nm、光軸方向約 1.2 μm を達成した。実際の対物レンズは、高真空中に置かれた際に内部に空気が残らないように、市販品 (M Plan Apo HR \times 100、NA0.9、Mitutoyo) に空気孔が開けられた特注のものを使用している。ボールねじ (BS) を回転させることで、対物レンズを固定する底板が上下に動いて焦点の粗調整を行う。伸縮可能なベローズにより高真空を保ったまま底板の上下動が可能となっている。サンプルホルダは熱膨張係数がほぼ 0 である石英製のステージに固定することで、温度変化によるドリフトを押さえている。サンプルホルダとクライオスタットのコールドヘッド (CH) は、熱伝導が高く柔軟性もある銅メッシュで繋いでいる。このことにより、直線導入機を介したサンプル位置の粗動が可能となっており、高い操作性を実現している。

底板中央の窓からレーザーが導入され、対物レンズによりサンプル上に集光される。ガルバノミラー対によりレーザー位置の走査を行う。サンプルからの蛍光は同じ対物レンズにより集められ

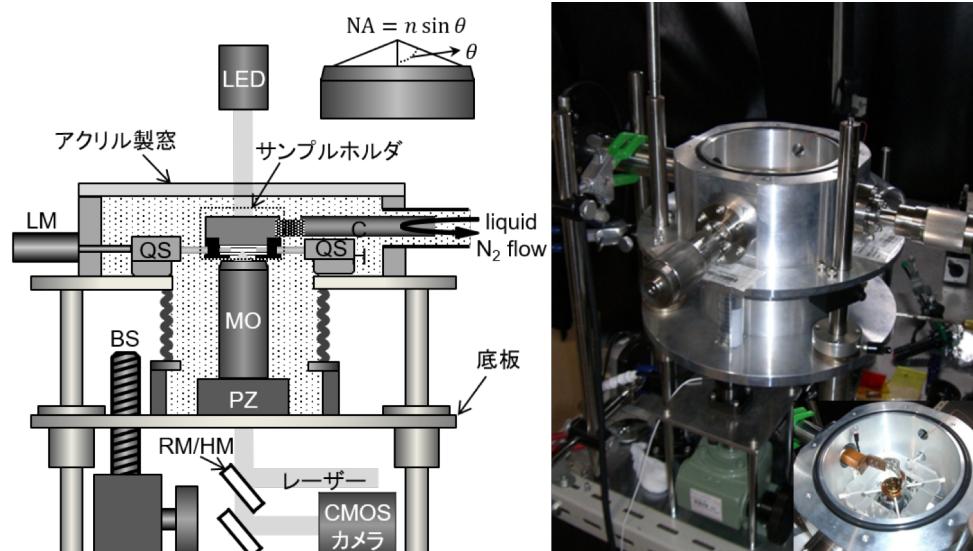


図1. 極低温顕微鏡の概略図（左）と実際の装置写真（右）

MO: 対物レンズ、PZ: ピエゾアクチュエータ、LM: 直線導入機、CH: クライオスタットコールドヘッド、QS: 熔融石英製サンプルステージ、BS: 焦点粗調整用ボールねじ、RM/HM: 反射鏡/半透過鏡。右の写真右下はサンプル室。左図は文献7より改変。

検出系に運ばれる。分光器に結合した CCD カメラにより蛍光スペクトルが取得される。分光器の入りがピンホールになっていることで、共焦点顕微鏡として作動する。また、サンプルの透過像は顕微鏡上部に設置した LED から光を用いて、CMOS カメラにより取得できるようになっている。

3. 細胞内光合成タンパク質の偏在を可視化

寒天培地で培養したクラミドモナス細胞をバッファ (pH 7.5、20 mM tricine、50 mM NaCl) に懸濁した後、極低温顕微鏡のサンプルホルダへセットした。この段階では、サンプル温度を 23°C に調整する。15 分の暗順応後に PSI 光 (710 nm、 $170 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を照射することで、ステート 1 へ誘導する。光照射開始後 15 分で冷却を開始する。ステート遷移誘導光の照射は、サンプル温度が 80 K に達するまでの約 30 分維持した。ステート 2 誘導の際には、PSII 光 (470 nm、 $120 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) を用いて同様の操作を行う。PSI 光、PSII 光は、図 1 の LED から光をバンドパスフィルタに通して得た。顕微鏡で測定された 80 K の細胞の蛍光スペクトルにはある程度のバラつきが見られたが、多数の細胞で平均すると

通常の蛍光光度計による測定とほぼ同じスペクトルが得られた⁸⁾。

図 2 に、80 K で観測されたクラミドモナス細胞の共焦点蛍光顕微鏡像を示す。励起波長は 445 nm である。各ピクセルで図 2 M、N に示したような蛍光スペクトルが取得される。我々は、全てのピクセルの蛍光スペクトルを 5 つのガウス関数の和でフィッティングした。フィッティングの第一段階では、10 個程度の細胞のスペクトルを全てうまく再現するような 5 つのガウス関数のパラメータを求める包括的 (global) フィッティングを行う。第一段階のフィッティングでは、各ガウス関数のピーク位置と幅は異なる細胞で同じ値を取るが、振幅は異なる、という束縛条件の下で行う。この第一段階の包括的フィッティングの結果、5 つのガウス成分のピーク位置と幅が求められる。図 2 M、N から分かるように、ステートにより若干ピーク波長に違いは見られたが、5 つの成分は短波長から順に 680 nm、686 nm、692 nm、712 nm、730 nm 付近にピークを持つ。最も短波長の 680 nm 成分 (緑に塗りつぶされたピーク) を、主に LHC からの蛍光と帰属した。686 nm、692 nm の 2 成分 (青に塗りつぶされたピーク) は、精製された PSII の 77 K 蛍光スペクトルとの

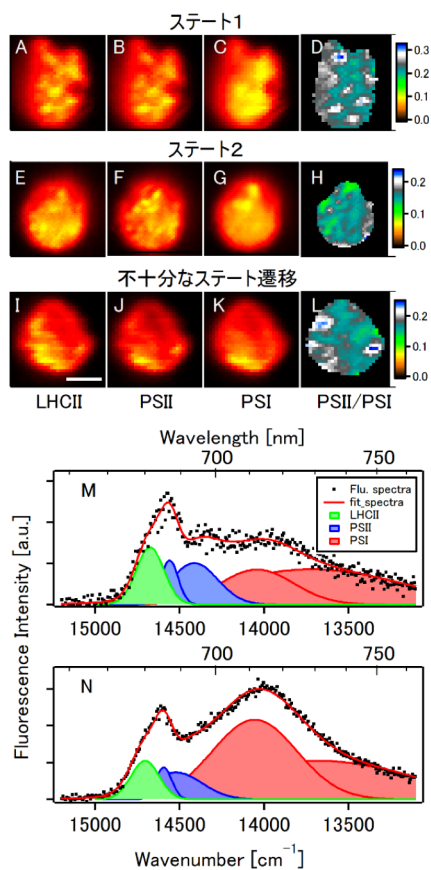


図2. ステート1 (A~D)、ステート2 (E~H)に誘導されたクラミドモナス細胞の80 Kにおける極低温顕微鏡画像

I~Lはステート遷移が十分に起こらなかった細胞の蛍光像。(A, E, I)、(B, F, J)、(C, G, K)、はそれぞれLHC、PSII、PSIに帰属された蛍光成分で再構成した像を示す。(D, H, L)、はPSIIの像をPSIの像で割って得られるRatio map。バーは2 μmを表す。M, Nは、A~DおよびE~Hに示した細胞のあるピクセルにおける蛍光スペクトル(点)と5つのガウス関数の和で与えられるフィッティング曲線(赤実線)。各ガウス成分を塗りつぶしたピークで示した。文献8より改変。

類似からPSIIの蛍光と帰属した。長波長の2つの成分(赤に塗りつぶされたピーク)をPSIと帰属した。第二段階では、決定されたガウス成分のピーク位置、幅を固定して、振幅のみをフリーパラメータとして全ピクセルのスペクトルのフィッティングを行う。こうして、LHC、PSII、PSIの3つの成分の蛍光強度mapが得られる。

図2 A~C、E~G、I~K、はこのようにして得られた各成分の蛍光強度の細胞内mapである。

最上段にステート1へ誘導された細胞、上から2段目にステート2へ誘導された細胞の像を示した。上から3段目には、ステート2へ誘導したがPSII蛍光強度の増強が他の細胞に比べて十分ではなかった細胞の像を示す。ここでは、このような細胞を「遷移不十分な細胞」と呼ぶことにする。多くの細胞を観察すると、一定の割合で遷移不十分な細胞が見られた。一番右のD、H、Lはそれぞれの細胞のPSII/PSI比率mapであり、PSII蛍光像をPSI蛍光像で割り算して得た。ステート1に誘導された細胞の例で顕著であるが、LHCおよびPSIIの蛍光像では細胞内に細かい粒子状の構造が見られる。これらの粒子状構造は、PSII超複合体が比較的多く存在するPSII-rich領域であると考えられる。このような微細構造が見られない細胞もあったが、我々の顕微鏡では光軸方向の空間分解能が低いことから、おそらく細胞の向きによっては微細構造が見えにくいという事情があると思われる。チラコイド膜内におけるPSIIとPSIの偏在は、PSII/PSI比率mapでより顕著に見られる。クラミドモナスでは、高等植物のようにPSIIが局在するグラナ構造が発達していないことが知られるが、これらの測定データが示すように、ある程度PSI、PSIIは異なる局在を示すようである。このように、開発した極低温顕微鏡が、クラミドモナスにおけるPSIとPSIIの偏在を可視化するのに十分な空間分解能を持つことが示された。このことは、以下の解析を進める上での前提となる。

ステート遷移においてどの程度LHCが両光化学系間を移動しているのかを明らかにするためには、ステート1、2それぞれに誘導した細胞で、LHCがPSI、PSIIとどの程度同じ場所に存在するか(共局在)を明らかにする必要がある。このことを定量的に評価するため、一つの細胞における各ピクセルでのLHC成分の相対強度を縦軸に、そのピクセルにおけるPSII/PSI値を横軸にした相関図を作成した(図3)。これらの相関図中の一つのデータ点は、その細胞の蛍光像のあるピクセルにおける値を表しており、右に位置するデータ点は比較的PSIIの多い細胞内の部位に、左に位置するデータ点はPSIの多い部位に相当する。

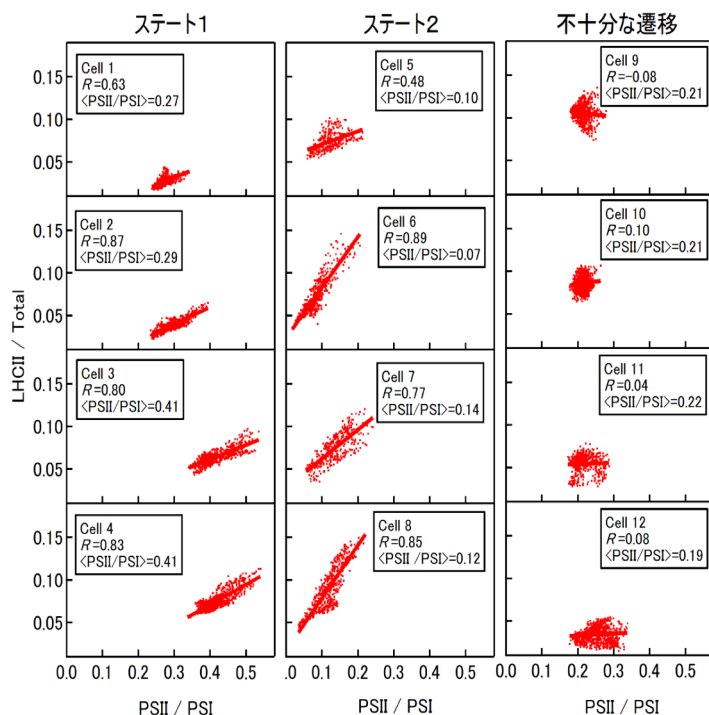


図3. 各ピクセルにおける LHC 蛍光の相対強度をそのピクセルにおける PSII/PSI 値に対してプロットした相関図

ステート1 (左) およびステート2 (中央) に誘導された細胞。右は遷移が不十分だった細胞。各グループ4つの細胞の結果を示した。文献8より改変。

図3の相関図で、右肩上がりのドット分布は PSII の多い部位で LHC 蛍光が強いことを示し、右下がりのドット分布は PSI 蛍光が強い部位で LHC 蛍光も強いという傾向を示唆する。単純に考えれば、ステート2で LHC の一部が PSI 側に移動するのであれば、相関図の傾きが小さくなる傾向が見られるはずだと予想した。

図3に示された相関図を見ると、ステート1誘導細胞では確かに右肩上がりの傾きを示す傾向が得られたが、ステート2誘導細胞においては上で述べた予想通りに傾きが小さくなるという傾向は見られなかった。一方で、PSII/PSI 比がステート1、2に誘導された細胞の値の中間程度の値を示す遷移不十分細胞において、相関図の傾きが有意に小さくなるという傾向が見られた。より定量的な評価をするため、図3の相関図においてピアソンの相関係数 R を計算した。 R は-1から1までの値を取るが、正の大きな R 値は相関図に示した変数の間に正の相関があることを示し、負の R 値は負の相関があることを示す。つまり、ある細胞の R 値が大きければ、その細胞は PSII-rich 領域で LHC 蛍光が強いという傾向を示したことになる。図4に、観測したすべての細胞の R 値を、その細胞の PSII/PSI 比 (細胞中の全

ピクセルで平均) に対してプロットした。図4では、右に位置するデータ点はステート1の細胞、左に位置するデータ点はステート2の細胞である。赤色の三角は710 nmの光を照射してステート1に誘導した細胞のデータであり、青色の丸は460 nmの光照射によりステート2へ誘導した細胞である。ステート遷移誘導をしたにも関わらず遷移が不十分であった遷移不十分細胞 (淡いデータ点) を一つのグループとし、それ以外の細胞をステート1へ誘導された細胞、ステート2へ誘導された細胞、のグループに分類した。ステート2グループで、ステート1グループと比較して R 値は若干小さくなっているが、大きな変動ではなかった。その一方で、遷移不十分グループの細胞では、 R 値が有意に小さくなった細胞がいくつか見られた。これらの結果を解釈するモデルを図4中に示している。

ステート1細胞で高い R 値が見られたのは、PSII と LHC の共局在によるものと解釈した (図4右上)。ステート2細胞では、PSI からの蛍光強度が強くなっているため LHC の一部は PSI と結合してエネルギーを供給しているはずである。にもかかわらずステート2細胞で高い R 値が見られたことを説明するため、PSII 周辺に PSII と

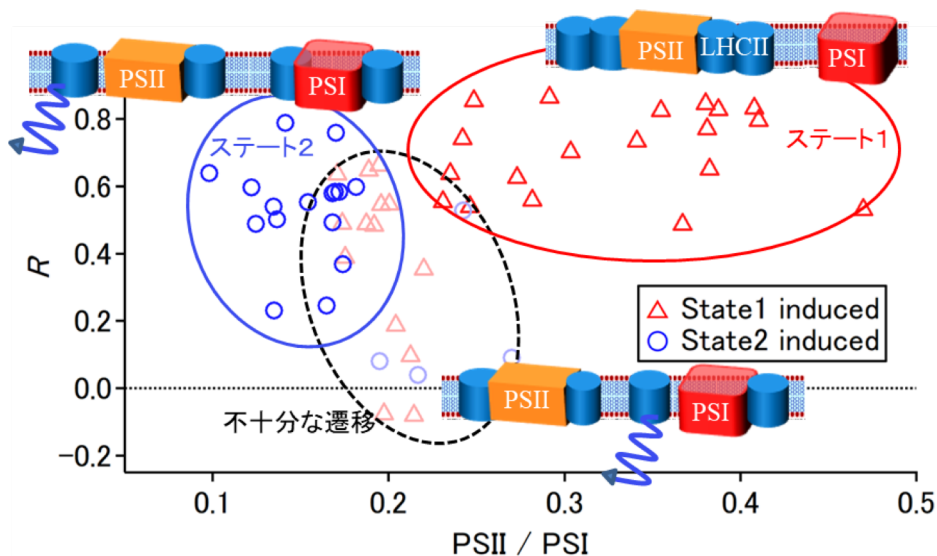


図 4. 各細胞の R 値をその細胞の $PSII/PSI$ の平均値に対してプロットした相関図

赤: ステート 1 に誘導した細胞、青: ステート 2 に誘導した細胞。 R 値および $PSII/PSI$ の平均値から、全細胞を 3 つのグループに仕分けした (赤、青、黒の楕円)。想定される各グループの LHC の状態を模式的に表した。

の結合が切れた free LHC が残っていると考えた (図 4 左上)。PSII 周辺の free LHC は、おそらく励起エネルギーを熱へと散逸する消光モードへと変化していると考えられるが、それでも PSII に結合していた場合よりも蛍光収率の高い (寿命の長い) 状態にあると考えられる。実際、若干寿命の延びた free LHC の存在は、いくつかの研究で報告されている^{16,17}。つまりステート 2 誘導細胞では、PSII-rich 領域に蛍光収率の高い free LHC が存在することで高い LHC 蛍光が見られていると考えられる。 R 値が有意に小さくなった遷移不十分細胞については、PSII へ移動した LHC がうまく PSI と結合できておらず free LHC として存在している場合や、本来なら PSII から離脱しているはずの LHC が PSII と結合したままになっている場合、などが考えられる (図 4 右下)。ここで説明したモデルを証明するためには、今後の検証が必要となる。

4. 今後の展望: 細胞内光合成の顕微分光解析

極低温光学顕微鏡の空間分解能で、クラミドモナス細胞内の PSII-rich、PSI-rich 領域を分解することが可能なことは示せた。今後は、特異値分解

や主成分分析などの解析法による、より精度の高いスペクトル成分分解を行うことも重要であろう。ガウス成分への分解から、LHC からの相対蛍光強度を見積もることも出来たが、LHC はその存在様式に依存して蛍光寿命が変化することが予想されることから、680 nm の蛍光強度の測定が必ずしも LHC の局所濃度を反映しているとは言えない。蛍光強度は分子の局所濃度×蛍光収率に比例するからである。今後は、各ピクセルでの蛍光スペクトルと同時に 680 nm の蛍光減衰曲線を測定することが重要な課題である。現在、150 fs 程度の時間幅をもつパルスレーザーで励起を行い、ビームスプリッターでサンプルからの蛍光の一部を蛍光寿命測定用の検出器へ導入することで、上記の実験を進めている。蛍光寿命測定を同時に行うことで、ステート 2 への遷移で PSII から分離した free LHC が存在するかが解明されると期待している。近いうちに結果を報告できるだろう。

空間分解能の改善は重要な今後の課題である。特に、光軸方向の空間分解能は現状では最高でも 1.2 μm 程度であり、チラコイド膜の微細構造を明らかにするには十分とは言えない。超解像顕微

鏡技術の 1 つである STED (Stimulated Emission Depletion) 法¹⁸⁾は、励起体積を小さくするためのドーナツ型をしたレーザー光を同時に照射することで回折限界を超える空間分解能を実現する。STED 技術により、光軸方向の空間分解能も 100 nm 程度にまで改善したとの報告もある¹⁸⁾。極低温顕微鏡に STED 技術を導入することには、技術的な困難はない。むしろ、室温での STED 顕微鏡で問題となる振動励起状態からの励起が極低温では抑えられることから、より高い STED 効果も期待できる。近い将来、我々の極低温顕微鏡に STED 技術を導入して空間分解能を改善することが期待される。

現状では、試料冷却に数 10 分かかっていることも、課題である。冷却に時間がかかれば、細胞内外の水は結晶の氷として凝結することになり、細胞へのダメージが心配される。幸い、現状でも通常の条件で観測されるステート遷移と同じ現象が極低温顕微鏡下でも実現できているため、結晶氷の生成は大きな問題にはなっていないようであるが、空間分解能を改善してより微細な構造を観測しようという場合には問題になる可能性もある。冷却を迅速に行うことで、結晶状の氷の生成を抑えてアモルファス状態の氷にすることで、細胞へのダメージを抑えることができるだろう。クライオ電子顕微鏡の測定では、非常に小さい容積のサンプル溶液を液体エタン中に浸漬することで迅速に冷却することを実現している¹⁹⁾。このような手法を我々の極低温顕微鏡技術に取り込むことで、結晶氷生成によるダメージを極力抑えた観測を実現することが重要である。

5. 光合成タンパク質の単一分子分光

2014 年のノーベル化学賞の対象にもなった単一分子計測の手法は、光合成タンパク質にも適用されてきた。一つだけのタンパク質からの蛍光スペクトルや励起スペクトルを測定することで、分子毎の違いや、スペクトル形状の時間的な揺らぎを観測できるようになる。鋭い偏光異方性が見られることも単一分子を検出するメリットの一つである^{10, 20-22)}。偏光異方性の測定から、複合体中の色素分子の配向を特定するなどの成果が挙

がっている^{21, 22)}。光合成タンパク質のダイナミク的な性質を解明することも、単一分子分光に期待される。X 線結晶構造解析から得られる構造を見ると、光合成タンパク質中で原子は密に充填されており、構造が揺らぐ余地はほとんどないように見える。それでも多くの光合成タンパク質で、単一分子分光によりスペクトルの形状や強度が時間とともに揺らぐことが見出されており⁹⁻¹³⁾、何らかの構造揺らぎが生じていることを示唆している。例えば PSI では、液体 He 温度にもかかわらず、水素結合を仲介するプロトンの動きが単一分子の蛍光スペクトルを変化させる¹¹⁾ことが報告されている。色素分子が高密度に配置されている光合成タンパク質では、色素周囲のタンパク質側鎖のわずかなコンフォメーション変化が、分子に吸収された光エネルギーのその後の運命を大きく変えるようである。こうしたことは、光合成光捕集系が常に高効率なエネルギー捕集を行っている訳ではなく、強光下では吸収した光エネルギーを熱に散逸させて電荷分離反応にブレーキをかける調節機能を持つ柔軟なシステムであることと関係しているのだろう。吸収した光エネルギーを熱散逸させるモードへの移行を可能にするためには、ある程度系に柔軟性が必要であると考えられ、その柔軟性が揺らぎとして観測されているのだろう。

光合成タンパク質のなかでも、LHCII や紅色細菌のアンテナ系である LH2 などのアンテナ系はある程度高い蛍光収率を示すため単一分子分光の対象として活発に研究されてきた。一方、PSII や PSI などの光化学系は、室温においては高い量子収率で光誘起電荷分離反応を起こすため、蛍光量子収率は低くなっている。そのため、これらの系における単一分子分光は、これまでのところ比較的蛍光収率が高くなる極低温に限られる。ここでは、我々が開発した極低温顕微鏡による PSI の単一分子分光の研究について報告する。

図 5 に、*Synechocystis* PCC6803 から精製した PSI 三量体溶液の濃度を段階的に希釈していったときに得られる蛍光像を示す。希釈を進めるとともに徐々に蛍光信号が希薄になり、70~7 pM では粒状の輝点として観測されるようになる。7

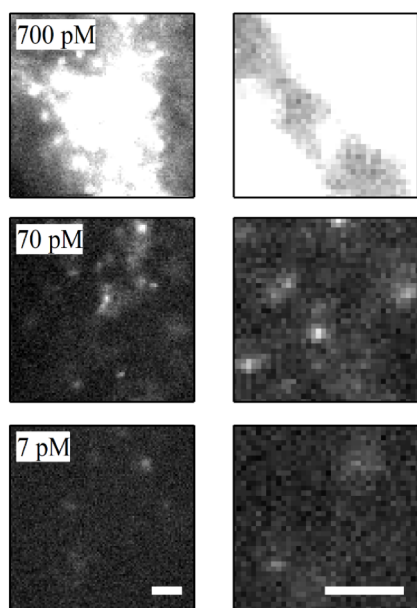


図5. 700 pM から 7 pM まで 3 段階に濃度を希釈した PSI 溶液の 80 K における蛍光顕微鏡像。バーは 5 μm を表す。文献 9 より改変。

pM という濃度では、分子の数密度は厚さ 1.5 μm 、10 μm 四方の体積に平均で 0.6 分子が見出される程度となる。厚さ 1.5 μm は顕微鏡の光軸方向の分解能に相当しており、この顕微鏡で 10 μm 四方の領域を走査すればおよそ 0.6 個の分子が見つかる、ということになる。図 5 の例では、およそこの見積りに従う粒子密度となっており、我々は図 5 で見られるような粒子状輝点を単一 PSI 三量体と考えている。

図 5 のような蛍光像を測定した後、レーザー位置を輝点の位置に固定することで、その分子からの蛍光スペクトルの経時変化を追跡することができる。図 6 は、3 つの分子で 220 秒間にわたって観測された蛍光スペクトルの時系列である。図 6 (A) に示した分子では、蛍光スペクトルのピーク位置は 720 nm 付近でほとんど動かず、蛍光強度もある程度一定であった。それに対し図 6 (B) に示した分子では、ピーク位置は一定であったが、強度は数秒ほどの時間スケールで小刻みに揺らいでいる (ブリンキング) のが見られる。図 6 (C) に示した分子では、強度の小刻みな変動と同時に

ピーク波長も揺れ動く (スペクトル拡散) のが見られた。このようなスペクトルの揺らぎが見られることから、我々の測定で単一の分子を見ることが間接的に示される。図 6 に示した 3 つの分子は、それぞれサンプル条件が異なっている。(A)、(B) はどちらも 80 K で測定したものであるが、(A) では P700 をあらかじめ中性状態にするためにアスコルビン酸ナトリウムを添加しており、(B) ではフェリシアン化カリウムを添加して P700 を酸化状態にしている。(C) も P700 酸化条件であるが、測定温度は (B) より若干高い 100 K である。我々の測定条件では、(C) のようなピーク波長の揺れは稀にしか観測されず、100 分子のうち数分子で見られたのみであった。(B) に見られるような強度揺らぎが最も典型的なスペクトルの経時変化であった。

さて、観測されたスペクトルの揺れをどのように解釈すればよいのか? PSI の反応中心である P700 は、中性状態であれば電荷分離反応を起こすことでアンテナクロロフィルの蛍光を消光する。よく知られることであるが、酸化状態の P700 (P700⁺) も中性状態に匹敵する効率でアンテナクロロフィルの励起状態を脱励起する^{23, 24)}。800 nm 付近に幅広い吸収ピークを持つ P700⁺へのフェルスター機構によるエネルギー移動とその後の基底状態への緩和が P700⁺による消光の機構であると考えられている^{25, 26)}。100 K 以下の温度で PSI の蛍光が強くなるのは、P700 よりも低い励起状態を持つ特有のクロロフィル (Red Chl) の存在による²⁷⁻²⁹⁾。図 6 (B) に見られるような蛍光強度の揺らぎ、ブリンキングは、PSI に結合するクロロフィルのどれかが吸収した光エネルギーが蛍光を出す Red Chl に渡る状態 (明状態) と、P700⁺に渡る状態 (暗状態) の間の遷移に対応している。何らかの構造変化により、エネルギー移動の経路が変化することで、Red Chl と P700⁺に渡るエネルギーの分岐比が変化することでブリンキングが起こると考えている。ここで、アスコルビン酸ナトリウム添加により P700 を中性にしているにもかかわらず、消光剤として P700⁺を想定しているのは、強い励起光による高頻度な励起により電荷分離反応を起こし

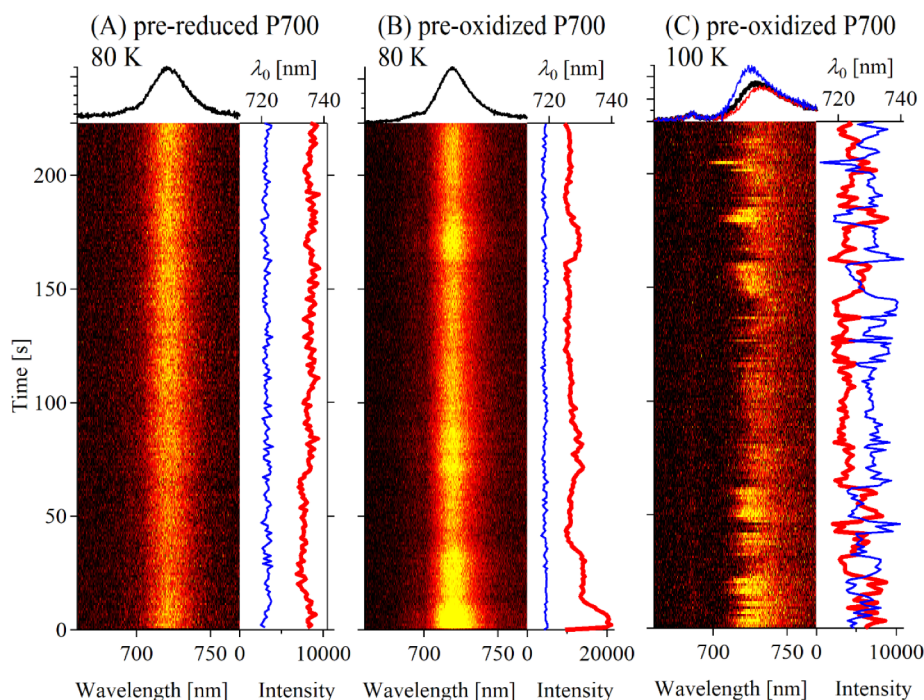


図6. 単一 PSI の蛍光スペクトルの時系列変動

還元型 P700 (A) および酸化型 P700 (B, C) を含む PSI サンプル。測定温度は (A, B) は 80 K、(C) は 100 K、励起波長 633 nm。文献9 より改変。

て平均としては $P700^+A_0^-$ (A_0 はフィロキノン) 状態が蓄積しているためである。

どのようなコンフォメーション変化により明状態と暗状態の間の遷移が起こるのか、現時点ではよく分かっていない。図6に示したが、フェリシアン化カリウムにより P700 をあらかじめ酸化している方が若干ブリンキングの程度(蛍光強度の揺らぎの標準偏差)が大きいことが分かっている。上述のように、強い励起光照射下では P700 中性サンプルでは $P700^+A_0^-$ 状態が蓄積している。一方 P700 酸化サンプルでは電荷分離反応は起こらないため A_0 は中性に保たれる。つまり、P700 中性サンプルと P700 酸化サンプルの違いは、フィロキノンの電荷にある。両条件でのブリンキングの程度が違うことから、フィロキノン周辺のクロロフィルの揺らぎがブリンキングに関与していると予想される。

6. 今後の展望：光合成系の単一分子分光

単一 PSI の蛍光スペクトルを測定してきたが、これは言わば光エネルギーの出口だけを見てい

たことになる。励起レーザーの波長をスキャンすることで励起スペクトルを測定することが可能となれば、光エネルギーの入り口となるアンテナクロロフィルの情報を得ることが可能となる。例えば、ブリンキングで明状態と暗状態の間の遷移があったときに、アンテナクロロフィルに変化があるのかないのか、など明らかにできるだろう。励起スペクトルの偏光異方性を測定すれば、色素分子の配向に関する情報も得られる可能性がある。励起スペクトル測定は現在進行中であり、近いうちに結果を報告できるようになる予定である。

単一分子の蛍光スペクトル、励起スペクトルを測定できる訳なので、もはやタンパク質を精製することなく、葉緑体に含まれる全光合成タンパク質を希釈して丸ごと測定する、というアプローチも将来的には有効な方向性であろうと考えている。PSI、PSII のスペクトルは既知であるので、例えばストレスに晒された試料で既知のスペクトルから外れる分子を探索することで、ごく少数

しか存在していない過渡的な超複合体を見出せるのではないだろうか。

7. おわりに

2010年頃から地道に開発を続けてきた極低温顕微鏡が、ようやく光合成研究に貢献できるようになってきた。ステート1、ステート2のクラミドモナス細胞内部の光合成タンパク質の各成分の分布を明らかにすることが出来た。LHCは、両光化学系の間を往復するだけでなく、一部はPSIIからは分離するがその周辺に漂い消光状態へと移行して光エネルギーのバランス制御に貢献していることを示唆する結果が得られた。今後、蛍光減衰曲線の同時測定や空間分解能の改善により、より詳細な細胞内局所における光合成機能解析の研究を推進できると期待している。PSIの単一分子の蛍光スペクトル測定からは、PSIアンテナ系のエネルギー移動経路がダイナミックに揺らいでいることを明らかにすることが出来た。今後、励起スペクトル測定や偏光異方性の測定を行うことで、複雑なアンテナ系のダイナミクスの理解が深まることを期待する。

謝辞

本研究の成果は、藤田祐輝君（東北大学）、Sankar Jana博士（現・St Andrews大学）の貢献に負うところが大きい。クラミドモナス細胞は、皆川純博士（基礎生物学研究所）、大西紀和博士（現・岡山大学）から譲り受けました。PSIサンプルは、長尾遼博士（現・岡山大学）、野口巧博士（名古屋大学）から頂きました。極低温顕微鏡の開発は、名古屋大学の加藤渉君、東北大学の浪江慶介君他、多くの学生、および両大学の金属工作室の職員の方々のご協力により実現できました。皆様にお礼申し上げます。本研究は、JSPS科研費（24370060、15H04356）および山田科学振興財団研究援助の助成を受け実施しました。

Received Nov 25, 2018; Accepted Dec 1, 2018; Published Dec 31, 2018.

参考文献

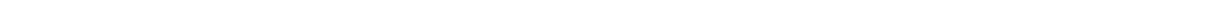
1. van Spronsen, E.A., Sarafis, V., Brakenhoff, G.J., van der Voort, H.T.M. and Nanninga, N. (1989). Three-dimensional structure of living chloroplasts as visualized by confocal scanning laser microscopy. *Protoplasma* 148, 8–14.
2. Hepler, P.K. and Gunning, B.E.S. (1998). Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma* 201, 121–157.
3. Herbstová, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M.V. and Kirchhoff, H. (2012). Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 20130–20135.
4. Kim, E., Ahn, T.K. and Kumazaki, S. (2015). Changes in antenna sizes of photosystems during state transitions in granal and stroma-exposed thylakoid membrane of intact chloroplasts in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Cell Physiol.* 56, 759–768.
5. Hasegawa, M., Shiina, T., Terazima, M. and Kumazaki, S. (2010). Selective excitation of photosystems in chloroplasts inside plant leaves observed by near-infrared laser-based fluorescence spectral microscopy. *Plant Cell Physiol.* 51, 225–238.
6. Iermak, I., Vink, J., Bader, A.N., Wientjes, E. and van Amerongen, H. (2016). Visualizing heterogeneity of photosynthetic properties of plant leaves with two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1857, 1473–1478.
7. Shibata, Y. et al. (2014). Development of a novel cryogenic microscope with numerical aperture of 0.9 and its application to photosynthesis research. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1837, 880–887.
8. Fujita, Y., Ito, W., Washiyama, K. and Shibata, Y. (2018). Imaging of intracellular rearrangement of photosynthetic proteins in *Chlamydomonas* cells upon state transition. *J. Photochem. Photobiol. B-Biology* 185, 111–116.
9. Jana, S., Du, T., Nagao, R., Noguchi, T. and Shibata, Y. (2018). Redox-state dependent blinking of single photosystem I trimers at around liquid-nitrogen temperature. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1860, 30–40.
10. van Oijen, A.M., Ketelaars, M., Köhler, J., Aartsma, T.J. and Schmidt, J. (1999). Unraveling the electronic

- structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes. *Science* 285, 400–402.
11. Brecht, M., Studier, H., Radics, V., Nieder, J.B. and Bittl, R. (2008). Spectral diffusion induced by proton dynamics in pigment-protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 17487–17493.
 12. Krüger, T.P.J., Wientjes, E., Croce, R. and van Grondelle, R. (2011). Conformational switching explains the intrinsic multifunctionality of plant light-harvesting complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13516–13521.
 13. Kondo, T., Pinnola, A., Chen, W.J., Dall'Osto, L., Bassi, R. and Schlau-Cohen, G.S. (2017). Single-molecule spectroscopy of LHCSR1 protein dynamics identifies two distinct states responsible for multi-timescale photosynthetic photoprotection. *Nature Chem.* 9, 772–778.
 14. Tamarat, P., Maali, A., Lounis, B. and Orrit, M. (2000). Ten years of single-molecule spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 104, 1–16.
 15. Fujiyoshi, S., Fujiwara, M. and Matsushita, M. (2008). Visible fluorescence spectroscopy of single proteins at liquid-helium temperature. *Phys. Rev. Lett.* 100
 16. Iwai, M., Yokono, M., Inada, N. and Minagawa, J. (2010). Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2337–2342.
 17. Włodarczyk, L.M., Snellenburg, J.J., Ihalainen, J.A., van Grondelle, R., van Stokkum, I.H.M. and Dekker, J.P. (2015). Functional Rearrangement of the Light-Harvesting Antenna upon State Transitions in a Green Alga. *Biophys. J.* 108, 261–271.
 18. Hell, S.W. (2003). Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology* 21, 1347–1355.
 19. Fernandez-Leiro, R. and Scheres, S.H.W. (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature* 537, 339–346.
 20. Hofmann, C., Ketelaars, M., Matsushita, M., Michel, H., Aartsma, T.J. and Köhler, J. (2003). Single-molecule study of the electronic couplings in a circular array of molecules: Light-harvesting-2 complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Phys. Rev. Lett.* 90
 21. Shibata, Y., Saga, Y., Tamiaki, H. and Itoh, S. (2007). Polarized fluorescence of aggregated bacteriochlorophyll *c* and baseplate bacteriochlorophyll *a* in single chlorosomes isolated from *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry* 46, 7062–7068.
 22. Skandary, S., Konrad, A., Hussels, M., Meixner, A.J. and Brecht, M. (2015). Orientations between red antenna states of Photosystem I monomers from *Thermosynechococcus elongatus* revealed by single-molecule spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 119, 13888–13896.
 23. Byrdin, M., Rimke, I., Schlodder, E., Stehlik, D. and Roelofs, T.A. (2000). Decay kinetics and quantum yields of fluorescence in photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the reduced and oxidized state: Are the kinetics of excited state decay trap-limited or transfer-limited? *Biophys. J.* 79, 992–1007.
 24. Shibata, Y., Yamagishi, A., Kawamoto, S., Noji, T. and Itoh, S. (2010). Kinetically distinct three red chlorophylls in Photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* revealed by femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy at 15 K. *J. Phys. Chem. B* 114, 2954–2963.
 25. Davis, M.S., Forman, A. and Fajer, J. (1979). Ligated chlorophyll cation radicals - their function in Photosystem-II of plant photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4170–4174.
 26. Schlodder, E., Çetin, M., Byrdin, M., Terekhova, I.V. and Karapetyan, N.V. (2005). P700(+)- and ³P700-induced quenching of the fluorescence at 760 nm in trimeric Photosystem I complexes from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1706, 53–67.
 27. Shubin, V.V., Murthy, S.D.S., Karapetyan, N.V. and Mohanty, P. (1991). Origin of the 77-K variable fluorescence at 758-Nm in the cyanobacterium *Spirulina-Platensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1060, 28–36.
 28. Karapetyan, N.V. (2008). Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters. *Photosynth. Res.* 97, 195–204.
 29. Schlodder, E., Hussels, M., Çetin, M., Karapetyan, N.V. and Brecht, M. (2011). Fluorescence of the various red antenna states in photosystem I complexes from cyanobacteria is affected differently by the redox state of P700. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1807, 1423–1431.

Development of Cryogenic Microscope and Its Application to Photosynthesis Research

Yutaka Shibata

Graduate School of Science, Tohoku University



解説

植物における1細胞・組織レベルでの遺伝子発現解析[‡]¹京都大学 生命科学研究所 統合生命科学専攻²奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域廣畑 敦洋¹、上本 恭平¹、遠藤 求^{2,*}

近年の技術進歩により、生物学における解析の時空間分解能は飛躍的に向上している。これまでは、植物個体全体や葉・根といった荒い解像度で成分分析や発現解析が行われることがほとんどであった。しかし、「個体や器官内には複数の細胞タイプが混在しており、こうした解析ではそれらの平均を見ているにすぎない」という批判は古くから存在していた。組織・細胞レベルでの解析技術はこうした問題を解決するための突破口となっており、多くの発見へとつながっている。本稿では、光合成研究への適用を念頭に、私たちが行っている柵状組織と海綿状組織の遺伝子発現を細胞タイプごとに計測するための簡易手法を含め、高い時空間分解能で遺伝子発現解析を実現する手法について概説する。

1. はじめに

植物の光合成を理解するため、器官レベルから分子レベルまで様々なアプローチによる研究がなされている。葉肉細胞は葉の表側に位置する柵状組織と裏側に位置する海綿状組織で大きく機能が異なっている。そのため、器官レベルでの理解と分子レベルでの理解をつなぐためには、組織・細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルの理解は不可欠である。近年の解析技術の進歩やコストの低下により、大量のトランスクリプトーム解析を行うことが可能となった。本稿では、こうしたメリットを享受し、柵状組織と海綿状組織の違いを生み出す分子メカニズムを明らかにするという仮想研究を念頭に、選択可能な技術のメリットやデメリットについて説明していく。

2. 光合成における柵状組織と海綿状組織

葉肉細胞は光合成を行う主たる細胞であり、多くの植物において葉肉細胞は大きく柵状組織と海綿状組織に分けることができる。柵状組織は縦

長の細胞が何層かに整列した構造を持ち、海綿状組織は丸い細胞が散在した空隙の大きい構造を持つ。特に木本植物では両組織の境界線がはっきりしており、顕微鏡下で明確に区別できる。

また、形態だけでなく光合成活性においてもこれら組織の違いは顕著である。柵状組織は光が入射する表側に位置し受光量が大きく光飽和しやすいため、光吸収のほとんどは柵状組織で行われている¹。柵状組織の葉肉細胞が入射方向に対して縦長であることは、強光条件において光が細胞膜を通過する回数を減らし、光飽和を回避する効果があると考えられている。逆に、海綿状組織の葉肉細胞は細胞壁を薄くすることで細胞に入る光の透過性を上げ、加えて、細胞表面で光を何回も乱反射させることで、柵状組織で吸収できなかった光を吸収可能にしている。さらに、植物は柵状組織と海綿状組織の割合そのものを変化させることで、葉器官レベルでの光吸収効率を変化させている。柵状組織の割合を増加させることで、植物は各細胞層での過度な光吸収を回避しながら最大光吸収量を高めることができるため、強光条件下では有利に働く。これに対して、海綿状組織の割合を増加させると、植物は海綿状組織内で

[‡]解説特集「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新発見」

*連絡先 E-mail: endo@bs.naist.jp



図 1. シロイヌナズナ葉原基から葉が発達時の由来を表したイラスト

(a)が移行期胚、(b)が子葉。シュート頂分裂組織 (SAM、橙色) に近い細胞群 (緑色) は葉の裏側に、遠い細胞群 (黄緑色) は葉の表側に対応している (3) を改変)。

の乱反射を通じて光を捕集できるので、弱光条件下では有利に働く。例えば、コナラなどの木本植物では、同一個体内に柵状組織が発達した陽葉と海綿状組織が発達した陰葉の両方を発達させ、光の強さに応じて適切な葉を作り分けている²⁾。柵状組織と海綿状組織の割合が後天的に調節されている事実は、これらの比率制御が植物の適応度を高める上で重要であることを強く示唆すると共に、なんらかの環境応答メカニズムが存在することを意味している。今後、光合成の最大化を目指した研究を実践していく上で、柵状組織と海綿状組織の比率制御は有望な標的になるだろう。

では、柵状組織と海綿状組織はいつどのように分化するのだろうか。これらの組織は葉原基の段階に生み出される葉の向背軸極性に従って配置されていることから、発生のかかなり早い段階で細胞運命が決まっていると考えられる。葉原基はシュート頂分裂組織 (SAM) に接しており、向背軸性は葉原基細胞の SAM との位置関係によって決まっている³⁾ (図 1)。この向背軸極性に関しては昔から研究が進められてきており、向軸側の誘導因子として転写因子 *HD-ZIP III* が、背軸側の誘導因子として *FILAMENTIOUS FLOWER (FIL)* や *KANADI* 遺伝子群が重要であることが明らかとなっている⁴⁻⁸⁾。しかし、向背軸極性が決定した後には分化する柵状組織・海綿状組織については、葉の柔組織内でどちらか一方が優勢になる変異体が発見されておらず、また成熟葉における柵状組織・海綿状組織特異的なマーカー遺伝子は見つかっていない。シロイヌナズナの本葉では、葉原基で発現していた *FIL* の発現がcausingして

海綿状組織で残っており、これが海綿状組織マーカーの代替として利用されているのみである。このように、葉の向背軸極性については理解が進んでいる一方で、その後の柵状組織・海綿状組織の分化については未だ不明な点が多い。すでに示したように、柵状組織と海綿状組織は形態や機能が大きく異なっていることから、それぞれ異なる遺伝子発現プロファイルを持つと考えられる。柵状組織と海綿状組織をそれぞれ区別して遺伝子発現解析を (比較的簡便に) 行うことができれば、これらの組織がどのように分化し、どのような役割分担を果たしているかなどの新たな知見が得られると期待される。

3. 組織・細胞レベルの分解能での解析

微小組織や 1 細胞レベルでの網羅的な遺伝子発現解析は柵状組織・海綿状組織に限らず、植物ではそれほど進んでいない。その理由として、微小組織・細胞の単離操作には手間がかかり、精度も高くないことが挙げられる。それでも最近では、さまざまな方法が開発されつつあり、今後はより利用しやすくなることが予想される。そこで、本稿の後半では組織および細胞単離の方法およびそれらの解析手法について光合成研究での利用を念頭にメリット・デメリットや特徴を紹介する。ここでは特に、近年目覚ましい発展を見せる 1 細胞タイプ・1 細胞トランスクリプトーム解析について取り上げる。これまで数多く行われてきた個体・組織レベルでのトランスクリプトーム解析から得られた描像は、複数種の細胞の平均的な発現レベルを見ているに過ぎない。実際、同じ組織

内の細胞であっても、細胞タイプごとに、あるいは細胞タイプが同じであっても受容する情報や組織内での位置情報の違いなどで、1細胞ごとに遺伝子発現プロファイルは異なる⁹⁻¹¹⁾。特に、これまで葉肉細胞として発現解析されることが多かった柵状組織と海綿状組織の機能の違いを理解する上で、1細胞タイプレベルあるいは1細胞レベルでの遺伝子発現解析を行うことは実りある成果を生むものと期待される。

3.1. 1細胞タイプ (Single cell type) の単離

特定の細胞タイプだけを扱うことができれば、遺伝子発現解析の空間解像度はかなり向上する。今回の例で言えば、柵状組織と海綿状組織のそれぞれを特異的に単離することが解析の第一歩となる。

フローサイトメトリーは光や蛍光色素などを利用してサンプル中に存在する細胞を1個ずつ、迅速かつ高感度に扱う技術である。細胞分取機能を備えたセルソーターでは、特定の細胞を単離することが可能である。最近では Ghost Cytometry や Intelligent Image-Activated Cell Sorting といったより高速で処理するための技術も登場しており^{12,13)}、大量の細胞の中からレアな細胞タイプを単離するとき力を発揮する。実際の使用例では、古典的には維管束節部伴細胞特異的なプロモーターの下で GFP を発現させた植物のプロトプラストから GFP 蛍光を有する細胞だけを単離するといった報告や、近年ではクラミドモナスの変異株プールからより高速に目的形質を持つ変異株をスクリーニングするなどがある^{14,15)}。しかし、この方法を行うためにはマーカーとなる遺伝子、または明確な形状の違いが必要となる。柵状組織と海綿状組織の単離はタバコ¹⁶⁾やチャ¹⁷⁾、ヒヤクニチソウ¹⁸⁾、ソラマメ¹⁹⁾などで成功している。これらの場合、柵状組織と海綿状組織由来のプロトプラストは形が異なっていることが成功の秘訣であり、シロイヌナズナ^{20,21)}などの場合は、両組織由来のプロトプラスト共に球形となりサイズもほぼ同じであるため、こうした方法で柵状組織と海綿状組織を見分けることは難しい(図2)。

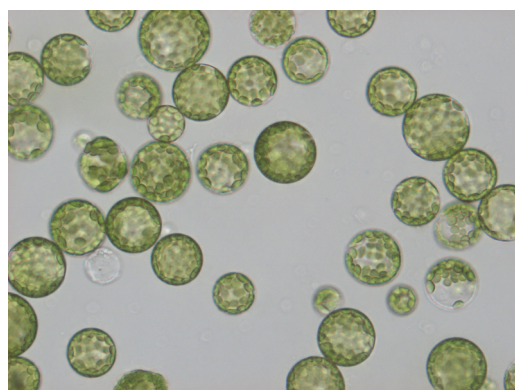


図2. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 葉肉のプロトプラスト

本文の記述のように維管束と表皮からは葉肉を分離できるが、プロトプラスト作製だけでは葉肉の各組織の細胞が混在する。

そこで、一步戻って、まずはシロイヌナズナの柵状組織と海綿状組織のマーカー遺伝子を決めることを考えてみよう。私たちは Tape-*Arabidopsis* サンドイッチ法²²⁾を改良し、柵状組織と海綿状組織を簡便かつそこそこの精度で単離する方法を開発した²³⁾。この方法では、葉の表裏をテープで挟み(サンドイッチし)、両側に剥がすだけで、柵状組織と海綿状組織の境界面で両側に分かれるため、短時間の酵素処理によって柵状組織と海綿状組織の両細胞を得ることができる。これは、柵状組織と海綿状組織間の接着力の弱さをベースとした技術であり、セントポーリア (*Saintpaulia*) で柵状組織(向軸側上皮を含む)を単離し、遠心法により葉緑体を分離した報告²⁴⁾をヒントに開発された。ただし、この方法は汎用性が低く用いる植物種ごとに開発が必要である点がネックとなっている。

もう少し汎用性をもたせるのであれば、レーザーマイクロダイセクション法 (Laser microdissection, LMD) は良い方法である。この方法では、顕微鏡下でサンプル断面を見ながらレーザーで組織を切断するため単離精度が高い点の特徴である。しかし、切片ごとに処理していくため、単離操作には長時間が必要である。さらに、サンプルの固定にはホルマリン固定や凍結など複数の方法が存在し、どの固定法を採用したかによってその後実施できる解析方法が決まってくる。

る。したがって、複数の種類の解析を行う場合には、解析ごとに固定法を変えた単離操作を行う必要がある。さらに、顕微鏡下であっても細胞タイプの境界面は明瞭でない場合や Z 軸方向の解像度の悪さから、コンタミのリスクがあること（特に小さい領域をくり抜きたい場合は無視できない割合になってしまう）にも注意が必要である。

3.2. 1細胞 (Single cell) の単離

コンタミしているかも知れない細胞群を扱うよりも、多少の不便さはあっても 1 細胞ごとに扱ったほうが楽である場合も多い。もちろん、細胞ごとに個性があることが想定される場合には 1 細胞解析を選択すべきである。1 細胞解析は流行りではあるが、1 細胞タイプでの解析でも十分である場合も多いので、どちらを選択するかは事前によく考えるべきである（図 3）。

1 細胞単離法の最も古典的なものとしては限界希釈法 (Limiting dilution) が挙げられる。この技術は非常に単純であり、細胞を含んだ液から計算上 1 cell / 1 well となるように希釈し、単一細胞を得るといったものである。簡便であるため、長い間、1 細胞単離技術の主流として用いられてきたが、信頼性と効率の低さが問題であった。

1 細胞単離方法として他には、マイクロ流体法

(Microfluidics)²⁵⁻²⁸⁾があり、現在の主流となっている。超微小な流路を使用して 1 細胞ずつ流路に流し込み適切な流量制御を行うことで、少ない初期サンプル量・低い解析コストを達成している。必要サンプル量はフローサイトメトリーに比べると少ないものの、それでも 1,000 細胞以上のサンプル量が推奨されているため、超微量サンプルの解析は困難である。また市販のものはほとんど動物細胞 (5-10 μm) を想定しているため、葉肉細胞のような大きい細胞 (50-100 μm) 使用するためには何かしらの工夫が必要な場合もある。植物での 1 細胞トランスクリプトームの実施例は現時点で 3 報しかなく、それらはいずれも根の細胞をプロトプラスト化して 1 細胞を単離したものであった^{29,30,31)}。しかし、プロトプラスト化は潜在的にストレス応答を誘導するだけでなく、プラズモデスマータなどによって構築されている微環境の喪失や単離に伴う時間変化による時間解像度の悪化などの問題点が存在するため、注意が必要である。また、細胞が大きいという問題点を克服するため、核を単離してトランスクリプトームを行うことも検討されている。RNA の大部分は細胞質に存在するが、核内の RNA プロファイルは細胞全体のプロファイルと概ね似ていることが報告されている^{32,33)}。

	限界希釈法	Microfluidics	Micromanipulation	1 cell-DGE
細胞単離法・RNA抽出法				
利点	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 非常に簡便 ✓ 低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 正確な 1 細胞単離が可能 ✓ 必要初期サンプル量が少ない (<100 cells) ✓ 単離時に前処理が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 非常に簡便 ✓ 顕微鏡下で行うため、高精度 ✓ 低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 非常に簡便 ✓ 顕微鏡下で行うため、高精度 ✓ 低コスト
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 正確性に欠ける ✓ 長い時間を要する ✓ 細胞へのダメージが大きい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 流路のスケールが固定 (細胞サイズごとに調整が必要) ✓ 低スループット ✓ 高コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 長い時間を要する ✓ 細胞へのダメージが大きい ✓ RNA純度が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 長い時間を要する ✓ 細胞へのダメージが大きい

図 3. 1 細胞 (Single cell) 単離技術のまとめ

キャピラリーを用いたマイクロマニピュレーション法 (Micromanipulation) は、限界希釈法と同じく簡便かつ古典的方法である。顕微鏡下でキャピラリーピペットを用いて 1 細胞を分取する。非常に多くの実績が報告されており、植物においても様々な種で用いられている³⁴⁻³⁶。植物細胞を用いた研究では多くの場合プロトプラスト化した細胞を吸っていたのに対して、いくつかの論文では細胞内容を直接吸っていた。そうした方法を進化させた論文が最近、ヒメツリガネゴケを用いて報告された³⁷。この方法 (1cell-DGE) では、顕微鏡下で細胞内に直接マイクロキャピラリーを刺し、内容を回収することで十分な精度の 1 細胞トランスクリプトームを実現している。植物細胞が大きい点や細胞壁同士で結着しているためガラスキャピラリーを挿入する際に細胞が動きにくいことなど、これまで植物細胞が持つデメリットと思われていた特徴を見事メリットに変えている点で非常に優れている。一方で、長い作業時間と低スループット性は依然として課題である。

3.3. 単離操作を介さない 1 細胞タイプ・1 細胞トランスクリプトーム解析

動物細胞と異なり、細胞が持つ特徴的な機能を保ったまま培養することができない植物細胞で

は、どうしても生体からの解析を行わざるを得ない。しかし、生体からの細胞単離は既に見てきたように非常に困難である。こうした問題を根本から解決するような細胞単離操作を伴わない手法もいくつか開発されている。

INTACT (Isolation of Nuclei Tagged in specific Cell Type)³⁸は、ビオチン認識配列を融合した GFP を核膜に局在させた形質転換植物を利用する。発現が確認された植物体は凍結・粉碎され、ストレプトアビジン-磁性ビーズを利用して標的にされた核だけを回収する。細胞タイプ特異的なプロモーターを利用することで、1 細胞タイプでの解析が可能となる。ただし、私たちの経験からすると真に細胞タイプ特異的なプロモーターはかなり少ない。組織特異的と言われていたプロモーターであったとしても、多くの場合 1:10 ~ 1:100 程度の S/N 比であるため、フローサイトメトリーを行う際と同様に注意が必要である。

生体内での 1 細胞解析には、Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) と呼ばれる方法も存在する³⁹ (図 4、5)。この単離技術で用いる TIVA tag は主にビオチン、蛍光分子 Cy-3 および Cy-5 (FRET に関わる)、光励起性結合タンパク質 (photocleavable linker, PL) から成る。細胞内に浸透させた TIVA tag 中の PL を UV レーザーで励起すると分子内の poly(A) が解離して poly(U) が露

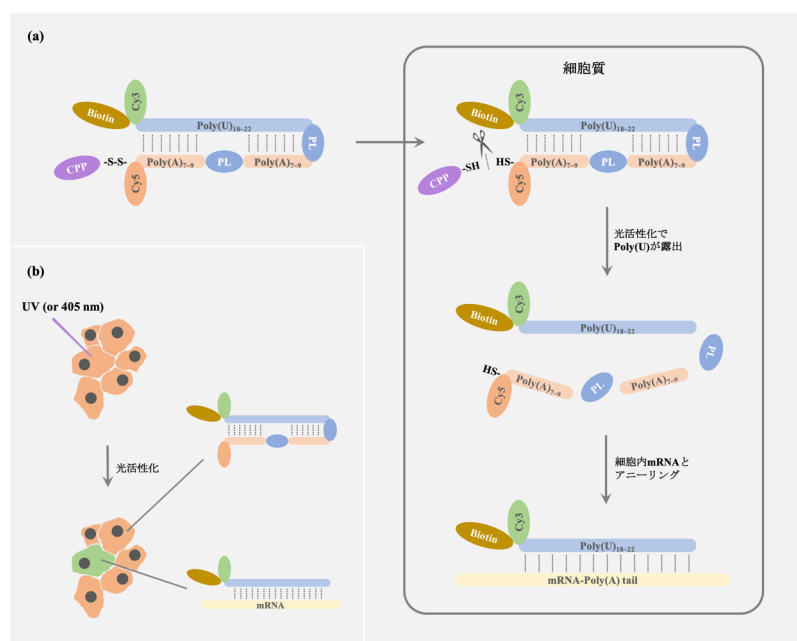


図 4. TIVA を用いた抽出法 (a) TIVA tag の構造。 (b) それを用いた 1 細胞 mRNA の抽出法。 UV または 405 nm のレーザー光を用いることで 1 細胞だけを狙って光活性化を行うことができる⁽³⁹⁾を改変)。

出すので、細胞内 mRNA の poly(A) tail と結合する。この mRNA はビオチンを用いて抽出する。TIVA は組織単離など行わないため、細胞を取り囲む環境変化の影響を抑えることが可能である。しかし、TIVA には問題点も多い。TIVA tag は分子内の細胞膜透過ペプチド (CPP) が細胞タイプ特異的に浸透することから、細胞選択的に TIVA tag を浸透させることができる。一方で、細胞特異的な CPP を合成する必要がある他、植物細胞を浸透する CPP の報告が少ない点は潜在的な課題である。さらには解析対象となる細胞は破壊されるため、1細胞レベルでの時系列解析は不可能であり、例えば光応答の詳細なメカニズム解析などにおいて欠点となりうるだろう。

厳密な意味ではオミクス解析には該当しないものの、十分な数の遺伝子発現を同時に見る方法としては *in situ* ハイブリダイゼーション法も有効である (図 5)。通常はリハイブリ (再解離) を行ってもせいぜい数遺伝子しか検出できないが、固定された細胞・組織で幅広い遺伝子プロファイルを作製する FISSEQ (Fluorescent *in situ* sequencing) はその限界を突破する^{40, 41)}。スライドガラスに準備した固定細胞・組織を *in situ* で逆転写を行い、次に RCA (Rolling circle amplification)

で増幅を行う。この増幅産物は架橋構造を持ち、その位置情報が保持される。したがって、SOLiD シーケンシング (フラグメントをビーズに結合させて増幅させる方法) で空間的な解析結果を得られる。ヒト線維芽細胞での実験では 4,000 以下の遺伝子を解析できており、スループット性は高い。*in situ* ハイブリダイゼーションには様々な応用があり、他にも single molecule fluorescence *in situ* hybridization (smFISH)がある⁴²⁾。FISSEQ と同様に固定したサンプルを準備して、GFP などの蛍光プローブで細胞内の mRNA を 1 分子ごとにカウントできる。定量的で空間的な解析結果をもたらすので、いわゆるトランスクリプトーム解析ではないが、こうした技術もまた有用であろう。

さらに最近では、HTC (Hydrogel-tissue chemistry) を取り入れた STARmap (Spatially-resolved transcript amplicon readout mapping) が報告されている⁴³⁾ (図 5)。3次元の空間情報を保ったまま、1細胞レベルでトランスクリプトーム解析を行うことができる技術として、マウス脳を用いた実験で報告された。この方法では標的とする 10~1,000 程度の遺伝子を組織内で増幅し、ハイドロゲルに架橋する。その後、増幅時に組み込んだバーコード配列を蛍光シーケンスとして読み

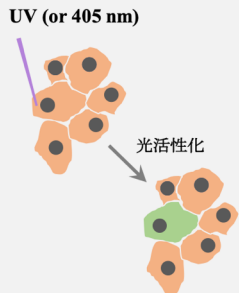
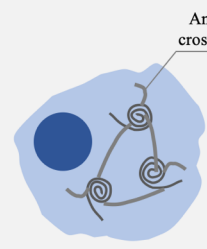
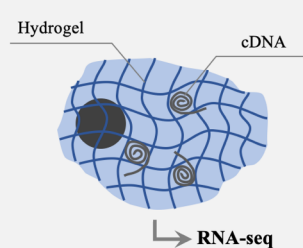
	TIVA	FISSEQ	STARmap
細胞単離法・RNA抽出法	 <p>UV (or 405 nm)</p> <p>光活性化</p>	 <p>Amplicon cross-linking</p>	 <p>Hydrogel</p> <p>cDNA</p> <p>RNA-seq</p>
利点	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 非常に簡便 ✓ 低コスト 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 空間情報を維持 ✓ 高スループット 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 空間情報を維持 ✓ 分解能が高い ✓ シーケンシングのバックグラウンド蛍光が低い
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 正確性に欠ける ✓ 長い時間を要する ✓ 細胞へのダメージが大きい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 固定操作が必要 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 遺伝子の塩基配列情報が必要 ✓ 低スループット

図 5. 単離操作を介さない 1細胞タイプ・1細胞トランスクリプトーム解析 (STARmap の図は⁴³⁾をもとに作成)

出すことで、バックグラウンドやシークエンス・エラーといった問題を回避している。ハイドロゲル内部は疎水性であることからプライマーや酵素を浸透させることが難しく、3次元の空間情報といってもサンプルの厚さは150 μm までである点がネックである。こうした点は吸水性ポリマーによる膨張顕微鏡法 (expansion microscopy)⁴⁴⁾との組み合わせによりハイドロゲルの網目を大きくすることなどは有望であろう。現在報告されている Iterative expansion microscopy は試料を4.5倍拡大できる膨張の操作を2回行い、最大で20倍に拡大できる。酵素類を浸透させた後にこの拡大操作を行えば、3次元空間情報を保持し、かつ、扱いやすいサンプルを手に入れることができると予想され、FISSEQと同様に有用となる可能性がある。

4. おわりに

ここで紹介してきたように、柵状組織や海綿状組織などの様に、存在が明らかであるにもかかわらず成り立ちが未解明である、といった問題は数多く存在する。しかし、近年の技術革新によって私たちはさまざまな技術を利用可能になっており、これらをうまく利用することで新たな視点から光合成研究を展開していくことができるだろう。

私たちも1細胞解析を中心とした概日時計の研究を進めてきており、概日時計が柵状組織や海綿状組織の発達に関わる可能性も明らかになりつつある。技術をハブとしてこれまで交わることの少なかった分野に交流が生まれ、より科学が進んでいくことを願っている。

Received Nov 29, 2018; Accepted Dec 5, 2018; Published Dec 31, 2018.

参考文献

1. Terashima, I. and Hikosaka, K. (1995) Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 18, 1111–1128.
2. Sinnott, E.W. (1960) *Plant Morphogenesis*. McGraw-Hill, New York.
3. Jenik, P.D. and Barton, M.K. (2005) Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development* 132, 3577–3585.
4. Tameshige T., Fujita H., Watanabe K., Toyokura K., Kondo M., Tatematsu K., Matsumoto N., Tsugeki R., Kawaguchi M., Nishikura M. and Okada K. (2013) Pattern dynamics in adaxial-abaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLoS Genet.* 9, 7.
5. La Rota, C., Chopard, J., Das, P., Paindavoine, S., Rozier, F., Farcot, E., Godin, C., Traas, J. and Monéger, F. (2011) A data-driven integrative model of sepal primordium polarity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 4318–4333.
6. Toyokura, K., Watanabe, K., Oiwa, A., Kusano, M., Tameshige, T., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Saito, K. and Okada, K. (2011) Succinic semialdehyde dehydrogenase is involved in the robust patterning of *Arabidopsis* leaves along the adaxial-abaxial axis. *Plant Cell Physiol.* 52, 1340–1353.
7. Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A. and Meyerowitz, E.M. (2015) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* 15, 1899–1911.
8. Gillmor, C.S., Park, M.Y., Smith, M.R., Pepitone, R., Kerstetter, R.A. and Poethig, R.S. (2010) The MED12-MED13 module of mediator regulates the timing of embryo patterning in *Arabidopsis*. *Development* 137, 113–122.
9. Li, L. and Clevers, H. (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542–545.
10. Huang, S. (2009) Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise. *Development* 136, 3853–3862.
11. Shalek, A. K., Satija, R., Shuga, J., Trombetta, J.J., Gennert, D., Lu, D., Chen, P., Gertner, R.S., Gaublot, J. T., Yosef, N., Schwartz, S., Fowler, B., Friedman, N., Hacohen, N., Park, H., May, A.P. and Regev, A. (2014) Single cell RNA Seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510, 363–369.
12. Ota, S., Horisaki, R., Kawamura, Y., Ugawa, M., Sato, I., Hashimoto, K., Kamesawa, R., Setoyama, K.,

- Yamaguchi, S., Fujiu, K., Waki, K. and Noji, H. (2018) Ghost cytometry. *Science* 360, 1246–1251.
13. Nitta, N., Sugimuram, T., Isozaki, A., Mikami, H., Hiraki, K., Sakuma, S., Iino, T., Arai, F., Endo, T., Fujiwaki, Y., Fukuzawa, H., Hase, M., Hayakawa, T., Hiramatsu, K., Hoshino, Y., Inaba, M., Ito, T., Karakawa, H., Kasai, Y., Koizumi, K., Lee, S., Lei, C., Li, M., Maeno, T., Matsusaka, S., Murakami, D., Nakagawa, A., Oguchi, Y., Oikawa, M., Ota, T., Shiba, K., Shintaku H, Shirasaki, Y., Suga, K., Suzuki, Y., Suzuki, N., Tanaka, Y., Tezuka, H., Toyokawa, C., Yalikun, Y., Yamada, M., Yamagishi, M., Yamano, T., Yasumoto, A., Yatomi, Y., Yazawa, M., Di Carlo, D., Hosokawa, Y., Uemura, S., Ozeki, Y. and Goda, K. (2018) Intelligent image-activated cell sorting. *Cell* 175, 266–276.
 14. Bargmann, B.O.R. and Birnbaum, K.D. (2010) Fluorescence activated cell sorting of plant protoplasts. *JoVE*. 36.
 15. Breker, M., Lieberman, K. and Cross, F.R. (2018) Comprehensive discovery of cell-cycle-essential pathways in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 30, 1178–1198.
 16. Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1968) Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* 9, 115–124.
 17. Kuboi T. and Terao R. (1993) Isolation of mesophyll cells, epidermis and vascular tissues from tea leaves. *Chagyo Kenkyu Hokoku* 78, 23–27.
 18. Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1983) Mechanical separation of palisade and spongy-parenchyma cells from the leaves of mesomorphic dicotyledons for photosynthetic studies. *Planta*, 157, 105–110.
 19. William, H.O., Jr., Cheri, L. Schmuck, and Tolbert, N.E. (1976) Photosynthetic carbon metabolism in the palisade parenchyma and spongy parenchyma of *Vicia faba L.* *Plant Physiol.* 58, 186–189.
 20. Yoo S.D., Cho Y.H. and Sheen J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.
 21. Endo, M., Shimizu, H. and Araki, T. (2016) Rapid and simple isolation of vascular, epidermal and mesophyll cells from plant leaf tissue. *Nat. Protoc.* 1388–1395.
 22. Wu, F.H., Shen, S.C., Lee, L. Y., Lee, S.H., Chan, M. T. and Lin, C.S. (2009) Tape-*Arabidopsis* sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* 5, 16.
 23. Uemoto, K., Araki, T. and Endo, M. (2018) Isolation of *Arabidopsis* palisade and spongy mesophyll cells. *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 1830, 141–148.
 24. Kadohama, K., Goh, T., Ohnishi, M., Fukaki, H., Mimura, T. and Suzuki, Y. (2013) Sudden collapse of vacuoles in *Saintpaulia* sp. palisade cells induced by a rapid temperature decrease. *PLoS One* 8, e57259.
 25. Whitesides, G.M. (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373.
 26. Marcus, J.S., Anderson, W.F. and Quake, S.R. (2006) Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Anal. Chem.* 78, 3084–3089.
 27. Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2001) Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys. Rev. Lett.* 86, 4163–4166.
 28. Utada, A.S., Lorenceau, E., Link, D.R., Kaplan, P.D., Stone, H.A. and Weitz, D.A. (2005) Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science* 308, 537–541.
 29. Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P.L., Rahni, R., DelRose, N., Powers, A., Satija, R. and Birnbaum, K.D. (2016) Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* 165, 1721–1733.
 30. Shulse, C.N., Cole, B.J., Turco, G.M., Zhu, Y, Brady, S.M. and Dickel, D.E. (2018) High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types. *bioRxiv.*
 31. Efroni, I., Ip, P.L., Nawy, T., Mello, A. and Birnbaum, K.D. (2015) Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol.* 16, 9.
 32. Barthelson, R., Lambert, G., Vanier, C., Lynch, R. and Galbraith, D. (2007) Comparison of the contributions of the nuclear and cytoplasmic compartments to global gene expression in human cells. *BMC Genomics* 8, 340.
 33. Slane, D, Kong, J, Schmid, M, Jürgens, G and Bayer, M (2015) Profiling of embryonic nuclear vs. cellular RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Genom. Data* 4, 96–98.
 34. Brehm-Stecher, B.F. and Johnson, E.A. (2004) Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 538–559.

35. Guo, F., Li, L., Li, J., Wu, X., Hu, B., Zhu, P., Wen, L. and Tang, F. (2017) Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Res.* 27, 967–988.
36. Blewett, J., Burrows, K. and Thomas, C. (2000) A micromanipulation method to measure the mechanical properties of single tomato suspension cells. *Biotech. Lett.* 22, 1877–1883.
37. Kubo, M., Nishiyama, T., Tamada, Y., Sano, R., Ishikawa, M., Murata, T., Imai, A., Lang, D., Demura, T., Reski, R. and Hasebe, M. (2018) Single-cell transcriptome analysis of *Physcomitrella* leaf cells during reprogramming using microcapillary manipulation. *BioRxiv.*
38. Deal, R.B. and Henikoff, S. (2011) The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* 6, 56–68.
39. Lovatt, D., Ruble, B.K., Lee, J., Dueck, H., Kim, T. K., Fisher, S., Francis, C., Spaethling, J.M., Wolf, J.A., Grady, M.S., Ulyanova, A.V., Yeldell, S.B., Gripenburg, J.C., Buckley, P.T., Kim, J., Sul, J.Y., Dmochowski, I.J. and Eberwine, J. (2014) Transcriptome In Vivo Analysis (TIVA) of spatially defined single cells in intact live mouse and human brain tissue. *Nat. Methods.* 11, 190–196.
40. Lee, H.L., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Ferrante, T.C., Terry, R., Turczyk, B.M., Yang, J.L., Lee, H.S., Aach, J., Zhang, K. and Church, G.M. (2014) Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat. Prot.* 3, 442–458.
41. Ginart, P. and Raj, A. (2014) RNA sequencing *in situ*. *Nat. Biotech.* 6, 543–544.
42. Yang, L., Titlow, J., Ennis, D., Smith, C., Mitchell, J., Young, F.L., Waddell, S., Ish-horowicz, D. and Davis, I. (2017) Single molecule fluorescence in situ hybridisation for quantitating post-transcriptional regulation in *Drosophila* brains. *Methods* 126, 166–176.
43. Wang, X., Allen, W.E., Wright, M.A., Sylwestrak, E.L., Samusik, N., Vesuna, S., Evans, K., Liu, C., Ramakrishnan, C., Liu, J., Nolan, G.P., Bava, F.A. and Deisseroth, K. (2018) Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* aat5691.
44. Chang, J.B., Chen, F., Yoon, Y.G., Jung, E.E., Babcock, H., Kang, J.S., Asano, S., Suk, H.J. Pak, N., Tillberg, P. W., Wassie, A., Cai, D. and Boyden, E.S. (2017) Iterative expansion microscopy. *Nat. Methods* 14, 593–603.

Gene expression analysis for single cell or single cell-type in plants

Atsuhiko Hirohata¹, Kyohei Uemoto¹, Motomu Endo^{2,*}

¹Graduate School of Biostudies, Kyoto University, ²Graduate School of Bioscience, Nara Institute of Science and

Technology

解説

ゲノミックセレクションおよびハイスループットフェノタイピングを用いた作物育種の効率化・高速化[†]

東京大学 大学院農学生命科学研究科

郭 威、岩田 洋佳*

今後深刻化が進む食料問題に対応するためには、作物育種の高速化・効率化が不可欠となる。本稿では、育種の高速化・効率化につながると期待される2つの技術—ゲノミックセレクションとハイスループットフェノタイピング—についてその仕組みや現状について紹介する。前者はゲノムワイドマーカーを用いて個体・系統の遺伝的能力を予測して選抜する手法であり、後者は画像解析などを用いて個体・系統の表現型を高効率に計測するための手法である。いずれも、目的形質の間接的な選抜として捉えることができ、ある条件のもとで直接的な選抜に比べて速度・効率を向上させることができる。今後、これら2つの技術を融合することで、育種の高速化・効率化をより高いレベルで実現できると考えられる。

1. はじめに

世界人口は2050年には97億人を超えると試算¹⁾されており、食料問題は今後ますます深刻化すると考えられる。こうした人口増を支えるには、トウモロコシ、イネ、コムギなどの主要穀物では、2050年までにおよそ70%の収量増を達成する必要がある²⁾。また、食習慣の変化により、肉や乳製品の消費が、特に発展途上国では増えると試算されており³⁾、飼料作物の増産も今後必要となる。また、世界で20億人以上が「隠れた飢餓」(hidden hunger)とよばれる微量栄養素不足に苦しめられており、カロリー源としての食料を確保するだけでなく、食料の栄養価を高めることも重要である⁴⁾。こうした問題を解決するためには、様々な側面からの取り組みが必要となるが、その中でも重要なものの一つは、作物の遺伝的能力の改良、すなわち、育種である。

作物の育種には、通常、非常に長い年月を要する。交雑育種では、交配後代の中から優秀な遺伝子型が選抜されるが、選抜を行うには後代の個体

や系統の遺伝的能力の評価を行う必要がある。遺伝的能力の評価は、主に、栽培試験を通して得られる表現型値をもとに行われる。表現型値は、遺伝的要因だけでなく、環境要因によっても変動するため、複数年度・複数試験地での栽培試験をもとに優秀な遺伝子型が選抜される。この複数年度・複数試験地での栽培試験の過程が多大な時間と労力を必要とする。逆にいうと、この過程を短縮・省略、あるいは、効率化することができれば、作物育種の効率を大幅に向上させることができる。上述したように、食料を取り巻く問題は年々深刻化が進んでおり、作物育種の効率化・高速化は危急の課題となっている。

本解説記事では、育種の効率化・高速化につながると期待されている2つの手法について紹介する。一つはゲノミックセレクション (genomic selection) とよばれる選抜手法⁵⁻⁸⁾であり、もう一つはハイスループットフェノタイピング (high-throughput phenotyping: HTP) とよばれる計測手法^{9,10)}である。前者は、ゲノムワイドに高密度に分布するDNA多型をマーカーとして用い、ゲノムワイドマーカー遺伝子型をもとに遺伝的能力を予測して選抜する手法である。ゲノムワイド

[†]解説特集「光合成研究に新しい潮流をもたらす新技術・新発見」

*連絡先 E-mail: aiwata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ドマーカーの多型を調べることで優秀な遺伝子型の選抜ができるため、栽培試験を用いた遺伝的能力の評価を大幅に短縮あるいは省略することができる。後者は、カメラやセンサーで収集されるデータを解析することで、高効率に植物を計測する手法である。屋外の圃場で栽培されている植物を計測するための手法を特にフィールドベース (field-based) HTP とよぶ。フィールドベース HTP では、無人航空機 (Unmanned Aerial Vehicle: UAV、通称ドローン)、ガントリー、トラクターなどに搭載されたカメラやセンサーを用いて、屋外の圃場で栽培されている多数の植物を高効率に計測する。フィールドベース HTP を用いることで、栽培試験における表現型計測を大幅に効率化できるだけでなく、これまで計測が難しかった形質の評価が可能になる場合もある。これら 2 つの手法は、そのそれぞれが育種の効率化・高速化に貢献すると考えられるが、両手法を合わせて使うことにより、育種のより一層の効率化・高速化が可能になる。

2. ゲノミックセレクション

2.1. ゲノミックセレクションの原理

ゲノミックセレクションでは、ゲノムワイドマーカーの遺伝子型に基づいて予測を行う^{6,8)}。その予測を可能にしているのが、連鎖不平衡 (linkage disequilibrium, LD) とよばれる現象である。ゲノム上に互いに近接している DNA 多型は、それらの間で組換えが生じにくいために、DNA 多型間に非独立性が生じる場合がある。このように DNA 多型間に非独立性がみられる状態を連鎖不平衡という。ゲノムワイドに高密度に分布する DNA 多型をマーカーとして用いれば、一部のマーカーが対象形質を支配する遺伝子と連鎖不平衡になり、遺伝子の状態をマーカーを通して間接的にとらえることができる。ゲノミックセレクションでは、この仕組みを用いて、ゲノムワイドに高密度に配置されたマーカーを用いて、ゲノム上に散在する遺伝子の状態をとらえ、それらが支配する形質の予測をおこなう。なお、ゲノミックセレクションでは、形質との関連の強い一部のマーカーだけを利用することをせず、全てのマ-

ーカーを予測・選抜に用いる。この点が、QTL と連鎖する少数のマーカーのみを用いる従来のマーカー利用選抜 (marker assisted selection, MAS) と異なる。ゲノミックセレクションでは、全てのマーカーを予測・選抜に用いることで、QTL 解析やゲノムワイドアソシエーション研究 (genome-wide association study, GWAS) などでは検出されない効果の小さな多数の遺伝子の集積を目指す¹¹⁻¹³⁾。

2.2. ゲノミックセレクションの流れ

ゲノミックセレクションでは、選抜を行う前にあらかじめ予測モデルを作成しておく必要がある⁶⁾。予測モデルを作成するためには、まず、育種集団や遺伝資源などを材料として用いて、多数の個体や系統のゲノムワイドマーカー遺伝子型データと改良対象とする形質の表現型データを収集する。次に、このデータを用いて、ゲノミック予測モデル (genomic prediction model) を作成する。ゲノミックセレクションにおける選抜は、以下のように行われる。まず、選抜しようとする個体や系統について、ゲノムワイドマーカー遺伝子型を調べる。次に、作成しておいた予測モデルを当てはめて、その個体や系統の遺伝子型値を予測する。複数の形質が選抜の対象である場合は、それら全形質について遺伝子型値を予測する。そして、予測された遺伝子型値に基づいて優良な個体や系統を選抜する。選抜された個体や系統は、次世代の育種集団の親として用いられ、選抜と交配が繰り返される。なお、選抜と交配が繰り返されることにより、連鎖不平衡のパターンが変化するため、予測モデルの精度が低下していく¹⁴⁾。ゲノミックセレクションの精度を保つためには、予測モデルを定期的に更新する必要がある。予測モデルの更新のためには、表現型データの計測・収集が必要となる。したがって、ゲノミックセレクションの導入により、表現型データの計測・収集の必要がなくなるわけではない。ゲノミックセレクションでは、選抜と形質評価の過程が切り離されることにより、選抜・交配のサイクルが高速化される。なお、上述した手順はゲノミックセレクションを用いた育種過程の一例であり、今後、さ

まざまなかたちでの利用が考案されると思われる。

2.3. ゲノミックセレクションの予測モデル

ここでは、ゲノミックセレクションの予測モデルについて解説する。今、 \mathbf{x}_i を遺伝子型（品種・系統、あるいは、個体） i のゲノムワイドマーカーの遺伝子型、 y_i を遺伝子型 i の遺伝子型値（genotypic value）あるいは表現型値（phenotypic value）とする。このとき、予測モデル $f(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\theta})$ は、以下のように表される。

$$y_i = f(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\theta}) + e_i$$

ここで、 $\boldsymbol{\theta}$ は予測モデルのパラメータからなるベクトル、 e_i は残差である。ゲノミックセレクションでは、通常、一塩基多型（single nucleotide polymorphisms, SNPs）がマーカーとして用いられる。2つの対立遺伝子をもつ SNP の3つの遺伝子型（例えば、AA, AG, GG）は、 $-1, 0, 1$ （あるいは、 $0, 1, 2$ ）としてスコア化される。例えば、10,000 SNPs を予測に用いる場合には、 \mathbf{x}_i は、10,000 個の要素をもつベクトルとして表される。モデル構築には、訓練データとよばれるデータが必要となる。訓練データは、多くの遺伝子型（品種・系統、あるいは、個体）のゲノムワイドマーカーの遺伝子型と、遺伝子型値（あるいは、表現型値）が含まれている。この訓練データを用いて、予測モデルのパラメータ $\boldsymbol{\theta}$ の推定値 $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ を求める。予測モデルのパラメータの推定値が得られれば、選抜対象とする遺伝子型 s の遺伝子型値を、そのマーカー遺伝子型 \mathbf{x}_s をもとにして、 $f(\mathbf{x}_s; \hat{\boldsymbol{\theta}})$ として予測することができる。ゲノミックセレクションを初めて提案した Meuwissen ら⁵⁾の論文では、線形回帰モデル線形回帰モデル

$$f(\mathbf{x}_i; \boldsymbol{\theta}) = \beta_0 + \sum_{j=1}^M x_{ij} \beta_j$$

が用いられた。ここで、 β_0 は切片、 β_j はマーカー j の効果、 x_{ij} は \mathbf{x}_i の j 番目の要素である。この線形回帰モデルを訓練データに当てはめることにより、推定パラメータ $\hat{\boldsymbol{\theta}} = (\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_M)^T$ を得る。これにより、 s 番目の遺伝子型（個体・個体）の遺伝子型値は、

$$\hat{y}_s = \hat{\beta}_0 + \sum_{j=1}^M x_{sj} \hat{\beta}_j$$

として予測できる。ここで、 \hat{y}_s は個体 s の遺伝子型値の予測値である。

ゲノミックセレクションでは、多くの場合、ゲノムワイドマーカーの数 M は、訓練データに含まれる遺伝子型（個体・個体）の数 N より大きい。作物では、 N は通常数百～数千で、一方 M は RAD-Seq や GBS (genotyping-by-sequencing) などとよばれる次世代シーケンシング (next generation sequencing, NGS) を用いた技術¹⁵⁾の登場により、年々増加の一途をたどっており数万～数十万となる。したがって、ゲノミックセレクションの予測モデルは一般に、“large p small n ”問題とよばれる条件、すなわち、パラメータ数 p がサンプル数 n を超えている条件下で予測モデルを構築しなければならない。さらに、互いに近傍に座乗するマーカー間は互いに連鎖不平衡の状態にあるため、説明変数間の多重共線性 (multi-collinearity) が予測モデル構築の障害となる。そこで、ゲノミックセレクションでは、こうした問題に対応できるようなモデル化手法が用いられる。

ゲノミックセレクションの予測モデル構築にもっともよく用いられる方法は、GBLUP (Genomic Best Linear Unbiased Predictor) とよばれる方法である。BLUP は、動物育種で伝統的に用いられてきた、血縁関係をもとにした育種価 (breeding values) の推定・予測モデルである。GBLUP では、血縁関係から計算される分子関係行列 (numerator relationship matrix) を、ゲノムワイドマーカーから計算されるゲノム関係行列 (genomic relationship matrix) で置き換えたものである¹⁶⁾。また、“large p small n ”に対応できるリッジ回帰や LASSO などの正則化回帰⁸⁾や、Bayesian alphabet とよばれる各種ベイズ回帰¹⁷⁾も用いられる。なお、ゲノミックセレクションでは、高い予測精度が得られるモデルを構築することが重要であり、逆にいうと、どのようなモデル化手法であっても高い予測精度が得られるものであれば有用である。このような視点から、カーネル回帰や random forest などの様々な機械学習

法も予測に用いられる¹⁸⁾。特に、エピスタシスのような遺伝子の非相加的効果がある場合には、マーカー遺伝子型と表現型間の非線形な関係をモデル化できる機械学習法の利用が有効な場合がある。その他、複数形質のモデル化を同時に行う手法など、様々なものが提案されている¹⁹⁾。

ゲノミックセレクションでは、その選抜効率を把握するために、予測精度を評価する必要がある。予測精度の評価には交差検証 (cross-validation) とよばれる方法が用いられる。これは、上述したように、ゲノミックセレクションのモデル構築では、モデルのパラメータ数が訓練データのサンプル数より多いが、このような場合は特に、訓練データに対するモデルの当てはまりの良さでは、モデルの優劣を評価することができない。それは、パラメータ数が多いために、モデルを訓練データにいくらかでも当てはめることができるためである。予測モデル構築では、未知データに対する予測ができることが重要であり、交差検証では未知データを仮想的に準備して、予測精度を評価する。 n -分割 (n -fold) 交差検証とよばれる方法の具体的な手順は以下の通りである。1) 訓練データを無作為にほぼ同じサイズの n セットに分割、2) 1つのセットを検証用データとして除いておき、残りの $n-1$ セットを訓練データとして用いて、予測モデルを得る。3) 得られた予測モデルを評価用データに当てはめ、予測値を得る。4) 2-3について、 n セットの全てが必ず1度ずつ検証用データとして用いられるまで繰り返す。5) 予測値と観測値間の一致度をもとに予測精度を計算する。 $n=10$ がよく用いられる。 n をサンプル数とする場合は1個抜き (leave-one-out) 交差検証とよばれ、各サイクルで1サンプルずつが除かれて検証用データとなる。なお、予測精度の評価には、予測値と観測値間の相関係数や、予測値と観測値間の残差平方和が用いられる。上述したように、様々な手法が予測モデル構築に用いられるが、予測精度が最も高いモデルは形質によって異なる場合が多い。各形質に適した予測モデルは、交差検証を通してアドホックに決めるのが良いであろう。

2.4. ゲノミックセレクションの利用

Meuwissenら⁵⁾が、ゲノミックセレクションについて提案する論文を出版して以来、ゲノミックセレクションは、家畜^{20, 21)}および作物^{11, 6-8)}の育種を効率化・高速化するための手法として、高い注目を浴びてきた。同論文は、シミュレーション研究の論文であったが、その後、比較的早くにホルスタインの育種に用いられ^{20, 21)}、遺伝的獲得量 (後述) に大きな向上がみられた²²⁾。一方、作物では、家畜に比較して、育種への導入は遅れた。また、作物でのゲノミックセレクションの利用は、主に、民間種苗会社で進んでいると考えられ、ゲノミックセレクションを実際に適用した結果について報告されている例は決して多くない^{13, 23-26)}。ここでは、ゲノミックセレクションを用いた普通ソバの選抜実験²⁶⁾について紹介する。

Yabeら²⁶⁾は、年2回のゲノミックセレクションと、年1回の表現型選抜を3年間繰り返し、同一年に全世代の栽培試験を行い、その結果を比較した。ゲノミックセレクションでは、4,417~50,000のゲノムワイドマーカーが用いられた。夏期の栽培では、毎年、192個体についてマーカー遺伝子型と表現型値を計測し、それらデータをもとに予測モデルを得た。また、得られた予測モデルを当てはめて遺伝子型値を推定し、12の優良個体を選抜した。冬期の栽培では、48個体についてマーカー遺伝子型のみを計測し、夏期に作成しておいた予測モデルをもとに予測値を求め、12の優良個体を選抜した。表現型選抜では、毎年192個体について表現型値を計測し、表現型値に基づいて12の優良個体を選抜した。全世代を用いた栽培試験の結果、ゲノミックセレクションでは収量を間接的に選抜するために作成された選抜指数が20.9%、表現型選抜では15.0%改良された。選抜指数は7形質の線形結合としたが、大きな重みを与えた形質 (花房の数、主茎長) ほど改良が進んだ。普通ソバは、異型花柱性の他殖性植物のため、収量調査が行われる時点では、既に花粉を受粉してしまっており、花粉親の選抜が難しい。ゲノミックセレクションでは、受粉前に優良個体を選抜できるため、花粉親についても選抜ができる。普通ソバ育種を想定したシミュレーシ

ンでは、ゲノミックセレクションの有用性が示されていた^{27,28)}が、上述した研究はそれを実際の選抜実験で示した。現在、こうした実証研究に関する報告はまだ少ない。今後、こうした実証研究によりゲノミックセレクションのポテンシャルを具体的に評価していく必要がある。

3. ハイスループットフェノタイピング (HTP)

HTP は、高効率・高精度に植物の表現型を計測することを目標としているが、近年の技術の進歩により、それが可能となりつつある。HTP は、種子の選別から圃場での収穫、地上部から地下部まで、様々な形質を対象に、様々なスケールで行われている (図 1)。植物の表現型計測をハイスループット化するには、画像センシングと機械学習を組み合わせた技術が非常に有効である²⁹⁻³²⁾。多様な画像センサーを異なる機材 (固定プラットフォーム、移動ロボット、ドローンなど) に搭載することで、室内・野外を問わず大量の画像データを取得・解析できる。例えば、種子の表現型計測のための画像撮影は主に室内で行われるが、光源の変化に対する頑健性と、互いに繋がりや重なり

りが生じてしまう種子の分離が主要な課題として挙げられていた。しかし、画像解析という視点からみると難易度は低く、既にいくつかの主なツールが開発されている³³⁻³⁸⁾。発芽直後あるいは移植直後の実生の HTP は、実験室内での三次元形状・群落構造、器官の形状・サイズの解析³⁹⁻⁴²⁾、圃場での発芽率調査、地上ロボット⁴³⁻⁴⁵⁾やドローン^{46,47)}を用いた近接撮影による雑草識別など、複雑な形態をもつ作物に対しても有効な三次元再構築、解析手法、微小個体の認識、分類などの難題に挑戦した研究例が種々報告されている。また、栄養成長期の植物に対する HTP については、主に植被率⁴⁸⁾、群落の高さ^{49,50)}、病害やストレスの検出⁵¹⁻⁵⁶⁾が研究対象とされており、大型屋内フェノタイピング施設や、野外の圃場での適用例が広く報告されている。また、生殖成長期の植物に対する HTP については、開花、穂や果実の認識、計数⁵⁷⁻⁶³⁾などへの適用が例として挙げられる。以下、野外の圃場における計測への適用例を中心に、異なる生育期間に対する HTP 技術を一例ずつ紹介しながら、その現状と問題点について述べる。

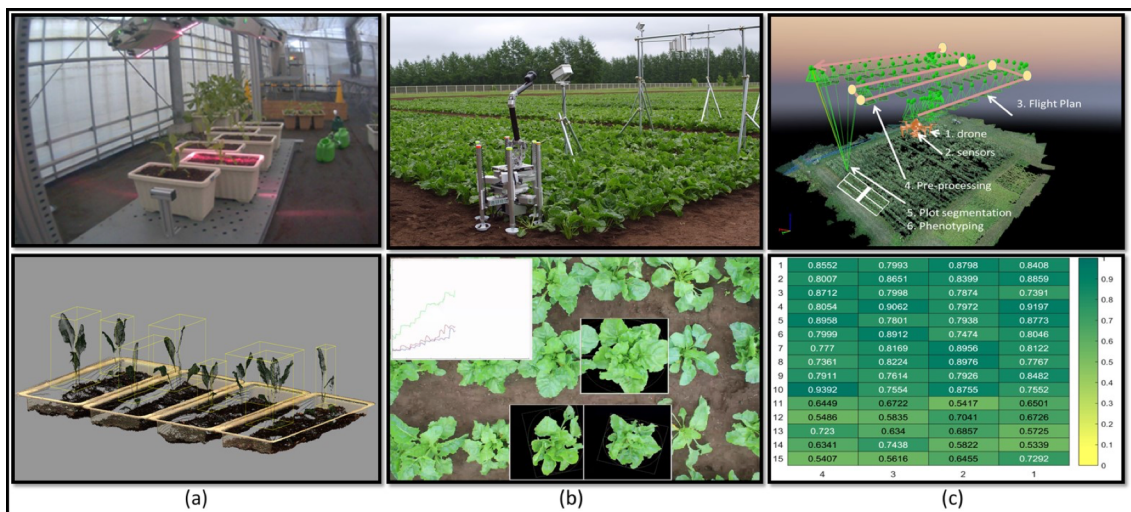


図 1. 異なるスケールにおける HTP の例

(a) 超近接撮影に基づく HTP の例。高解像度画像や三次元情報が高い頻度で取得できるため、草丈、葉面積、植被率、バイオマスの経時的計測が可能。(b) 固定カメラやロボットを用いた撮影に基づく HTP の例。圃場で観測したい少数の植物やプロットについて、時系列で撮影する。植被率、成長速度、成長曲線の推定が可能。(c) 低空ドローンを用いた撮影に基づく HTP の例。ドローンの自動航行により圃場全体を対象に撮影を行い、更に複数の写真より三次元合成、全圃場のマッピング、プロット分割ができる。(b)の定点観測より数多くの植物やプロットについて、植被率、成長速度、成長曲線の推定が可能。

3.1. 種子の HTP

種子の HTP は、主に収穫後の収量や品質の調査の際に利用される。計測の一般的な流れは、画像取得、種子と背景の分離、種子の抽出、種子の形態計測、結果出力となる。この一連の処理の中では、撮影時の光条件が変化の中で種子と背景を分離するステップと、種子同士が繋がりが重なりをもつ中で個々の種子を抽出するステップが課題となる。なお、これらステップを問題なく実施できれば、サイズや形状などの特徴の定量的計測や評価を行うためのソフトウェアは既に提供されている^{33,66)}。なお、これまでは、主に、収穫後に室内で撮影・解析を行っていたが、最近では野外での解析を可能にするツールも報告されている。例えば、Makanza ら³⁸⁾はトウモロコシを対象にして、野外でも手軽に撮影を行い、穂や穀粒の数や形などを計測できるツールを作成した(図2)。

3.2. 発芽・移植直後の幼植物の HTP

発芽直後あるいは移植直後の幼植物の HTP は、大きく分けて、室内栽培あるいは圃場栽培を基に行うものに分けられる。室内栽培を基にした HTP では、作物の三次元構造⁶⁷⁾の計測が行われることが多く、一般的な流れとしては、三次元点群の再構築、植物領域の点群の抽出、各器官の抽出、各器官の評価が行なわれ、個葉の枚数、面積、生育パターン⁴⁰⁾、枝の分布⁴²⁾など、詳細な表現型が計測される。三次元点群の再構築では、ToF (time-of-flight)、LiDAR (Light Detection and Ranging)、Structured-light、Stereo vision、SfM (Structure-from-motion) などの様々な技術がある。これらの技術は、計測精度、計測コスト、応用場面が異なる⁶⁷⁾が、最近では市販の RGB カメラを 1 台用いただけでも高い精度での三次元点群の再構築ができる SfM が最も注目されており⁶⁸⁾、今後、さらなる発展も期待できる。植物領域の点群の抽出と各器官の抽出については、異なる技術

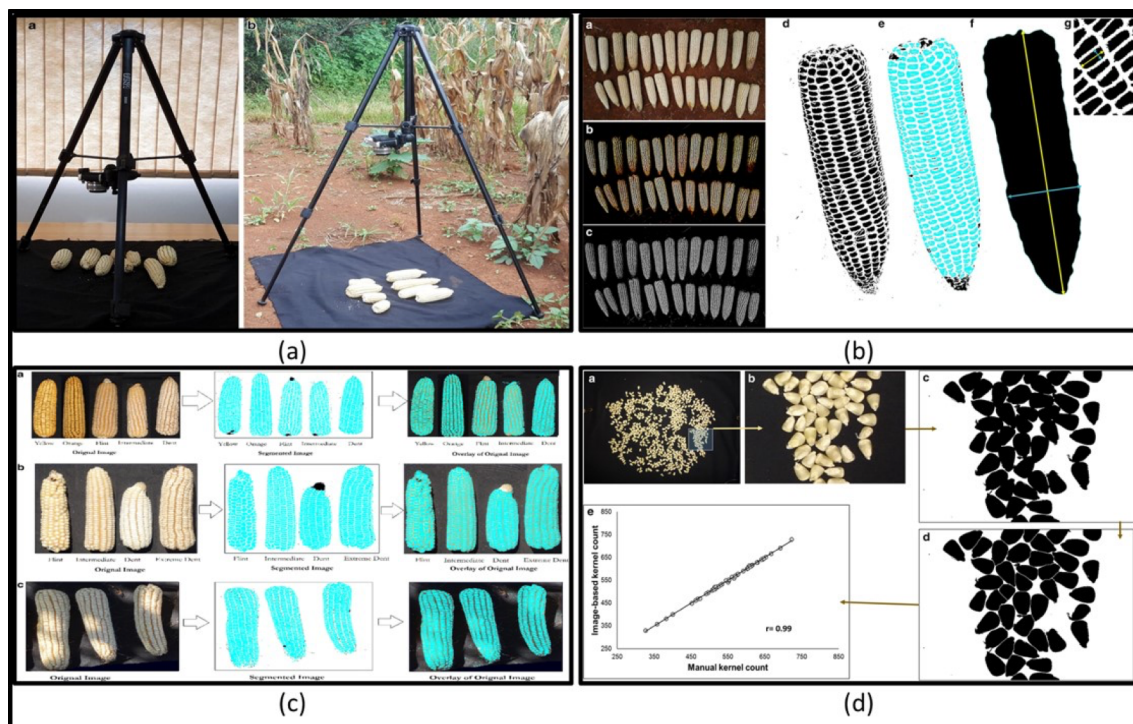


図2. 野外で種子の計測を行った例³⁸⁾

(a) 制御光と自然光を用いた画像の取得。(b) 画像解析を用いた穀粒の抽出と、穂と穀粒の形態特徴の計算。(c) 様々な色、テクスチャ、サイズをもつ穂について、異なる光源のもとで穂と穀粒を抽出した結果。(d) 画像解析を用いて重なった穀粒を分離し、高精度に計数する。

を用いて得られた点群はその属性も異なるため、それぞれの技術に対して別々に対策を講ずる必要がある。また、幼植物でも既に複雑な形状をもつため、互いに重なった部分の抽出などが、最大の課題となっている (図 3)。圃場栽培を基にした HTP の場合には、地上台車/ロボット (自律走行や手押し式) や無人飛行機を利用して、二次元画像解析より発芽率、個体計数^{47,69-72)}や初期成長の活性⁷³⁾などの計測が多く報告されている。一般的な解析の流れは、種子の HTP と大きく変わらないが、個体を分離する際に、光条件の変化の他に、個体間⁷²⁾や個体と雑草間の重なりが大きな課題となっている。特に作物と雑草の区別については、未だに有効な手法がない。なお、圃場栽培を基にした HTP での三次元点群の再構築と詳細な計測技術も報告されつつあるが、異なる測量機器間での結果の比較や、環境の影響、特に風による影響への対策が課題となっており、今後の計測技術の発展に期待したい。

3.3. 栄養成長期の HTP

栄養成長期の植物に対する HTP は、室内栽培の場合には主に個体レベル、圃場栽培の場合には群落レベルで行われる。一般的な流れとしては、画像取得、植物領域の抽出、対象形質の計測・評価となる。対象形質として、植被率、病害やストレスの程度について、既に多くの手法が開発され、HTP の有効性が示されている^{48,51-56)}。しかし、植物群落の高さの計測は未だ開発段階であり、残された課題がある。例えば、Wang ら⁷⁴⁾は、ソルガムの群落の高さの計測を対象に、異なる画像取得方法について、測量精度およびコストの比較をした (表 1)。Madec ら⁴⁹⁾は、LiDAR 測量と無人航空機に搭載した RGB カメラによる SfM 測量の比較を行った。また、Hu⁵⁰⁾は無人航空機に搭載した RGB カメラによる SfM 測量のみの場合に、群落高の計算方法の比較を行った。地上台車/ロボットの場合は、どちらの手段を用いても、良い精度が得られることが分かったが、無人航空機の場合にはカメラの解像度にも大きく依存する。

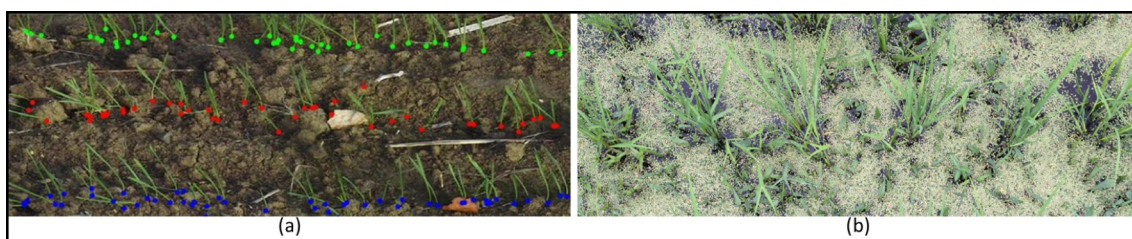


図 3. (a) コムギの発芽後 2 週間前後の画像⁷²⁾。図中の点は、個体と地面の接点の位置を示している。個体間の重なりが非常に高いことが分かる。(b) イネの移植後 3 週間前後の画像。雑草とイネ、および、イネ同士の重なりが非常に高いことが分かる。

表 1. 種類の異なる画像取得法とそれら性能の比較⁷⁴⁾

Sensors	Carriers	Performance			
		Resolution	Equipment cost per unit	Accuracy compared with the ground truth	Data processing cost
LIDAR-Lite v2 sensor	Ground vehicle	Low, only reflect	<\$100	Low, due to the low sampling frequency	Low
Ultrasonic sensor		1-dimensional measurements	\$300-\$800	High	
Kinect camera	UAV	~0.2 MP	<\$300	High, within the optimal measuring range	High, due to photogrammetry processing
DSLR cameras		~18 MP	>\$800	Highest	
Digital cameras		~12 MP	<\$600	Lowest	

SfM を実行する際の基礎パラメータとなる局所特徴量計算法と初期設定（特徴点の数、特徴点マッチングの方法など）、カメラ内部パラメータ初期設定、密な点群を生成するためのアルゴリズムなどについて、試行錯誤することで最適な設定を探して利用してきたが、今後は、こうした設定の自動化についても、さらなる研究が必要と考えられる。

3.4. 生殖成長期の HTP

生殖成長期の HTP の主な対象形質は、開花時間、穂や果実の数、成熟度などが挙げられている。栄養成長期の HTP と異なり、対象物の抽出ではなく、対象物の検出と認識が問題になり、検出と認識のためのモデル構築が課題となる。また、個体間等の重なりも、問題となる。例えば、育種圃場において、ソルガムの出穂の認識と検出を行った場合、図 4 のように、異なる光条件、出穂期間、品種・系統、穂同士の重なり等により、画像を通して捉えられる穂の色、サイズ、形が変化する。しかし、コンピュータにはそれらを同一のものとして認識させ、計数させなければならず、そこに、

高度な機械学習の技術が必要となる。Guo ら⁵⁹⁾は、2段階の機械学習法を用いる手法を提案した。現在では、急速に発展しつつある深層学習も検出・識別モデル構築の手法として注目されている。深層学習では、十分な数のトレーニングデータがあれば、より高い精度での検出と計数が可能となっている（例えば、出穂^{65,75,76)}、果実⁶⁴⁾）。

4. ゲノミックセレクションおよびHTPを用いた選抜の効率

育種における選抜の効率を評価する指標として、選抜反応（response to selection）よばれる指標がある⁷⁷⁾。選抜反応 R は、選抜された親から得られた子供の表現型の平均 \bar{y}_o と、選抜前の親集団における表現型の平均 \bar{y}_p の差、すなわち、

$$R = \bar{y}_o - \bar{y}_p$$

として定義される。今、選抜対象としている形質の遺伝率を h^2 、選抜差（selection differential） S を親集団における表現型の標準偏差 σ_p と選抜強度 i の積 $i\sigma_p$ として表すと、

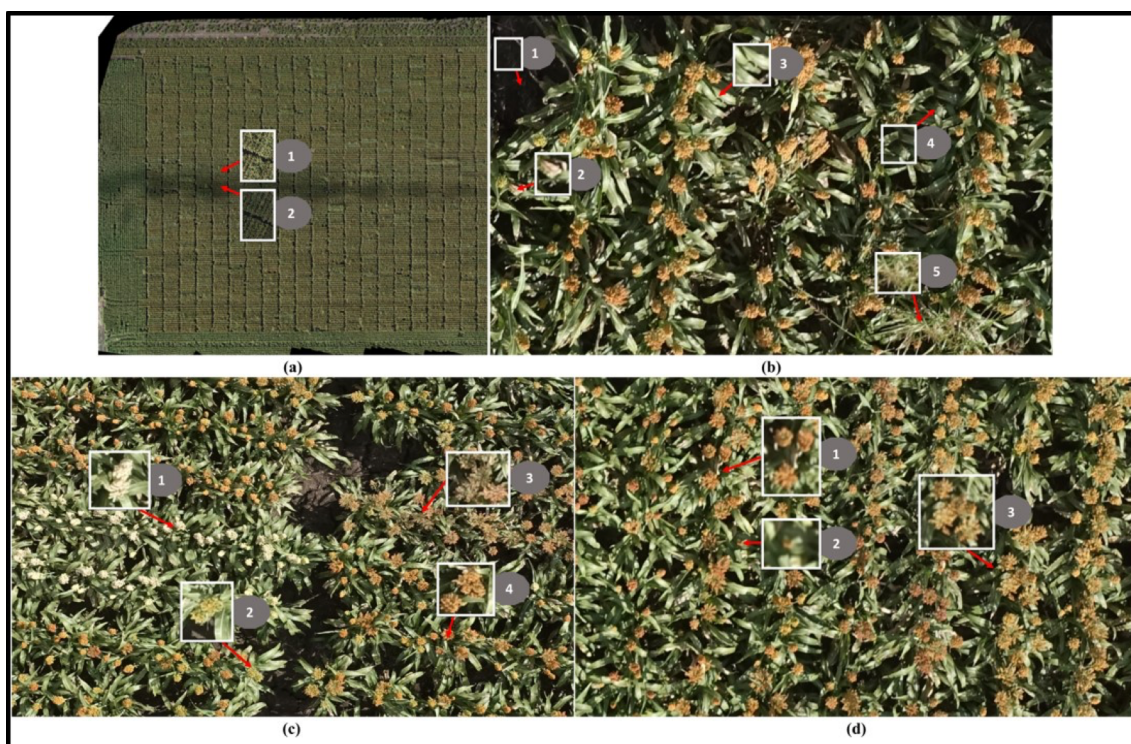


図 4. 育種圃場で撮影された様々な系統のソルガムの出穂⁵⁹⁾

$$R = ih^2\sigma_p$$

という関係になる。この式は、「育種家の方程式 (breeder's equation)」とよばれる育種上重要な式であり、対象形質の遺伝率 h^2 と、親集団における表現型の標準偏差 σ_p が分かれば、ある選抜強度 i のもとで期待される選抜反応 R を計算できる。今、遺伝率 $h^2 = \sigma_g^2/\sigma_p^2$ を利用すると、

$$R = ih\sigma_g$$

と表される。なお、 σ_g は、親集団における遺伝分散の平方根である。

ここで、改良対象とする形質 X を、HTPで計測される形質 Y を用いて間接的に選抜する場合を考える。このとき、形質 Y を用いた形質 X の間接的な選抜反応 CR_X は、

$$CR_X = i_Y h_Y r_{XY} \sigma_{gX}$$

と表される。ここで、 i_Y は形質 Y の選抜強度、 h_Y は形質 Y の遺伝率の平方根、 r_{XY} は形質 X と形質 Y の遺伝相関、 σ_{gX} は形質 X の親集団における遺伝分散の平方根である。これが、形質 X を直接選抜した場合の選抜反応 $R_X = i_X h_X \sigma_{gX}$ よりも大きくなる、すなわち、選抜の効率が高まる条件は、

$$i_Y h_Y r_{XY} > i_X h_X$$

となる。2つの形質の選抜強度が同じ場合 ($i_Y = i_X$)、HTPを用いて計測される形質 Y は、改良対象形質 X に比べて遺伝率が高く、かつ、形質 X との遺伝相関が高い必要がある。ただし、HTPを用いた計測では、直接選抜に比べ、多数の遺伝子型 (系統、個体) を評価できる場合が多い。したがって、形質 Y の選抜強度を形質 X の選抜強度に比べて高めることができる。 $i_Y > i_X$ であれば、形質 Y の遺伝率が形質 X の遺伝率を上回らない場合でも、直接選抜を上回る効率で選抜できる可能性がある。

ゲノミックセレクションを用いた選抜も、ゲノムワイドマーカーをもとに計算される予測値 I をもとにした間接的な選抜となり、その選抜反応 CR_I は、

$$CR_I = i_I r_{XI} \sigma_{gX}$$

と表される。これが、形質 X を直接選抜した場合の選抜反応よりも大きくなる条件は、

$$i_I r_{XI} > i_X h_X$$

となる。2つの形質の選抜強度が同じ場合 ($i_I = i_X$)、ゲノミックセレクションの予測値と形質 X の遺伝子型値の相関 r_{XI} が、形質 X の遺伝率の平方根 h_X を上回ると、ゲノミックセレクションによる選抜の効率が、形質 X の直接選抜の効率を上回る。形質 Y を用いた間接選抜のときと同様、 $i_I > i_X$ であれば、ゲノミックセレクションの予測値 X_G と形質 X の遺伝子型値の相関 r_{XI} が、形質 X の遺伝率を上回らない場合でも、直接選抜を上回る効率で選抜できる可能性がある。

ゲノミックセレクションでは、上述したように、交差検証によって予測値と表現型値 P の相関を計算し、精度の指標とする場合が多い。この相関は、

$$\begin{aligned} r_{PI} &= \frac{\text{cov}(P, I)}{\sigma_{pX}\sigma_I} = \frac{\text{cov}(X, I)}{\sigma_{pX}\sigma_I} \\ &= \frac{\sigma_{gX}}{\sigma_{pX}} \cdot \frac{\text{cov}(X, I)}{\sigma_{gX}\sigma_I} = h_X r_{XI} \end{aligned}$$

と表され、したがって、ゲノミックセレクションを用いた場合に期待される選抜反応は、交差検証を用いて得られる r_{PI} を用いて

$$CR_I = \frac{i_I r_{PI} \sigma_{gX}}{h_X}$$

と推定することができる。

なお、育種の効率を考える場合に、年あたりの改良速度を求める場合もある。すなわち、選抜反応 R を1サイクルの選抜に要する時間 δ_X で割って、

$$\Delta G_X = \frac{ih_X \sigma_{gX}}{\delta_X}$$

を求める。 ΔG は、時間あたりの遺伝的獲得量 (genetic gain) とよばれる。ゲノミックセレクションで期待される時間あたりの遺伝的獲得量は、

$$\Delta G_I = \frac{i_I r_{XI} \sigma_{gX}}{\delta_I}$$

となる。なお、上述した交差検証から得られる表現型値 P との相関を用いると、

$$\Delta G_I = \frac{i_I r_{PI} \sigma_{gX}}{h_X \delta_I}$$

となる。ここで、 δ_I は、ゲノミックセレクションを用いた場合の1サイクルの選抜に要する時間である。植物育種では、ゲノミックセレクションを用いた場合の1サイクルの選抜に要する時間は、対象形質 X を1サイクル直接選抜するのに要する時間に比べて短いことが多い。例えば、イネの収量性や品質を改良する場合、通常、集団内の個体のホモ接合度が高まるまで自殖を繰り返してから、系統単位で評価・選抜が行われる。一方、ゲノミックセレクションでは、個体選抜が可能のため、雑種第2代 (F_2) のような早い世代で選抜を行うことができる。このような場合、 $\delta_I \ll \delta_X$ となり、ゲノミックセレクションで期待される選抜反応 CR_I が、形質 X に対する直接選抜で期待される反応 R_X よりも小さくても、時間あたりの遺伝的獲得量は、ゲノミックセレクションのほうが勝る可能性が高い。HTP を用いた選抜についても同様のことがいえる。すなわち、HTP を用いて早期世代に個体単位で計測される形質が、収量性や品質と遺伝相関をもつのであれば、HTP を用いた場合の時間あたりの遺伝的獲得量を、形質 X を直接選抜した場合に比べて、大きくすることができる。なお、ゲノミックセレクションでは、一般に、選抜サイクルを短くすることによる選抜効率の向上が高いと考えられる⁶⁾。

5. 今後の展望

今後、ゲノム情報にかかわらず、様々なオミクスデータが育種に活用されていくと考えられる⁷⁸⁾。こうしたオミクス利用育種 (omics-assisted breeding) においては、HTP がオミクスデータと表現型を関連付け、モデル化するために非常に重要な役割を果たすと考えられる。HTP は、上述したように、効率的に大規模・高密度表現型データを収集でき、したがって、ゲノミック予測モデルを構築するための訓練データを収集するのにも向いている。HTP を利用することで、訓練データの取得を容易にし、ゲノミックセレクションの育種現場への導入が促進されるであろう。

なお、HTP により、育種家や研究者がこれまで注目してこなかった形質の計測も可能となる⁷⁹⁾。こうした形質を組合せ、それらと収量や品質

の関係をモデル化できれば、収量性や品質の選抜効率を向上できるだろう。より、具体的には、HTP で計測される様々な形質をもとに、収量や品質を予測するモデルを構築できる可能性がある。こうしたモデルを構築できれば、HTP で計測される形質をもとに、計測に手間と時間のかかる収量や品質を予測して選抜可能となる。また、HTP で計測された形質の表現型値を、ゲノミックセレクションの予測モデルに二次的な変量として組み込むこともできる⁸⁰⁾。

現在のゲノミックセレクションの予測モデルのもつ問題点は、作物の環境変化に対する応答のモデル化が難しい点である。これは、予測モデルがゲノムワイドマーカー遺伝子型データを専ら入力として用いており、気象条件などの環境データが入力として用いられていないためである。ゲノムワイドマーカー遺伝子型データと環境データの両方を入力としたモデルにより、作物の環境応答、すなわち、遺伝子型×環境の交互作用のモデル化が可能となれば、環境適応性の予測も可能となる。地球レベルでの気候変動が進む現在、将来の環境を想定した育種を進めていくことが重要である。そのためにも、上述したような予測モデルの構築は非常に重要になるであろう。こうしたモデルでは、植物の成長をモデル化することも重要であり、HTP の利用も不可欠となる。食料問題の解決のためには、ゲノミックセレクション、HTP、GWAS、ゲノム編集など、現在利用可能な技術をうまく融合させ、育種の効率化・高速化を図ることが重要である。

Received Nov 30, 2018; Accepted Dec 12, 2018; Published Dec 31, 2018.

参考文献

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017) World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working paper No. ESA/P/WP/248.

2. Tester, M. and Langridge, P. (2010) Breeding technologies to increase crop production in changing world. *Science* 327, 818–822.
3. FAO (2011) World Livestock 2011 – Livestock in food security. Rome, FAO.
4. Bouis, H.E. and Saltzman, A. (2017) Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security* 12, 49–58.
5. Meuwissen, T.H., Hayes, B.J. and Goddard, M.E. (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829.
6. Heffner, E.L., Sorrells, M.E. and Jannink, J.L. (2009) Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49, 1–12.
7. Jannink, J.L., Lorenz, A.J. and Iwata, H. (2010) Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Brief. Funct. Genomics* 9, 166–177.
8. Lorenz, A.J., Chao, S., Asoro, F.G., Heffner, E.L., Hayashi, T., Iwata, H., Smith, K.P., Sorrells, M.E. and Jannink J.L. (2011) Genomic selection in plant breeding. Knowledge and Prospects. *Adv. Agron.* 110, 77–123.
9. Araus, J.L. and Cairns, J.E. (2014) Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends Plant Sci.* 19, 52–61.
10. Araus, J.L., Kefauver, S.C., Zaman-Allah, M., Olsen, M.S. and Cairns J.E. (2018) Translating high-throughput phenotyping into genetic gain. *Trends Plant Sci.* 23, 451–466.
11. Bernardo, R. and Yu, J. (2007) Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.* 47, 1082–1090
12. Heffner, E.L., Lorenz, A.J., Jannink, J.L. and Sorrells, M.E. (2010) Plant breeding with genomic selection gain per unit time and cost. *Crop Sci.* 50, 1681–1690.
13. Massman, J.M., Jung H.J.G. and Bernardo, R. (2013) Genomewide selection versus Marker-assisted recurrent selection to improve grain yield and stover-quality traits for cellulosic ethanol in maize. *Crop Sci.* 53, 58–66.
14. Jannink, J.L. (2010) Dynamics of long-term genomic selection. *Genet. Sel. Evol.* 42, 35
15. Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G. and Hohenlohe, P.A. (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 17, 81–92.
16. Habier, D., Fernando, R.L. and Dekkers, J.C. (2007) The Impact of Genetic Relationship Information on Genome-Assisted Breeding Values. *Genetics* 177, 2389–2397.
17. Gianola, D. (2013) Priors in whole-genome regression: The Bayesian alphabet returns. *Genetics* 194, 573–596.
18. González-Recio, O., Rosa, G.J.M. and Gianola, D. (2014) Machine learning methods and predictive ability metrics for genome-wide prediction of complex traits. *Livestock Sci.* 166, 217–231.
19. Spindel, J. and Iwata, H. (2018) Genomic selection in rice breeding. in *Rice Genomics, Genetics and Breeding* (Sasaki, T. and Ashikari, M., Eds.), 473–496, Springer, Singapore.
20. Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J. and Goddard, M.E. (2009) Genomic Selection in Dairy Cattle: Progress and Challenges. *J. Dairy Sci.* 92, 433–443.
21. VanRaden, P.M., Van Tassell, C.P., Wiggans, G.R., Sonstegard, T.S., Schnabel, R.D., Taylor, J.F. and Schenkel, F.S. (2009) Reliability of Genomic Predictions for North American Holstein Bulls. *J. Dairy Sci.* 92, 16–24.
22. García-Ruiz, A., Cole, J.B., VanRaden, P.M., Wiggans, G.R., Ruiz-López, F.J. and Van Tassell, C.P. (2016) Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3995–4004.
23. Combs, E. and Bernardo, R. (2013) Genomewide selection to introgress semidwarf maize germplasm into U.S. corn belt inbreds. *Crop Sci.* 53, 1427–1436.
24. Asoro, F.G., Newell, M.A., Beavis, W.D., Scott, M.P., Tinker, N.A. and Jannink J.L. (2013) Genomic, marker-assisted, and pedigree-BLUP selection methods for β -glucan concentration in elite oat. *Crop Sci.* 53, 1894–1906.
25. Beyene, Y., Semagn, K., Mugo, S., Tarekagne, A., Babu, R., Meisel, B., Sehabiague, P., Makumbi, D., Magorokosho, C., Oikeh, S., Gakunga, J., Vargas, M., Olsen, M., Prasanna, B.M., Banziger, M. And Crossa, J. (2015) Genetic gains in grain yield through genomic selection in eight bi-parental maize populations under drought stress. *Crop Sci.* 55, 154–163.
26. Yabe, S., Hara, T., Ueno, M., Enoki, H., Kimura, T., Nishimura, S., Yasui, Y., Ohsawa, R. and Iwata, H. (2018) Potential of genomic selection in mass

- selection breeding of an allogamous crop: an empirical study to increase yield of common buckwheat. *Front. Plant Sci.* 9, 276.
27. Yabe, S., Ohsawa, R. and Iwata, H. (2013) Potential of genomic selection for mass selection breeding in annual allogamous crops. *Crop Sci.* 53, 95–105.
 28. Yabe, S., Ohsawa, R. and Iwata, H. (2014) Genomic selection for the traits expressed after pollination in allogamous plants. *Crop Sci.* 54, 1448–1457.
 29. Pieruschka, R. and Poorter, H. (2012) Phenotyping plants: Genes, phenes and machines. *Funct. Plant Biol.* 39, 813–820.
 30. Fahlgren, N., Gehan, M. A. and Baxter, I. (2015) Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24, 93–99.
 31. Furbank, R. T. and Tester, M. (2011) Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci.* 16, 635–644.
 32. Yang, W., Duan, L., Chen, G., Xiong, L. and Liu, Q. (2013) Plant phenomics and high-throughput phenotyping: Accelerating rice functional genomics using multidisciplinary technologies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 180–187.
 33. Tanabata, T., Shibaya, T., Hori, K., Ebana, K. and Yano, M. (2012) SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiol.* 160, 1871–1880.
 34. Yang, X., Hong, H., You, Z. and Cheng, F. (2015) Spectral and Image Integrated Analysis of Hyperspectral Data for Waxy Corn Seed Variety Classification. *Sensors* 15, 15578–15594.
 35. Whan, A.P., Smith, A.B., Cavanagh, C.R., Ral, J.P., Shaw, L.M., Hawitt, C.A., and Bischof, L. (2014) GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements. *Plant Methods* 10, 23.
 36. Al-Tam, F., Adam, H., Anjos, A. Dos, Lorieux, M., Larmande, P., Ghesquière, A., Jouanic, S., and Shabazkia, H.R. (2013) P-TRAP: a Panicle Trait Phenotyping Tool. *BMC Plant Biol.* 13, 122.
 37. Duan, L., Yang, W., Bi, K., Chen, S., Luo, Q., and Liu, Q. (2011) Fast discrimination and counting of filled/unfilled rice spikelets based on bi-modal imaging. *Comput. Electron. Agric.* 75, 196–203.
 38. Makanza, R., Zaman-Allah, M., Cairns, J.E., Eyre, J., Burgueño, J., Pacheco, Á., Diepenbrock, C., Magorokosho, C., Tarekne, A., Olsen, M., Prasanna, B.M. (2018) High-throughput method for ear phenotyping and kernel weight estimation in maize using ear digital imaging. *Plant Methods* 14, 49.
 39. Golbach, F., Kootstra, G., Damjanovic, S., Otten, G. and van de Zedde, R. (2015) Validation of plant part measurements using a 3D reconstruction method suitable for high-throughput seedling phenotyping. *Mach. Vis. Appl.* 27, 663–680.
 40. Duan, T., Chapman, S. C., Holland, E., Rebetzke, G. J., Guo, Y., and Zheng, B. (2016) Dynamic quantification of canopy structure to characterize early plant vigour in wheat genotypes. *J. Exp. Bot.* 67, 4623–4534.
 41. Paproki, A., Sirault, X., Berry, S., Furbank, R. and Fripp, J. (2012) A novel mesh processing based technique for 3D plant analysis. *BMC Plant Biol.* 12, 63.
 42. Schöler, F. and Steinhage, V. (2015) Automated 3D reconstruction of grape cluster architecture from sensor data for efficient phenotyping. *Comput. Electron. Agric.* 114, 163–177.
 43. Burgos-Artizzu, X. P., Ribeiro, A., Guijarro, M. and Pajares, G. (2011) Real-time image processing for crop/weed discrimination in maize fields. *Comput. Electron. Agric.* 75, 337–346.
 44. Lottes, P., Hörferlin, M., Sander, S. and Stachniss, C. (2017) Effective Vision-based Classification for Separating Sugar Beets and Weeds for Precision Farming. *J. Field Robot.* 34, 1160–1178.
 45. Sa, I., Chen, Z., Popovic, M., Khanna, R., Liebisch, F., Nieto, J., and Siegwart, R. (2018) WeedNet: Dense Semantic Weed Classification Using Multispectral Images and MAV for Smart Farming. *IEEE Robo. Auto. Lett.* 3, 588–595.
 46. Lottes, P., Khanna, R., Pfeifer, J., Siegwart, R., Stachniss, C. (2017) UAV-Based Crop and Weed Classification for Smart Farming UAV-Based Crop and Weed Classification for Smart Farming. in 2017 IEEE Inter. Conf. on Robo. and Auto. (ICRA) 3024–3031.
 47. Varela, S., Dhodda, P.R., Hsu, W.H., Prasad, P.V.V., Assefa, Y., Peralta, N.R., Griffin, T., Sharda, A., Ferguson, A., and Ciampitti, I.A. (2018) Early-season stand count determination in Corn via integration of imagery from unmanned aerial systems (UAS) and supervised learning techniques. *Remote Sens.* 10, 343.
 48. Duan, T., Zheng, B., Guo, W., Ninomiya, S., Guo, Y., and Chapman, S.C. (2017) Comparison of ground

- cover estimates from experiment plots in cotton, sorghum and sugarcane based on images and ortho-mosaics captured by UAV. *Func. Plant Biol.* 44, 169–183.
49. Madec, S., Baret, F., de Solan, B., Thomas, S., Dutartre, D., Jezequel, S., Hemmerlé, M., Colombeau, G., and Comar, A. (2017) High-Throughput Phenotyping of Plant Height: Comparing Unmanned Aerial Vehicles and Ground LiDAR Estimates. *Front. Plant Sci.* 8, 2002.
 50. Hu, P., Chapman, S. C., Wang, X., Potgieter, A., Duan, T., Jordan, D., Guo, Y., and Zheng, B. (2018) Estimation of plant height using a high throughput phenotyping platform based on unmanned aerial vehicle and self-calibration: Example for sorghum breeding. *Eur. J. Agron.* 95, 24–32.
 51. Baret, F., Madec, S., Irfan, K., Lopez, J., Comar, A., Hemmerlé, M., Dutartre, D., Praud, S., and Tixier, M.H. (2018) Leaf-rolling in maize crops: From leaf scoring to canopy-level measurements for phenotyping. *J. Exp. Bot.* 69, 2705–2716.
 52. Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R. and Davis, C. (2010) A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Comput. Electron. Agr.* 72, 1–13
 53. Ghosal, S., Blystone, D., Singh, A. K., Ganapathysubramanian, B., Singh, A., and Sarkar, S. (2018) An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4613–4618.
 54. Singh, A.K., Ganapathysubramanian, B., Sarkar, S. and Singh, A. (2018) Deep Learning for Plant Stress Phenotyping: Trends and Future Perspectives. *Trends Plant Sci.* 23, 883–898.
 55. Naik, H. S., Zhang, J., Lofquist, A., Assefa, T., Sarkar, S., Ackerman, D. Singh, A., Singh, A.K., and Ganapathysubramanian, B. (2017) A real-time phenotyping framework using machine learning for plant stress severity rating in soybean. *Plant Methods* 13, 23.
 56. Singh, A., Ganapathysubramanian, B., Singh, A.K. and Sarkar, S. (2016) Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. *Trends Plant Sci.* 21, 110-124.
 57. Zhu, Y., Cao, Z., Lu, H., Li, Y. and Xiao, Y. (2016) In-field automatic observation of wheat heading stage using computer vision. *Biosyst. Eng.* 143, 28–41.
 58. Guo, W., Fukatsu, T. and Ninomiya, S. (2015) Automated characterization of flowering dynamics in rice using field-acquired time-series RGB images. *Plant Methods* 11, 7.
 59. Guo, W., Zheng, B., Potgieter, A.B., Diot, J., Watanabe, K., Noshita, K., Jordan, D. R., Wang, X., Watson, J., Ninomiya, S., and Chapman, S.C. (2018) Aerial Imagery Analysis – Quantifying Appearance and Number of Sorghum Heads for Applications in Breeding and Agronomy. *Front. Plant Sci.* 9, 1544.
 60. Sadeghi-Tehran, P., Sabermanesh, K., Virlet, N. and Hawkesford, M.J. (2017) Automated Method to Determine Two Critical Growth Stages of Wheat: Heading and Flowering. *Front. Plant Sci.* 8, 252.
 61. Yamamoto, K., Guo, W., Yoshioka, Y. and Ninomiya, S. (2014) On plant detection of intact tomato fruits using image analysis and machine learning methods. *Sensors* 14, 12191–12206.
 62. Sengupta, S., and Lee, W.S. (2014) Identification and determination of the number of immature green citrus fruit in a canopy under different ambient light conditions. *Biosyst. Eng.* 117, 51–61.
 63. Maldonado, W. and Barbosa, J.C. (2016) Automatic green fruit counting in orange trees using digital images. *Comput. Electron. Agric.* 127, 572-581.
 64. Sa, I., Ge, Z., Dayoub, F., Upcroft, B., Perez, T., and McCool, C. (2016) Deepfruits: A fruit detection system using deep neural networks. *Sensors* 16, 1222.
 65. Madec, S., Jin, X., Lu, H., De Solan, B., Liu, S., Duyme, F., Heritier, E., Baret, F. (2018) Ear density estimation from high resolution RGB imagery using deep learning technique. *Agric. For. Meteorol.* 264, 225–234.
 66. Iwata, H. and Ukai, Y. (2001) SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93, 384–385.
 67. Rahman, A., Mo, C. and Cho, B. (2017) 3-D Image Reconstruction Techniques for Plant and Animal Morphological Analysis-A Review. *J. Biosyst. Eng.* 42, 339–349.
 68. Hui, F., Zhu, J., Hu, P., Meng, L., Zhu, B., Guo, Y., Li, B., and Ma, Y. (2018) Image-based dynamic quantification and high-accuracy 3D evaluation of canopy structure of plant populations. *Ann. Bot.* 121, 1079–1088.
 69. Gnädinger, F. and Schmidhalter, U. (2017) Digital counts of maize plants by Unmanned Aerial Vehicles (UAVs). *Remote Sensing* 9, 544.
 70. Aich, S., Josuttes, A., Ovsyannikov, A., Strueby, K., Ahmed, I., Duddu, H.S., Pozniak, C., Shirtliffe, S.,

- and Stavness, I. (2018) DeepWheat: Estimating Phenotypic Traits from Crop Images with Deep Learning. in *Proc. 2018 IEEE Winter Conf. Appl. Comput. Vision*, WACV 2018, 323–332.
71. Liu, T., Yang, T., Li, C., Li, R., Wu, W., Zhong, X., Sun, C., Guo, W. (2018) A method to calculate the number of wheat seedlings in the 1st to the 3rd leaf growth stages. *Plant Methods* 14, 101.
72. Liu, S., Baret, F., Allard, D., Jin, X., Andrieu, B., Burger, P., Hemmerlé, M., Comar, A. (2017) A method to estimate plant density and plant spacing heterogeneity: Application to wheat crops. *Plant Methods* 13, 38.
73. Kipp, S., Mistele, B., Baresel, P. and Schmidhalter, U. (2014) High-throughput phenotyping early plant vigour of winter wheat. *Eur. J. Agron.* 52, 271–278.
74. Wang, X., Singh, D., Marla, S., Morris, G. and Poland, J. (2018) Field-based high-throughput phenotyping of plant height in sorghum using different sensing technologies. *Plant Methods* 14, 53.
75. Hasan, M. M., Chopin, J. P., Laga, H. and Miklavcic, S. J. (2018) Detection and analysis of wheat spikes using Convolutional Neural Networks. *Plant Methods* 14, 100.
76. Xiong, X., Duan, L., Liu, L., Tu, H., Yang, P., Wu, D., Chen, G., Xiong, L., Yang, W., and Liu, Q., (2017) Panicle-SEG: A robust image segmentation method for rice panicles in the field based on deep learning and superpixel optimization. *Plant Methods* 13, 104.
77. Falconer, D.S. and Mackay, T.F.C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th Edition. Burnt Mill, England: Longman, U.K.
78. Deshmukh, R., Sonah, H., Patil, G., Chen, W., Prince, S., Mutava, R., Vuong, T., Valliyodan, B., Nguyen, H.T. (2014) Integrating omic approaches for abiotic stress tolerance in soybean. *Front. Plant Sci.* 5, 244.
79. Ledford, H. (2017) Robots stop to smell the flower. *Nature* 541, 445–446.
80. Rutkoski, J., Poland, J., Mondal, S., Auriague, E., González Pérez, L., Crossa, J., Reynolds, M., and Singh, R., (2016) Canopy temperature and vegetation indices from high-throughput phenotyping improve accuracy of pedigree and genomic selection for grain yield in wheat. *G3(Bethesda)* 6: 2799–2808.

Genomic selection and high-throughput phenotyping to increase the efficiency and speed of crop breeding

Wei Guo, Hiroyoshi Iwata*

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

表紙の紹介

南極露岩域に生育する光合成生物の光阻害の波長依存特性

¹ 中央大学 理工学部生命科学科 (現所属)

² 大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立極地研究所

小杉真貴子^{1,2,*}、小池裕幸¹、伊村智²

氷河の後退によって形成された南極露岩域の陸上環境は低温や凍結、乾燥といったストレスに晒されており、生物にとって極限環境のひとつである。こうした環境には優れた乾燥耐性を有する地衣類や蘚類、気生藻、陸棲ラン藻が優占して生育しており、一次生産者として重要な役割を担っている。私達は南極の陸上光合成生物の適応戦略とその多様性を明らかにするため、生育環境の観測と生理学的実験手法を用いて解析を行ってきた。特に、ストレス環境下において光合成効率低下の大きな原因となる光阻害に着目している。

表紙の風景は、東南極地域に位置するラングホブデのユキドリ沢の晩夏 (1月末) の様子である。緑藻ナンキョクカワノリ (*Prasiola crispa*)、地衣類ネナシイワタケ (*Umbilicaria decussata*)、蘚類ヤノウエノアカゴケ (*Ceratodon purpureus*) が生育するユキドリ営巣地に観測点 (赤旗の場所) を置いて微気象観測を行うと共に¹⁾、持ち帰った3生物試料を用いて生理学的解析を行った。基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて光化学系 II における光損傷の反応係数を測定し、光感受性の波長依存性を3生物で比較したところ、光感受性とその波長依存性は大きく異なっていた。最も光感受性が高いのは *P. crispa* で、吸水時の紫外線に対する光損傷の反応係数は地衣類の7倍以上であったが、乾燥状態では紫外線による光化学系 II の光損傷が著しく軽減することが分かった²⁾。波長ごとの反応係数から生育環境下での太陽光スペクトルに対する光損傷の速度定数を算出し、光感受性の違いが生態学的な振る舞いに与えている影響を考察した。

その詳細について、2019年4月号の解説記事にて報告する予定である。

*kosugi@bio.chuo-u.ac.jp

参考文献

1. Kosugi, M., Kurosawa, N., Kawamata, A., Kudoh, S. and Imura, S. (2015) Year-round micrometeorological data from the habitats of terrestrial photosynthetic organisms in Langhovde, East Antarctica, during 2013. *JARE Data Rep., Terrestrial Biol.* 8, 1-99.
2. Kosugi, M., Maruo, F., Inoue, T., Kurosawa, N., Kawamata, A., Koike, H., Kamei, Y., Kudoh, S. and Imura, S. (2018) A comparative study of wavelength-dependent photoinhibition of drought-tolerant photosynthetic organisms in Antarctica and the potential risks of photo-damage in the habitat. *Ann. Bot.* in press. doi: 10.1093/aob/mcy139.

特別企画：若手研究者の海外留学レポート！

第5回「修行 in ボストン」

Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology (USA)
The Schlau-Cohen Lab.
東北大学大学院 理学研究科 (現所属)

近藤 徹

今回、海外での研究体験談を紹介する機会をいただきました。海外に出る若手研究者が減ってきているとの話もあり、留学の1つの例として参考になればとの思いから、僭越ながら執筆させていただきます。

簡単に自己紹介すると、学生時代は名大理物で光合成反応中心 (RC) の電子スピン分光解析を行い、学位を取得しました。その後、学振 PD として東工大理物へ移り、RC の極低温 1 分子分光を始めました。任期満了に伴い、アメリカ・ボストンにある MIT 化学へ移り、ポスドクとして光合成アンテナタンパク質の常温 1 分子分光解析を行いました。3 年 5 カ月間 (2015/5~2018/9) を MIT で過ごした後、東北大理化へ異動し、現在は光合成超高速光反応の 1 分子観測に取り組んでいます。

海外での研究経験の紹介が本企画の趣旨だと思いますので、ここでは研究内容などの堅苦しい話は抜きにして、個人的な体験談を中心に書かせていただきます。数ある例の 1 つに過ぎませんが、今後、学生さんや駆け出しのポスドクが外国へ飛び出すきっかけとなってくれたら幸いです。

1. 海外で研究することのメリット

まず、何よりも、わざわざ苦勞してまで海外へ出る必要があるのか、という疑問が湧くかもしれない。研究施設や環境、もっと端的に言えば得られる成果、を考えると、もしかしたら日本に残った方が有利かもしれない。また、今後のキャリアを日本国内で考えている場合は、日本で着実に人脈を作っていくのも一つの手だろう。しかし、それでも私は、一度は海外に出るべきだと主張したい。その理由は明快で、単純に度胸が付くからである。研究で必要となる技術や知識、論文をまとめる能力、または学生の指導経験など、研究者として必要とされる要素はいくつかあるが、こと度胸に関しては、若い時に身に付けておかないと二度と得られないのではないだろうか。そして、個人的には、研究者にとって度胸 (又は気概)こそ最も重要な要素のように思う。胆力がない人間に世界をリードする研究なんてそもそも無理だろう。また、度胸・気概がある者同士で議論しないと、研究話もつまらない。楽しく議論できる仲間は多いに越したことはないので、精神修行という意味も込めて是非とも一度は海外に出てみては！？、とお勧めする次第である。

2. 一口に海外に出ると言っても、、、

海外で研究すると言っても、海外の大学で ph.D 取得を目指すか、ポスドクとして働くか、によって状況は大きく異なる。過去の執筆者の方も指摘されているように、将来的に海外で PI としてラボを運営したいのであれば、海外の大学に学生として入学して ph.D を取るべきである。MIT でも ph.D 取得に向けて切磋琢磨している学生さん達と話す機会があったが、みんな意欲的に研究に取り組んでおり、互いに刺激になることは間違いない。具体的に興味がある方は、直接コンタクトを取って情報を仕入れてみることをお勧めする。ここでは主に、私自身の経験を基に、ポスドクとして働くことを念頭に置いて話を進めたい。

ポスドクとして海外に出るパターンは大きく分けて 3 つある。1 つ目は、海外学振や海外派遣助成などを獲得し、自分でお金を持って行く、パターン①である。(申請が通るかは別として) 最もメジャーな方法であり、ラボも自由に選択できる。2 つ目は、出身ラボのボスなどに紹介してもらい、パターン②である。信頼の置ける受入ラボを探せる点で大きなメリットがある (受入ラボをミスると大惨事になり兼ねないので、この点は重要である)。3 つ目は、自力で探す、パターン③である。学会に参

加したり、直接ラボを訪問し、自身を売り込む。周りにいた外国人ポスドク達を見ると、ほとんどがパターン③であった。MITの所属ラボでも、1~2カ月に一人くらいの割合でポスドク候補者のセミナーが開かれ（直接訪問してくる場合もあれば、Skype越しでやる場合もある）、雇うかどうかPIと話し合うことも多かった。日本からだ①か②のパターンが多いと思うが、いざとなれば③もある。その気になればどうにでもなるのである。

一方で、受入研究室の選択肢は、(A) 大御所ラボ、(B) テニユア取得後の中堅ラボ、(C) テニユアトラック中の若手ラボ、と概ね3つに分けられる。Aは蓄積したノウハウがあるため、興味が合うテーマをやってれば良い選択だろう。Bは勢いがある場合が多く、最先端の知識や技術に接することができる。世界初の挑戦的なテーマに取り組むには最良かもしれない。Cは鬼気迫る環境に身を置けるので、修行するにはもってこいである。PIとも頻りに議論することになるので、強固な信頼関係を築ける。

以上のように、海外にポスドクとして出る場合、出方が3通り、受入先のラボ選びで3通り、の計9つの組み合わせが考えられる。私の場合は、出方③+ラボCの道を選んだ。世界最先端の装置や技術をいきなり使えたわけではないが、若手PIと共にラボを立ち上げながら研究を進めて行く経験は、他では得難いものである。どのパターンもメリット・デメリットがあると思うが、③+Cの組み合わせは中々に面白かった。以下、冗長ではあるが、それらの経験談を書き連ねたいと思う。

3. 背水の陣からの渡米

2014年の秋、私は結構焦っていた。学振PDの任期も半年後には切れるという状況なのに、次に行く当てがなかった。そんな折、国際学会（ゴードン会議）がイタリアで開催されることがわかり、職探しに出かけることにした（もちろん発表もした）。学会だけではもったいないので、ドイツとオランダのいくつかの研究室にアポを取って訪問し、雇ってもらえないか直訴してみた。結局、研究室訪問は様々な理由（雇うお金がない、ラボの引っ越しでそれどころではない、など）により功を奏さなかったが、学会では大きな出会いがあった。自分の興味にピッタリと合うポスター発表を見つけ、眺めていたら、右上に小さな付箋を見つけたのだ。新しくラボを開くのでポスドク募集中、と書いてある。これを逃す手はない。そこで、発表者を探し、ポスター発表を聴き、とりあえずGreat workだと褒め、早々に本題（雇ってほしい）に入った。下手な英語など気にもせず、とにかく熱意を伝えた。時として決死の覚悟は言語の壁を超えるのである。帰国後、長めのcover letterにCVやreference letterを添付して送り、Skype面接を経て、何とか雇ってもらえることが決まった。これが、MIT時代のボス・Gabriela Schlaue-Cohenとの出会いである。

いきなり現れた面識もない東洋人をよく雇ってくれたなあ、と今でも感謝するばかりである。この点に関して、Gabriela（親しみを込めて敬称略）が日本人に対する理解を持ってきてくれたことが、大いに助けとなった。まず、彼女が学生時代に同僚だった日本人の学振ポスドクがえらく優秀だったということ。私がJSPS研究員だと伝えたら、JSPS研究員は優秀だ！、と大いに興奮していた。全部が全部じゃないですよ、と多少自虐の念を抱いたが、その時は背水の陣を敷いていたので、ですよ！（Exactly!）、と軽く流すにとどめた。Skype面接でも、英会話に関する話題になった際、ダメダメな英語を話す身として不安になったが、日本の英語教育システムが良くないのよ！、みたいなことを言ってくれたので、ですよ！（Exactly!）と上手く乗っかることができた。そんなこんなで、めでたく渡米の道が開けたのである。

4. ちょっと厳しくないですか！？

Gabrielaはいつもニコニコしている。MITの彼女のオフィスで初顔合わせをした時も、日本からのフライトはどうだった？、みたいな雑談をニコニコと話しかけてきた。感じの良い方ではないか。で、次に出てきた言葉は、今日中に顕微装置の開発に必要な物品を全部注文しといてね、だった。IDすらまだ貰っていないのに御冗談でしょうガブリエラさん、と本気で思ったので、当然ジョークだと解釈し、okay no problem!、と軽く流した。それから数日間は事務手続きで多少慌ただしかったものの、空き時間にキャンパス内を散歩するなど充実した日々を過ごした。なんて長閑なところだろう、素敵な町ボストン。ただし、そんな優雅な日々も4日目には脆くも崩れ去るのである。

金曜の夕方、静寂に包まれたオフィスに激しい足音が響いた。ドアを開けるとGabriela。明らかに苛立っているようだったので、素朴な質問を1つ、どうされましたか？。彼女は早口で、何故注文を終わらせていないんだ！？1週間も無駄にしたんだぞ！ちゃんと理解してるのか？、と捲し立てた。ジョークだと思っていた旨を正直に伝えると、脱力したのか、できるだけ早く注文を終わらせてくれ、と言いつつ残し去っていった。その時は多少面を食らったが、全面的に彼女が正しい、と今では理解でき

る。テニュアトラック中の若手 PI は必死である。彼女たちも数年後には厳しく審査され、PI としての実績を評価されなければ MIT を去るしかない（テニュアに残れるのは 30% 程度らしいので狭き門である）。それ以降、気持ちを引き締め、こちらも必死に頑張ることにした。

5. ラボを立ち上げる

初期メンバーは 4 名（Gabriela、同僚ポスドクの John、院生の Ashley、そして私）である。実験室には光学定盤以外に何もなかった（図 1）。兎にも角にも実験装置を立ち上げないといけない。しかし、問題はそれだけではない。Grant 獲得にも寄与しなければいけないのである。Gabriela から、来年以降の雇用契約は今年の Grant 次第と言われていたので、こちらも必死である。というわけで、最初のミッションは、3 カ月後の Grant 申請までにデータ（単一 LH2 の蛍光顕微画像）を 1 つでもいいから取得することとなった。ここで一番の弊害となったのが、物品の納期である。遅い！遅すぎる！とにかく早くしてくれ！、と業者に何度掛け合ったかわからない。時には情に訴えかけ（あなた方の納期如何によってはポスドクが不幸になることもあるのですが理解してくれていますか？、など。案外有効だった。）、とにかく結果を出した。その後、何度も Grant 申請に向けたデータ収集をこなし、Gabriela も様々な Grant を獲得してくれた。とにかく、首の皮一枚つながったわけである。

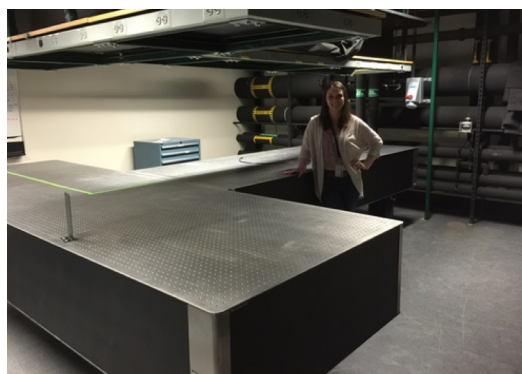


図 1. 着任当時のレーザー実験室 更地の光学定盤と第一期の学生さん。実際は、ここに新品のレーザーが一台置かれていた。

そこで次の課題は、ちゃんとしたサイエンスとしての仕事をまとめることである。最初はかなり挑戦的なテーマに取り組む予定であったし、その準備を進めていた。しかし、実験室の引っ越し（つまり、装置をばらして一から再構築）が半年後に決まり、Gabriela と相談の上、とりあえずは引っ越しまでにまとめられる軽めのテーマにしよう、ということになった。それから半年間、引っ越しの日の朝ぎりぎりまでデータを取り続けた。その後、データ解析や原稿執筆などで少し時間はかかったが、何とか論文まで漕ぎ着けた。着任から論文アクセプトまでの 2 年間は本当に忙しかった、と今でも思う。しかし、これが Schlu-Cohen ラボで初めてのオリジナル論文となり、とにかくホッとしたことを記憶している。多分、Gabriela もホッとしたに違いない。現に、それ以降、格段に優しくなった。

6. ポスドクは研究のプロフェッショナル

議論の際、相手の意見を尊重するのは非常に大事である。一方、研究に関しては、主張すべきところはしないとけない。この点に関して Gabriela と一悶着あった。光合成系の 1 分子分光研究に関する総説論文を作成中、それは起こった。レビューなので過去の論文を広く紹介しないとけない。そこで私は、データ解析に関する論文を出来るだけ集めてグループ分けし、総説の 1 セクションとしてまとめ上げた。我ながら素晴らしい出来だと感心していた。しかし、その部分に Gabriela はクレームを付けてきたのだ。彼女曰く、これまで光合成研究に使われたことのない解析法は総説の趣旨に反するので載せるべきではない、とのこと。これに私は反発し、これまで使われていないからこそ紹介すべきだ、と主張した。心底そう思ったので、こちらから引く気は毛頭なかった。業を煮やした彼女は、1 日じっくり読み直してから再考し無駄な部分を削ってから明日再度送ってこい、との指示を出した。私はその指示に従い、翌日、読み返したけどパーフェクトだったので削るところが無かった、と一文添えて一字一句そのままの原稿を送り返した。そして振り出しに戻るのである。こんなやり取りを繰り返すうちに、年末に差し掛かり、かねてから予定していた通り、私は日本に帰省した。その隙を縫って彼女は動いた。投稿期限が迫っているのをいいことに、独自に編集して投げてしまったのだ。謀ったな、ガブリエラ！心中穏やかではない。折角の年末年始が台無しである。最終的に納得はしたもの、突然のパワープレーに驚きを禁じ得ないのである。このように、PI と意見がぶつかることはままある。しかし、あくまでも研究者としての衝突であり、個人的な軋轢とは受け取られないのである。実際、この事で関係がギクシャクすることなど全くなかった。日本人は得てして主張することに不慣れであるが（そこが良いところでもあるのだが）、ポスドクは研究のプロとして雇われているので、研究に関する主張で臆することは何もない。

7. テンション高めの学生たち

新しいラボに着任したので、当然、蓄積されたノウハウは何もないわけである。従って、学生はポスドクが直接指導しなければならない。この点は欧米でもラボによって作法が異なるようである。MIT の他のラボでは学生もポスドクも互いに独立し、問題や質問がある場合にのみ手を貸す、というのが普通であった。一見、ポスドクにとって、学生指導は重荷のように思われるが、個人的には非常に楽しいものだった。彼らはとにかくテンションが高いのである。何度ハイタッチを強要されたか分からない（ちなみに、日本でハイタッチをしたことは一度もない）。何か信号が見えたと、Hey!と言ってハイタッチ&大はしゃぎである。経験上、アーティファクトかどうか何となく分かる身としては、喜ぶ前にまずゴミ信号かどうかチェックして、と指示を出さざるを得ない。数時間後、落胆し肩を落としながら帰宅していく姿を何度も見た。さっきまでの元気は何処へやら。一方で、何度も失敗して半ばヤル気を失いかけてる学生さんが、ちゃんとした信号を見つけた時は、こちらも単純に嬉しいのである。とにかく、彼らの一挙手一投足は見ていて楽しい（図2）。いずれ彼らも立派な研究者になるだろうから（アメリカの院生は基本的に全員が博士号を取りに来ており、中間試験にパスできなかった者が修士卒になる）、今後の交流も非常に楽しみである。

ちなみに、学生やポスドクと打ち解ける際はジョークが有効であることを付記しておく。特にPIイジリは鉄板である。巨大な力を前に結束力が高まるのは、古今東西変わることのない普遍の真理である（赤壁の戦い然り、薩長同盟然り）。英語だとちょっと、、と心配される方もいらっしゃるかもしれないが、伝わるか伝わらないかは問題ではない。気にせずガンガン言い続けるのが肝心である。そのうち、何言ってるかよくわからないけど良い奴、という称号が与えられるはずである。そうなったらもう占めたものである。また、PI から叱咤され、時に罵倒されることがあっても、ジョークで笑い飛ばす度量を示すことが重要である。打たれ強い東洋人という新たな称号が加わり、信頼は不動のものになるだろう。

8. 世界各国から人が集まる：not Global, but International

MITには世界中から人が集まってくる。ラボのポスドクや学生を見ても、カナダ、スペイン、スコットランド、イタリア、インド、韓国、ネパール、日本、など出身国は様々である（図3）。共同研究者も、フランス、フィリピン、中国、など多彩な人種が集まっていた。常用語は当然英語である。私自身、英語は苦手だったが、論理立ててしっかり話せば、皆ちゃんと聴いてくれる。この点に関して印象的な出来事があった。ある時、流暢な英語（私からすると）を話すポスドクがラボにやってきたが、ネイティブの学生さんの評価は非常に低かった。聞いてみると、自分の主張ばかりでつまらない、頻繁に論理が飛ぶのでフォローできない、とのことだった。言語に関わらず、コミュニケーションの取り方は基本的にどこも同じである。つまり、人の話を聞いて、それについて論理立てて誠実に返答する。それさえできれば、さして気を張る必要もないように思う。とは言え、言語が全く分からないと結構シンドイ思いもする。以前ドイツに留学した際、ラボには外国人が自分一人だけだった。そのため、ラボ内はドイツ語が飛び交っており、かなり苦戦を強いられた経験がある。というわけなので、国際性豊かなラボの方が居心地は良いかもしれない。

いろんな国の人達と接する場では、自分の作法を無理に変えるより、相手に理解してもらう方が楽である。例えば、日本人独特の曖昧なYes（つまり、No）。Gabrielaは日本人との交流経験が豊富だったためか、そこら辺のニュアンスを理解してくれているようであった。ある時、ラボミーティングで、Toru（私）のYesは時としてNoを意味するから各自気を付けるように！、との注意事項が伝達されたことがあった。同僚ポスドクからは、なんではっきりNoと言わないんだ？、と困惑顔で真面目に質問



図2. ラボのメンバーとMIT内のバーにて 研究室から徒歩数分のところにバーがあり、頻繁に飲んでた。ここでラボミーティングをやることもあった。筆者にとっては思い出深い場所である。



図3. ラボのメンバーと近くのレストランにて筆者の送別会を開いてもらった時の写真。メンバーは各々様々な国からやって来ている。筆者(右列中央付近)からテーブルを挟んで向かい側に座っているのがボスのGabrielaである。

9. 日本各地から人が集まる：超異分野間交流

ボストンエリアには、MIT、Harvard、Boston University、Boston College、Tufts University、Northeastern University などなど、とにかく沢山の大学が密集している。そのため、日本から来ている研究者の数もかなり多い。大学からだけではなく、企業や官庁からも様々なバックグラウンドを持つ人達が集まっている。日本人研究者による月一講演会も催されており、日本では知り合うことがなかったであろう方々と交流することもできる。私は極端な人見知り体質なので、そういった場にはほとんど参加しなかったが、それでもMITで働くポストドクや客員で来られている若手研究者の方々と触れ合う機会が多かった。各々明確な目的意識を持っており、話しているだけでも面白い。また、これまで見聞きすることすらなかった異分野の方々と、本気で研究の話ができた(図4)。この点は、今後の研究者人生にとって最大の収穫だったと思う。実際、これらの雑談からスタートした研究計画がいくつもあり、現在進行中のものも多い。MITには学内者向けの専用バーが併設されており(図2)、夜な夜な集まって話ができる。ビール片手に議論に花を咲かせた日々は、最高の思い出として記憶に残っている。

されたが、文化的でエッセンシャルなことだから理解してくれ、と宥めるのである。ただ、No を意味する Yes の場合は眉間にしわが寄って10度ほど首を傾けることが多いから簡単に見分けられるよ、と実演して見せたら、彼もナルホドと言っていた。納得してもらえたに違いない。これこそ相互理解であろう。ちなみに、最近流行りの Global という言葉は嫌いである。Global 化 = 均一化・画一化である。もちろん、郷に入れば郷に従えという言葉があるように、相手方の作法を理解し敬意を払うことは当然であるが、譲れない部分まで譲る必要はない。お互い理解できない、ということを理解すれば十分な場合も多いのである。これこそ国際的(International)なお付き合いというものだろう。

様々な国からやって来たポストドク達と、将来展望について話す機会も多かった。行く行くは自分の国で働きたいと考えている人が予想以上に多く、驚かされた。ただ、母国の高等教育システムはまだまだ貧弱なので最先端の研究は出来ない、と肩を凍める人も結構多い。その点、日本は恵まれていて羨ましいとのこと。問題点ばかり取り上げて、揚げ足取りに終始する風潮が蔓延してしまった昨今、少し立ち止まって日本のアカデミアの良い点(良かった点!?)を見直してみてもはどうだろうか、と考えさせられた次第である。



図4. MITで知り合った日本人のポストドク仲間

ガチで研究討論会をしようと有志が集まり、夜な夜な遅くまで議論した時の写真。一人当たりの発表時間が3時間近くになることもある、とにかく質問しまくりの会だった。長丁場を飲みながら耐え、睡魔に負けた者から脱落する(中央の人)。化学・物理・生物などの自然科学分野だけでなく、組織マネジメントの専門家まで、多種多様な研究者が集った。これ程楽しい会は、そうは無いだろう。是非とも今後も続けていきたい。

10. 思考の基本はやっぱり日本語

読んで字の如くである。自分の考えや感覚を、論理的にだけでなく、情緒的な言葉まで交えて表現できることは何よりも大事である。そして、言語レベルは研究レベルに直結する。真に深い研究をするには、思考能力＝表現力＝言語能力を研ぎ澄ませる他ない。別に何の言語を用いても構わないが、日本人にとっての第一言語はやはり日本語である。日本人が英語で思考し、ネイティブのレベルまで到達する又は凌駕することは可能だろうか？。海外でも一流の研究者として活躍されている日本人の方々が沢山いらっしゃるので一般化はできないが、私は非常に難しいように思う。少なくとも、私のような凡人には到底無理な話である。日々英語でやり取りしていても、いざ議論を戦わせる際には深い思考が必要となり、複雑な論理を組む際には日本語に頼らざるを得なかった。世の中のほとんど全てが凡人であることを鑑みると、英語で薄っぺらい議論ができるようになるよりは、日本語能力を研ぎ澄ましてより深みを目指す方が随分とマシなのではないか、と心底思うわけである。

11. 日本とアメリカ、研究システムの比較

アメリカの若手PI達と一緒に仕事をしていて少し羨ましく思った点を述べておく。まず、ラボの立ち上げ資金。大学にもよるとは思うが、スタートアップパッケージとして1億円近くの援助が貰える。学生に支払う給料分を差し引いても、非常に魅力的な額である。学生数を抑えて装置開発にお金を回すなど、自由度も高い。この点は日本と大きく異なる。同僚ポストドクと将来プランについて話していた際、日本のスタートアップ助成に関する話題になった。基本的には300万円位を申請できると教えて、良い消耗品が揃えられそうだな(笑)、と皮肉が返ってくるのである。つまり、まともにやり合っても勝てない。では、どうするか。やはり、アイデアで闘うしかない。しかし、アイデアを実現するにも元手が必要なのである。残念ながら日本では、アイデアだけでは研究費を獲得し難い。これまでの経験や習得してきた技術の粋を出るようなアイデアは、いくら面白くて重要そうに見えても、中々お金が出ない(最近はずいぶん変わってきているみたいだが)。そうすると、過去の業績で勝負することになり、既定路線から飛び出し難くなる。この点、アメリカのPI達はとことんアイデアで勝負しているように見えた。人件費を見越した予算が付くため、これまでに蓄積のない技術や経験のない分野でも、ポストドクを雇うことで遣り繰りできる。例えば、近くの理論研究室では、実験的なアプローチも始めたくなってきたみたいで、実際に予算を獲得し、実験系のポストドクを揃え、計画を実行に移していた。PI自身は理論家であり実験系には不慣れたため、一緒に働くポストドクは難儀していたが(PI:なんでそんなデータも出せないんだ!→ポストドク:無理に決まってるだろ!一度自分でやってみろよ(怒)、みたいなやり取りの愚痴をよく聞かされた)、数年後には面白い結果を出してくるのである。ポストドクが使い捨てにされてる感は否めなかったが、民間企業へのパスも大きく開かれているので、食いつぶされることはない。このように、研究に対する考え方や研究環境・システムは、野心的なテーマに挑戦しやすそうに見えた。

一方で、1つのテーマを深く掘り下げる、と言った雰囲気は希薄に感じた。目新しい物に飛び付く、と言ったら語弊があるかもしれないが、ゆっくりじっくり考えているのか疑問に感じることもしばしばであった。この点は、日本のやり方の方がよっぽど立派に見える。PIが各自で独立しネットワークの軽いアメリカ型と、教授から助教までを1つのラボでまとめて連携する日本型、当たり前だが一長一短である。はてさて、どちらが良いのだろうか？

考慮すべきは研究のフェーズであろう。ここで、研究には2つのフェーズがあると考えられる。1つ目は、世界中の研究者が共通の問題意識の基、各々の分野から一点突破を目指すフェーズである。それぞれのグループが穴を深く掘り進め、問題となる岩を突き破る、云わば縦掘りのフェーズである。しかし、目に見える問題があらかた片付くと、最終的に行き着くのは巨大な岩盤である。そこで、果たしてここは最深部なのだろうか？と考え、他に掘れる場所がないか探しだす横掘りフェーズに移行する。つまり、これまで全く関わり合いのなかった異分野間で連携し、問題自体を探し出すフェーズになる。研究の流れはこの2つのフェーズで循環する、と考えられる。恐らく、日本の伝統的なやり方は、一点突破の縦掘りフェーズに適している。しかし、現在は、明らかに横掘りのフェーズが来ている。異分野間で連携が取りやすく、挑戦的なテーマに寛容な、アメリカ型のやり方がマッチしているように思う。日本としては、来るべき縦掘りフェーズに備えて本来の強みを残しつつも、異分野間での連携意識を高めて急場を凌ぐのが最善の策だろう。間違っても、日本型を完全否定しアメリカ型をそのまま劣化コピー、なんて間の抜けた愚策は取るべきではない。

12. 外の空気も吸いましょう！

反省点も1つ書いておく。単刀直入に言ってしまうと、ラボに入り浸り過ぎた。折角アメリカまで来たのに、観光というものをほとんどしなかった。とにかく忙しかったのもあるが、余裕ができたら行こう、と甘い考えでいたのが最大の敗因である。余裕は自発的にできるものではない。エネルギーを使って無理やりにも時間を空けなければ、余裕は生まれにくい。花の都ニューヨーク、圧巻の滝ナイアガラ、一度はこの目でグランドキャニオン、光合成細菌の郷イエローストーン、どこも行けてない。心を鬼にしても観光すべきであった。猛省せざるを得ない。

滞在先のボストンは、アメリカでも屈指の学園都市である。つまり、本来のアメリカではない。生のアメリカ文化やその現状を知るには、観光地だけでなく、地方都市なども巡る必要があるだろう。ボストンにいる限りは、自分がアジア人であることを意識することもなかった。しかし、地域によってはアメリカの生の声・姿に接することができたかも知れない（もちろん危険な地域は必ず把握しとく必要がある）。そういった研究以外の知的好奇心は、今回の渡米で満たすことが出来なかった。再度、猛省である。

13. 最後に

今回のアメリカ留学は無事に終わることができ、現在は日本で研究を続けている。冒頭にも書いたが、海外での研究生活を通して、精神的に随分と鍛えられたと実感している。正直なところ、日本にいても結果は出せるし、分野によっては海外に出るよりも良い論文が書けるのかもしれない。しかし、そういった事は長い人生を考えれば些末な事ではない。若いうちに一度は慣れない土地や文化に触れながら、研究生活を送ってみるのも一興である。研究者としてのキャリア形成にプラスになるかは正直分からないが、間違いなく貴重な人生経験となるだろう。

最後になりましたが、ポスドクとして快く受け入れてくれ、海外で研鑽を積む機会を与えてくれた **Gabriela** には心の底から感謝の意を表します。本稿では随分と茶化した表現を用いたが、それもジョークと笑い飛ばしてもらえよう。今後、学会か何かで、互いに個性的な研究者として相まみえることができれば幸いである。ちなみに、日本で見所のある学生を見つけたら MIT に派遣する旨を伝えてあるので、我こそはと思う方は是非とも連絡されたい。

今回このような記事を学会誌に寄稿する機会を与えて下さった、光合成学会若手の会の清水隆之さん、渡辺麻衣さんには、この場を借りて深く御礼申し上げます。しがたないポスドクの他愛もない海外研究体験談でしたが、後に続く熱意溢れる若手研究者の背中を少しでも後押しできることを願い、締めめの言葉とさせていただきます。駄文散文にお付き合いいただきありがとうございました。

toru.kondo.c8@tohoku.ac.jp

報告記事

The 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis 参加報告

基礎生物学研究所 環境光生物学部門
キム ウンチュル

2018年8月19–22日に中国の北京で開かれた 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis に参加してきました。本会議は、3年周期で開催される International Congress on Photosynthesis が4年周期に変更され、研究交流ができない期間が長くなってしまったことを補うために開催される会議です。ヨーロッパ、アメリカ、アジア-オセアニア地域会議はそれぞれ4年周期で同じ年に開催されます。今年のアメリア会議とヨーロッパ会議はそれぞれ、今年7月と8月に開催されました。

本会議は、9つのセッション(Light harvesting and photosynthetic electron transfer, Carbon fixation and metabolism, Photosynthetic membrane protein complex structure and function, Biofuels and artificial photosynthesis, Biosynthesis and assembly of photosynthetic apparatus, Perception of environmental stresses and signaling, Photosynthetic gene expression, Ecophysiology and other applications, Crop yield improvement and agricultural biotechnology)で構成されており、Plenary Lecture 7 演題、口頭発表 52 演題、若手研究者発表 5 演題、ポスター発表約 70 件などアジア-オセアニア各国の光合成の分野をリードする研究者の発表がありました。参加者は約120名であり、約4割が日本人、約5割が中国人でした。

国際光合成会議と比べ、本会議は、基礎メカニズムの研究より応用の研究が多かったです。特に、中国、オーストラリア、韓国、ニュージーランドの研究者からの発表は応用研究が中心でした。それぞれの国で、光合成研究において異なる視点を持っていると感じました。

私は、本会議にて、今まで基礎生物学研究所で研究した結果を、“Photoprotection mechanisms of LHCSR in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*”というタイトルで発表しました。緑藻の光防御メカニズムに重要な役割を持っている LHCSR1 と LHCSR3 (Light-harvesting complex stress responsible protein1 と 3) の機能を解明する研究 (Kim et al., JBC 2017, Kosuge et al., PNAS 2018) と、光化学系タンパク質複合体のような膜タンパク質複合体の各サブユニットの結合の強さを分析するための新しい分析方法を開発し、膜タンパク質同士の結合の強さという新たな視点での分析を可能にした研究 (Kim et al., JPCB 2018) をまとめて発表しました。植物研究者と比べて緑藻研究者は比較的少ないので、緑藻が植物と全く異なるメカニズムを持っていることに興味を持ってくれた人が多かったです。

本会議の特徴は、国際光合成会議と比べて規模が小さくなったことにあると思います。会場の数が減ったおかげで（本会議は2会場：国際会議は4会場）、自分の分野と距離がある分野の発表も聞くことができ良かったです。また、他の研究者との交流がより促進されたと思います。これにより地域的に近い研究者との共同研究がさらに活発になるものと期待されます。そして、中国の特色があらわれる会議場の雰囲気と印象的だったガラパーティーが記憶に残りました。

次の第2回会議は2022年に日本で開催されるとの事なので、非常に楽しみです。



会議場外部(The Friendship Hotel)



メイン会議場



ガラパーティー(京劇公演)



ガラパーティー

Photographed by 寺村美里(立命館大学)

報告記事

第1回アジア・オセアニア国際若手の会開催報告

東京大学 総合文化研究科 助教
神保 晴彦

8月23日に開催された初のアジア・オセアニア国際光合成若手の会は本会議である1stAOICPのプログラムの一部に組み込まれ、ポスター発表者によるショートプレゼンテーションと5人の若手研究者による口頭発表を行いました。日本からは民秋研（立命館大学）のD3寺村美里さんと彦坂研（東北大学）のD1辻本克人さんが、新学術「新光合成」の支援を受けて、口頭発表しました。また、中国から2人、オーストラリアから1人が口頭発表を行いました。ポスター発表の前にはショートプレゼンテーションを行い、十数名の若手研究者が口頭で研究内容を発表しました。ポスター発表は74演題が登録されていたものの、驚くべきことに数十演題ほどしか実際には張り出されず、ショートプレゼンテーションも残念ながら思ったほどの盛り上がりとはなりません。こうしたポスター発表における研究姿勢や、発表スライドを写真撮影する姿勢にはとても驚かされました。

私は、初のアジア・オセアニア国際光合成学会が中国でやると決まった時、日本光合成学会若手の会幹事として、国際光合成若手の会を絶対に主催しなければならないと思いました。中国はサイエンスにおいて確実に存在感が高まっています。若手の研究者レベルで交流を行うことで、将来的にはアジアにおける存在感を共有する必要があると考えられます。今回の国際若手の会は、初めての試みで非常にチャレンジングであったこともあり、改善点も見受けられました。しかし、このような会が開催できたこと自体が、これからアジアで日本の若手研究者がアピールしていくための、大きな第一歩だと考えています。

初めて国際的な若手の会を開催する上で、多くの方々のご協力とご支援を賜りました。特に新学術「新光合成」の先生方には日本人若手研究者の旅費等を支援いただき、心からお礼を申し上げます。今後もこうした国際的な光合成若手の会を推進していくつもりです。諸先生方には、またご迷惑をおかけする部分もございますが、どうか暖かく見守っていただけると幸いです。また、国内においても日本人だけでなく留学生を巻き込んで光合成学会若手の会を盛り上げていく予定ですので、どうか若手の方々も共に盛り上げていただければと思います。



発表者および若手の会のオーガナイザー（私は右から3人目）

報告記事

International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 参加報告

京都大学 生命科学研究所
石川 規子

2018年11月7日から10日まで、岡山の倉敷国際ホテルと倉敷市民ホールにて、国際シンポジウム「International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis」が開催されました。国内内外の著名な研究者を招いて、25名の招待講演者と116題のポスター発表があり、参加者175名と大変な盛況となりました。会場には若い研究者の姿が多く見られ、海外、特に中国から多くの方が来られていた印象を持ちました。

初日は Plenary Lecture として、京都産業大学の遠藤斗志也先生と、岡山大学の馬連峰先生からご講演がありました。遠藤先生のご講演は、ミトコンドリアへのタンパク質や脂質の輸送装置に関するもので、ミトコンドリアは葉緑体とともに細胞内共生によって獲得されたオルガネラであり、電子伝達鎖などの似通った構造を持つことから大変興味深く拝聴しました。馬先生のイネのシロカ輸送機構に関するご講演はユーモアに溢れ、こちらも大変楽しく拝聴させて頂きました。



会場入口のポスター

2日目からは本格的にセッションが始まり、以下のトピックに関するご講演がありました。

1. Photosynthetic Machineries: Structure and Assembly
2. Mechanism of Photosynthetic Regulation I & II
3. Gene Expression and Engineering
4. Chloroplast Biogenesis I & II

いずれの講演も十分な発表時間とセッションごとのテーマ設定が明確で、各分野の研究内容をしっかりと聞くことができる、よい機会となりました。特に印象的だったのが、未発表のデータが多く話題に挙げられた点で、質疑での議論が大いに盛り上がっていたように思います。例えば、Umeå大学のAlizée Malnoë博士は本年発表されたNPQの変異株の話題を端緒にその効果を抑制する更なる新規変異株についてお話しされ、NPQの制御機構について掘り下げた話題を提供して下さいました。また、多くの先生方がご自身の研究の初期から現在までを体系的にお話し下さったのも印象深く、東京工業大の久堀徹先生の、近年のお仕事の網羅的な紹介とそのレッドクス研究における位置づけについての発表、岡山大学の坂本亘先生のご研究を始めたきっかけ、

その後の展開から現在に至るまでお話が、中でも印象に残っています。特に坂本先生には本シンポジウムの Chair としてこのような素晴らしい会を開いて頂き、本当にありがとうございました。

2 日目と3 日目の招待講演のセッションの後には、ポスター発表者の若手研究者や学生から 17 題の 5min 発表がありました。自分の発表を 5 min で、しかも英語で上手くまとめるのは難しいかと思いますが、いずれの発表もご自身の研究の魅力を存分に伝え、興味を惹かれるものばかりでした。ポスターセッションも大変な盛況で、私自身も、「PsbQ-Like protein 3 (PQL3) is an assembly factor for the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase-like complex in Arabidopsis」と題した発表を行いました。学会で発表するのは久しぶりでしたが、いくつかの大変に有意義なご意見、ご指摘をいただくことができ良かったと思います。

本シンポジウムは冒頭でも述べた通り、海外からの参加者が多く、日ごろは接することの難しい多くの方々の発表を聞き、意見交換をする大変、貴重な場になったと思います。会場は倉敷美観地区やアイビススクエアに程近く、折しも紅葉の季節で、学会関係者以外にも多くの海外からの観光客が訪れ、日本にいながら国際シンポジウムの雰囲気十分に堪能することができました。このような素晴らしい国際シンポジウムを企画、準備してくださった岡山大学の坂本先生を始め、オーガナイザーや準備委員会の先生方、受付や会場係をして下さっていた岡山大学の皆様など、関係者全てに感謝したいと思います。



写真左上、シンポジウム会場の様子
右上、ディナーで余興（備中神楽）
を楽しむ参加者
横、参加者全体での集合写真

（岡山大学の高見常明博士、坂本
亘先生ご提供）

事務局からのお知らせ

★入会案内

本会へ入会を希望される方は、会費（個人会員年会費：¥1,500、賛助法人会員年会費：¥50,000）を郵便振替（加入者名：日本光合成学会、口座番号：00140-3-730290）あるいは銀行振込（ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290 名前：ニホンコウゴウセイガッカイ）にて送金の上、次ページの申し込み用紙、または電子メールにて、氏名、所属、住所、電話番号、ファックス番号、電子メールアドレス、入会希望年を事務局までお知らせください。

★会費納入のお願い

学会の運営は、皆様に納めていただいております年会費によりまかなわれております。当該年度の会費が未納の場合、光合成研究が送られてくる封筒に、会費未納が印字されています。ご都合のつくときに、会費を納入ください。1年間会費を滞納された場合、次年度よりお名前が会員名簿から削除され、光合成研究は届かなくなります。再入会される場合は、未納の分もあわせてお支払いいただきます。会費納入状況などにつきましては、ご遠慮なく事務局（sonoike@waseda.jp）までお問い合わせください。会員の皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

日本光合成学会会員入会申込書

平成 年 月 日

日本光合成学会御中

私は日本光合成学会の趣旨に賛同し、平成 年より会員として入会を申し込みます。

[]内に会員名簿上での公開承諾項目に○印をつけてください

[] 氏名 (漢字) (必須)

氏名 (ひらがな)

氏名 (ローマ字)

[] 所属

[] 住所 1

〒

[] 住所 2 (自宅の方または会誌送付先が所属と異なる場合にのみ記入)

〒

[] TEL1

[] TEL2 (必要な方のみ記入)

[] FAX

[] E-mail

個人会員年会費 1,500 円 (会誌、研究会、ワークショップなどの案内を含む)

賛助法人会員年会費 50,000 円 (上記と会誌への広告料を含む)

(振込予定日: 平成 年 月 日) (会員資格は1月1日~12月31日を単位とします)

* 複数年分の会費を先払いで振り込むことも可能です。その場合、通信欄に (何年度~何年度分) とお書き下さい。

連絡先

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋裕一郎 研究室内

日本光合成学会

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

ホームページ: <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名: 日本光合成学会 口座番号: 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店(ゼロイチキユウと入力)、当座、0730290

名前: ニホンコウゴウセイガッカイ

日本光合成学会会則

第1条 名称

本会は日本光合成学会（The Japanese Society of Photosynthesis Research）と称する。

第2条 目的

本会は光合成の基礎および応用分野の研究発展を促進し、研究者相互の交流を深めることを目的とする。

第3条 事業

本会は前条の目的を達成するために、シンポジウム開催などの事業を行う。

第4条 会員

1. 定義

本会の目的に賛同する個人は、登録手続を経て会員になることができる。また、団体、機関は、賛助会員になることができる。

2. 権利

会員および賛助会員は、本会の通信および刊行物の配布を受けること、本会の主催する行事に参加することができる。会員は、会長を選挙すること、役員に選出されることことができる。

3. 会費

会員および賛助会員は本会の定めた年会費を納めなければならない。

第5条 組織および運営

1. 役員

本会の運営のため、役員として会長1名、事務局長1名、会計監査1名、常任幹事若干名をおく。役員の任期は2年とする。会長、常任幹事は連続して二期を越えて再任されない。事務局長は五期を越えて再任されない。会計監査は再任されない。

2. 幹事

幹事数名をおく。幹事の任期は4年とする。幹事の再任は妨げない。

3. 常任幹事会

常任幹事会は会長と常任幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。常任幹事会は本会の運営に係わる事項を審議し、これを幹事会に提案する。事務局長と会計監査は、オブザーバーとして常任幹事会に出席することができる。

4. 幹事会

幹事会は役員と幹事から構成され、会長がこれを招集し議長となる。幹事会は、常任幹事会が提案した本会の運営に係わる事項等を審議し、これを決定する。

5. 事務局

事務局をおき、事務局長がこれを運営する。事務局は、本会の会計事務および名簿管理を行う。

6. 役員および幹事の選出

会長は会員の直接選挙により会員から選出される。事務局長、会計監査、常任幹事は会長が幹事の中から指名し、委嘱する。幹事は常任幹事会によって推薦され、幹事会で決定される。会員は幹事を常任幹事会に推薦することができる。

第6条 総会

1. 総会は会長が招集し、出席会員をもって構成する。議長は出席会員から選出される。

2. 幹事会は総会において次の事項を報告する。

1) 前回の総会以後に幹事会で議決した事項

2) 前年度の事業経過

3) 当年度および来年度の事業計画

3. 幹事会は総会において次の事項を報告あるいは提案し、承認を受ける。

- 1) 会計に係わる事項
- 2) 会則の変更
- 3) その他の重要事項

第7条 会計

本会の会計年度は1月1日から12月31日までとする。当該年度の経理状況は、総会に報告され、その承認を受ける。経理は、会計監査によって監査される。本会の経費は、会費および寄付金による。

付則

第1 年会費は個人会員1,500円、賛助会員一口50,000円とする。

第2 本会則は、平成14年6月1日から施行する。

第3 本会則施行後第一期の会長、事務局長、常任幹事にはそれぞれ、第5条に定める規定にかかわらず、平成14年5月31日現在の会長、事務局担当幹事、幹事が再任する。本会則施行後第一期の役員および幹事の任期は、平成14年12月31日までとする。

第4 本会則の改正を平成21年6月1日から施行する。

日本光合成学会の役員選出に関する申し合わせ

平成27年5月27日 幹事会

1. 選挙管理委員会

本会の選挙を公正に実施するため、選挙管理委員会を置く。選挙管理委員2名は常任幹事会が幹事会に推薦し、決定する。選挙管理委員の互選により委員長を選出する。

2. 会長〔会則第5条第6項〕

1) 幹事および常任幹事による若干名の候補者の推薦方法

幹事は、会長選挙に推薦する候補者としてふさわしい会員を3名連記で投票する。投票結果が上位の会員について、常任幹事会は、本人の意向を確認した上で、若干名を推薦候補者として決定する。選挙事務は事務局長が執り行う。

2) 会長選挙

会長選挙の実施に当たっては、会員に推薦候補者を提示し、全会員による単記無記名投票を実施する。最高得票者を、次期会長とする。得票数が同数の場合は、抽選により決定する。選挙事務は選挙管理委員会が執り行う。

日本光合成学会の運営に関する申し合わせ

1. 幹事会

幹事は光合成及びその関連分野の研究を行うグループの主催者である等、日本の光合成研究の発展に顕著な貢献をしている研究者とする。任期は4年とするが、原則として再任されるものとする。

2. 事務局

事務局長の任期は2年とするが、本会の運営を円滑に行うため、約5期(10年)を目途に再任されることが望ましい。

3. 次期会長

会長の引き継ぎを円滑に行うため、次期会長の選挙は任期の1年前に行う。

4. 常任幹事会

常任幹事会の運営を円滑におこなうため、次期会長は常任幹事となる。

「光合成研究」 投稿規定

総則

1. 「光合成研究」(本報)は光合成に関連する諸分野における記事を掲載する。
2. 1年に3回(4月、8月、12月号)冊子体として発行し、電子版を光合成学会のホームページ上に公開する。
3. 原稿が E-mail において受付処理をされた日を以て受付日とし、編集委員が掲載可と判断した日を採択日とする。ただし原稿が本規定に合わない場合受け付けないことがある。
4. 編集委員は、原稿の審査に際し、原則的に適切な査読者を選んで査読を依頼し、掲載の可否を判断する。
5. 掲載論文の著作権(冊子体および電子版)は日本光合成学会に属する。
6. 図やそこで使われる写真が過去論文として発表したものもしくは発表されたものであった場合は、それらの著作権問題を著者ら自身でクリアする必要がある。
7. 投稿に当たっては、全ての著者が投稿に同意し、かつ原稿の内容について責任を持たなければならない。また、全ての著者は代表著者が全著者を代表して原稿の掲載に関する事項を執り行うことに同意するものとする。

一般的事項

- (1) Microsoft Word ファイルを基本とする。字数制限は設けないが、「解説」は A4 サイズ 6~8 ページ、「トピックス」、「研究紹介」は 4 ページ程度を目安にする。1 ページ当りの文字数は、図表を含めて 1800 字程度。日本語は MS 明朝、英数字は Times New Roman とする。
- (2) 本文の最初に、日本語および英語での論文題名、著者所属機関名、氏名を記載する。
- (3) 句読点は「、」「。」「」に統一する。
- (4) 300 字程度の日本語要旨を作成すること。
- (5) 参考文献、表、図のキャプションは、本文の後ろにつける。
- (6) 本文中に図の大体の位置を指示する。(図を貼り付けてもよい。)

参考文献

- (1) 参考文献は、本文中の該当箇所に、右上付きで、1)、1,2)、1-3) のように示す。
- (2) 参考文献の表記は下記のとおりとする。

雑誌例

1. Berthold, D.A., Babcock, G.T. and Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett.* 134, 231-234.
2. Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 109-112.

書籍例

3. Diner, B.A. and Babcock, G.T. (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., Eds.) pp 213-247, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

図/写真

- (1) 図、写真はグレースケールでも良い場合には、グレースケールで作成する。カラーの図や写真を希望する場合には、カラーの図や写真を送付すること。図や写真の枚数によっては、編集委員会との相談により、PDF 版ではカラーになるが、冊子体ではグレイになる場合がある。
- (2) jpg あるいは tiff 形式等で本文とは別ファイルとして送付すること。解像度は 300 dpi 程度とする。

日本光合成学会「光合成研究」編集委員会
2017年12月23日改訂

幹事会名簿

秋本誠志	神戸大学大学院理学研究科	高市真一	東京農業大学生命科学部
栗井光一郎	静岡大学大学院理学領域	高橋裕一郎	岡山大学異分野基礎科学研究所
池内昌彦	東京大学大学院総合文化研究科	田中 歩	北海道大学低温科学研究所
石北 央	東京大学大学院工学研究科	田中 寛	東京工業大学資源化学研究所
泉井 桂	近畿大学生物理工学部生物工学科	田中亮一	北海道大学低温科学研究所
伊藤 繁	名古屋大学	民秋 均	立命館大学総合理工学院
井上和仁	神奈川大学理学部	都筑幹夫	東京薬科大学生命科学部
伊福健太郎	京都大学大学院生命科学研究所	出羽毅久	名古屋工業大学大学院工学研究科
榎並 勲	東京理科大学	寺島一郎	東京大学大学院理学系研究科
得平茂樹	首都大学東京大学院理工学研究科	輛 達也	東京理科大学理学部
遠藤 剛	京都大学大学院生命科学研究所	仲本 準	埼玉大学大学院理工学研究科
大岡宏造	大阪大学大学院理学研究科	永島賢治	神奈川大学
太田啓之	東京工業大学	成川 礼	静岡大学大学院理学研究科
	バイオ研究基盤支援総合センター	南後 守	大阪市立大学大学院理学研究科
大友征宇	茨城大学理学部	西田生郎	埼玉大学大学院理工学研究科
大政謙次	東京大学大学院農学生命科学研究科	西山佳孝	埼玉大学大学院理工学研究科
小川健一	岡山県農林水産総合センター	野口 航	東京薬科大学生命科学部
	生物科学研究所	野口 巧	名古屋大学理学研究科
小俣達男	名古屋大学大学院生命農学研究科	長谷俊治	大阪大学蛋白質研究所
垣谷俊昭	名古屋大学	林 秀則	愛媛大学プロテオサイエンスセンター
葉子野康浩	兵庫県立大学理工学部	原登志彦	北海道大学低温科学研究所
柏山祐一郎	福井工業大学環境情報学部	彦坂幸毅	東北大学大学院生命科学研究所
金井龍二	埼玉大学	久堀 徹	東京工業大学研究院化学生命科学研究所
神谷信夫	大阪市立大学複合先端研究機構	日原由香子	埼玉大学大学院理工学研究科
熊崎茂一	京都大学大学院理学研究科	福澤秀哉	京都大学大学院生命科学研究所
栗栖源嗣	大阪大学蛋白質研究所	藤田祐一	名古屋大学大学院生命農学研究科
小池裕幸	中央大学理工学部	古本 強	龍谷大学農学部
小林正美	筑波大学大学院数理物質科学研究科	前 忠彦	東北大学
坂本 亘	岡山大学資源生物科学研究所	牧野 周	東北大学大学院農学研究科
佐賀佳央	近畿大学理工学理学部	増田真二	東京工業大学
櫻井英博	早稲田大学		バイオ研究基盤支援総合センター
佐藤公行	岡山大学	増田 建	東京大学大学院総合文化研究科
佐藤直樹	東京大学大学院総合文化研究科	松浦克美	首都大学東京都市教養学部
鹿内利治	京都大学大学院理学研究科	松田祐介	関西学院大学理工学部
重岡 成	近畿大学農学部	真野純一	山口大学農学部
篠崎一雄	理化学研究所植物科学研究センター	皆川 純	基礎生物学研究所
嶋田敬三	首都大学東京	宮尾光恵	東北大学大学院農学研究科
白岩義博	筑波大学生物科学系	宮下英明	京都大学大学院地球環境学堂
沈 建仁	岡山大学異分野基礎科学研究所	宗景 (中島) ゆり	関西学院大学理工学部
杉浦昌弘	名古屋市立大学	村田紀夫	基礎生物学研究所
	大学院システム自然科学研究科	本橋 健	京都産業大学総合生命科学部
杉浦美羽	愛媛大学プロテオサイエンスセンター	矢守 航	東京大学大学院理学系研究科
杉田 護	名古屋大学遺伝子実験施設	横田明穂	奈良先端科学技術大学院大学
杉山達夫	名古屋大学		バイオサイエンス研究科
鈴木祥弘	神奈川大学理学部	和田 元	東京大学大学院総合文化研究科
園池公毅	早稲田大学教育学部		

編集後記

おかげさまで、編集長として最後の号を出すことができました。今月号では解説特集も担当し、分野のすそ野を広げるべく、非学会員の方からもご寄稿頂きました。楽しんで頂けたでしょうか？ 卷頭言にありますように、高橋会長がこの12月で退任されます。高橋会長、お疲れ様でした。本誌の編集でも大変お世話になりました。ありがとうございました。そして高橋先生のご退任に合わせて、編集委員会からは、静岡大学の栗井 光一郎さんと私が退任となります。

この2年間、常に記事のことを頭に置きながら過ごしてきましたので、一息つく思いがする反面、様々な方々と協力しながら誌面を作ることがなくなるのは寂しくもあります。これまで記事をご投稿頂きました著者の皆様、急な査読にも対応して頂いた査読者の皆様、特集等でお助け頂いた編集委員の皆様、この場をお借りして深く御礼申し上げます。また編集長として至らず、記事を掲載できなかったケースもございました。ご迷惑をおかけした皆様には、改めましてお詫び申し上げます。

新しい年からは、静岡大学の成川礼さんが新編集長を担当されます。また編集委員として、東京大学の矢守航さんに加え、関西学院大学の宗景ゆりさん、北海道大学の高林厚史さんが加わります。さらに若返り、女性も加わって、新しい誌面づくりが期待されます。私も一読者として、毎号楽しみにしたいと思います。引続き皆様からの温かいご支援とご協力を、どうぞよろしくお願いいたします。

最後に光合成学会と「光合成研究」の益々の発展を祈念して、私からのご挨拶とさせていただきます。

編集長・伊福 健太郎（京都大学）

記事募集

日本光合成学会では、会誌に掲載する記事を会員の皆様より募集しています。募集する記事の項目は以下の通りです。

- トピックス：光合成及び関連分野での纏まりのよいトピックス的な記事。
- 解説：光合成に関連するテーマでの解説記事。
- 研究紹介：最近の研究結果の紹介。特に、若手、博士研究員の方からの投稿を期待しています。
- 集会案内：研究会、セミナー等の案内。
- 求人：博士研究員、専門技術員等の募集記事。
- 新刊図書：光合成関係、または会員が執筆・編集した新刊図書の紹介。書評も歓迎します。

記事の掲載を希望される方は、新編集長の成川 (narikawa.rei@shizuoka.ac.jp) までご連絡ください。

「光合成研究」編集委員会

編集長 伊福 健太郎 (京都大学)
編集委員 粟井 光一郎 (静岡大学)
編集委員 成川 礼 (静岡大学)
編集委員 矢守 航 (東京大学)

日本光合成学会 2018年度役員

会長 高橋 裕一郎 (岡山大学)
事務局長 園池 公毅 (早稲田大学)

常任幹事 田中 歩 (北海道大学) 前会長
常任幹事 鹿内 利治 (京都大学) 前事務局長
常任幹事 松田 祐介 (関西学院大学) 年会 2015年
常任幹事 柏山 祐一郎 (福井工業大学) 年会 2016年
常任幹事 杉浦 美羽 (愛媛大学) 年会 2017年
常任幹事 古本 強 (龍谷大学) 年会 2017年
常任幹事 牧野 周 (東北大学) 年会 2018年
常任幹事 宮尾 光恵 (東北大学) 年会 2018年
常任幹事 榎 達也 (東京理科大学) 光生物学協会
常任幹事 石北 央 (東京大学)
常任幹事 伊福 健太郎 (京都大学) 編集長

会計監査 藤田 祐一 (名古屋大学)
ホームページ 加藤 裕介 (岡山大学)

光合成研究 第28巻 第3号 (通巻83号) 2018年12月31日発行

日本光合成学会

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学 異分野基礎科学研究所

高橋 裕一郎 研究室内

TEL : 086-251-7861

FAX : 086-251-7876

e-mail : jspr@photosyn.jp

ホームページ : <http://photosyn.jp/>

郵便振替口座 加入者名 : 日本光合成学会 口座番号 : 00140-3-730290

銀行振込の場合 ゆうちょ銀行、019店 (ゼロイチキュウと入力)、当座、0730290

名前 : ニホンコウゴウセイガッカイ
