

マツ枯れを巡る生物学*

黒田 宏之**

マツ枯れについての総説や単行本はかなりの数が発行されている¹⁻³⁾。ここでは材線虫病と関連する現象を、これまでの解説とは異なる切り口で考えてみたい。しかし、公開講演という性格上、広い話題を対象としたため、最近の裸子植物の遺伝子情報に関しては深く触れることができなかった。

1. マツのストレス応答が人類の地域経済発展に寄与してきた

約 300 年前の江戸時代の儒学者、熊沢蕃山といえ、今日、森林を蘇らせた先駆者として評価されている。蕃山は、岡山周辺の禿げ山に藩の費用で植林や砂防工事を行い、藩内にマツを植えるよう指導した。しかし、官学であった朱子学と対立した彼は、中央幕府の政策とも対立し、安易に海岸や山に生育が早くて栽培が容易なアカマツを植林することを批判している。この例のように、日本ではマツ林は、海岸の防風林や荒れ地の砂防林など保安林、寺社や庭園の景観、マツタケ山、薪炭林など環境保全と関連したイメージが先行しがちである。しかし、マツ属は、裸子植物の中では最も種の数が多く、100 種類を超える樹種が、赤道を含む汎北半球に天然分布している。また、南半球でも、真っ直ぐ、よく成長するラジアータマツ (*P. adianta*) のような樹種が、構造用材や合板生産のために大規模に人工植林されてきた。したがって、古来より、マツ材をはじめ、マツの樹皮タンニン、樹脂 (マツヤニ)、マツタケなど生産は、世界各地の地域経済発展に重要な役割を果たしてきた。これらの生産は、20 世紀末には、ほかの天然資源と同じく、乱伐や石油化学製品に押されて衰退したかに見える。しかし、21 世紀に入って、マツをはじめとする遺伝子情報が利用できるようになり、新たなビジネスチャンスが生まれる兆しも見える。

マツヤニ由来の成分を塗布した製品は撥水性に優れる。このため、マツヤニは英米海軍御用達の必需品として、石油化学製品が発達するまで重用されていた⁴⁾。ロジン、マツヤニを水蒸気蒸留し、揮発成分を除いた褐色ガラス様の物質である。ジテルペン樹脂酸を主体とする混合物で、欧米では主としてパルプ製造時の廃液から副産物として生産される。製紙用サイズ剤、印刷インキ、塗料、接着剤以外に、弦楽器の弓への塗布、ガム、香料、薬剤などにも使用されている。財務省の輸入統計によれば、我が国のロジン市場規模は減少傾向にあるものの、年間約 40 億円規模で、輸入量の 9 割以上は中国製品である。このマツヤニ生産に用いられているマツは、スラッシュマツ (*Pinus elliottii*)、馬尾松(台湾アカマツ, *Pinus massoniana*)、雲南松 (*Pinus yunnanensis*) などがある。近年では、フランス海岸松 (*Pinus pinaster*) やラジアータマツの樹皮から得られるプロシアニジン誘導体の酸化能力が注目され、化粧品やサプリメント原料としての利用に関心が注がれている。

マツヤニやタンニン成分は、元来進化の過程でマツが獲得した防御物質と考えられる。マツヤニ生産では、幹に、切る・叩くなどの傷害ストレス、酸などの薬品ストレス、温熱ストレスを与え、マツの防御反応を起こさせることで生産量を高める工夫がなされてきた。タンニン生産についても、後で触れるように種々のストレスで含有量や成分が変化する。ストレスの与え方には、植物ホルモン投与などを含め多くの特許や研究があるが、中にはパラコート処理のように、現在では使用が禁止されている人体に有害な薬剤処理もあった。マツヤニなどの生産量を増やすために用いられる薬剤は、製品中に混入する可能性がある。また、酸化が進んだマツヤニ成分は人によってはアレルギー反応を起こ

* 2007 年 6 月 8 日作成。第 3 回生存圏研究所公開講演会 (2006 年 10 月 14 日) 要旨を書き直したものである。

** 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所森林圏遺伝子統御分野。E-mail: hkuroda@rish.kyoto-u.ac.jp

すこともある。したがって、これらの製品取扱いの安全性に関しては無関心であってはいけない。いずれにしても、人類は古くからマツのストレス応答と付き合ってきたのである。

先の蕃山は、「アカマツの露は樹下に生える作物や草に有害である」と述べたとされる。この記述は、マツの成分が生理学的な影響を及ぼす例として興味深い。マツでは、これとは別の生理学的影響も報告されている。たとえば、昆虫の誘引活性、抗カビ活性、殺線虫活性、弱い性ホルモン様活性や、人によっては接触皮膚炎やアレルギーを引き起こす化合物の存在が知られている⁵⁾。もっとも、このような生理活性は、マツに限らず多くの植物に多かれ少なかれ存在し、マツが特に問題となっている訳ではない。マツは古来人類と共存してきた樹木で、ヒトに対しての有害成分のレベルは一般に低いと考えられている。例外としては、北米のマツ属のいくつかの樹種では、その針葉を食べた妊娠中の放牧牛が早産や流産をするという事例が古くから知られており、その原因化合物も特定されている。

40年ほど前までは、北海道を除いて、どこにでもあった海岸線のクロマツや、マツタケ山のアカマツは、開発や材線虫病で激減してしまった。マツ枯れ被害の特徴は、病気が非常に強力で、伝染性の流行病的な枯れ方をすることである。この特徴は、典型的な外来性の病原生物の病徴と一致する。事実、病原体とされるマツノザイセンチュウ（材線虫）は、アメリカから20世紀初頭に我が国に入ってきた外来線虫である。単離した材線虫をマツに接種すると、自然界の松枯れと同じ症状を呈してマツは枯れる。また、材線虫は、我が国に生息していたマツノマダラカミキリ（カミキリ）に乗って移動できるために、松枯れの被害が拡大した。我が国では、ロジン輸入と松枯れ防除関連の薬剤使用だけで、少なくとも年間100億円を超える経費が動くと推定される。これにマツ材の輸入やマツタケ輸入が加わると、マツの関連産業は、我が国だけでも、それなりの経済規模を持つことになる。マツ枯れのような病害が国境を越えて広がると、木材生産、ロジン生産、マツタケ生産、サプリメント生産などの各国の地域経済に深刻な影響が出る。さらに、急激なマツ林の枯損は、地域環境バランスの変調につながる危険性が高い。

2. マツ材の樹脂道ネットワークを材線虫がゆく

材線虫は、培地上で1時間に2cm程度、実際の樹幹内では一日に50cm以上移動できると言われる。材線虫の胴回りは、約0.03mm、体長は1mm前後である。口針を持っており、細胞内容物を吸うことはできるが、物理的に細胞を食い破って素早い移動をすることはむずかしい。このような生物が、若いシュートから侵入した後、マツ全体に広がるための移動通路はどこに存在するのだろうか？

仮道管は、細胞の死後、細胞内容物が無くなり壁だけが残った細胞である。水、ミネラル、ホルモン等を木部の内部や樹冠へと運搬するパイプとして働いている⁶⁾。仮道管のうち、軸方向のものは、長さが2-3mm程度、太さは0.03mm程度で、木部体積の96%前後を占める（図1 a, b）。これらの細胞は、水を運ぶパイプとしての役割だけでなく、物理的な強度を木の大きなからだに付与している。仮道管の細胞壁には複数の弁付きの孔（有縁壁孔）が開いている。この弁は樹液のpH変化に連動して、逆止弁として働くと考えられている。この細胞のパイプの太さは、材線虫の胴回りほどの大きさで、細胞壁の孔に材線虫が頭を入れることはできても、通路として利用することはむずかしい。軸方向の仮道管以外に、マツ属には放射方向に並ぶ放射仮道管が存在する。この細胞群は組織学的にマツ属であることを判定するときの重要な指標となるが、材線虫の通り道としてはやはり小さすぎる。

マツ属のシュートや樹幹には、隣り合った柔細胞が分化中に剥がれてできた細胞間隙が存在する。この円筒状の空間は樹脂道（細胞間道）と呼ばれており、木部体積の1%前後を占める。日本産のマツの木口面では、その直径は0.1-0.2mmである（図1 b）。この空間の樹体内での連続性は検証されていないが、教科書的には「かなりの長さ」とか「長さ不定」と記載されている。樹脂道には樹脂が貯まるとよく言われるが、マツが健全な状態では、一般にこの空間が樹脂で満たされることはない。胴回りが約0.03mm程度の材線虫は、この細胞間隙をおもな通り道として利用する。組織学的に見ると、材線虫が通ることのできるマツのシュートや幹の空間は樹脂道しか考えられない。材線虫は、枝

先から侵入して、やがてマツの全身に広がることから、この樹脂道のネットワークは、シュートから幹を經由して根までマツの全身にはり巡らされていると想像される。

樹脂道の直径は、マツの材線虫に対する抵抗性に関連する要因の 1 つと考えられている。また、材線虫に対する別の組織学的な抵抗性要因として、枝の付け根の構造が関係している例が報告されている。少し詳しくこの樹脂道ネットワークについて見てみよう。若い伸長中のシュート（一次組織）では、師部側の皮層と一次木部の両方に樹脂道が存在する。成熟した二次組織では、皮層が脱落して存在しないので材線虫の軸方向の通路は師部には存在せず、木部に限られると考えられている。樹脂道の周りは、エピセリウム細胞と呼ばれる柔細胞で囲まれている。この柔細胞は、いわゆるマツヤニの分泌細胞である。心材に大量の樹脂を蓄積する熱帯産のカリビアマツ (*P. caribaea*) などには、樹脂道周辺にさらに特殊なストランド細胞（樹脂細胞）が発達している。枝の付け根では、樹脂道が複雑に交錯しており、枝から幹への材線虫通過が困難な組織構造となっている。事実、例外もあるが、枝数の多い家系で材線虫に対する抵抗性が高いことが報告されている⁷⁾。

材線虫の通路沿いである樹脂道内の空間はエピセリウム細胞で囲まれている。感染初期には、材線虫はこれらの柔細胞に口針を刺して、養分を摂取していると考えられる。マツ属のエピセリウム細胞は細胞壁が他の針葉樹に比べ薄く切片作成時に壊れやすい。このような細胞壁の性質は、材線虫が細胞に口針を突き刺す場合、有利に働くだろう。したがって、材線虫はエピセリウム細胞を破壊すると考えられているが、材線虫の通過跡が、エピセリウム細胞の破壊跡として簡単に追跡できる訳ではない。また、エピセリウム細胞の内容物が化学的に分析された例を見つけることはできなかった。材線虫に対する抵抗性を考えた場合、このような細胞の細胞壁が厚くなる、あるいは、この細胞が材線虫に対する防御物質を産生するなどによって、その個体の材線虫に対する抵抗性は高まると予想される。

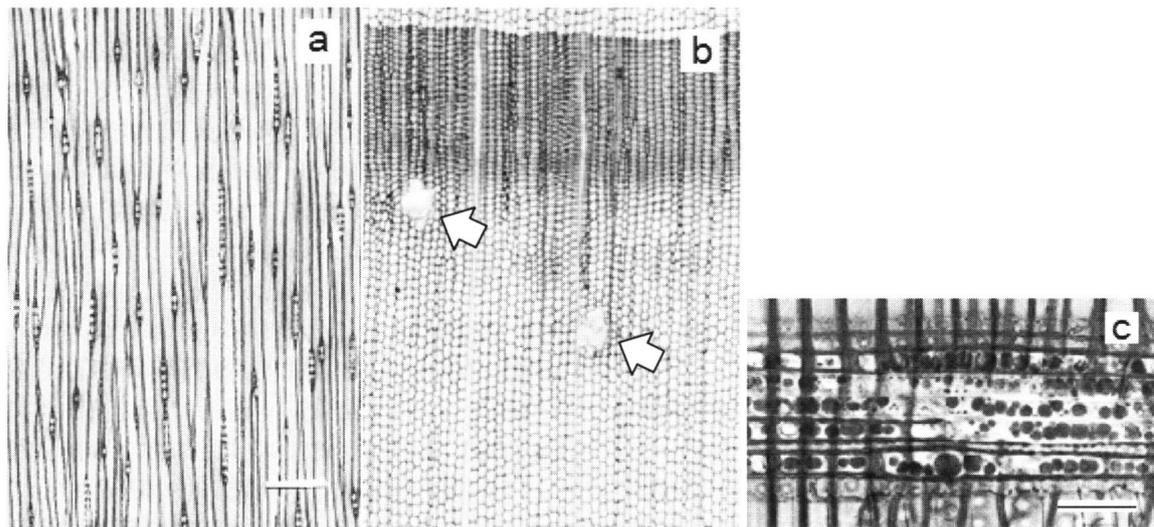


図 1：正常なアカマツ木部組織断面の光学顕微鏡増

a. 接線面切片像（線の長さは 0.2 mm）、b. 木口面切片像（倍率は a. に同じ、矢印は樹脂道）、c. 放射面切片像（線の長さは 0.05 mm、放射柔細胞には油脂粒の貯蔵がみられる）

3. マツ材中で 20 年以上生き続ける細胞の営み

放射柔細胞は、先に述べた樹脂道やエピセリウム細胞とともに、材線虫に対する抵抗性を考えるうえで重要なマツの要素である。この柔細胞は、木材中の体積の約 2~3% を占めている。クロマツよりアカマツの放射柔細胞の割合が高いとされるが、この存在割合と材線虫抵抗性との関連は研究されていない。形成層から 20 年以上経過した年輪でも、この細胞には核や細胞内容物が観察され、長年月にわたり生き続けることができる¹³⁾。マツの放射方向の柔組織は、先に述べた樹脂道ネットワーク

と隣接箇所を持つ。たとえば、放射柔組織のいくつかは、その中央部に水平方向の樹脂道が存在する。この放射方向の樹脂道を利用して、材線虫は師部・木部間を移動する。また、軸方向柔細胞が放射柔細胞と交わる場所も存在する。このような場では、直接・間接に放射柔細胞が材線虫の影響を受ける可能性が高い。現に、放射柔細胞もまた、材線虫接種によって大きな変化の観察される細胞である。

正常な放射柔細胞には、顕微鏡観察で澱粉粒や中性の脂溶性成分が存在する（図 1c）。辺材の脂溶性成分の分析結果では、中性の脂溶性物質に相当する成分としてトリアシルグリセロールや、ホスホグリセリド、ステロールなどが検出できる。これらのうち、顕微鏡下で観察される脂溶性物質の主な実体は、乾燥辺材重量当たり 1.6-5.1% 存在するトリアシルグリセロールであり、後の 2 者は細胞膜成分と推定される⁸⁾。この分析値は、マツが“FAT TREE”と呼ばれることを化学的に裏づける。動物では、このような中性脂質が細胞質中に油滴として存在し、ミトコンドリアへエネルギーを供給していることがよく知られている。おそらく、マツも動物同様に、これらの油滴やデンプン粒がエネルギー源となるのであろう。一方、このような成分は、材線虫の餌となる可能性が高い。

夏の終わりから秋にかけて、老化した柔細胞は死ぬ。この時に辺材と心材の移行部では仮道管中から水が追い出される。この部分は、マツではそれほど顕著でないが、木部水分含量の高いスギでは顕著な「白線帯」として明瞭に観察される。このような水が追い出される時期以降、マツの柔細胞は、殺線虫物質（ピノシルビン誘導体）⁹⁾ や抗菌物質（ピノセンブリン誘導体）などのフェノール性二次代謝産物を産生する¹⁰⁾。マツ属心材成分中の主要なフラボノイドは、フラバノン、フラバノール、フラボンのように、必ずC環にカルボニル基が存在する。一方、フラボノイドC環4位のカルボニル基が $-CH_2-$ 基まで還元されると、反応性が高くなり、分子間で結合して高分子化する。いわゆるタンニンの生成である。これらの成分は樹皮に豊富に存在するが、針葉樹辺材での報告例を見つけることは難しい。ダグラスファー (*Pseudotsuga menziesii*) の乾燥辺材では、乾燥重量当たり最大で 0.03% 前後のタンニンが含まれることが化学的に証明されている¹¹⁾。検出されたタンニンは、恐らく木材の伐採後の乾燥中に生成したと考えられる。一方、同じ木材試料中の心材部にはタンニンが検出できなかった。言い換えると、針葉樹の心材化では、生合成経路の上流に位置するフェノール性化合物のみが生成し、それより下流に存在するタンニン生合成系はほとんど働いていないと考えられる。

4. 材線虫はどのようにしてマツを枯らすのか？

材線虫病に関連する化学成分の研究は、細胞毒素のスクリーニングという戦略で研究が進められた例がかなりある。また、材線虫に寄生する細菌の毒素が材線虫病や材線虫の分泌酵素が細胞を殺すという報告もある。一般に、細胞の死が植物個体の死に結びついているという議論は広くなされているし、材線虫病にも当てはまる部分がないとは言いきれない。しかし、マツのように大きなからだをもつ樹木の場合は、細胞死＝個体死という議論は成り立ちにくい。現に、分化中の木部や心材化では木部の多くの細胞が死に絶えるけれども、個体の生命は維持されている。草本植物は、環境の悪化を種子形成の間隔を短くして世代交代させることで乗り越える。これに対して樹木は、環境悪化に対抗して、木部や師部などの組織や時に器官の一部を切り捨ながらも個体全体は生き長らえさせる能力を備えている¹⁵⁻¹⁷⁾。細胞が死んでも個体が生き残るという特徴は長年月を生き抜くために都合がよい。細胞の死が個体の死と直接結びつきにくいのなら、どのようにして材線虫はマツを枯らすのだろうか？次に、細胞死とは結びつかないマツ枯れ説を紹介する。

材線虫感染初期にマツから生成されるのは、揮発性のモノテルペン類である。材線虫感染初期には、辺材中の水が追い出された跡が、実体顕微鏡下で白い斑点として放射組織に沿って観察される。これがさらに進むと、樹幹の断面全体が白くなって通水が遮断される。白い斑点を抽出しガスクロマトグラフィ分析した結果、材線虫感染後にモノテルペンレベルが顕著に上昇することが明らかにされた^{18, 19)}。この結果を顕微鏡観察結果に照らし合わせると、つぎのように考えられた。正常な状態では、キャビテーション（蒸散による張力などで樹幹の通水パイプが切れる現象）で切れた水パイプは、再

びつながり、蒸散流が回復する。しかし、仮道管内腔に疎水性のモノテルペンが排出されることによって水パイプが切れたまま回復できなくなる。この現象は、心材化の段階で言う白線帯の形成に相当する。心材化では、このような部分は心材と辺材の境界域に限られるが、材線虫病での白線帯化は通水している木部断面の全面を覆うように分布する。こうなると、蒸散流が完全に遮断され、樹冠へ水が全く供給されない。マツ属では、必ず1本の仮道管に複数の放射柔細胞列が隣接している(図1a)⁶⁾。この放射柔細胞群が仮道管に接する部分では、細胞壁の薄い窓状の隔壁が存在する。モノテルペン類は仮道管に隣接している放射柔細胞から通水パイプである仮道管内に直接放出されるのだろう¹⁸⁾。通常、材線虫に感染後、2週間程度では、蒸散流の上昇がテルペンで抑制されてもマツの外見が変化することはない。しかし、3週間を超える頃から下枝の針葉が黄色く変色しはじめて、1ヶ月を超えるころには、針葉は萎れ、最後には赤くなって外見上も枯れたことが明らかになる。これらの観察結果は、材線虫病が萎凋病(いちょうびょう)であることをよく説明している。

材線虫感染後に放射柔細胞に観察される変化と、心材形成時の変化を対比させると、次のように説明できる。両者の共通点は、木部に不可逆的なキャピテーションが起こることである。その現象をきっかけとして、次に起こるフェノール生成では、成分組成の違いが認められる。マツの心材成分は、すでに述べたように、タンニン以外のフラボノイドやスチルベノイドが主成分である。一方、材線虫接種にตอบสนองしてストロブマツ(*P. strobus*)では、これらの心材成分の上昇が観察される¹²⁾。これに対して、我が国のクロマツ(*P. thunbergii*)では、材線虫の感染で頻りに検出される主な木部の成分は安息香酸やカテコールなどである²⁾。また、クロマツやアカマツ(*P. densiflora*)では、材線虫感染で放射柔細胞中のタンニン生成が推定されているが、化学的に確認されていない^{1,14)}。材線虫を接種したアカマツの放射柔細胞は油滴やデンプン粒の崩壊・変質がはじまり細胞外へ漏出する^{1,14)}。

材線虫病に対するフェノール成分生成が樹種間で異なることは、材線虫抵抗性の要因が単一でないことを示している。我が国のマツにおいては、材線虫病の場合は若い細胞の外敵に対する病原応答であり、他方の心材化の場合は老化細胞の環境ストレス応答である。このような違いが、フェノール成分の組成の違いに現れるのだろうか。また、材線虫感染にตอบสนองして生成するフェノール成分の持つ意味については、材線虫に対する毒物、マツの細胞毒、酸化ストレスの緩和ほかの説があり、明快な結論が得られていない。化学構造ではモノテルペンの親戚である樹脂は酸化されると、材線虫に対して毒性がある。樹皮からの樹脂の滲出、すなわちエピセリウム細胞の樹脂生成能は次第に減じることが広く知られている。材線虫に感染したマツでは、3週間前後で樹脂の滲出力が低下する。見方をかえると、材線虫はマツの殺線虫成分や樹脂の生成を抑制して、樹幹を自分の生育に適した環境に変えているように見える。キクイムシに生息する青変菌をマツやトウヒに接種すると病原応答して、師部のポリフェノール含有柔細胞が膨らむ、シュウ酸カルシウムの結晶が増える、傷害樹脂道が形成されるなどが報告されている。トウヒの場合は、反応が顕著で数メートル離れていても病原応答が観察されるのに対して、マツの応答は感染部位に限られる。これら師部細胞の変化は、しかし、材線虫病の感染初期では報告されていない。

5. 樹木遺伝子の解析で材線虫病が解明できるか？

はじめに、広葉樹のゲノム研究についての世界の趨勢に簡単に触れておこう。樹木のゲノム研究は、イネやシロイヌナズナに比べて、やや遅れてスタートした。しかし、ポプラ(*Populus trichocarpa*)では、アメリカ・エネルギー省のJoint Genome Instituteとカリフォルニア大学の主導により、ドラフトゲノムの塩基配列決定がすでに終了している^{20, 21)}。石油枯渇の危機管理と関連して、樹木バイオマスが化石エネルギーに代わる資源として着目され、採択されたアメリカの国家プロジェクトの1つであった。2008年度からは、ユーカリで同様のプロジェクトが同じ組織により始まる。ユーカリのバイオ燃料としての価値に着目した開発・研究として着目されている。このプロジェクトは、各国を刺激して同様の研究を促し、大きな波及効果をもたらした。特に、樹木の様々な形質に対応する遺伝子

の配列情報が網羅的に蓄積され、樹木遺伝子の研究基盤が築かれた意味は大きい。遺伝子を対象とする研究では、一般に、大量の配列情報の中から意味のある遺伝子を選ぶことによって新たな研究の進展につながることが多い。このような観点から、樹木遺伝子の場合にも、木材形成などの形質発現において階層構造の上位に位置することの予想される転写因子や、成分生成の鍵となる遺伝子などが最初の研究開発の対象として選ばれる傾向にある。

裸子植物は、ヒトに比べて約 3 倍、シロイヌナズナの約 10 倍のゲノム量を持つ。ゲノム塩基配列解析に要する経費や時間を考えると、裸子植物のゲノム塩基配列解析は、非常に困難であると判断される。遺伝子を導入して形質転換体をつくる実験系は、特別な場合を除いて裸子植物では一般的でない。また、種子が得られるまでの世代時間は、数年以上と草本植物に比べて長く、遺伝子の欠損株が整備されている訳でもない。このように、被子植物と比べて、裸子植物の遺伝子研究を推進するための環境は、整備されているとはいえない。これまでの裸子植物の遺伝子研究では、必然的に、発現している遺伝子を網羅的に捕まえることに注意が向けられてきた。

発現配列タグ (EST: Expression Sequence Tags) は、cDNA ライブラリー中のあるクローンをランダムに選択し、各クローンの塩基配列を次々に 1 回だけ読んで決定した配列情報である。一旦、EST データが大量に蓄積されると、塩基配列解析による迅速な発現遺伝子の同定が可能となる。マツの EST は、1990 年代後半から、ノースカロライナ大学の Sederoff のグループによって始められた²²⁾。テーダマツ (*Pinus taeda*) の樹幹で発現している EST データに、種子形成過程の発現遺伝子群、フランス海岸マツ (*P. pinaster*) の発現遺伝子群、種々のマツ属樹種における発表された塩基配列などを加えた EST データベースが、TIGER (The Institute for Genomic Research, Rockville MD) や、ハーバード大学 DFCI (Dana-Farber Cancer Institute) の TGI (The Gene Index) で、まとめられている (表1)²¹⁾。TGI では、マツ属の発現遺伝子は実に 30 万個以上の EST 配列が登録されている。NCBI (The National Center for Biotechnology Information) が運営する 2007 年 3 月の dbEST バージョンでは、マツの EST 数は、植物では、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ダイズに次ぐデータベース量を誇る。ちなみに、樹木塩基配列の 3 大データベースは、マツ、トウヒ、ポプラである。ポプラの EST 数 (表1) は、ゲノム由来の仮想 EST が混在して大きな値となっている。現在では、これらの樹木の遺伝子クローニングは標的遺伝子をはっきりしていれば比較的簡単にできる。

EST の部分塩基配列をコンピュータ上で類似配列群にまとめた (クラスター化) 後、あるクラスター中で末端に共通配列を持つ断片をつないだ配列を仮想転写産物 (TC) と呼ぶ。NCBI のサイトが使用している UniGreene という用語に対応する。マツ属では、古典的な方法で単離された cDNA クローンと TC の総数は 2 万 4 千弱、つながる相手がみつからない EST や塩基配列 (Singlet 総数) が 4 万 6 千弱存在する (表1)。TC は半数が 1 kb 以下、残りの半数の 9 割以上が 1~2 kb の間に分布している (表2)。複数の樹種が混在しているため、これらの数値は単一樹種における発現遺伝子数であるとは言えない。ちなみに、テーダマツ単独の TC 総数は約 1 万 5 千強が登録されている。これらの TC 数はマツにおいて、働いている遺伝子総数の目安となる。

マツの遺伝子に関して個々のケースを記述する前に、発現遺伝子を網羅的に捕まえて解釈する際の注意点について考えてみたい。TC の配列を解析する場合、「Blast」などの検索ソフトを用い、期待値という統計量を指標として、データベース中に類似配列を見つける。この場合、通常は、塩基配列をアミノ酸配列に変えて検索する。期待値は、低いほど互いの配列が類似していることを示している。データベース中に期待値が、たとえば、 10^{-10} 以下の値を示す配列が見つかったら、一応、両者は類似の機能を持つことが期待される。ここで、期待値の持つ意味について、もう少し詳しく考えよう。機能を推定したいマツの TC 配列と、データベース中の遺伝子配列を突き合わせ、両者で一致するアミノ酸の割合について考える。短い TC 配列の中でアミノ酸の一致する割合が高い場合と、長い TC 配列の中で一致する割合が低い場合は、期待値を基準にすると等価で、両者の期待値は類似の値を取る。したがって、期待値を指標とする限り、マツの TC 配列が長くなるほど、データベース中の配列にヒットする確率が高い。1000 bp を超える遺伝子配列の中には、通常、機能を発現するために重要な保存

領域が存在し、このような領域は進化の過程で配列が変化しにくいと考えられる。

表 1: EST ライブラリー解析結果の比較²¹⁾

学名	普通名	TCs* の元となるデータ		TC* 総数	Singletons* の元となるデータ		Singleton *総数	The Gene Index 版(公開日)
		ESTs	ETs*		ESTs	ETs*		
<i>Pinus sp.</i>	マツ類	305,583	2,078	23,531	21,901	125	45,557	6.0 (July 19, 2005)
<i>Picea sp.</i>	トウヒ類	219,883	520	30,427	28,795	81	59,303	2.0 (June 21, 2006)
<i>Populus sp.</i>	ポプラ類	330,034	1,198	44,764	41,484	76	86,324	3.0 (June 19, 2006)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	580,869	70,591	34,155	39,039	8,632	81,826	13.0 (June 16, 2006)
<i>Oryza</i>	イネ	1,077,922	95,560	77,158	85,212	19426	181,796	17.0 (June 20, 2006)

* TC, Tentative Consensus sequences (仮想コンセンサス配列) : 2 つ以上の ESTs (時に ET も) をつないで得られたコンセンサス (共通) 配列で、それらの ESTs は少なくとも 94% の配列同一性を持ち、少なくとも 40 塩基は重なり合う。

* ET (転写産物) : 対象とする植物種において、ESTs を除く全ての配列を GenBank から取り出して、cDNA とゲノム DNA の非コード領域を除去した配列情報。

* Singletons : TC を作る過程で相手の見つからなかった ESTs

表 2: TC の長さ分布²¹⁾

TC の大きさ		< 1kb	≥1kb <2kb	≥2 kb < 3kb	≥3 kb < 4kb	≥4 kb < 5kb	≥5 kb	TC 総数:
<i>Pinus sp.</i>	マツ類	49.7	45.7	4.31	0.28	0.03	0.01	23,531
<i>Picea sp.</i>	トウヒ類	69.3	29.7	0.95	0.03	0.01	0	30,427
<i>Populus sp.</i>	ポプラ類	74.7	24.5	0.77	0.07	0.00	0	44,764
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	43.7	38.2	12.6	3.87	1.07	0.67	34,155
<i>Oryza</i>	イネ	55.4	27.6	10.5	4.56	1.31	0.69	77,157

TC の長さ分布 : 数値は TC 総数に対する割合 (%)

マツとシロイヌナズナを比較した場合 (表 2)²¹⁾、このような長い TC 間では、シロイヌナズナの中に類似の配列が見出される可能性が高くなる。事実、塩基長が 1 kbp を超えるテータマツの TC では、90% 以上がシロイヌナズナに類似配列を見つことができた²³⁾。また、このような TC では、シロイヌナズナの相当する遺伝子との配列類似性は、特別な領域に限られることなく全コード領域にわたり認められた。したがって、裸子植物と被子植物間には系統的に大きな隔りがあるにもかかわらず、重要な遺伝子の配列は保存されていると言える²³⁾。しかし、解釈が難しいのは、マツの TC の半分を占めるシロイヌナズナに見出されない短い TC 配列やシングレットの存在である。これらが裸子植物に特異的で意味のある配列である可能性は否定できない。一方、単なる人為的な副産物である可能性

もあり得る。たとえば、5' および 3' 末端の非転写領域、ゲノムDNAの混入、データベースに登録されていない微生物DNA等の混入、転写反応時の種々の人為的副産物などの可能性を吟味する必要がある。ゲノム DNA の混入はマツゲノムの約 1% を占めるレトロポゾンが、EST 中に存在しないことを示すことで、人為的な副産物の可能性から除外できるかもしれない。しかし、遺伝子機能を何らかの方法で直接証明できない限り、多くの短い TC の意味を見出すことは難しい。このような状況は異なる生物のゲノム研究でも指摘されている。一方、短い配列は単なる人為的な副産物あるいはジャンク配列ではなく、機能を持つという報告も出始めており²⁷⁾、今後の進展が期待される。

樹木の EST 解析は、初期の研究では木部形成に関与するものが多かった。近年、トウヒに対する網羅解析²⁴⁾が進んだのと並行して、病虫害に対する応答の網羅的解析も急速に進んでいる^{25, 26)}。現在は、針葉樹の病原応答に対しての候補遺伝子が勢揃いし、個々の遺伝子解析が始まる前段階にあると考えられる。たとえば、マツの TC の中では、酵素遺伝子は約 2600 分子種存在しており TC 総数の約 1/10 に相当する。二次代謝に関与する酵素分子種は、さらにそのうちの 1/10 の 270 程度である。その内訳は、テルペン類、リグニン生合成に関与する遺伝子群等からなる。奇妙なことに、抗生物質生合成に関連する遺伝子がかなり見られるが、マツが抗生物質を生成するのではなく、プログラムが生んだ人工産物と考えられる。今後、個々の意味のある遺伝子やその産物の解析が進むものと期待できる。

参考文献

- 1) 二井一禎, 佐橋憲生 編, 特集「マツ枯れ」, 日本森林学会誌 88, 363-428, 2006.
- 2) 河津一義 編, ミニレビュー「マツノザイセンチュウによる松枯れ発病のメカニズム」, 日本農芸化学会誌, 64, 1241-1264, 1990.
- 3) Wingfield, M. J. ed., Pathogenicity of the pine wood nematode, pp.122, APS press, 1987.
- 4) Zenkel, D. F., The utilization of wood extractives, Natural Products of Woody Plants (Rowe, ed), Springer-Verlag, 953-978, 1989.
- 5) 黒田宏之, マツ枯損防止のための新戦略構築, 木材研究・資料, 35, 32-46, 1999.
- 6) Kuroda, H. and Kuroda, K., Candidate genes involved in water pump of trees, Tree Sap II (Terazawa, M. ed), Hokkaido Univ. Press, 67-75, 2000.
- 7) Kuroda, K., Inhibiting factors of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt, *J. For. Res.*, 9, 217-224, 2004.
- 8) Piispanen, R., Saranpää, P., Neutral lipids and phospholipids in Scots pine (*Pinus sylvestris*) sapwood and heartwood, *Tree Physiol.*, 22, 661-666, 2002.
- 9) Suga, T., Ohta, S., Munesada, K., Ide, N., Kurokawa, M., Shimizu, M. and Ohta, E., Endogenous pine wood nematocidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*, *Phytochem.*, 3, 1395-1401, 1993.
- 10) Kodan, A., Kuroda, H. and Sakai, F., A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 3335-3339, 2002.
- 11) Dellus, V., Mila, I., Scalbert, A., Menard, C., Michon, V. and Penhoat, CLMH., Douglas-fir polyphenols and heartwood formation, *Phytochem.*, 45, 1573-1578, 1997.
- 12) Yamada, T. and Ito, S., Chemical defense responses of wilt-resistant pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, against *Bursaphelenchus xylophilus* Infection, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 59, 666-672, 1993.
- 13) Nobuchi, T. and Hasegawa J., Radial distribution of heartwood phenols and the cytological changes of ray parenchyma cells associated with heartwood formation in Japanese red pine, *Bull. Kyoto Univ.*

- For.*, **66**, 132-142, 1994.
- 14) Nobuchi, T., Tominaga, T., Futai, K. and Harada, H., Cytological study of pathological changes in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) seedlings after inoculation with pine-wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), *Bull. Kyoto Univ. For.* **56**, 224-233, 1984.
 - 15) 黒田宏之, 草にはなく木にあるもの, 木材研究・資料, **23**, 1-13, 1987.
 - 16) 黒田宏之, ライフスタイルとしての木と草の誕生, 木のひみつ (京都大学木質科学研究所創立50周年記念事業会編), 東京書籍, 26-30, 1994.
 - 17) 黒田宏之, 木の誕生, ブルーバックス木材なんでも小事典 (木質科学研究所 木悠会編), 講談社, 16-23, 2001.
 - 18) Kuroda, K., Yamada, T., Mineo, K. and Tamura, T., Effect of cavitation on the development of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*, *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, **54**, 606-615, 1988.
 - 19) Kuroda, K., Terpenoids causing tracheid cavitation in *Pinus thunbergii* infected by pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*), *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, **55**, 170-178, 1989.
 - 20) Tuskan, G. A. et. al., The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray), *Science*, **313**, 1596-1604, 2006.
 - 21) The DOE Joint Genome Institute (JGI): <http://compbio.dfci.harvard.edu/index.html>;
<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>
 - 22) Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., SCS, Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M. M., Sederoff, R. and Whetten, R. W., Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9693-9698, 1998.
 - 23) Kirst, M., Johnson, A. F., Baucom, C., Ulrich, E., Hubbard, K., Staggs, R., Paule, C., Retzel, E., Whetten, R. and Sederoff, R., Apparent homology of expressed genes from wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) with *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7383-7388, 2003.
 - 24) Pavy, N., Paule, C., Parsons, L., Crow, J. A., Morency, M. J., Cooke, J., Johnson, J. E., Noumen, E., Guillet-Claude, C., Butterfield, Y., Barber, S., Yang, G., Liu, J., Stott, J., Kirkpatrick, R., Siddiqui, A., Holt, R., Marra, M., Seguin, A., Retzel, E., Bousquet, J. and MacKay, J., Generation, annotation, analysis and database integration of 16,500 white spruce EST clusters, *BMC Genomics*, **6**: **144**, 1-19, 2005.
 - 25) Ralph, S. G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J. A., Nelson, C. C., Butterfield, Y. S. N., Kirkpatrick, R., Liu, Jones, S. J. M., Marra, M. A., Douglas, C. J., Ritland, K. and Bohlmann, J., Conifer defense against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome, *Plant, Cell Env.*, **29**, 1545-1570, 2006.
 - 26) Wanga, D., Eylesa, A., Mandich, D. and Bonello, P., Systemic aspects of host-pathogen interactions in Austrian pine (*Pinus nigra*): A proteomics approach, *Physiol. Mol. Plant Path.*, **68**, 149-157, 2006.
 - 27) Lu, S, Sun, Y-H., Amerson H. and Chiang, V. L., MicroRNAs in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and their association with fusiform rust gall development, *Plant J.*, **51**, 1077-1098, 2007.