

# 循環発展的なプロジェクト構造を生む バイオインフォマティクス戦略

— 創薬ターゲット遺伝子の網羅的機能解析 —

諏訪 牧子\*、小野 幸輝

大量の生命情報データの情報洪水の中、バイオインフォマティクス技術の役割は高まり、実験上の大きなリスクを軽減し、実験の設計に資する情報を提供する形で貢献することが期待されている。この目的のもと、私たちは細胞膜に存在するGタンパク質共役型受容体(GPCR)を中心に、ゲノム配列から遺伝子を同定してそれらの機能解析を行うための計算パイプラインを構築し、その応用結果を網羅的な機能解析総合データベース(SEVENS)として練り上げてきた。このコア技術が共同研究の呼び水となり、その後循環発展的に展開しながら今日も続いている。この流れは、三つの要素(長期熟成されたコア技術、実験研究者との密な連携、技術インキュベーションを生む環境)を駆動力として進む研究の方向性と、進展の速いライフサイエンス分野の方向性の相互作用として進み続けるダイナミックな形態である。

**キーワード:** Gタンパク質共役型受容体、ゲノム、遺伝子同定、Gタンパク質共役選択性予測、循環発展的、SEVENS、GRIFFIN

## A bioinformatics strategy to produce a project structure of spiral development

– Comprehensive functional analysis of the drug design target genes –

Makiko Suwa\* and Yukiteru Ono

In the midst of the information flood of biological data, the role of the bioinformatics technology rises. This technology is expected to provide information to reduce the risk in the experiments and to help the designing of the experimental protocol. For this purpose, we mainly targeted a G protein coupling receptor (GPCR) and developed a computational pipeline which identifies these genes from genome sequences and performs their functional analyses. The applied results have been worked out into an integrated comprehensive functional analysis database (SEVENS).

This core technology has become the trigger of collaborative researches, which continues today in a spiral evolutionary form. This flow is the dynamic form that continues advancing by the interaction between the research direction determined by three elements as a driving force and the direction of the life science fields progressing rapidly. The three elements are the core technique matured for a long term, the close cooperation with the experiment researcher, and the environment producing technical incubation.

**Keywords:** G-protein coupled receptor, genome, gene finding, G protein coupling selectivity prediction, a spiral development, SEVENS, GRIFFIN

### 1 はじめに

2000年にヒトのゲノムドラフト配列が発表され<sup>[1]</sup>、桁違いに大量の生物情報があふれ始めた。その後10年近く経つ間に、1,000種類近くの生物のゲノム配列が解読され、さらに最近では、2000年当時より約1,000倍速く配列を解読できる次世代シーケンサーの出現により、生物情報の洪水ともいえる状態になった。これらから、膨大な量の産業応用ターゲット(遺伝子、RNA、タンパク質情報等)が得られるのは明白であり、これらを高効率に機能解析する生化学的な実験技術が望まれているが、現時点では膨大なコストと時間がかかるため事実上不可能である。

この状況のもと、バイオインフォマティクス技術への期待は高まっている。バイオインフォマティクスとは、生物学、情報学、およびその他境界領域が融合した分野であり、計算機を用いて大量データを処理しつつ生命情報(暗号)をデジタル化・DB化し、その解読技術を開発・応用しながら新しい生物学的知見を得、生命現象を情報論的、物理的にモデル化して記述する学問である。生命情報を担う遺伝子等の挙動を予測・制御することが可能という強みを持つ。いわば、生化学実験では対応できない解析に対する答えを、予め計算機上で低コストかつ高速に用意できる可能性がある。これができれば機能解析実験を飛躍的に

産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 〒135-0064 江東区青海 2-4-7 臨海副都心センター別館  
Computational Biology Research Center, AIST 2-4-7 Aomi, Koto-ku 135-0064, Japan \* E-mail: m-suwa@aist.go.jp

Original manuscript received June 29, 2009, Revisions received October 13, 2009, Accepted October 20, 2009

効率化させるナビゲータとなると期待される。

多くの産業応用ターゲットの中でも中心的なものは、Gタンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR)<sup>[2]</sup> と呼ばれる生体分子である。細胞膜に存在し、膜を貫通する7本の螺旋構造 (膜貫通ヘリックス) による管状構造を作り、細胞外側から神経伝達物質、ペプチド、匂い物質等の多様なリガンドが結合することで、細胞質側から共役するGタンパク質が活性化され、その種類によって細胞内への情報伝達の経路が決まる (図1)。多くの場合、この情報伝達システムの異常が、高血圧、心臓病、癌等の重篤な疾病を引き起こすことから、現在世界で出荷される薬の30%近くがこの受容体が関与するシステムの制御を目的としている。仮にGタンパク質の活性化を選択的に制御できる薬物を同定できれば市場に与えるインパクトは極めて大きい。例えば、GPCRを介して肥満病の発現機構を制御するペプチドは、薬剤の有効なシーズ、健康食品の基として大きな市場 (年間数百億円規模) を見込める。

しかしそれを目指した生化学実験には、巨額を水に投じるといった極めて大きなリスクを伴う。例えば生理活性を持つ有用ペプチドの単離は、数年から数十年かけても成功する保障はない。あるいは結合リガンドが不明であるオーファン受容体のリガンドを探索する場合、まずGPCRが発現し、Gタンパク質と結合して機能できるような細胞環境を樹立する必要があるが、GPCRにとって共役Gタンパク質種が不明なため、少なくとも代表的な数種類のGタンパク質と組合せた細胞環境の実験系を全て検討する必要がある、仮にここまでできて高効率化することがさらに難しい。

以下の章では、上述のようなリスクを可能な限り軽減するために、バイオインフォマティクスの立場から考えられるア

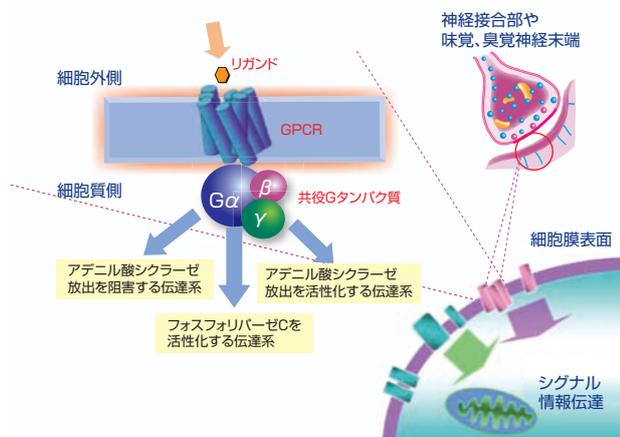


図1 Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の概念図  
神経接合部等の細胞膜内に存在する。(図右)。7本の膜貫通ヘリックスによる構造に細胞外側から多様な種類の分子 (リガンド) が結合し、共役するGタンパク質を活性化するが、その種類に応じ細胞内への情報伝達の経路 (大別して3種類) が決まる (図左)。

プローチを、我々の従来から行ってきた GPCR 研究 (以下、これを本プロジェクトと呼ぶ) をモデルケースとすることで示してみようと思う。

## 2 研究の目的・目標実現に向けた研究シナリオ

2000年に始まった本プロジェクトでは、「GPCR 創薬関連の生化学実験上のリスクを可能な限り軽減するため、バイオインフォマティクス技術により実験結果を予測して、実験の設計に資する情報を提示する」ということが目的であった。

そのための具体的目標は、まず、①ヒトの GPCR 遺伝子を新規遺伝子まで含め、網羅的にゲノム配列から同定、保有してデータベース (DB) 化すること、これらの遺伝子に計算手法で可能な限り高効率に機能・構造情報を付加することであった。これらの基盤ができれば、生化学実験で単離、発現するのが困難な新規 GPCR をあらかじめ DB 中から容易に見出せるようになる。

もう一つの目標は、②リガンドや GPCR 配列情報を入力すると Gタンパク質の活性化を予測できるプログラムを開発し、結合リガンドが不明なオーファン受容体に応用することであった。これにより、GPCR とそれを制御する薬物の組合せを網羅的に探索することで、オーファン受容体に対するリガンドスクリーニング実験系の設計も可能になるものと期待できた。すなわち製薬分野の研究を加速させるような貢献ができる可能性がある。

本プロジェクトのスタート時に考えた目標はここまでであった。バイオインフォマティクスの研究サイクルは、基礎から応用へ移行するまでが短く、上記の成果は DB やプログラム等の“製品”になる。いわば見えやすい形で典型的な本格研究のサイクルを完結できるため、一応ここで一区切りになると考えた。

実際は、このサイクルだけで完了ではなくてであったがライフサイエンス分野の進展は極めて速いため、その先の研究シナリオを詳細に正しく書くのは不可能であった。ただ“製品”を基に、より大きな流れに対応していくことになるのだろうとは、おぼろげながら予測していた。それを行おうとすると、全体では数年以上かかるプロジェクトになることは当時から予測できた。

## 3 一巡目の本格研究

以下では、本プロジェクト開始当初の研究サイクル一巡目について示す。これはヒトゲノム配列から遺伝子を同定することから始まった。

### 3.1 ゲノム配列からの遺伝子同定

ゲノムとは、細胞核内の染色体に記載された生命の設計

図の総体である。この中から、計算機で遺伝子を同定することは、長大なテキストファイルとして記録された DNA（デオキシリボ核酸）配列情報から、遺伝子領域の特徴を持つ領域を検出することと同義である。（近年の解釈では遺伝子領域は、タンパク質をコードする領域とともに機能する RNA（リボ核酸）をコードする領域も含め、広い概念を持つが、本論文では、話の都合上それをタンパク質コード領域だけに限る。）

多くの場合、真核生物では遺伝子はゲノムの DNA 配列上でイントロンと呼ばれる複数の領域で分断される(図 2)。この情報が最終的にタンパク質情報になるまでに mRNA に転写され、その後イントロンが切り取られ、分断された側のエクソン領域だけが結合した成熟 mRNA になった後、アミノ酸配列に翻訳される。翻訳の際にアミノ酸の一文字に対応する三つ組の塩基の並びをコドンという。

コドン単位で DNA 配列を順に区切りながら読んでいくときに、その開始点に対応するコドン列が出来るが、開始位置から一つまたは二つ塩基をずらした場合と逆側から読んだ場合も含めて 6 種類のコドン列が（読み枠）有り得る。計算手法で遺伝子領域を捉えるためには、各読み枠ごとにタンパク質のアミノ酸配列への翻訳を開始する場所のコドン（開始コドン）、終止するコドン（終止コドン）、エクソンとイントロンの境界等の特徴領域の文字列情報を学習してモデル化し、これに良く適合する領域を抽出する。

探索する対象が GPCR であれば、遺伝子としての一般的な特徴に加え、GPCR というタンパク質として共通する特徴領域をモデルに採用する。この特徴領域とは、7 本の膜貫通ヘリックスを持つこと、アミノ酸配列の NH<sub>2</sub> 末端側の糖鎖修飾部位、COOH 末端側の脂質結合部位、細胞質側の膜貫通ヘリックス末端にある三つのアミノ酸（Asp、Arg、Tyr の並び（DRY 配列））等、機能に関わる短い共通配列（機能モチーフ）や、数十残基の大域的に共通した

構造（ドメイン）等である。

遺伝子同定に用いるバイオインフォマティクスの要素技術は、上述のような遺伝子の特徴を捉えるプログラム群である。新規遺伝子を間違わずに見つけることに全力を傾けている実験研究者から見れば、ある割合の成功率で予測できるといわれてもまだ利用するのに躊躇されるだろう。予測したものはほぼ全て正しいといえるところまで迫ることが望まれている。そこで極めて高い精度で予測可能にするため、国内外の適切なプログラム群を選定し、各々の性能を評価した。

まず、エクソン-イントロン境界をモデル化して既知遺伝子配列をゲノムへ貼り付けるプログラム (ALN<sup>[3]</sup>) と、核酸塩基の出現・遷移確率モデル (隠れマルコフモデル) を遺伝子構造に適用したプログラム (GeneDecoder<sup>[4]</sup>) を評価した。既知の遺伝子のエクソン-イントロン構造が明らかになっている核酸配列領域の学習データから遺伝子領域の最大長を確認し、任意のエクソンから上流、下流側へどれだけ（付加伸展長）広げれば、遺伝子全体領域をカバーできるかという点、あるいは、エクソンを最も精度良く同定するための配列類似スコアを調査した。

次に、遺伝子配列候補が実際に GPCR か否かを判別するための道具として、配列検索プログラム (blastp)、GPCR 特有のモチーフ帰属プログラム (HMMER<sup>[5]</sup>)、膜貫通ヘリックス領域予測プログラム (SOSUI<sup>[6]</sup>) を評価した。GPCR を選択するパラメータは、blastp ではタンパク質配列を検索するときの類似期待値スコア (E-値)、HMMER では、隠れマルコフモデルで表現した機能モチーフ (Pfam) を検索するときの E-値、SOSUI では予測ヘリックスの本数である。タンパク質配列 DB (UniProt、GPCRDB 等) 中の、既知 GPCR 配列と GPCR 以外の配列を含む学習セットから、正しい GPCR 配列を判別するためのパラメータの閾値を、感度 (正しいものの中から正しく予測した割合)、選択性 (予測した中に含まれる正解の割合) を評価しながら定めて行った。偽陰性 (正しい配列を予測できない場合) の結果を最小限に抑えながら、ほぼ 100 % の選択性を達成できる閾値を「最高選択性閾値」、一方、偽陽性 (GPCR とは異なる配列を予測してしまう場合) の結果を最小限に抑えながら、100 % 近くの感度を達成できる閾値を「最高感度閾値」と定義した。

以上のように、研究の問題解決に必要な基礎知識ともいえる各要素プログラムの特性を「理解」することを目的としたことから、この段階は第 1 種基礎研究といえる。

### 3.2 遺伝子同定・機能解析パイプライン

3.1 節の研究を基に、ゲノム配列から GPCR 遺伝子を網羅的に同定するシステムを開発した。これは、各要素プ

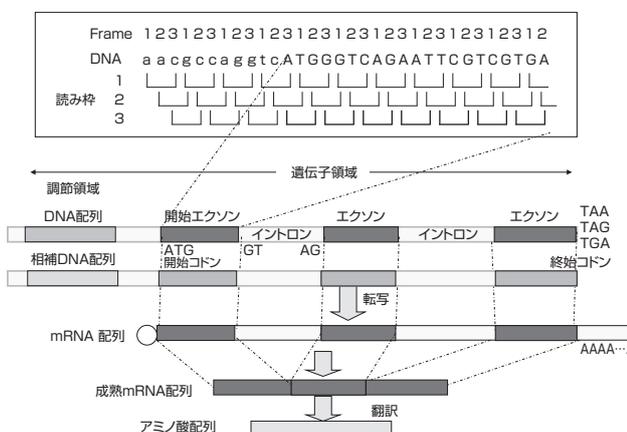


図 2 DNA 配列上の遺伝子領域の概念図

プログラムを、入力から出力を生じるパイプとみなし、各パイプを段階的に最適な閾値や順番でつなぎ合わせたもの（SEVENS パイプライン：図3）であり、ゲノム配列からタンパク質コード領域を抽出し（遺伝子発見段階）、これらの中から GPCR 遺伝子候補を確定させ（GPCR 遺伝子精密化段階）、機能・構造情報を付加する（機能解析段階）という各段階からなる。

この部分は、各要素プログラムを組み合わせるシステム化し、その結果としての制御を試みるという観点なので、第2種基礎研究といえる。

### 1) 遺伝子発見段階

ゲノムの DNA 配列を6つの読み枠ごとにスキャンし、それに対応するコドンを実験室に翻訳しながら、既知 GPCR のアミノ酸配列と一定の類似スコア以上で合致する断片領域（エクソン領域に相当）を全てリスト化する（tblastn プログラム）。これで遺伝子が存在する領域が絞られるので、ALN<sup>[3]</sup>により、その上流、下流1,000塩基まで探索領域を広げながら既知の配列に相当した全長遺伝子を構成する。この他にも、遺伝子領域を確率モデル化した GeneDecoder<sup>[4]</sup>により得られた配列も同時に用意した。このため複数の配列が完全一致か部分一致で重なる領域が出てくるが、有意な重複がある部分をつながりながら最長になるアミノ酸配列を決定する。

### 2) GPCR遺伝子精密化段階

決定したアミノ酸配列を順次、配列検索プログラム（blastp）、機能モチーフ同定プログラム（HMMER<sup>[5]</sup>）、膜貫通ヘリックス予測プログラム（SOSUI<sup>[6]</sup>）に流していく（図3）。3.1節でプログラム毎に決定した最高選択性閾値と最高感度閾値を組合せ、様々な検出選択性と感度で得られるデー

タセットを作成できる。多少の擬陽性（誤予測）を許しても、GPCR を全て漏れなく抽出したいなら、blastp、HMMER、SOSUI の最高感度閾値（各々 E 値  $<10^{-30}$ 、E 値  $<10^{-1}$ 、予測本数範囲 6 ~ 8 本）で得られる出力の和集合を求める。これは学習セットに対して 20.4 % の選択性ながら 100 % の感度を示す（レベル D）。一方、最も精密なデータセット（レベル A）は、blast と HMMER の最高選択性閾値（各々 E 値  $<10^{-80}$ 、E 値  $<10^{-10}$ ）による出力の和集合となる。これは学習セットに対し 99.4 % の感度と 96.6 % の選択性を示す。また、この二つレベルの間に中間的存在としてレベル B（感度 99.8 %、選択性 70 %）、レベル C（感度 99.9 %、選択性 48.4 %）のデータセットを作成した。最後に、データセットを GPCR 以外の配列データに照合し、間違えて予測した配列は除去する。

### 3) 機能解析段階

同定した GPCR 配列で、互いに E 値  $<10^{-30}$  で関連付けられる配列同士をグループ化し、各々を既知のファミリーに帰属させる。既知 GPCR 配列に対し 100 残基以上 96 % 以上の類似度で整列できる配列は既知配列と同一とし、それ以外の配列を新規配列とみなした。またエクソン領域に終始コドンが含まれていれば、偽遺伝子とする。各々の配列には、GPCR 遺伝子精密化段階で行った解析を基に、染色体上の座標、エクソン数、配列長、配列検索情報、膜貫通ヘリックス領域、機能モチーフ領域、ドメイン領域等の機能・構造情報を付加する。

### 3.3 プロジェクトのアウトプット

ヒトゲノムから全ての GPCR を同定し終えた段階では、配列セットのレベル（A, B, C, D）に従って 827, 1300, 1517, 2109 配列を得た。配列が多いセットほど擬陽性（正

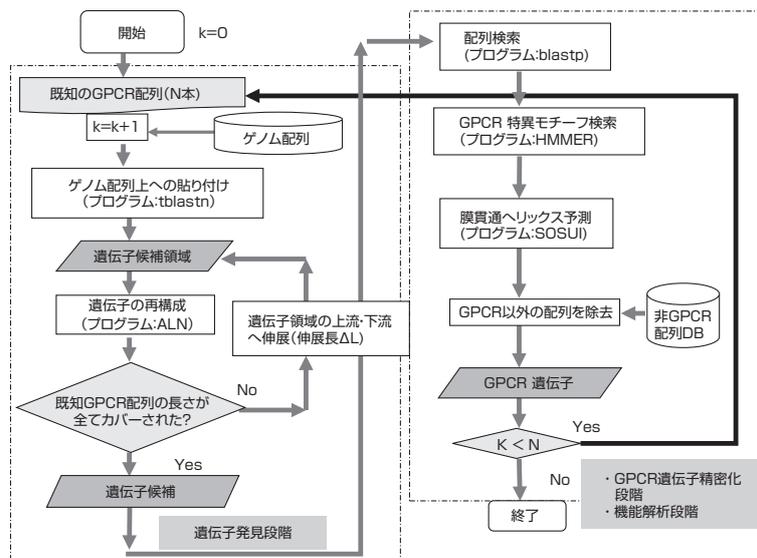


図3 SEVENS-パイプライン  
ゲノム配列からGPCR遺伝子を網羅的に同定するために段階的に様々なツールを最適な閾値、順番で組合せた解析パイプライン。

しくないものを予測してしまう場合)が含まれる可能性が高い一方で、新規 GPCR を含む可能性が高くなる。興味深いことに 11 番染色体上に GPCR の大部分が集中し、嗅覚受容体がそのほとんどを占めることや、3 番染色体にケモカイン受容体が集中することなどが分かったが、これは網羅的な遺伝子同定により初めて可能になったわけである。これらの中で新規と判定した数百の配列について 2002 年に特許を出願したが、それに対してある製薬企業から内容開示請求があり、開示料収入を得た。つまり製品化研究としての成果が上がったのである。

計算手法で構造・機能情報が付加された GPCR 配列は、2003 年にデータベースに収めて公開した (SEVENS<sup>[7]</sup> <http://sevens.cbrc.jp/1.20/>、一番最初のバージョン)。この時点では、コア技術が一応完成し、白紙状態からの最初のサイクルとしてのプロジェクトは一度区切りをむかえた。

## 4 循環的な発展を遂げるプロジェクト

### 4.1 ホップ: プロジェクト全体のコア技術開発

2000 年に始まった本プロジェクトは、要素技術の解析、システム化、製品化と一巡し、WEB 公開した後でも続いている。前節の“一順目の本格研究”が、跳躍でいうところのホップの段階だとすると、この後、ステップ、ジャンプと段階が上がっていく過程になる。以下に、その後の共同研究への展開と、それを通じての技術開発の進展を示す。

### 4.2 ステップ: 産学との連携からコア技術へのフィードバック

2002 年、企業と共同し SEVENS 中の新規 GPCR に関して、ヒトの複数の組織において多くの配列の発現を実験的に確認し、特に重要な配列に対し特許を出願した。計算手法で予測した遺伝子であっても発現が確認できたということは私たちの方針の妥当性を示すことになった。

しかし一方で課題も残った。遺伝子の発現確認には、微量な核酸配列サンプルを短時間に急増幅できるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 反応) という方法を用いたが、この反応解析を行うための配列は、その両末端部分が正確な完全長であることが望ましい。しかし、予測遺伝子には開始 (または終止) エクソンの同定に失敗して両末端が欠けていた例が多いことが分かった。このほとんどが、多くのエクソンからなる長い遺伝子で、非常に広い領域に広がっていたため、遺伝子領域周辺の付加伸展長のパラメータが、3.1 節で定めた値 (1,000 塩基) では十分ではなかったのだ。そこで改めて遺伝子存在領域を、常識的な想定範囲よりはるかに広げて検討したところ、驚くことに任意のエクソンの上流、下流 140,000 塩基までは考慮する必要があることが判明した。

SEVENS パイプラインの対象は GPCR だが、各段階のパラメータを替えれば、別の種類のタンパク質に対しても応用可能である。2002 年から東京大学のベンチャー研究所と始めた共同研究ではこれを狙った。慢性関節リウマチや多発性硬化症など難治性炎症疾患では、慢性的炎症個所に免疫細胞が過度に集積して組織を破壊する。これはケモカインというタンパク質がその受容体の GPCR (CCR2) と結合することで免疫細胞の遊走を誘発するためなので、ケモカインの結合を阻害する分子 (アンタゴニスト) の探索競争になっていた。しかし CCR2 と構造が類似し、臓器形成や細胞の分化・増殖時に作用するような別のサブタイプ of ケモカイン受容体同士でアンタゴニストが交差した際に起きると危惧される副作用を回避するため、アンタゴニストとは別ルートで CCR2 を制御する分子を探索することが望まれていた。

実験的研究からは、既に CCR2 の細胞内 C 末端に特異的に会合する新規遺伝子 (FROUNT) がその候補であることを示していた。一方私たちは、これが複数のヘリックスが繰り返し現れる構造からなる 600 残基の長いタンパク質であることと、短く弱いモチーフを複数持つという特徴を入れてゲノム中から探索した結果、この新規遺伝子自体と完全一致する領域は 2 か所しか存在しないが、弱いスコアながら一致を示す領域であれば複数存在することが分かった。この研究は Nature Immunology<sup>[8]</sup> に掲載された。

以上、二つの共同研究で再検討した技術を SEVENS パイプラインに反映していくことになった。

### 4.3 ジャンプ: 新たな機能予測プログラムの開発

2004 年から、製薬企業との共同研究が始まった。ここでは、選択的に G タンパク質の活性化を制御できるリガンドを効率的かつ網羅的にスクリーニングする計算機システムを構築し、最終的に結合リガンドが不明なオーファン受容体のリガンドスクリーニングに応用することをめざした。

まず、SEVENS のレベル A データセットから 108 本のヒトの新規の GPCR を選び出したが、これらはオーファン受容体でもある。次に、スクリーニングする側のリガンドについては、遺伝子同定パイプラインをペプチド性リガンド探索用に最適化してから、既知ペプチド性リガンドを基にしてヒトゲノムから網羅的に同定した。

一方で、G タンパク質活性化をモニターできるプログラムを開発した。まず結合リガンドと共役 G タンパク質が既知の配列 ( $G_{i/o}$  型: 61、 $G_{q/11}$  型: 47、 $G_s$  型: 23) を用い、認識性能が最も高いとされている機械学習手法の Support Vector Machine (SVM) 法により、リガンド、GPCR、G タンパク質の様々な部位の物理化学的パラメータから、共役 G タンパク質の種類を判別分類するのに効果的に効くパ

ラメータと最適な判別平面を決定した。最適化パラメータ<sup>[9]</sup>と判別平面を用いて、リガンド分子量と GPCR を入力すると最初に G<sub>s</sub> 結合タイプを選別後、残りから G<sub>i/o</sub> か G<sub>q/11</sub> かの 2 者判別を行うという階層判別のプログラム(GRIFFIN)にしたが、85%以上の感度、選択性で予測可能となった<sup>[10]</sup>。

以上を使えば、GPCR に結合するリガンドデータベースを基に、特定のペプチド性リガンドが結合した受容体がシグナル伝達下流で活性化させる G タンパク質種を予測できるので、受容体を発現させる評価系の設計にも役立つ。GRIFFIN は、SEVENS の機能解析段階において、機能未知 GPCR 予測用に利用していくこととなった。

#### 4.4 再ホップ：研究のスケールアップのため第1種基礎研究

これまではヒトゲノムだけを扱った内容だったが、原理的には他の生物ゲノムでも応用可能である。2005 年から、文部科学省の特定領域研究に参加し、本格的に比較ゲノム研究を開始したが、それには SEVENS パイプラインを他の生物用に改良する必要があった。当時、入手できた 200 を超える原核生物ゲノム、十数種の真核生物ゲノム配列を基に、既知遺伝子をゲノム配列にマップする際の類似期待値スコア (E 値) や遺伝子候補領域の上 / 下流への付加伸展長等を調査した。改良パイプラインを用いたところ、GPCR は原核生物からは殆ど同定されない一方、真核生物種では酵母で数個、植物で十数個、昆虫で約 200、魚類、鳥類では約数 100、哺乳類では約数 100 ~ 数 1,000 見出された。昆虫、線形動物、脊椎動物間で、神経伝達や細胞間相互作用等生命活動に最低限必要な受容体は全生物に保存されていたが、脊椎動物ではより複雑な機能に関連する受容体の種類が急増していた。また外界の化学物質の受容体は、水中、空気中など環境に対応して生物種ごとに特有な分布をみせた。例えば哺乳類では GPCR 遺伝子のうち嗅覚受容体の割合が多く 7 割程度にも及んだ。これらは高密度な遺伝子重複を繰り返して急増したことを示唆している<sup>[11]</sup>。多生物種用 SEVENS パイプラインはこの時点でほぼ自動化し、生物の種類が増える度に解析し続けることが可能になった。

#### 4.5 再ステップ：新規プロトコルを導入したパイプラインの活用

様々な生物種から GPCR を同定、公開していることが評価され、2007 年から日中共同研究によるカイコゲノムプロジェクトに参加するようになった。カイコゲノムは鱗翅目昆虫で最初に完成した配列で、解析により医療用タンパク質等や新機能絹糸の生産技術開発を加速することで、新しい農業開発等、昆虫産業の展開に貢献する可能性がある。

私たちは、東京大学、京都工芸繊維大グループと共同

し、カイコゲノムから 7 本膜貫通ヘリックス型受容体を同定し、ファミリー分布を明らかにした。特に嗅覚、味覚受容体に関しては他の昆虫 (ショウジョウバエ、ハマダラカ、ミツバチ) と比べてカイコ特有の性質をいくつか見出した<sup>[12]</sup>。

ここでも、SEVENS パイプラインを昆虫用に改良することから始める必要があった。すなわち、既知遺伝子をゲノムに貼る際の配列類似度スコア、上流、下流へ広げる付加伸展長の調査、および昆虫嗅覚受容体のみに見られる共通配列の隠れマルコフモデル化等を行った。また同定遺伝子数をできる限り最大化することを目指したため、新しいプロトコルを導入した。通常のパイプラインでは、既知遺伝子を種にすると、それよりも多い数の新規遺伝子を含めた遺伝子候補が釣れてくる。そこで、これら新規遺伝子を改めてパイプラインの最初の種にすれば、さらに新規の数が増えていく。こうして予測遺伝子数が収束するまで逐次的に繰り返す (再帰計算) というものである。これを応用し、嗅覚受容体を 66 個同定したが、この中に含まれる新規受容体 18 個の発現、機能解析実験により、カイコが桑の葉に強くひき寄せられる要因となる匂い物質 (シスジャスモン) とその受容体を世界で初めて同定することができた。これは生物学分野で世界的成果となり、Current Biology 誌に掲載された<sup>[13]</sup>。

昆虫用のパイプラインや再帰計算プロトコルは、現在の SEVENS に反映している。

#### 4.6 現在の成果 SEVENSとGRIFFIN

2009 年現在、SEVENS は科学研究費補助金 (研究成果公開促進費) の支援のもと、43 種の真核生物種に対し 24,545 遺伝子を収納しており、様々な機能・構造情報を階層的にまとめ、視覚的に表現した総合 DB になっている。これまでの共同研究で改良された技術がその都度フィードバックされ、現在は情報量がとても豊富になっている。図 4 に現在の SEVENS の WEB 画面 (<http://sevens.cbrc.jp>) を示す。

トップページには真核生物のリストが表示され、生物種を指定すると、検索画面が表示される。ここでの染色体マップ、系統樹アイコン、検索条件入力フォームのいずれからも GPCR 詳細解析画面に移動できる。詳細解析画面では選択した GPCR の座標やエクソン配列、配列類似性検索、遺伝子発現パターン、リガンド結合、G タンパク質結合、アミノ酸配列の組成、予測膜貫通ヘリックス領域、機能モチーフ領域、ドメイン領域、不定形な構造になると予測した領域 (ディスオーダー領域)、エクソン-イントロン境界、偽遺伝子、新規遺伝子、立体構造モデリング等の情報が閲覧できる。

一方、機能予測のために開発した GRIFFIN は WEB で

も利用可能であり (<http://griffin.cbrc.jp/>)、リガンド分子量と GPCR 配列を入力すると、結合する G タンパク質を予測する。リガンド分子量は特定の値でも任意の刻み数で段階的に指定することもできる。段階的なリガンド分子量指定は、結合リガンドが不明なオーファン受容体の結合 G タンパク質予測に役立つ。

## 5 再ジャンプ：今後の研究展開

### 5.1 高次な生命現象の理解

これまででは、網羅的な観点ながらも個別遺伝子の機能解析に重点を置いていたが、今後は遺伝子全体のネットワークに根ざした高次な生命現象の理解に向けた研究が必要である。

この観点で、現在取り組み始めたのは、哺乳類 GPCR の大部分を占める嗅覚受容体に関与するシステムの研究である。嗅覚システムは、膨大な匂い分子種の組み合わせを媒介として記憶や感情を誘引するため、もしこのシステムを体系的に理解できれば、将来的には匂い分子のブレンドにより快適に感じる生活環境を生み出すための研究に繋がる可能性もある。

多様な匂い分子に反応する数百種の嗅覚受容体全てからの電気的な活性化信号が、嗅上皮組織で統合され 2 次元パターン（匂い地図）へと変換される。このような匂い分子、受容体、細胞、匂い地図の時間、空間的な因果関係を理解したい。具体的には匂い分子に対する全ての

嗅覚受容体の活性を予測するプログラム（活性化アレイ）を開発し、ヒトやマウスの全嗅覚受容体に応用する予定である。既に私たちは、SEVENS 中に嗅覚受容体を全て保有している。GRIFFIN を改良すれば匂い分子に対する全嗅覚受容体の応答シミュレーションができると考えている。

### 5.2 GPCRの新しい研究フェーズ

近年の GPCR の立体構造に関する急激な研究の進展も意識する必要がある。これまで長い間、立体構造が解かれたのは、唯一牛のロドプシンのみで、創薬の現場ではこれを鋳型にしたモデリング構造を解析することが当然視されていた。しかし 2007 年～2008 年に異なるファミリーの GPCR 構造<sup>[14][15]</sup>が立て続けに決定されたことから、従来の研究法が急速に大きく変わると予想される。

新しい立体構造からは、リガンド結合部位、G タンパク質結合部位の構造の違いは、ファミリー間で無視できない程度広がっていることが分かったので、結局は鋳型として GPCR ファミリーの代表全ての立体構造を決める必要があることが示唆されている。しかし発現と結晶化がボトルネックとなり、すぐには実現困難であるため、予め立体構造決定とは別の切り口で構造情報を得ておきたい。そこで配列レベルでファミリーごとの立体構造を反映した情報を抽出、概観するのが重要であり、SEVENS は正にこの目的で利用できる。

### 5.3 統合データベースを意識した開発

生命情報を収めた DB はライフサイエンス研究を支える

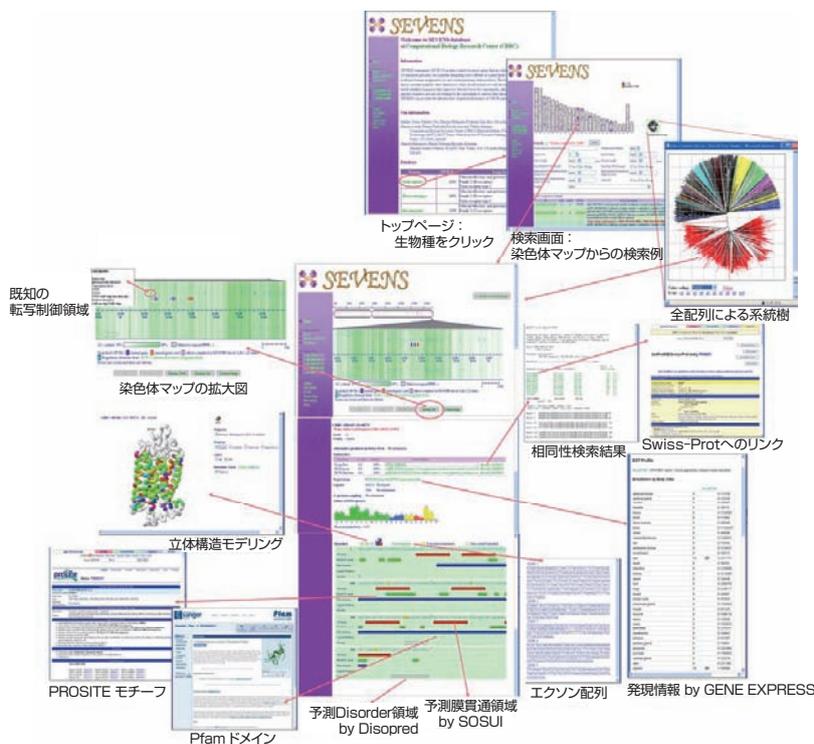


図 4 現在の SEVENS データベース (<http://sevens.cbrc.jp>)

基盤であるが、様々な研究機関に散在しているため利便性が低い。そこで各々のDBを一元的に管理する形で統合する体制作りが国として急速に進められている（例えば、文部科学省や経済産業省の統合DBプロジェクト等）。今後SEVENSもこの流れを意識して設計していく必要がある。すなわち恒久的な維持、管理を行うために更新を完全自動化し、なおかつデータの信頼度を高く保つ方策が必要である。

## 6 議論

### 6.1 研究シナリオ：循環発展的なプロジェクト構造

前章までに、本プロジェクトの成果と今後の展開を示した。ライフサイエンス分野の研究の進展は早いので、遠い将来までの“正しい”研究シナリオを書くのは困難であるということを最初に述べたが、振り返ってみると実に効率よく研究が展開していったように思える。2000年からスタートしたプロジェクトは、まずGPCRの網羅的DBの開発から公開までが、最初の段階の本格研究になっている。しかしこの段階は、より大きな研究発展段階の、ホップ段階（第1種基礎研究）として繰り返されておき、これに続く段階として、第2種基礎研究的な共同研究、製品化研究的な共同研究が循環的に発展を続け、今日に至っている(図5(a))。

なぜ直線的ではなく、このような発展形態になったのだろうか？次のような理由を考えている。まず、2章で示したとおりバイオインフォマティクス分野では成果に至るまでの

時間が短いので、図5(a)の各研究段階は1～2年で決着がつく小プロジェクトに成り易い。それら小段階の研究方向性を小ベクトルと考えると、それらとライフサイエンス全体の方向性の合成ベクトルが全体のプロジェクトの方向を決めるといえる。このような方向の決定は段階ごとに成されていく。次に、そもそもライフサイエンス分野の方向性が、飛躍的な技術発展に伴いながら循環発展的な動きをするのでその影響を受けて発展していくことになる。

では、この小ベクトルを今日まで途絶えること無く進めてきた駆動力は何だったのだろうか？以下にその要素を示してみたが、これらが図5(b)のように働いて研究方向性が決まってきたと考えている。

#### 1) 長期熟成のコア技術

プロジェクトは8年以上が経過している。通常は5年程度が常識で、研究打ち切りを言われていてもおかしくはない。しかし私たちの場合、コア技術を長期熟成することで、研究のステージが次々と上がってきたことを伝えたい。循環発展的構造が途切れなかった最も本質的な要因は、遺伝子同定パイプラインや、DB、プログラムに対して粘り強く改良を積み重ねることでSEVENS自体が信頼され得るものになったことだと思っている。一旦、完成してしまうと論文を1本書くだけで、後はメンテナンスがなされないDBが多い中、何年経過しても時流に対応して更新し続けて残っていること自体がブランド力となり、共同研究が舞い込んでくるように思う。

#### 2) 実験研究者との密な連携

バイオインフォマティクス技術は大量のデータを短時間で

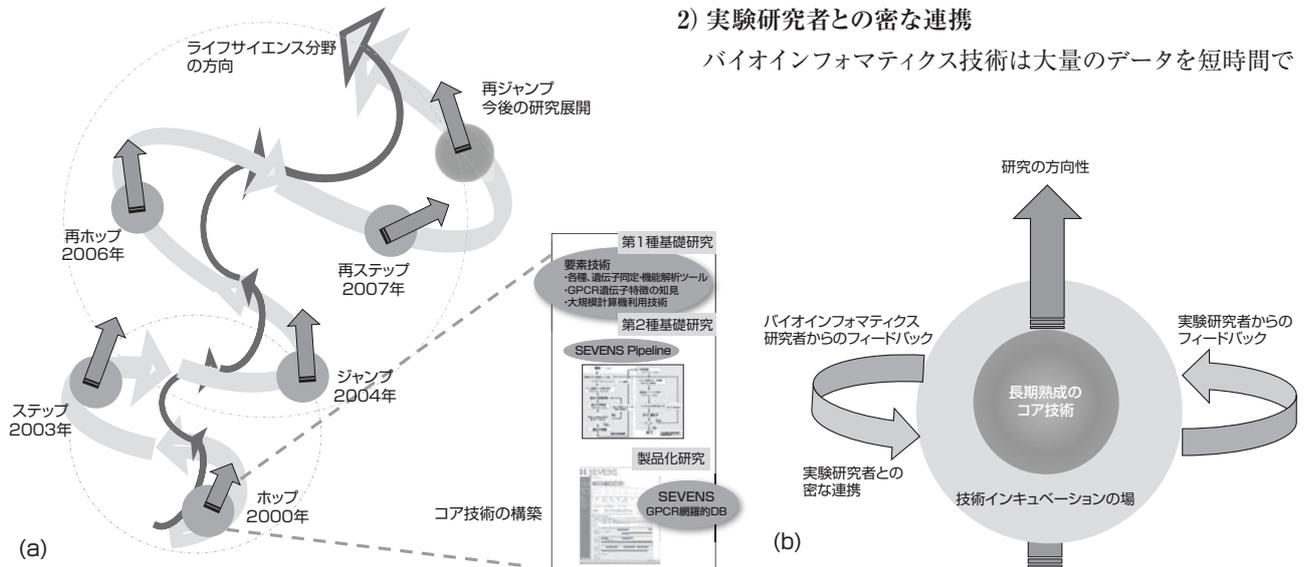


図5 循環的な発展をとげるプロジェクト構造の概念図

(a) プロジェクト開始時のGPCRの網羅的DBの開発から公開までが、小さな意味での本格研究だが、この段階はより大きな研究発展段階の第1種基礎研究的な段階（ホップ、再ホップ）として繰り返され、これに続き、第2種基礎研究的な共同研究（ステップ、再ステップ）、製品化研究的（ジャンプ、再ジャンプ）な共同研究が循環的に展開している。これは各ステップの共同研究の方向性と、自身が急速に進展するライフサイエンス分野の方向性の相互作用として発展し続ける形態である。

(b) 各ステップの共同研究の駆動力となる3要素の関係性。①長期熟成されたコア技術は、②技術インキュベーションを生む研究環境内で、さらに成長、熟成が進む。これをもとにバイオインフォマティクス研究者と実験研究者との③密な連携によるフィードバックがかかった回転運動が共同研究の方向ベクトルを決める。これはコマの回転が軸方向を決めるのに似ている。

処理して、結果を出すことは得意分野である。しかしながらその結果が真に意味をもつか否かは、実験的研究で確認しなくては検証できない。そして検証の結果からのフィードバックを受けることで、要素技術で設定したパラメータをより良い方向に修正することができる。一方、実験系研究者にとっては、予測結果を受けて、リスクやコストの低い、より良い実験系の設計に修正することができる。私たちのプロジェクトでは、実験研究者との様々な共同研究を通じて議論を重ね、この双方向からのフィードバックが何度も働き、解析・予測技術の改良作業が加速化されたのだと思う。私たちの研究ユニットとしては実験を行わないが、今後のあらゆる研究で、常に実験研究者と連携するのが必須であるぐらいの取り組みが必要だと感じている。

### 3) インキュベーションの場

生命情報科学研究センター（現在のセンターの前身）の設立と前後して2000年にプロジェクトはスタートした。しかし必ずしも順調な始まりとはいえなかった。当時としては、前例の無いことだったので、どこから手を付け進行するか、模索しながらの始まりだった。もちろん、プロジェクトの進行に関する見通しが全くなかったわけではない。細胞膜のタンパク質を長年研究してきた者として、“こうすればできる”というイメージは、当初からもっていたが、筆者一人では具体的に実現化する手段が掴めなかった。しかし、並列計算環境の専門家である秋山氏、数理モデルの専門家である浅井氏と共同することで、大規模並列計算環境や高度な数学的手法を応用した強力な解析ができるようになった。また、現在でも、様々な局面での周りの研究者との議論が参考になっている。このようなことは、様々なバックグラウンドを持つ研究者が1箇所に集まった生命情報工学研究センターでなければ実現できなかったことであり、この幸運に感謝している。

## 6.2 研究目標への到達度

本プロジェクト開始時の目的は、GPCR 研究に関しバイオインフォマティクス技術により、実験上の大きなリスクを軽減し、予め実験結果を予測して実験の設計に資する情報を提示することであった。2000年当初に比べ、最近ではKinaseなどのGPCRとは異なるタンパク質や、タンパク質複合体形成阻害剤等が創薬ターゲット中で占める割合が高まっている。しかしGPCRの重要性は未だ色褪せておらず、バイオ情報の増加に伴い、学術論文の本数はむしろ急増している。その中で私たちは目的を達成できたのだろうか？

SEVENSでは、実験ですでに発現を確認しているGPCRだけではなく、生体内で潜在的に発現しうる遺伝子まで把握していることから、本当の意味での網羅的解析ができるという点で独自性をもっており、GPCRの総合的な

理解や関連創薬に大きく貢献できると自負している。しかし実際に貢献できたか否かは、開発したツールがどれくらい利用され、フィードバックを受けたかが一つの指標になる。現在、国際学術誌、文科省や経産省の統合DB整備事業等のポータルサイトにもリンクされ、国内、国外（アメリカ、ドイツ、フランス、ブラジル、スペイン、イタリア、台湾等）の企業や、政府機関等から月平均1,000件程度の非冗長なアクセス数がある。また、創薬関連の代表的WEB DBの1つとして、国際書籍<sup>[16][17]</sup>にもレビューされている。一方GRIFFINはGタンパク質結合予測のWEBツールとしてトップクラスを競っているところであり、これも国際書籍<sup>[18]</sup>にレビューされている。

4章で示したように、これまで多くの産学官連携の共同研究が、循環的な発展をしながら展開し、重要な成果を得てきた。最初の段階では、想像もできなかったが、振り返ってみると実に効率よく研究が展開していったことに驚いている。プロジェクト開始当初では、企業との共同研究が主だったが、ここ3年ほどでアカデミックサイドとの共同研究が多くなった。これは、SEVENSのユーザーの裾野が広がってきたことを示している。最近では、大変うれしいことに、学会の懇親会等で、初めてお会いする製薬企業、大学等の実験系研究者からSEVENSやGRIFFINを利用しており、新規遺伝子の解析に役に立ったとの話を聞くこともある。以上を鑑みると、当初の目標はある程度達成され、自己評価としては満足のいくものと考えている。

SEVENSプロジェクトは今後も発展していく。これまで長い時間をかけて蓄積した機能データを基に、実験研究者と本格的にタイアップして、GPCRが関与する高次元生命現象の解明につながる成果を出していきたいと考えている。

## 謝辞

このプロジェクトは、多くの方たちとの共同研究である。秋山泰氏（東工大、前生命情報科学研究センター長）、浅井潔氏（東大/生命情報工学研究センター長）、有田正規氏（東大）、油谷浩幸教授（東大）、佐藤智之氏（みずほ情報総研）、大河内郁夫氏（みずほ情報総研）には、GPCR遺伝子同定技術導入に関してご助力をいただいた。広川貴次氏（生命情報工学研究センター 研究チーム長）、矢葺幸光氏（情報数理研究所）にはGRIFFIN開発に関してご助力をいただいた。藤渕航氏（生命情報工学研究センター 研究チーム長）、西澤達也氏（情報数理研究所）、奈良先端科学技術大学院大学の多くの学生には、GPCRの比較ゲノム解析に関してご助力をいただいた。以上の皆様に心から感謝いたします。

## 参考文献

- [1] E. S. Lander *et al.*: International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409, 860-921 (2001).
- [2] A. Shenker: G protein-coupled receptor structure and function: The impact of disease-causing mutations, *Baillieres Clin. Endocrinol Metab.*, 9, 427-451 (1995).
- [3] O. Gotoh: Homology-based gene structure prediction: Simplified matching algorithm using a translated codon, (tron) and improved accuracy by allowing for long gaps, *Bioinformatics*, 16, 190-202 (2000).
- [4] <http://genedecoder.cbrc.jp/>
- [5] <http://hmmer.janelia.org/>
- [6] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng and S. Mitaku: SOSUI, Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics*, 14, 378-379 (1998).
- [7] M. Suwa, T. Sato, I. Okouchi, T. Kumagai, M. Arita, K. Asai, Y. Akiyama, S. Matsumoto, S. Tsutsumi and H. Aburatani: SEVENS, *Nucleic Acids Research.*, 31, Online summary paper (<http://www3.oup.co.uk/nar/database/summary/summary/373>), (2003).
- [8] Y. Terashima, N. Onai, M. Enomoto, V. Poonpiriya, T. Hamada, K. Motomura, M. Suwa, T. Ezaki, T. Haga, S. Kanagasaki and K. Matsushima: Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis, *Nature Immunology*, 6, 827-835 (2005).
- [9] T. Muramatsu and M. Suwa: Statistical analysis and prediction of functional residues effective for GPCR-G-protein coupling selectivity, *PROTEIN Engineering Design & Selection*, 19, 277-283 (2006).
- [10] Y. Yabuki, T. Muramatsu, T. Hirokawa, H. Mukai and M. Suwa: GRIFFIN, a system for predicting GPCR-G-protein coupling selectivity using a support vector machine and a hidden Markov model, *Nucleic Acid Research*, 33, W148-W153 (2005).
- [11] Y. Ono, W. Fujibuchi and M. Suwa: Automatic gene collection system for genome-scale overview of G-protein coupled receptors in eukaryotes, *Gene*, 364, 63-73 (2005).
- [12] Q. Xia *et al.*: Silk worm genome consortium, The genome of a lepidopteran model insect, the silk worm *Bombyx mori*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 1036-1045 (2008).
- [13] K. Tanaka, Y. Uda, Y. Ono, T. Nakagawa, M. Suwa, R. Yamaoka and K. Touhara: Highly selective tuning of a silk worm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile, *Curr. Biol.* 19, 881- 890 (2009).
- [14] M. A. Hanson and R. C. Stevens: Discovery of new GPCR biology, one receptor structure at a time, *Structure*. 17, 8-14 (2009).
- [15] D. T. Lodowski, T. E. Angel and K. Palczewski: Comparative analysis of GPCR crystal structures, *Photochem Photobiol.*, 85425-85430 (2009).
- [16] L. X. Yao, Z. C. Wu, Z. L. Ji, Y. Z. Chen and X. Chen: Internet resources related to drug action and human response: A review, *Applied Bioinformatics*, 5, 131-139 (2006).
- [17] L. J. Zhi, L. Z. Sun, X. Chen, C. J. Zheng, L. X. Yao, L. Y. Han, Z. W. Cao, J. F. Wang, W. K. Yeo, C. Z. Cai and Y. Z. Chen: Internet resources for proteins associated with drug therapeutic effects, adverse reactions and ADME, *Drug Discovery Today*, 8, 526-529 (2003).
- [18] A. Daskalaki ed.: Handbook of Research on Systems Biology Applications in Medicine, Vol I (Medical Information Science Reference Press) (2009).

## 執筆者略歴

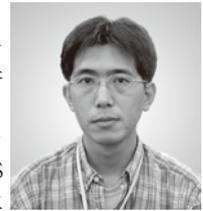
諏訪 牧子 (すわ まきこ)

独立行政法人産業技術総合研究所生命情報工学研究センター主幹研究員。1986年青山学院大学大学院理工学研究科前期課程修了、博士(理学)。東京農工大学工学部、文部技官、助手、株式会社ヘリックス研究所主任研究員、工業技術院電子技術総合研究所主任研究員、産業技術総合研究所生命情報科学研究センター 研究チーム長、副研究センター長を経て、2007年より現職。専門：バイオインフォマティクス、生物物理学。本論文で記述したプロジェクトでは全体の統括を担当した。



小野 幸輝 (おの ゆきてる)

株式会社情報数理研究所バイオリフサイエンスシステム事業部第8ビジネスグループマネージャー。1994年名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻前期課程修了。株式会社ジャズテックを経て、2001年より現職。専門：バイオインフォマティクス。本論文では主にSEVENSのWEBインターフェースの開発と共同研究で生じた改良点の実装を担当した。



## 査読者との議論

## 議論1 研究の進め方についての主張点

コメント (赤松 幹之: 産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門)

タイトルにあるように「バイオインフォマティクス戦略」的な内容になっていることがシンセシオロジー論文として期待されます。戦略的とは、ゴールを意図して研究のシナリオ(プロセス)を事前に定めてから研究をすることですので、もし、このような循環的な研究の進め方として意図的に工夫されたことがあれば、その記述をお願いします。また、著者自身が意図せずこのような展開になったのであれば、このような循環的なDBの発展が起きるために必要な条件は何であるか書いていただければと思います。また、DBの循環的な発展プロセスを述べるのが本論文のポイントだと思いますので、その発展プロセスを図示したものを含めていただくと、主張点が分かり易くなると思います。

コメント (中島 秀之: はこだて未来大学)

研究手法に関して「伝えたいポイント」を、一般読者層(外部の他分野研究者)も意識して、加筆していただけると良いと思います。

回答 (諏訪 牧子)

本文中で示したバイオインフォマティクス戦略とは、必ずしも、研究のシナリオを事前に定めてからそのロードマップに従って進めて行くものではありません。むしろ、振り返ってみると、意図せずとも実に効率よく研究が展開していったと感じますので、それを生み出すバイオインフォマティクス特有の駆動力があったことに注目したものです。

研究プロジェクト全体の発展の流れは、複数の要素(長期成熟されたコア技術、実験研究者との密な連携、技術インキュベーションを生む環境等)を駆動力として進む個別研究の方向性と、進展の速いライフサイエンス分野の方向性との相互作用としてスパイラルアップして進み続けるダイナミックな形態と考えられます。(この発展プロセスを図5(a)、(b)として図示しました。)

このような形態は、バイオインフォマティクスが研究ターゲットによる強い制限を受けないために、状況に応じて多様な方向性を定めることができるという性質と、基礎研究からその応用と実用化への期間が短いために個別の研究は1~2年で決着がつくという性質によるものだと思います。

## 議論2 タイトル

コメント (赤松 幹之)

シンセシオロジー的（構成学的）観点からの内容が推察できるように、共同研究によってDBがスパイラルアップして研究が進展していったことを論じた論文であることを示すようなタイトルをご検討ください。

回答 (諏訪 牧子)

最初のタイトル「創薬ターゲット GPCR の探索と機能解析－バイオインフォマティクスの戦略－」では、研究の中身は想像が付きませんが、ご指摘のように構成学という観点で見たときにバイオインフォマティクスの戦略なるものが、どのようにプロジェクト全体に関わってくるのかは読み取れない内容でした。そこでその点を明確にするべく、「循環発展的なプロジェクト構造を生むバイオインフォマティクス戦略－創薬ターゲット遺伝子の網羅的機能解析－」というタイトルに変えました。

## 議論3 第2種基礎研究

コメント (赤松 幹之)

「3.2 遺伝子同定・機能解析パイプライン」第1段落最後：「これらの組合せの研究は、正に第2種基礎研究といえる」とありますが、できれば、どういう点が第2種基礎研究であると考えられているのか解説していただけますでしょうか。

回答 (諏訪 牧子)

ご指摘の箇所は、遺伝子同定・機能解析パイプラインを開発する内容のところですが、すでに基礎研究を積み重ねて確立している各要素プログラムを組み合わせでシステム化し、それを制御しながら対象に応用するという観点なので、第2種基礎研究と言えるということであり、この趣旨の文章を加筆しました。

## 議論4 バイオインフォマティクス

コメント (中島 秀之)

1ページに出てくる「バイオインフォマティクス」の説明ですが、生物学の手段としての情報技術（つまり道具）という位置づけだけが強調されています。確かに本論文ではその側面が強いのですが、生命情報工学研究センターが主張してきたのは「単なる道具ではない」ということでした。情動的考え方・アプローチが大事であるという点を追加しておいてはいかがでしょうか。

回答 (諏訪 牧子)

ご指摘の箇所では、実験研究的アプローチでの困難性を軽減させるという観点から見たときに、バイオインフォマティクス技術の持つ強みを強調しようとしたため、「単なる道具」に見えてしまうような偏った内容になってしまった感があります。そのため、バイオインフォマティクスの一般的な定義をまず先に示した後に、その中に含まれる一側面として、上記のような強みを記載する書き方に修正いたしました。

バイオインフォマティクスは多様なバックグラウンドを持った研究者が集まる広い学問であり、その定義の捉え方と、その中のどの側面を切り取って扱うかは、出身分野に従ってかなりの広がりを持っているのではないかと感じています。私の場合は、生物物理学出身ということもあり、生物学的知見を得ることに力点を置きます。そのための試行錯誤は研究対象に左右されて結構泥臭いものになり、この研究対象にはどのようなプログラムをどんな順番でどのように組み合わせるかという「道具を利用する」的な発想に必然的になることから、本文でもその色が滲み出ていました。これは、本来、対象を選ばずに、美しい体系を適用する方向性を持つ情報学的アプローチとは異なってきますが、このような捉えかたも容認されています。このような多様性こそが、バイオインフォマティクスという分野の発展に広がりを与えるものだと考えています。