

ストレスで異なる遺伝子発現パターン（シグナルの数，種類）を検出することができた。このことから，今回作製したわずか12種類の遺伝子の発現パターンにより，7種類のストレスを区別することができるようになった。これにより，DNAチップを用いた環境ストレスモニタリング手法の基盤が確立できた。

ここでは，筆者が作製したDNAアレイによる植物の環境ストレス診断手法について述べた。これにより環境ストレスの種類を，植物に見た目の障害が現れる前に遺伝子診断することができる可能性が示された。この方法は，今後未知のストレスが現れた場合でもそれに対して応答する遺伝子を単離し，プローブ化することで対応できる非常に柔軟性の高い方法である。しかし，遺伝子発現はストレスの総量（時間，程度）によって変化することや，複合ストレスをどのように診断するのかなど，まだ課題は多い。また，DNAの標識に蛍光色素やラジオアイソトープを用いること，遺伝子発現の解析に特殊な装置を必要とすることなど，設備面やコスト面での課題もある。今後はこれらの課題を克服していくことで，より完成度の高い遺伝子診断手法の確立ができると期待される。 [玉置雅紀]

#### ■文 献

- 1) Heagle, A. S. *et al.* (1995): *Water Air Soil Pollut.*, 85, 1373-1378.
- 2) Heggestad, H. E. (1991): *Environ. Pollut.*, 74, 264-291.
- 3) Kangasjärvi, J. *et al.* (1994): *Plant Cell Environ.*, 17, 783-794.
- 4) Matsuyama, T. *et al.* (2002): *Environ. Pollut.*, 117, 191-194.
- 5) Omasa, K. and Takayama, K. (2002): *Air Pollution and Plant Biotechnology*, Springer-Verlag.
- 6) 関 直彦ら (2000): DNAマイクロアレイの原理と種類, 秀潤社.
- 7) Tamaoki, M. *et al.* (2003): *Plant Mol. Biol.*, 53, 443-456.
- 8) Tamaoki, M. *et al.* (2004): *Environ. Pollut.*, 131, 137-145.

### 5.5 植物反応の画像計測

植物反応の画像計測技術の発達はめざましく，植物の生長や形態的な変化，生理・生化学機能などに関する様々な情報を得る技術が開発されている（表5.4）（たとえば，大政ら，1988；Häder, 2000；Omasa *et al.*, 2002；日本生物環境調節学会，2004）。顕微鏡レベルでは，共焦点のレーザスキャン顕微鏡の発達によ

表 5.4 植物を対象とした生体画像計測技術と得られる情報

代表的な画像計測技術	取得可能な主な情報
三次元形状計測システム (ステレオ, 単眼視, レンジファインダなど)	位置, 形状, 器官生長, バイオマスなど
分光反射画像計測システム (マルチバンド・ハイパースペクトルなど)	器官生長, 色調, 含有色素など
分光蛍光画像計測システム (LIF, クロロフィル蛍光など)	含有色素, 成分, 光合成など
顕微画像計測システム (共焦点, 走査プローブ, 分光蛍光など)	細胞構造, 成分, 機能, 遺伝子情報など
赤外画像計測システム (熱赤外, FTIR, 顕微鏡など)	気孔反応, 蒸散, 成分など
CT (X線, MRI, ポジトロンなど)	生体内構造, 成分, 機能など

り, 細胞や組織の生理・生化学機能や遺伝子に関する情報が得られる。また, 器官や個体レベルでも, 形状計測から機能計測へ, 二次元計測から三次元計測へ, さらに, 受動計測から能動計測へと発達してきている。そして, 細胞や組織, 葉のレベルでの機能解明や環境応答解析などに利用されている。また, 環境汚染の植物への影響の診断や農作業用ロボット, 種苗生産, 栽培管理の自動化など, 農業や環境分野への利用も試みられている (大政, 2002; 日本生物環境調節学会, 2004)。ここでは, 植物反応で重要な光合成や蒸散・気孔反応に関する情報を得ることができる, クロロフィル (Chl) 蛍光画像計測法と熱赤外画像計測法について簡単に紹介する。

### (1) クロロフィル蛍光画像計測法

植物は, 光合成を行うために同化色素で光エネルギーを吸収し, これを反応中心に集めて光化学反応(水の分解)を駆動し, 後に続く CO<sub>2</sub> 固定のための化学エネルギーを作り出している。その際, 吸収した光エネルギーのすべてを光化学反応に用いることができるわけではなく, 余った光エネルギーは, 熱として捨てられる (熱放散) か, 吸収した光よりも長波長の光として捨てられる (再発光される) ことになる。この捨てられた光が Chl 蛍光である (Govindjee, 1995)。常温条件下において, Chl 蛍光は主に光化学系 II (PSII) に属する Chl *a* から発せられ, 683 nm 付近に波長のピークをもつ赤色光として観察される (Chl 蛍光を励起する光の波長は, 683 nm 以下と考えて差し支えない)。吸収された光のうちで, 蛍光として再発光されるものの割合を蛍光収率と呼ぶ。Chl 蛍光収率は, 光合成反応系の状態により大きく変化するため, この値を正確に計測することにより, 光合成反応系についての情報を非破壊かつ非接触で得ることができる。一般的な Chl 蛍光画像計測システムでは, Chl 蛍光の励起に青色光が用いられてい

る。光源としては、ショートパスフィルタ ( $\lambda < 570 \text{ nm}$  など) を装着したハロゲンランプやメタルハライドランプが用いられることが多いが、最近では、青色LEDを利用したシステムも市販されている。青色光照射により励起されたChl蛍光は、ロングパスフィルタ ( $\lambda > 640 \text{ nm}$ ) を透過してCCDカメラで計測する。

Chl蛍光から光合成反応についての定量的な情報を得るには、「飽和パルス法」と呼ばれる解析法を用いる。飽和パルス法では、 $\Phi_{\text{PSII}}$  や  $\text{NPQ}$  などの蛍光パラメータを算出する。 $\Phi_{\text{PSII}}$  は、PSIIの量子収率 (PSIIへ分配された光量子のうちで、実際に電子伝達反応に用いられたものの割合) を示しており、この値に光強度を乗ずれば、電子伝達速度を算出できる (Genty *et al.*, 1989)。そのため、酸素濃度2%以下の嫌気条件で計測された $\Phi_{\text{PSII}}$ は、光合成速度と高い相関を示す。 $\text{NPQ}$ は、実際に光合成を行っている状態での熱放散経路の活性化程度を数値化した指標である (Bilger and Björkman, 1990)。これらの蛍光パラメータは、3種類の蛍光収率画像 ( $\Phi F_m$ ,  $\Phi F$ ,  $\Phi F_m'$ ) を用いて算出される。 $\Phi F_m$ は約20分間の暗処理後に暗条件下において飽和パルス光を照射したときに計測される暗期最大蛍光収率、 $\Phi F$ は明条件下で実際に光合成を行っている状態で計測される明期定常蛍光収率、 $\Phi F_m'$ は $\Phi F$ 計測直後に明条件下で飽和パルス光を照射して計測される明期最大蛍光収率である。飽和パルス光とは光強度が  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  程度で、照射時間が約1秒間の強光パルス光であり、照射中の光化学反応を一時的に飽和させる目的で照射する計測用の光である。つまり、飽和パルス光照射中に葉が吸収する光エネルギーは、熱として放散されるか蛍光として再発光されるかのいずれかの運命をたどる。そのため、 $\Phi_{\text{PSII}}$ 画像と $\text{NPQ}$ 画像は、前述の3種類の蛍光収率画像を用いて次式により算出される。

$$\Phi_{\text{PSII}} = (\Phi F_m' - \Phi F) / \Phi F_m'$$

$$\text{NPQ} = (\Phi F_m - \Phi F_m') / \Phi F_m'$$

図5.30は、飽和パルス法を用いて、葉面散布型の除草剤 (有効成分はグルホシネート) が光合成機能に及ぼす影響を診断した例である。葉面に散布後30分以内に、塗布領域の電子伝達速度が低下し、熱放散経路が活性化されている。これは、グルホシネートが葉緑体内のアンモニアを取り除く酵素 (グルタミン合成酵素) の機能を阻害したことにより、葉内にアンモニアが蓄積したために引き起こされた光合成機能障害であると考えられる (Takayama *et al.*, 2003)。

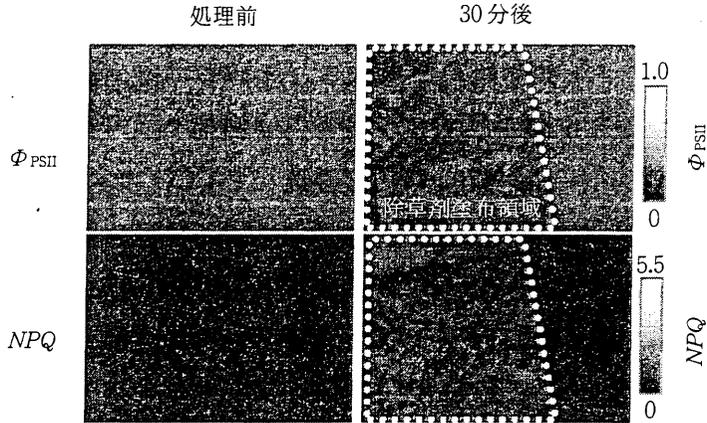


図 5.30 飽和パルス法を用いた除草剤による光合成機能障害の診断 (Takayama *et al.*, 2003)

## (2) 熱赤外面像計測法

植物は、光合成の基質である  $\text{CO}_2$  を大気中から葉内に取り込むために気孔を開く。このとき、代償として葉内の水分が気孔を通して大気中に失われていく。この現象は蒸散と呼ばれ、気孔を大きく開いて盛んに光合成を行っている場合には蒸散速度が大きく、このとき、多くの蒸発潜熱が奪われるために葉面温度（葉温）は低くなる。熱赤外面像計測では、多くのポイントの温度を非接触で計測できるため、葉面の不均一な蒸散反応の解析が可能である。

葉面の局所部位における蒸散速度  $W$  ( $\text{g mm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) は、葉の向・背軸面の環境条件が同じであると仮定した場合、熱収支式を用いて次式のように表せる。

$$W = \frac{\alpha_p E_s + \varepsilon [E_w - 2\sigma(273.15 + T_i)^4] + 2g_{aH}\rho c_p(T_a - T_i)}{L}$$

ここで、 $E_s$  は環境からの短波放射 ( $\text{W m}^{-2}$ , 波長  $\leq 3 \mu\text{m}$ )、 $E_w$  は環境からの長波放射 ( $\text{W m}^{-2}$ , 波長  $\geq 3 \mu\text{m}$ )、 $T_i$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) は葉温、 $T_a$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) は気温、 $\alpha_p$  は葉の短波放射の吸収率、 $\varepsilon$  は葉の長波放射の放射率、 $\sigma$  はステファン-ボルツマン定数 ( $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-4}$ )、 $g_{aH}$  は熱伝達に対する境界層コンダクタンス ( $\text{mm s}^{-1}$ )、 $\rho c_p$  は空気の熱容量 ( $\text{W s m}^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ )、 $L$  は蒸発潜熱 ( $\text{W s g}^{-1}$ ) である。また、葉面における蒸散は、フィック (Fick) の法則に基づいて、大気と気孔底界面間の水蒸気密度差とその間の拡散コンダクタンスを用いて次式のようにも表現できる。

$$W = \frac{X(T_i) - hX(T_a)}{1/g_{su} + 1/g_{aw}} + \frac{X(T_i) - hX(T_a)}{1/g_{sl} + 1/g_{aw}}$$

ここで、 $h$ は相対湿度、 $X(T)$ は温度  $T$  [°C] における飽和水蒸気密度 ( $\text{g mm}^{-3}$ )、 $g_{su}$  および  $g_{sl}$  ( $\text{mm s}^{-1}$ ) はそれぞれ向軸面および背軸面の水蒸気拡散に対する気孔コンダクタンス、 $g_{aw}$  ( $\text{mm s}^{-1}$ ) は葉面の水蒸気拡散に対する境界層コンダクタンスである。上記の二つの式は、気温、相対湿度、短波放射、長波放射、気流（境界層コンダクタンス）などの環境条件が既知であれば、葉温を計測するだけで蒸散速度と気孔コンダクタンスの算出が可能であることを意味する。筆者らは、1980年代の初めに、この手法を葉面における大気汚染ガス吸収速度分布の解析に応用している。詳しくは参考文献を参照されたい（大政ら、1988；Omasa *et al.*, 2002）。

熱赤外画像と Chl 蛍光画像を同時計測すれば、気孔反応と光合成反応との関係を解析できる。図 5.31 は、このシステムを用いて、ABA 溶液塗布処理が光合成反応および気孔反応に及ぼす影響を解析した例である。図では、ABA 溶液塗布 50 分後に気孔コンダクタンスが著しく低下して蛍光パラメータも変化 ( $\Phi_{PSII}$  は低下し  $NPQ$  は上昇) した一部の領域を除いて、気孔コンダクタンスが

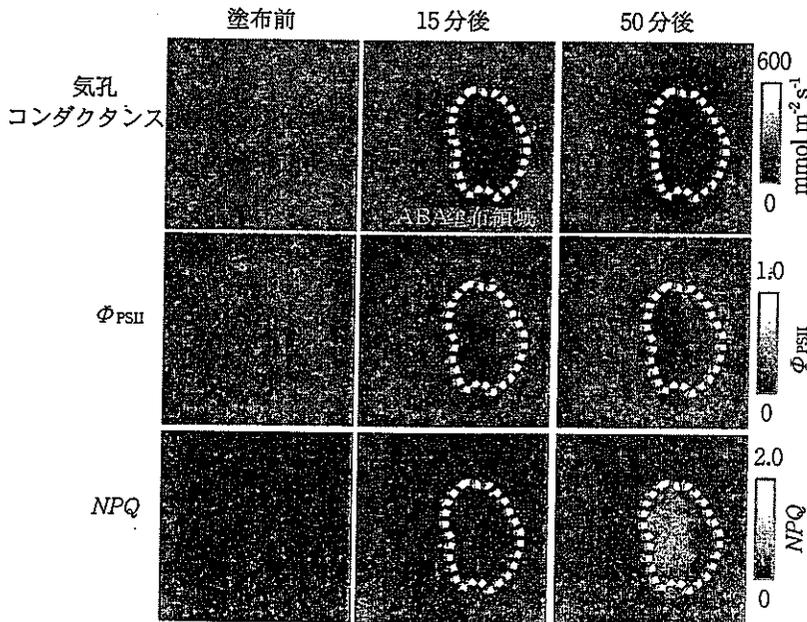


図 5.31 ABA 溶液塗布処理が光合成と気孔反応に及ぼす影響 (Omasa and Takayama, 2003)

低下しても蛍光パラメータが変化しない領域が認められる（たとえば、ABA 溶液塗布 15 分後の ABA 塗布領域内）。このような領域では、気孔閉鎖により葉内への CO<sub>2</sub> 供給量が低下して CO<sub>2</sub> 固定反応が滞ったことにより余剰となったエネルギーを、光呼吸により効率よく消費しているものと解釈できる (Omasa and Takayama, 2003)。

Chl 蛍光画像計測法や熱赤外画像計測法などの画像計測法は、一定領域の平均値を計測するようなスポット計測法では検知できない微小領域における変化を敏感に検知でき、さらに、人間の目にみえない植物反応の可視化が可能である。今後、既存の画像計測機器が改良されたり、新しい画像計測技術が開発されたりすることにより、これまでになかった新しい植物反応の画像計測法が生み出されていくものと期待される。

[大政謙次・高山弘太郎]

#### ■文 献

- 1) Bilger, W. and Björkman, O. (1990) : *Photosynth. Res.*, **25**, 173-185.
- 2) Genty, B. *et al.* (1989) : *Biochim. Biophys. Acta*, **990**, 87-92.
- 3) Govindjee (1995) : *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 131-160.
- 4) Häder, D. P. ed. (2000) : *Image Analysis: Methods and Applications* (2nd ed.), CRC Press.
- 5) 日本生物環境調節学会編 (2004) : 新農業環境工学, 養賢堂.
- 6) 大政謙次 (2002) : 農業情報研究, **11**, 213-230.
- 7) Omasa, K. and Takayama, K. (2003) : *Plant Cell Physiol.*, **44**(12), 1290-1300.
- 8) Omasa, K. *et al.* (2002) : *Air Pollution and Plant Biotechnology*, Springer-Verlag.
- 9) 大政謙次ら編 (1988) : 植物の計測と診断, 朝倉書店.
- 10) Takayama, K. *et al.* (2003) : *The CIGR J. Sci. Res. Dev.*, V, Manuscript IT 03 001, pp. 1-12.