

DNA アレイ法を用いた遺伝子発現プロファイリングによる植物の 環境ストレスモニタリング手法の開発

Development of a Method for Identification of Plant Environmental Stresses by Gene Expression Profile Using cDNA Array

玉 置 雅 紀

MASANORI TAMAOKI

国立環境研究所生物多様性研究プロジェクト 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2

TEL: 029-850-2466 FAX: 029-850-2490

E-mail: mtamaoki@nies.go.jp

National Institute for Environmental Studies, Biodiversity Conservation Research Project, 16-2 Onogawa,
Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

キーワード: シロイヌナズナ, 遺伝子診断, 環境ストレス, 遺伝子発現プロファイル, DNA アレイ

Key words: *Arabidopsis thaliana*, diagnosis, environmental stress, gene expression profile, DNA array

(原稿受付 2005年5月30日/原稿受理 2005年7月19日)

1. 研究の背景

野生植物は外的環境から様々な影響を受けている。環境の変化は人類が地球上に現れる前は穏やかな変化をしていたと考えられるが、人類の出現後、特に産業革命後の200年は人為的活動の結果発生する環境汚染物質により急激な環境変化を生み出してきた。このような急激な環境変化により近年植物の生育に影響が出るようになってきた。例えば光化学オキシダントの主要成分であるオゾンは先進国のみならず最近では発展途上国に於いても最も主要な大気汚染物質であり、これにより野生植物及び作物の生育に顕著な影響が見られるようになっている。また、フロンガスによるオゾン層の破壊により地球表面に到達する紫外線の量は年々増加しており²⁾、これにより植物の生育阻害が起こることが懸念されている³⁾。酸性雨は葉の表面のワックス層を剥ぎ取るため、結果的に植物は乾燥や紫外線に対する耐性が低下し、やがて個体の枯死を招く。さらに、酸性雨により酸性化した土壌ではアルミニウムやマンガンなどが溶出しやすくなり、これによりヨーロッパでは樹木の根の生育が阻害されているという報告がある⁴⁾。これら以外にも植物は塩、乾燥、重金属、強光、高・低温などの様々なストレスに曝されている。一方植物はこれらのストレスに対して様々な防御機構を発達させているが、これらのストレスの影響が植物の防御反応の閾値を超えてしまうと植物の健全な生育を阻害し、やがて個体の枯死を引き起こす。したがって、このような生育阻害がどのような環境ストレスにより引き起こされたのかを個体への影響が現れる前に正確に知ることは、農作物の管理や野生植物の保全に大きく寄与すると考えられる。

環境ストレスの予測的診断法としてこれまでに特定のストレスに対して感受性の高い植物(指標植物)を利用する方法が開発され、実際に使われてきた。例えばタバコの栽培品種である Bel-W3 系統やクローバーの NCS 系統は大気中にオゾンが他の植物では影響の見られない位の低濃度に存在する場合でも葉に可視的な障害が現れることが知られている^{5,6)}(図1)。この性質を利用して、他の植物にオゾン被害が現れる前に指標植物に現れる葉の可視的な障害を見ることによりオゾンによる植物への被害を事前に診断することが考えられ、実際に利用されてきた。ところがこれらの指標植物における葉の可視障

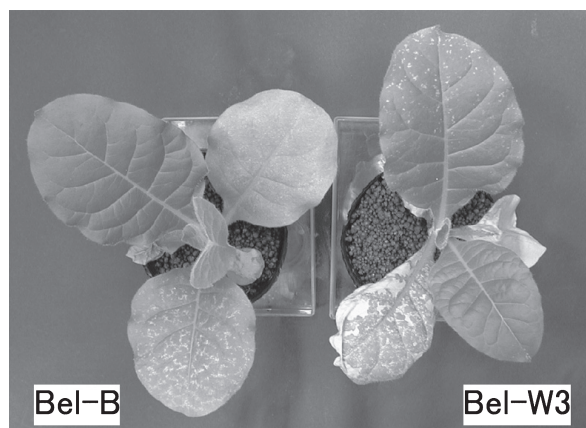


図1. オゾン感受性の異なるタバコにおける葉の可視障害。
左はオゾン耐性系統 Bel-B に、右はオゾン感受性系統 Bel-W3 に 0.2 ppm のオゾンを6時間暴露した後、24時間明所に放置した時の写真。オゾン感受性系統 Bel-W3 の葉には顕著なオゾンによる葉の可視障害が見られる。

害の形成は葉の成熟度、生育環境、水や肥料などにより影響を受けるため確実な指標とするには不十分である⁷⁾。

また、植物の葉を蛍光画像あるいは熱赤外線画像によりモニタリングすることにより環境ストレスによる葉での光合成能力の低下や可視的障害を予測的に診断する手法の開発も行われており一定の成果を挙げている⁸⁾。しかし、この方法で指標としている光合成能力の低下や可視的障害はほとんど全ての環境ストレスにより引き起こされるため、この方法では環境ストレスが植物に影響を与えているかどうかの診断することはできても、その影響がどのような種類の環境ストレスにより引き起こされているのかを正確に診断することは困難であった。

一方、植物は異なる環境ストレスに曝された場合にそれぞれのストレス種に特異的な生理反応を示すことが知られており、さらにこれらの生理反応の少なくとも一部は様々な遺伝子の発現により引き起こされていると考えられる。したがって、環境ストレスにより誘導される遺伝子の発現は、個体の枯死に先立って起こるといえる。近年、いくつかの環境ストレスの暴露に対して発現応答する遺伝子が例えば、オゾン⁹⁾、乾燥¹⁰⁾、紫外線¹¹⁾、重金属¹²⁾、強光¹³⁾、塩^{14,15)}、低温^{14,15)}等を暴露した植物から単離されている。さらに最近では cDNA アレイ法と呼ばれる多くの遺伝子の発現を一度に見ることが出来る方法が開発されている。現在この方法は植物における環境ストレス応答を調べる目的で主に用いられているが、それだけでなく、植物の受けている様々な環境ストレスの診断にも非常に有効なツールとして使用することが出来る可能性を秘めている。そこで本稿では環境ストレスを受けている植物での遺伝子発現プロファイル DNA アレイ法により比較し、そのプロファイルの違いから、植物の生育に影響を及ぼす環境ストレスの種類を遺伝子発現レベルで診断する手法の開発状況について解説したい。

2. DNA アレイ法とは？¹⁶⁾

遺伝子の発現はゲノム DNA から mRNA への転写と mRNA からタンパク質への翻訳の 2 段階からなっている。DNA アレイ法はこのうち mRNA の種類と量の違いを見る方法である。DNA アレイはガラス基板上あるいはナイロン膜上に数千~数万種類の DNA (これをプローブと呼ぶ) を高密度に配列したツールであり、DNA の集積度の違いによりマイクロアレイ (集積度高い) とマクロアレイ (集積度低い) とに分類される (表 1)。この集積度の違いによりマイクロアレイではガラス基盤に、マクロアレイではナイロン膜を DNA の支持体として用いる。さらに DNA マイクロアレイは、

表 1. DNA マイクロアレイと DNA マクロアレイの特徴の比較

	DNA マイクロアレイ	DNA マクロアレイ
集積度	<10,000遺伝子/cm ²	<500遺伝子/cm ²
検出法	蛍光色素	ラジオアイソトープ
再利用	不可	5~7 回位可能
検出限界	150 mRNA 分子/細胞	15 mRNA 分子/細胞

cDNA 断片をガラス基盤上に固定化した DNA マイクロアレイ¹⁷⁾ と、ガラス基盤上でオリゴヌクレオチドを光リソグラフィによって合成する DNA チップ¹⁸⁾ に大別されるが、これらについては通常明確に区別することはなく一括して DNA マイクロアレイと呼ぶことが多い。

DNA アレイを用いて遺伝子発現を調べるには、まず調べたいサンプルから mRNA を抽出し逆転写酵素により cDNA に変換する。その際にマクロアレイ法ではラジオアイソトープをマイクロアレイ法では蛍光物質を用いて cDNA を標識する (図 2)。標識した cDNA (ターゲット DNA と呼ぶ) をマクロアレイあるいはマイクロアレイと反応させてハイブリッドを形成させる。次に、正しく結合していない cDNA を洗浄して取り除き、標識した cDNA が結合したプローブ DNA のシグナルを読み取ることにより遺伝子の発現を調べることが出来る。

上述したように DNA マクロアレイ法を使用して遺伝

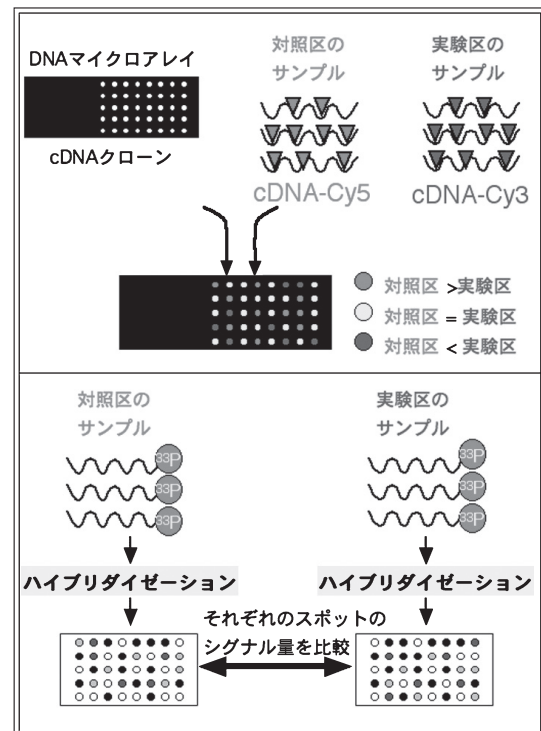


図 2. DNA マイクロアレイ及び DNA マクロアレイにより遺伝子発現変化を検出する方法の概略。

(上図) DNA マイクロアレイ実験の流れ。2つの異なるサンプル (対照区、実験区) から mRNA を調製し、それぞれを異なる励起波長を持つ蛍光物質 (Cy5, Cy3) で標識する。標識化合物を混合し、同一の遺伝子スポット上で競合的ハイブリダイゼーションを行った後、各々の蛍光シグナルを測定して重ね合わせ、擬似色調解析を行う。この例の場合対照区のサンプルで発現量の多い遺伝子のスポットは赤、実験区のサンプルで発現量の多い遺伝子のスポットは緑、ほぼ等量発現している者は黄色で表されている。(下図) DNA マクロアレイ実験の流れ。2つの異なるサンプル (対照区、実験区) から mRNA を調製し、それぞれをラジオアイソトープ (³²P) で標識する。それぞれの標識化合物を同じ DNA プローブがスポットされたマクロアレイ膜に対して独立にハイブリダイゼーションを行う。こうして得られた各スポットのシグナル量を数値化・比較し、2つのサンプル間で発現量の異なる遺伝子を同定する。(この図のカラー版は以下の Web 上で見る事が出来る。http://biotech-id.cool.ne.jp/JEB.html)

子発現を見る場合には全 mRNA をラジオアイソトープ標識したターゲット DNA を用いる。ラジオアイソトープを標識として用いるマクロアレイ法は、蛍光標識したターゲット DNA を用いるマイクロアレイ法に比べて100~1,000倍の感度を有するとされている。一般に1つの細胞では約30万分子の mRNA が存在しているといわれていることから、マクロアレイ法では全発現 mRNA 中0.005%しか存在しない mRNA の発現を検出することが出来るといわれている。そのため DNA マクロアレイ法では理論的に1細胞中におよそ15分子しかない mRNA の発現を調べる事が出来る(表1)。一方、マクロアレイ法の短所としてはひとつの測定サンプルごとに1組(1~数枚)のマクロアレイ膜を使用するため2つのサンプル間の遺伝子発現量を比較したいときには2組のマクロアレイ膜が必要となる。これにより、2組のマクロアレイ膜の間でスポットされたターゲット DNA の量が大きく違った場合には実験誤差がおきやすくデータの信頼性が低下する。

DNA マイクロアレイは DNA の集積度が高いため cDNA の標識にラジオアイソトープを用いるとシグナルがプローブ DNA 間で干渉してしまうため利用できず、代わりに蛍光色素と高出力レーザー励起を用いた検出法が利用されている(表1)。したがって、検出感度は DNA マクロアレイ法よりも劣る。そのため DNA マイクロアレイ法はマクロアレイ法の1/10倍の感度しかない。このような検出感度の問題はあるが、マイクロアレイ法にはマクロアレイ法にない長所がある。すなわち、マイクロアレイ法では多数の DNA プローブを載せた1枚の DNA マイクロアレイに対して比較対象となる2つのサンプルから調製したターゲット DNA (同量の mRNA から逆転写反応でそれぞれ合成する)を競合させてハイブリダイゼーションすることで2つのサンプル間の遺伝子発現量を比較することが出来る。そのため、DNA マイクロアレイ法ではマクロアレイ法にみられるターゲット DNA のスポットむらに伴う実験誤差は生じない。そのため、2つのサンプル間における個々の遺伝子の発現量の差を正確に定量出来る。

3. DNA アレイ法を用いてストレス特異的な発現をする遺伝子を同定する

遺伝子発現の最初のステップはゲノム DNA から mRNA への転写である。したがって、植物組織から mRNA を抽出し、転写産物の種類と量を測定することにより mRNA の全体像を把握することができる。DNA マクロアレイ法では、まず、ある特定のストレスを与えた植物から抽出した全 mRNA を逆転写酵素によりラジオアイソトープ (^{32}P , ^{33}P) を用いて標識しながら cDNA を合成する。こうして合成された標識 cDNA をターゲットと呼ぶ。次に標識されたターゲットを数百~数千種類の遺伝子がスポットされたマクロアレイ膜にハイブリダイゼーションさせることによりマクロアレイ膜上に配置された全てのプローブ遺伝子についてその mRNA の存在量を一度に計測することができる。尚、マイクロアレイ法で遺伝子発現を調べる方法はマクロアレイ法と大差はない。これらの方法の違いはマイクロア

レイ法では cDNA の標識に蛍光色素 (Cy3, Cy5) を用い、プローブ DNA の支持体としてスライドガラスを使うところだけである(表1, 図2)。

環境ストレスにより発現量が変化する遺伝子は、ストレスを与えていない植物から調整した mRNA を対照として用いて同様な実験を行い、ストレスを与えた植物と与えていない植物における遺伝子発現量を遺伝子毎に比較することにより同定することができる。さらに同じ作業を様々なストレスに曝した植物を用いて行い、それらにより得られた遺伝子の発現パターンを他のストレスを与えたときのパターンと比較することによりそれぞれのストレスに対して特異的な発現変化を示す遺伝子 (mRNA) を特定することができる。

4. 使用した植物材料

植物サンプルとしては播種後2週間目のシロイヌナズナを使用した(図3)。この植物は、1) ゲノムサイズが小さい、2) 植物体が小さく室内での大量栽培が容易である、3) 生活環が短い、等の特徴を持っている。更に基礎研究の積み重ねから、4) 大量の突然変異体がある、5) 遺伝子組換え体の作製が容易である、6) 遺伝子マーカーが充実しているため、突然変異体の原因遺伝子の染色体上の位置の特定が容易である等の利点がある。また、2000年12月に全塩基配列が決定され¹⁹⁾、発現遺伝子のカタログである EST (Expression Sequence Tag) も充実している。

シロイヌナズナのゲノムは、約1億2500万個の DNA 塩基対からなっており、その中に約25,000個の遺伝子があることが予想されている。現在それらの遺伝子をほとんどカバーする事ができるほどの EST クローンが単離されているため、DNA マイクロアレイのような大量の遺伝子発現を一度に見る環境が整っている。したがって、本研究は将来的には DNA アレイ法による野生生物への環境ストレス診断を行うことを目標としているが、上記の理由でまずは様々な遺伝子情報が集積しているシロイヌナズナを用いて本手法の有効性を確かめることにした。



図3. 播種後2週間目のシロイヌナズナ。

5. マイクロアレイ法によるストレスモニタリング 手法の開発²⁰⁾

ここではまず筆者が所属する研究室において開発されたマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現パターンによるストレスモニタリング法の概要について解説する。一般に植物はストレスを受けるとこれに対する防御反応としてストレス応答遺伝子を発現することが知られている²¹⁾。これらの遺伝子発現の多くは植物ホルモンを介して誘導されることが知られている。そこで、既にシロイヌナズナにおいて植物ホルモンに反応する事が知られている遺伝子をマイクロアレイ化し、これを用いてストレスモニタリングができるかどうかの検討を行った。まず、シロイヌナズナより32種類のストレス応答遺伝子を単離し、これを用いてマイクロアレイを作成した(図4, 引用文献22のWeb siteに載せた遺伝子の一覧を掲載)。

次にオゾン(0.2 ppmを24時間暴露), 紫外線(290~315 nmの紫外線を24時間照射), 乾燥(植物を根から切り離し地上部を濾紙上に5時間放置, 約20%の水分が消失), 傷害(植物の葉に針で穴を開け7時間栽培)ストレスを与えたシロイヌナズナから mRNA を調整し, これを用いて遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより検出した。個々の遺伝子についてその発現誘導量を横軸にオゾンによる誘導量, 縦軸に乾燥あるいは傷害による誘導量をプロットすると相関係数はそれぞれ, $R=0.143$, $R=0.213$ と低い値を示した。一方で, 横軸にオゾンによる誘導量, 縦軸に紫外線による遺伝子発現の誘導量をプロットすると相関係数は $R=0.89$ と高い相関を示した。

これらのストレスで発現変化した遺伝子の内容を詳細に解析すると, オゾン及び紫外線では *PR-1* (図4の a4の位置にある遺伝子), *PR-2a* (同 a5), *PR-5* (同 a6), *PR-3b* (同 a7), *EDS1* (同 b4) 及び *AtGST1* (b7) の発現が顕著に増加していることが明らかになった(図4, 5)。しかしながら, 乾燥では上述した遺伝子の発現上昇はほとんど見られず, 代わりに *AtVSP* (同 e4) 及び *ADC2* (同 e7) の発現が顕著に上昇した。また, 傷害では *ADC2*, *PR-1*, *PR-2a* 及び *EDS1* の発現パターンがオ

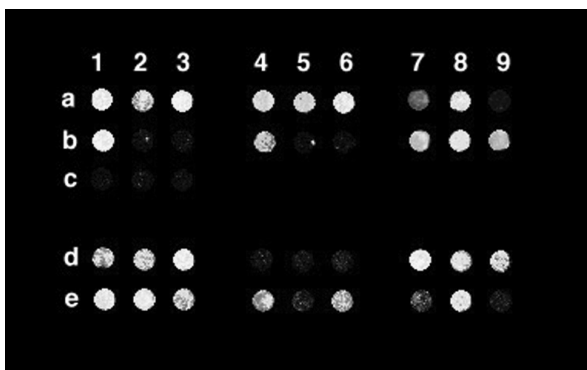


図4. 作成したマイクロアレイを用いたオゾン暴露時の植物における遺伝子発現パターンの例。それぞれのスポットに対応する遺伝子の名前は Web site²²⁾で確認することが出来る。(この図のカラー版は以下のWeb上で見ることが出来る。<http://biotech-id.cool.ne.jp/JEB.html>)

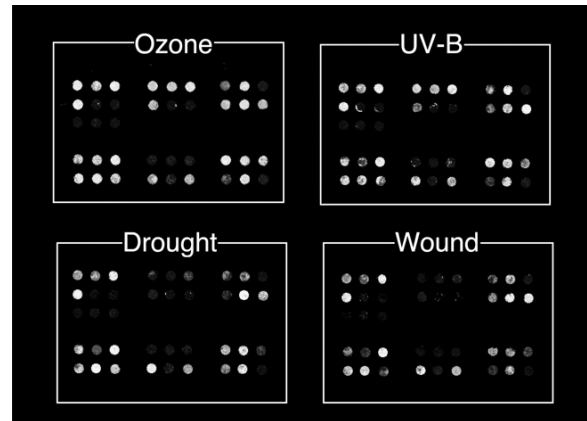


図5. マイクロアレイ法によるストレス診断。

オゾン(左上), 紫外線(右上), 乾燥(左下)及び傷害(右下)を与えたときのマイクロアレイパターン。個々のスポットの発色は特定の遺伝子の発現量を表す。緑:対象区と比べ発現が増加 黄色:発現変化しない 赤:対象区と比べ発現が減少。(この図のカラー版は以下のWeb上で見ることが出来る。<http://biotech-id.cool.ne.jp/JEB.html>)

ゾンと異なっていた。以上の結果は実際のマイクロアレイパターンにも反映されており, マイクロアレイパターン(蛍光の発色パターン)はオゾンと紫外線との間で違いは見られなかったが, 乾燥, 傷害とオゾンの間では区別することができた(図5)。

したがって, DNA アレイ法による遺伝子発現パターンによる環境ストレスの診断はおそらく可能であることが示唆された。しかし, オゾンと紫外線の間では遺伝子発現パターンでは区別できなかったことから, これらの区別にはさらに他の遺伝子をプローブとして用いる必要があることもわかった。

6. マクロアレイ法によるオゾン反応性 遺伝子群の単離²³⁾

DNA マイクロアレイを用いたパイロット実験ではDNA アレイ法により植物の環境診断が可能であることが示されたが, 既知の遺伝子発現情報を元にしたアレイ法では上述したように区別できるストレス種に限界があるという問題点も浮かび上がった。そこで筆者はシロイヌナズナの遺伝子が大量にスポットしてあるマクロアレイを用いてオゾンの暴露により発現変化する新規な遺伝子群を単離し, その中から更に他の環境ストレスで発現変化する(あるいはしない)遺伝子の同定を試みた。尚, オゾン誘導性の遺伝子の単離は播種後2週間後のシロイヌナズナに0.2 ppmのオゾンを12時間暴露した植物から行った。なぜこの時間を選んだのかというと, この暴露時間では植物の葉に可視的な障害及び生育の障害は見られないにも関わらず, 多くのストレス誘導性遺伝子の発現が最大になるため, ストレス誘導遺伝子を効率よく単離することが出来ると判断したためである²⁴⁾。

そこで, この状態の植物とオゾン処理を行わなかった植物からそれぞれ mRNA を調整し約12,000種類のプローブ遺伝子を搭載したマクロアレイを用いてこれらの遺伝子の発現解析を行った(図6)。その結果, 発現量が

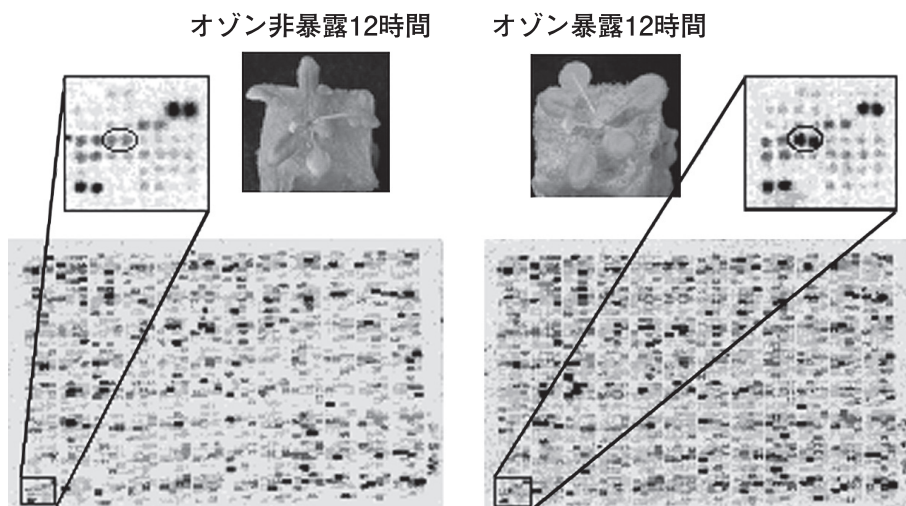


図6. マクロアレイ法によるオゾン誘導性遺伝子の単離。

左はオゾン非暴露した植物、右はオゾン暴露した植物から取られた mRNA によるマクロアレイパターンを示す。ここではマクロアレイメンブレンの一部を拡大してオゾンで発現増加している遺伝子を丸で囲んである。

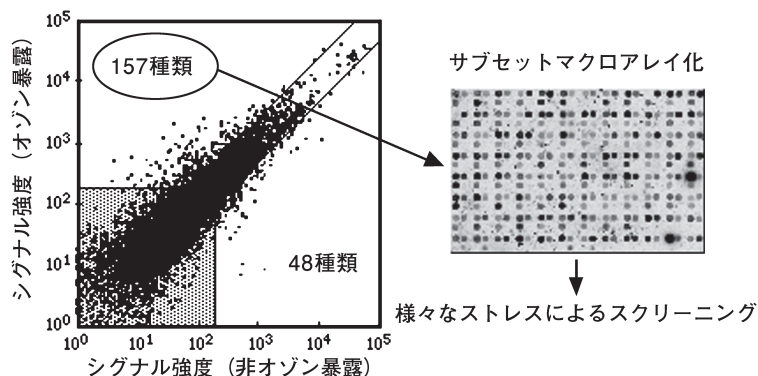


図7. マクロアレイ法によるオゾン誘導性遺伝子の単離及びオゾンで発現増加する遺伝子のサブセットアレイ化。

右図はオゾン暴露(縦軸)と非暴露(横軸)時の遺伝子発現量を比較したグラフを表す。実線はそれぞれオゾンにより3倍以上(上)または1/3以下(下)になる境界線を示す。また、斜線で囲まれた部分はシグナルが弱いためデータの信頼性が低いので解析対象外とした。尚、オゾンにより発現が増加、減少する遺伝子の一覧は [Web site^{29\)}](#) で確認することが出来る。右図はマクロアレイによりオゾンで発現が上昇した遺伝子を利用して作製したサブセットマクロアレイを用いたオゾン暴露時のシロイヌナズナにおける遺伝子発現パターンの例を示す。

比較的高く、オゾンの暴露により3倍以上あるいは1/3以下に発現が変化する遺伝子を205種類同定することができた(図7)。その内訳は、オゾンにより発現が増加するもの157種類、減少するもの48種類であった。

7. ミニマクロアレイを用いた各種ストレスの遺伝子診断²⁶⁾

こうしてオゾンにより発現が変化する遺伝子を多数単離することができたので、次に、オゾンにより発現の増加する157種類の遺伝子をスポットした小スケールのマクロアレイ膜(サブセットマクロアレイ)を作成した(図7)。このサブセットマクロアレイを用いて他の環境ストレスに曝した植物の遺伝子発現パターンの解析を行った。この際、環境ストレスとして、乾燥ストレス(植物を根から切り離し地上部を濾紙上に6時間放置、約20%の水分が消失)、塩ストレス(250 mMの塩化ナト

リウムを12時間吸収)、酸性雨(人工酸性雨、pH 5を葉にスプレーし12時間栽培)、紫外線(290~315 nmの紫外線を12時間照射)、高温(35°Cで12時間栽培)、低温(4°Cで12時間栽培)、を植物に与えた。いずれのストレスを与えた場合でも植物の見た目の変化は観察されなかった。

そこでストレスを与えた植物から mRNA を抽出し、サブセットマクロアレイで遺伝子発現パターンを解析しオゾンの遺伝子発現パターンと比較した。その結果、オゾン暴露に対する紫外線、酸性雨、乾燥、塩ストレス、低温及び高温の遺伝子発現変化パターンの相関係数はそれぞれ $R=0.62, 0.49, 0.41, 0.47, 0.30, 0.40$ と比較的低い値を示した(図8)。このように低い相関しか見られなかったことから、今回作製したサブセットマクロアレイにスポットされている157種類のプローブ DNA の中に上記の全てのストレスを区別することができる遺伝子が含まれていることが明らかになった(尚、各ストレスに

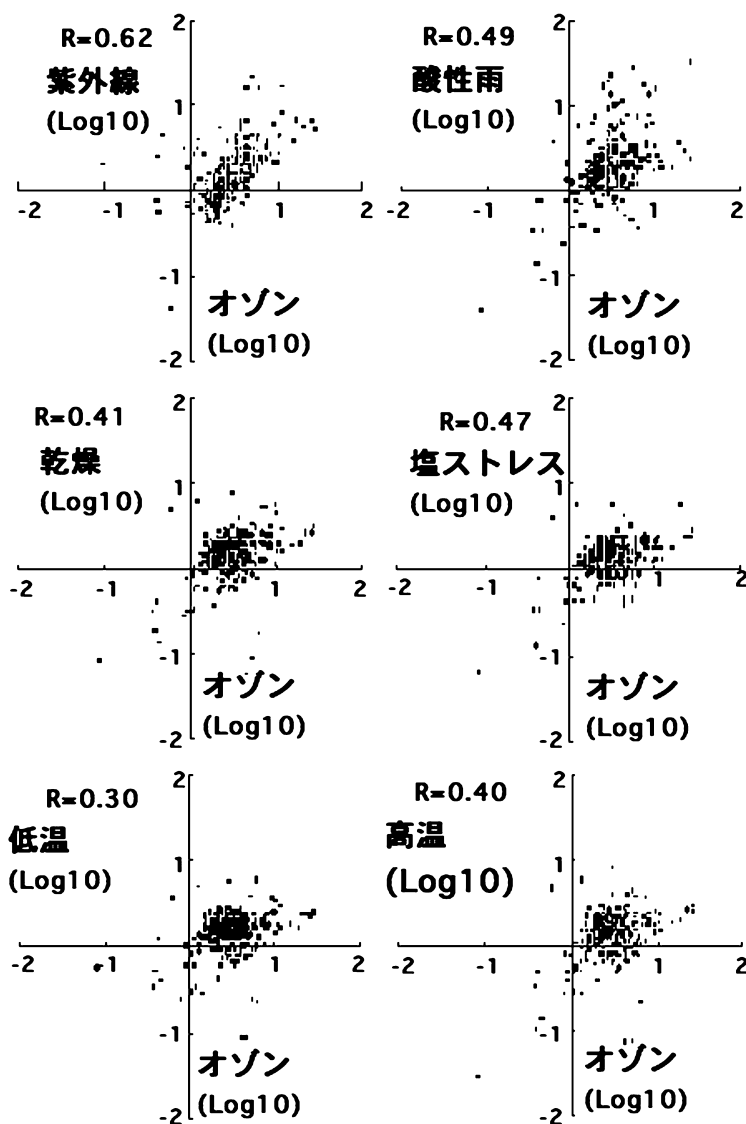


図8. オゾンによる遺伝子発現パターンと他のストレスによる遺伝子発現パターンの比較。
横軸はオゾンによる遺伝子発現の変化量の常用対数、縦軸は各ストレスによる遺伝子変化量の常用対数を表す。

おけるサブセットマイクロアレイによる遺伝子発現誘導量の値は Web site²⁷⁾ の Supplemental Data 1 からダウンロードすることが出来る)。

さらに、以上の結果に基づいてそれぞれのストレスを区別するのに必要最小限な12種類のプローブ遺伝子を選抜し、これらを使ったミニマイクロアレイを作成した。このミニマイクロアレイを用いて各ストレスの区別が可能かどうかの検証を行った。その結果、対象区に比べオゾン、紫外線、酸性雨、乾燥、塩ストレスではそれぞれ9、5、6、2、4個の遺伝子の発現増加が確認され、また、低温と高温では3個の遺伝子の発現が増加したが、発現増加する遺伝子種が異なっていた(図9)。

つまり作成したミニマイクロアレイによりオゾンを含む7種類の環境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成したわずか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 アレイ法を用いた環境

ストレスモニタリング手法の基盤が確立できたと考えられる。

8. 今後の展望

ここでは筆者が作成した DNA マイクロ及びマイクロ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特異的に応答する遺伝子を単離し、DNA アレイ法のプローブとすることで対応することが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等まだまだ課題は多い。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

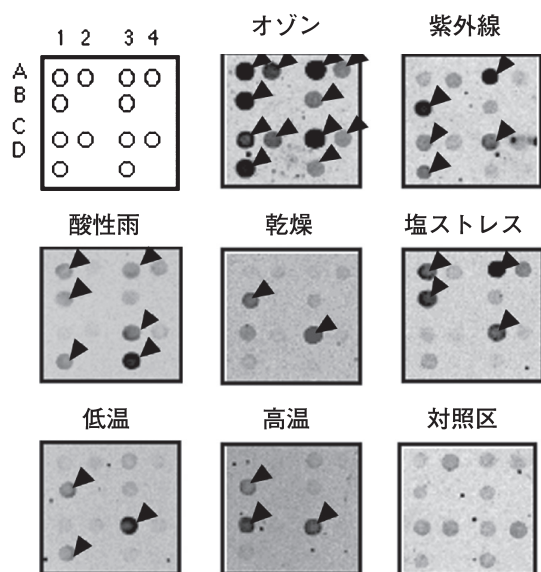


図9. ミニマクロアレイによるストレス診断。

ミニマクロアレイを用いた様々なストレスにおける遺伝子発現パターンを示す。矢印はそれぞれのストレスにより発現が増加した遺伝子を示す。このミニマクロアレイに用いた遺伝子の種類は Web site²⁷⁾ の Supplement Data 2 で確認することが出来る。

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。

現在、筆者が進めている研究では約23,000種類のシロイヌナズナの遺伝子をカバーする DNA マイクロアレイを用いてオゾン、酸性雨、紫外線、SO₂等のストレスに対して特異的かつ持続的に発現誘導してくる遺伝子を単離することができている。このデータと既に文献などで報告されている各ストレス特異的に発現増加する遺伝子に関する情報とを統合することにより、少なくともモデル植物であるシロイヌナズナでは近いうちに DNA アレイ法による環境ストレスモニタリングが可能になることが期待される。

文 献

- Pell, E.J., C.D. Schlagnhauser, and R.N. Artica. 1997. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant* 100: 264–273.
- Molina, M.J., and F.S. Rowland. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature* 249: 810–812.
- Tevini, M. 1994. Physiological changes in plants related to UV-B radiation, pp. 37–56. In R.H.M. Biggs, and E.B. Joyner (ed.), *Stratospheric Ozone Depletion/UV-B Radiation in the Biosphere*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Likens, G.E., C.T. Driscoll, and D.C. Busco. 1996. Long term effects of acid rain: Response and recovery of a forest ecosystem. *Science* 272: 244–246.
- Heagle, A.S., J.E. Miller, B.I. Chevone, T.W. Dreschel, W.J. Manning, P.M. McCool, C.L. Morrison, G.E. Neely, and J. Rebbeck. 1995. Response of a white clover indicator system to tropospheric ozone at eight locations in the United States. *Water Air Soil Pollut.* 85: 1373–1378.
- Heggstad, H.E. 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ. Pollut.* 74: 264–291.
- Krupa, S.V., W.J. Manning, and M. Nosal. 1993. Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environ. Pollut.* 81: 137–146.
- Omasa K., and K. Takayama. 2002. Image instrumentation of chlorophyll a fluorescence for diagnosing photosynthetic injury. pp. 287–308. In K. Omasa, H. Saji, S. Youssefian, and N. Kondo (ed.) *Air Pollution and Plant Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kubo, A. 2002. Effects of air pollutants on gene expression in plants. pp. 121–140. In K. Omasa, H. Saji, S. Youssefian, and N. Kondo (ed.) *Air Pollution and Plant Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327–334.
- Jordan, B.R. 2002. Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Func. Plant Biol.* 29: 909–916.
- Louie, M., N. Kondor, and J.G. Dewitt. 2003. Gene expression in cadmium-tolerant *Datura innoxia*: detection and characterization of cDNAs induced in response to Cd²⁺. *Plant Mol. Biol.* 52: 81–89.
- Hutin, C., L. Nassaume, N. Moise, I. Moya, K. Klopstech, and M. Havaux. 2003. Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4921–4926.
- Kreps, J.A., Y. Wu, H.S. Chang, T. Zhu, X. Wang, and J.F. Harper. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130: 2129–2141.
- Seki, M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, and K. Shinozaki. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279–292.
- 関 直彦, 天野雅彦, 村松正明. 2000. DNA マイクロアレイの原理と種類, pp. 13–25. 細胞工学分冊「DNA マイクロアレイと最新 PCR 法」秀潤社.
- Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467–470.
- Fodor, S.P.A., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, and C.L. Adams. 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364: 555–556.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Matsuyama, T., M. Tamaoki, N. Nakajima, M. Aono, A. Kubo, S. Moriya, T. Ichihara, O. Suzuki, and H. Saji. 2002. cDNA microarray assessment for ozone-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Pollut.* 117: 191–194.
- Kangasjärvi, J., J. Talvinen, M. Utriainen, and R. Karjalainen. 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.* 17: 783–794.
- <http://www.nies.go.jp/biodiversity/members/tamaoki/microarray2.html>.
- Tamaoki, M., N. Nakajima, A. Kubo, M. Aono, T. Matsuyama, and H. Saji. 2003. Transcriptome analysis of O₃-exposed *Arabidopsis* reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression. *Plant Mol. Biol.* 53: 443–456.
- Tamaoki, M., T. Matsuyama, M. Kanna, N. Nakajima, A. Kubo, M. Aono, and H. Saji. 2003. Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* 216: 552–560.

- 25) <http://www.nies.go.jp/biodiversity/members/tamaoki/pmb.html>.
- 26) Tamaoki, M., T. Matsuyama, N. Nakajima, M. Aono, A. Kubo, and H. Saji. 2004. A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using a cDNA macroarray. *Environ. Pollut.* 131: 137–145.
- 27) <http://www.nies.go.jp/biodiversity/members/tamaoki/macroarray.html>.