

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02302

研究課題名(和文) ナノバブルによる種子の発芽促進条件の明確化と発芽プロセスのモデル化

研究課題名(英文) Determination of promotion factors in seed germination and modelling of germination process

研究代表者

大下 誠一(Oshita, Seiichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授

研究者番号：00115693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)： ナノバブル(NB)水による種子の発芽促進とそのメカニズムの解明を目的に、オオムギ種子の発芽実験を行った。同時に、NB水を試料としてESR法による活性酸素(ROS、ヒドロキシルラジカル・OH)の検出を試みた。

その結果、オオムギ種子ではNBの個数濃度が 10^8 個/mLのレベルで安定的に発芽の促進が示された。更に、発芽過程のモデル化に用いたs-shaped modelにおけるパラメータT50(最大発芽率の50%に達するに要する時間)が発芽促進効果の判定に有効であることを示した。また、高濃度の酸素NB水において・OHが検出されたことを踏まえ、・OHが誘起する発芽促進メカニズム(仮説)を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノバブルはバルク水中のサブミクロンオーダーの気泡を指す。これを含有するナノバブル(NB)水が種子の発芽を促進し、s-shaped modelにより発芽過程のモデル化が可能となり、オオムギ種子では 10^8 個/mLレベルのNB個数濃度において種子発芽が安定して促進された。更に、個数濃度が高い酸素NB水でOHラジカル(・OH)の発生がESR法により捉えられたことで、・OHに起因して種子内のスーパーオキシドラジカルが誘起され、発芽促進に至るメカニズムが示唆された。

以上、NBの個数濃度を指標とした発芽促進条件が明確にされたので、現場へのNB水の適用が容易になり、穀物生産の向上に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)： In order to clarify the effect of nanobubbles (NBs) on promotion of seed germination and its mechanism, barley seed germination test was conducted. In parallel to this, reactive oxygen species (ROS, hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) in NB water was tried to be detected by ESR method. Barley seed was used as a target seed sample and its seed germination was promoted stably when the number concentration of NBs was in the order of 10^8 per mL. Adding to this, the parameter of T50 (time required to reach 50% of the maximum germination ratio) was revealed to be adequate for judging the promotion effect.

Finally, OH radical was detected by ESR method which means the mechanism that OH radical in NB water provokes the generation of super oxide radical inside seed leading to the promotion of germination.

研究分野：生物プロセス工学

キーワード：ナノバブル ウльтраファインバブル 活性酸素 ヒドロキシルラジカル スーパーオキシドラジカル
種子発芽促進 発芽モデル ESR

1. 研究開始当初の背景

ナノバブル (NB) はバルク水中に分散して存在するサブミクロンオーダーの気泡である。これを含む水 (ナノバブル水: NB 水) が生理活性を促進することが指摘されてきた。すなわち、NB 発生器で作成した NB が殺菌、脱色、洗浄効果、さらには生物の生長を促進することなどが、農学、工学、医学などの多岐にわたる分野で報告されてきた。その中で、生物の生理活性効果については、NB 水の適用によるイネ水田からのメタンの発生抑制 (Minamikawa et al., *Environmental Research Letters*, 2015)、胡蝶蘭の花持ちの長期化 (高橋正好, フードテクノロジーフォーラム, 2006)、イチゴの成長促進、ナスの品質向上 (氷室, 混相流, 2016)、さらに、水耕栽培によるレタスの生長促進 (Park and Kurata, *Hort Technology*, 2009)、ウコンの活性促進 (Hashimoto et al., 日本混相流学会講演論文集, 2011)、藻類の生長促進 (Zimmerman et al., *Applied Energy*, 2011)、ナタネ (植物) やマス (魚) などの生長促進 (Ebina et al., *PLOS ONE*, 2013) など多数の報告がある。加えて報告者らも NB 水により植物細胞の原形質流動速度が増大することを見出し、オオムギ種子の発芽率が NB 水により格段に向上することを示した (Liu et al., *Chemical Engineering Science*, 2013)。

NB 水が生理活性に寄与する要因には、水の流動性の高まりによる種子内の物質移動・生化学反応の促進やゼータ電位が膜電位に及ぼす影響などが考えられるものの (Liu et al., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2016) 断片的なデータにとどまっており、プロセスの詳細は未解明である。一方で、実験的には、水の物性 (流動性) 変化やゼータ電位などだけでは理解できないほどの、発芽率の向上が観察されている。NB 水に関して更なる要因が見出せなければ、過剰とも思える種子の生理応答、すなわち、発芽促進に説明がつけられない。

一方で、植物生理の分野では活性酸素の役割が明らかにされつつある。すなわち、これまで、種子の発芽に関する研究は植物ホルモンからのアプローチが常套手段であり、発芽はジベレリン (GA) とアブシジン酸 (ABA) とのバランスで決まると理解されてきた。しかし、近年に至って、種子発芽における活性酸素 (ROS) の重要性が報告され、吸水後の種子内における酸化、還元状態により発芽が制御されるという理解が報告されるようになった (Bailly et al., *C. R. Biologies*, 2008., Muller, *Plant Physiology*, 2009., Ishibashi et al., *Plant Physiology*, 2012.)。例えば、生体内で産生された $\cdot\text{OH}$ が伸長生長中の細胞壁多糖類を切断する (Muller et al., 2009) すなわち細胞壁の緩みをもたらし、生長に寄与する指摘がなされていた。

しかしながら、NB 水による種子の発芽促進効果について、NB の個数濃度がどれだけあれば発芽が促進されるかは明らかでなく、また、発芽促進のメカニズムは不明瞭なままであった。

2. 研究の目的

NB 水に含有される NB の個数濃度と種子の発芽促進効果の関係を求め、発芽促進条件の明確化に取り組む。更に、NB 水における ROS の発生を仮定し、これを裏付ける ESR 法による ROS の検出を試みる。以上により、種子の発芽が安定的に促進される NB の個数濃度を特定して生産現場に適用できる指標を提示し、発芽促進のメカニズムを推定することを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 種子と発芽試験

種子には、オオムギ種子を用いた。種子水分を約 13 % w. b. に調製した乾燥種子を 20 前後の室内に静置し、11 月 ~ 45 月にわたって保存することにより、異なる保存期間における種子を採取して実験に供した。いずれの実験でも、粒が大きく、変色がない健全な種子 300 粒を選別し、これを任意に 2 つのグループに分け、一方を NB 水試験区用 (NB 区)、他方を蒸留水試験区 (コントロール区) 用とした。各グループを更に 50 粒ずつ 3 組に分け、プラスチック製ネットに入れた。それぞれの試験区の 50 粒 3 組ずつを NB 水および蒸留水を入れたビーカーに浸漬した。水量は種子 1 粒につき 10 mL とし (各試験区とも 150 粒/1.5L)、各水を 1 日 2 回交換した。恒温水槽を用いて水温を 25 一定で暗条件とし、各測定時間に、各試験区の水で十分に湿らせたろ紙上に種子を 50 粒ずつ整列させ、発芽した種子数を記録した。

3.2 発芽の判定

種子の発芽は、吸水に始まり幼根が伸びて外皮 (種皮) を破ることで終わるとの報告がある (Bewley, *The Plant Cell*, 1997)。しかし本研究では技術的な取扱いを念頭に置いて、ISO 規格 (ISO 18763:2016) に則り、幼根が 1 mm の長さになった状態を発芽と判定した (Soil quality, ISO 18763, 2016)。

3.3 s-shaped model と評価パラメータ

発芽過程をモデル化するために、(1)式に示す s-shaped model を適用し、 T_{50} を求めた (Ritz et al., *PLOS ONE*, 2015)。

$$G(t_i) = G_{\max} / [1 + \exp\{B(\log(t_i) - \log(T_{50}))\}] \quad (1)$$

ここで、 \log は自然対数を表し、記号は以下の通りである。

$G(t_i)$: 観測時刻 t_i における発芽率

G_{\max} : 最終観測時の最大発芽率

本文で使用する $G_{\max, \text{NB}}$ および $G_{\max, \text{Control}}$ は、それぞれ、NB 区および Control 区の最大発芽率

T_{50} : 発芽率が G_{\max} の 50% に達するまでの時間

t_i : 観測時刻

なお、 $t_i=0$ のとき $\log(t_i)$ が計算不可能になるため t_i の最小値を $t_{\min}=0.1$ とする。

B : 観測時刻 T_{50} における回帰曲線の傾き

3.4 NB の個数濃度計測装置

NB の測定には、粒子解析装置ナノサイト LM10 (日本カンタム・デザイン株) を使用した。レーザー光源は 635 nm, 40 mW の半導体レーザーである。

3.5 ESR (電子スピン共鳴) 分光器とラジカル

ESR (Electron Spin Resonance) 分光器は X バンド (9.8 GHz) の EMX-plus (ブルカーピオスピン株) を用いた。測定条件を、中心磁場 3521 G、測定磁場範囲 200 G、磁場変調幅 1 G およびマイクロ波強度 6 mW と設定し、室温にて測定した。

スピントラップ剤には 50 mM の 5-(2,2-dimethyl-1, 3-propoxy cyclophoryl)-55-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO, MW=247.23) (合同会社 PRINC) を用いた。

4. 研究成果

4.1 発芽促進効果とモデル解析

NB 水と Control 水に浸漬した場合の発芽率の経時変化と s-shaped モデルによるフィッティング結果を Fig.1 に示した。NB の個数濃度は 1.54×10^8 個/mL であった。記号 \square は NB 水、 \circ はコントロール水に種子を浸漬した場合であり、1 つの記号は、種子 50 粒を 1 組とした場合の発芽率の平均値を示す。Fig. 1 には T_{50} の 95% 信頼限界も合わせて示した。供試材料は 45 ヶ月保存後の種子である。最終発芽率はコントロール区で 62.0% であったのに対し、NB 区では 87.3% まで向上した。

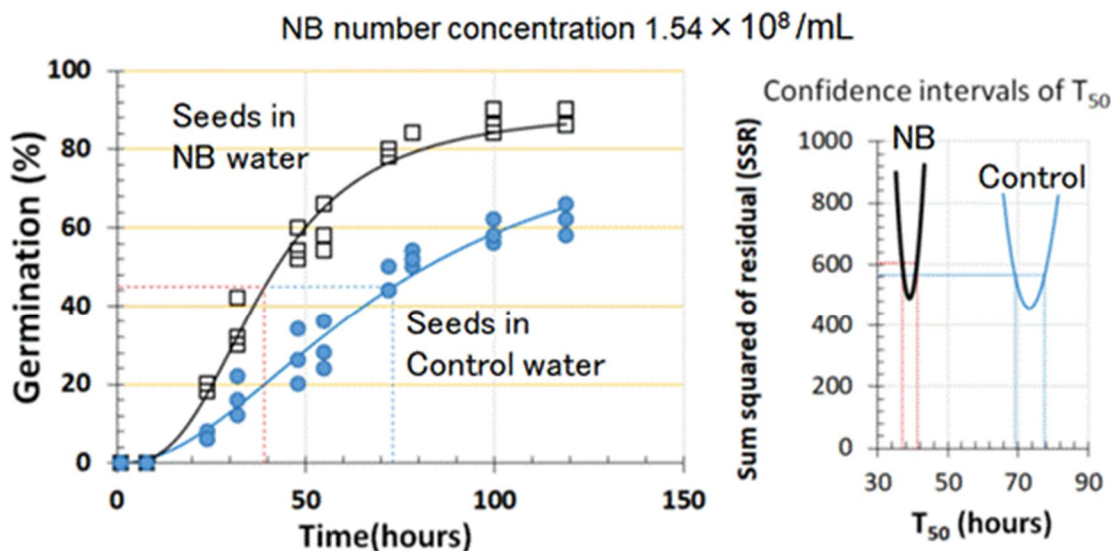


Fig. 1 Fitting curve of seed germination and 95% confidence intervals of T_{50}

同様の実験を NB 個数濃度が 10^6 /mL ~ 10^9 /mL の範囲で行い、発芽促進に有効な個数濃度の範囲を検討した。その結果、 10^6 /mL のレベルでは発芽促進効果がなく ($T_{50, \text{NB}} \approx T_{50, \text{Control}}$)、 10^7 /mL のレベルでは一部に効果が認められるものの安定的な発芽促進効果は期待できないことが示された。これに対し、 10^8 /mL のレベルになると発芽促進効果 ($T_{50, \text{NB}} < T_{50, \text{Control}}$) が安定的に得られた。一方、 10^9 /mL のレベルでは発芽が促進されることがあるものの、注目すべき結果として発芽が抑制される場合があった。

4.2 発芽促進と活性酸素 (ROS)

NB 水において発芽が促進されるメカニズムに関して、NB の個数濃度 (個/mL) の経時的な減少 (NB の圧壊) により ROS ($\cdot\text{OH}$: ヒドロキシルラジカル) が発生し、これがシグナル伝達分子となって種子内の ROS ($\text{O}_2 \cdot^-$: スーパーオキシドアニオンラジカル) の発生を誘発し、発芽を促進するという仮説を立てた。そこで、ESR 法による ROS ($\cdot\text{OH}$) の検出を試みた。発芽実験に用いた空気 NB 水では ROS ($\cdot\text{OH}$) は検出できなかったが、その理由は NB の個数

濃度が低く、ROS は発生するものの ESR 法で検出できる濃度ではないことが推察された。そこで酸素 NB 水を調製した結果、静置した酸素 NB 水において ROS のシグナルが検出された。この結果から、空気 NB 水では微量の NB が圧壊することにより ESR 法では検出できないレベルの ROS が発生していることが推察された。これにより、前述した発芽促進メカニズム（仮説）が裏付けられた。同時に、NB の個数濃度が $10^9/\text{mL}$ のレベルになると発芽が抑制される実験結果となったことも、高濃度の NB 水においては過剰な ROS が発生するため種子に生理的なダメージを与えるためであると推論された。

4.3 まとめ

NB 水による種子の発芽促進効果について実験的に検討した結果、s-shaped モデルにおける T_{50} が促進効果の有無を判定するパラメータとして有効であった。これに基づいた判定に置いて、個数濃度が $10^6/\text{mL}$ のレベルでは効果がなく、 $10^7/\text{mL}$ のレベルでは安定的な発芽促進効果は期待できないこと、 $10^8/\text{mL}$ のレベルになると発芽促進効果が安定的に得られることが判明した。また、更に NB の個数濃度が高い $10^9/\text{mL}$ のレベルでは発芽が抑制される場合があった。

一方、ESR 法による $\cdot\text{OH}$ の検出においては、空気 NB 水ではシグナルが観察されなかったが、酸素の高濃度 NB 水では、外部からエネルギーを与えることなく静置した状態で $\cdot\text{OH}$ のシグナルが観察された。この事実から、 $10^9/\text{mL}$ までの個数濃度のレベルでは水中で圧壊する空気 NB の数が少ないため、ESR 法では $\cdot\text{OH}$ を捉えられなかったものと考えられた。以上により、4.2 に記した発芽促進のメカニズム（仮説）が裏付けられた。今後、静置した空気 NB 水における $\cdot\text{OH}$ の発生を捉えることができれば、仮説の信頼性が向上し、種子のみでなく植物の成長促進効果メカニズムの解明にも資するものとする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 大下誠一、上條雄樹、ファム ティ クイン アン、吉村正俊、五月女格、亀谷宏美、藤田俊弘、リュウ シュ | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 オオムギ種子発芽促進に効果を示すウルトラファインバブルの個数濃度 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 混相流 | 6. 最初と最後の頁 194, 204 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 8件/うち国際学会 11件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Pham Thi Quynh Anh, Dang Quoc Thuyet, Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Modeling the effect of ultrafine bubbles on barley seed germination |
| 3. 学会等名 Vietnam-Japan Science and Technology Symposium（国際学会）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Ultrafine bubble (Nanobubble)'s promotion effect on seed germination and its ISO standardization |
| 3. 学会等名 The 4th International Symposium on Application of High-voltage, Plasmas & Micro/Nano Bubbles (Fine Bubble) to Agriculture and Aquaculture (ISHPMNB 2019)（招待講演）（国際学会）（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大下誠一、上條雄樹、五月女格、吉村正俊、Pham Thi Quynh Anh、亀谷宏美、藤田俊弘 |
| 2. 発表標題 種子発芽促進に効果を示すUFB（ウルトラファインバブル）の個数濃度 |
| 3. 学会等名 日本混相流学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita, Hiromi Kameya, Yuuki Kamijo, Masatoshi Yoshimura, Itaru Sotome, Surina Boerzhijin, Toshihiro Fujita |
| 2. 発表標題 Promotion effect of air ultrafine bubbles on seed germination for sustainable agriculture |
| 3. 学会等名 6th NANO Boston Conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下誠一 |
| 2. 発表標題 ナノバブル (NB) / ウルトラファインバブル (UFB) の安定性と生物への影響 |
| 3. 学会等名 令和2年度「農林水産・食品産業マイクロ・ナノバブル技術研究組合」公開セミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Pham Thi Quynh Anh, Dang Quoc Thuyet, Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Modeling the effect of ultrafine bubbles on barley seed germination |
| 3. 学会等名 Vietnam-Japan Science and Technology Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Ultrafine bubble (Nanobubble)'s promotion effect on seed germination and its ISO standardization |
| 3. 学会等名 The 4th International Symposium on Application of High-voltage, Plasmas & Micro/Nano Bubbles (Fine Bubble) to Agriculture and Aquaculture (ISHPMNB 2019) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大下誠一, 上條雄樹, 五月女格, 吉村正俊, Pham Thi Quynh Anh, 亀谷宏美, 藤田俊弘 |
| 2. 発表標題 種子発芽促進に効果を示すUFB (ウルトラファインバブル) の個数濃度 |
| 3. 学会等名 日本混相流学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大下誠一, 上條雄樹, 五月女格, 吉村正俊, Pham Thi Quynh Anh, 亀谷宏美, 藤田俊弘 |
| 2. 発表標題 UFB (ウルトラファインバブル) による種子発芽促進と殺菌効果の可能性 |
| 3. 学会等名 2019年農業食料工学会・農業施設学会・国際農業工学会第6部会合同国際大会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Characteristics of Nanobubbles (Ultrafine bubbles) and their application to agriculture including ISO standardization activities |
| 3. 学会等名 The 3rd International symposium on Application of High-voltage, Plasma & Micro/Nano Bubble (Fine Bubble) to Agriculture and Aquaculture (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前田重雄, Dang Thuyet, 藤田俊弘, 大下誠一 |
| 2. 発表標題 ultrafineGalFにより生成したウルトラファインバブル水を用いた種子発芽促進効果の国際比較試験 |
| 3. 学会等名 日本混相流学会 混相流シンポジウム2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita, Shu Liu, Thuyet Quoc Dang, Shigeo Maeda |
| 2. 発表標題 Effect of nanobubble water on seed germination and its mechanism |
| 3. 学会等名 256th ACS National Meeting & Exposition: ACS Division of Environmental Chemistry, Nanobubbles: A Sustainable Solution for Water Treatment and Agricultural Application (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Seed germination promotion by UFB and activities of “FBIA International Platform for FB Application” including Japanese farmers on site practices |
| 3. 学会等名 XIth International Symposium on Fine Bubble Technology, Mendeleev, Solnechnogorsk district, Moscow (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Seiichi Oshita |
| 2. 発表標題 Antioxidant Activity of Hydrogen Nanobubble Water against ROS |
| 3. 学会等名 Nanobubble 2018, International Conference on Nanobubbles, Nanodroplets and Their Application, Sushou, China (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下誠一 |
| 2. 発表標題 UFBによる種子発芽促進とFB応用国際プラットフォームの構築 |
| 3. 学会等名 第12回ファインバブル国際シンポジウム (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下誠一 |
| 2. 発表標題 ナノバブル・ファインバブル研究の世界の状況とISO/TC281における農業応用 |
| 3. 学会等名 平成30年度「農林水産・食品産業マイクロ・ナノバブル技術研究組合」公開セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|---------------|
| 研究分担者 | 関崎 勉 (Sekizaki Tsutomu) (70355163) | 東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 五月女 格 (Sotome Itaru) (90469833) | 東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授 (12601) | |
| 研究分担者 | 芹澤 昭示 (Serizawa Akimi) (10027146) | 京都大学・工学研究科・名誉教授 (14301) | 削除：2019年7月31日 |
| 研究分担者 | 二瓶 直登 (Nihei Naoto) (50504065) | 東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授 (12601) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|