

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32621

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22316

研究課題名(和文)植物外的刺激を誘発させるためのマイクロ波パルス条件の探索とそのメカニズム解明

研究課題名(英文) Exploration of microwave pulse condition for inducing external plant stimulation and elucidation of its mechanism

研究代表者

堀越 智 (HORIKOSHI, Satoshi)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：50424784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は播種後14日目のシロイヌナズナに、「微弱な」マイクロ波を1時間照射すると成長が著しく促進することを偶然発見した。この先行研究から「マイクロ波照射の最適条件は?」、「促進原理は?」、「圃場でも効果が得られるのか?」といった疑問が浮かび、これを解明するため、本申請に至った。

本申請研究の結果より、マイクロ波は1秒間パルス照射する条件が最適で、マイクロ波を照射された植物体は、光合成に関連する遺伝子が発現し成長促進につながる事が分かった。また、マイクロ波を照射した小松菜を圃場で栽培すると、発芽率、生長率、害虫忌避率が向上し、生産性が向上することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はマイクロ波と物質の相互作用を熱的または電磁波的效果を切り分けてマイクロ波化学を先導的に行ってきた。この研究を物質から生物へ置き換え、本研究がスタートしている。

本申請研究の内容は、物理学(電磁気)、生物(植物、分子生物学)を横断して行う複合領域であり、このような分野はないことから新分野としての学術的意義は高い。

また、植物の成長や機能を電気の力を短時間利用するだけで制御することができれば、農業の効率や自動化に大きく寄与できるため産業分野への貢献も高い。したがって、計画生産や品種改良、農業自動化、食物問題など多岐にわたる問題を解決することができ、社会的意義が高い内容であるといえる。

研究成果の概要(英文)： The applicant accidentally discovered that *Arabidopsis thaliana* 14 days after sowing was significantly accelerated in growth by irradiation with "weak" microwaves for 1 hr. From this previous research, we have questions such as "What are the optimum conditions for microwave irradiation?", "What is the acceleration mechanism?", And "Is it effective in the farm?" From the results of this application study, it was found that the conditions for irradiating the microwave with a pulse for 1 s are optimal, and that the plant body irradiated with the microwave expresses genes related to photosynthesis and leads to growth promotion. It was also found that when Komatsuna irradiated with microwaves was cultivated in the field, the germination rate, growth rate, and pest repellent rate were improved, and the productivity was improved.

研究分野：マイクロ波科学

キーワード：マイクロ波 植物外的刺激 植物育成 パルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な植物の種子または成長初期の苗の一時期に、食品加熱などで使用されているマイクロ波(数 μ ワット)を60分間照射し、その後は普通に育成するだけで、有益性の高い植物育成(発芽率向上、成長速度促進(図1)、早生化、耐熱性向上(図2)、種子のサイズや数の増加、生体重の増加、害虫忌避率向上、種子のサイズや収量増加、ロゼット回避向上)ができることを偶然発見した。これらの植物成長における現象は、熱などの既存の外的刺激では得られないことから、電磁波としてのマイクロ波エネルギーが誘発する刺激であると推察した。しかし、その効果はマイクロ波照射装置に依存することが分かり、その原因はマイクロ波を連続で照射しても、マイクロ波刺激を与えることはできず(図3)、ON/OFFを繰り返すパルス波(図4)でマイクロ波を照射しなければならないことが分かった。

2. 研究の目的

現在まで得られている結果に対して、植物へ与えるマイクロ波刺激法における、(1)高精度マイクロ波装置の試作、(2)最適照射条件の探索、(3)メカニズム解明、(4)実用植物での評価について研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本実験では、実験項目が4つあるため、各々の実験方法を分けて示す。

(1) 高精度マイクロ波装置の試作

マイクロ波電場の強度ジフィー内のシロイヌナズナ5株に対して、5%以下の範囲で均一照射(熱的影響が発生しない許容範囲)できるマイクロ波アプリケーション(照射箱)と、マイクロ波パルスを1ミリ秒0.1Wの範囲で不規則に調整できるマイクロ波発振器を組み合わせた、マイクロ波照射装置を試作した。試作機のマイクロ波源は半導体式発振器を用い、植物サンプルはダミーロードを接続したシングルモードアプリケーション内で照射を行った。

(2) 最適照射条件の探索

試作装置を用いて、播種後14~16日目(成熟栄養成長初期)のシロイヌナズナへ、様々な条件で(マイクロ波出力、電場強度、パルス幅、パルス周期、照射時間)のマイクロ波照射を行い、シロイヌナズナの成長速度から特徴を整理した。成長変化はマイクロ波照射直後から4~6日ごとに、植物体の直径を測定し、増加しなくなるまで続けた。また、播種後40日目付近から花序茎の成長が見られ始めたため、それ以降は花序茎の長さを4~8日ごとに記録することとした。育成は人工気象器内で行い、t検定から有意差を計算し、最適条件を明確にした。

(3) メカニズム解明

最適条件でマイクロ波刺激を行ったシロイヌナズナとコントロール(未マイクロ波処理)や成長観察に差が生じなかったマイクロ波刺激体との比較を、トランスクリプトーム解析(RNAシーケンス)、メタボローム解析、各種遺伝子発現解析などにより行い、分子生物学的観点からマイクロ波刺激のメカニズム解明を行った。

(4) 実用植物での評価

(2)から得られた最適条件のマイクロ波刺激を、実用植物である小松菜の育成を圃場で行い、成長の特徴から有効性の有無を明確にした。

4. 研究成果

(1) 高精度マイクロ波装置の試作

半導体式発振器とシングルモードアプリケーションを組み合わせた装置を図5に示す。マイクロ波は非常に精密に制御しながら植物へ照射することができる電場強度計によって



図1 マイクロ波照射によるシロイヌナズナの成長比較



図2 結実してから28°Cで育成したイチゴの実の写真



図3 (左)マイクロ波連続照射、(右)パルス照射によるシロイヌナズナの成長比較

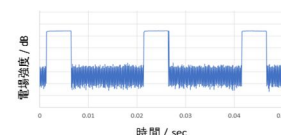


図4 マイクロ波パルス照射の電場強度に対する波形

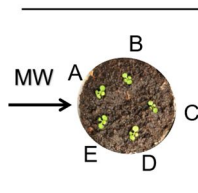
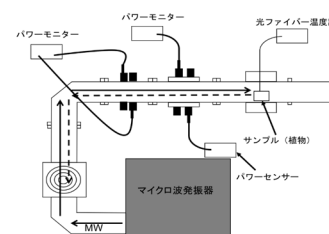


図5 試作したマイクロ波照射装置の(上)写真と(中)概略図、シングルモードアプリケーション内部のシロイヌナズナの設置イメージ

確認した。またシングルモードアプリアーター内へ発芽したシロイヌナズナを含む培養土を設置し、電界センサー(精工技研製)を用いて、培養土上の植物体の位置 A~E(図 5 下)の電場強度を測定すると、均一であることが計測された。また、光ファイバー温度計を用いて、位置 A~E の温度変化を観測すると、全く温度が変化していないことも確認した。したがって、本試作機は十分に均一なマイクロ波を各芽に照射できることが明確になった。

(2) 最適照射条件の探索

播種後 14 日目のシロイヌナズナに試作装置を用いてマイクロ波照射を行い、その後の植物体の直径および茎長について測定した。本研究では、マイクロ波波形の(連続波、パルス)、マイクロ波の出力、デューティー比(パルス幅)の違いにより、植物の成長に差がみられるかどうか検討した。

はじめに、マイクロ波波形の(CW: Continuous Wave および PW: Pulse wave)の違いによる、植物成長の差について検討した(図 6)。マイクロ波照射を 1 時間行った後、植物体の直径および花序茎を観察すると、最も成長が促進したものは、試作機以前から使っていたマイクロ波照射装置でマイクロ波を照射した Positive-control であり、PW と CW に生育の差はみられなかった。

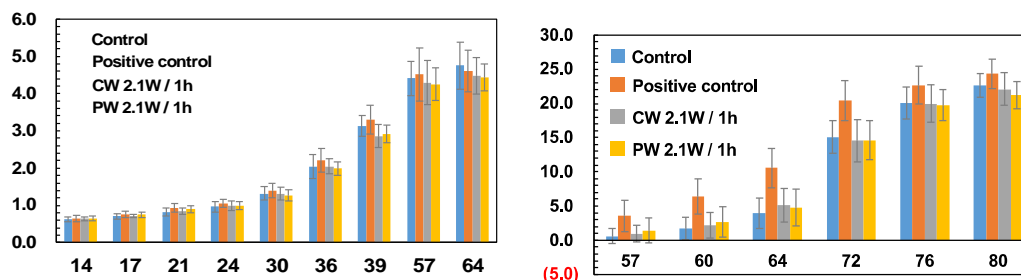


図 6 (左)マイクロ波処理直後からの葉直径の変化、(右)播種後 57 日目より測定した花序茎の長さの変化 (エラーバーは標準誤差)

次に、マイクロ波の出力を 4 倍に増やして照射して同様の生育調査を実施した。ただし、3 分以上マイクロ波照射を行うと培養土の温度が 1°C 上昇したことから、照射時間は 1 秒間とした。1 時間の照射では有意差が見られなかったが、1 秒間だけ照射を行うと、PW の条件では葉の成長に有意的な促進が確認された。また、花序茎に対しても有意的に成長促進が確認された。次にその時間を 1 分間に増やし実験を行うと、温度の上昇は観測されなかったが、成長促進も確認できなかった。

次に、デューティー比の違い(パルス幅の違い)による比較を行った。デューティー比 0.10、0.25、0.50 の三パルス条件で検討を行った(図 7)。すべてのデューティー比でマイクロ波処理した試料は、コントロールよりも成長が促進することが確認された。

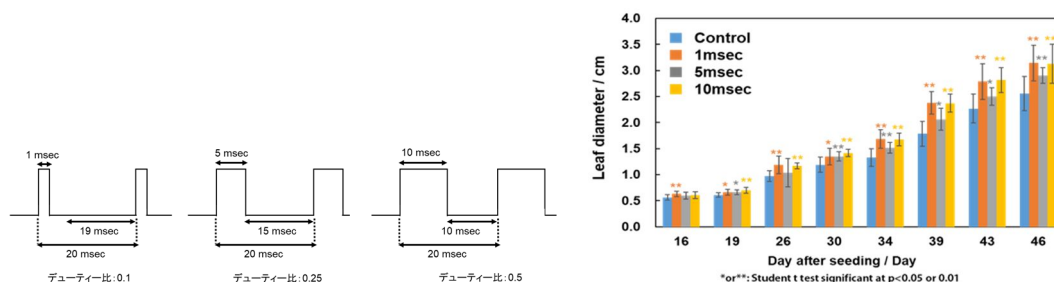


図 7 (左)デューティー比 0.10、0.25、0.50 のパルス形状のイメージおよび、(右)各測定日における葉直径の測定結果(エラーバーは標準誤差)

(3) メカニズム説明

マイクロ波化学の分野では、物質とマイクロ波の相互作用において、マイクロ波の振動共鳴による「熱的效果」と、マイクロ波の電磁波の直接的な影響である「非熱的效果」が知られている。これを物質から植物に置き換えて考えると、熱的效果は植物の熱刺激で、非熱的效果は植物が受ける電磁波の直接的な影響であると考えられる。そこで、マイクロ波照射による遺伝子の発現を熱風による熱的刺激と比較するため、遺伝子の上昇と低下をマイクロアレイで網羅解析した。データはタカラバイオ株式会社に解析を委託し、それらは各プローブの発光強度に対し 2 群間比較 t 検定で統計学的かつ生物学的に有意差を示すプローブ群の抽出分類を行った。その結果、マイクロ波処理により発現が 2 倍以上に増加したプローブ数は 1555 個(Group 1)、1/2 以下に減少したプローブ数は 286 個(Group 2)抽出された。また、熱処理により発現が 2 倍以上に増加したプローブ数は 2881 個(Group 3)、1/2 以下に減少したプローブ数は 3574 個(Group 4)抽出された。

マイクロアレイの分析データによると、Group 1(マイクロ波処理により発現が 2 倍以上に増加)

には、Group 3(熱処理により発現が2倍以上に増加)の一部も含まれており、Group 2(マイクロ波処理により1/2以下に減少)にはGroup 4(熱処理により1/2以下に減少)の一部が含まれていることが分かった。そこで、Group 1に含まれる遺伝子のうち、Group 3にも含まれる遺伝子を省いた。さらに、これらの遺伝子のうち、Group 4と重複するものをピックアップした。また、Group 2に含まれる遺伝子のうち、Group 4にも含まれる遺伝子を省いた。さらに、これらの遺伝子のうち、Group 2と重複するものをピックアップした。最終的に、これらの遺伝子をマイクロ波のみによって影響を受けた遺伝子とした。

次に、マイクロ波処理した植物で発現が上昇する遺伝子に対して、「細胞内のどこに存在しているのか」、「どのようなプロセスに影響しているのか」について調べた。その結果、マイクロ波処理によって発現が増加する遺伝子は、葉緑体に多く存在していることが分かった。この結果から、マイクロ波が葉緑体に影響を与えた可能性が示唆された。葉緑体の主な働きには、糖生成を伴う光合成、窒素同化がある。両者とも植物の成長に欠かせない働きをするため、マイクロ波が葉緑体内のこれらのはたらきに影響を与えた可能性がある」と仮説を立てた。また、マイクロ波処理によって発現が増加する遺伝子は、窒素代謝や有機物質、巨大分子の代謝にはたらいっていることが分かった。窒素代謝のうち、窒素同化は葉緑体で行われている。これは、マイクロ波によって発現が上昇する遺伝子は葉緑体に多く存在するという上記の結果と一致することから、マイクロ波が葉緑体に作用した仮説が濃厚なものとなった。

また、KEGG pathwayを利用して、マイクロ波処理によって活性化する経路と不活性化する経路、熱処理によって活性化する経路と不活性化する経路調べ(図8)、マイクロ波処理で活性化する経路は熱処理で不活性化し、マイクロ波処理で不活性化する経路は熱処理で活性化するという対の傾向がみられた。この結果から、マイクロ波によって活性化される経路は熱処理とは異なるものであり、成長の促進がもたらされたのはマイクロ波特有の効果、つまり非熱的效果であることが分かった。

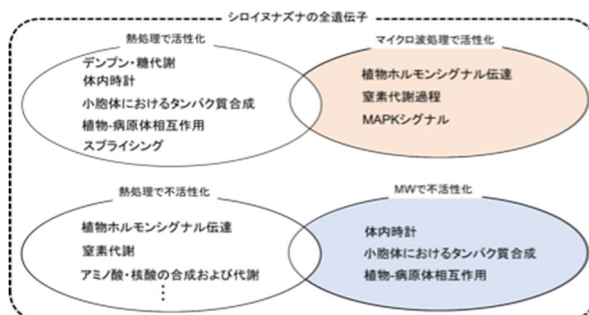


図8 マイクロ波処理によって活性化する経路と不活性化する経路、熱処理によって活性化する経路と不活性化する経路の相関図

(4) 実用植物での評価

実用植物として使用した小松菜は夏楽天(日本プラントシーダー社製)を使用した。20m(400種子)シーダーテープを、直接マイクロ波照射し、照射後の種子を静岡県駿東郡の圃場(図9)に播種して栽培を行い、データを取得した。実験誤差を無くすため虫害予防のための農薬散布や防虫ネットの設置は行わずに栽培を行った。



図9 圃場の航空写真

マイクロ波照射した夏楽天の種子を播種し生育を行い、32-d-oldでコントロールと成長の比較を行った。本来であれば60~70%は発芽をするが、台風による影響で、土壌が流され、畝の状況

が悪かったことから全体的に不作の状況であった。しかし、マイクロ波照射区は生長が早く植物体のサイズが大きくなったことを目視にて確認できた(図10)。



図10 夏楽天の32-d-oldでのサイズ(左)コントロール、(右)マイクロ波照射した種子

時期を変えて再度実験を繰り返した。マイクロ波照射した夏楽天の種子を播種し、生育を行った。20-d-old において、発芽率を測定し、41-d-old において生長率と虫害率を測定した。コントロールの夏楽天の種子と比較して、発芽率 1.5 倍、生長率 1.3 倍、害虫忌避率 3.9 倍の差が有意的に向上していることが観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hagiwara Kenta, Horikoshi Satoshi, Serpone Nick	4. 巻 27
2. 論文標題 Photoluminescent Carbon Quantum Dots: Synthetic Approaches and Photophysical Properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 9466 ~ 9481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202100823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Horikoshi Satoshi, Yamazaki Satoshi, Arai Yuhei, Sakemi Daisuke, Yoshizawa-Fujita Masahiro, Serpone Nick	4. 巻 70
2. 論文標題 Synthesis of Recyclable Magnetic Cellulose Nanofibers from Ionic Liquids for Practical Applications in Separation Science	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 737 ~ 743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess21087	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
1. 著者名 Chitete-Mawenda Upile, Serpone Nick, Horikoshi Satoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of a Hg-free UV light source incorporating a Kr/Br ₂ gas, and its application for wastewater treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 101 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-020-00006-6	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
1. 著者名 Hagiwara Kenta, Horikoshi Satoshi, Serpone Nick	4. 巻 415
2. 論文標題 Luminescent monodispersed carbon quantum dots by a microwave solvothermal method toward bioimaging applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 113310 ~ 113310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochem.2021.113310	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

1. 著者名 Horikoshi Satoshi, Sawada Seiya, Serpone Nick	4. 巻 11
2. 論文標題 A novel green chemistry gelation method for polyvinyl pyrrolidone (PVP) and dimethylpolysiloxane (silicone): microwave-induced in-liquid-plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 24326 ~ 24335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra03007h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Horikoshi Satoshi, Kimura Mizuki, Serpone Nick	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a microwave-discharge light-emitting diode (MDLED): a novel UV source for the UV-driven microwave-assisted TiO ₂ photocatalytic treatment of contaminated wastewaters	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-021-00118-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Horikoshi Satoshi, Takahashi Leo, Sueishi Kirara, Tanizawa Honoka, Serpone Nick	4. 巻 11
2. 論文標題 Microwave-driven hydrogen production (MDHP) from water and activated carbons (ACs). Application to wastewaters and seawater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 31590 ~ 31600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra05977g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 K Hagiwara, H. Uchida, Y. Suzuki, T. Hayashita, K. Torigoe, T. Kida, S. Horikoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of alkan-1-ol solvents in the synthesis of yellow luminescent carbon quantum dots (CQDs): van der Waals force-caused aggregation and agglomeration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advance	6. 最初と最後の頁 14396-14402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra01349h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 S. Horikoshi, S. Sawada, A. Tsuchida, N. Serpone	4. 巻 69
2. 論文標題 Enhanced degradation of organic pollutants with microwave-induced plasma-in-liquid (MPL): Case of flame retardant Tetrabromobisphenol-A in alkaline aqueous media	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal Oleo Science	6. 最初と最後の頁 261-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19333	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀越 智、安藤 拓、鮫島実桜里
2. 発表標題 生産現場におけるマイクロ波刺激を用いた作物の有用生育に関する研究
3. 学会等名 第14回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門松佳苗、堀越 智
2. 発表標題 植物におけるマイクロ波効果の分子生物学的解明
3. 学会等名 第13回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀越智(監修・著書)、他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 220
3. 書名 生物・生体・医療のためのマイクロ波利用 ~ 熱/非熱プロセスを用いた基礎から応用の技術 ~	

〔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	鈴木 伸洋 (Suzuki Nobuhiro) (50735925)	上智大学・理工学部・准教授 (32621)	

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