

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19117

研究課題名（和文）持続的農業を実現する作物生体ナノデバイス開発

研究課題名（英文）Development of novel bio-nanodevice for sustainable agriculture

研究代表者

平山 隆志（Hirayama, Takashi）

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：10228819

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）：生体の生理状態を随時観測するための生体ナノセンサーの開発研究を、ナノセンサーの導入が容易な植物を対象に行った。この研究で、活性酸素に反応するカーボンナノチューブを基礎としたナノセンサーを用いて、植物の葉における傷害に反応した活性酸素合成増加を観測することに成功した。また、植物ホルモンのセンサー開発にも異なる手法で取り組み、その開発の可能性を確認することができた。今後、実際のセンサー開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

データ科学により飛躍的な発展が期待される生命科学において、経時的に生理状態を把握するセンサーの開発が求められている。本研究課題で取り組んだカーボンナノチューブを基礎とした生体ナノセンサーは、汎用性が高くさまざまな生体分子のセンサーの開発が可能である。本研究課題では、植物体においてカーボンナノチューブを利用したセンサーが機能することを確認し、さらに新規生体化合物のセンサー開発も期待できる知見を得ることができた。これらの成果は、今後のセンサー開発を後押しするものであり、その意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Research on the development of biological nanosensors for observing physiological states of living organisms at any time was conducted on plants. In this research, we demonstrated that an increase in reactive oxygen species in response to injury in plant leaves could be detected by nanosensors based on carbon nanotubes. We also worked on the development of sensors for plant hormones by taking several different approaches and were able to confirm the feasibility of their development. It would be highly expected that the development of actual sensors for plant hormones in near future.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ナノセンサー カーボンナノチューブ 活性酸素 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで主に CREST のサポートを受け圃場作物の農業形質をゲノム情報と環境情報から予測するモデルを構築する開発研究をおこなってきた。その研究では、圃場作物の経時的な状態把握データがモデルの高精度化に重要であることを明らかにし、我々が開発・構築した手法により、農業形質を高精度に予測するモデル構築が可能であることを示した。一方で、経時的に圃場作物の詳細な状態データを収集することは多大なコストと労力を必要とし、モデル構築技術の汎用化および実装の足枷となっている。そこで、容易に安価に圃場作物の状態データを取得する方法が必要と考えられた。また、昨今、農業の IoT 化が喧伝されているが、そのほとんどは温室などの農業環境の制御とそれによる作物生産の効率化が主体である。本来であれば、環境データやその制御より、作物の状態情報を取得しそれに対応する方がより効率出来なはずである。しかし、現時点では作物の状態情報という最も重要なデータについてはまだ取得方法がない。つまり、農業形質を予測し作物をデザインする技術の開発においても、また、農業 IoT の基盤を活用しより効率の良い農作業の提案や生産制御を実現化するためにも、作物の状態データを経時的に収集する生体センサーの開発が必須なのである。

近年、カーボンナノチューブ (single-walled carbon nanotube (SWNT)) を基盤とした化学物質の開発が進められている。SWNT に修飾を加えることで特定の化合物に反応し、光反応特性が変化することが明らかになっている。このセンサー開発手法は、汎用性が高いこと、比較的材料費が安価であることから、さまざまなセンサーが既に開発されている。

植物ホルモンは、植物の成長やさまざまな環境ストレス応答に関与しており、植物の成長・生理状態を把握する重要な指標となっている。しかし、その生体内の濃度はホルモンにより増減はあるものの概ね非常に低く、現状では正確な測定には質量分析装置を用いた破壊的分析が必要とされている。これまで、ホルモン受容体を改変したセンサーの開発が提案されているが、遺伝子組み換え技術が必要などの制約があるため、異なるセンサーの開発が望まれている。

以上の背景の下、本課題研究では、SWNT を基礎に植物の生理状態を把握する生体ナノセンサーの開発研究を行うことにした。

2. 研究の目的

本課題研究の目的は2つの点に集約できる。

- 1) カーボンナノチューブを用いたセンサーの作成、それを用いた生体の状態観測の可能性の調査
- 2) 植物の生理状態を観測するためのカーボンナノチューブを基礎にした新たなセンサーの開発

3. 研究の方法

1) カーボンナノチューブを用いたセンサーの作成、観測システムの構築

これまでの研究により、SWNT と(GT)₁₅ からなる合成一本鎖 DNA を混合し超音波処理により分散 (可溶化、ポリマーによるラッピングによる分散化)させたカーボンナノチューブ(G-SWNT)は、活性酸素種の過酸化水素に反応しその濃度に比例して蛍光波長が減少するが、一方(AT)₁₅ で分散化した A-SWNT は反応しないことが知られている。この性質を利用して、生体内の活性酸素の増減を観測することが試みられている。本研究課題では、まず、カーボンナノチューブのこのような特性を確認すると共に、その観測システムの構築をおこなった。これまでの知見を参考に、SWNT と(GT)₁₅ または(AT)₁₅ からなる合成一本鎖 DNA を混合し超音波処理により分散化させる事に成功した。次に、分散化した G-SWNT と A-SWNT の光反応特性を調査した。つまりどのような波長の光に対し、どのような波長の蛍光を発するかを、調べた。これにより、観測すべき蛍光とその励起光の波長を決定した。これを参考に、励起用レーザー光、蛍光フィルターを特定し、ハイパースペクトルカメラを利用した観測システムを構築した。この観測システムを用いて、タバコまたはシロイヌナズナの葉にナノセンサーを浸透させ、生体内での活性酸素観測を試みた。蛍光の変化の観測にあたっては、蛍光画像データを数値化し経時的な変化を追跡するプログラムを独自に開発した。

2) 新規カーボンナノチューブ植物ホルモンセンサーの開発の試み

植物ホルモンはこれまでに 10 種類ほどが知られているが、そのうちアブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸は、比較的内在性の濃度が高い。また、これらの植物ホルモンは環境ストレス応答に関わり、これらの変動から植物や作物の環境ストレス応答状況を認知することができる。一方、サイトカイニン、成長や栄養状態の指標になることがわかっている。そこで、本課題研究では、これらの植物ホルモンを対象に、認識する生体ナノセンサーの開発を SWNT を基盤にして試みた。まず、これまでの報告から、これらの植物ホルモンと親和性がある DNA 配列の情報を収集し、それらを SWNT の分散化に利用することを試みた。DNA による分散化とその DNA の化合物への親和性の関係については何ら報告はないが、化合物と親和性があるものが SWNT に結合することで、SWNT の光反応特性に何らかの影響が与える可能性があると考えた。さらに、これらの植物ホルモンそれぞれの存在下で SWNT を分散化する DNA 配列を探索するという方法を試みた。ラ

ランダムな配列を持つ DNA プールと植物ホルモンを混合し、それと共に SWNT を超音波で分散化させ、分散化された SWNT から DNA を抽出、PCR により増幅ののち、また植物ホルモン存在下で分散化させるという操作を繰り返すことで、植物ホルモンセンサーに質する DNA 配列を同定するという手法で、それを試みた。

4. 研究成果

1) カーボンナノチューブを用いたセンサーの構築、観測システム構築

上述の方法に従い、G-SWNT および A-SWNT を構築することができた。この過程で、SWNT と DNA の量比が分散化の効率に影響することが示唆された。また、これまでの報告のような長時間の超音波処理や長時間の遠心処理は必要ではないことがわかった。センサーの構築の工程については最適化の可能性が示唆された。

まず、構築した G-SWNT および A-SWNT を用いて、連続的な波長の光で励起し蛍光を観測し、光応答特性を調査した (図 1)。

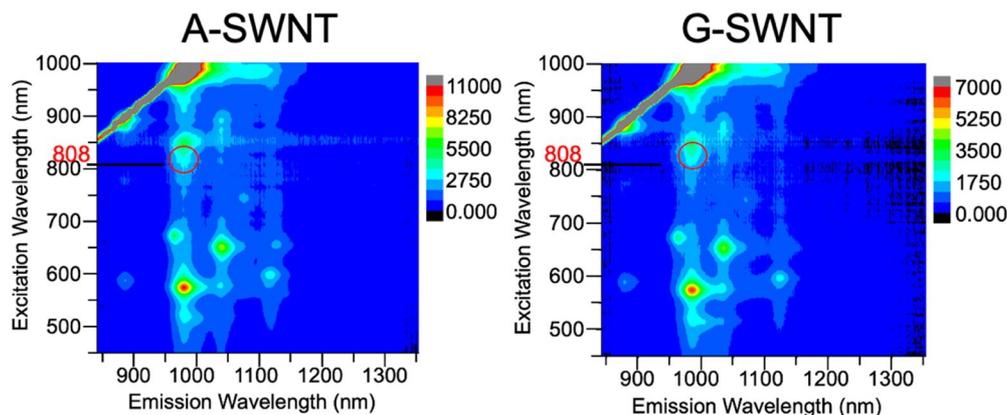


図 1、A-SWNT および G-SWNT の光応答特性

この結果から、構築されたセンサーは波長が 800 nm~850 nm の光を吸収し波長 980 nm 付近の光を発することがわかった。これらの特性は、これまでの報告とは異なっており、その理由については不明である。上述のようにまだ最適化可能な部分があることが示唆される。この結果に基づき、808 nm の波長の励起用レーザー発生装置、波長が 850 nm 以下の光をカットする観測用蛍光フィルター、近赤外に高感度な InGaAs カメラを用いることにした。これらを配置した、観測システムを構築した (図 2)。

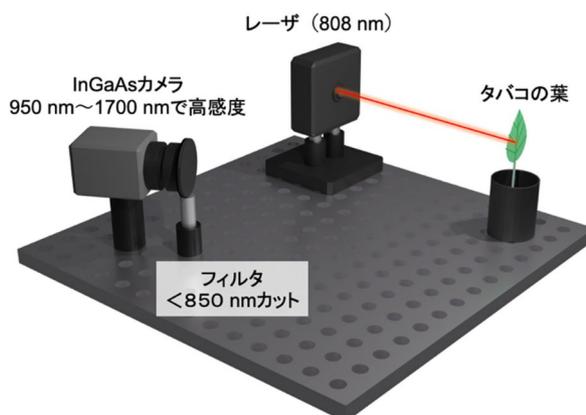


図 2、構築した生体ナノセンサー観測システム。

この図では葉のみが図示されているが実際には植物体を利用した。

構築した観測システムを用いて、SWNT センサーによる植物葉内の活性酸素増減の観測を試みた。シロイヌナズナまたはタバコの展開葉に緩衝液 (10mM MES pH5.7) に懸濁した G-SWNT または A-SWNT を、それぞれ葉身の裏側から注射器で圧力をかけて浸透させた。G-SWNT と A-SWNT の反応を比較するため同じ葉身に浸透した。SWNT センサーの葉身への浸透後 30 分ほどの時間を置いて、傷害として対象葉身にピンセットまたはハサミで傷をつけ、ほぼ同時に測定を開始した。5 秒おきに InGaAs カメラにより画像を取得し、蛍光強度の分析をおこなった (図 3)。

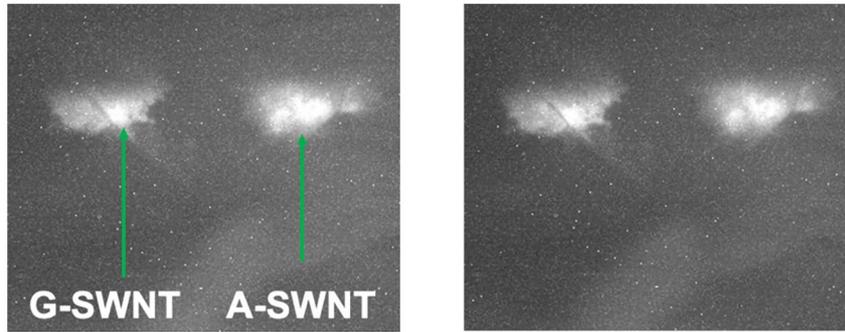


図3、観測開始時（左）および終了時（右）の蛍光画像
この図ではわからないが一枚の葉身に2つのSWNTが浸透されている。

経時的に取得した画像から、蛍光強度データを抽出しその時間変化を解析した。その結果、期待通り A-SWNT では変化がない一方、G-SWNT では蛍光強度の減衰が認められた（図4）。

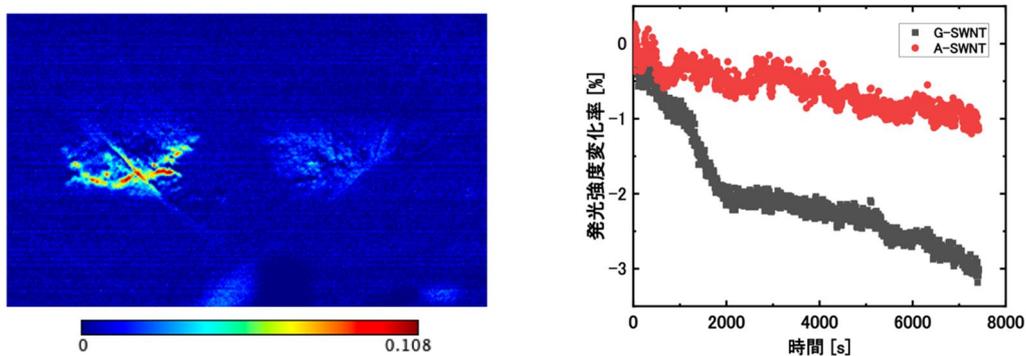


図4、G-SWNTの特異的蛍光減衰の観測

左図：観測時間内での変化を色で表したもの。SWNTの位置は図3に対応。右図：蛍光強度の時間推移。

以上の結果から、SWNTを基本としたナノセンサーは植物性体内で期待通りの反応を示し、それは蛍光特性の変化として観測可能であることが実証された。一方で、同じセンサーを用いて、モモの葉身を対象に同様の観測を試みたが、葉身内での蛍光は観測されたものの傷害にตอบสนองしたセンサーの反応は認められなかった（図5）。この理由は、傷害の与えかたやモモ生育状況などさまざまなことが想定されるが、現段階では特定できていない。今後、多様な植物種での実験・観測環境の検討が必要である。

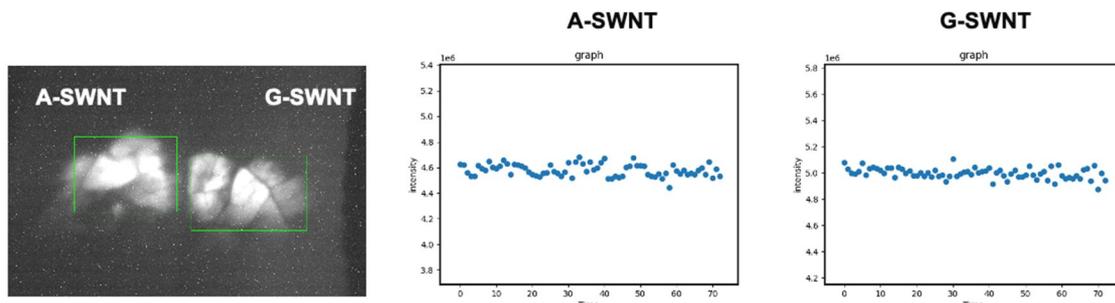


図5、モモ葉身における過酸化水素生体ナノセンサーの応答実験

左図：1枚のモモ葉身にSWNTセンサーを浸透させ、蛍光を観測した結果。右図：それぞれの蛍光強度の時間推移。

2) 新規カーボンナノチューブセンサーの開発

内在性植物ホルモンを経時的に容易に観測するためのナノセンサーの開発を試みた。まず、これ

まで植物ホルモンと親和性があるとされる配列 (aptamer) を持つ DNA を用いて SWNT を分散化することで、ホルモンのセンサーが構築できないか考え試みた。これまでの報告からアブシジン酸と相互作用するとされる配列 2 種類とサイトカニンと相互作用するとされる配列を選択し実験に供した (図 6)。

```
ABA-a
GCGGATGAAGACTGGTGTCCCTTATGGTGGGTGCGCTGGGCTGCAATCTTTGGCTGGCCCTAAATACGAGCAAC

ABA-b
GCGGATGAAGACTGGTGTGAGGGGATGGGTTAGGTGGAGGTGGTTATTCGGGAATTCGCCCTAAATACGAGCAAC

zeatin
GCGGATGAAGACTGGTGTGCGGATATGGTTAGGCAGGCATAAGAGGTTTATTCGGCCCTAAATACGAGCAAC
```

図 6、実験に利用した植物ホルモンとの相互作用が期待される DNA 配列

残念ながら、結果的にはこれらの配列では効率が低いながらも SWNT の分散化はできたが、アブシジン酸やサイトカニン存在下での光応答性の変化は確認できなかった。DNA が化合物と相互作用するというだけでは、SWNT をセンサー化することはできないと考えられた。

次に、ランダムな DNA 配列から、植物ホルモン存在下で効率よく SWNT を分散化できる配列の中には SWNT をセンサー化するものが存在すると考え、その探索を試みた。実際、この方法の考案中に、同様な方法により、ヒトの神経伝達物質のセンサー開発の可能性を示した報告がなされた。ランダム配列 20nt を含む合成 1 本鎖 DNA を用い、植物ホルモンのアブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸、それぞれ 100 μ M 存在下で超音波を施し SWNT の分散化を試みた。その結果、いずれの植物ホルモン存在下でも同様の条件で分散化できたが、アブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸で、その効率は大きく異なった (図 7)。この効率の違いは、複数回の実験でも同様に確認され、植物ホルモンとの相互作用による違いと考えられ、ホルモン特異的な反応の違いを示唆するものと思われる。

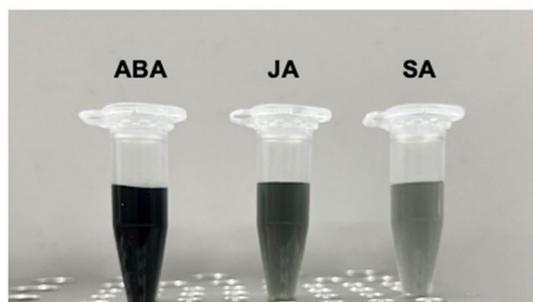


図 7、植物ホルモンとランダム配列存在下での SWNT の分散化

同じ条件下での SWNT 分散化の結果。ABA、JA、SA はそれぞれアブシジン酸、ジャスモン酸、サリチル酸を示す。

得られた分散化 SWNT から、DNA を抽出し PCR で増幅して 1 本鎖化したのち植物ホルモン存在下で SWNT を分散化して再度 DNA を抽出する、という操作を繰り返し、植物ホルモン特異的に SWNT を分散化する配列の同定を試みた。しかし、PCR による増幅の過程で、マルチマーが出現するなど、最適な条件の収束に至らず、配列特定に至っていない。今後も、この実験工程の最適化を進めながら、配列の特定とそれを用いたセンサーの開発を進める。

国内外を含め、SWNT を用いた植物ホルモンのセンサー開発の報告はなく、センサーが開発されればそのインパクトは大きいと考える。今回対象とした植物ホルモンのジャスモン酸やサリチル酸は、植物体から揮発されるものもあり、将来的には体内に浸透させず非侵襲的に利用可能なセンサーの開発も期待できる。特にこれらは、昆虫による食害や病原菌による病気と関連があるため、これらのセンサーが開発されれば農業生産の向上に大きく寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hirayama Takashi、Mochida Keiichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Plant Hormonomics: A Key Tool for Deep Physiological Phenotyping to Improve Crop Productivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1826 ~ 1839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac067	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学資源植物科学研究所環境応答機構研究グループ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/ers/index-j.html 岡山大学大学院自然科学研究科林靖彦研究室 https://hayashi-lab.org/

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	林 靖彦 (Hayashi Yasuhiko) (50314084)	岡山大学・自然科学学域・教授 (15301)	
研究分担者	持田 恵一 (Mochida Keiichi) (90387960)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー (82401)	

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
---------	---------