

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390110

研究課題名(和文)酸素プラズマ照射による植物の抗酸化活性向上と成長促進プロセスの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of antioxidative activity and growth regulation of plants induced by oxygen radical irradiation

研究代表者

林 信哉 (Hayashi, Nobuya)

九州大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40295019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸素プラズマ中の活性酸素を植物種子に照射することにより、成長した植物の抗酸化活性の向上と成長促進効果が得られることが明らかとなった。大気圧バリア放電酸素プラズマ中で60分間程度処理を行った植物種子を栽培した結果、約1.6倍程度成長が加速することが分かった。シロイヌナズナ種子の遺伝子発現解析を行ったところ、活性酸素により光合成に関係する酵素が活性化した結果、炭素固定プロセスからTCA回路に至るまでの一連の反応が促進しており、その結果成長が促進されることが明らかとなった。同時に、抗酸化遺伝子の発現により種子内で抗酸化物質が産生されることが分かった。本成長促進効果は次世代には継承されなかった。

研究成果の概要(英文)：The growth regulation characteristics of plants are investigated when plant seeds are irradiated with atmospheric discharge plasma. Enhancement of the germination and lengths of the stem and root of plants are observed after seeding. The total length of the stem and root increases approximately 1.6 times after a cultivation period of 72 h. The growth regulation effect is found to be maintained for 80 h of cultivation after seeding. The growth regulation originates from the change in the antioxidative activity of plant cells induced by active oxygen species generated in the oxygen plasma, which leads to the production of growth factor in plants.

研究分野：プラズマ理工学

キーワード：酸素プラズマ 活性酸素種 成長促進 抗酸化活性 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

近年、プラズマを生体(細胞)に照射することにより、成長・増殖の促進や細胞のアポトーシスを誘導することが実験的に確認されて始めている。このような細胞の成長制御は、近い将来に医療や農林水産業への応用が期待されている。これまでの研究から、植物の種子にプラズマを照射することにより成長が促進することが見出された。その際、植物内の抗酸化活性が向上することを示すデータが得られた。これらの結果より、抗酸化活性の向上により植物細胞内で酸化還元反応が生じ、細胞周期の加速や遺伝子の転写が促進されることにより、植物の成長(茎長、根長)が促進されると推察される。しかしながら、プラズマ照射から植物の成長が促進するまでのプロセスは、これまで実験的に明確にされてはいない。

2. 研究の目的

酸素プラズマを照射した植物の種子を播種・栽培すると、プラズマ未照射の種子と比較して成長の速度が2倍程度向上する成長促進効果が得られる。本研究では、酸素プラズマ照射による植物の酸化ストレス応答反応に着目し、プラズマ照射からストレス応答を経て成長促進効果に至るプロセスを調べることにより、成長促進のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

これまで、種子にプラズマを照射し播種・栽培すると植物内の抗酸化物質の量に変化が生じ、抗酸化物質の量に変化に応じて植物の成長が促進することが知られている。本研究では、酸素プラズマ照射による植物成長促進の全過程を解明するために、反応経路中で未だ明らかになっていない以下の2つのプロセス、未解明プロセス①:プラズマ照射により植物内の抗酸化活性が変化するプロセス、未解明プロセス②:植物内の抗酸化活性が植物の成長に影響を与えるプロセスを実験的に明らかにする。

3. 研究の方法

大気圧トーチ型酸素プラズマ源において酸素ガス流量、照射時間、放電電圧をそれぞれ変化させて種子にプラズマを照射し、栽培した植物の根と茎の長さの変化を計測する。種子へのプラズマ照射の際に活性酸素照射量と照射時間との積である活性酸素ドーズ量をパラメータとする。活性酸素ドーズ量の相対値はケミカルインジケータ(CI)の変色を用いて計測する。用いるCIは、フタロシアン系化合物を用いて特定の活性粒子種のみ反応して呈色するよう設計されている。CIの色調の変化つまり活性酸素ドーズ量は、実体顕微鏡と高感度マルチチャンネル分光器とを組み合わせて作製する高空間分解色度計にて数値化する。実体顕微鏡を通してCIを分光計測することにより、照射面積の小さな大気圧トーチプラズマによる、CIの局所

的な色調変化を高い空間分解能で計測可能である。

酸素プラズマの照射により植物内で生じる生体反応のシーケンスを明らかにするために、シロイソナズナ種子(Arabidopsis, wild type, Columbia-01)から抽出したRNAをマイクロアレイを用いて解析し遺伝子発現を調べた。遺伝子データベースにはDAVID(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)を用いた。

4. 研究成果

酸素プラズマ中の活性酸素種濃度をケミカルインジケータを用いて計測し活性酸素CT値を求めた。求めたCT値をパラメータとしたプラズマ照射植物の長さとしオール量の傾向をFig.1に示す。処理時間を通して活性酸素種濃度の時間変化は観測されずほぼ一定の値となった。よって、CIの変色から活性酸素濃度計測は可能となったが、精密な計測は困難であることが分かった。

Fig.2に酸素プラズマを照射したシロイソナズナ種子の遺伝子発現解析結果を示す。発現した678個の遺伝子のうちp値が0.05以下かつ発現量が高い遺伝子を順に表示した。抗

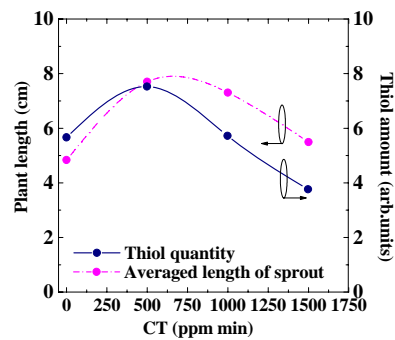


Fig.1 植物長さおよび種子内チオール量の活性酸素CT値依存性。

GO	Count	PValue
GO:0008620 response to abiotic stimulus	37	1.55E-08
GO:0008970 response to osmotic stress	17	7.61E-06
GO:004847 cell wall modification during multidimensional cell growth	6	1.17E-06
GO:0028202 plant-type cell wall loosening	6	3.64E-06
GO:0004409 response to cold	12	5.03E-06
GO:0004040 cell wall organization	13	5.29E-06
GO:0008951 response to salt stress	16	5.31E-06
GO:0049203 external encapsulating structure organization	13	9.01E-06
GO:0042546 cell wall modification	9	1.16E-04
GO:0008927 plant-type cell wall modification	6	1.26E-04
GO:0008926 multidimensional cell growth	6	1.45E-04
GO:0008931 plant-type cell wall modification during multidimensional cell growth	5	1.70E-04
GO:0008964 plant-type cell wall organization	7	2.08E-04
GO:0008960 developmental growth involved in morphogenesis	9	3.14E-04
GO:0008920 unidimensional cell growth	9	3.14E-04
GO:0003493 mycelium formation	4	4.92E-04
GO:0010400 cell growth	10	5.75E-04
GO:0049523 developmental growth	9	8.14E-04
GO:0008361 regulation of cell size	10	8.48E-04
GO:0092826 regulation of cellular component size	10	0.00102
GO:0040003 growth	10	0.001534
GO:0008956 response to temperature stimulus	12	0.001785
GO:0008902 cell morphogenesis	9	0.002043
GO:0008957 response to blue light	5	0.002066
GO:0008184 response to red light	5	0.002043
GO:0008955 cellular component morphogenesis	9	0.002888
GO:001258 protein polymerization	4	0.003187
GO:0043084 cellular metabolic compound salvage	5	0.00389
GO:0010033 response to organic substance	23	0.008311
GO:001255 reductive pentose-phosphate cycle	2	0.008938
GO:0008952 photosynthesis	4	0.010783
GO:0008938 response to red or far red light	7	0.010888
GO:0018695 photosynthesis, dark reaction	3	0.011392
GO:0008945 response to light stimulus	12	0.013221
GO:0012570 starch biosynthetic process	2	0.014485
GO:0008415 response to water	7	0.016044
GO:0008314 response to radiation	12	0.016782
GO:0008939 carbon fixation via Calvin cycle	3	0.018923
GO:0008114 response to endogenous stimulus	18	0.021788
GO:0008925 response to hormone stimulus	17	0.04007
GO:0018972 photosynthesis	6	0.043116

Fig.2 プラズマ照射種子の遺伝子発現解析結果。

酸化関連遺伝子や抗ストレス遺伝子の高発現とともに、光合成関連遺伝子、炭素固定・解糖系関連遺伝子、細胞成長遺伝子等の発現が見られる。またオーキシン等の植物ホルモン産生に関係する遺伝子も発現している。従って、酸素プラズマ照射により、光合成反応系を律速する反応を触媒する酵素である RuBisCO のチオール基が酸化されジスルフィド結合が生じた結果、RuBisCO が活性化される。その結果、光合成や Calvin-Benson 回路等の炭素固定系に関連する遺伝子が発現すると推察される。

遺伝子発現結果を DAVID により解析して得られた TCA 回路のパスウェイを Fig.3 に示す。TCA 回路内の 13 個の反応のうち Oxaloacetate, Marate, Fructos, Bisphosphorate をそれぞれ代謝する 4 個の反応が upregulate しており、植物の原材料である ATP の産生が促進すると考えられる。同様に、解糖系や炭

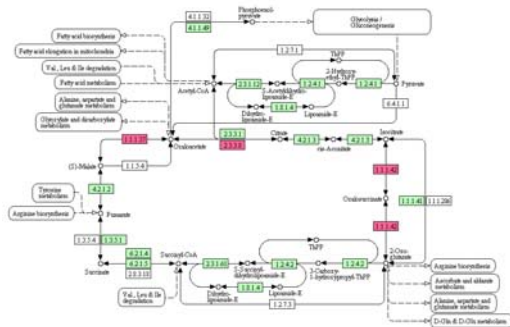


Fig.3 TCA 回路のシグナルパスウェイ。

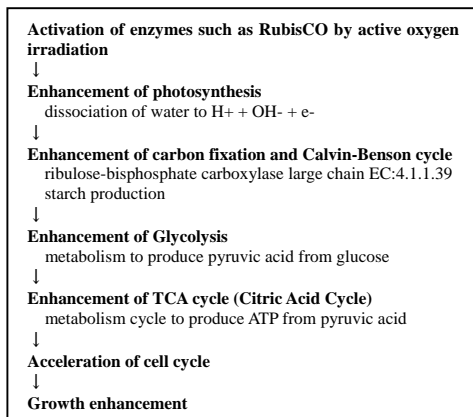


Fig.4 プラズマ照射から成長促進までの推定される反応経路。

GeneSymbol	(O2 80 Pa) vs (O2, 20 Pa)	
	Zscore	ratio
CCS52A2	-0.30203	0.958499
CDKB2;1	-0.86562	0.508516
PIP2E	-2.86487	0.140695
EXPA8	-2.02987	0.632017
EXPA20	-3.03902	0.654561

Fig.5 セルサイズ関連遺伝子の発現。

素固定系のパスウェイ解析からも、パスウェイ上の一部の反応が上方制御させている。

これらの結果をもとに、上述の未解明プロセス①②を含む種子への酸素プラズマの照射から植物の成長促進に至るプロセスを Fig.4 に記述した。光合成が促進することで Calvin-Benson 回路や炭素固定系が上方制御され、その結果解糖系および TCA 回路を亢進し ATP の産生が促進された結果、植物の成長が促進すると推察される。

Fig.5 に酸素プラズマを照射したシロイヌナズナのマイクロアレイ解析から得られたセルサイズ関連遺伝子の発現を示す。成長促進の高い圧力 20Pa のほうが圧力 80Pa よりも細胞伸長を促す expansin 遺伝子の発現が高いことが分かる。従って、プラズマ照射による植物の成長促進は植物細胞の軸方向への伸長が一つの要因であると考えられる。

以上より、①植物内の抗酸化活性が変化するの抗酸化遺伝子の発現によるものであり、②植物内の抗酸化活性が RuBisCO 等の酵素の活性を変化させ、その下流の反応系を亢進し ATP が増産されることで成長が促進すると結論される。

また、このようなプラズマ照射による成長促進効果は次世代の種子には継承されず、次世代は通常の成長であった。一世代限りではあるものの、成長促進効果の情報は細胞分裂を通して保存されていることから、エピジェネティクスが生じていると考えられる。今後、DNA のメチル化やヒストンの修飾を確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Kazunori Koga, Sarinont Thapanut, Takaaki Amano, Hyunwoong Seo, Naho Itagaki, Nobuya Hayashi and Masaharu Shiratani, A simple method to improve harvest by non-thermal air plasma irradiation to seeds of Arabidopsis thaliana L., Appl. Phys. Exp. 9 016201-1 - 016201-3 (2016) (査読有).

DOI: 10.7567/APEX.9.016201

② Nobuya Hayashi, Reoto Ono and Shohei Uchida, Growth Enhancement of Plant by Plasma and UV Light Irradiation to Seeds, J. Photopolym. Sci. Technol. 28 445-448 (2015) (査読有).

③ 小野 大帝, 林 信哉, 低圧酸素プラズマ照射による植物細胞の抗酸化特性の評価, 電気学会論文誌A 135 347-352 (2015) (査読有).

④ Reoto Ono and Nobuya Hayashi, Variation of antioxidative activity and growth enhancement of Brassicaceae induced by low-pressure oxygen plasma, Jpn. J. Appl. Phys. 54 06GD03-1 - 06GD03-4 (2015) (査読有).

DOI: 10.7567/JJAP.54.06GD03

⑤ N. Hayashi, R. Ono, M. Shiratani and A. Yonesu, Antioxidative activity of plant and regulation of Brassicaceae induced by oxygen radical irradiation, Jpn. J. Appl. Phys. 54 06GD01-1 - 06GD01-5 (2015) (査読有).
DOI: 10.7567/JJAP.54.06GD01

⑥ 林 信哉, 小野大帝, 柳生義人, 米須 章, 大気圧プラズマの農水産物応用, 日本AEM学会誌 22 447-452 (2014) (査読有).
DOI: 10.14243/jsaem.22.447

⑦ 林 信哉, 猪原 哲, 門脇一則, 高木浩一, 王 斗艶, 西村 亮, パルスパワー・プラズマによる農作物の収量改善, プラズマ・核融合学会誌 90 541-546 (2014) (査読有).

⑧ Satoshi Kitazaki, Thapanut Sarinont, Kazunori Koga, Nobuya Hayashi, and Masaharu Shiratani, Plasma induced long-term growth enhancement of Raphanus sativus L. using combinatorial atmospheric air dielectric barrier discharge plasmas, Current Applied Physics 14 S149-S153 (2014) (査読有).
DOI: 10.1016/j.cap.2013.11.056

⑨ Nobuya Hayashi, Yoshihito Yagyu, Akira Yonesu, and Masaharu Shiratani, Sterilization characteristics of the surfaces of agricultural products using active oxygen species generated by atmospheric plasma and UV light, Jpn. J. Appl. Phys. 53 05FR03-1 - 05FR03-5 (2014) (査読有).
DOI: 10.7567/JJAP.53.05FR03

[学会発表] (計9件)

① Effect of DBD Plasma on Cell Growth of Animal Cells, Reoto Ono, Nobuya Hayashi, Asami Inoue, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara, IAPS 15, 2015年3月7日, ホノルル (アメリカ合衆国)

② Growth Enhancement and Change of Cells of Plants Using Various Active Species in Plasma, Satoshi Watanabe, Reoto Ono, Nobuya Hayashi, 10th International Symposium on Applied Plasma Science (ISAPS' 2015), 2015年9月3日, 奈良ホテル (奈良県奈良市)

③ Mechanism of Growth Enhancement of Plants using Active Species in Air and Oxygen Plasma, Satoshi Watanabe, Reoto Ono, Nobuya Hayashi, 68th Annual Gaseous Electronics Conference held jointly with 9th Annual International Conference Plasma & 33rd Symposium on Plasma Processing (ICRP-9), 2015年10月14日, ホノルル (アメリカ合衆国)

④ Elucidation of Growth Enhancement Effect of

Sprouts of Brassicaceae using Low Pressure Oxygen Plasma, Reoto Ono, Nobuya Hayashi, Akira Kobayashi, Malaysia-Japan Joint International Conference 2015 (MJJIC2015), 2015年11月14日, 山口大学 (山口県山口市)

⑤ Effect of antioxidative activity of plants by low pressure oxygen plasma irradiation, Reoto Ono, Shohei Uchida, Akimasa Tanaka, Tomomasa Itarashiki, Satoshi Kitazaki, Nobuya Hayashi, 第8回 International Conference on Reactive Plasmas and 第31回 Symposium on Plasma Processing, 2014年2月5日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

⑥ Variation of Antioxidative Activity Induced by Active Oxygen Species Produced by Low Pressure RF Plasma, R. Ono, N. Hayashi, The 21st Annual Meeting of IAPS, 2014年3月8日, 香港 (中国)

⑦ Effect of active oxygen species generated by oxygen plasma on antioxidative substances in plants, R. Ono, S. Uchida, A. Tanaka, T. Itarashiki, S. Kitazaki, N. Hayashi, ISEHD2014, 2014年6月24日, 琉球大学 (沖縄県中頭郡)

⑧ Growth Enhancement of Plant by Plasma and UV Irradiation to Seeds, Shohei Uchida, Reoto Ono, Nobuya Hayashi, PSE 2014, 2014年9月16日, ガルミッシュパルテンキルヘン (ドイツ)

⑨ Clarification of growth enhancement effect of plants by optimizing antioxidative activity induced by oxygen plasma, R. Ono, S. Uchida, N. Hayashi, A. Kobayashi, MJJIS2014, 2014年11月12日, クアラルンプール (マレーシア)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: プラズマ殺菌装置

発明者: 林 信哉

権利者: 九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-223431

出願年月日: 2015年11月13日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ: <http://appl.aees.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 信哉 (HAYASHI, Nobuya)
九州大学・大学院総合理工学研究院・准教授
研究者番号：40295019

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし