

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600124

研究課題名(和文) プラズマ帯電液滴プラントアクティベーターによる植物免疫制御の挑戦

研究課題名(英文) Challenge to plant immunity control by plant activator using plasma electrification droplet

研究代表者

金子 俊郎 (KANEKO, TOSHIRO)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30312599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧空気プラズマを用いた植物防除法について、殺菌およびプラントアクティベーター(免疫活性化剤)による植物免疫制御(病害抵抗性誘導)の観点から研究を行った。殺菌に関しては、プラズマ中に導入する水導入量が多いほど分生子発芽抑制効果が高いことが明らかとなり、液中硝酸イオン濃度と正相関する活性種が寄与していると考えている。一方、病害抵抗性誘導に関しては、プラズマ活性ガス噴霧によって防御関連遺伝子が発現変動し、病害抵抗性の誘導が示唆された。さらに、防御関連遺伝子の発現変動は、液中水酸基ラジカル濃度との関連が示唆され、プラズマ活性ガスの活性種組成の制御による植物病害防除の機能制御の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Two functions of the plasma generated reactive species for agricultural applications, the germination suppression of pathogenic conidia and the induction of defense related genes of rice seeds, are experimentally investigated. The germination suppression effect is enhanced by the water molecular fraction increase in plasma, correlating with hydroxy radical density in the plasma effluent and nitrate ion concentration in the conidia suspension. On the other hand, the gene expression degree of the defense related genes of rice seeds are significantly increased under a certain plasma effluent exposure condition and are varied simultaneously with the mixture variation of the reactive species. The difference of the reactive species correlated with the germination suppression and the defense related genes indicates the feasibility to switch those functions by the reactive species control in the plasma effluent.

研究分野：プラズマエレクトロニクス

キーワード：大気圧放電プラズマ 帯電液滴 植物免疫 活性酸素種 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

温度、湿度、光強度等の環境を制御した閉空間で植物を計画的に生産する植物工場は、病原菌や害虫の侵入がないため、それらを防除・駆除するための農薬が不要であるといわれてきた。しかしながら実際には、僅かな菌の混入で植物工場の閉空間内で爆発的に感染してしまうため、病原菌を防除する農薬を使用しているのが現状である。現在使用されている化学農薬は、生物毒性による環境への影響や薬剤耐性菌の出現などが問題となっており、食の安全・安心や環境と調和した持続的な食料生産体制の確立の観点からも、従来の農薬に代わる新しい病害防除法の開発が求められている。植物の病気感染は、病原体が細胞膜を通して細胞内に侵入し繁殖することが主な原因であるが、一般的に植物は病原体が細胞膜に接触することで受容体タンパクが異物として認識し、防御機構を始動することで、病原体に対する抵抗性を発現する(植物免疫)。

この植物免疫を能動的に活性化できれば、農薬を使わずに病害防除が可能であり、ある種の化合物がプラントアクティベーター(免疫活性化剤)として植物免疫を活性化させる効果があることが報告されているが、植物ごとに免疫を活性化させる化合物が異なり、コスト的な観点から実用化は進んでいない。

### 2. 研究の目的

以上の研究背景のもとに、本研究では、化合物のプラントアクティベーターの代替法として、大気圧空気プラズマを活用する。大気圧空気プラズマは、生成される活性酸素種(ROS)、活性窒素種(RNS)などの活性種が様々な生物応答をもたらすことが知られており、それら活性種による殺菌や植物の免疫制御(病害抵抗性誘導)等が新しい病害防除法として期待されている。

本研究では、実用的にROSやRNSを生成できる空気と水を原料とする水導入大気圧空気プラズマ装置を作製し、プラズマ中で生成されたROSやRNSを含む反応性ガス(プラズマ活性ガス: Plasma Effluent)の噴霧によるイチゴ炭疽病菌の殺菌とイネ種子に対する病害抵抗性誘導効果を調べ、従来の農薬に代わる病害防除法として、植物のもつ防御応答システムをプラズマで活性化する「水導入大気圧空気プラズマプラントアクティベーター」による植物免疫の制御を目的としている。

### 3. 研究の方法

開発した水導入大気圧空気プラズマ装置(図1)は、空気および窒素を原料ガスとした誘電体バリア放電(DBD)プラズマを生成し、プラズマ装置下端から10cmの距離に配置した病原体や植物体にプラズマ活性ガ

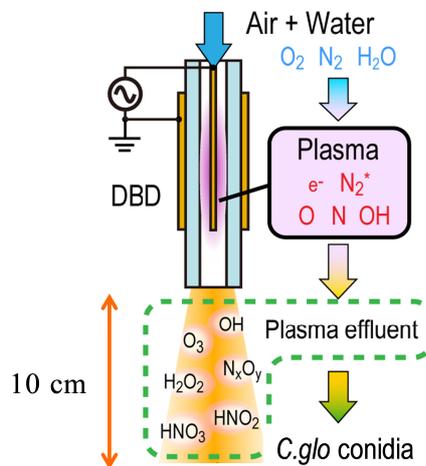


図1: 水導入大気圧空気プラズマ装置。

スを噴霧できる。本プラズマ装置は、プラズマ中に導入する水の流量( $F_{H_2O}$ )制御することで、プラズマ中で生成される活性種の組成を変化させることが可能である。

### 4. 研究成果

イチゴ炭疽病菌は世界10大植物病害菌の一つであり、植物体に付着した水滴中の分生子が発芽し、植物細胞に侵入することで感染が起こることが知られている。本研究では分生子懸濁液に対してプラズマ活性ガスの噴霧を行い、分生子発芽抑制効果を観測した。窒素プラズマに比べて空気プラズマの場合に顕著な発芽抑制効果が観測され、酸素由来の活性種が寄与していることが示唆された。さらにプラズマ中に導入する水流量を変化させたところ、図2に示すようにプラズマ中に導入する水流量が多いほど発芽抑制効果が高まることがわかった。

分生子発芽抑制の水導入量依存性について議論するために、活性種測定を行った(図3)。気相中の $N_2O$ 密度は水導入量にほとんど依存せず、放電電力も一定であったことから、本研究の水導入量では放電への影響が少ないことを示している。計測されたオゾンの密度は水導入に対し若干減少し、水導入量に対して強まった発芽抑制効果(図2)と逆相関であった。一方で、気相中OH密度は発芽

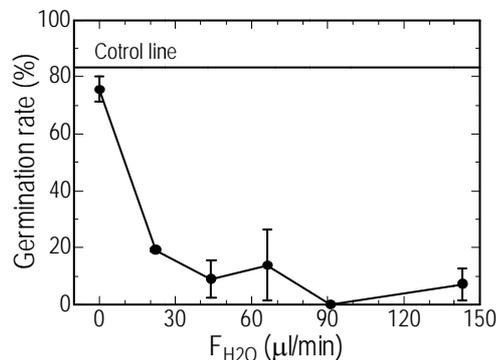


図2: 分生子発芽率の水導入量依存性。

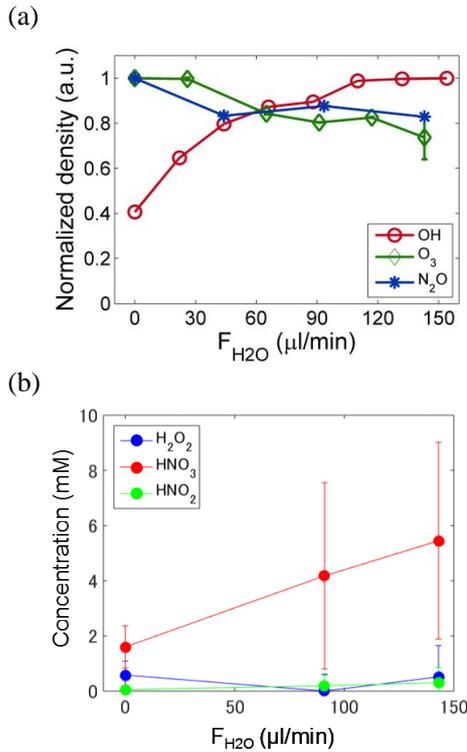


図 3: (a)気相中および(b)液相中の活性種濃度の水導入量依存性。

抑制効果と正の相関があり、さらに液相中  $NO_3^-$  濃度も正相関した。しかしながら、プラズマ活性ガス噴霧と同濃度の液相中  $NO_3^-$  は発芽抑制効果がなく、液相中  $NO_3^-$  と同様に気相中 OH の増加に伴い増加してい

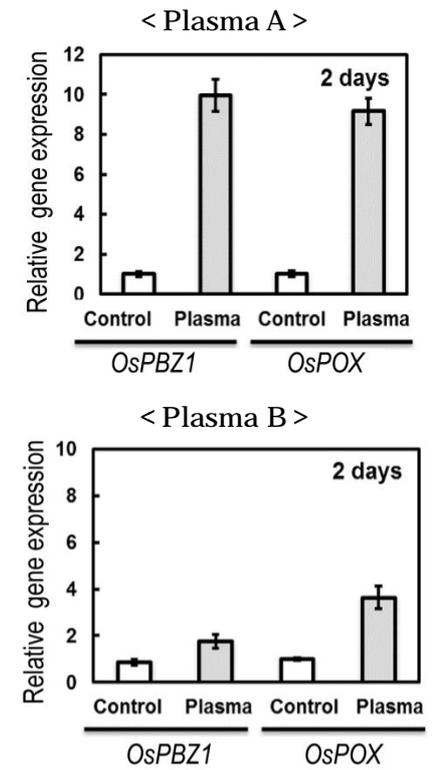


図 4: イネ防御関連マーカー遺伝子 ( $OsPBZ1$ ,  $OsPOX$ ) の UBQ 規格化発現度。

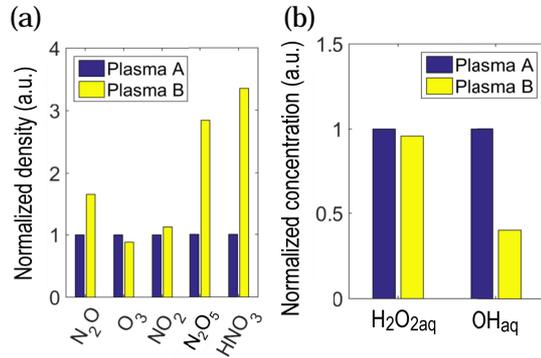


図 5: 電極の違いによる(a)気相中および(b)液相中の活性種組成変化。

ると推測される  $HO_{2aq}$ ,  $ONOO^-$  などの活性種が発芽抑制に寄与していると考えている。

次に、イネ種子にプラズマ照射を行い、プラズマによる病害抵抗性誘導効果を実験的に調べた。芽出して湿った状態のイネ種籾にプラズマ活性ガスを噴霧し、2 日間育苗してサンプリングを行い、防御関連遺伝子 ( $OsPBZ1$ ,  $OsPOX$ ) の発現変動 (ユビキチン (UBQ) 規格化発現度) を調べた。一定の生成条件 (水導入量, 空気流量など) で異なる活性種を生成する 2 種類の電極 (Plasma A, Plasma B) を作製し、活性種組成と遺伝子発現の関係について調べた。図 4 より、プラズマにより防御関連遺伝子が誘導されている可能性が示唆された。特に、Plasma A の場合において、 $OsPBZ1$ ,  $OsPOX$  とともに発現が顕著に増加した。

赤外吸収分光法 (気相中) や紫外・可視吸収分光法 (液相中) より、電極の違いにより発生した活性種組成が異なることが明らかとなり (図 5), この活性種組成の変化が遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Role of Continuous Discharge Current for Secondary Streamer in Water, International Journal of Plasma Environmental Science & Technology, 査読有, Vol. 10, No. 1, pp. 16-19, 2016.

URL: [http://www.iesj.org/html/service/ijpest/vol10\\_no1\\_2016/ijpest\\_vol10\\_no1\\_2016\\_pp016-019.html](http://www.iesj.org/html/service/ijpest/vol10_no1_2016/ijpest_vol10_no1_2016_pp016-019.html)

K. Tominami, H. Kanetaka, T. Kudo, S. Sasaki, and T. Kaneko: Apoptotic Effects on Cultured Cells of Atmospheric-Pressure Plasma Produced Using Various Gases, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 55, No. 1S, pp. 01AF03-1-6, 2015.

DOI:10.7567/JJAP.55.01AF03

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, S. Horiuchi, R. Honda, and M. Kanzaki: Improvement of Cell Membrane Permeability Using a Cell-Solution Electrode for Generating Atmospheric-Pressure Plasma, Biointerphases, 査読有, Vol. 10, No. 2, pp. 029521-1-6, 2015.

DOI:10.1116/1.4921278

S. C. Cho, T. Kaneko, H. Ishida, and R. Hatakeyama: Nitrogen-Atom Endohedral Fullerene Synthesis with High Efficiency by Controlling Plasma-Ion Irradiation Energy and C60 Internal Energy, Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 117, No. 12, pp. 123301-1-5, 2015.

DOI:10.1063/1.4916247

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Initiation Process and Propagation Mechanism of Positive Streamer Discharge in Water, Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 116, No. 21, pp. 213301-1-12, 2014.

DOI:10.1063/1.4902862

H. Fujita, S. Kanazawa, K. Ohtani, A. Komiya, T. Kaneko, and T. Sato: Highly Temporal Visualization of Generation Process of Underwater Secondary Streamer From Developed Primary Streamer, IEEE Transactions on Plasma Science, 査読有, Vol. 42, No. 10, pp. 2398-2399, 2014.

DOI:10.1109/TPS.2014.2325937

S. Takahashi and T. Kaneko: Effects of the Electron Irradiation Energy on Synthesis of Gold Nanoparticles Using Gas-Liquid Interfacial Plasma, Journal of Physics: Conference Series, 査読有, Vol. 518, pp. 012022-1-5, 2014.

DOI: 10.1088/1742-6596/518/1/012022

T. Kaneko, S. Takahashi, and T. Kato: Structure Controlled Nanoparticle Conjugates Synthesized by Gas-Liquid Interfacial Plasmas, Materials Science Forum, 査読有, Vol. 783-786, pp. 1996-2001, 2014.

DOI:10.4028/www.scientific.net/MSF.783-786.1996

K. Tomita, K. Nagai, T. Shimizu, N. Bolouki, Y. Yamagata, K. Uchino, and T. Kaneko: Thomson scattering diagnostics of atmospheric plasmas in contact with ionic liquids, Applied Physics Express, 査読有, Vol. 7, No. 6, pp. 066101-1-4, 2014.

DOI:10.7567/APEX.7.066101

[学会発表](計20件)

小西秀明, 嶋田啓亮, 高島圭介, 安藤杉尋, 高橋英樹, 金子俊郎: 大気圧空気プラズマ中の活性種によるイネ防御関連遺伝子に対する発現誘導効果, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学(東京都, 目黒区), 2016.3.21.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, and M. Kanzaki: Plasma Stimuli for Enhancement of Cell Membrane Permeability (Keynote Lecture), The 12th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2015), Sendai International Center (Sendai, Japan), 2015.10.29.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, M. Kanzaki, and T. Sato: Cell Membrane Transport Using Atmospheric Pressure Plasmas in Contact with Liquid (Invited), The 21st Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics, Osaek Greenyard Hotel (Yangyang, Korea), 2015.10.3.

小西秀明, 高島圭介, 安藤杉尋, 高橋英樹, 金子俊郎: 大気圧空気プラズマによるイネ防御関連遺伝子の発現誘導, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市), 2015.9.16.  
金子俊郎, 佐々木渉太, 保苺雄太郎, 神崎展, 非平衡大気圧プラズマ刺激による新作用機序遺伝子導入(Invited), 第76回応用物理学会秋季学術講演会 シンポジウム, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市), 2015.9.14.

金子俊郎: 生体に対するプラズマの安全学(Invited), 第10回日本安全学教育研究会, 東北大学(宮城県, 仙台市), 2015.8.23.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, and M. Kanzaki: Synergy Effects of Physical and Chemical Stimulations on Cell Membrane Transport Using Non-Equilibrium Atmospheric Pressure Plasma (Invited), The 2nd Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology, Tohoku University (Sendai, Japan), 2015.6.12.

金子俊郎: 低温大気圧プラズマの医療・農業分野への実用的応用(Invited), 情報機構セミナー, 産業会館(東京都, 江東区), 2015.5.20.

T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, and M. Kanzaki: Spatially Localized Transfection Using Controlled Plasma Irradiation to Solution Containing Living Cells (Invited), 3rd International Workshop on Solution Plasma and Molecular Technologies (SPM-3), Chulalongkorn University (Bangkok,

Thailand), 2015.5.8.

金子俊郎: プラズマ技術の新たな展開  
~ 生物・医療・農業への応用最前線 ~  
(Invited), バイオインダストリー協会  
セミナー "未来へのバイオ技術"勉強会  
「プラズマで拓くライフイノベーション」,  
バイオインダストリー協会(東京都,中央  
区), 2015.2.5.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki:  
Physical and Chemical Effects of  
Non-Equilibrium Plasma Irradiation on  
Enhancement of Transfection Efficiency  
(Invited), The 75th IUVESTA Workshop  
on Sheath Phenomena in Plasma  
Processing of Advanced Materials,  
Hotel Krvavec (Cerklje na Gorenjskem,  
Slovenia), 2015.1.22.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki:  
Investigation of Cell Membrane  
Transport Using Non-Equilibrium  
Atmospheric Pressure Plasma  
Irradiation (Invited), The 1st  
Taiwan-Japan Workshop on Plasma  
Life Science and Technology, National  
Chiao Tung University (Hsinshu,  
Taiwan), 2014.12.20.

T. Kaneko, H. Konishi, K. Takashima, S.  
Inawashiro, and N. Seo: Effects of  
Atmospheric Pressure Air Plasma  
Irradiation on Sterilization of Plant  
Pathogenic Fungi, 第24回日本MRS年  
次大会, 横浜市開港記念会館(神奈川県,  
横浜市), 2014.12.10.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki:  
Minimally-Invasive and Highly-  
Efficient Gene Transfection Based on  
Plasma Enhanced Cellular Activity  
(Invited), 2014 MRS Fall Meeting &  
Exhibit, Hynes Convention Center  
(Boston, USA), 2014.12.4.

T. Kaneko: Minimally-Invasive Gene  
Transfection by Chemical and Physical  
Interaction of Atmospheric Pressure  
Plasma Flow (Invited), 67th Annual  
Gaseous Electronics Conference,  
Marriot City Center and Raleigh  
Convention Center (Raleigh, USA),  
2014.11.4.

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki:  
Physical and Chemical Effects of  
Helium Plasma Jet on Gene  
Transfection Efficiency (Invited), The  
5th International Symposium on  
Plasma Nanoscience (iPlasmaNano-V),  
Melia Costa Del Sol Hotel (Malaga,  
Spain), 2014.9.30.

小西秀明, 高田涼平, 加藤俊顕, 金子俊郎,  
猪苗代翔太, 瀬尾直美: イチゴ灰色かび病  
殺菌に対する大気圧空気プラズマ中の活  
性種の効果, 第75回応用物理学会秋季学

術講演会, 北海道大学(北海道, 札幌市),  
2014.9.19.

金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎展: 細胞膜輸  
送に対する非平衡プラズマ刺激の効果  
(Invited), 日本機械学会 2014 年度年次大  
会ワークショップ, 東京電機大学(東京都,  
足立区), 2014.9.10.

金子俊郎, 佐藤岳彦, 加藤俊顕, 神崎展,  
佐々木渉太, 藤田英理, 青山智成: ナノス  
ケール非平衡プラズマによる低侵襲・高効  
率遺伝子導入 (Invited), 新学術領域研究  
「プラズマ医療科学の創成」第3回公開  
シンポジウム「新学術の最前線~プラズ  
マと生物と医療の協奏曲~」, 名古屋大学  
(愛知県, 名古屋市), 2014.8.9

T. Kaneko, S. Sasaki, and M. Kanzaki:  
Non-Equilibrium Plasma Irradiation on  
Living-Cell Suspended Solution for  
Minimally-Invasive Gene Transfection  
(Invited), 2nd International Workshop  
on Solution Plasma and Molecular  
Technologies (SPM-2), Korea Aerospace  
University (Seoul, Korea), 2014.5.16.

〔図書〕(計0件)  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計4件)

名称: 体内用プラズマ発生装置, 遺伝子導  
入装置, 薬剤導入装置および内視鏡  
発明者: 金子俊郎, 佐々木渉太, 佐藤岳彦  
権利者: 国立大学法人東北大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-069729  
出願年月日: 2015.3.30  
国内外の別: 国内

名称: 初処理方法及び初処理装置  
発明者: 川井芳明, 原田浩平, 金子俊郎,  
高島圭介, 山内孝彦, 阿部宗幸  
権利者: 大亜真空株式会社, 国立大学法人  
東北大学, 株式会社オジマスカイサービス  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-066098  
出願年月日: 2015.3.27  
国内外の別: 国内

名称: プラズマ殺菌駆除装置  
発明者: 川井芳明, 原田浩平, 金子俊郎, 加  
藤俊顕, 高島圭介  
権利者: 大亜真空株式会社, 国立大学法人  
東北大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-066095  
出願年月日: 2015.3.27  
国内外の別: 国内

名称:遺伝子導入装置および遺伝子導入方法

発明者:金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎展,  
加藤俊顕

権利者:国立大学法人東北大学

種類:特許

番号:PCT/JP2014/66185

出願年月日:2014.6.18

国内外の別:国際

〔その他〕

ホームページ

<http://www.plasma.ecei.tohoku.ac.jp>

機関リポジトリ

<http://ir.library.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 俊郎 (KANEKO TOSHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号:30312599

### (2) 研究分担者

高橋 英樹 (TAKAHASHI HIDEKI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号:20197164

加藤 俊顕 (KATO TOSHIAKI)

東北大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号:20502082

### (3) 連携研究者

なし