

2022 年（令和 4 年度）

プラズマバイオコンソーシアム

プラズマ種子科学研究会 講演予稿集

主 催：名古屋大学低温プラズマ科学研究センター  
名古屋大学農学国際教育研究センター  
九州大学プラズマナノ界面工学センター  
東北大学非平衡プラズマ学際研究センター  
自然科学研究機構新分野創成センター  
自然科学研究機構基礎生物学研究所

後 援：日本植物学会，日本作物学会，日本植物バイオテクノロジー学会  
日本植物生理学会，日本農芸化学会，日本土壤肥料学会  
応用物理学会プラズマエレクトロニクス分科会  
プラズマ・核融合学会  
名古屋大学 融合フロンティアフェロシップ事業アジア未来創造分野

プラズマバイオコンソーシアム

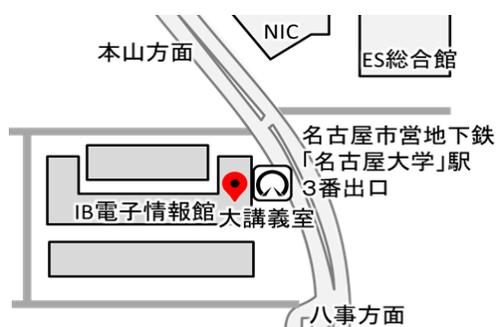
## プラズマ種子科学研究会

期 日：2023年2月23日（木）午後～24日（金）午前

形 式：日本語,

参加費：無料 一般申込み受付可

会 場：名古屋大学東山キャンパス IB 電子情報館東棟2階 大講義室  
名古屋市営地下鉄東山線 「名古屋大学」駅下車 出口3番すぐ上



開催趣旨：

プラズマ照射した種子の発芽や植物の成長の促進が、農業の新しい技術として注目されています。種子は主要な農作物であり、食料をはじめ、医療、資源・エネルギーの多くの分野で利用され、農業生産においては種子が鍵を握っているといっても過言ではありません。作物育種のみならず、地球規模の環境変動は、植物の環境ストレス耐性を逸脱し、環境の温度、栄養レベル、光の状態を感知し、休眠状態から発芽のタイミングを決定する機構に少なからず影響を与えています。しかしながら、低温プラズマ照射は短寿命な活性種の応用は、休眠打破などに作用が認められることによって作物栽培などに有用な結果が見出されています。そのため、本研究集会では、両分野に共通する活性種に焦点を当て、植物科学・低温プラズマ科学の2つの分野に共通する専門家をお呼びして討論できる機会を設けます。

## プログラム (すべての講演が招待講演となります。)

### 2023年2月23日(木・祝) (講演時間には質疑10分を含みます)

- 13:45 (15分) 開会の辞 古閑一憲 (九州大学)
- 14:00 (60分) 「**硝酸イオンによる種子発芽調節**」  
南原英司 (トロント大学)
- 15:00 (45分) 「**プラズマ活性水による種子休眠打破と種子発芽制御**」  
中林一美 (ロンドン大学ロイヤル・ホロウェイ校)
- 15:45 休憩 (15分)
- 16:00 (30分) 「**種子へのプラズマ照射量の定量解析最前線**」  
奥村賢直<sup>1</sup>、古閑一憲<sup>1,2</sup>、白谷正治<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九州大学, <sup>2</sup>自然科学研究機構)
- 16:30 (30分) 「**フロー式プラズマ発生装置による窒素肥料の生成**」  
玉井鉄宗 (龍谷大学農学部資源生物科学部)
- 17:00 (30分) 「**プラズマと膜輸送**」  
魚住信之 (東北大学工学研究科バイオ工学専攻)
- 17:30～ 意見交換会 会場: シェジロー (ES 総合館1F) 会費: 5,000円

### 2023年2月24日(金) (講演20分質疑10分)

- 9:00 (30分) 「**プラズマと作物生産**」  
石橋勇志 (九州大学)
- 9:30 (30分) 「**プラズマ照射による植物細胞への生体高分子導入及び農業への応用**」  
柳川由紀 (千葉大学園芸学研究院 / 理研 環境資源科学研究センター)
- 10:00 (30分) 「**作物の生理形態特性からみるプラズマ照射後の環境ストレス応答**」  
仲田麻奈 (名古屋大学)
- 10:30 休憩 (15分)
- 10:45 (30分) 「**ゼニゴケをモデルとした植物における活性種の役割と低温プラズマの作用機構の解析**」  
坪山祥子・朽津和幸 (東京理科大学理工学研究科応用生物科学専攻)
- 11:15 (30分) 「**作物育成における低温プラズマ処理の収穫への効果**」  
橋爪博司 (名古屋大学低温プラズマ科学研究センター)
- 11:45 (15分) 閉会の辞 古閑一憲 (九州大学)
- 12:00 会場終了
- 13:00～ 見学会 名大 低温プラズマ科学研究センター (NIC4階)
- 14:00～ 見学会 谷口光隆研究室, 柴田貴広研究室 農学部A館 (電顕設備, LC-MS)  
名大 全学技術センター 農学部B館 (共通MS)

## 硝酸イオンによる種子発芽調節

南原英司

トロント大学, 細胞システムズ学科

Email : eiji.nambara@utoronto.ca

### 概要

硝酸イオンは植物の主要な窒素源の一つで、植物が生育していく上で重要な環境因子である。硝酸イオンを投与すると、その環境や投与する濃度に応じて、植物は成長や生理応答を変化させる。硝酸イオンは植物に取り込まれると、亜硝酸、アンモニアイオンに還元（同化）された後、アミノ酸に取り込まれる。硝酸イオンは栄養源として重要であると同時にシグナル分子としての役割もある。硝酸イオンの栄養としての、また、シグナルとしての機能は、硝酸イオン情報伝達の分子レベルのメカニズムが理解される以前からよく議論されてきた。特に、植物のゲノム配列が解読され、数多くの硝酸イオンに発現が調節されている遺伝子群（分子マーカー）を用いて詳細な解析が行われてきた。硝酸イオンを同化できない植物に低濃度の硝酸イオンを投与すると、野生型（正常型）植物と同様に多くの分子マーカー遺伝子の発現が短時間で変動する。これは硝酸イオン自体が（その同化産物でなく）シグナル分子として機能する根拠とされてきた。現在は分子遺伝学の研究の進展に伴い、硝酸イオンの情報伝達メカニズムは比較的良好に理解されている。

植物は一度発芽してその場に根をはるとその環境に適応して生育し、次世代の種子を作らないといけない。そのため、種子発芽は、温度、光、栄養条件など様々な環境因子によって調節されている。硝酸イオンは多くの種子の発芽を促進し、発芽促進物質として知られている。硝酸イオンの発芽促進効果は、硝酸イオンを同化できない種子でも同様に見られることから、主にシグナル分子として発芽を調節していると考えられる。硝酸イオンは植物体で見られている情報伝達と似たしくみで作用し、発芽抑制シグナルであるアブシジン酸の代謝を制御することによって発芽を促進していることがわかってきた。

プラズマ照射は種子や培地で、活性種を作り出し、様々な物理的、化学的変化を引き起こすと考えられる。プラズマの効果を効率的かつ再現的に引き出し農業的に利用するために、そこで起こっている多面的な変化がどのように生物学的な変化に変換されるかを理解することが重要であると思われる。種子は様々な外的、内的因子をインプットとして感知し、シンプルなアウトプットとして発芽するかしないを決める。硝酸イオンの情報伝達は、初動は特異的であるものの、最終的に発芽を促進する過程の中で、活性酸素や活性窒素種、植物ホルモン、光や温度など様々な情報ネットワークと相互作用すると考えられる。今回の様々な専門家の集まりの中で、分野を超えた議論の一助となる話題が提供できればと考えている。

## プラズマ活性水による種子休眠打破と種子発芽制御

Giles Grainge, Kazumi Nakabayashi, Tina Steinbrecher, Sue Kennedy\*, Junchen Ren\*\*,  
Felipe Iza\*\*, Gerhard Leubner-Metzger

Dept. Biological Sciences, Royal Holloway University of London

\*Elsoms Seeds Ltd.

\*\*Wolfson School of Mechanical, Electrical and Manufacturing Engineering, Loughborough University

Email : Kazumi.Nakabayashi@rhul.ac.uk

### 概要

近年大きな論点となっている全世界の持続可能な（サステナブルな）食糧生産のためには、革新的な農業技術の開発が不可欠である。種子休眠は適応形質であり、種子が発芽できる環境条件を決定する。休眠の解除には種子がさまざまな環境シグナルを感知・統合することによって起こる複雑なプロセスが必要であるが、このプロセスの誘導は種子の収穫後の加工処理テクノロジーで代用できる場合がある。我々は、低温大気ガスプラズマを用いて作成したプラズマ活性水（GPAW）がシロイヌナズナ種子やタバコ種子の生理的休眠の解除を誘導するメカニズムを分子生物学的に解析した。

GPAWは、プラズマ処理によって生成される活性酸素・窒素種（ $\text{NO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{NO}$ や $\cdot\text{OH}$ ）によってジベレリン(GA)やアブシジン酸(ABA)の代謝を標的とするシグナリング経路を活性化し、その下流にある細胞壁リモデリング遺伝子の発現を誘導した。同時に、GPAWは直接的に細胞壁への化学的作用を起こし、胚乳の生体力学的脆弱化を早めた。さらに、シロイヌナズナ突然変異体のGPAWへの応答を解析することによって、GPAWに含まれる複数の活性種がそれぞれに発芽の促進に寄与していることが明らかとなった。つまり、GPAWによる休眠の解除は分子学的に誘導される複数のシグナル経路による生理学的な変化と直接的な組織の化学的脆弱化の複合効果によってなされ、種子発芽が誘導された。

これらの結果から、ガスプラズマテクノロジーは種子が発芽可能な環境を模倣することによって休眠状態にある種子の発芽力を上げ、種子のクオリティを向上させることが示された。

## 種子へのプラズマ照射量の定量解析最前線

奥村賢直\*, 古閑一憲\*\*\*, 白谷正治\*

\*九州大学

\*\*自然科学研究機構

Email : t.okumura@plasma.ed.kyushu-u.ac.jp

### 概要

国内外で注目を集めているプラズマ照射による植物の応答誘導は<sup>1-3</sup>、発芽・生育の改善<sup>4-6</sup>、種子のジベレリン酸(GA)とアブシジン酸(ABA)のホルモンバランス制御<sup>7,8</sup>、プラズマ照射による収穫特性の改善<sup>9</sup>などが農学的価値のある成果が報告されている。最近では、プラズマ照射の分子生物学的メカニズムを解明するための検討が始まっている<sup>10</sup>。プラズマは、活性酸素窒素種(RONS)、光子、イオン、電場を発生し、種子に照射する<sup>11</sup>。特にRONSは、成熟、老化、発芽などのさまざまな種子プロセスやその後の成長に関与することが植物分子生物学でも良く知られているものの<sup>12,13</sup>、プラズマで発生した分子の種子導入量と植物応答の定量的な議論には至っていない。比色定量などの従来計測法は、種子に導入されたRONS量の推定に役立つものの、測定感度不足により直接検出に至っていない。RONSのひとつであるNO<sub>3</sub>は、種子への導入により、CYP707A2プロモーターへのNLP8の結合に起因するシグナル伝達、遺伝子発現調節、休眠打破、およびABA代謝などの発芽に関連する応答の誘導に関与する<sup>15-18</sup>。NO<sub>3</sub>の投与によるオミクス・フェノタイプ応答については多くの報告があるが、植物体に導入されたNO<sub>3</sub>量に対する植物応答の定量的検討例は少ない<sup>17</sup>。そこで本研究では、レタス種子(*Lactuca sativa* L.)を対象として、種子への照射で実績を持つスケラブル誘電体バリア放電プラズマを照射した種子へのNO<sub>3</sub>導入量の定量測定に初めて成功した結果について報告する。5分間空気プラズマ照射した種子の抽出液をエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI QMS)で解析し、プラズマ照射により質量62m/zのイオンが検出可能な量で導入されていることを明らかにした。続いて、そのイオンがNO<sub>3</sub>であることを液体クロマトグラフィー(LC)、多波長検出器(MWD)、およびLC-ESI QMSによって同定した。電子温度T<sub>e</sub>=1eV、電子密度N<sub>e</sub>=10<sup>13</sup>/m<sup>3</sup>、およびガス温度T<sub>g</sub>=300Kでの1次元シミュレーションは、一酸化窒素NOを含むNO<sub>3</sub>の導入を示した。走査型電子顕微鏡(SEM)により、プラズマ照射後に種子の表面に変化がないことを明らかにした。この結果は、プラズマ照射が種子にダメージを与えずにドライプロセスでNO<sub>3</sub>を導入する有効な方法であることを示している。

今後の展望として、生体(種子)内プラズマ起因RONSの微量定量分析法を創成し、プラズマ起因種子内RONS量を基にした植物分子生理学的検討を行う予定である。まずは、(i) 種子に導入されるNO<sub>3</sub>量、(ii) NO<sub>3</sub>の種子器官・深さ分布、(iii) 種子内導入RONS量を明らかにする。以上により、プラズマ農業研究における機序検討に寄与する。

**謝辞** 本研究はJSPS科研費JP20H01893、JP19K14700、JP22K03586により実施された。さらにJST JPMJTR20RU、JPJSCCA2019002、JP16H03895、JP19H05462、JP21H04451、JP20K14454、プラズマバイオコンソーシアム、および名古屋大学低温プラズマ科学センターによる支援を受けた。

### 参考文献

1. Attri, P., *et al.*, *M. Processes* **8**, (2020).
2. Attri, P., *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **60**, (2021).
3. Attri, P. *et al.*, *Agronomy* **12**, 1–22 (2022).
4. Kitazaki, S. *et al.*, *Curr. Appl. Phys.* **14**, S149–S153 (2014).
5. Koga, K. *et al.*, *Appl. Phys. Express* **9**, 5–8 (2016).
6. Koga, K. *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**, (2020).
7. Mildažienė, V. *et al.*, *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
8. Attri, P. *et al.*, *Sci. Rep.* **11**, 1–10 (2021).
9. Hashizume, H. *et al.*, *Plasma Process. Polym.* **18**, 1–11 (2021).
10. Suriyasak, C. *et al.*, *ACS Agric. Sci. Technol.* **1**, 5–10 (2021).
11. Tochikubo, F. & Teich, T. H., *Jpn. J. Appl. Phys., Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.* **39**, 1343–1350 (2000).
12. Bailly, C., *et al.*, *Comptes Rendus - Biologies* vol. 331 806–814 (2008).
13. Barba-Espín, G. *et al.*, *Plant, Cell Environ.* **34**, 1907–1919 (2011).
14. Li, Z. *et al.*, *Front. Plant Sci.* **8**, 1–14 (2017).
15. Wang, R., *et al.*, *Plant Physiol.* **145**, 1735–1745 (2007).
16. Matakias, T. *et al.*, *Plant Physiol.* **149**, 949–960 (2009).
17. Liu, K. H. *et al.*, *Nature* **545**, 311–316 (2017).
18. Duermeyer, L. *et al.*, *Seed Sci. Res.* **28**, 150–157 (2018).

## フロー式プラズマ発生装置による窒素肥料の生成

玉井鉄宗, 水越克彰\*, 西村芳実\*\*, 寺島千晶\*\*\*

龍谷大学農学部資源生物科学科

\*大阪公立大学大学院現代システム科学研究科

\*\*大阪大学大学院工学研究科

\*\*\*東京理科大学理工学部先端化学科

Email : ttamai@agr.ryukoku.ac.jp

現在、窒素肥料を生成するための手段としてハーバー・ボッシュ法が用いられているが、これには大規模なプラントが必要となり、反応に必要なエネルギーは全世界の人間が消費するエネルギーの約1.2%、産業分野に絞ると約87%を消費しているといわれている。しかし、これだけのエネルギーを消費して生成された窒素肥料を用いても実際に生物に取り込まれるのは29%程度で残りの71%は土壌などの環境中に流出してしまっており、その利用効率の低さが大きな課題となっている(林ら 2017)。私たちは、大気中の窒素を水中に硝酸として固定できるフロー式プラズマ発生装置(図1)を開発した(Mizukoshi et al. 2015)。この装置により固定された硝酸を窒素肥料として利用できれば、農業現場で必要な時に、必要な量の窒素肥料を供給できるようになる。このことにより窒素利用効率を向上させ、エネルギーロスを軽減し、かつ環境負荷の少ない農業が実現可能になると考えられる。そこで、私たちは本フロー式プラズマ発生装置を用い、窒素肥料を生成することを目的として研究を行っている。



図1 フロー式プラズマ発生装置



図2 リーフレタスの水耕栽培

左: 培養液(-N)

右: プラズマ処理水を用いた培養液

本装置のプラズマ処理水を利用して培養液を調製し、リーフレタス(*Lactuca sativa* var. *crispata*)の水耕栽培を行った。その結果、リーフレタスは正常に窒素を吸収し、良好な成長を示した(図2)。このことは、本装置によって固定された硝酸が窒素肥料になり得ることを示している。しかし、いくつかの課題も露呈している。まず、電極のモリブデン(Mo)がプラズマ処理水に溶出し、植物体内に高濃度に蓄積することである。このリーフレタス100gを摂取すれば、ヒトの一日の推奨摂取量を数十倍も超えることになる。さらに、Moは植物の鉄吸収を阻害することもわかっている。また、現状では、ハーバー・ボッシュ法と比較して窒素固定効率が低いことも大きな問題である。したがって、溶出するMoを極力抑制しつつ、窒素固定量を上昇させる反応条件を検討する必要がある。その際の評価指標として、固定された硝酸濃度(ppm)を溶出したMo濃度(ppm)で除した数値を硝酸固定

効率( $\text{NO}_3/\text{Mo}$ 値)と定義し、この数値を向上させる反応条件を求めた。実験により、周波数を上げるにつれて $\text{NO}_3/\text{Mo}$ 値は上昇し、処理水の体積を増やすことによっても $\text{NO}_3/\text{Mo}$ 値は上昇することが明らかとなった。一方、処理水をアルカリ化すると、固定される硝酸濃度は飛躍的に上昇したが、Moの溶出量も増加するため、結果として $\text{NO}_3/\text{Mo}$ 値は上昇しなかった。水を循環させずに一方向に流し、水が電極と接する回数を一度にしてプラズマ処理を行うと最も $\text{NO}_3/\text{Mo}$ 値が高くなった。また、その効果は純水よりも水道水を用いた場合の方が顕著となり、水道水においてはアルカリ化の効果もみられなかった。これらの詳細や今後の展望について報告する。

【引用文献】 林健太郎, et al. 日本土壤肥料学雑誌 88.2 (2017): 166-179.

Mizukoshi, Yoshiteru, et al. Chemistry Letters 44.4 (2015): 495-496.

## プラズマと膜輸送

魚住信之, 山梨太郎, 佐々木渉太\*, 金子俊郎\*, 石丸泰寛

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻

\*東北大学大学院工学研究科電子工学専攻

Email : uozumi@tohoku.ac.jp

細胞や生物個体は外界から様々な養分である元素を取り入れて生命を維持している。細胞に取り込まれる養分などの元素などや不要物は疎水性の生体膜を通る必要がある。このため、多くのイオンは生体膜で機能するイオン輸送体(チャネル・トランスポーターなど)を介して、元素の体内への吸収、排出、循環が行われている。イオン輸送体は生物の種類に関係なくほとんどの細胞で機能している。

植物における三大栄養素の一つであるKは細胞内の主要な陽イオンとしてK輸送体によって細胞内外に輸送され、酵素の活性化、膜電位形成、細胞内の浸透圧調節、気孔の開閉など植物の生育に関わる生理的プロセスにおいて重要な役割を担っている。このように、様々な環境変化に応じて機能するK輸送体は適切に制御されることで生命が維持される。K輸送体の一つであるKチャネルは、根、葉、茎の維管束、CO<sub>2</sub>吸収や蒸散によって根からの元素吸収を担う気孔の開閉などに関与するKチャネルが機能している。このKチャネルを調節することによって植物の環境適応性が変化する<sup>(1)</sup>。また、植物は一般的にNaClに感受性を持つ<sup>(2)</sup>。Kトランスポーターに分類されるTrk/Ktr/HKT系のシロイヌナズナAtHKT1はNa透過性を持ち耐塩性に関与している。KUP/HAK/KT系Kトランスポーターはもっともホモログ遺伝子が多く、シロイヌナズナにおける発現組織、輸送活性、生理的役割が明らかにされてきた。KUP9とHAK5は根におけるKの吸収やKの植物内循環に寄与している。このようにK輸送体は植物の生理環境に影響を与える因子であることことから、K輸送体の制御は植物の調節に関係する<sup>(3,4)</sup>。

植物は三大栄養素の一つである窒素を硝酸態窒素NO<sub>3</sub><sup>-</sup>やアンモニア態窒素として吸収する。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はKのカウンターイオンであることから、K輸送体は生体膜における硝酸輸送に影響を与える。最近、我々は窒素態の植物への供給法としてプラズマを用いる方法を検討した。プラズマ発生装置により生成された窒素化合物を含む気体は、液体培地を介した供給から植物の窒素源として有効であることが示された。高濃度の供給では葉に傷害がみられたが、低濃度の供給では傷害なく窒素欠乏植物の成育を促進することが示された。プラズマを用いることにより植物の成長を調節できることが示された。

1) Yamanashi et al. Stress Biology 2;25 (2022)

2) Tanudjaja et al. J. Biol. Chem. 299, 102846 (2023)

3) 佐藤, 石丸, 魚住 バイオスティミュラントハンドブック 第1編5章 147-153 NTS社 (2022)

4) Sato et al. Adv. Sci. 9, e2201403 (2022)

## プラズマと作物生産

石橋勇志, Suriyasak Chetphilin

九州大学大学院農学研究院

Email : yushi@agr.kyushu-u.ac.jp

「稲妻ひと光で稲が一寸伸びる」という先人の言葉がある通り、プラズマと農業の関係は有効的であるとする思考は存在し、実際にプラズマ照射により植物の生育が促進した報告も多数存在すが、そのメカニズムを証明した例は極めて少ない。植物は、動物のように動き回ることができないため、種子が発芽した場所で一生を過ごさなければならない。もし、土壌の水分や温度が実生の成長にとって可能な範囲になれば、発芽した個体は死滅する運命をたどってしまう。したがって、発芽種子のタイミングの解明は、植物学の中心的命題の一つであると同時に、食糧生産にも直結する大変重要な課題である。そこで我々は、プラズマと種子をキーワードとして、プラズマ照射が種子発芽に及ぼす影響を調査した。

供試材料として、発芽遅延を示す高温登熟イネ種子（品種：日本晴）および種子休眠性の高いオオムギ（品種：イチバンボン）を用いた。プラズマ照射条件については、スケーラブル誘電体バリア放電プラズマ装置を用いて、雰囲気：空気、放電電圧：7.00 kVp-p、放電周波数：14.4 KHz、放電電力密度：3.05 w/cm<sup>2</sup>、種子—電極間距離を1 mm、照射時間：3 minの条件で照射した。

結果として、イネ、オオムギ共に全てのプラズマ照射条件により、発芽の促進が確認された。このプラズマ照射による発芽促進効果は、再現性よく確認されたことから、イネおよびオオムギ種子におけるプラズマ照射は、種子休眠を覚醒する作用があることが示唆された。

次に、吸水後の種子胚からRNAを抽出し、発芽関連遺伝子の発現解析を行った。種子発芽に関与する重要な植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) の生合成 (NCEDs) および代謝 (ABA8'-OHs) に関わる遺伝子の発現では、イネおよびオオムギ共に、NCEDsにおいて、顕著な違いは確認されなかったが、ABA8'-OHsにおいて発現上昇が確認された。一方、もう一つの重要な発芽制御ホルモンであるジベレリン (GA) に関する遺伝子 (生合成および代謝) の発現は、処理区間において違わなかった。先行研究において、種子休眠の解除には、ABA8'-OHsの働きが重要であることが報告されている

(Miller et al. 2006)。プラズマ照射による発芽促進効果は、ABAの代謝促進によって引き起こされる可能性が明らかとなった。また、イネにおいて、胚乳の貯蔵デンプを分解する $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子発現を確認したところ、プラズマ照射により、その発現が上昇していることが明らかとなり、この $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の内、プロモーター領域にCpGアイランドを持つ遺伝子についてMeDIP-qPCRにより、メチル化程度を確認したところ、プラズマ照射によって、メチル化程度の低下が確認された。さらにオオムギにおいて、活性酸素を産生し、発芽促進に関与するNADPH oxidaseの遺伝子発現は、プラズマ照射により上昇し、そのプロモーター領域のメチル化程度は低下していた。

以上の結果は、プラズマ照射による種子休眠覚醒機構において、プラズマ照射によるDNAの低メチル化を介した発芽関連遺伝子の調節が重要であることを示唆した。

現在、プラズマ照射による種子のエピジェネティクス制御に着目し、網羅的な解析から種子発芽関連遺伝子の発現制御の解明に取り組んでおり、本講演において、その一端をご紹介すると共に、地球環境変動により食糧の安定生産が困難になる時代において、持続的な食糧調達を可能にする社会を実現する具体的方策の1つとして期待されるプラズマ農業の可能性について議論したい。

## プラズマ照射による植物細胞への生体高分子導入及び農業への応用

柳川由紀<sup>1,2</sup>, 飯島勇介<sup>3</sup>, 相澤駿輝<sup>3</sup>, 末永祐磨<sup>3</sup>, 遠藤真咲<sup>4,5,6</sup>, 加藤悦子<sup>7</sup>, 土岐精一<sup>4,5,8</sup>, 沖野晃俊<sup>3</sup>, 光原一朗<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 千葉大学大学院 園芸学研究院

<sup>2</sup> 理化学研究所 環境資源科学研究センター

<sup>3</sup> 東京工業大学 未来産業技術研究所

<sup>4</sup> 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

<sup>5</sup> 横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科

<sup>6</sup> 横浜市立大学 木原生物学研究所

<sup>7</sup> 東洋大学 食環境科学部

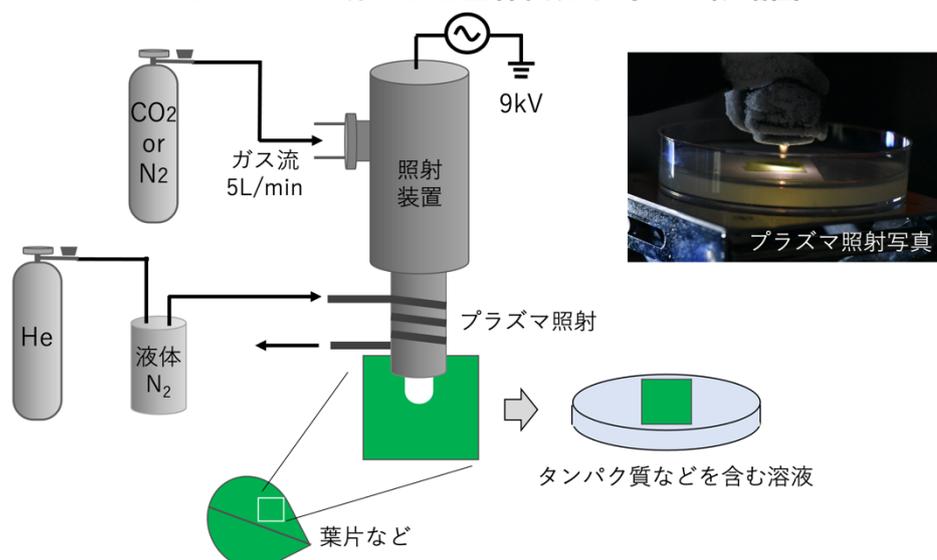
<sup>8</sup> 龍谷大学 農学部

Email : yuki.yanagawa@chiba-u.jp / ykyana@gmail.com

生細胞への生体高分子導入技術は生物の機能解析のみならず農業や医療などの応用面でも利用される重要な技術の一つである。特に、近年は生細胞へタンパク質やタンパク質-RNA 複合体からなるゲノム編集酵素を導入するゲノム編集が盛んに行われるようになり、農業分野において新育種として期待されている。しかし、植物は動物などにはない特異的な構造を有していることから、無傷の植物組織の細胞に外からタンパク質を導入する技術に関しては発展途上であり、特に植物細胞へのタンパク質導入技術の開発が期待されている。

本研究会では、私たちが開発した、温度制御大気圧プラズマを用いて植物細胞に生体高分子(タンパク質及び遺伝子)を直接導入する技術 (Yanagawa et al, PLoS One 2017; 特許第 6875686 号)について発表する。私たちがこの系を用いて、植物細胞内にモデルタンパク質である sGFP 融合タンパク質のみならず、Cas9/sgRNA を導入することにも成功し、イネ及びタバコのゲノム編集に成功した(Yanagawa et al, PLoS One, in press; 特開 2021-78362)。さらに、私たちが温度制御大気圧プラズマによる導入機構についても解析を行い、クラスリン依存的エンドサイトーシスが関与していると示唆する結果を得た(Yanagawa et al, Plant Biotech 2022)。本研究会では最新の研究成果を含めて発表する予定である。

### プラズマ照射による生体高分子導入の概略図



#### References:

- 1- Yanagawa et al (2017) Direct protein introduction into plant cells using a multi-gas plasma jet. PLoS ONE 12, e0171942
- 2- Yanagawa et al (2022) Temperature-controlled atmospheric-pressure plasma treatment induces protein uptake via clathrin-mediated endocytosis in tobacco cells. Plant Biotech. 39, 179-183

## 作物の生理形態特性からみるプラズマ照射後の環境ストレス応答

仲田（狩野）麻奈, Yap Seong Ling\*, Nikolay Britun\*\*, 石川健治\*\*, 橋爪博司\*\*, 堀勝\*\*, 江原宏

名古屋大学農学国際教育研究センター

\*University of Malaya

\*\*名古屋大学低温プラズマ科学研究センター

Email : mnakata@agr.nagoya-u.ac.jp

近年、旱魃や洪水、高温などの環境ストレス（非生物的ストレス）が作物生産に与える影響が深刻化しており、環境ストレス耐性を付与した作物の作出やストレスを軽減できる栽培管理技術の開発が求められている。著者らは、これまでにイネの水ストレス適応性強化に貢献できる形質として、根に注目して研究を進めてきた。その中で、乾燥ストレスや土壌が乾燥と湿潤を繰り返す土壌水分変動ストレス条件で高い適応性を示すイネは、根全体の構造や構成される根の形態を変化させる能力（根の可塑性）を有することを明らかにしてきた。また、根の可塑性は肥培管理などの栽培管理によって強化できる可能性を示した。ところで、植物種子への低温プラズマ照射が発芽・実生の成長促進につながる新しい技術として注目があつまっている。著者らは、イネのように種子から育て種子を収穫する作物において、低温プラズマ照射が作物の環境ストレス耐性強化にも応用できないかと考え、イネ生育に低温プラズマ照射が与える影響について検証した。

まず、イネ生育にとって最適なプラズマ照射時間について検討するため、照射時間を変えて処理したイネ種子について、発芽後の生育を調査した。イネ種子は、日本晴（水稻品種、*Japonica*）を用いた。プラズマ照射処理としてヘリウムナノセカンドジェットを1分、2分、5分、10分間、イネ種子に照射した。プラズマ照射をしていない種子を対照として用いた。それらを人工気象器内にて水耕条件で2週間栽培した。地上部生育、根系発達について調査した結果、全体的にプラズマ照射処理によって生育が促進される傾向が見られ、とくにプラズマ照射時間が5分と10分間の区の生育が優れていた。このことから、長めに照射した方が高い効果を得られる可能性が示唆された。

次に、3分間のプラズマ照射処理を行なった種子とプラズマ照射をしていない種子（対照）を用いて、乾燥ストレス条件下の生育に対する効果について検証した。処理区に、対照区（乾燥ストレスなし）、疑似的な乾燥ストレス区（ポリエチレングリコールPEG6000、10%w/v）を設けて、人工気象器内にて水耕条件で2週間栽培した（図1）。乾燥ストレス処理の影響は、乾燥ストレス処理開始後3日目から現れ、地上部の成長速度は低下する一方で、根の身長速度は促進し、水分不足による葉の萎凋、黄化が観察された。一方、表現型で見ると、乾燥ストレスの有無に関わらずプラズマ処理の有意な効果は見られず、現在生理反応における違いを精査しているところである。今回はイネで乾燥ストレスに対する応答について調べたが、今後は異なる品種や他の作物（ササゲ属）での応答、また違う種類のストレス（塩ストレスや過湿ストレス）での応答についても評価するとともに、ストレス耐性向上に効果的なプラズマ照射方法について引き続き検討を進めていく。



図1. 水耕栽培の様子。

対照区(左)、乾燥ストレス区(右)。

## ゼニゴケをモデルとした植物における活性種の役割と 低温プラズマの作用機構の解析

坪山 祥子・橋本 研志・朽津 和幸

東京理科大学理工学研究科応用生物科学専攻

Email: [tsuboyama@rs.tus.ac.jp](mailto:tsuboyama@rs.tus.ac.jp); [kuchitsu@rs.tus.ac.jp](mailto:kuchitsu@rs.tus.ac.jp)

活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は反応性が高く、生体に強い毒性を持つため、植物は多様な ROS 消去機構を備えている。一方で植物は、NADPH oxidase/Rboh 等の酵素により積極的に ROS を生成する。細胞膜上に存在する Rboh の活性は厳密に制御されており、Ca<sup>2+</sup>の結合と種々の蛋白質リン酸化酵素による特定のアミノ酸のリン酸化により相乗的に活性化される。欠損変異体の遺伝学的解析等から、Rboh による細胞壁空間への ROS 生成が、Ca<sup>2+</sup>を介した制御系と共に ROS-Ca<sup>2+</sup>シグナルネットワークを形成し、成長・発生・生殖、細胞の分裂・極性を持つ伸長・分化・プログラム細胞死、細胞壁の制御、長距離シグナル伝達等、植物の高次機能の基盤となる情報統御系の根幹で重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。

苔類ゼニゴケは、遺伝子構成や組織体制が単純だが陸上植物に共通な多くの遺伝子が保存されており、生活環の大部分が半数体で遺伝学的解析が容易である上に、遺伝的背景の統一やゲノム編集などの遺伝子工学的解析実験系が確立されており、実験モデルとして有用な植物種である。私たちは、ROS-Ca<sup>2+</sup>シグナルネットワーク関連遺伝子の機能欠損変異体を網羅的に作出し、成長・ストレス応答制御における ROS の役割やその分子機構の解明を進めている。ROS の積極的な生成能が失われた *Rboh* 欠損二重変異体では、細胞分裂・分化が強く抑制され、細胞の分裂や分化の制御における ROS の重要性を示している。

植物種子にプラズマを照射すると、発芽・成長が促進されると報告され、プラズマは安全・安心な農業技術の新たな手段として期待されている。その効果には、プラズマ装置により発生した活性酸素・窒素種の関与も示唆されるが、その効果の分子機構はほとんど未解明である。種子は、親株の生育環境や種子の保存状態・期間等により、植物ホルモン量や休眠状態等の生理状態が変動し、それに応じてプラズマ照射に対する感受性が大きく変化する。植物に対するプラズマの効果の分子機構の解明には、種子とは異なる植物組織への照射実験系の確立が必要と考え、安定的に大量の試料を採取可能なゼニゴケの無性芽への応用を試みた。

多量の試料への同時照射を可能にするスケーラブル誘電体バリア放電 (SDBD) プラズマ装置を用いて、ゼニゴケ無性芽にプラズマ照射したところ、強度依存的な効果が見出され、低電力プラズマ照射では無性芽の成長が促進され、高電力では成長は抑制された。また、プラズマ照射直後にゼニゴケの細胞内で誘導される初発反応をリアルタイムで捉えるため、顕微鏡下でプラズマ照射が可能な小型のペン型プラズマ装置 (PDBD) を新たに開発・導入した(九州大学・白谷 正治 教授, 古閑 一憲 教授, 奥村 賢直 博士との共同研究)。細胞質中の Ca<sup>2+</sup>及び ROS の時空間動態を解析可能な分子プローブを発現させたゼニゴケを用いて PDBD と蛍光イメージング法の組み合わせにより、無性芽にプラズマを照射すると、直後に細胞質の Ca<sup>2+</sup>と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が上昇することを見出した。阻害剤を用いた薬理的解析や、変異体を利用した遺伝学的解析により、プラズマ照射の初発反応の分子機構の解析を進めており、プラズマ由来の ROS が Ca<sup>2+</sup>チャネルを活性化し Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系が活性化されることが明らかとなった。下流の反応との関連性の解析を進めている。新たに構築したゼニゴケのプラズマ照射実験系は、植物へのプラズマ照射効果の分子機構の解明に有用と期待される。

## 作物育成における低温プラズマ処理の収穫への効果

橋爪博司, 水野寛子, 阿部明子, 三田 薫, 湯浅元気\*, 東野里江\*, 蕭 世男, 田中宏昌, 石川健治,  
小嶋美紀子\*\*, 竹林裕美子\*\*, 北野英己\*\*\*, 松本省吾\*\*\*, 榊原 均\*\*\*,

広末庸治\*, 前島正義\*\*\*, 水野正明\*\*\*\*, 堀 勝

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター

\*富士通クライアントコンピューティング株式会社

\*\*理化学研究所環境資源科学研究センター

\*\*\*名古屋大学大学院生命農学研究科

\*\*\*\*名古屋大学附属病院先端医療・臨床研究支援センター

Email : hashizume@plasma.engg.nagoya-u.ac.jp

近年、低温プラズマの農業応用研究が注目を集めており、プラズマ処理によってカイワレ、シロイヌナズナ、コムギなど様々な植物種に対して発芽率の向上や成長促進効果が報告されている。我々のグループでは超高密度非平衡大気圧プラズマを開発し、<sup>1)</sup> 医療や農業分野を始めとして様々なバイオ応用研究を推進してきた。プラズマの照射により発生するオゾンや紫外線など種々の活性種の中でも特に活性酸素種がミドリカビ胞子の殺菌に対して極めて有効であることが示された。<sup>2,3)</sup> また、臨床で使用される乳酸リンゲル液に対してプラズマ照射を行い調製されたPlasma-activated Ringer's lactate solution (PAL) はがん細胞のみ細胞死を誘導する優れた選択性を持つことが示された。<sup>4)</sup>

これらの知見に基づき、我々は実験室内での検討のみならず実際のフィールドにおいても低温プラズマ処理の効果の検証を進めてきた。一般にイネの栽培は、種子発芽から育苗をおこない、水田に定植した後出穂し、登熟期を経て収穫を向かえる。このように多くの生育段階を経るため、各段階で低温プラズマの有効性を検討することが必要である。名古屋大学生命農学研究科附属農場（愛知県東郷町）の試験水田に定植されたイネ苗（品種：あいちのかおり）に対して定期的にプラズマ直接照射ならびにPALの浸漬処理を行った。<sup>5)</sup> 図1に示すように、プラズマ直接照射では定植から出穂まで約2ヶ月間をプラズマ処理期間として、そのうち栄養成長期にあたる前半での処理において苗の重量や収穫量など有効な結果が得られた。一方でPAL処理では、収穫量は減収となったものの主稈の生育が促進する結果が示された。また、いずれの処理法においても、得られた玄米のうち未熟米の割合が有意に減少しており、プラズマ処理によって登熟が促進されることが示唆された。これらの結果から、イネの栽培時期において最適な条件でプラズマ処理を行うと、苗の生育や収穫量のほか、その品質にも効果をもたらすことが明らかとなった。

本検討とともに、種々の生育段階や他の品種に対する検討結果についても報告する。

### 謝辞

本研究は富士通クライアントコンピューティング株式会社およびJSPS科研費（JP19H05462）の支援により行われた。

### [参考文献]

- 1) M. Iwasaki, et al., Appl. Phys. Lett., **92**, 081503 (2008).
- 2) S. Iseki, et al., Appl. Phys. Lett., **96**, 153704 (2010).
- 3) H. Hashizume, et al., Appl. Phys. Lett., **103**, 153708 (2013).
- 4) H. Tanaka, et al., Sci. Rep., **6**, 36282 (2016)
- 5) H. Hashizume et al., Plasma Processes Polym., **18**, e202000181 (2021).

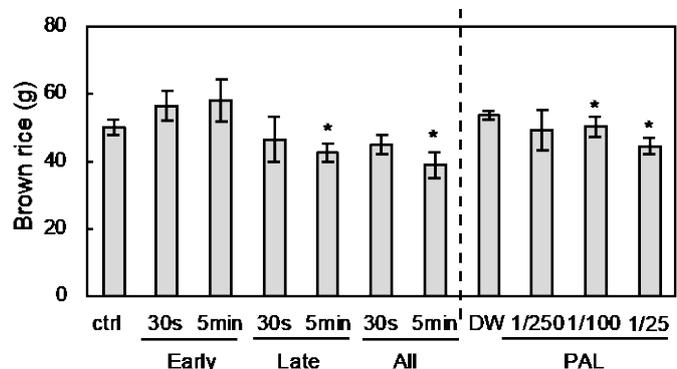


図1 各処理条件での玄米重量の結果

\*は対照区 (ctrl) ならびに蒸留水 (DW) との有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

---

2022 年（令和 4 年度）  
プラズマバイオコンソーシアム  
プラズマ種子科学研究会 講演予稿集

2023（令和 5）年 2 月 17 日発行

---

本予稿集の一部または全部を著作権法の定める範囲を超え、無断で複写、複製、転写することを禁じます。  
講演予稿集に掲載された予稿の著作権は、プラズマ種子科学研究会に帰属します。