

プラズマによる植物の成長促進・機能性向上 Enhancement of growth and functionality of plants induced by plasmas

林 信哉¹, 田代康介², 合島怜央奈³
Nobuya Hayashi, Kosuke Tashiro, Reona Aijima

¹ 九大総理工, ² 九大農, ³ 佐賀大医
^{1,2} Kyushu University, ³ Saga University

1. はじめに

近年, 生体へのプラズマ照射により生体表面の物理的変化とともに細胞内で一連の生体反応が誘導され, 植物の成長促進や細胞の増殖促進およびアポトーシス誘導等の生体機能が発現することが分かってきた¹⁻³. 特にプラズマによる植物の発芽・成長促進の誘導⁴)は, 薬剤を使用せず安価で安全な処理方法により栽培期間を短縮可能であるため, 農作物の栽培コストの大幅な削減等, 実用への期待も高い. また, プラズマの照射により農産物の機能性の一つである抗酸化活性の向上が確認されている. 酸化防止剤を使用することなく農産物やそれを加工した食品の鮮度保持期間の延長が期待される. 一方で, このような生体機能の発現がプラズマ照射により誘導されるメカニズムはこれまで解明されておらず, 成長促進技術などの実用化に対するハードルとなっている. 本研究では, プラズマ照射による植物の成長促進や抗酸化活性の変化といった生体機能の発現特性とその発現メカニズムを明らかにする.

2. 実験装置および方法

容積 20 L の真空容器内部を圧力 60 Pa の酸素ガスで満たし, 高周波放電 (13.56 MHz) により酸素プラズマを生成した. Fig. 1 に酸素プラズマ中での種子処理の様子を示す. 種子は真空容器上内面に固定された高周波放電電極から 150 mm 離れた位置に設置した. 種子の位置での電子密度はラングミュアプローブで計測可能な 10^6 cm^{-3} 以下の値であった. 酸素プラズマ中の中性活性酸素種 (O^3P , $^1\Sigma_g^+$ 等) を種子に作用させる場合には, 種子を不織布製のバッグに封入し種子に物理的影響を与える酸素イオンを遮断した.

本研究では, カイワレ大根種子と理研 BRC より入手したシロイヌナズナの種子 (*Arabidopsis thaliana* wild type, Columbia-01) を用いた. 遺伝子発現は, 酸素プラズマ照射後の種子から RNA を抽出してマイクロアレイを作成し, マイクロアレイスキャナ (Agilent SurePrint G3 GE 8x60K v2) により発現が変動している遺伝子を見出した. また, バイオインフォマティクスデータベース (DAVID)⁵)を用いた遺伝子オンロジー解析とヒートマップにより, プラズマ照射により変動する遺伝子群の機能を特定した. エピジェネティクスの指標となる DNA メチル化は, 5-メチルシトシンの生成

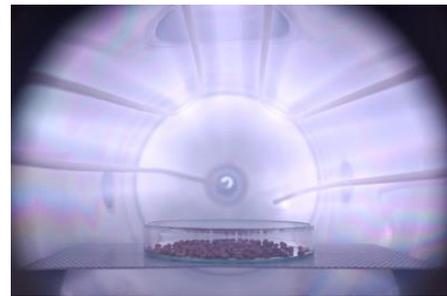


Fig. 1. 酸素プラズマ下流領域での種子への活性酸素種照射の様子.

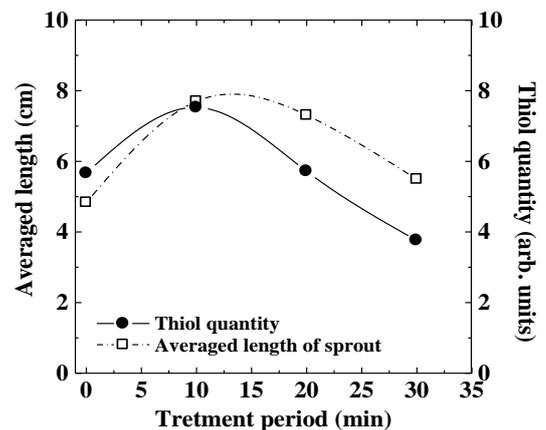


Fig. 2 プラズマを照射したカイワレ大根種子の長さやチオール化合物量の照射時間依存性.

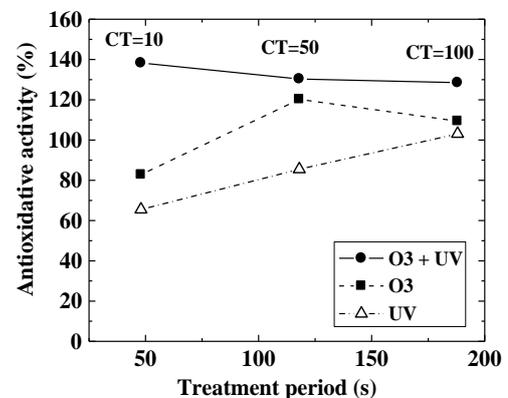


Fig. 3. ブドウへの大気圧空気プラズマおよび紫外光照射による抗酸化活性変化の照射時間依存性.

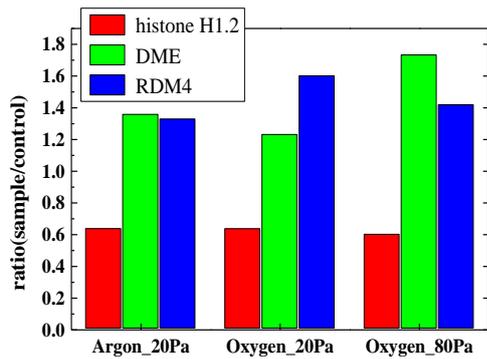


Fig. 5. DNA メチル化とヒストン修飾に関する遺伝子の変動例.

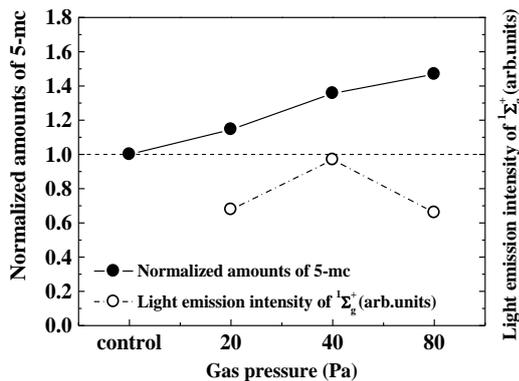


Fig. 6. DNA メチル化量および一重項酸素分子からの発光強度の酸素ガス圧力変化.

量を試薬により定量することで評価した.

3. 実験結果および考察

(1) 成長促進と抗酸化活性の向上

植物の種子にプラズマを短時間照射すると植物が刺激を感受し、播種後にFig. 2および3に示すような成長促進や抗酸化活性の向上が生じる. カイワレ大根種子にプラズマを照射した場合の、カイワレ大根の長さや抗酸化活性の指標であるチオール化合物量をFig. 2に示す. カイワレ大根長さとチオール化合物量のプラズマ照射時間依存性は同様な傾向を示している. Fig. 3にブドウへの大気圧空気プラズマ、紫外光照射およびプラズマ+紫外光による抗酸化活性変化の照射時間依存性を示す. 3つの場合で生成されるオゾン濃度Cが等しくなるようにした. プラズマとUV光を併用してブドウに活性酸素が照射される場合、抗酸化活性は未照射の1.4倍程度に増加した.

(2) 遺伝子解析

植物の成長や抗酸化活性の変化に対するプラズマの作用機序を明らかにするために、マイクロアレイによる遺伝子発現変動解析から得られたヒートマップより、プラズマ照射により発現量が増加した遺伝子を特定した. その中で、染色体領域の構造に関するヒストン修飾やDNAメチル化を律速する反応を触媒する酵素の産生をコードするエピジェネティクス関連遺伝子 (DMEや

RDM4等) に注目し、プラズマの照射パラメータを変化させた場合の発現量の変化をリアルタイムPCRを用いて定量した (Fig. 4). ガス種やプラズマの条件を変化させた場合の各遺伝子の発現量の変化はそれぞれ異なる傾向を持つが、いずれにも共通してリンカーヒストン遺伝子の発現量が低下し、DNAメチル化に関する遺伝子の発現量は増加することが分かった.

(3) DNAメチル化定量解析

プラズマ照射によるエピジェネティクスの発現を定量的に示すために、DNAメチル化量を測定した. 酸素圧力を変化させてプラズマを生成・照射した場合のDNAメチル化量の変化をFig. 5に示す. 圧力の増加とともに、DNAのメチル化量が増加していることが分かる. 一方で、DNAメチル化率の傾向は $O(^5P)$, Σ_g^+ のいずれの活性種生成の傾向とも異なっている.

(4) 活性酸素の作用機序と反応パスウェイの推定

酸素プラズマの照射により発現量が増加するエピジェネティクス関連遺伝子をリストアップし、これらの発現遺伝子から、植物種子への酸素プラズマ照射からエピジェネティクスへ至る大域的なパスウェイを推定した. ①活性酸素が細胞膜を透過して核に到達 → ②ヒストン修飾およびDNAメチル化の律速反応を触媒する酵素をコードする遺伝子に対応する転写因子の酸素受容体 (-SH) に活性酸素が結合・活性化 → ③エピジェネティクス関連遺伝子の発現量の増加 → ④ヒストン修飾およびDNAメチル化反応が促進する、といった経路が予想される.

4. 結論

酸素プラズマ中の活性酸素種の植物種子への照射によって誘導される成長促進や抗酸化活性向上等の生体反応は、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな遺伝子発現・制御により生じている可能性が見出された. 現在、酸素プラズマによる核内DNAのメチル化が誘導する遺伝子発現について調べているところである.

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP15H02231 の助成を受けたものです.

参考文献

- 1) A. E. Dubinov, E. M. Lazarenko, and V. D. Selemir: IEEE Trans. Plasma Sci. **28** (2000) 180.
- 2) J. C. Volin, F. S. Denes, R. A. Young, and S. M. T. Park, Crop Sci. **40**, 1706 (2000).
- 3) S. Kitazaki, K. Koga, M. Shiratani, N. Hayashi, Jpn. J. Appl. Phys. **51**, 01AE01-1 (2012)
- 4) N. Hayashi, R. Ono, M. Shiratani and A. Yonesu, Jpn. J. Appl. Phys. **54**, 06GD01-1 (2015).
- 5) Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA, Nature Protoc. **4**, 44 (2009).