

平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	バイオマテリアルを応用した新規接ぎ木技術の開発とメカニズムの解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部食品安全工学科・准教授・石丸 恵 共同研究者：生物理工学部医用工学科 ・教授 ・古菌 勉 農学部農業生産科学科 ・准教授・神崎真哉	

1. 研究目的・内容

当該研究課題は、ハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子複合体を用いた種々の医療用生体材料による果樹の接ぎ木活着率の向上および活着期間の短縮を目的とした効率的接ぎ木技術の開発とそのメカニズムの解明を目指す。

2. 研究経過及び成果

平成27年度に採択された本研究課題は、平成28年度で2年が経過し、上記研究目的を達成するため、以下の3項目について研究を進めている。平成28年度に得られた結果は、以下のとおりである。

1) HAp ナノ粒子をコーティングした分解性シートおよび素材の製造 (担当：古菌)

昨年度に引き続き、生分解性ポリ乳酸 (PLLA) メッシュシート上に平均一次粒子径約 50nm をイオンの相互作用によりほぼ単層で PLLA シートにコーティングした分解性 HAp シートを共同研究者に提供した。既に当該シートでは植物細胞の高い接着性が観察されている。また、接ぎ木界面への塗布剤および噴霧剤の開発を目的とし、分解性 HAp シートに代わる分解性素材2種類を作製した。HAp ナノ粒子はエタノールを良分散媒とし水を貧分散媒とすることがわかっている。ただし、接ぎ木界面への侵襲性を考慮すると水が相応しい。よって両溶媒を分散媒とする0.2重量%HAp塗布剤を作製した。さらに、表層(殻)にHApナノ粒子層を形成し、コア(核)にPLLAを内包するコアシェル微粒子を一段階製造法で作製した。当該微粒子は反応溶液中におけるHApとPLLAの重量比、および反応溶液の回転数により粒径制御が可能であった。当該コアシェル微粒子を粉末状および分散液状にて共同研究者へ提供した。

2) HAp ナノ粒子をコーティングした素材を用いた接ぎ木効率の評価 (担当：石丸・神崎)

昨年度に引き続き、分解性HApシートをブルーベリー、トマト、タバコを用いて接ぎ木試験を行い、活着効率化の検討を行った。また、今年度新たに製造した液状HAp塗布剤(液状HAp)と粒子状HAp塗布剤(粒子状HAp)を用いてブルーベリーおよびトマトの接ぎ木試験を行った。接ぎ時にHApシート使用区(HApシート)、HAp非コーティングシート使用区(PLLA)および無使用(無処理)の3処理区間で活着率の差異およびその後の新梢成長に及ぼす影響について調査した。ブルーベリーは枝接ぎを行い、トマトおよびタバコは割接ぎを慣行法に従って行った。液状HApと粒子状HApでは、HAp区と無処理区の比較を行った。

その結果、ブルーベリーにおいては、昨年同様HApによる接ぎ木活着促進効果は認められなかった。特に液状および粒子状HApにおいては、HApシートより低い活着率であったことから、木本においてはHApシートの方がHApの効果がみられた(表1)。トマトおよびタバコについては、活着期間が5~7日と短期間であったため、HApによる効果の有無を判別することは難しかった。

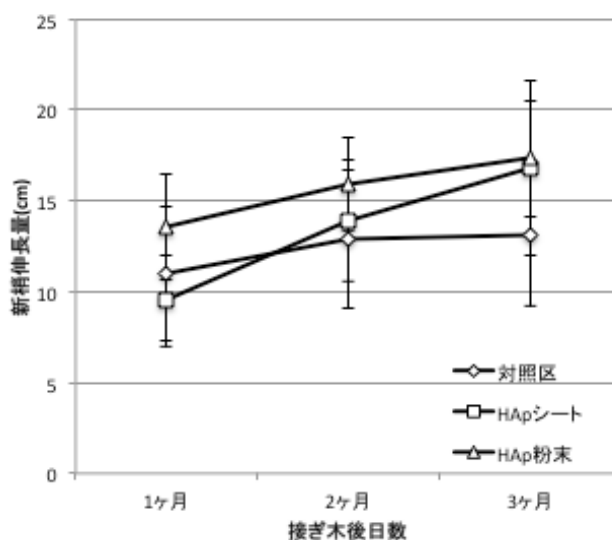
表1. HApがブルーベリー、トマトおよびタバコの活着率に及ぼす影響

処理区	ブルーベリー		トマト		タバコ	
	活着数/接ぎ木数 (本)	活着率 (%)	活着数/接ぎ木数 (本)	活着率 (%)	活着数/接ぎ木数 (本)	活着率 (%)
無処理	13/15	87	46/50	92	4/5	80
HApシート	4/5	80	9/10	90	4/5	80
液状HAp	2/4	50	10/12	83	4/5	80
粒子状HAp	1/4	25	7/8	88	3/5	60

次に、カキ、イチジクおよびライチを用いて HAp コーティング素材が接ぎ木効率およびその後の伸長に及ぼす影響を調査した。カキは前年度とは異なり 8 年生の‘富有’を台木とし、‘富有’休眠枝を穂木に用いて、HAp シートおよび HAp 粉末を利用して高接ぎを行い、慣行法（対照区）と活着率および活着後の伸長量を比較した。その結果、活着率は対照区で最も高くなり、HAp コーティング素材の活着促進効果は確認できなかった（表 2）。また、活着後の新梢の伸長量は HAp コーティング素材使用区で対照区より高い値を示したが、統計的に有意な差はみられなかった（第 1 図）。

表 2. HAp 素材の使用がカキ接ぎ木の活着率に及ぼす影響

	対照区	HAp シート区	HAp 粉末区
活着率 (%)	77.5	55	70

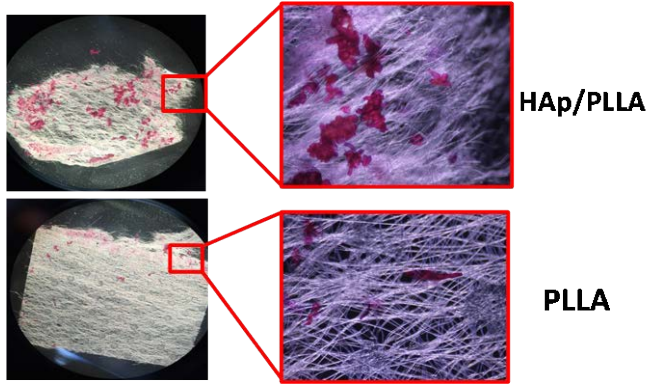


第 1 図. 接ぎ木時の処理が新梢の伸長量に及ぼす影響

一方、イチジクおよびライチを用いた試験では対照区と HAp シート区の違いはみられなかった（データ略）。

3) HAp ナノ粒子をコーティングした素材への植物細胞の付着性および増殖性の評価（担当：石丸・神崎）

上記研究項目 1) で作成した HAp シートと、トマトカルスから調製した懸濁細胞との付着性および増殖性について検討を行った。実験は、昨年の結果から、HAp シートにトマト懸濁細胞が接着することが明らかとなったことから、HAp シートとの接着に関連する物質はペクチン物質であると考え、染色法を用いて実験を行った。

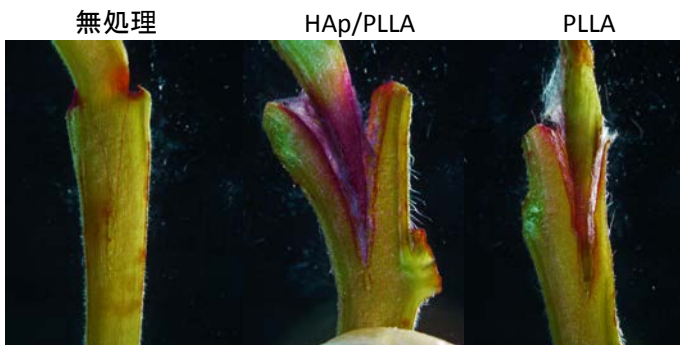


第2図 ルテニウムレッド染色した HAp シート

その結果、ペクチンを染色するルテニウムレッドを用いて、HAp シートとトマト懸濁細胞を染色したところ、HAp シートで多くの細胞が赤く染色され、HAp シートと細胞の接着にはペクチンが関与していると推測された(第2図)。

また、実際の接ぎ木における状況を確認するため、トマト接ぎ木後5日目の接ぎ木断面をルテニウムレッドで染色を行った。

その結果、HAp シートで強く染色され、接ぎ木の細胞と HAp シートがペクチンで接着している様子が明らかとなった(第3図)。



第3図 トマト接ぎ木断面のルテニウムレッド染色

平成27年度および28年度の研究成果の一部は、「植物親和性材料およびその利用」(特願2017-003695, 2017年1月12日)として特許出願準備を行っていたため、成果の発表等を行うことができなかった。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本年度の研究結果から、さらに新たな HAp ナノ粒子をコーティングした素材の製造を行い、接ぎ木への応用を検討するとともに、他の果樹等への接ぎ木検証を行う。さらに、HAp ナノ粒子をコーティングした素材と植物細胞の付着機構について詳細に検討を行う。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
園芸学会	口頭発表	平成29年9月2~3日(予定)
石丸恵、古菌 勉、河邊カーロ和重、植物親和性材料およびその利用	特願 2017-003695	2017年1月12日