

平成 29 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

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)

効率的接ぎ木技術の開発に係る研究を共同研究者が実施するため、これまで接ぎ木効果があった HAp ナノ粒子/生分解性ポリ乳酸 (PLLA) メッシュシートを多数製造し、共同研究者に提供した。なお、HAp 複合化 PLLA メッシュシート以外に、HAp ナノ粒子を分散させた塗布剤、HAp/PLLA コアシェル型微粒子の粉末および分散液を接ぎ木に使用したが、初期接着性が得られなかった。このことから、粉体を用いた場合、接ぎ木界面における点での接着では効果が得られないことが推察された。すなわち、接ぎ木界面における強固な接着は、メッシュ状シートに HAp を複合化することにより、HAp の親和性に加え、面による接着とメッシュ間の多孔質を利用した三次元的なアンカリング効果が相乗的に作用したとも考えられた。さらに追加検討として、HAp ナノ粒子と高分子基材との複合安定性を評価するため、柔軟性を有する透明エラストマーシート上に HAp ナノ粒子をコーティングした複合シートを作製した。当該シートを用いて 1 日および 3 日間の引っ張り試験 (周期 1/60Hz, 歪み 3.3%, 応力 6.6%) を行った。引っ張り試験前後の複合シートを SEM 観察したところ、いずれのシートにおいても HAp ナノ粒子の表面被覆率は 65%程度であり、試験前後において HAp ナノ粒子の表面被覆率に統計学的な差異は認められなかった。以上のことから、複合化した HAp ナノ粒子は高分子基材に安定して結合していることが明らかとなった。

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。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	4/5	80	38/40	95	4/5	80
HApシート	4/5	80	13/15	87	4/5	80
液状HAp	2/4	50	5/10	50	3/5	60
粒子状HAp	1/4	25	2/5	40	3/5	60

次に、マンゴーを用いて HAp 粉末が接ぎ木効率に及ぼす影響を調査した。台木には 1 年生および 2 年生の実生（台湾在来種）を用い、穂木には ‘Irwin’ の当年枝を用いた。通常、マンゴーの接ぎ木は 6 月から 8 月に行われることが多いが、本実験は 2 月に実施した。HAp 粉末は接ぎ木時に穂木の切断面に塗布し、慣行法（対照区）と 1 ヶ月後の活着率を比較した。その結果、活着率は対照区でわずかに高かったものの、HAp 粉末使用区とほとんど変わらず、HAp 粉末使用による接ぎ木活着促進効果は確認できなかった（表 2）。

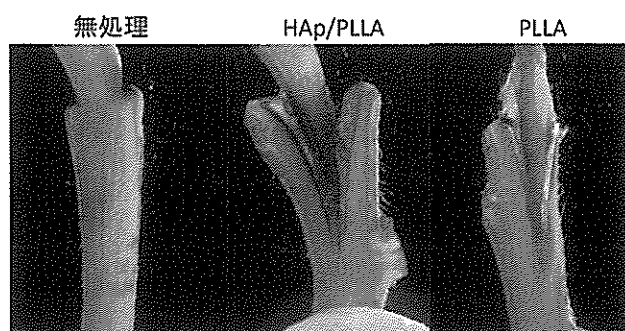
表 2. HAp 粉末の使用がマンゴー接ぎ木の活着率に及ぼす影響

	対照区	HAp 粉末区
活着率 (%)	66.7	61.5

これまでのカキやライチ、イチジクを用いた研究においても HAp 素材使用による接ぎ木促進効果は明確ではなく、マンゴーにおいても同様の結果となった。HAp 素材を果樹類の接ぎ木に実用化するためには、使用法を含めてさらに検討する必要があると考えられた。

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）

今年度は、昨年度の結果から、第 1 図のように HAp シートを用いて接ぎ木を行うと、接ぎ木境界面に多くのペクチン物質が生成していることが明らかとなった。そこで、平成 29 年度は、昨年



第 1 図 トマト接ぎ木断面のルテニウムレッド染色

と同様にトマトで無処理、HAp/PLLA、PLLA のみの 3 区を設け、それぞれから全 RNA を抽出し、RNA-Seq 法により、HAp/PLLA 区のみで強く発現する細胞壁関連遺伝子群を同定した。

その結果、HAp/PLLA 区のみで強く発現する細胞壁関連遺伝子は、28 種類が同定された。その中には、*Xyloglucan galactosyltransferase XLT2-like*, *glycosyltransferase 7*, *cellulose-synthase like*, *expansin*, *beta-glucuronosyl transferase GlcAT14B*, *galactosyltransferase-like* の発現量が高いことが明らかとなった。この他、細胞壁構成多糖類を合成する糖合成関連遺伝子も含まれていた。これらは、ペクチンの合成だけでなく、セルロース合成、ヘミセルロース合成に関連した酵素遺伝子であった。昨年度の結果、ペクチン物質の合成が特徴的に増加するとしたが、RNA-Seq による解析から HAp により誘導された遺伝子群は、ペクチンだけでなく、セルロースおよびヘミセルロースの合成も誘導されていることが明らかとなった。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究課題で、HAp が植物細胞に付着性を有し、その際には細胞壁構成多糖類の合成を誘導することが明らかとなった。このため、果樹での接ぎ木への応用性がさらに期待できると考え、これまで行った果樹以外への応用を検討し、実用化を目指したい。また、植物培養細胞シートの作成を検討する予定であったが、本研究課題内での実現ができなかったことから、今後検討していきたい。

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)
園芸学会平成 29 年度秋季大会 (酪農学園大学)	口頭発表	平成 29 年 9 月 2 日