

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2021年8月5日(05.08.2021)



(10) 国際公開番号

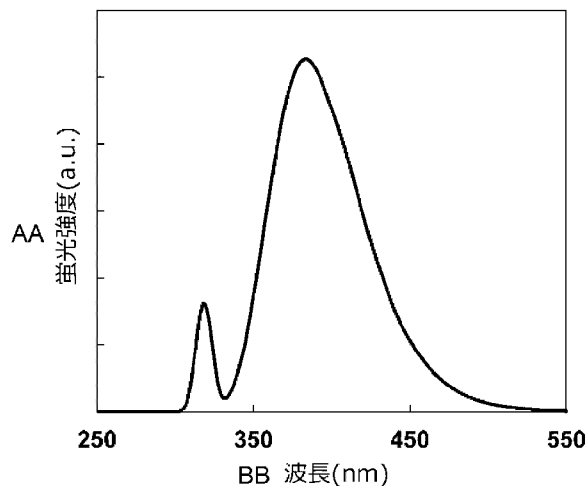
**WO 2021/153513 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*G01N 21/64* (2006.01) *G01N 27/48* (2006.01)  
*G01N 27/416* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/002482
- (22) 国際出願日: 2021年1月25日(25.01.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2020-010620 2020年1月27日(27.01.2020) JP
- (71) 出願人: 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 前田勝美(MAEDA Katsumi); 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会
- 社内 Tokyo (JP). 岩佐 繁之(IWASA Shigeyuki); 〒1088001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 伊藤 克博(ITO Katsuhiko); 〒1030025 東京都中央区日本橋茅場町2丁目13番11号 サンアイ茅場町ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: METHOD FOR SENSING PLANT HORMONE, AND METHOD FOR EARLY DETECTION OF DISEASE INFECTION IN PLANT USING SAME

(54) 発明の名称: 植物ホルモンのセンシング方法、及びそれを用いた植物の病気感染の早期検出方法

[図10]



CC 図10. TBO/MSA混合溶液の蛍光スペクトル

AA Fluorescence intensity  
BB Wavelength  
CC Fluorescence spectrum of TBO/MSA mixed solution

(57) Abstract: The present invention can detect disease infection in plant at an early stage by: using, as a receptor for sensing, a boron-oxygen compound having a specific structure that forms a complex by selectively recognizing methyl salicylate, which is a plant hormone released when a plant is infected with a pathogen; and using changes in fluorescent emission or electrochemical behavior after reacting with the methyl salicylate.



WO 2021/153513 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

---

(57) 要約: 植物が病原菌感染の際に放出する植物ホルモンであるサリチル酸メチルを選択的に認識して錯体を形成する特定構造のハウ素-酸素化合物をセンシングのレセプターとして利用し、サリチル酸メチルと反応した後の蛍光発光現象や電気化学的挙動の変化を利用することによって、植物の病気感染を早期に検出することができる。

## 明 細 書

発明の名称：

植物ホルモンのセンシング方法、及びそれを用いた植物の病気感染の早期  
検出方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、植物が病気に感染した際に放出する植物ホルモンのセンシング方法、及び植物の病気感染を早期に検出する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 植物は、糸状菌等の病原菌の感染を受けたり、害虫等による食害を受けたり、さらに環境の変動によるストレスを受けたりすると、それに対抗して独自の防御機構が働くことが知られている。具体的には、植物は病原菌による感染を受けると感染した場所でシグナル物質であるサリチル酸を合成する。そして、サリチル酸が師管組織を經由して植物体内を移動し、未感染組織に防御機構を誘導することで、結果として病原菌に対して全身で抵抗性を発現する（全身獲得抵抗性）。また、害虫による食害を受けることでエチレンやジャスモン酸を合成し、サリチル酸と同様に植物体内を移動することで全身に防御機構を誘導する（誘導全身抵抗性）。さらに乾燥、低温、塩害などの生育環境の変動に対してはアブシジン酸を植物体内で合成し環境ストレスに適用することが知られている。

[0003] また、植物は病原菌感染や害虫による食害を受けた際に、被害を受けた植物自身だけでなく、周囲の植物にも知らせるメカニズムが存在することが知られている（非特許文献1）。具体的には、病原菌に感染した際に合成されるサリチル酸はメチル化されてサリチル酸メチルになり、揮発性シグナル物質として植物から放出されて周囲の植物に病原菌の感染を知らせることで予め防御機構を促す。また、害虫の被害の際に合成されるジャスモン酸もメチル化されてジャスモン酸メチルとなり揮発性シグナルとなり植物から放出されることで、周囲の植物に予め抵抗性を誘導することが知られている。

[0004] このように植物は病害虫による被害を受けた際にシグナル物質として植物ホルモンを放出することが知られており、そのシグナル物質をいち早くセンシングすることで病害虫被害を早期に検出することが可能となる。

[0005] 害虫被害の際に揮発性シグナルとして放出されるジャスモン酸をセンシングすることで被害の早期発見する方法として、栽培している農作物の傍に、発光タンパク質遺伝子を有するモニター植物と一緒に栽培し、そして農作物が害虫被害を受けた際に放出されたジャスモン酸メチルをモニター植物が感知してモニター植物が発光する現象を利用する方法が開示されている（特許文献1）。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：WO2019/082942号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：J. Japan Association on Odor Environment, Vol.36, No.3, 153-155(2005).

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、農作物を含む植物の栽培において、病気感染した際に放出される植物ホルモンであるサリチル酸メチルをセンシングする方法、及び該センサーを提供し、それによって植物の病気感染を早期に、その場で検出する方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、揮発性植物ホルモンであるサリチル酸メチルを選択的に認識して錯体を形成するホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物をセンシングのレセプターとして利用する。また、本発明はサリチル酸メチルとホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物が反応して生成した錯体の蛍光発光現象を利用することによって、植物の病気感染を早期に検出する。さらに、本発明は

サリチル酸メチルとホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物が反応して、電気化学的挙動が変化する現象を利用することによって、植物の病気感染を早期に検出する。

### 発明の効果

[0010] 本発明のホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物を用いることにより、植物が病原菌に感染した際に放出される揮発性植物ホルモンのサリチル酸メチルを選択的にセンシングでき、さらにサリチル酸メチルとホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物が反応して形成された錯体からの蛍光発光現象を利用したり、電気化学的挙動の変化を利用することで植物の病原菌による感染を早期に検出することが可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、テトラアセトキシジボロキサン (TB0) のみ (a)、及びテトラアセトキシジボロキサン+サリチル酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図2]図2は、テトラアセトキシジボロキサン (TB0) のみ (a)、及びテトラアセトキシジボロキサン+ジャスモン酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図3]図3は、TB0を含むろ紙とサリチル酸メチルをシャーレにいれたものをデシケータ内に直接接触しないように静置し、1時間後にろ紙を取り出し、ろ紙にUVランプで励起させて、蛍光発光があるか評価した結果を示す写真である。

[図4]図4は、フェニルボロン酸 (PB) のみ (a)、及びフェニルボロン酸+サリチル酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図5]図5は、フェニルボロン酸 (PB) のみ (a)、及びフェニルボロン酸+ジャスモン酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光

発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図6]図6は、2, 4, 6-トリフェニルポロキシソ (TPB) のみ (a)、及び2, 4, 6-トリフェニルポロキシソ+サリチル酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図7]図7は、2, 4, 6-トリフェニルポロキシソ (TPB) のみ (a)、及び2, 4, 6-トリフェニルポロキシソ+ジャスモン酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図8]図8は、2, 4, 6-トリソ (3, 4, 5-トリフルオロフェニル) ポロキシソ (TFPB) のみ (a)、及び2, 4, 6-トリソ (3, 4, 5-トリフルオロフェニル) ポロキシソ+サリチル酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図9]図9は、2, 4, 6-トリソ (3, 4, 5-トリフルオロフェニル) ポロキシソ (TFPB) のみ (a)、及び2, 4, 6-トリソ (3, 4, 5-トリフルオロフェニル) ポロキシソ+ジャスモン酸メチル (b) を滴下したろ紙にUVランプの光を当てて、蛍光発光が見られるか否かを確認した結果を示す写真である。

[図10]図10は、TB0のアセトニトリル溶液 (濃度0.1mol/L) 1mlとMSAのアセトニトリル溶液 (濃度0.1mol/L) 1mlを混合し、10分後に2000倍に希釈してその溶液を石英セルに入れ、励起波長348nmで蛍光スペクトルを測定して得られた蛍光スペクトル曲線を示す図である。

[図11]図11は、TB0とMSAの比率を変えて混合液を調製し、励起波長348nmでの蛍光スペクトルを測定して、波長384nmでの蛍光強度を求め、得られた蛍光強度をプロットした図である。

[図12]図12は、TB0のアセトニトリル溶液 (破線) 及びTB0+MSAのアセトニトリル溶液 (実線) のサイクリックボルタンメトリ (CV) の測定

結果を示す図である。

[図13]図13は、TBOのアセトニトリル溶液（破線）及びTBO+ジャスモン酸メチル（MJA）のアセトニトリル溶液（実線）のサイクリックボルタンメトリ（CV）の測定結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を実施するための形態について図面等を用いて説明する。

ただし、以下に述べる実施形態には、本発明を実施するために技術的に好ましい限定がされているが、発明の範囲を以下に限定するものではない。

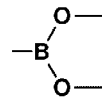
[0013] 本発明者らは、上述の課題を解決するために鋭意研究を重ねた。その結果、植物が病原菌に感染した際に放出する揮発性シグナル物質であるサリチル酸メチルはホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物を用いることで選択的にセンシングできることを見出し、本発明を完成した。

[0014] 以下に、本発明に係る実施形態について詳述する。

[0015] <サリチル酸メチルのレセプター：ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物>

ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物としては、一般式（1）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物が挙げられる。

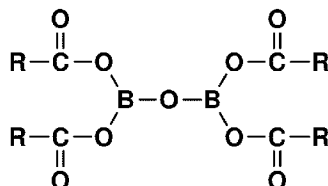
[0016] [化1]



(1)

[0017] 具体的には、下記一般式（2）で表されるジボロキサン誘導体、

[0018] [化2]

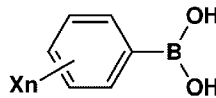


(2)

(式中、Rはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、またはフェニル基を表す。ここで、各Rはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。)

[0019] 下記一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体、

[0020] [化3]

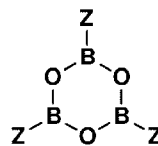


(3)

(式中、Xは水素原子、炭素数1～4のアルキル基、アルコキシ基、メルカプト基、メルカプト置換アルキル基、またはメルカプト置換アルコキシ基を表し、nは1～5の整数を表す。ここで、nが2以上の場合、各Xはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。)

[0021] 下記一般式(4)で表されるボロキシン誘導体が挙げられる。

[0022] [化4]



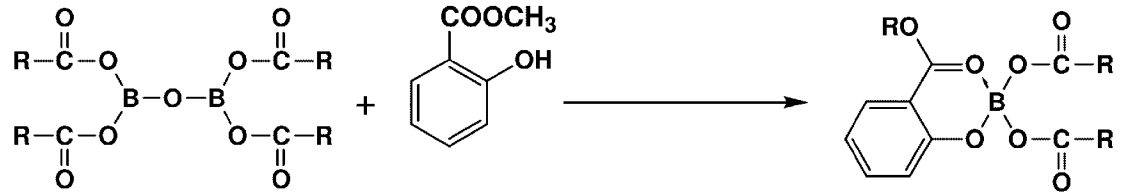
(4)

(式中、Zは炭素数1～4のアルキル基、または置換もしくは無置換のフェニル基を表す。ここで、各Zはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。なお、置換フェニル基の例には、例えば、アルキル置換フェニル基、アルコキシ置換フェニル基、ヒドロキシ置換フェニル基、ハロゲン置換フェニル基(例えば、フッ素置換フェニル基)、ハロゲン化アルキル置換フェニル基、アミノ置換フェニル基、ニトロ置換フェニル基、カルボキシ置換フェニル基が含まれる。)

[0023] 例えば、上記ジボロキサン誘導体はサリチル酸メチルと下記式(1)に示

す反応によりホウ素錯体を形成することでサリチル酸メチルを選択的に認識することができる。

[0024] [化5]



式(1)

[0025] また、上記フェニルボロン酸誘導体、及びボロキシソル誘導体も、サリチル酸メチルと反応して錯体を形成することでサリチル酸メチルを選択的に認識することができる。

[0026] よって、本発明の一部の実施形態は、一般式(1)で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式(2)で表されるジボロキシソル誘導体、一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式(4)で表されるボロキシソル誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法に関する。

[0027] また、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターとして、一般式(1)で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式(2)で表されるジボロキシソル誘導体、一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式(4)で表されるボロキシソル誘導体を用いる、サリチル酸メチルのセンシング方法に関する。

[0028] 一部の実施形態では、一般式(2)で表されるジボロキシソル誘導体として、テトラアセトキシジボロキシソル(TBO)が用いられうる。また、一部の実施形態では、一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体として、フェニルボロン酸(PB)が用いられうる。さらに、一部の実施形態では、一般式(4)で表されるボロキシソル誘導体として、2,4,6-トリフェニルボロキシソル酸(TPB)または2,4,6-トリス(3,4,5-トリフルオロフェニル)ボロキシソル(TFPB)が用いられうる。

[0029] 一部の実施形態では、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルとの反応は溶液中で行われる。溶液は、例えば、アセトニトリル溶液またはメタノール溶液でありうるが、これらに限定されるものではない。一部の実施形態において、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物の濃度は、例えば、 $0.00001\text{mol/L}$ ～ $5\text{mol/L}$ の範囲内、例えば、 $0.00004\text{mol/L}$ ～ $0.4\text{mol/L}$ の範囲内の濃度でありうる。

[0030] 一部の実施形態では、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルとの反応はホウ素-酸素化合物を含有する固体媒体中で行われる。固体媒体は、例えば、紙または樹脂（例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ナイロン樹脂、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリフェニレンオキサイド、ポリビニルアルコール等）でありうるが、これらに限定されるものではない。

[0031] <蛍光発光現象>

ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルの反応により生成した錯体は、新たに蛍光発光を示す。具体的には、ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルの反応で形成された錯体に、波長が $200\sim 400\text{nm}$ の励起光をあてることで蛍光発光を示す。一方、ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物のみでは蛍光発光を示さず、これによってサリチル酸メチルを検出することが可能となる。

[0032] よって、本発明の一部の実施形態は、（i）一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（２）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（３）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（４）で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、（i i）錯体に励起光をあてる工程、（i i i）錯体が発する蛍光を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法に関する。一部の実施形態様では、励起波長として $200\sim 400\text{nm}$ の範囲内の適切な波長が選択される。さらに、一部の実施形態では、検出された蛍光の強度をあらかじめ決められ

た参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程も実施されうる。

[0033] また、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルが、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（２）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（３）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（４）で表されるボロキシン誘導体と反応して、ホウ素錯体を形成することで蛍光発光する現象を利用する、サリチル酸メチルのセンシング方法に関する。

[0034] <電気化学的挙動>

ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルの反応により生成した錯体は、レセプターのホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とは異なる電気化学的挙動を示す。具体的には、ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルから成る錯体を含有する電気化学セルのサイクリックボルタンメトリの測定により、電流値の大きな変化が生ずる。これによって、この電流値をモニターすることでサリチル酸メチルを検出することが可能となる。

[0035] よって、本発明の一部の実施形態は、（i）溶液中で一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（２）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（３）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（４）で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、（i i）一定の電圧下で溶液に流れる電流を測定する工程、（i i i）錯体の形成により生じる電流値の変化を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法に関する。一部の実施態様では、電圧の値として1.6~2.2Vの範囲内の適切な値が選択される。溶液は、支持電解質として、例えば、テトラブチルアンモニウムテトラフルオロボラートを含みうるが、これに限定はされない。さらに、一部の実施形態では、検出された電流値の変化をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程も実施されうる。

[0036] また、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルが、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（２）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（３）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（４）で表されるボロキシン誘導体とサリチル酸メチルとの反応により電気化学的挙動が変化する現象を利用することを特徴とする、サリチル酸メチルのセンシング方法に関する。

[0037] さらに、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルが、一般式（１）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（２）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（３）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（４）で表されるボロキシン誘導体とサリチル酸メチルとの反応により生じる電流値の変化を利用することを特徴とする、サリチル酸メチルのセンシング方法に関する。

[0038] 一部の実施形態において、本発明のサリチル酸メチルのセンシング方法は、農作物の病原菌感染の検出のために用いられうる。

[0039] <サリチル酸メチルセンサー>

本発明のホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物をレセプターに用いたサリチル酸メチルセンサーは、少なくともサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部から構成される。認識部には、少なくともレセプターであるホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物を含む。ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物は、サリチル酸メチル以外の他の植物ホルモン、例えばジャスモン酸メチルとは反応せず認識しないため、サリチル酸メチルを選択的に認識することができる。前記検出部は、前記サリチル酸メチルの認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを光学的、及び/または電気化学的に検出できるように構成されている。例えば、光学的な検出部では、ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルで生成した錯体の蛍光発光を検出するため、少なくとも励起光源と検出素子から構成され、蛍光強度の変化からサリチル酸メチルの検出並びにその濃度を測定する。また、電気化学的な検出部では電気化学的

挙動の変化を検出するため、例えばホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物とサリチル酸メチルで生成した錯体の酸化により生じる電流を検出するように電極を有する電気化学セル（検出素子）を構築して、該電気化学セルの電気化学的挙動の変化（例えば、ある電位での電流値の変化）を用いてサリチル酸メチルの検出、及びその濃度を測定する。

[0040] よって、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式（1）で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備えている、サリチル酸メチルセンサーに関する。一部の実施形態において、本発明のサリチル酸メチルセンサーは、農作物が病原菌に感染した際に放出される植物ホルモンのサリチル酸メチルを検出する。よって、本発明のサリチル酸メチルセンサーは、農作物の病原菌感染検出用のセンサーとして用いられうる。一部の実施形態において、本発明のサリチル酸メチルセンサーは、ジャスモン酸メチルに比べて、サリチル酸メチルを選択的に検出することができる。

[0041] また、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、（i）一般式（1）で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、（ii）該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを光学的に検出する検出部を少なくとも備えている、サリチル酸メチルセンサーに関する。一部の実施形態において、光学的な検出部は、少なくとも励起光源と検出素子とを含む。一部の実施形態において、本発明のサリチル酸メチルセンサーは、観測された蛍光強度の変化に基づき、サリチル酸メチルの検出及び／または濃度測定を行うことができる。

[0042] さらに、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、（i）一般式（1）で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、（ii）該認識部にサリ

チル酸メチルが認識されたことを電気化学的に検出する検出部を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサーに関する。一部の実施形態において、電気化学的な検出部は、ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルが形成する錯体の酸化により生じる電流を検出する電極を有する電気化学セルを含む。一部の実施形態において、本発明のサリチル酸メチルセンサーは、電気化学セルの電流値の変化に基づき、サリチル酸メチルの検出及び／または濃度測定を行うことができる。

[0043] 一部の実施態様では、検出部は、サリチル酸メチルの検出及び／または濃度測定を処理するプログラムを実行するコンピュータを含みうる。そのようなプログラムは、例えば、コンピュータに、光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに、分析結果を出力する段階を実行させるプログラムでありうる。一部の実施態様において、受信した信号の分析は、例えば、受信した信号をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定することを含みうる。また、一部の実施態様において、分析結果は、例えば、センサーに接続されたディスプレイ装置、またはネットワークを介して接続された他の機器等へ出力されうる。

[0044] よって、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式(1)で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備え、該検出部が検出素子とコンピュータを含むサリチル酸メチルセンサーにおいて、コンピュータに、(i) 光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、(ii) 受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに(iii) 分析結果を出力する段階を実行させるプログラムに関する。

[0045] <農作物の病原菌感染を早期に検出する方法>

本発明のサリチル酸メチルセンサーの用途の一つとして、サリチル酸メチルセンサーを農作物が植えられている傍らに設置し、センサーによりサリチル酸メチルを検出することによって、農作物の病原菌感染を早期に検出することが可能である。

[0046] よって、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルセンサーを農作物の近傍に設置し、該センサーによりサリチル酸メチルを検出することにより農作物の病原菌感染を検出する方法に関する。一部の実施態様において、サリチル酸メチルセンサーは、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式(1)で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備えている、サリチル酸メチルセンサーである。また、一部の実施態様において、サリチル酸メチルセンサーは、(i)一般式(1)で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、(ii)該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを光学的及び/又は電気化学的に検出する検出部を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサーである。

[0047] 監視対象となりうる農作物としては、例えば、キュウリ、スイカ、トマト、ナス、ピーマン、シシトウ、メロン、ハクサイ、キャベツ、ダイコン、レタス、ネギ、ブロッコリー、タマネギ、ニンニク、ヤマノイモ、アスパラガス、ニンジン、バレイショ、セルリー、タバコ、イネ、イチゴが挙げられるが、これらに限定はされない。検出されうる病害としては、例えば、輪紋病、白星病、褐色輪紋病、葉かび病、萎凋病、根腐萎凋病、半身萎凋病、褐色根腐病、灰色疫病、根腐病、黒点根腐病、白絹病、苗立枯病、褐斑病、べと病、うどんこ病、灰色かび病、炭疽病、黒星病、菌核病、つる枯病、斑点病、疫病、モザイク病、黄化えそ病、黄化葉巻病、青枯病、軟腐病、かいよう病、茎えそ細菌病、黒班細菌病、斑点細菌病等が挙げられるが、これらに限定はされず、また、検出されうる病原菌感染としては、上記の病害の原因菌

による感染が挙げられるが、これらに限定はされない。

[0048] 本開示の文脈において、センサーを農作物の近傍に設置すると言った場合、用語「近傍」の例としては、例えば、監視対象の農作物から2m以内、1m以内、75cm以内、50cm以内、40cm以内、30cm以内、20cm以内、10cm以内、または5cm以内の距離が挙げられるが、これらに限定はされず、適切な距離が種々の要因を考慮して適宜選択される。当業者であれば、センサーを設置する位置を様々な条件を考慮した上で適宜設定することが可能であろう。

[0049] さらに、本発明の一部の実施形態は、農作物の病原菌感染の検出における、サリチル酸メチルセンサーの使用に関する。また、本発明の一部の実施形態は、サリチル酸メチルセンサーの製造における、一般式（1）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式（2）で表されるジボロキサン誘導体、一般式（3）で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式（4）で表されるボロキシン誘導体の使用に関する。

## 実施例

[0050] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

[0051] （実施例1）

テトラアセトキシジボロキサン（TB0）0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmφ）に滴下し乾燥させて、TB0を含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図1(a)）。次にそのろ紙に植物が病原菌に感染した際に放出するサリチル酸メチル（MSA）のアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図1(b)）。その結果、TB0はサリチル酸メチルと反応し、蛍光発光を示し、サリチル酸メチルをセンシングできることが分かった。

[0052] （比較例1）

テトラアセトキシジボロキサン（TB0）0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmφ）に滴下し乾燥させて、TB0を含むろ紙を得

た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図2(a)）。次にそのろ紙に植物が害虫被害を受けた際に放出するシグナル物質であるジャスモン酸メチルのアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図2(b)）。その結果、TB0はジャスモン酸メチルとは反応せず、蛍光発光を示さないことが分かった。

[0053] 実施例1と比較例1の結果から、TB0は植物が病原菌感染時に放出するサリチル酸メチルを選択的にセンシングできることが分かった。

[0054] （実施例2）

テトラアセトキシジボロキサン（TB0）0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmφ）に滴下し乾燥させて、TB0を含むろ紙を得た。次にこのろ紙とサリチル酸メチル0.05gをシャーレにいれたものをデシケーター内に直接接触しないように静置し保管した。1時間後にろ紙を取り出し、ろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか評価した結果、青色蛍光が確認された（図3）。この結果から、植物が病原菌感染の際に放出するサリチル酸メチルを揮発性シグナルとしてセンシングできることが分かった。

[0055] （実施例3）

フェニルボロン酸（PB）0.1gをメタノール3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmφ）に滴下し乾燥させて、PBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図4(a)）。次にそのろ紙に植物が病原菌に感染した際に放出するサリチル酸メチル（MSA）のアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図4(b)）。その結果、PBはサリチル酸メチルと反応し、蛍光発光を示し、サリチル酸メチルをセンシングできることが分かった。

[0056] （比較例2）

フェニルボロン酸（PB）0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2ml

を円形ろ紙（45mmΦ）に滴下し乾燥させて、PBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図5(a)）。次にそのろ紙に植物が害虫被害を受けた際に放出するシグナル物質であるジャスモン酸メチルのアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図5(b)）。その結果、PBはジャスモン酸メチルとは反応せず、蛍光発光を示さないことが分かった。

[0057] 実施例3と比較例2の結果から、PBは植物が病原菌感染時に放出するサリチル酸メチルを選択的にセンシングできることが分かった。

[0058] （実施例4）

2, 4, 6-トリフェニルポロキシシン酸（TPB）0.1gをメタノール3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmΦ）に滴下し乾燥させて、PBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図6(a)）。次にそのろ紙に植物が病原菌に感染した際に放出するサリチル酸メチル（MSA）のアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図6(b)）。その結果、TPBはサリチル酸メチルと反応し、蛍光発光を示し、サリチル酸メチルをセンシングできることが分かった。

[0059] （比較例3）

2, 4, 6-トリフェニルポロキシシン酸（TPB）0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙（45mmΦ）に滴下し乾燥させて、TPBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ（波長365nm）で励起させて蛍光発光があるか確認した（図7(a)）。次にそのろ紙に植物が害虫被害を受けた際に放出するシグナル物質であるジャスモン酸メチルのアセトニトリル溶液（0.1mol/L）0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した（図7(b)）。その結果、TPBはジャスモン酸メチルとは反応せず、蛍光発光を示さないことが分かった。

[0060] 実施例4と比較例3の結果から、TPBは植物が病原菌感染時に放出する

サリチル酸メチルを選択的にセンシングできることが分かった。

[0061] (実施例5)

2, 4, 6-トリリス(3, 4, 5-トリフルオロフェニル)ポロキシシン(TFPB) 0.1gをメタノール3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙(45mmΦ)に滴下し乾燥させて、TFPBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ(波長365nm)で励起させて蛍光発光があるか確認した(図8(a))。次にそのろ紙に植物が病原菌に感染した際に放出するサリチル酸メチル(MSA)のアセトニトリル溶液(0.1mol/L) 0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した(図8(b))。その結果、TFPBはサリチル酸メチルと反応し、蛍光発光を示し、サリチル酸メチルをセンシングできることが分かった。

[0062] (比較例4)

2, 4, 6-トリリス(3, 4, 5-トリフルオロフェニル)ポロキシシン酸(TFPB) 0.1gをアセトニトリル3mlに溶解した溶液0.2mlを円形ろ紙(45mmΦ)に滴下し乾燥させて、TFPBを含むろ紙を得た。得られたろ紙にUVランプ(波長365nm)で励起させて蛍光発光があるか確認した(図9(a))。次にそのろ紙に植物が害虫被害を受けた際に放出するシグナル物質であるジャスモン酸メチルのアセトニトリル溶液(0.1mol/L) 0.03mlを滴下し乾燥させ、得られたろ紙に同様にUVランプで励起させて蛍光発光があるか確認した(図9(b))。その結果、TPBはジャスモン酸メチルとは反応せず、蛍光発光を示さないことが分かった。

[0063] 実施例5と比較例4の結果から、TFPBは植物が病原菌感染時に放出するサリチル酸メチルを選択的にセンシングできることが分かった。

[0064] (実施例6)

[蛍光強度の定量性評価]

TB0のアセトニトリル溶液(濃度0.1mol/L) 1mlとMSAのアセトニトリル溶液(濃度0.1mol/L) 1mlを加え、10分後に2000倍に希釈してその溶液を石英セルに入れ、励起波長348nmで蛍光スペクトルを測定した結果、図10に示す蛍光

スペクトル曲線が得られた。その時のピーク波長は384nmであった。次に、TBOのアセトニトリル溶液（濃度0.1mol/L）0.9mlとMSAのアセトニトリル溶液（濃度0.1mol/L）0.1mlを加え、10分後に2000倍に希釈して励起波長348nmで蛍光スペクトルを測定し、波長384nmでの蛍光強度を求めた。同様にTBO溶液0.8mlとMSA溶液0.2mlでの蛍光強度、さらにTBO溶液0.7mlとMSA溶液0.3mlでの蛍光強度を求めた。得られた蛍光強度をプロットしたものを図11に示す。この結果から、MSAの比率が増大するとともに蛍光強度も増大しており、MSAを定量的に検出できることが分かった。

[0065]（実施例7）

[電気化学的挙動の測定]

支持電解質としてテトラブチルアンモニウムテトラフルオロボラートをアセトニトリルに溶解し電解液を調製し（濃度：0.1mol/L）、ガラス容器に電解液10mlを入れ、作用極、対極、参照電極から成る三電極方式の電気化学セルを構成した。なお作用極にはグラッシーカーボン、対極にはPt、参照電極にはAg/Ag<sup>+</sup>電極を用いた。そこにTBOのアセトニトリル溶液（濃度：0.1mol/L）を0.1ml加え、室温でサイクリックボルタンメトリ（CV）を測定した（掃引電位：0~2.2V、掃引速度：0.1V/s）。

[0066] 次にそこにサリチル酸メチル（MSA）のアセトニトリル溶液（濃度：0.1mol/L）を0.1ml加え、同様にCV測定を行った。

[0067] 得られた電流-電圧曲線（サイクリックボルタモグラム）を図12に示す。破線はTBOのみ、実線はTBOにMSAを添加した後の測定結果である。この結果から、MSA添加後には、添加前に比べて、電位が1.6~2.2Vの領域で電流値が大きく変化していることが分かった。このことは、例えばMSAの添加前後で電流値が大きく変化する電圧（Ag/Ag<sup>+</sup>電極に対して1.6~2.2V）で電極に流れる電流値をモニターすることで、電流値の変化で植物ホルモンであるサリチル酸メチルをセンシングできることを示している。

[0068]（比較例5）

[電気化学的挙動の測定]

実施例 7 と同様に、但し、サリチル酸メチルのアセトニトリル溶液を用いる代わりに、植物が害虫被害の際に放出する植物ホルモンのジャスモン酸メチル (MJA) のアセトニトリル溶液 (濃度 : 0.1mol/L) 0.1ml を添加して、同様にサイクリックボルタンメトリの測定を行った。得られた結果を図 13 に示す。破線は TBO のみ、実線は TBO に MJA を添加した後の測定結果である。この結果から、MJA 添加前後に電流値が大きく変化している電圧領域がないことが分かった。

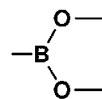
[0069] 実施例 7 と比較例 5 から、TBO によりサリチル酸メチルを電気化学的にも選択的にセンシングできることが明らかとなった。

[0070] 上記の実施形態の一部または全部は、以下の付記のようにも記載されうるが、本出願の開示事項は以下の付記に限定されない。

[0071] (付記 1)

サリチル酸メチルをセンシングする方法であり、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターとして下記一般式 (1) で表される構造を有するホウ素-酸素化合物を用いるセンシング方法。

[0072] [化6]

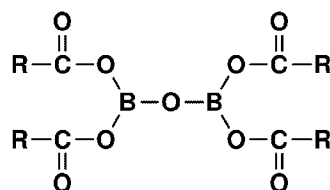


(1)

(付記 2)

前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式 (2) で表されるジボロキサン誘導体である付記 1 記載のセンシング方法。

[0073] [化7]



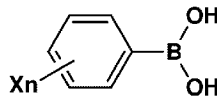
(2)

(式中、Rはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、またはフェニル基を表し、各Rはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。)

(付記3)

前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体である付記1記載のセンシング方法。

[0074] [化8]



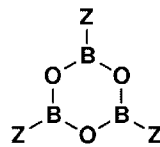
(3)

(式中、Xは水素原子、炭素数1～4のアルキル基、アルコキシ基、メルカプト基、メルカプト置換アルキル基、またはメルカプト置換アルコキシ基を表し、nは1～5の整数を表し、nが2以上の場合、各Xはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。)

(付記4)

前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式(4)で表されるボロキシン誘導体である付記1記載のセンシング方法。

[0075] [化9]



(4)

(式中、Zは炭素数1～4のアルキル基、または置換もしくは無置換のフェニル基を表し、各Zはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。)

(付記5)

前記センシングにおいて、サリチル酸メチルが前記ホウ素-酸素化合物と反応してホウ素錯体を形成することで蛍光発光する現象を利用する付記1～4のいずれか一項記載のセンシング方法。

(付記6)

前記センシングにおいて、前記ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルの反応により電気化学的挙動が変化する現象を利用する付記1～4のいずれか一項記載のセンシング方法。

(付記7)

前記センシングにおいて、前記ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルの反応により生じる電流値の変化を利用する、付記6記載のセンシング方法。

(付記8)

サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、  
i) 一般式(1)で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、  
i i) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサー。

(付記9)

付記8記載のサリチル酸メチルセンサーを農作物の近傍に設置し、該センサーによりサリチル酸メチルを検出することにより農作物の病原菌感染を検出する方法。

(付記10)

サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式(1)で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備え、該検出部が光学的及び／または電気化学的な検出素子とコンピュータを含むサリチル酸メチルセンサーであって、コンピュータに、  
i) 光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、  
i i) 受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに  
i i i) 分析結果を出力する段階

を実行させるプログラムを有するサリチル酸メチルセンサー。

(付記 1 1)

(i) 一般式 (1) で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式 (2) で表されるジボロキサン誘導体、一般式 (3) で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式 (4) で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、(ii) 錯体に励起光をあてる工程、(iii) 錯体が発する蛍光を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法。

(付記 1 2)

励起波長として200~400nmの範囲内の波長を用いる付記 1 1 記載の検出方法。

(付記 1 3)

検出された蛍光の強度をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程をさらに含む付記 1 1 または 1 2 記載の検出方法。

(付記 1 4)

(i) 溶液中で一般式 (1) で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式 (2) で表されるジボロキサン誘導体、一般式 (3) で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式 (4) で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、(ii) 一定の電圧下で溶液に流れる電流を測定する工程、(iii) 錯体の形成により生じる電流値の変化を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法。

(付記 1 5)

電圧の値が1.6~2.2Vの範囲内である付記 1 4 記載の検出方法。

(付記 1 6)

溶液が、支持電解質として、テトラブチルアンモニウムテトラフルオロボラートを含まない付記 1 4 または 1 5 記載の検出方法。

(付記 1 7)

検出された電流値の変化をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程をさらに含む付記 14～16 のいずれか一項記載の検出方法。

(付記 18)

一般式 (1) で表される構造を有するホウ素-酸素化合物が、テトラアセトキシジボロキサン (TBO)、フェニルボロン酸 (PB)、2, 4, 6-トリフェニルボロキシニン酸 (TPB)、および 2, 4, 6-トリス (3, 4, 5-トリフルオロフェニル) ボロキシニン (TFPB) から成る群より選択される付記 10～17 のいずれか一項記載の検出方法。

(付記 19)

サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、(i) 一般式 (1) で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、(ii) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを光学的に検出する検出部を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサー。

(付記 20)

光学的な検出部が、少なくとも励起光源と検出素子とを含む付記 19 記載のサリチル酸メチルセンサー。

(付記 21)

サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、(i) 一般式 (1) で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、(ii) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを電気化学的に検出する検出部を少なくとも備えている、サリチル酸メチルセンサー。

(付記 22)

電気化学的な検出部が、ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルが形成する錯体の酸化により生じる電流を検出する電極を有する電気化学セルを含む付記 21 記載のサリチル酸メチルセンサー。

(付記 23)

サリチル酸メチルセンサーを農作物の近傍に設置し、該センサーによりサリチル酸メチルを検出することにより農作物の病原菌感染を検出する方法。

(付記 24)

センサーを農作物から 2 m 以内に設置する、付記 9 または付記 23 に記載の農作物の病原菌感染を検出する方法。

(付記 25)

サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式 (1) で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備え、該検出部が光学的及び／または電気化学的な検出素子とコンピュータを含むサリチル酸メチルセンサーにおいて、コンピュータに、

- i) 光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、
  - ii) 受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに
  - iii) 分析結果を出力する段階
- を実行させるプログラム。

[0076] この出願は、2020年1月27日に提出された日本出願特願2020-010620を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

[0077] 以上、実施形態及び実施例を参照して本願発明を説明したが、本願発明は上記実施形態及び実施例に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明の範囲内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

### 産業上の利用可能性

[0078] 本発明の実施形態によるホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物を植物ホルモンであるサリチル酸メチルを検出するレセプターに用いたセンシングは、サリチル酸メチルと選択的に錯体を形成し、且つ蛍光発光現象や電気化

学的挙動の変化を発現することから、植物が病原菌感染の際に放出する植物ホルモンであるサリチル酸メチルを選択的に検出することを可能とする。

[0079] そして、ホウ素-酸素結合を有する特定構造の化合物を認識部とするセンサーを用いることで、植物の病気感染を早期に検出することができ、具体的には農作物の病気感染を早期に検出できるセンサーとしてハウス等の施設園芸での農業ICT用の新たなセンサーとして利用することができる。

## 請求の範囲

[請求項1] サリチル酸メチルをセンシングする方法であり、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターとして下記一般式（1）で表される構造を有するホウ素-酸素化合物を用いるセンシング方法。

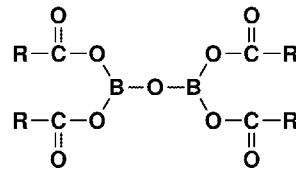
[化1]



(1)

[請求項2] 前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式（2）で表されるジボロキサン誘導体である請求項1記載のセンシング方法。

[化2]

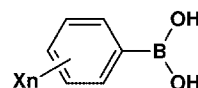


(2)

（式中、Rはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、またはフェニル基を表し、各Rはそれぞれ同じであっても、異なってもよい。）

[請求項3] 前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式（3）で表されるフェニルボロン酸誘導体である請求項1記載のセンシング方法。

[化3]



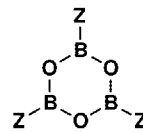
(3)

（式中、Xは水素原子、炭素数1～4のアルキル基、アルコキシ基、

メルカプト基、メルカプト置換アルキル基、またはメルカプト置換アルコキシ基を表し、 $n$ は1～5の整数を表し、 $n$ が2以上の場合、各 $X$ はそれぞれ同じであっても、異なってもよい。）

[請求項4] 前記センシング方法において、ホウ素-酸素化合物が下記一般式（4）で表されるボロキシニ誘導体である請求項1記載のセンシング方法。

[化4]



(4)

（式中、 $Z$ は炭素数1～4のアルキル基、または置換もしくは無置換のフェニル基を表し、各 $Z$ はそれぞれ同じであっても、異なってもよい。）

[請求項5] 前記センシングにおいて、サリチル酸メチルが前記ホウ素-酸素化合物と反応してホウ素錯体を形成することで蛍光発光する現象を利用する請求項1～4のいずれか一項記載のセンシング方法。

[請求項6] 前記センシングにおいて、前記ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルの反応により電気化学的挙動が変化する現象を利用する請求項1～4のいずれか一項記載のセンシング方法。

[請求項7] 前記センシングにおいて、前記ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルの反応により生じる電流値の変化を利用する請求項6記載のセンシング方法。

[請求項8] サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、  
 i) 一般式（1）で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、  
 ii) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部

を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサー。

[請求項9] 請求項8記載のサリチル酸メチルセンサーを農作物の近傍に設置し、該センサーによりサリチル酸メチルを検出することにより農作物の病原菌感染を検出する方法。

[請求項10] サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式(1)で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備え、該検出部が光学的及び／または電気化学的な検出素子とコンピュータを含むサリチル酸メチルセンサーであって、コンピュータに、

i) 光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、

i i) 受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに

i i i) 分析結果を出力する段階

を実行させるプログラムを有するサリチル酸メチルセンサー。

[請求項11] (i) 一般式(1)で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式(2)で表されるジボロキサン誘導体、一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式(4)で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、(i i) 錯体に励起光をあてる工程、(i i i) 錯体が発する蛍光を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法。

[請求項12] 励起波長として200~400nmの範囲内の波長を用いる請求項11記載の検出方法。

[請求項13] 検出された蛍光の強度をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程をさらに含む請求項11または12記載の検出方法。

- [請求項14] (i) 溶液中で一般式(1)で表される構造を有するホウ素-酸素化合物、一般式(2)で表されるジボロキサン誘導体、一般式(3)で表されるフェニルボロン酸誘導体、または一般式(4)で表されるボロキシン誘導体と、サリチル酸メチルとを反応させて錯体を形成する工程、(ii) 一定の電圧下で溶液に流れる電流を測定する工程、(iii) 錯体の形成により生じる電流値の変化を検出する工程を含む、サリチル酸メチルの検出方法。
- [請求項15] 電圧の値が1.6~2.2Vの範囲内である請求項14記載の検出方法。
- [請求項16] 溶液が、支持電解質として、テトラブチルアンモニウムテトラフルオロボラートを含む請求項14または15記載の検出方法。
- [請求項17] 検出された電流値の変化をあらかじめ決められた参照値と比較することにより、サリチル酸メチルの濃度を決定する工程をさらに含む請求項14~16のいずれか一項記載の検出方法。
- [請求項18] 一般式(1)で表される構造を有するホウ素-酸素化合物が、テトラアセトキシジボロキサン(TBO)、フェニルボロン酸(PB)、2,4,6-トリフェニルボロキシン酸(TPB)、および2,4,6-トリス(3,4,5-トリフルオロフェニル)ボロキシン(TFPB)から成る群より選択される請求項10~17のいずれか一項記載の検出方法。
- [請求項19] サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、(i) 一般式(1)で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、(ii) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを光学的に検出する検出部を少なくとも備えているサリチル酸メチルセンサー。
- [請求項20] 光学的な検出部が、少なくとも励起光源と検出素子とを含む請求項19記載のサリチル酸メチルセンサー。
- [請求項21] サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、(i) 一般式(1)で表される構造のホウ素-酸素化合物を有するサ

リチル酸メチルの認識部と、(i i) 該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを電気化学的に検出する検出部を少なくとも備えている、サリチル酸メチルセンサー。

[請求項22] 電気化学的な検出部が、ホウ素-酸素化合物とサリチル酸メチルが形成する錯体の酸化により生じる電流を検出する電極を有する電気化学セルを含む請求項21記載のサリチル酸メチルセンサー。

[請求項23] サリチル酸メチルセンサーを農作物の近傍に設置し、該センサーによりサリチル酸メチルを検出することにより農作物の病原菌感染を検出する方法。

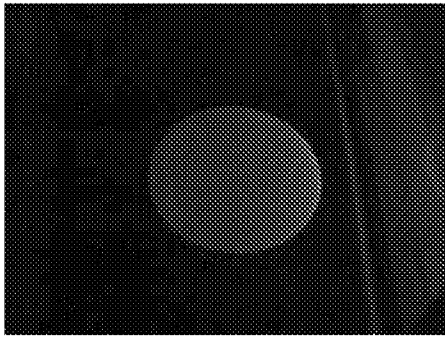
[請求項24] センサーを農作物から2 m以内に設置する、請求項9または請求項23に記載の農作物の病原菌感染を検出する方法。

[請求項25] サリチル酸メチルを検出するサリチル酸メチルセンサーであって、サリチル酸メチルを選択的に認識するレセプターである一般式(1)で表される特定構造のホウ素-酸素化合物を有するサリチル酸メチルの認識部と、該認識部にサリチル酸メチルが認識されたことを検出する検出部を少なくとも備え、該検出部が光学的及び／または電気化学的な検出素子とコンピュータを含むサリチル酸メチルセンサーにおいて、コンピュータに、

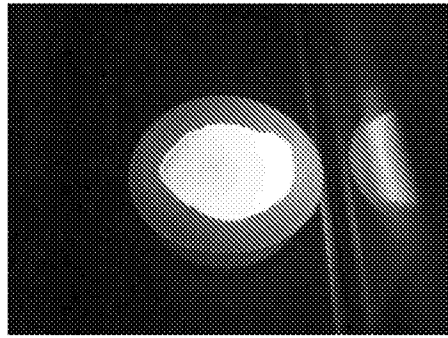
- i) 光学的及び／または電気化学的な検出素子からの信号を受信する段階、
- i i) 受信した信号を分析してサリチル酸メチルの有無及び／またはその濃度を決定する段階、並びに
- i i i) 分析結果を出力する段階

を実行させるプログラム。

[図1]

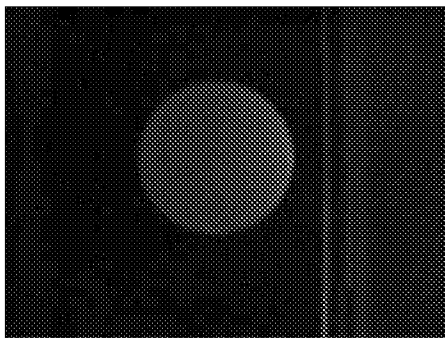


(a)

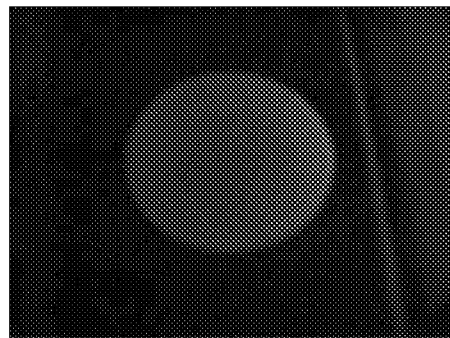


(b)

[図2]

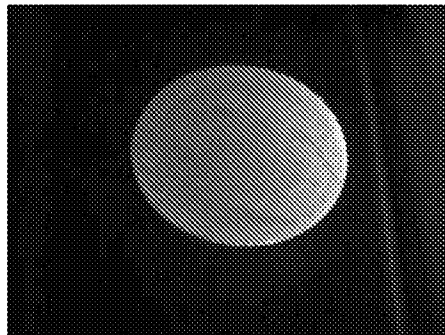


(a)

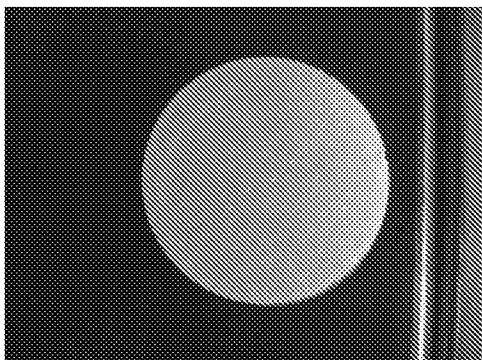


(b)

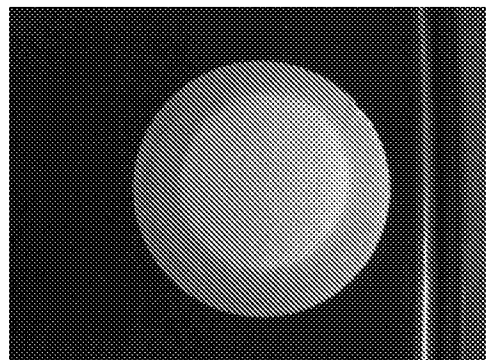
[図3]



[図4]

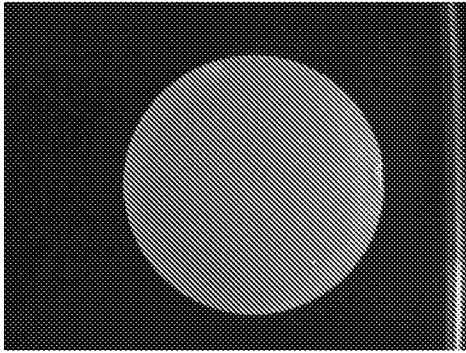


(a)

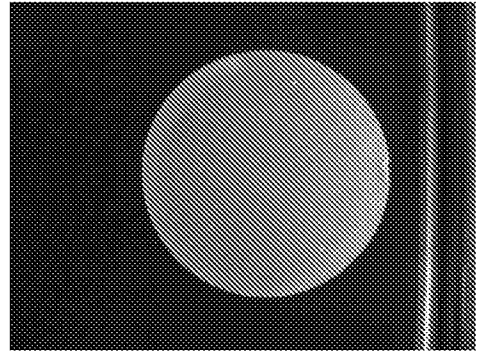


(b)

[図5]

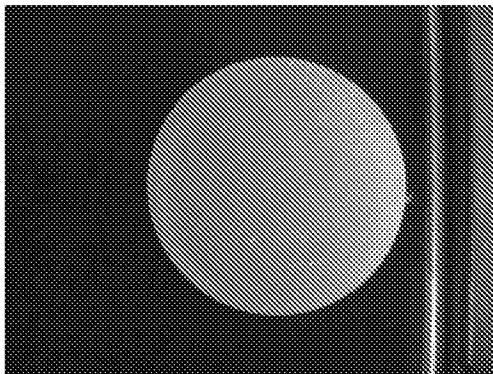


(a)

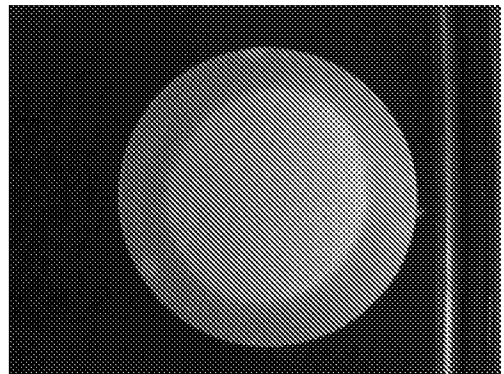


(b)

[図6]

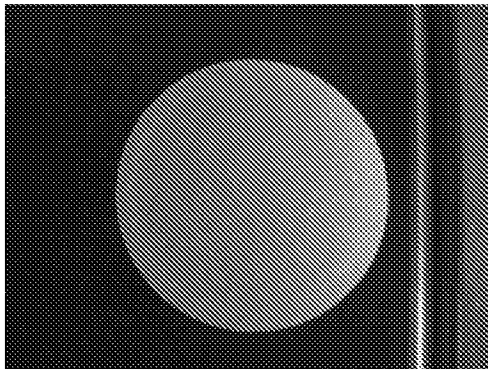


(a)

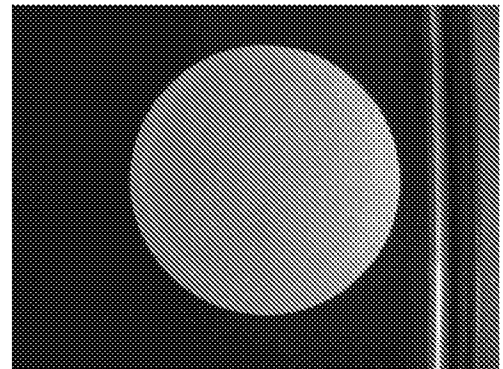


(b)

[図7]

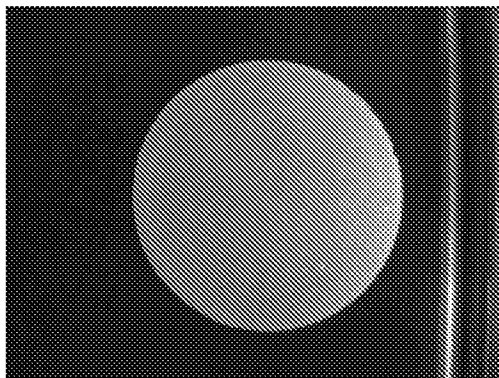


(a)

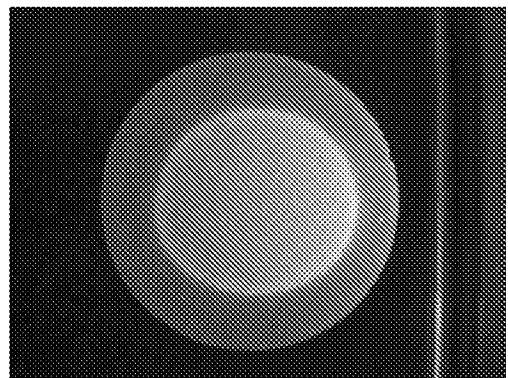


(b)

[図8]

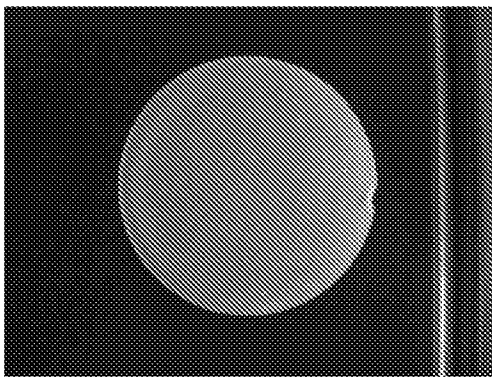


(a)

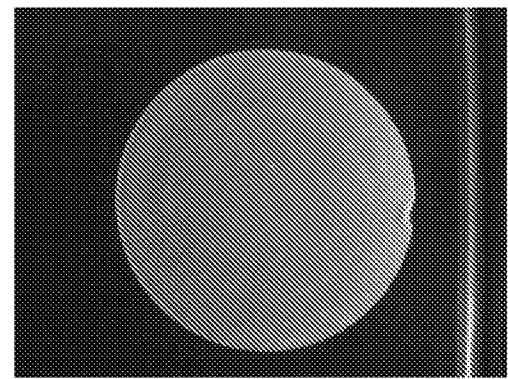


(b)

[図9]



(a)



(b)

[図10]

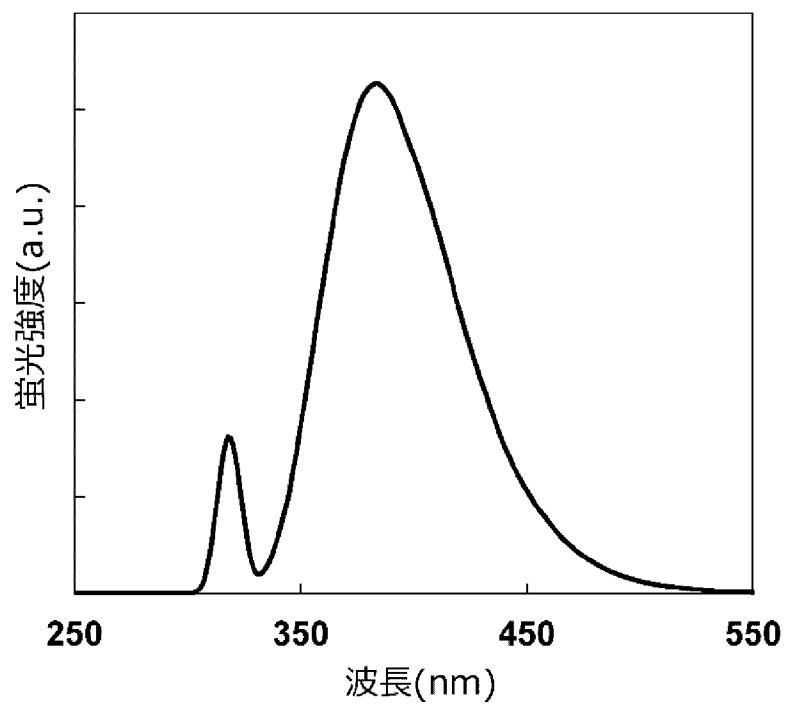


図10. TBO/MSA混合溶液の蛍光スペクトル

[図11]

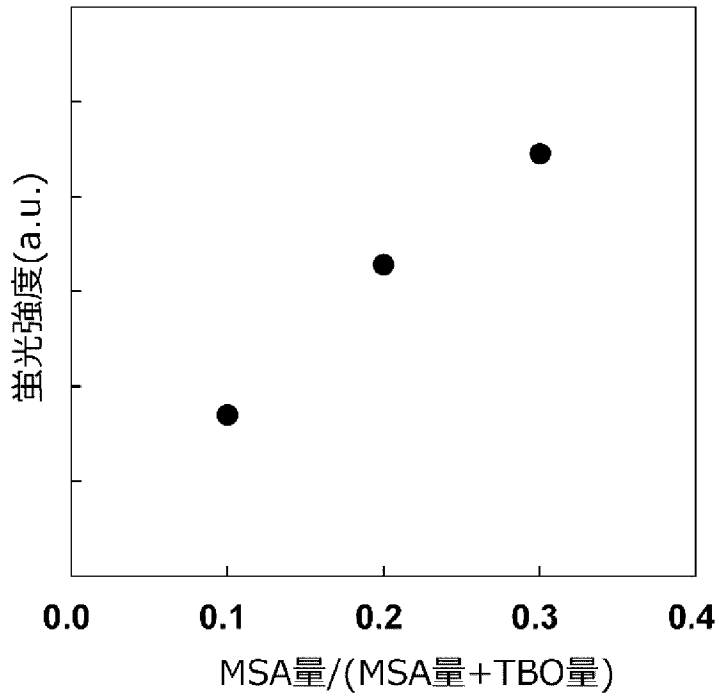
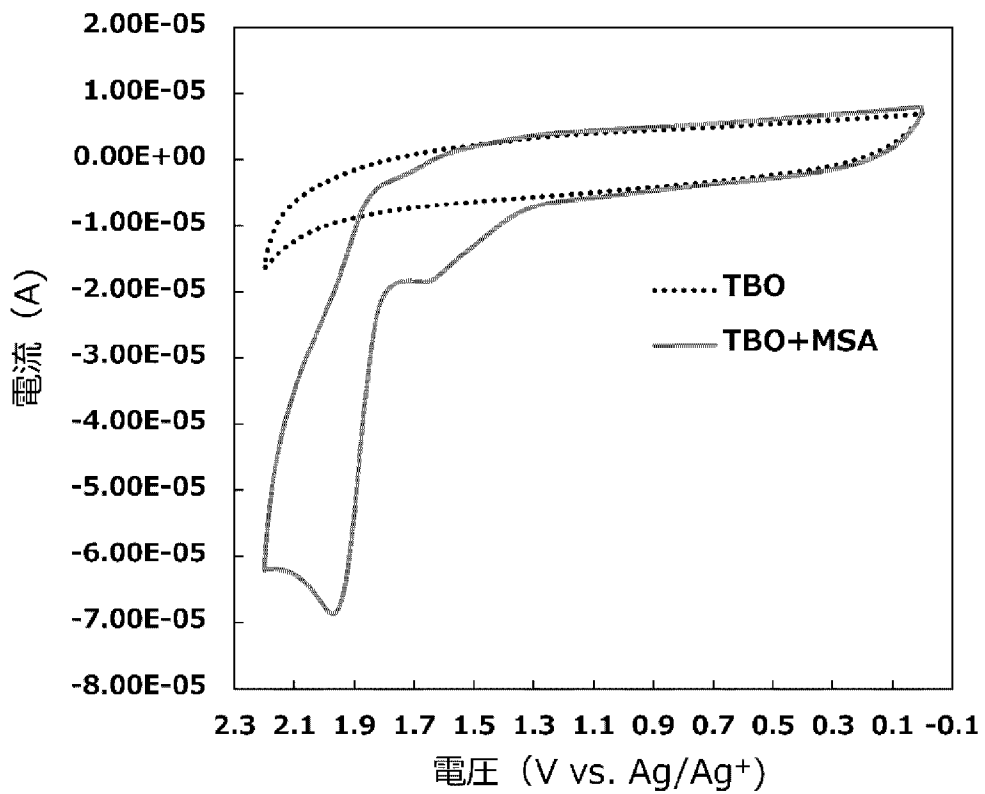
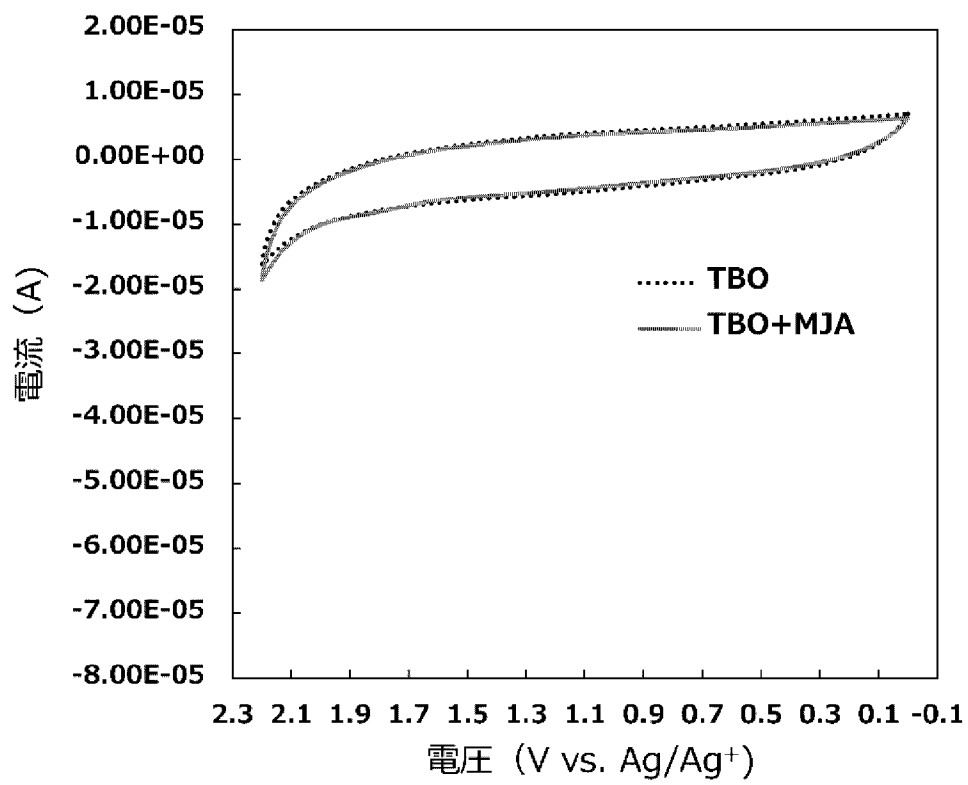


図 1 1 . MSAの比率と蛍光強度の関係

[図12]



[図13]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/002482

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 21/64(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i; G01N 27/48(2006.01)i  
 FI: G01N21/64 Z; G01N27/48 311; G01N27/416 336Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/62-21/83; G01N27/26-27/404; G01N27/414-27/416; G01N2742-27/46;  
 G01N33/48-33/98; B82Y30/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2018/0142277 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 24 May 2018 (2018-05-24)	1-25
A	WO 2018/122860 A1 (MINISTRY OF AGRICULTURE) 05 July 2018 (2018-07-05)	1-25
A	CN 100493212 C (HEFEI INST OF SUBSTANCE SCIENCES, C.A.S) 27 May 2009 (2009-05-27)	1-25
A	WO 2019/082942 A1 (UNIVERSITY OF TSUKUBA) 02 May 2019 (2019-05-02)	1-25
A	LI, Y. et al., "A reagent-assisted method in SERS detection of methyl salicylate", Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 31 January 2018, vol. 195, pp. 172-175, doi:10.1016/j.saa.2018.01.073, whole document	1-25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 25 March 2021 (25.03.2021)

Date of mailing of the international search report  
 06 April 2021 (06.04.2021)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japan Patent Office  
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
 Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2021/002482

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2018/0142277 A1	24 May 2018	US 2020/0115730 A1	
WO 2018/122860 A1	05 Jul. 2018	WO 2016/168585 A1	
CN 100493212 C	27 May 2009	(Family: none)	
WO 2019/082942 A1	02 May 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 21/64(2006.01)i; G01N 27/416(2006.01)i; G01N 27/48(2006.01)i FI: G01N21/64 Z; G01N27/48 311; G01N27/416 336Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） G01N21/62-21/83; G01N27/26-27/404; G01N27/414-27/416; G01N2742-27/46; G01N33/48-33/98; B82Y30/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2018/0142277 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 24.05.2018 (2018-05-24)	1-25
A	WO 2018/122860 A1 (MINISTRY OF AGRICULTURE) 05.07.2018 (2018-07-05)	1-25
A	CN 100493212 C (HEFEI INST OF SUBSTANCE SCIENCES, C.A.S) 27.05.2009 (2009-05-27)	1-25
A	WO 2019/082942 A1 (国立大学法人筑波大学) 02.05.2019 (2019-05-02)	1-25
A	LI, Y. et al., A reagent-assisted method in SERS detection of methyl salicylate, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018.01.31, Vol. 195, pp. 172-175, doi:10.1016/j.saa.2018.01.073 Whole document	1-25
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）		
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
25.03.2021	06.04.2021	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  赤木 貴則 2W 1763  電話番号 03-3581-1101 内線 3258	

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2021/002482

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2018/0142277	A1	24.05.2018	US	2020/0115730	A1	
				WO	2016/168585	A1	
WO	2018/122860	A1	05.07.2018	(ファミリーなし)			
CN	100493212	C	27.05.2009	(ファミリーなし)			
WO	2019/082942	A1	02.05.2019	(ファミリーなし)			