

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14105

研究課題名(和文) 自律駆動デバイスによる花粉管誘引アッセイ手法の確立と、新規花粉管誘引物質の探索

研究課題名(英文) Development of pollen tube attraction assay using autonomously operable microfluidic device and search for new pollen tube attractants

研究代表者

柳澤 直樹 (Yanagisawa, Naoki)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・学振特別研究員(PD)

研究者番号：20728282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生殖プロセスの要である花粉管誘引現象の解明は、農作物の生産量やバイオマス資源の増加に革新的な影響を与える可能性がある重要なテーマである。本研究では、自律駆動型マイクロ流体デバイスを開発し、研究者の操作を伴わずに誘引物質の活性を評価できる技術を開発を目指した。本研究を通じて、伸長する花粉管の先端部位に自動的に誘引物質を与えられる仕組みを確立し、誘引物質の勾配下において花粉管が伸長方向を変える様子をとらえることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉管は、胚珠が分泌する誘引物質の濃度勾配上を伸長することで卵細胞の位置を認識しており、花粉管誘引物質の同定は植物の生殖メカニズムを解明する上で必要不可欠である。誘引物質の活性判断には、花粉管の先端にサンプルを与え、伸長方向の変化から誘引現象を判断する方法が一般的に用いられる。しかしこの方法は、研究者の経験や技術に大いに依存しており、活性の有無を判断するために多大な時間を要する事が、主要な問題として挙げられていた。本研究成果と今後の最適化によって、花粉管に限らず先端成長する細胞(例えば神経細胞など)に対しても、自動で試薬を与え、その後の挙動を評価できるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of the pollen tube attraction phenomenon, which is the key to the reproductive process of plants, is an important theme that may have an innovative impact on the increase of crop production and biomass resources. In this research, we have developed an autonomously driven microfluidic device, and aimed to develop a technology that can evaluate the activity of a pollen tube attractant without manual operation. Through this study, we have established a mechanism that can automatically apply an attractant to the tip of a growing pollen tube, and succeeded in detecting the change in the pollen tube growth direction under the gradient of the attractant.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ流体デバイス 花粉管

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

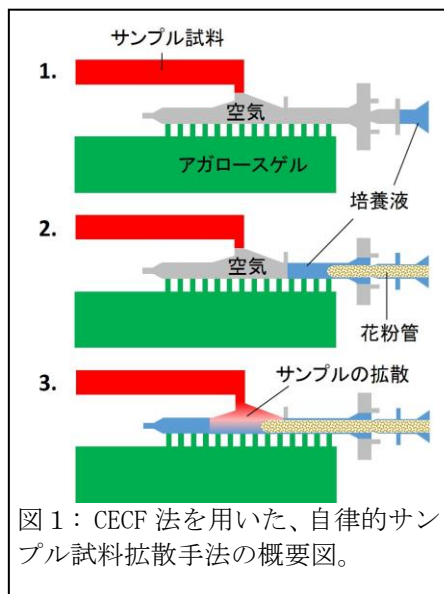
被子植物の受精過程において、受粉された花粉粒から伸長する花粉管細胞は、胚珠内の卵細胞へ精細胞を運ぶ役割を担う。花粉管を胚珠内に誘引する物質として「LURE ペプチド」が同定され (Okuda et al, *Nature*, 2009)、その誘引物質に対する受容体も報告された (Takeuchi et al, *Nature*, 2016; Wang et al, *Nature*, 2016)。花粉管誘引物質は他にも数多く存在する可能性が示唆されており (Higashiyama et al, *Annu. Rev. Plant Biol*, 2015)、植物の受精の仕組みの全貌を明らかにするには、未だ確認されていない花粉管誘引物質の同定が必要不可欠である。誘引物質の活性判断には、花粉管の先端にサンプルを与え、伸長方向の変化から誘引現象を判断する方法が一般的に用いられる。しかしこの方法は、研究者の経験や技術に大いに依存しており、活性の有無を判断するために多大な時間を要する事が、主要な問題として挙げられている。

2. 研究の目的

花粉管の誘引活性を評価するには、これまでに得られている実験的知見から、瞬間的に急な濃度勾配を花粉管先端部位に形成する事が重要であると示唆されている。本研究の目的は、花粉管誘引物質を自律的に花粉管先端へ与え、その活性を評価できるデバイスの開発である。

3. 研究の方法

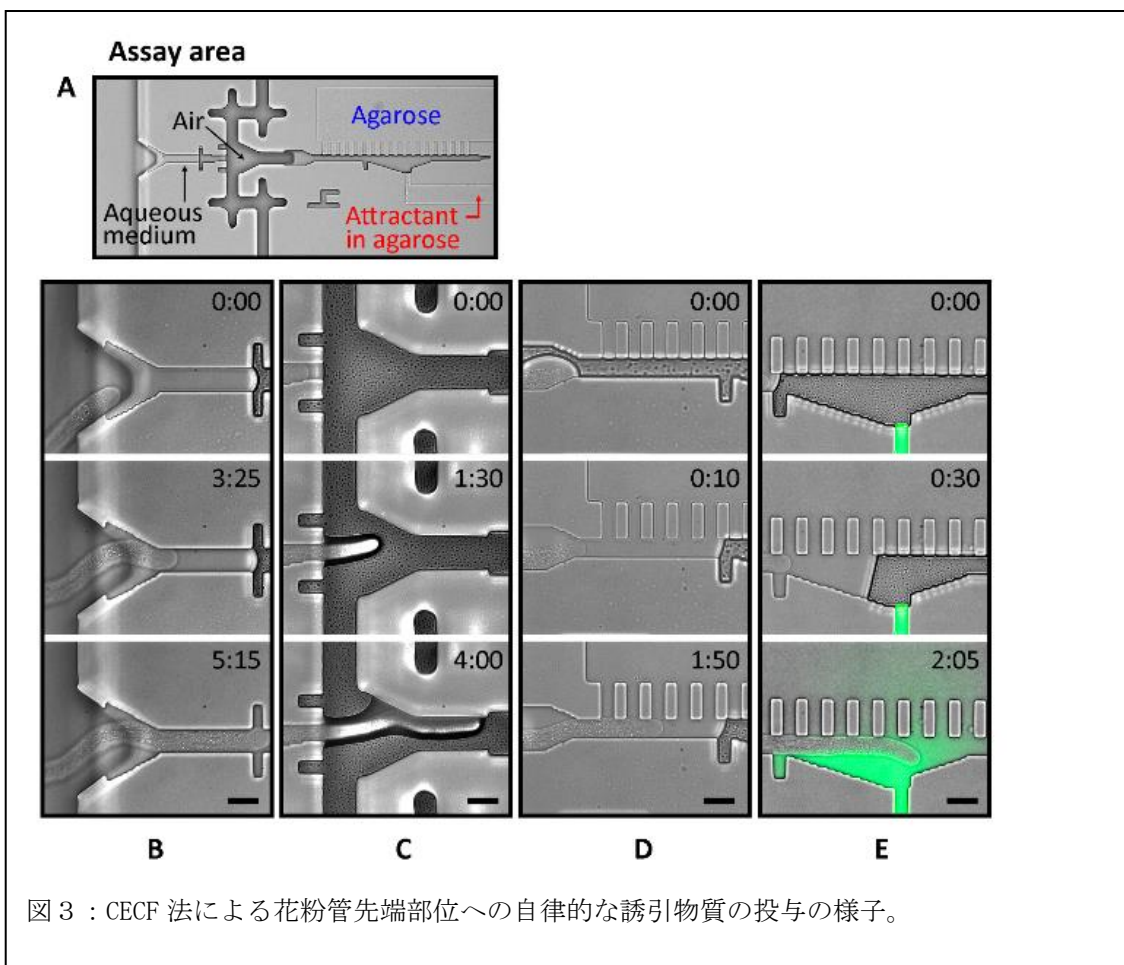
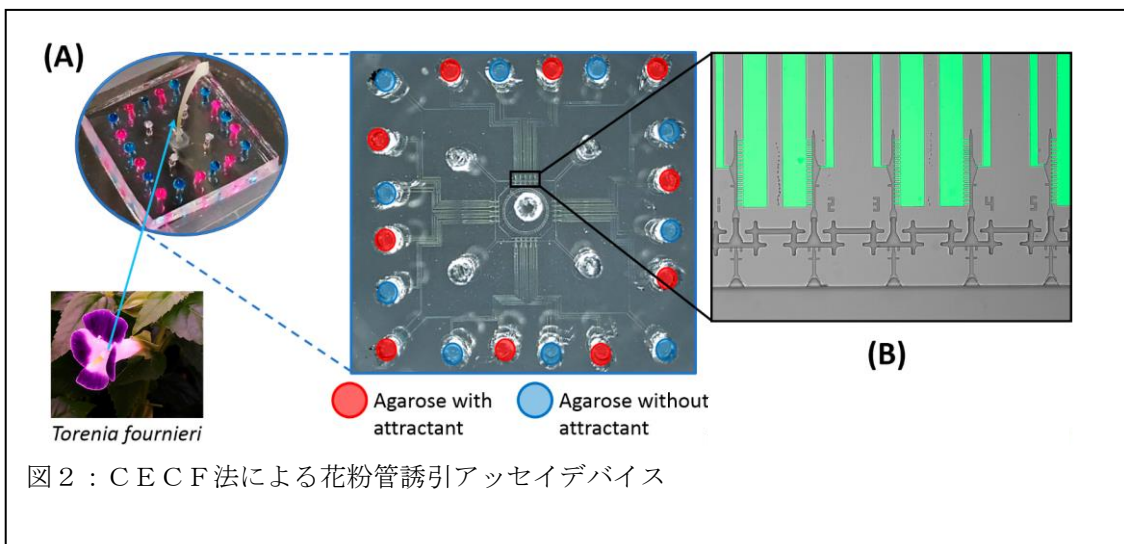
本研究をこれまでの研究を通じて独自に見出した、「細胞伸長を介した毛細管流動法、Cell Elongation-assisted Capillary-driven Flow (CECF) Method」を採用した。毛細管現象による流体の速度は、流路などの細い管の大きさに依存することから、流路の断面積を調節することで、流体の流れを制御することが可能である。CECF 法は、流路の断面積を広げることで液体の流れを停止させた状態を維持し、そこへ花粉管が伸長することによって液体を押し出し流れを引き起こす技術である。図1に示すようなマイクロ流路中に、サンプル試料、アガロースゲル、花粉管の培養液を予め注入しておくことで、後は花粉管の伸長のみで培養液の流体移動を制御し、その先端部位にサンプル試料を拡散させることが可能であると考えた。この手法を用いることで、個々の花粉管の先端部位に、誘引物質を自律的に拡散させる技術開発を目指した。



4. 研究成果

本研究ではPDMS (Poly-dimethylsiloxane)の基板上に流路を作製し、それをガラス板に接着させたマイクロデバイスを使用した (図2)。また、モデル植物として *T. fournieri* を用いた (図2A)。毛細管力による流速は、流路表面の親水性によって大きく左右される。本研究で使用するデバイスは、ガラスとPDMSから構成されており、それら表面の親水化はプラズマ処理によって調節した。また、流路の幅・高さによって、毛細管流の速度を調節することも可能である。これらのパラメータを最適化し、図1で示すような流体の流れを自律的に、そして再現性良く行える最適な流路を設計した。図3は、本研究で設計したマイクロ流路内に花粉管が伸長している様子を撮影したものである。図3Aにアッセイ領域の全体図を示しており、花粉管がこの領域の入り口を通り抜けると (B)、次に空気で満たされた流路内を液体を引きずりながら伸長する (C)。その後、細い流路に花粉管が進入した瞬間に、毛細管力によって液体が流れるが (C)、サイドの流路を設けることで、液体の流れが止まるようにした。最後に、花粉管がこのサイドの流路の位置に到達すると、液体が押され再び毛細管力によって液体が流れる。この時、液体が誘引物質に触れることで拡散し、花粉管の先端に濃度勾配が形成されることを確認した。花粉管が、濃度の高い方へ伸長方向を変える様子も捉えることに成功した。しかし、当初の計画では、誘引物質が含まれたサイドの流路へ花粉管が進入するか否かで誘引活性を判断する予定であったが、

誘引物質に反応しつつもサイドの流路へ入らない花粉管が多々確認された。そのため、誘引物質の濃度勾配下における花粉管の挙動を定量的に評価するという点においては、引き続き今後の課題として対応する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yanagisawa N and Higashiyama T	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantitative assessment of chemotropism in pollen tubes using microslit channel filters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 24113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5023718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yanagisawa N, Sugimoto N, Higashiyama T, and Sato Y	4. 巻 135
2. 論文標題 Development of microfluidic devices to study the elongation capability of tip-growing plant cells in extremely small spaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e57262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----