

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05287

研究課題名（和文）外部刺激に対する植物の力学的応答解析技術

研究課題名（英文）Method for analyzing dynamic response of plants to external stimulation

研究代表者

肥田 博隆（Hida, Hirotaka）

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60402509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：外部刺激に対する植物の応答の解明を目的とし、生育環境を制御しつつ、植物の成長挙動を連続的に解析可能なシステムの開発を行い、以下の結果を得た。(1)フォースセンサを有するマイクロ流体デバイスを開発し、胚軸の機械的性質、および重力屈性時に発生するモーメントの計測に成功した。(2)害虫（植物寄生性線虫）の感染により生じる根こぶ（根の変質）は、機械的ストレスにより発生が抑制可能であることが示唆された。(3)栄養素による濃度勾配に対し、イネの側根は高濃度側に向かい伸長することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、外部刺激に対する植物の応答の解明を目的とし、植物の成長挙動を連続的に解析可能なシステムを開発した。本手法は、従来は困難であった「生きたまま」の植物の硬さや成長時の発生力が評価可能であり、新たな観点から植物の成長メカニズムの解明に貢献する。また、植物の成長メカニズムの理解を通じ、将来的には農作物の生育技術の改善へと発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanisms of plant response to external stimulus including gravity, we have developed the analytical systems for continuously observing and analyzing the growth behavior of the growing plants. (1) By using the microfluidic device integrated with the micropillar-based force sensors, we successfully measured the mechanical properties of the growing sprouts. (2) The mechanical stress might inhibit the infection of the plant-parasitic nematodes to the plants. (3) We observed that the lateral roots of rice plants tended to elongate toward the high concentration region.

研究分野：バイオマイクロシステム

キーワード：マイクロ・ナノ科学 Micro TAS Plant-on-a-chip マイクロ・ナノデバイス バイオメカニクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、成長を持続するために、重力や光などの外部刺激に応答し、伸長方向や姿勢の制御など、成長挙動を変化させることが知られている。この現象は屈性と呼ばれ、例えば茎など地上部の器官は重力と逆方向に伸びる一方で（負の重力屈性）、地下部の器官である根は重力に沿って地中に伸びる（重力屈性）。植物は屈性により、成長に必要な光や水分、養分などの資源を効率良く得ていると考えられている。しかし、実際の生育環境では、地上部や土壌中の障害物による機械抵抗のため、植物の運動は制限される。機械抵抗を含む外部刺激に晒された環境で成長を持続するため、植物は消費エネルギーの最適化を図りつつ器官を成長させると推測されているが、その詳細な力学的メカニズムは不明な点が多い。この主な要因として、生育環境および外部刺激を制御したうえで、植物の成長挙動を連続的かつ定量的に分析するための効果的な手法が未確立であることが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、重力など外部刺激が作用した際の植物の成長挙動を力学的観点から理解することを目的として、地上の器官である胚軸、および地下の器官である根を解析対象とし、成長挙動および硬さや成長時に生じる推進力などの機械的特性を連続的に計測可能な分析システムの開発を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、MEMS (Micro electromechanical systems) 技術により作製したマイクロデバイスを応用し、植物学におけるモデル生物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、およびイネを解析対象として (1) 胚軸の重力屈性の力学的解析システムの開発 (2) 植物寄生性線虫の感染過程解析用マイクロ流体デバイスの開発 (3) マイクロ流体デバイスによる根の化学応答の解析を行った。

(1) 胚軸の重力屈性の力学的解析システムの開発：PDMS (poly-dimethylsiloxane) を材料とし、MEMS 技術であるソフトリソグラフィにより、微小流路の内部にフォースセンサとなるマイクロピラーを配置したマイクロ流体デバイスを作製した (図 1)。重力屈性により、胚軸の伸長方向が変化する過程で、胚軸の接触によりマイクロピラーが変形した際、ピラーの剛性、および先端変位量より、発生力の検出が可能となる。実験では、本デバイスを寒天培地上に貼付したのちにシロイヌナズナの種子を流路に導入し、暗所で生育することで胚軸を鉛直上向きに成長させた。一定量の伸長を確認した後、デバイスを面内で回転させ、胚軸の向きを水平方向とすることで、負の重力屈性により胚軸の伸長方向を水平方向から鉛直方向に変化させ、その際の成長挙動、およびピラーの変形量の計時変化を撮影した (図 2)。本研究では、胚軸を片持ち梁とみなした物理モデルを構築し、撮像結果をもとに発生力、および弾性率の推定を行った。

(2) 植物寄生性線虫の感染過程解析用マイクロ流体デバイスの開発：植物の害虫である植物寄生性線虫 (サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*)) の感染による根の肥大化 (根こぶ) の発生過程、および物理的拘束下における根こぶの形成プロセスを解明するためのマイクロ流体デバイスを開発した。本デバイスの流路内にはマイクロピラー (高さ 285  $\mu\text{m}$ , 円柱型：直径 100~200  $\mu\text{m}$ , 正四角柱型：一辺 100~200  $\mu\text{m}$ ) がアレイ化されており、根こぶは発生過程で一対のピラーにより圧迫され、機械ストレスを受ける (図 3)。このときの変化の様子を光学顕微鏡による観察、および根こぶの断面観察により、器官から細胞スケールでの解析を行った。

(3) 根の化学応答解析：イネを解析対象とし、化学刺激に対する根の化学応答を解析するためのマイクロ流体デバイスを開発した。本デバイスは、根の伸長方向を制御するガイドピラー、液体培地の導入・排出口、根の解析領域となるチャンバーから構成され、2 か所の導入口より異なる液体培地を送液することで、チャンバー内で異なる化学環境を局所的に形成できる (図 4)。実験では、発芽したイネの主根をデバイスに導入し、デバイスを水平面から 60° に傾け、液体培地を連続的に供給した。主根から側根の発生を確認した後、2 つの導入口に異なる濃度の培地を送

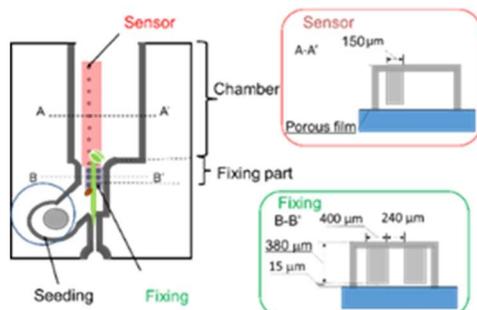


図 1 胚軸の発生力検出デバイス

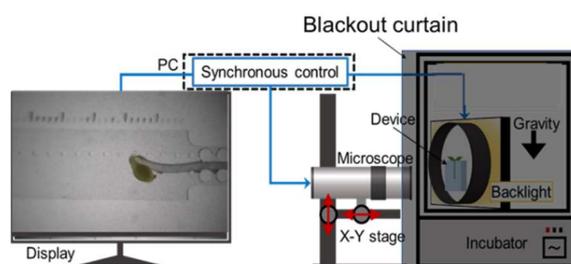


図 2 胚軸の重力屈性解析システム

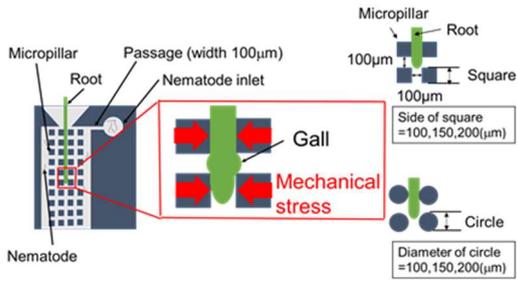


図 3 植物寄生性線虫の感染過程解析用マイクロ流体デバイス

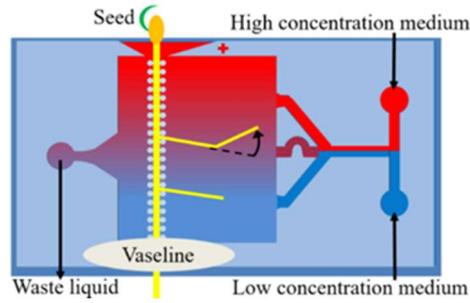


図 4 根の化学応答解析用マイクロ流体デバイス

液することで、拡散による濃度勾配をチャンバー内に形成し、根の伸長方向を経時的に測定することで、化学刺激に対する根の伸長挙動を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 胚軸の重力屈性の力学的解析システムの開発：本研究で開発した解析システムにより、光屈性の影響を除去し、胚軸の成長挙動を連続的に撮像することが可能となった。胚軸の形状、およびフォースセンサにより検出した力をもとに、重力屈性により生じるモーメントを算出したところ、 $4.38 \times 10^{-8} \text{ Nm} \sim 1.75 \times 10^{-7} \text{ Nm}$  となった。また、物理モデルをもとに算出したヤング率の値は  $1.86 \text{ MPa} \sim 20.6 \text{ MPa}$  となった。本手法により、成長を維持した状態で、胚軸の機械的性質、および重力屈性時に発生するモーメントを定量的に評価することが可能となった。

(2) 植物寄生性線虫の感染過程解析用マイクロ流体デバイスの開発：本デバイス上でシロイヌナズナにサツマイモネコブセンチュウを感染させ、光学顕微鏡で撮像した結果、マイクロピラーによる機械ストレスにより、無負荷時と比べ形成される根こぶの寸法が減少することを確認した（図 5）。また、機械的ストレスを与えた根こぶの切片の断面観察を行ったところ、サツマイモネコブセンチュウが繁殖の過程で引き起こす細胞の変質が抑制されていた。以上の結果より、根に対し、機械的ストレスを与えることで、サツマイモネコブセンチュウの感染の拡大を抑制する可能性が示唆された。

(3) 根の化学応答解析：本デバイス上で濃度の異なる培地（定量の 1/2, 1/25, 1/200 希釈）でイネを生育したところ、濃度の上昇に応じて側根の伸長速度の低下を確認した。一定の濃度の培地により生育した場合、側根は重力屈性に応じ、重力方向に伸長した。一方で、濃度の異なる 2 種類の培地（低濃度：1/200 希釈、高濃度：1/2 および 1/25 希釈）を導入し、チャンバー内に濃度勾配を形成した状態で生育した場合、濃度勾配の形成から 2 時間後に側根は高濃度側に向かって伸長方向を変化させることを確認した（図 6）。以上より、本手法により重力および化学に対する応答など、複合的な外部刺激に対する根の成長挙動を定量的に解析できることが明らかになった。今後は、本手法の応用により、植物の成長メカニズムの解明への貢献が期待される。

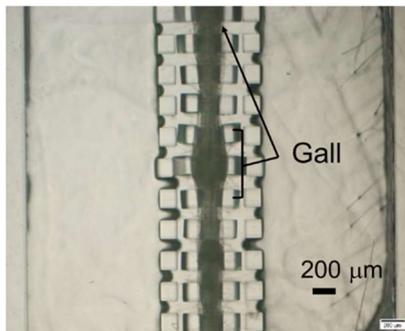


図 5 機械ストレスによる根こぶの成長の抑制

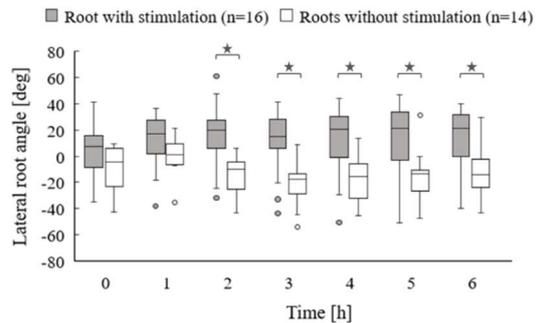


図 6 化学応答による根の伸長方向の変化

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 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hida Hiroataka, Ebara Rika, Hayashi Shumpei, Kanno Isaku, Furumizu Chihiro, Sawa Shinichiro         | 4. 巻<br>141             |
| 2. 論文標題<br>Method for Analyzing an Infection Process of Plant-parasitic Nematodes Using a Microfluidic Device | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines  | 6. 最初と最後の頁<br>141 ~ 146 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1541/ieejsmas.141.141  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Ueda Kazuki, Kweon Sang-Hyo, Hida Hiroataka, Mukouyama Yoshiharu, Kanno Isaku                         | 4. 巻<br>327                   |
| 2. 論文標題<br>Transparent piezoelectric thin-film devices: Pb(Zr, Ti)O <sub>3</sub> thin films on glass substrates | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Sensors and Actuators A: Physical   | 6. 最初と最後の頁<br>112786 ~ 112786 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.sna.2021.112786   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>樋口 岳, Beier Marcel, 藤田 知道, 藤原 徹, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>生体試料の硬さ計測を目的としたバルブ一体型マイクロ流体デバイスの開発            |
| 3. 学会等名<br>IIP2022 情報・知能・精密機器部門 (IIP部門) 講演会              |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>村田 裕紀, 澤 進一郎, 神野 伊策, 肥田 博隆              |
| 2. 発表標題<br>マイクロピラーによる機械的ストレスが植物寄生性線虫の感染過程に与える影響の解析 |
| 3. 学会等名<br>IIP2022 情報・知能・精密機器部門 (IIP部門) 講演会        |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>宮林 志保, 神野 伊策, 肥田 博隆      |
| 2. 発表標題<br>植物の姿勢制御に伴う発生力の計測手法       |
| 3. 学会等名<br>化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会 |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>乾 純也, 肥田 博隆, 神野 伊策, 河田 秀斗, Andres Maturana |
| 2. 発表標題<br>SU-8 製多孔質フィルムを用いた細胞の捕捉および培養観察              |
| 3. 学会等名<br>化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会                   |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>肥田 博隆  |
| 2. 発表標題<br>農業におけるMEMS   |
| 3. 学会等名<br>IIP2022 情報・知能・精密機器部門 (IIP部門) 講演会 MSD 部門・IIP部門 合同ワークショップ (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroataka Hida   |
| 2. 発表標題<br>Applications of Microfluidic device in Plant Biology                               |
| 3. 学会等名<br>5th International Conference on Emerging Electronics (IEEE-ICEE2020) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>安田 悠悟, 廣田 智, 荻野 千秋, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>酵母の単離と解析のためのマイクロ流体デバイスの開発        |
| 3. 学会等名<br>第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>肥田 博隆, 江原 りか, 神野 伊策, 古水 千尋, 澤 進一郎 |
| 2. 発表標題<br>植物寄生性線虫の感染プロセスの解析手法               |
| 3. 学会等名<br>第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム    |
| 4. 発表年<br>2020年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>福澤 滉平, 山崎 清志, Marcel Beier, 藤原 徹, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>イネの側根の屈性解析システムの開発                              |
| 3. 学会等名<br>第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム                 |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>林 駿平, Beier Marcel, 三輪 京子, 藤原 徹, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>栄養条件が根の機械的性質に及ぼす影響の解析                         |
| 3. 学会等名<br>第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム                           |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>佐古 隆太郎, 澤 進一郎, 古水 千尋, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>ポアメンブレンを用いた植物寄生性線虫の化学走性分析デバイス      |
| 3. 学会等名<br>第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム     |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hirotaka Hida   |
| 2. 発表標題<br>Plant-on-a-chip: Applications of microfluidics in plant biology                                   |
| 3. 学会等名<br>The 15th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered & Molecular Systems (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>林 駿平, Beier Marcel, 三輪 京子, 藤原 徹, 神野 伊策, 肥田 博隆 |
| 2. 発表標題<br>マイクロピラーとの接触解析による根の機械的性質の推定手法                  |
| 3. 学会等名<br>日本機械学会2020年度年次大会                              |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤原徹, Marcel BEIER, 肥田博隆                                    |
| 2. 発表標題<br>植物の根の力学特性と成長に関する基礎的研究 その 1 マイクロピラーを用いたシロイヌナズナの根の力学特性推定法の開発 |
| 3. 学会等名<br>2020年度日本建築学会大会学術講演会・建築デザイン発表会                              |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>肥田博隆, 江原りか, 神野伊策, 古水千尋, 澤進一郎 |
| 2. 発表標題<br>機械的ストレスが植物寄生性線虫の感染に与える影響の解析  |
| 3. 学会等名<br>令和2年度センサ・マイクロマシン部門 総合研究会     |
| 4. 発表年<br>2020年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>H. Hida, S. Miyabayashi, I. Kanno   |
| 2. 発表標題<br>ON-CHIP METHOD FOR CHARACTERIZING DYNAMIC RESPONSES TO GRAVITY IN GROWING PLANTS  |
| 3. 学会等名<br>2022 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint International Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE2022) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀江智貴, 神野伊策, 肥田博隆               |
| 2. 発表標題<br>機械的抵抗下での根の伸長挙動のオンチップ解析手法       |
| 3. 学会等名<br>化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会(2022) |
| 4. 発表年<br>2022年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>根本慎司, 山崎清志, Marcel Beier, 藤原徹, 神野伊策, 肥田博隆 |
| 2. 発表標題<br>マイクロ流体デバイスを用いたイネの側根の栄養屈性解析                |
| 3. 学会等名<br>化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会(2022)            |
| 4. 発表年<br>2022年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroataka Hida   |
| 2. 発表標題<br>PLANT-ON-A-CHIP TECHNOLOGIES AND ITS APPLICATIONS  |
| 3. 学会等名<br>The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems(Transducers 2023) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|