

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650075

研究課題名(和文) マイクロ流路を用いた花粉管間相互作用の定量解析

研究課題名(英文) The analysis of interaction between pollen tubes by microchannel device

研究代表者

佐藤 良勝 (SATO, Yoshikatsu)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・講師

研究者番号：30414014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：花粉管ガイダンスは、雄性配偶体である花粉管を雌性配偶体へ的確に導く受精に重要な機構の一つである。近年、誘引物質が同定されるなど分子レベルの解析が進められているが、雌性配偶体に進入する花粉管数が1本に制限される仕組みはよく分かっていない。本研究課題では微細加工技術を駆使してマイクロ流路を作製し、ライブイメージングにより花粉管間における相互作用について調べた。その結果、花粉管同士がかるうじてすれ違うことのできる流路幅においても、顕著な相互作用は認められなかった。花粉管間の相互作用の解析には、二光子顕微鏡を駆使してin vivoにおけるライブイメージングから忌避反応を捉える必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pollen tube guidance is one of the key processes for plant reproduction. Recently, molecular characters have been identified such as attractant molecules. However, it remains to be elucidated that only one of many pollen tubes enters each ovule. The repellent effect by the interaction between pollen tubes is assumed, although not substantiated. We employed nano-technology based on photolithographic approach to make microfluidic devices for cell culture and live imaging. In the result, no apparent interaction between pollen tubes was detected in the microchannel. We need to observe pollen tube behaviors in vivo using two-photon microscopy.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：花粉管ガイダンス マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

植物の生殖過程で花粉管が雌組織に導かれる花粉管ガイダンスは、近年誘引物質が同定されるなど分子レベルでの理解が深まってきた。また、誘引物質を放出する助細胞は2個あり、雌性配偶体は2本の花粉管を誘引出来る能力を持つが、通常1つの雌組織に対して受精できる花粉管は1本のみであり、2本目の花粉管を誘引するのは1本目の花粉管による受精が失敗したときだけであることも明らかになった。この現象は、動物の受精における多精拒否機構を想像させるが、その分子機構は不明である。1つの仮説として、花粉管間の反発的な相互作用機構の存在が考えられてきたが実証された例はない。花粉管間の相互作用については、複雑な雌組織内を二光子顕微鏡により *in vivo* イメージングから探る一方で、*in vitro* における実験基盤の開発が必須な状況にあった。

2. 研究の目的

本研究では、先ずトレニアの花粉管1対1での解析が可能な実験基盤を、微細加工技術によるマイクロ流路を作製し、流路中を伸長する花粉管の伸長端同士を極めて近距離に近づける実験系を開発する。次に花粉管が互いの伸長方向を変え衝突を回避するかどうかをライブイメージング技術を駆使して観察し、複数の花粉管が同じ雌組織に向かわない機構への花粉管間相互作用の関与を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) マイクロ流路の設計・製作

花粉管衝突実験に使用するマイクロ流路の設計を行った。流路幅は花粉が容易にはすれ違うことのできない幅(8 μm)から、互いに容易にすれ違うことのできる幅(20 μm)に設計し、流路の上下幅は花粉管が上下に重ならないで幅(10 μm)に設計した。マイクロ流路作製に関しては、微細加工技術の一つであるフォトリソグラフィを適用した。ネガティブ型感光性材料であるSU-8を用いて基板上にマイクロ流路が描かれた微細パターンを作製し、これを鋳型としてシリコンゴムであるポリジメチルシラキサン(PDMS)に転写した。これをガラス底ディッシュに押しつけてマイクロ流路として用いた。マイクロ流路作製における鋳型となる基板作製は研究分担者である新田が行い、マイクロ流路の設計、および、PDMSへの転写によるマイクロ流路作製は研究代表者である佐藤が行った。

2) タイムラプス観察

マイクロ流路の両端にポンチ穴を開け、花柱挿入口を作り、受粉した花柱を差し込んだ。発芽した花粉管は花柱を通り抜けマイクロ流路上を伸長する。実験はマイクロ流路内を伸長する花粉管について、インターバル時間3秒のタイムラプス観察を行った。本過程は

研究代表者である佐藤が行った。

4. 研究成果

1) マイクロ流路の設計・製作・評価

先ず、花粉管の横幅を考慮して流路幅8, 12, 16, 20 μmのマイクロ流路1を作製した(図1)。

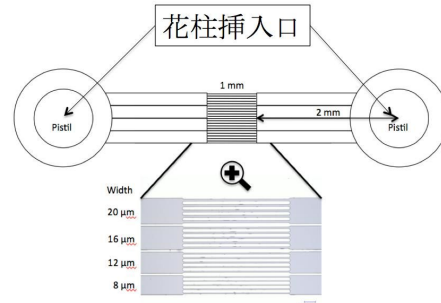


図1. 花粉管衝突実験用マイクロ流路1

マイクロ流路1は、花粉管衝突領域が中央の1つしかないため、花粉管がすれ違う瞬間を捉えることは極めて困難であった。そこで両端の花柱挿入口からサーキット状にマイクロ流路の設計を改良し、1つのマイクロ流路デバイスで3つ花粉管衝突領域が形成されるマイクロ流路2を設計し、この作製に成功した(図2)。

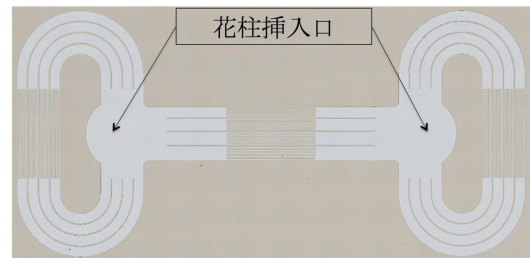


図2. 花粉管衝突実験用マイクロ流路2

また、マイクロ流路1による花粉管の衝突および回避は、異なる花柱から発した花粉管しか観察することができないが、マイクロ流路2では、同じ花柱から発した花粉管同士の様子を見ることができ、マイクロ流路1よりも *in vivo* でおきている状態に近いと考えられる。さらに、花粉管相互作用が同種の花由来であれば通る花柱には依存しない場合には、異種の植物の花粉管間の相互作用の解析にも発展できると考え、本研究ではマイクロ流路2を用いることにした。

2) 花粉管のタイムラプス観察

めしめ柱頭に受粉した花粉は約5~6時間後に花柱を通り抜け、マイクロ流路内を伸長しはじめることが分かった。さらに、流路幅を狭めた花粉管衝突領域に達するまでに約10~15時間を要することがわかったため、タイムラプス観察は受粉後10時間後から開始した。一方、花粉管の伸長速度は約50 μmであることから、花粉管がすれ違う瞬間はわずか数十秒程度のイベントであった。この瞬間を捉えることは容易ではなく、秒単

位の時間分解能を要したため、インターバル3秒の定点観察を行った。その結果、花粉管のすれ違う様子を捉えることに成功した(図3)。この際、2本の花粉管は伸長速度を変えことなく一定速度で伸長しすれ違うことが分かった。さらに、花粉管同士が互いに避けることなく伸長し、衝突する例も見られた(図4)。これらのことから、花粉管同士による顕著な衝突を回避する反応は認められなかった。本解析においては、対向して伸長する花粉管間の動態のみを観察したため、互いの接近する早さに忌避反応が追いつかない可能性も考えられる。同方向に伸長する花粉管の伸長端を近接させる必要があったが、技術的に困難であった。

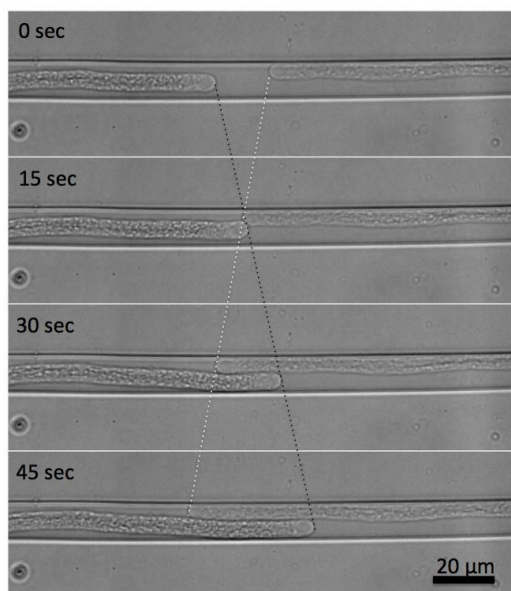


図3. 一定速度ですれ違う花粉管の様子

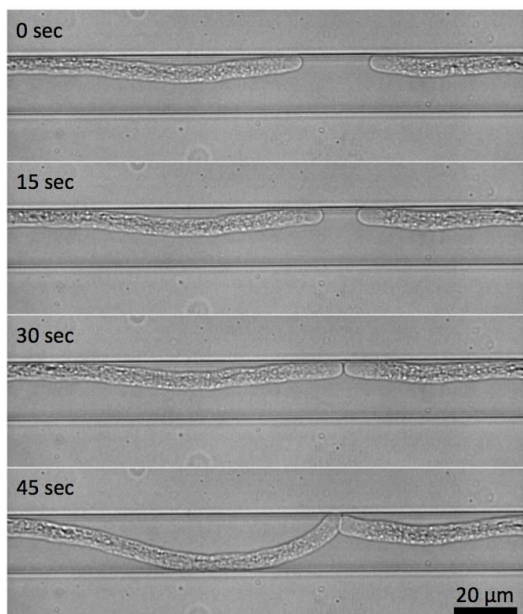


図4. 花粉管衝突の様子

以上の結果から、トレニア花粉管間においては忌避的な相互作用はもたない可能性が示

唆された。つまり、複数の花粉管が雌性配偶体に進入しない機構は雌組織側による制御が働いている可能性が考えられる。今後花粉管ガイダンスの解析には、二光子顕微鏡を駆使した *in vivo* イメージングによる解析とマイクロ流路を基盤とした *in vitro* イメージングを組み合わせる必要があると考えられる。*In vivo* イメージングから忌避反応を捉え、その情報をもとに雌組織が放出するであろう忌避物質候補を分子生物学により推定する。その物質が鍵因子であるかどうかを検証する際にこそ、マイクロ流路は特に有用性を発揮すると考えられる。マイクロ流路をベースとした実験系は、組織内の複雑な3次元空間を2次元で解析することができるイメージング上の利点の他、反応に必要な分子を用いて再現できる点に大きな特徴をもつからである。

最後に、マイクロ流路を中心とした微細加工技術は、花粉管ガイダンスだけでなく植物分野では胚発生や根の屈性研究、動物分野では走化性研究など、様々な生命科学研究に応用できると考えられる。しかし、まだまだ生命科学系研究者が日常的に利用できる程には微細加工技術は取り入れられていない。今後、本研究を進展させることにより、微細加工技術の生命科学分野への普及に努めたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Horade M, Yanagisawa N, Mizuta Y, Higashiyama T, Arata H. Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device. *Microelectronic Engineering* 査読有 118, 2012, 25-28

〔学会発表〕(計1件)

佐藤良勝、洞出光洋、水多陽子、加地範匡、東山哲也、新田英之 植物生殖プロセスにおける花粉管ガイダンスのオンチップ定量解析 日本分析化学会第62年会 2013年9月12日 東大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 良勝 (SATO, Yoshikatsu)
名古屋大学トランスフォーマティブ生命
分子研究所・特任講師
研究者番号：30414014

(2) 研究分担者

新田 英之 (ARATA, Hideyuki)
名古屋大学理学研究科・特任講師
研究者番号：00582446

(3) 連携研究者

()

研究者番号：