

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760101

研究課題名(和文)植物細胞を利用した微細加工技術の確立と応用に関する研究

研究課題名(英文)Study on micro fabrication technology use of plant material

研究代表者

洞出 光洋(Horade, Mitsuhiro)

大阪大学・基礎工学研究科・特任助教

研究者番号：30583116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生物学の知見、特に植物の持つ生殖メカニズムに着目し、生体由来の植物細胞を材料の一種として利用する微細加工技術の確立を目指していく。花粉管のような微小でシステム化された組織を材料として利用するボトムアップの手法を確立することにより、低コストでナノスケール精度を実現するマイクロ・ナノデバイスの開発技術に繋げることが目的です。花粉管は直径数 μm 、長さ数 mm にも及ぶ、特殊な材料とみなせます。特に、容易なスケールダウン化、高アスペクト比・三次元・任意形状の製作技術は、微細加工学において非常に重要な高い技術であるため、これらの技術へ直結可能な技術確立を目指した。

研究成果の概要(英文)：In this research, novel micro fabrication technology is established based on knowledge of the biology. Especially, reproduction mechanism of plant focused, the plant cells are used as a type of material. Since plant cells such as pollen tube are miniaturized and systematized, these cells are build from bottom-up method. And this technology are utilized for development of micro- nano-devices. In the field of micro- nano- fabrication, fabrication of high aspect ratio, fabrication of three-dimensional structure, fabrication of structure with arbitrary shape and realization of high accuracy at low cost are important items. Therefore, element technology are established for realization of these items.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロマシン ナノマシン 精密部品加工 生体機能利用 細胞操作

1. 研究開始当初の背景

微細加工技術はマイクロ・ナノデバイス開発に不可欠な技術であり、デバイスを用いた様々な分野への応用研究も盛んに行われている。また、近年ではマイクロからナノへのスケールダウンの動きが顕著であり、低コストでのデバイス開発も要求されている。しかしナノスケールでの加工精度の実現にはどうしてもコストがかかるという問題が生じる。このような背景のなか、低コストでスケールダウンを実現する手法として、生体由来の個々の細胞をボトムアップの方式で構造体として構築していく技術に着目した。

マイクロ・ナノマシーニング技術と植物科学との融合研究を行っている過程で、植物細胞の知見が多く得られてきた。特に興味深い知見の1つに花粉があげられる。花粉はめしべに受粉後、直径数 μm の花粉管を数十から1万倍近い距離を伸び続ける。さらに、花粉管の先端は、やがて胚珠からのシグナルを受け到達する(図1参照)。よって、花粉管の特徴として、

直径数 μm 、長さ数mmを有している

その軌跡は胚珠に向かう

上記の2つが挙げられる。この花粉管の特徴を活かし、微細加工の材料、あるいはパーツの母型とすることができれば、新規微細加工技術に繋がるのではないかと考えた。

本研究課題では、植物を対象とした知見を利用することで、容易に線幅数 μm のパターニングが可能になると考えた。また、花粉管の誘引物質が同定されていることから、誘引物質を用いることで任意の形状に花粉管を形成することも可能である。花粉管のパターニングに必要な材料は花だけで安価であり、個体差を利用することでより微細な線幅のパターニングにも期待できる。本研究を通じて、これまでに達成困難であったマイクロ・ナノデバイスの実現への足がかりをつかみたい。

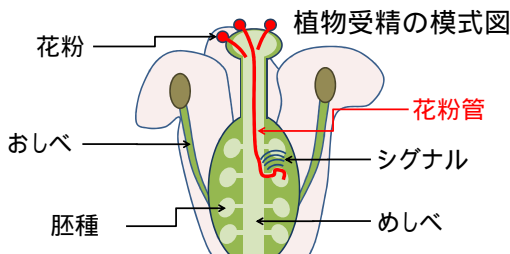


図1 植物受精の模式図

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、植物細胞を材料の一種として用いて、新規微細加工技術の確立を目指すことである。さらに、微細加工において要求度の高い、広域な材料選択、容易なスケールダウン化、高アスペクト比・三次元・任意形状の微細構造体の製作、これらの項目

の実現、および実現のための足がかりをつかむこととした。具体的な研究目的として、以下の4項目を挙げる。

花粉管を利用した金属材料のパターニング方法についての検討

高アスペクト比・三次元微細構造体等のマイクロ・ナノデバイス構成部品に要求される微細パーツ製作に必要な知見の所得

ナノスケールオーダーの加工をめざし、パターニングのスケールダウン化についての検討

花粉管誘引物質を利用した任意形状のパターニング方法について検討

3. 研究の方法

上記研究目的で挙げた、4つの項目を目指していく。

まず、植物細胞を用いた微細パターニングを行う上で、最も重要な項目の1つである、花粉管細胞の単離、挙動確認、アッセイデバイスの最適化を重点的に行う。シリコン樹脂の一種PDMSで製作したマイクロ流体デバイス内に、培地を満たし、花粉管の伸長を定量的に調査する。花粉管が壊死、あるいは伸長しなくなる等の条件、および最適線幅等を調査することで、加工限界や加工精度の知見を得ることが具体的な目的である。さらに、パターニングのスケールダウン化についての知見も合わせて取得することが目的である。花粉管の伸長を定量的に調査する目的で、下記のようなマイクロ流体デバイスを製作した。マイクロチャネルを利用し花粉管の単離、伸長の制御を行う。

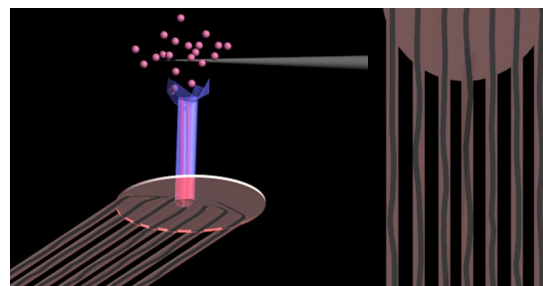


図2 マイクロ流体デバイスを用いたアッセイ系

次に、マイクロ流路内に異なる本数の花粉管が通せるかどうかということ进行调查する。密度分布を実現することができれば、三次元微細構造体製作に直結する知見が得られると考えている。

第3に、金属パターニングについて検討する。花粉管のパターニングと金属薄膜の形成を組み合わせることで、金属パターニングの足がかりをつかむ。金属パターニングが可能になれば、一般的に微細加工で用いられる半導体プロセスのようなことが可能になるため、材料選択制の拡大、ウェット/ドライエ

ッチング技術との組み合わせによる三次元加工や、高アスペクト比加工が大いに期待できる。

最後に、任意パターニングについての検討を行う。通常の微細加工では、任意の形状を得るために、フォトリソグラフィ工程の半導体マスクや、EB描画のような走査が必要となる。形状の自由度や、今後の応用を考える上で、任意の形状にパターニング可能か否かが重要なポイントである。そこで、マイクロ流体デバイスと、誘引物質との組合せにより、花粉管の伸長方向の制御が可能かどうかを調査する。

図3に示すような、花粉管を単離できる箇所と、誘引物質(ここではLUREを用いる)を添加できるマイクロチャンバを備えるマイクロ流体デバイスを製作。誘引物質により伸長方向が制御できるのかどうかを確認する。

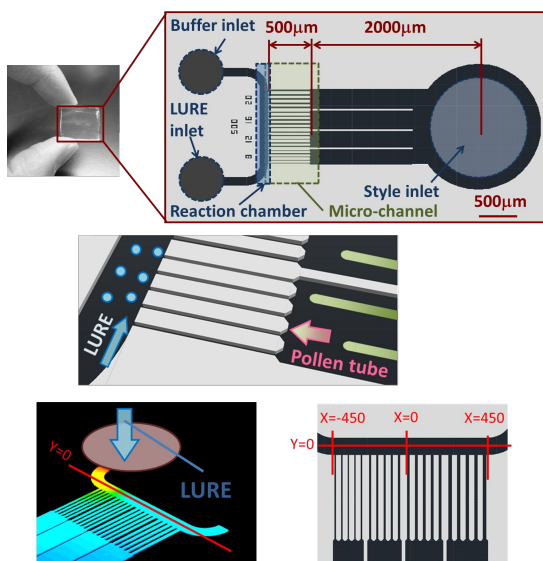


図3 花粉管伸長方向制御調査デバイス

4. 研究成果

(1) アッセイデバイスの最適化

流路の高さ・幅を様々なパラメータで製作し、流路の伸長に関する知見を得ることができた。まず表1は高さに関する知見である。結果として、スリット高さ $5\mu\text{m}$ 以下では花粉管が入らない スリット高さ $5\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ では交差することがない スリット高さ $12\mu\text{m}$ 以上では花粉管が交差した。スリット高さ $5\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ の流路デバイスを用いれば、通常の半導体プロセス等で行う、スピコートによる膜厚を均一にさせ、その後リソグラフィ技術によってレジストをパターニングする工程と同じことが可能になったといえる。また、表面凹凸のような3次元構造を製作したい場合は、スリット高さ $12\mu\text{m}$ 以

上とし、花粉管を交差させるようにすることで実現できることがわかった。

表1 流路高さとの伸長の関係

Height (μm)	Pollen tube condition
<5	No entry
5~12	No cross
12<	Cross

上記以外の知見として、スリットや狭所流路内で伸長させたところ、壁面との接触により伸長速度が抑制されたが、花粉管が壊死することはなかった。また、伸長速度の測定や挙動を合わせて計測し、最適パターニング条件の提示が行えた。また、上下方向への蛇行を抑制しつつ、細胞同士が交差する最適スリットサイズの提示を行えたため、1次元方向のみのパターニングだけでなく、2次元方向へのパターニングを可能にした。植物細胞を使って、数ミクロンスケールでかつ高さ $10\mu\text{m}$ 程度を有する、厚膜レジストパターニングと同等の技術確立を達成することができた。

(2) 密度分布の生成

また、同様に流路の幅も、様々な条件下で検討した。表2は幅に関する知見である。結果として、流路幅 $6\mu\text{m}$ 以下では花粉管が入らない 流路幅 $6\mu\text{m} \sim 12\mu\text{m}$ では流路内に1本しか侵入しない 流路幅 $12\mu\text{m}$ 以上では複数本の花粉管が侵入した。すなわち、流路幅を制御することで、花粉管の密度分布を制御することが確認できた。1本しか侵入しない領域、複数本侵入している領域を形成することができるため、花粉管を材料として見た場合、高さの異なる三次元微細構造体が形成しているといえる。また、花粉管の直径は個体差があるもののおおよそ約 $10\mu\text{m}$ である。流路幅 $12\mu\text{m}$ の場合は、左右に蛇行するような状態であった。一方、流路幅 $6\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の場合は、花粉管が流路の幅に変形するような形で流路内を伸長していた(図4)。すなわち、流路幅を制御することで、実際の花粉管の直径・幅よりもスケールダウンした状態で花粉管をパターニング可能であることがわかった。

表2 流路幅と伸長の関係

Width (μm)	Number of pollen tube
<6	No entry
6~12	1
12<	>2

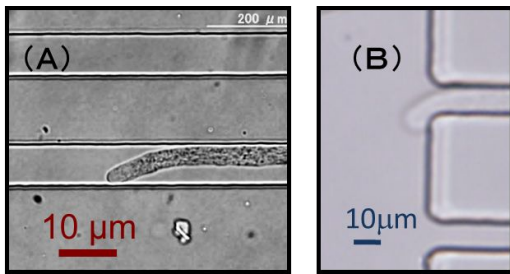


図4 流路内伸長結果 (A)流路幅12 μm時は花粉管が蛇行しながら伸長する (B)流路幅10 μm時は、流路内で押しつぶされているような形で伸長する

(3) 金属パターニングについての検討

花粉管のパターニングと金属薄膜の形成を組み合わせることで、金属パターニングの足がかりをつかむ。花粉管をパターニングした後、PDMSデバイスを取り外し、スパッタリングにより金属膜を成膜した。その後花粉管を物理的に取り除くことにより、花粉管以外の箇所に金属膜がパターニングされていることを確認した。フォトリソグラフィと金属成膜とで組み合わせる、リフトオフ法と同等の手法でパターニングが可能であることが確認された。

当初は、花粉管をホースのように扱い、内部に金属溶液を流す手法を検討していたが、リフトオフがより容易な手法であり、また成功していたことからこの手法を採用した。

(4) 任意パターニングについての検討

加工技術を確認するためには、目標形状通りの設計を行う技術が必要となる。本研究では、花粉管誘引物質と同一されたLUREと呼ばれるタンパク質に着目した。花粉管の先端はLUREから発せられるシグナルを感知し、LUREに向かって伸長することが知られている。このメカニズムを利用することで花粉管を自在に操作できると考えた。図3で示したマイクロ流体デバイスに、花粉管を伸長させる。その後誘引物質を添加し、誘引物質との相合作用を調査した。結果として、誘引物質を添加した方に、花粉管が伸長方向を変更していることを確認。バッファーのみの場合は、伸長方向に制限がかかっていないが、LUREを添加した場合のみ、LUREに引き寄せられていることが確認できた。よって、このLUREを用いて、任意のパターニングが可能であるといえる。

上記の結果により、当初の目的である、花粉管を利用した金属材料のパターニング方法についての検討

高アスペクト比・三次元微細構造体等のマイクロ・ナノデバイス構成部品に要求される微細パーツ製作に必要な知見の所得

ナノスケールオーダーの加工をめざし、パターニングのスケールダウン化についての

検討

花粉管誘引物質を利用した任意形状のパターニング方法について検討

これら4項目を実現するために必要な知見、成果を得ることができた。

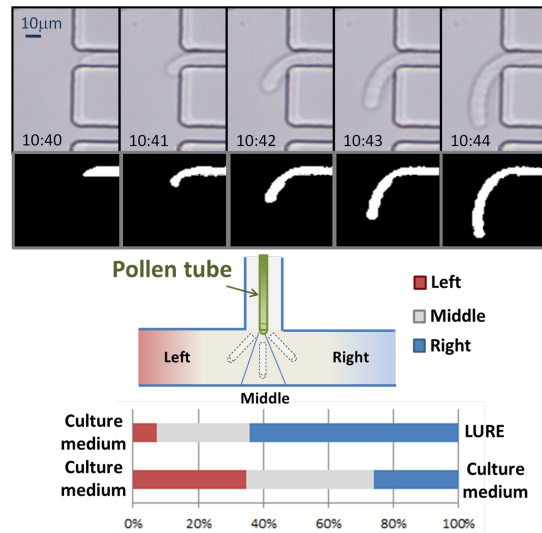


図4 花粉管伸長方向の制御

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 2 件)

Horade M, Kanaoka MM, Kuzuya M, Higashiyama T and Kaji N "A microfluidic device for quantitative analysis of chemoattraction in plants." RSC Adv., 2013 3, 22301-22307

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

[学会発表](計 8 件)

Horade M, Mizuta Y., Kaji N., Higashiyama T., Arata H. "PLANT-ON-A-CHIP MICROFLUIDIC-SYSTEM FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF POLLEN TUBE GUIDANCE BY SIGNALING MOLECULE: TOWARDS CELL-TO-CELL COMMUNICATION STUDY." MicroTAS 2012 Proc. pp. 1027-1029

6. 研究組織

研究代表者

洞出 光洋 (HORADE, Mitsuhiro)

大阪大学大学院基礎工学研究科・特任助教

研究者番号: 30583116