

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 26 日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2013～2014
課題番号：25706013
研究課題名(和文) マイクロ・ナノ工学を駆使した植物生殖機能解明

研究課題名(英文) Studying plant reproduction by microdevices

研究代表者

新田 英之 (Arata, Hideyuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：00582446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：生命現象を細胞・分子レベルで理解することは、現代の生物学における最重要課題の一つである。本研究により、従来の実験系を単に小型化するのではなく、ナノマイクロ空間特有の物理現象を利用した新たな原理によるごく微小実験システムを多数発明し、これまで観察すら不可能であった植物に関わる細胞・分子レベルにおける数多くの生命現象の極限計測や定量解析に成功した。本研究成果は、生物学分野における学術的価値の高い知見の獲得だけでなく、食糧問題、環境問題、エネルギー問題解決の起爆剤となる農作物増産技術を生み、新分野のみならず、新産業分野の創生にも寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanisms of living organisms at the cellular and molecular level is one of the most important issues in modern biology. In this study, we have developed several types of microsystems utilizing the physics at the nano- micro- scale. Consequently, we have succeeded in measuring and quantifying a number of phenomena at the cellular and molecular level involved in plants which could not otherwise be observed. The results obtained by this research provide not only the important biological findings but also the clues for overcoming food, environmental and energy problems, with industrial and societal impacts.

研究分野：ナノマイクロ科学

キーワード：ナノ科学 マイクロ工学 MEMS 植物科学 マイクロTAS

1. 研究開始当初の背景

花粉が雌しべに受粉すると種子ができる。花粉から伸び出した花粉管という細胞が、雌しべとの複雑で精密な細胞間シグナリングにより花粉管ガイダンス(花粉管誘導)を受け、花粉本体の数十倍から1万倍近い距離を迷うことなく伸び続け、標的の卵装置(胚のう)にたどり着く。近年、*Torenia fournieri* という卵装置が突出する植物を用いた体外受精系の開発により、卵細胞の隣にある2つの助細胞が、花粉管ガイダンスの最終段階で花粉管を正確に誘引する細胞であることが見出された(Higashiyama, *et al.*, *Science*, 2001, 293, 1480)。そして最近、助細胞が分泌する花粉管誘引物質が複数のペプチドであることが我々のグループにより明らかにされ、これらは LURE と名付けられた(Okuda, *et al.*, Higashiyama, *Nature*, 2009, 458, 357)。これらの進展により、花粉管ガイダンスに関わる様々な興味深い分子機構が明らかにされつつあり、雌しべ内での複雑なシグナリングの実態解明が急務となっている。

しかし、従来のアガロースゲル培地上の花粉管アッセイ系では無数の花粉管細胞が無秩序に伸長するため、花粉管伸長運動やその化学物質応答などの定量的解析が非常に困難であった(図1)。また、誘引物質(シグナリング分子)により花粉管の伸長方向が誘導されるメカニズムの詳細な理解のためには、シグナリング分子を一分子レベルで観察し、その花粉管先端との相互作用を解析することが必要不可欠であるにも関わらず、植物細胞生理学分野における既存の実験技術ではこれらの問題を解決することは不可能であり、技術的ブレークスルーが待ち望まれている。

申請者の専門技術の一つである MEMS 技術により製作した微細加工デバイスを用い

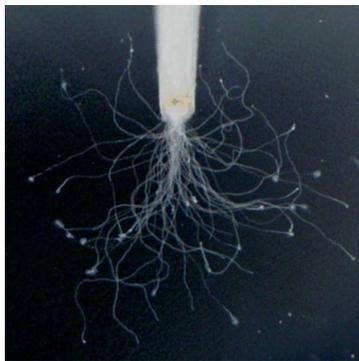


図1: アガロースゲル培地上における従来の花粉管伸長実験。無数の花粉管細胞が無秩序に伸長するため、花粉管伸長運動やその化学物質応答などの定量的解析が困難であった。マイクロ流路デバイスを用いることで、花粉管と誘引物質双方の高精度操作並びに定量的解析を目指す。

れば、花粉管細胞と同等のスケールで実験システムを構築できる点で上記の問題解決手段として期待できるが、マイクロチャネルを用いた花粉管の操作や定量的解析を試みた例が米国のグループから一件だけ報告されているにすぎない(Yetisen, *et al.*, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, 21, 054018)。しかも、この報告では数百マイクロメートル幅のチャネルを用いて多数の花粉管を同時に方向制御する程度が限界であった。また、我々のグループにて、シグナリング分子である LURE ペプチドの蛍光修飾を行うことには成功しているが(Goto, *et al.*, *Plant Cell Phys.*, 2011, 52, 49)、花粉管細胞との相互作用の一分子レベルでの観察には至っておらず、高感度で安定的に観察できるシステムの実現が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、花粉管誘引物質である LURE ペプチドが花粉管を誘導するメカニズムを分子レベルで解析するため、MEMS 技術を用いて花粉管と同じスケールのマイクロチャネルを有する流体チップを製作し、その二次元空間内での花粉管挙動の安定した観察と誘引物質の定量的解析を可能とし、植物の受精・生殖機能解明へのブレークスルーを実現することである。これにより、マイクロ工学、一分子生物物理学と、生物科学の中でこれまで他分野との接点が少なかった植物生理学・生殖分子情報学の融合と新学際領域のフロンティア開拓を目指す。

3. 研究の方法

受粉した花柱から伸びた複数の花粉管を個別に配向するためのマイクロ流路、および誘引物質との相互作用を観測する反応領域を備えたマイクロ流体デバイスを、MEMS 技術(微細加工技術)を駆使して設計、製作する。製作した PDMS マイクロ流路デバイスは、受粉した花柱から伸びた多数の花粉管を個別にチャネルに誘導する形状であり、流路は長さ 500 μm 、高さ 5~20 μm で、幅は 8、12、16、20 μm の流路をそれぞれ数本ずつ設置した構造である(図2)。花粉管伸長実験においては、デバイス内に液体培地を充填した後、受粉させた *Torenia fournieri* の花柱を 1 cm 程度の長さで切り、花柱差込口に設置した。受粉後約 3~5 時間で、伸長した花粉管は花柱を通過、デバイス内に進入し、流路に到達する。その伸長速度をデジタル顕微鏡でタイムラプス撮影し、伸長速度を解析する。

次に、T字型マイクロ流路デバイスと十字型マイクロ流路デバイスを作製する。このデバイスは、バッファおよび花柱の挿入口(直径 1.2 mm)、バッファ取り出し口(直径 3 mm)および幅が 500 μm で高さが 25 μm のマイクロ流路からなる。本デバイスを用いることにより、多数の花粉管が花柱を通過した後に、マイクロ流路内に進入させることが

できる(図3)。T字型デバイスでは、花柱挿入口の中心からT字路までの距離は3.5 mmである。十字型デバイスでは、花柱挿入口の中心から十字路までの距離は2 mmである。これらのマイクロデバイスは、シリコン基板上に感光性レジスト(SU-8 3025; Microchem Corp., Newton, MA, USA)をパタニングした鑄型から、PDMSを転写する(ソフトリソグラフィ)により作製した。PDMSマイクロ流路デバイスをガラスボトムディッシュに設置し、真空チャンバ内(10kPa)でPDMSを40分以上脱気した後、液体培地20~40 µLを花柱挿入口から挿入し、流路内を液体培地で満たした。受粉させた *Torenia fournieri* の花柱を1 cmの長さに切り、花柱挿入口に設置した。その後、*T. fournieri* から採取した卵巣をバッファ取り出し口に設置した。受粉後、花粉管は花柱を通過し、マイクロ流路内に進入する。ディッシュは湿度を保ったまま、25 ± 1 °C のインキュベーションチャンバー内で培養した。受粉から16~20時間後、誘引率(Guidance Response Ratio, GRR)を計測した。マイクロデバイス内花粉管の観察には実体顕微鏡(Axio Zoom V16; Zeiss, Germany)とCCDカメラ(AxioCam MRC; Zeiss, Germany)を用いた。

4. 研究成果

花粉管一本を2次元空間に閉じ込め、かつ無理なく伸長させることができる最適なチャンネルの高さは5 µmから12 µmの範囲であることをつきとめた。また、流路幅は花粉管の速度に影響を与えず、5 µmから12 µmの範囲であれば花粉管一本のみが進入することが分かった。また、従来のアガロースゲルを用いた花粉管伸長アッセイと本手法での花粉管伸長の計測速度を比較すると、後者が測定値も高く、かつ相対的にバラつきも抑えられていた(図4)。これは、アガロースゲル上では花粉管は垂直方向にもランダムに伸長することが要因の一つであると考えられる。また、流路内での伸長速度(50.2±9.6 µm/min)は、*in vivo*での伸長速度を花柱を通過する時間から計測した先行研究(約40 µm/min)により近い値であるため、本計測法は従来法に比べ、*in vivo*により近い環境での花粉管伸長速度計測が可能であることを示した。

誘引率は、それぞれの流路に進入する花粉管の数から算出することができる。誘引されていない花粉管は、T字デバイスにおいては、雌組織(卵巣)へ向かう数と反対方向へ向かう数が同じであるという仮定のもと、胚珠へ向かう花粉管の総数は

$$GRR + \frac{100-GRR}{2} \quad (1)$$

と予測できる(GRR: 誘引率)。一方で、胚珠と反対の方向へ向かう花粉管の総数は

$$\frac{100-GRR}{2} \quad (2)$$

となる。

胚珠へ向かう花粉管と、逆方向へ向かう花粉管総数の実測値はそれぞれ $78.1 \pm 6.5\%$ 、 $21.9 \pm 6.5\%$ (mean ± S.D., n = 16)となった。胚珠をおかないコントロール実験においては、左右のチャンネルに向かった花粉管総数はそれぞれ $50.3 \pm 9.8\%$ と $49.7 \pm 9.8\%$ (n = 11)となった。結果、花粉管は優位差をもって胚珠により誘引され(p < 0.01, Student's t-test)、T字デバイスを用いた計測では、GRRは56.2%と算出できた。

一方で、十字デバイスを用いた実験では、胚珠がおかれた方向の流路へ進入する花粉管総数は

$$GRR+E \quad (3)$$

と予測できる。E(error)は、胚珠がおかれた方向と、その逆方向の流路にたまたま進入する誘引されていない花粉管の総数である。胚珠がおかれた方向と、その逆方向の流路に進入する誘引されていない花粉管の数は同じ値であると仮定した。胚珠へ向かう花粉管と、逆方向へ向かう花粉管総数の実測値はそれぞれ $65.1 \pm 17.8\%$ と $8.2 \pm 3.5\%$ (n = 56)となった。残りの誘引されていない花粉管は十字路を直進した。胚珠を設置しない条件で行ったコントロール実験では、Eの値は同程度であった。結果、十字デバイスを用いた実験から算出したGRRは56.9%となった。二つの異なる形状のマイクロ流路デバイスを用いた実験から得られたGRRはほぼ同じ値となったため、本実験条件におけるGRRは高い信頼度をもって56~57%と断定することができた。更に、十字デバイスでは、誘引された花粉管をT字デバイス(56.2%)に比べて高精度(87.4%)で回収することができる。この技術を用いることにより、誘引された花粉管において、精度の高いトランスクリプトームやプロテオーム解析の実現が期待される。

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5件)

- Yoshikatsu Sato, Nagisa Sugimoto, Tetsuya Higashiyama, Hideyuki Arata, "Quantification of pollen tube attraction in response to guidance by female gametophyte tissue using artificial microscale pathway", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, accepted.
- Mitsuhiro Horade, Naoki Yanagisawa, Yoko Mizuta, Tetsuya Higashiyama, Hideyuki Arata, "Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device", *Microelectronic Engineering*, 2014, Vol. 118,

pp. 25–28.

- Jongho Park, Daisuke Kurihara, Tetsuya Higashiyama, Hideyuki Arata, "Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation", *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2014, Vol. 191, pp. 178-185.
- Hideyuki Arata, Tetsuya Higashiyama, "Poly(dimethylsiloxane)-based microdevices for studying plant reproduction (Review)", *Biochem. Soc. Trans.* vol. 42, issue 2, pp. 320-324, (2014).
- 新田 英之, 東山哲也:極微小デバイスを用いた生体分子・細胞・組織の顕微操作と解析 "Micromanipulation and analysis of biomolecules, cells, and tissues using microfabricated devices (Invited Review)", *Plant Morphology*, vol. 25, pp. 61-66, (2013).

〔学会発表〕(計 25 件)

- Hida H., Matsumura M., Kanno I., Nishiyama H., Sawa S., Higashiyama T., Arata H., "High-Throughput Chemotaxis Assay of Plant-Parasitic Nematode Toward Green Agriculture", *Proc. MicroTAS 2014*, San Antonio, pp. 276-278 (Oral presentation).
- Hirotaka Hida, Hidetaka Nishiyama, Shinichiro Sawa, Tetsuya Higashiyama, and Hideyuki Arata, "Behavior Analysis of Plant-parasitic Nematode in a Microchannel", 24th. International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nov. 10-13, 2013, Nagoya University, Japan, pp. 142-145.
- Hirotaka Hida, Hidetaka Nishiyama, Shinichiro Sawa, Tetsuya Higashiyama, and Hideyuki Arata, "On-Chip Chemotaxis Assay of Plant-Parasitic Nematode Towards Increasing Global Crop Productivity", *microTAS 2013*, Oct. Freiburg, Germany, pp. 1752-1754.
- Mitsuhiro Horade, Yoko Mizuta, Noritada Kaji, Tetsuya Higashiyama, and Hideyuki Arata, "Plant-on-a-Chip Microfluidic-System for Quantitative Analysis of Pollen Tube Guidance by Signaling Molecule: Towards Cell-to-Cell Communication Study", *microTAS 2012*, Oct., Nov. Okinawa, Japan, pp. 1027-1029.
- Motoki Kuzuya, Akira Terashima, Naoki Yanagisawa, Shunsuke Oishi, Ayato Sato, Hideyuki Arata, Tetsuya Higashiyama, Masahiro Kanaoka, "Screening and Identification of Molecules that Affect Pollen Tube Guidance in *Torenia fournieri*", (poster presentation) the 1st. CSRS-ITbM Joint Workshop, Jan 7, Nagoya University, 2015.
- Naoki Yanagisawa, Tetsuya Higashiyama, and Hideyuki Arata, "Quantitative analysis of signaling molecule for pollen tube guidance", *Material Research Society Annual meeting*, H12.31, Dec. 3rd. 2014, Boston.
- Jongho Park, Daisuke Kurihara, Tetsuya Higashiyama, Hideyuki Arata, "Microcage arrays for fixation of plant ovules and long-term observation", *International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014*. Sep. 9-10, Nagoya University.
- H. Hida, M. Matsumura, I. Kanno, H. Nishiyama, S. Sawa, T. Higashiyama, H. Arata, "High-throughput Chemotaxis Assay of Plant-parasitic Nematode by Using a Microchannel Device", *International ERATO Higashiyama Live-Holonics Symposium 2014*. Sep. 9-10, Nagoya University.
- Jongho Park, Daisuke Kurihara, Tetsuya Higashiyama, Hideyuki Arata, "Microchamber Arrays for Plant Ovule Fixation and Long-Term Observation", *RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference*, Sep. 6th. 2013, Makuhari, Chiba, Japan (poster).
- 肥田 博隆, 松村 匡隆, 神野 伊策, 西山 英孝, 澤 進一郎, 東山 哲也, 新田 英之: 「植物寄生性センチュウのハイスループット化学走性分析用デバイス」化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会, 日本女子大学, 2014 年 5 月 2,3 日.
- 湯川 泰弘, 朴 鍾漢, 新田 英之, 金 範 俊: 「ナノスリット中の長い DNA 分子に対する電気泳動と流体圧力の同時印加に関する研究」精密工学会春季大会, 東京大学本郷キャンパス, 2014 年 3 月 18 ~ 20 日.
- 湯川 泰弘, 朴 鍾漢, 新田 英之, 金 範 俊: 「ナノスリット中の長い DNA 分子に対する電気泳動と流体圧力の同時印加に関する研究」化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 2P11, イーグ レ姫路, 12 月 5,6 日.
- 朴 鍾漢, 栗原 大輔, 東山 哲也, 新田 英之: 「長期間観察を目的にする胚珠固定用のマイクロケージアレイの作製」日本機械学会第 5 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 2013 年 11 月 5-7 日, 仙台国際センター, 5PM3-PMN-03 (ポスター発表).
- 肥田 博隆, 西山 英孝, 澤 進一郎, 神野 伊策, 東山 哲也, 新田 英之: 「植物寄生性センチュウの行動分析用マイクロ流路デバイス: 流路規格および流路内物質濃度分布の検証」日本機械学会第 5 回マ

- イクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 2013年11月5-7日, 仙台国際センター, 5PM1-C-6 (口頭発表).
- ・ 湯川 泰弘, 朴 耕徳, 朴 鍾溟, 新田 英之, 金 範俊:「ナノスリット中の長いDNA 分子に対する電気泳動と圧力勾配の同時印加に関する研究」バイオ・マイクロシステム研究会, 2013年10月8日, 東京大学生産技術研究所, 東京, BMS-13-040.
- ・ 栗原 大輔, 牛王 啓太, 朴 鍾溟, 新田 英之, 東山 哲也:「マイクロデバイスを用いたシロイヌナズナ胚発生過程のライブイメージング」第77回植物学会, 2013年9月13-15日, 北海道大学, 札幌, 1pG11.
- ・ 須崎 大地, 武内 秀憲, 筒井 大貴, 椎名 恵子, 新田 英之, 東山 哲也:「ライブイメージングと細胞除去による雌性配偶体構成細胞の機能獲得における細胞間相互作用の解析」植物形態学会第25回総会・大会, 2013年9月13-15日, 北海道大学, 札幌, P-167.
- ・ 栗原 大輔, 牛王 啓太, 朴 鍾溟, 新田 英之, 東山 哲也:「シロイヌナズナ胚発生過程のライブイメージング マイクロデバイスを用いたアプローチ」植物形態学会第25回総会・大会, 2013年9月12日, 北海道大学, 札幌, P-044.
- ・ 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10-12日, 近畿大学, 大阪.
- ・ 朴 鍾溟, 栗原大輔, 東山 哲也, 新田 英之:「長時間ライブイメージングを実現する胚珠配列用マイクロデバイス」化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回大会, 2013年5月, 仙台.
- ・ 洞出 光洋, 水多 陽子, 東山 哲也, 新田 英之:「マイクロ流路を用いた花粉管細胞配列アッセイ」化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回大会, 2013年5月, 仙台.
- ・ 肥田 博隆, 西山 英孝, 澤 進一郎, 東山 哲也, 新田 英之:「植物寄生性センチュウの化学走性分析用マイクロ流路デバイス」化学とマイクロ・ナノシステム学会第27回大会, 2013年5月, 仙台.
- ・ 水多 陽子, 洞出 光洋, 後藤 宏旭, 加地 範匡, 新田 英之, 東山 哲也:「花粉管ガイダンスの分子実体解明に向けてーマイクロ流体デバイスを用いた試み」日本植物形態学会第24回大会 2012年9月姫路.
- ・ 洞出 光洋, 水多 陽子, 加地 範匡, 新田 英之, 東山 哲也:「PDMS マイクロチャネルを用いた花粉管細胞伸長の計測と制御」第25回化学とマイクロ・ナノシ

ステム研究会, 2012年5月, 2P04.

- ・ 水多 陽子, 洞出 光洋, 加地 範匡, 後藤 宏旭, 新田 英之, 東山 哲也:「花粉管内標的遺伝子の機能阻害と花粉管誘引アッセイに対する新アプローチ (New approaches for gene knockdown in the living pollen tube and for the pollen tube attraction using a microdevice-based assay)」第53回日本植物生理学会年会 (2012年3月16-18日, 京都産業大学) 2012年3月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 接ぎ木用の育苗部材及び育苗セット、並びに接ぎ木苗の生産方法
発明者: 野田口理孝, 新田英之, 池松朱夏
権利者: 野田口理孝, 新田英之, 池松朱夏, 名古屋大学
種類: 特願
番号: 2015-026570
出願年月日: 2015年2月13日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/hideyukif arata/home2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 英之

研究者番号: 00582446