

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600061

研究課題名(和文)花粉管先端膜回収のためのマイクロ流体システム

研究課題名(英文)Microfluidic system for collecting the cell membrane at pollen tube tip

## 研究代表者

柳澤 直樹 (Yanagisawa, Naoki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20728282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では花粉管先端部分の細胞膜を回収するマイクロ流体デバイスを開発し、膜タンパク質の検出と解析を実現させることを目的とした。開発したマイクロデバイス、先端成長し続ける花粉管の先端部分を捕獲できるマイクロ構造と、その先端部分を流体操作のみで切断できるマイクロ流路から構成される。本研究を通して、花粉管の先端部位の回収という目的は達成することが出来たが、細胞膜のみを回収するという課題に対しては実現に至っていない。細胞膜の分離には様々な精製ステップがあり、それらをデバイス内に構築することが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this research are to develop a microfluidic device that is able to collect the cell membrane at the tip of pollen tube and to perform proteomic analysis of the collected sample. The microdevice is composed of two parts: micro-cages for trapping pollen tube tip and micro-channels for cutting the trapped pollen tube. Through this research, we have successfully trapped and cut the tip of pollen tube and transferred the sample to the outside of the device. However, the isolation of the cell membrane of the collected pollen tube tip requires multiple purification steps, which are still ongoing work.

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

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の受精では、花粉管により精細胞が胚珠内の卵装置まで運ばれる必要がある。花粉管が胚珠に向けて迷うことなく伸び続ける仕組みは未解明な部分が多いが、その最終段階で、胚珠からの誘引物質により、花粉管が胚珠に誘導される（花粉管ガイダンス）ことが明らかになった (Higashiyama, *et al.*, *Science*, 2001)。また、その誘引物質である LURE ペプチドも同定された (Okuda, *et al.*, *Nature*, 2009)。そして、LURE の受容体は先端部分に集中して存在している可能性が高いため、プロテオーム解析によって受容体の探索を行う場合、花粉管の先端膜のみを回収することが強く求められている。これまでは、液体培地内に数ミリメートル伸ばさせた花粉管全体を液体窒素で凍らせ、切断することでサンプルを回収する手法が取られてきたが、伸張し続ける花粉管の先端膜のみを回収することは未だ不可能であった。

## 2. 研究の目的

花粉管先端には細胞間コミュニケーションに関わる膜タンパク質（受容体）が存在し、その同定と機能解明は、植物生殖メカニズムを解明する上で重要な課題である。本研究ではこの要求に対し、花粉管先端部分の膜のみを回収するマイクロ流体デバイスを開発し、膜タンパク質の検出と解析を実現させる。このマイクロデバイスは、先端成長し続ける花粉管の先端部分を捕獲し、その先端部分を流体操作のみで切断できるマイクロ構造と、先端膜を分離、回収できるマイクロ流路から構成される。多量の花粉管に対しても同一デバイス上で並列処理できるシステムも確立する (図 1)。

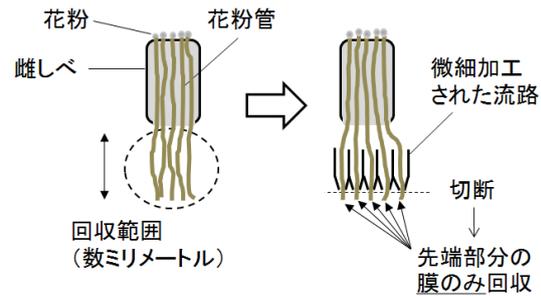


図 1 従来法によるサンプルの回収部位 (左)。本研究では花粉管先端の膜のみを回収する (右)。

## 3. 研究の方法

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。そして、モデル植物として *T. fournieri* を用いた。始めに、図 2 に示したようなマイクロピラーを使用して、そのピラー間の幅を調節することで花粉管の伸張を止める。そして、マイクロピラー内に捕獲された花粉管の先端部分を電気浸透流 (EOF) によって切断を試みた。

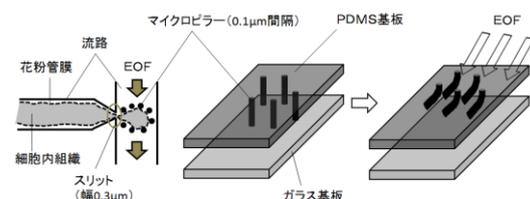


図 2 マイクロピラーを用いた花粉管先端部分の捕獲図 (左) と電気浸透流 (EOF) によるマイクロピラーの開口の模式図 (右)。

## 4. 研究成果

先端成長をする花粉管を捕獲するべく、図 3 に示すようなマイクロピラーを作製し実験を行った。結果としては、ピラー間の隙間を可能な限り狭めたとしても、花粉管の伸張を止めることは出来なかった。

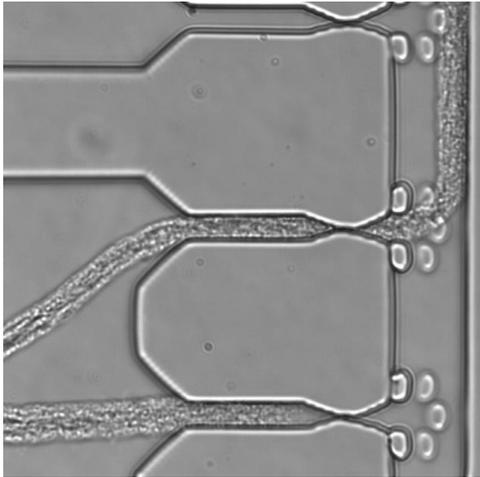


図3 マイクロピラーを花粉管が通過する様子。

この実験結果から、ピラー形状ではなく図4に示すような花粉管が逃げる事が出来ないマイクロ空間を用いることにした。この場合、一度捕獲された花粉管はほぼ全て、その場に留めることが出来た。

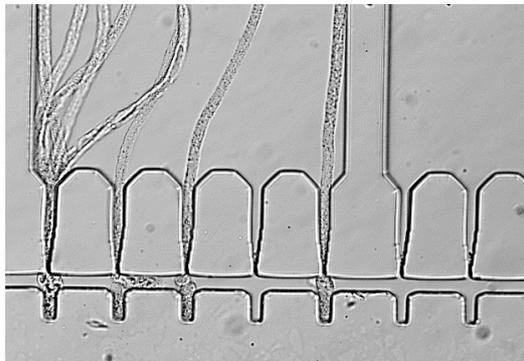


図4 マイクロ空間に花粉管が捕獲された様子。

そして、細胞壁を分解する酵素を含ませた溶液を、捕獲させた花粉管の先端から約 20  $\mu\text{m}$  の位置で流すことで、花粉管先端部分を切断できることを実証した(図5)。この時点では、切断した花粉管先端部位はマイクロ構造に捕獲されたままであったが、その後、流速を上げることで先端部位を取り出すことができ、そのままデバイス外まで輸送できるところまでを確認した。

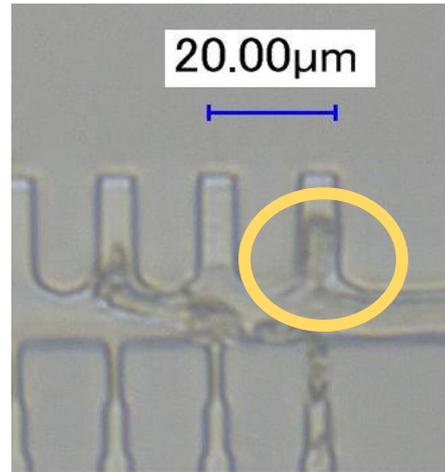


図5 花粉管先端部位が切断された様子。

本研究を通して、花粉管の先端部位の回収という目的は達成することが出来たが、細胞膜のみを回収するという課題に対しては実現に至っていない。細胞膜の分離には様々な精製ステップがあり、それらをデバイス内に構築することが今後の課題である。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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:

出願年月日:

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

柳澤 直樹 (YANAGISAWA, Naoki)

名古屋大学理学研究科・研究員

研究者番号： 20728282

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

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