

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660146

研究課題名(和文) マイクロチャネルを用いる in vitro カロース中空ファイバー生産モデル系の構築

研究課題名(英文) Proposal of in vitro system producing beta-1,3-glucan micro-hollow fiber by fixing a single plant cell into micro channel flowing device

研究代表者

近藤 哲男 (KONDO, TETSUO)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30202071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近藤らは植物プロトプラストを酸性かつ大過剰Ca²⁺下で培養することにより、-1,3-グルカンからなる中空繊維束が産生されることを発見した。繊維分泌は細胞膜上で生じており、膜上の合成酵素の集合形態が中空繊維束の形成に寄与することが示唆された。そこで、細胞を破裂させ、細胞膜表面を露出させた細胞ゴーストをマイクロチャネルデバイスへ固定することで合成酵素の集合状態を維持したまま、繊維束産生現象を再現させる半人工モデル系を構築した。これにより繊維産生に關する因子(pH、カルシウムイオン濃度、など)が特定された。とくに、マイクロチャネル内に生じるフローが、重要なファクターであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、環境応答として植物細胞外への物質生産現象に着目している。細胞膜貫通した合成酵素群により中空繊維の形成が生じることから、細胞膜の内と外で本生産システムを切り分けることとした。ここで細胞内は、遺伝情報に従う生物代謝による繊維前駆体生産を伴うフローシステムであり、細胞膜から外へは熱力学的自己組織化のプロセスとみなしている。その立証のため、マイクロチャネル内に細胞膜貫通合成酵素群を in situ で固定化し、前駆体を流し代謝フローを人工的に達成させた。このように、生体現象を、遺伝情報による現象と、熱力学的自己組織化とに切り分けることにより、生物の物質生産を理解できる手法を提案できた。

研究成果の概要(英文)：Previously, Kondo et al. discovered that addition of excess amounts of Ca²⁺ under an acid condition into culture media induces unique producing phenomenon of -1,3-glucan micro-hollow fibers from plant protoplasts. In this study for elucidating this unique phenomenon, we have attempted to construct a micro-channel flowing device as a semi-artificial system at a single cell level by fixing a single cell (ghost cell) that can reproduce the -1,3-glucan micro-hollow fibers.

When the culture media containing UDP-glucose flowed into the ghost cell-fixed device, -1,3-glucan micro-hollow fibers were produced, depending on the culture condition. The critical factors were found as pH, the concentration of Ca²⁺, and in particular a manner of the flow either laminar or random flows exhibited a remarkable effect. Accordingly, this semi-artificial flowing system has successfully reproduced the unique native phenomenon of secreting -1,3-glucan micro-hollow fibers from protoplasts.

研究分野：農学

キーワード：プロトプラスト膜タンパク カロース プロトプラスト 中空ファイバー生産 マイクロチャネル

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、シラカバの葉柄からのプロトプラスト(植物細胞)に対し、酸性下で大過剰なカルシウムイオン添加というストレスを負荷すると、細胞は直径が10倍に拡大するとともに、細胞分裂を抑制しながら、細胞外にナノサイズの中空系が束となった約20-30 μm 幅を有するマイクロサイズのカロース(分岐のない β -1,3-グルカン)巨大繊維を細胞外に分泌するという極めてユニークな現象を見出した。この現象は、植物細胞の環境変化にตอบสนองする挙動として、その潜在的エネルギーが、物質生産能に変換されたことを意味する。その後、研究代表者らは同調性の高いカルス懸濁細胞を用いる高効率のカロース繊維産生系を確立した。また、産生された繊維が、葉柄プロトプラストと同様に、ナノサイズの中空系が束となったマイクロサイズのカロース繊維だったが、繊維幅は葉由来が約20-30 μm に対し、カルス由来は14 μm と約2分の1になっており、中空系の幅は、葉由来より細い(200-300 nmから1-2 μm)ものであった。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが見出した「大過剰のカルシウムイオン添加した酸性下でカルスプロトプラストを培養すると、細胞外に、ナノサイズの中空系が束となったマイクロサイズ幅(14 μm)のカロース(β -1,3-グルカン)巨大繊維を生産・噴出する」という現象をモデル化し、植物ナノ繊維化の半人工プロセスを提案しようとするものである。

一般に、細胞膜から膜タンパクの立体構造を維持したまま抽出することは難しい。一方、林らにより提案されたゴースト調製法⁶⁾は、プロトプラストをバーストさせて得られた細胞断片から、膜タンパクの機能解析を可能とした。そこで、本研究では、このゴースト

調製法を利用し、カロース繊維を産生する生物(プロトプラスト)と人工反応経路(マイクロチャンネル)を一体化させた、半人工マイクロチャンネルデバイス(右図)の構築を目指した。すなわち、マイクロチャンネルにゴースト細胞を固定し、前駆体を含む培養液を流すことにより、カロース繊維産生現象の再現を試みた。この半人工デバイスによるカロース産生系を用いることによって、培養液のpHや Ca^{2+} 濃度の変化に対するプロトプラストのストレス応答を系統的に検討することが可能となり、カロース繊維産生に關与する環境因子の解明が期待される。

3. 研究の方法

- (1) マイクロチャンネルデバイスの作製 I字凸型(幅200 μm ×高さ100 μm ×総長4.3cm)ガラス基板を鋳型として、polydimethylsiloxane(PDMS)を熱硬化させ、I字凹型基板を調製した。それをPDMS平板と貼り合わせ、マイクロチャンネルチップとした。チャンネル両末端にマイクロチューブを接続し、注入口、排出口とした。
- (2) プロトプラスト由来ゴーストのマイクロチャンネルデバイスへの固定 シラカンバ葉柄由来カルスの懸濁培養細胞を用い、既報⁵⁾に従いプロトプラストを調製し、ストレス培養に供した。14日後、プロトプラスト懸濁液20 μL を40 μm 径のナイロンメッシュ上に滴下した後、50 mM PIPESを20 μL 滴下することによりプロトプラストをバーストさせ、ゴーストを調製した。このゴースト付きメッシュをチャンネルに直交するように設置した。
- (3) マイクロチャンネル内の培養液流動の検討 キャノン・フェンスケ粘度計を用いて、培養液表)の粘度を測定し、動粘度 ν を算出した。さらに、シリンジポンプで設

定可能なマイクロチャンネル内の流速 (0.3~6.0 $\mu\text{L/h}$)におけるレイノルズ数 Re を以下の式を用いて求めた。

$$Re = UL/\nu$$

U : 培養液送液速度 [m/s]、 L : チャンネル横断面の代表長さ (= (長辺+短辺)/2) [m]

次いで、ゴースト固定マイクロチャンネル内の流れについて、上記の Re からの推定と比較するため、オートクレーブにて死活させた酢酸菌を含む培養液を所定の流速で送液し、光学顕微鏡を用いて菌の挙動をモニターした。

(4) ゴースト固定マイクロチャンネルデバイスを用いた β -1,3-グルカンの合成 マイクロチャンネル内に培養液を 0.3 $\mu\text{L/h}$ で 1 日送液し、 β -1,3-グルカンの合成を試みた。合成された物質を Aniline blue fluorochrome (ABF) を用いて染色したのち、蛍光顕微鏡観察に供した。

4 . 研究成果

マイクロチャンネル内の培養液の流動を検討 (層流か乱流の判定) するために、培養液の動粘度 ν を算出したところ、全ての培養液で $\nu = 0.96 \text{ mm}^2/\text{s}$ となった。この値を用いて、送液速度 (0.3 ~6.0 $\mu\text{L/h}$) の範囲におけるチャンネル内の Re を計算したところ、 $Re = 2.7 - 2.8$ であった。これは理論的な層流形成条件である $Re < 2300$ を十分に満たすため、マイクロチャンネル内では層流が形成されていると推定された。さらに、ゴースト固定マイクロチャンネル内において、死活酢酸菌が流速 0.3 ~6.0 $\mu\text{L/h}$ においてチャンネル長軸に平行に流れたことから、層流の形成が確認された。すなわち、固定されたゴーストに対する前駆体の流れ方は、いずれの培養液においても同等に層流であることが示唆された。

次に、層流を形成する流速のうち、実際の繊維産生速度 (0.3 $\mu\text{m}/\text{min}$)³⁾に最も近い流速

0.3 $\mu\text{L/h}$ で培養液を 1 日送液した際のカロー

Table Callose secreted in semi-artificial micro channel device equipped with protoplast ghost cell.

Culture	pH	UDPG (mM)	CaCl ₂ (mM)	Callose substance
medium 1	3.5	5	300	
medium 2	3.5	5	0	
medium 3	3.5	0	300	×
medium 4	3.5	0	0	×
medium 5	7.2	5	300	
medium 6	7.2	5	0	
medium 7	7.2	0	300	×
medium 8	7.2	0	0	×

: Secreted, : Secreted or not, ×: Not-secreted

ス含有物質の有無を検討した。酸性域^{2,4)}、中性域³⁾ともにUDPGを添加したときのみ、デバイスの合成機能が発現された。特に、ストレス培養条件 (pH 3.5, 300 mM CaCl₂) の培養液を送液した際、長さ約 500 μm 、幅約 35 μm の物質が排出口から得られた。この物質はABF染色により緑色の蛍光を示した。このことから、マイクロチャンネル内に固定したゴーストからカロース含有物質が合成されたことが示された。pH 7.2 においても検討したところ、長さ約 300 μm 、幅約 50 μm のカロース含有物質の産生が認められた。

以上のように、本研究において半人工マイクロチャンネルデバイスを用いたカロース繊維産生系が構築された。このデバイスを用いることによって、今後、プロトプラストのカロース繊維産生に関与する様々な環境因子の特定に期待が持たれる。現在、カロース含有物質の高次構造について解析中である。

参考文献

- 1) Delmer D., and Amor Y., *Plant Cell* 7:987 (1995).
- 2) Kondo T., et al., *Japan Patent* No.3936522 (2000).
- 3) Seyama T., et al., *Planta* 227:1187 (2008).
- 4) Seyama T., Kondo T., *Holzforchung*, 66:407 (2012).
- 5) Matsuo S., et al., *Holzforchung*, 68:69 (2014).
- 6) Hirai N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:15102 (1998).

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)

[学会発表](計5件)

田川聡美、近藤哲男、環境ストレスに
応答して中空繊維を分泌するシラカバ培養
細胞由来プロトプラストの細胞壁形成挙
動、第67回日本木材学会大会(福岡大会)、
2017年3月19日、九州大学箱崎キャン
パス

内優里、近藤哲男、植物プロトプラスト
のゴーストを固定した半人工マイクロチ
ャネルデバイスによるカロース繊維の
in vitro 合成、第67回日本木材学会大会
(福岡大会)、2017年3月19日、九州大
学箱崎キャンパス

近藤哲男、プロトプラストの酸性下での
カルシウムイオンストレス応答挙動から
の細胞壁形成研究へのアプローチ、組織
と材質研究会シンポジウム 2017、2017
年3月19日、九州大学箱崎キャンパス

田川聡美、シラカバ培養細胞由来プロト
プラストの細胞壁形成ダイナミクス、組
織と材質研究会シンポジウム 2017、2017
年3月19日、九州大学箱崎キャンパス

田川聡美、近藤哲男、環境ストレスに
応答した植物プロトプラストの細胞壁形成
の可視化、第23回日本木材学会九州支部
大会、2016年9月12日、鹿児島大学農
学部

田川聡美、近藤哲男、環境ストレス応答
としての植物プロトプラストのセルロー
ス堆積異常とカロース中空繊維産生の相
関、セルロース学会第23回年次大会、
2016年7月15日、つくばカピオ

田川聡美、近藤哲男、環境ストレス応答
としての植物プロトプラストの細胞壁形
成異常とカロース中空繊維産生の相関、
第53回化学関連支部合同九州大会、2016
年7月2日、北九州国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://biomat.agr.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 哲男 (KONDO, Tetsuo)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30202071