

平成 25 年 10 月 3 日

マイクロケージアレイで種子成長の安定的長時間観察の実現 —マイクロ加工技術の導入で植物胚発生研究が加速される—

JST 課題解決型基礎研究の一環として、JST 戦略的創造研究推進事業 ERATO 型研究「東山ライブホロニクスプロジェクト」(研究総括：東山 哲也 教授 名古屋大学大学院理学研究科) ナノ工学グループ (グループリーダー：新田 英之 特任講師) の朴 鍾湔 (パク チョンホ) 研究員らは、栗原 大輔 特任助教 (同プロジェクト 光技術グループ グループリーダー) らと共同で、植物の胚発生^{※1}・胚乳^{※2}発生の研究に必須である種子の長期間培養と観察を安定的に、かつ容易に行えるマイクロケージアレイを開発しました。

被子植物では、将来植物体となる胚と、栄養を蓄える胚乳をもつ種子が作られます。胚発生や胚乳発生の機構解明のためには安定した種子の長時間ライブイメージングが必要不可欠であり、その成長を阻害することなく長時間、安定的な培養を実現する技術の開発が望まれていました。これらの課題を解決するため、MEMS (マイクロマシニング) 技術^{※3}を用いて種子を配置、固定するための微小な「檻」がアレイ状になった、マイクロケージアレイを開発しました。製作したマイクロデバイスを用いて、種子の固定、培養と観察を行い、種子の成長を阻害することなく長時間培養しながら安定的に固定、観察できることを確認しました。このマイクロケージアレイを用いることにより、成長する種子の内部を生きたまま詳細に解析することが可能となり、植物の受精卵から幼植物が作られる仕組みの解明や、種子の成長向上や食料増産技術につながると期待されます。また、マイクロ加工技術の植物科学分野への展開が加速すると期待されます。

※1 胚発生：被子植物においては、受精卵から幼植物 (成体) が作られる過程。胚発生研究は、植物科学分野で最も先端的に研究が進んでいる分野の1つである。

※2 胚乳：発芽に際して胚の成長に必要な養分を供給する、種子を構成する組織の1つ。(例：白米はイネ種子の胚乳部分である。)

※3 MEMS (マイクロマシニング) 技術：半導体集積回路加工技術を応用して、機械要素部品、センサ、アクチュエータ、電子回路などを一つの基板 (主にシリコンやガラス) 上に集積化したデバイスを MEMS (Micro-Electro-Mechanical-Systems) と呼ぶ。その微細加工・製作技術。

マイクロケージアレイで種子成長の安定的長時間観察の実現 ーマイクロ加工技術の導入で植物胚発生研究が加速されるー

【概要】

JST 課題解決型基礎研究の一環として、JST戦略的創造研究推進事業ERATO型研究「東山ライブホロニクスプロジェクト」(研究総括:東山 哲也 教授 名古屋大学大学院 理学研究科)ナノ工学グループ(グループリーダー:新田 英之 特任講師)の朴 鍾湔(パク チョンホ)研究員らは、栗原 大輔 特任助教(同プロジェクト 光技術グループ グループリーダー)らと共同で、植物の胚発生^{*1}・胚乳^{*2}発生の研究に必須である種子の長期間培養と観察を安定的に、かつ容易に行えるマイクロケージアレイを開発しました。

被子植物では、将来植物体となる胚と、栄養を蓄える胚乳をもつ種子が作られます。胚発生や胚乳発生の機構解明のためには安定した種子の長時間ライブイメージングが必要不可欠であり、その成長を阻害することなく長時間、安定的な培養を実現する技術の開発が望まれていました。これらの課題を解決するため、MEMS(マイクロマシニング)技術^{*3}を用いて種子を配置、固定するための微小な「檻」がアレイ状になった、マイクロケージアレイを開発しました。製作したマイクロデバイスを用いて、種子の固定、培養と観察を行い、種子の成長を阻害することなく長時間培養しながら安定的に固定、観察できることを確認しました。

このマイクロケージアレイを用いることにより、成長する種子の内部を生きたまま詳細に解析することが可能となり、植物の受精卵から幼植物が作られる仕組みの解明や、種子の成長向上や食料増産技術につながると期待されます。また、マイクロ加工技術の植物科学分野への展開が加速すると期待されます。

【ポイント】

- ・ MEMS(マイクロマシニング)技術を用いて種子を配置、固定するための微小な「檻」がアレイ状になった、マイクロケージアレイを開発した。
- ・ マイクロケージアレイを用いて種子の固定、培養と観察を行い、種子の成長を阻害することなく長時間培養しながら安定的に固定、観察できることを確認した。
- ・ 植物の受精卵から幼植物が作られる仕組みの解明や、種子の成長向上や食料増産技術への波及効果、マイクロ加工技術の植物科学分野への展開が期待される。

【背景】

植物の胚発生とその一連の過程は受精卵という単細胞から高等生物としての複雑な構造と機能を構築する基本的で重要なプロセスであり、胚発生研究は植物科学分野で最も先端的に研究が進んでいる分野の1つであります。胚発生の機構解明のためには安定した種子の長時間培養技術とライブイメージングが必要不可欠であり、その成長を阻害することなく長時間、安定な培養技術の開発が課題となっていました。また、多数の種子を同時に同じ条件で培養、

観察することも必要不可欠であり、その手法が簡便、シンプルであることも望まれていました。

そこで朴研究員らは、微小なケージ(CAGE, 檻)型の構造物をアレイ化したマイクロデバイスにより、種子を檻の中にとじこめ、長時間固定するというアイデアを考案しました。

【研究の内容】

培養されたシロイヌナズナの種子の寸法を参考にして、マイクロケージの設計を行いました。その後、素材としては種子に物理的な影響を与えないよう、柔軟性を持つポリマーであるポリジメチルポリシロキサン(PDMS)を材料に選びました。微細加工を施したシリコン基板を鋳型とし、ソフトリソグラフィ(マイクロ加工技術の一種)により、複数のマイクロケージをアレイ(ARRAY, 配列)状に配置したマイクロケージアレイを作製しました。

具体的には、紫外線に反応し、架橋される特性を持つ感光性レジストをシリコン基板上で加工し、マイクロケージの鋳型を作製します。その後、ジメチルポリシロキサンプレポリマーを鋳型に注入し、硬化させた後、基板から剥離することでマイクロケージアレイを作製しました。ケージの設計で、その全長は種子の成長後の長さを想定し、650 ミクロンに設計したが、幅は150, 200, 250, 300ミクロン(MICRON, ミクロン:1000分の1ミリメートル)の四つの異なる幅を持つデバイスを作製して、種子を格納するために最適な規格を割り出す検証実験を行いました。その結果、種子がケージの中に1個ずつ配置され、かつ複数になるべく同時に入らないよう、種子の数とケージの幅に関する定量的な分析も行いました。その結果から、長期間にわたる種子の培養に適するケージ幅として、200ミクロンと250ミクロンを選択しました(図1)。その後、マイクロケージアレイを用いて、種子を固定し、1週間培養を行い、種子の成長を記録しました(図2)。その結果、種子がはじめの位置と向きを維持したまま成長していく過程の観察を実現しました。また、生体適合性が高く、かつ柔軟性を持つポリマーを材料に選んだため、種子の成長を物理的負荷により阻害しないことも確認できました。マイクロケージアレイを用いて種子を固定することで、観察対象の種子を見失うことがなく、長時間にわたる多点観察を容易にし、実験にかかる所要時間も大幅に短縮することができました。

【成果の意義】

今回開発したマイクロケージアレイは有用な農作物など、シロイヌナズナ以外の種の種子の培養実験と成長観察、胚発生や胚乳発生のライブイメージング、さらには種子以外の植物組織の培養実験、長時間観察にも応用できます。また、実験にかかる所要時間も大幅に短縮されます。「東山ライブホロニクスプロジェクト」では、マイクロ加工技術の植物科学への展開を推進しており、関連分野の研究が加速されるだけでなく、種子の成長向上や食料増産技術、食糧問題やエネルギー問題にとって重要な農作物を含む、植物に関わる様々な育種・培養技術開発への貢献が期待できます。

【用語説明】

※1 胚発生

被子植物においては、受精卵から幼植物(成体)が作られる過程。胚発生研究は、植物科学分野で最も先端的に研究が進んでいる分野の1つである。

※2 胚乳

発芽に際して胚の成長に必要な養分を供給する、種子を構成する組織の1つ。(例:白米はイネ種子の胚乳部分である。)

※3 MEMS(マイクロマシニング)技術

半導体集積回路加工技術を応用して、機械要素部品、センサ、アクチュエータ、電子回路などを一つの基板(主にシリコンやガラス)上に集積化したデバイスをMEMS(Micro-Electro-Mechanical-Systems)と呼ぶ。その微細加工・製作技術。

【論文名】

“Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation”,

Sensors & Actuators B: Chemical

DOI: 10.1016/j.snb.2013.09.060

<参考図>

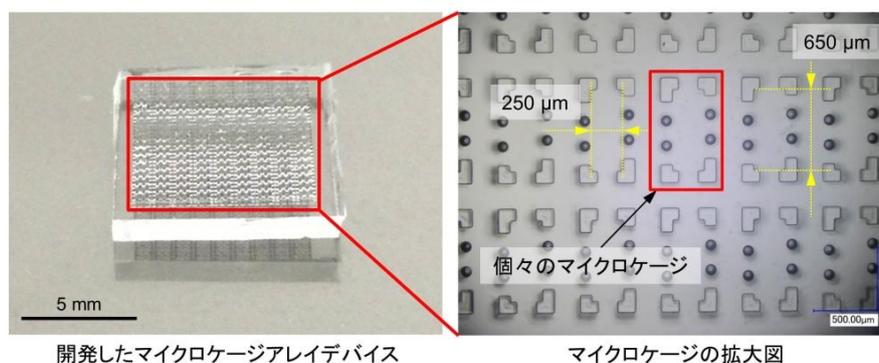


図 1. 開発したマイクロケージアレイとその構造

図1は作製したケージの幅が250ミクロンのマイクロケージアレイの全体図(左)と、その拡大図(右)を示しています。デバイス全体は、一辺が約1センチメートルの正方形の形になっていて、その中に96個(ケージ幅200ミクロンのアレイでは112個)のマイクロケージが配列されています。子房から採った種子をマイクロケージアレイに撒いて、培養ディッシュに入れるだけで培養の準備が整います。

一回で多数の種子をそれぞれのケージに格納することが可能であり、多数の種子を、長時間の多点観察においても特定することができます。

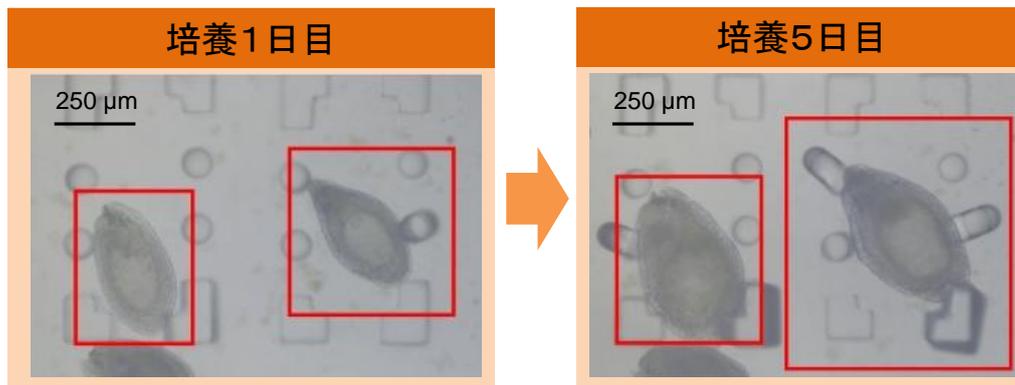


図 2. マイクロケージ内で培養され、成長する種子の様子

図 2 はマイクロケージに固定した種子を1週間、培養し、その間に成長していく種子を周期的に観察したものであります。1日目の種子に比べて、5日目の種子の大きさが変化したことが確認できます。また、周りに柔軟性を持つポリマーの柱がありますが、成長していく過程で、その柱を外側に押し出しているのも観察されました。これは、種子が培養される際、ケージより大きくなる場合でも、ケージ、特に側面に配置されたピラーがやわらかいため、物理的な圧迫により種子の成長を妨げることなく培養が可能になることを示しています。