

## 植物の細胞を培養し、経時的な観察を可能にする マイクロデバイスの開発に成功！

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科の清水 一憲 准教授、大学院生命農学研究科の田畑 亮 特任講師、名古屋大学生物機能開発利用研究センターの川勝 弥一 研究員、黒谷 賢一 特任講師、および野田口 理孝 准教授らの研究グループは、持続可能な農業へ向けた接木革新ユニット（B3 ユニット：若手新分野創成研究ユニット）の研究成果として、植物の細胞を微細流路内で培養し、経過観察を可能とするマイクロデバイスの開発に成功しました。

植物細胞の多くは不透明なため、細胞を生きのまま連続して光学的に観察することが難しいとされます。タバコ BY-2 細胞は、培養液中で紐状につながって増殖し、ほぼ透明であることから、生きのままの観察に適していますが、培養液中に懸濁された状態で、個々の細胞を経時的にトレースすることはこれまで困難でした。

今回、MEMS（メムス、Micro Electro Mechanical Systems）技術を応用した、微細加工により形成する流路デバイスを開発し、そこに BY-2 細胞をトラップすることで、個々の細胞を生きのまま経時的に観察することを可能としました。このマイクロデバイスと BY-2 細胞を用いることで、植物のシングルセルからの細胞分裂の系譜や、細胞間の物質の移動などをリアルタイムにトレースすることができるようになりました。本技術の活用により、農薬等の化合物評価や植物培養系の開発を効率化できます。

本研究成果は、2022 年 4 月 14 日付科学雑誌「PLOS ONE」オンライン版に掲載されました。

本研究は、科学研究費助成事業（18K05373、20H05501、18KT0040、18H03950、21H00368、20H03273）、科学技術振興機構（JPMJPR18K4）、新学術領域研究（20H05358）、公益財団法人キャノン財団（R17-0070）の支援のもとで行われたものです。

## 【ポイント】

- ・タバコ BY-2 細胞をトラップして培養する微細流路デバイスを設計し、MEMS 技術を用いたチップを開発した。
- ・タバコ BY-2 細胞を効率よく流路デバイスに導入するプロトコルを確立。
- ・通常の振盪培養と同等の細胞分裂活性を微細流路内で実現。
- ・細胞間の原形質連絡を介したタンパク質の移動をモニターすることに成功。

## 【研究背景と内容】

植物を含む多細胞生物では細胞間で物質をやり取りしており、高等植物では細胞間だけでなく、遠く離れた組織間でも物質や情報の交流があります。培養細胞は、これら細胞間の物質の交換やシグナリング研究の良いツールであることが期待されます。タバコ BY-2 細胞は、増殖能力が高く遺伝子組み換えが容易なため、細胞周期や核分裂などの細胞生理学分野のモデルシステムとなっておりますが、至適な培養条件下では細胞が一つにつながって増殖するため、物質や、シグナル分子の移動をモニターすることも可能であると考えられました。通常の培養方法としては、培養液中で攪拌することで細胞に栄養や酸素を供給する振盪培養が一般的ですが、この方法では、1つの細胞を経時的に追跡して観察することが困難でした。今回 BY-2 細胞を流路上に数細胞ずつ捉えることが出来る微細流路デバイスを設計し、細胞を導入することに成功しました（図 1）。この流路内には、培養液を緩やかに流し続けることが可能なため、振盪培養と同程度の細胞増殖活性を維持した状態で、一つ一つの細胞をリアルタイム観察することが可能となりました。また、流路中に 112 個のトラップゾーンを持つため、一度に多数の細胞を同時モニターすることも可能となります。BY-2 細胞は透明なため、蛍光タンパク質の発現を容易に観察することができました（図 2）。植物の細胞間には、細胞質を微細なトンネルで接続している原形質連絡が存在しており、濃度勾配に依存した物質の移動や、選択的な移動が行われていると考えられています。蛍光タンパク質（GFP）は、励起波長の強い光を照射すると蛍光が消失する性質があります。BY-2 の細胞列のうち、一部の細胞のみで蛍光を消失させると、時間の経過にしたがって蛍光が徐々に回復してきますが、細胞列全体を同条件で消光した場合には回復が見られません（図 3）。このことから GFP は原形質連絡を通過して隣接する細胞から移動してきたことが示唆されました。

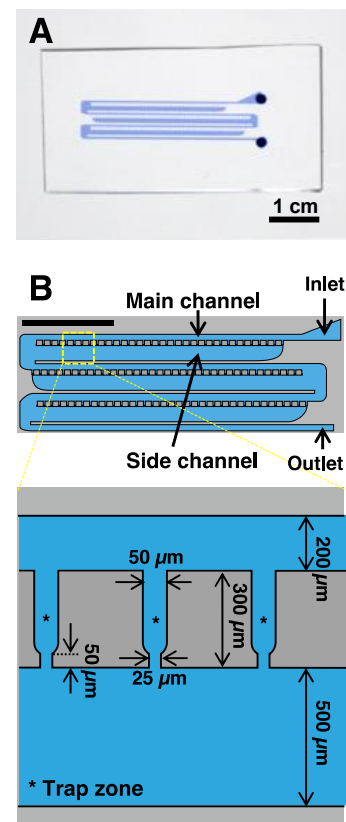


図 1 微細流路デバイスの実物 (A) およびデザイン (B)

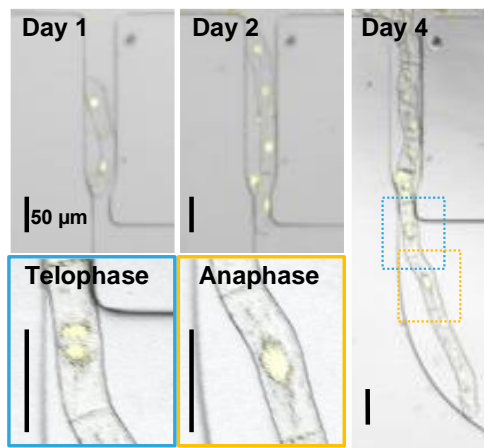


図2 微細流路デバイス内での細胞分裂、増殖のモニター。

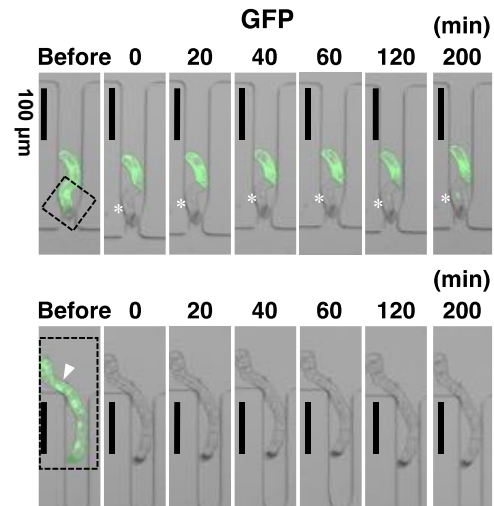


図3 細胞間のタンパク質の移動をモニター（上）一部の細胞だけの蛍光タンパク質を破壊（下）すべての細胞の蛍光タンパク質を破壊。

### 【成果の意義】

本研究により開発した、微細流路デバイスとタバコ BY-2 細胞を使用することにより、1細胞から多細胞へ分裂する間の細胞のトレースが可能となります。今後、遺伝子組み換え技術や、マーカー分子の超解像技術と合わせることで、原形質連絡による物質輸送のより詳細なモニタリングが可能となると考えられます。これにより、農薬をはじめとする化学物質など、様々な分子、物質が植物細胞の生理活性、分裂増殖、細胞運命の可塑性にどのような影響を及ぼしうるか評価することができます。

### 【論文情報】

雑誌名：PLOS ONE

論文タイトル：Development of Microfluidic Chip for Entrapping Tobacco BY-2 Cells（タバコ BY-2 細胞をトラップする微細流路チップデバイスの開発）

著者：Kazunori Shimizu, Yaichi Kawakatsu, Ken-ichi Kurotani, Masahiro Kikkawa, Ryo Tabata, Daisuke Kurihara, Hiroyuki Honda, Michitaka Notaguchi

（清水 一憲、川勝 弥一、黒谷 賢一、吉川 真広、田畑 亮、栗原 大輔、本多 裕之、野田口 理孝）

DOI：10.1371/journal.pone.0266982

URL：https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0266982