トピックス

植物先端成長細胞の機械的性質を マイクロデバイスで理解する

佐藤良勝¹, 東山哲也^{1,2}, 柳澤直樹¹

¹名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (WPI-ITbM)

²名古屋大学大学院理学研究科

1. はじめに

水やりを忘れて花壇や鉢植えの植物を萎れさせてしまった経験は、植物科学者でなくても誰しもあるのではないか。一方で、「ど根性植物」と紹介される舗装路の僅かな隙間からアスファルトを歪めて生える植物を直接目にしたりすることも少なくないだろう。これらは植物の弱さや強さを実感する対照的な光景であるが、どちらも水を吸収して体積を増大させる植物の成長のしくみと関係している。細胞外の水は細胞内外に生じる浸透圧により水ポテンシャルの低い細胞内へ流れようとする。このとき、植物細胞には物理的強度のある細胞壁が存在し、これが応力（壁圧）として働き吸水を妨げる。一方、壁圧と絶対値が等しく向きが逆の圧力（細胞膜が細胞壁を外側に押し広げる細胞内圧）は膨圧と呼ばれ、茎を直立させ葉を支える水力学的骨格として働く。その圧力は、プレッシャープローブ法を中心とした測定法により、約 0.3 メガパスカルから高いものでは 1 メガパスカルを超え、車のタイヤの圧力（約 0.2 メガパスカル）をはるかに上回ることが知られている¹⁾。植物細胞が水を吸って体積を増大させるためには、細胞内の浸透圧がさらに上昇すること、細胞壁にゆるみが生じること、あるいはその両方が必要であり、浸透圧調節と細胞壁の強度調節の調和が非常に重要である。

植物体を構成する細胞の多くは、それぞれの器官、組織の細胞極性に基づいて、分散成長と呼ばれる成長様式で伸長する。一方、細胞が全体的に伸長する分散成長とは異なり、神経細胞の軸索伸長、あるいは糸状菌の菌糸伸長のよう、細胞のごく一部が伸長する先端成長細胞が植物にも存在する。被子植物の雄性配偶子である花粉管、土壌中の水や栄養分を吸収して植物体に万遍なく行き渡らせる根毛、コケ植物蘚類の胞子

発芽直後の原糸体の頂端細胞などが、先端成長する細胞の典型例である。膨圧は細胞内で均一にかかる静水圧として働くため、先端成長は局所的なエキソサイトシスと局所的な細胞壁成分の再編を伴う細胞壁伸展が必須であると考えられている。実際、花粉管の伸長領域となる先端部は細胞壁構成成分や蓄積量が他の部位とは異なり²⁾、CFM (cellular force microscope) などを用いた計測技術により柔軟性も高いことが知られてきた³⁾⁻⁵⁾。先端部の柔軟な力学的特性は、自然界で先端成長する細胞が狭い空間に遭遇する場面、すなわち、花粉管が雌組織の狭空間を伸長する時、あるいは根毛が土壌粒子の隙間を伸長する時などにも重要であると考えられる。しかし、実際に複雑に入り組んだ組織内や土壌中で、細胞が物理的障壁に衝突する様子を生きたまま可視化するのには現在の観察技術では難しく、先端成長する細胞がどのくらい狭い隙間を通り抜けることができるのかは評価できなかった。

これまで筆者らは、植物が受精し種子をつくる上で重要な花粉管が雌性配偶体に誘引される花粉管ガイダンス機構を PDMS (ポリジメチルシロキサン) 製のマイクロ流体デバイスを用いて解析してきた⁶⁾⁻⁸⁾。その研究過程で、最小で 1 マイクロメートルの隙間のマイクロ流体デバイスを作製し、先端成長細胞の機械的性質を可視化する手法を開発した (図 1)^{9), 10)}。この手法により、先端成長する細胞が細胞径より極端に狭い 1 マイクロメートルの隙間であっても先端部分を変形させて通り抜けることができることを見出した。本研究は、浸透圧差による高い吸水力に対して局所的に低い応力を維持して伸長する先端成長細胞の柔軟な力学的特性を浮き彫りにするものである。

2. 先端成長細胞を狭小のスリットに誘導する マイクロ流体デバイスの作製

先端成長する細胞が自身の細胞径よりも狭い領域に

Mechano-properties of Tip-growing Plant Cells Analyzed by Microfluidic Devices

Yoshikatsu SATO¹, Tetsuya HIGASHIYAMA^{1,2} and Naoki YANAGISAWA¹

¹Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University

²Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

図 1
トレンシア花粉管を狭小のスリットに誘導するマイクロ流体デバイスの模式図。

直面したときの反応を解析するため、細胞が狭いスリットに向かって伸長するような流路をPDMS上に作製した。マイクロ流路内に細胞や培養液を導入できるようにPDMSにポンチ孔（リザーバー）を開けた後、PDMSとガラスボトムディッシュ表面をプラズマ処理により親水化した。最後に、双方を密着させることでデバイスを作製した。親水化処理によりPDMS面とガラス面との密着性が向上し、マイクロ流路以外の境界面への細胞伸長や、植物の高い膨圧によるデバイスのガラス面からの剥離を防ぐことができる。また、流路への培地装填方法として、ガラスボトムディッシュごとPDMSを真空処理により減圧した後、リザーバーに培地を注ぎ込むことで、マイクロ流路の隅々まで培地を浸透させることができる。また、リザーバーは植物組織の挿入口としても利用した。

3. 狭小空間での先端成長細胞のライブイメージング

筆者らは、先端成長する植物細胞として、はじめにトレンシア（学名：*Torenia fournieri*）の花粉管、シロイヌナズナ（学名：*Arabidopsis thaliana*）の根毛を用いた。その結果、細胞径約7～8マイクロメートルの花粉管および根毛は、細胞径より狭い空間まで伸長すると、先端部を流路形状に合わせて変形させながら伸長した後、PDMSで製作可能な最小の隙間、僅か幅1マイクロメートル、高さ4マイクロメートルのスリット（約4平方マイクロメートル）を通り抜けた。花粉管が狭小のスリットを通り抜けた直後には、花粉管先端部は膨潤し放射状に伸長する様子が窺えたが、その後すぐに極性を回復し先端成長を継続することが分かった（図2）。また、ヒストンを蛍光タンパク質でラベルした株を用いて解析したところ、スリット幅より大きな花粉管内部の栄養核や精細胞、根毛の細胞核も形を変形させてスリットをすり抜ける様子を確認した。

次に、筆者らは、ヒメツリガネゴケ（学名：

図 2
トレンシアの花粉管が幅1マイクロメートルのスリットに誘導され通り抜ける様子。

図 3
狭小スリットをすり抜け伸長し細胞分裂するヒメツリガネゴケ。図中の矢頭は細胞板の位置を表す。

Physcomitrella patens) の原糸体の頂端幹細胞を、①花粉管や根毛の2倍以上の細胞径（18～20マイクロメートル）がある点、②花粉管や根毛では発達しない光合成器官である葉緑体を多く含む点、③通常の伸長過程では分裂しない花粉管や根毛に対して先端成長と細胞分裂を繰り返しながら増殖する点の3つの点に注目して調べた。その結果、ヒメツリガネゴケの頂端幹細胞は、花粉管や根毛と同様に狭小のスリットをすり抜けることが分かった。通常発生時の細胞断面積から見積もると、スリット部では細胞はおよそ80分の1にまで絞られることになる。さらに、スリット通過後の流路にも葉緑体を含む細胞が複数見られたことから、細胞核や葉緑体を含むすべての細胞構成成分はスリットを通り抜け、先端成長と細胞分裂を繰り返す頂端幹細胞としての性質を保持し、増殖していることが示唆された。

4. おわりに

マイクロ流体デバイスを用いた観察により、先端成長細胞は、細胞径よりはるかに小さい空間内を伸長できる能力があることが分かった。スリット通過後の花粉管先端部が一時的に液体のように放射状に広がりながら伸長する様子は、先端成長を維持する細胞極性が一時的にゆるんだ状態と考察できるが、先端成長細胞は物理的障壁に直面したとき先端部の力学的な強度を積極的にゆるめて狭小空間に侵入する機構を備えている可能性も考えられる。この点に関しては、今のところ想像の域を出ない。しかし、今後、先端がスリットを通過する際の局所的エキソサイトーシスや細胞壁構成成分の変化を可視化することで、細胞極性の一時的な崩壊を明らかにすることは可能であろう。また、細胞先端部の強度変化については、力がかわると色が変化する蛍光性の伸展センサーをPDMSにドープすることにより、先端領域の力学的強度を測定することで、今後計測可能になると考えられる。さらに、先端成長細胞の物理的障壁に対する力学的応答の分子機構については、花粉管が雌性配偶体内では伸長しない、または破裂して種子ができない変異体の中から、花粉管を *in vitro* で伸長させた時には正常に伸長する株を選抜し、本研究のマイクロ流体デバイスを用いてアッセイすることで手がかりが得られるかもしれない。このように、モデル植物の分子基盤を活用した従来の分子遺伝学的な解析に加え、微細加工技術、蛍光性伸展センサーなどの技術を駆使した植物のレオロジー、メカノバイオロジーに挑む機運がさらに高まることを期待したい。

謝 辞

本研究の共同研究者であり、多大な支援をしてくださった新田英之博士、杉本渚さんに心から感謝いたします。

文 献

- 1) Pritchard, J. (2007) Handbook of Plant Science (Roberts, K. ed.) pp. 148-151, Wiley, Chichester.
- 2) Chebli, Y. *et al.* (2012) Plant Physiol. **160**, 1940-1955. DOI: 10.1104/pp.112.199729.
- 3) Vogler, H. *et al.* (2013) Plant J. **73**, 617-627. DOI: 10.1111/tpj.12061.
- 4) Shamsudhin, N. *et al.* (2016) PLoS ONE **11**, e0168138. DOI: 10.1371/journal.pone.0168138.
- 5) Sanati Nezhad, A. *et al.* (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 8093-8098. DOI: 10.1073/pnas.1221677110.
- 6) Horade, M. *et al.* (2013) RSC Adv. **3**, 22301-22307. DOI: 10.1039/C3RA42804D.
- 7) Sato, Y. *et al.* (2015) J. Biosci. Bioeng. **120**, 697-700. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.021.
- 8) Yanagisawa, N., Higashiyama, T. (2018) Biomicrofluidics **12**, 024113. DOI: 10.1063/1.5023718.
- 9) Yanagisawa, N. *et al.* (2017) Sci. Rep. **7**, 1403. DOI: 10.1038/s41598-017-01610-w.
- 10) Yanagisawa, N. *et al.* (2018) J. Vis. Exp. **135**, e57262. DOI: 10.3791/57262.

佐藤良勝

佐藤良勝 (さとう よしかつ)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (WPI-ITbM) 特任准教授

2001年東京大学大学院理学研究科博士課程修了, 日本学術振興会特別研究員 (基礎生物学研究所), JST ERATO 長谷部分化全能性進化プロジェクトグループリーダーなどを経て, 17年より現職。

研究内容: 植物生理学, ライブイメージングなど
連絡先: 〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町
E-mail: sato.yoshikatsu@i.mbox.nagoya-u.ac.jp
URL: <http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/liveimagingcenter>

東山哲也

東山哲也 (ひがしやま てつや)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (WPI-ITbM) 教授・副拠点長。同大学理学研究科教授

1999年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了, 99年同研究科助手, 2007年より名古屋大学理学研究科教授となり13年より現職。

研究内容: 植物生殖学, ライブイメージング
連絡先: 同上

E-mail: higashi@bio.nagoya-u.ac.jp
URL: <http://www.higashiyama-lab.com>

柳澤直樹

柳澤直樹 (やなぎさわ なおき)

日本学術振興会特別研究員 (名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所)

2013年アメリカ合衆国ワイオミング大学にてPhD取得, 13年JST ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト研究員などを経て18年より現職。

研究内容: 分析化学, マイクロ流体力学
連絡先: 同上
E-mail: yanagisawa.naoki@g.mbox.nagoya-u.ac.jp
URL: <http://www.higashiyama-lab.com>