

植物とMEMS

～マイクロデバイスで植物を理解～

新田 英之

科学技術振興機構 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

名古屋大学大学院理学研究科

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

現所属：ミリマン・インク・ジャパン

〒102-0082 東京都千代田区麴町

MEMS meet plant sciences

Key words: Pollen tube; Ovule; Plant reproduction; MEMS; MicroTAS

Hideyuki Arata

JST, ERATO Higashiyama Live-Holonics Project

Graduate School of Science, Nagoya University

Furo-chyo, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi, 464-8602 Japan

Present affiliation: Milliman Inc. Japan

Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0082 Japan

1. はじめに

デバイス（特定の機能をもった装置や道具）を小型化していくと、そのスケールに因って異なる特性を示す。我々が住むマクロのスケールは、古典的なニュートン力学が支配する世界である。一方で、ナノメートルスケールでは、量子力学の世界となる。ナノメートルスケールに届く手前のマイクロ（マイクロメートル）のスケールでは、マクロなスケールと同じく古典的なニュートン力学が支配する世界である。しかし、方程式中のどの項が支配的になるかはマクロとマイクロでは大きく異なる。例えば、質量はスケールの三乗に反比例するが、粘性抵抗は二乗に反比例する。従って、スケール則（寸法効果）により、マイクロの世界ではマクロの世界に比べ、摩擦力、表面張力など、体積よりも面積に依存する効果が支配的となる。そのため、マイクロの世界では、水はアリなど小動物にとってはねばねばしたものである。このマイクロスケール特有の物理現象を利用したマイクロの装置や人工システムでは、マクロの機器における時間的・空間的な精度や機能における限界を突破できる。

そのマイクロの装置やシステムの代表ともいえる MEMS（Micro-Electro-Mechanical Systems：メムス）は、半導体微細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（駆動装置）、電子回路などの機能単位を一つの基板（主にシリコン基板）の上に集積化したデバイ

スであり、MEMS 技術によりマイクロメートル (10^{-6}m) スケールからサブマイクロメートルスケールの構造物を製作することが可能である (藤田 2003; Arata 2010)。微小化により高感度、高応答速度を実現できるため、MEMS 技術は微小センサ (Bogue 2007)、アクチュエータ (駆動装置) (Dao et al. 2010)、光スイッチ (Toshiyoshi and Fujita 1999) などに応用されてきた。例えば、車等に搭載されている小型加速度センサや、プロジェクターに用いられている極微小ミラーアレイは、MEMS 技術の、社会へのインパクトという面で最も成功した応用例といえよう。一方で、主に MEMS 技術を用いて複数の化学プロセスをチップ上で行うマイクロ TAS (Micro-Total Analysis Systems) では、極微量サンプルでの化学・生化学実験が可能である (Reyes et al. 2002; Auroux et al. 2002)。微小空間で微量の液体を扱う場合、マクロスケールでの実験系に比べ、拡散距離が短く、比表面積 (単位体積あたりの表面積) は大きく、熱容量は小さくなる。そのため、高感度、高応答速度での並列処理や複数プロセスの連続処理などを一つのチップ上で行うことが可能である。材料費と廃棄物量も抑えられ、これらの実験を行う需要のある生物系実験現場で「その場」分析が可能であるという実用的な利点も享受できる (Arata and Fujita 2009)。MEMS やマイクロ TAS では、デバイスの一括大量生産が可能であるため、実験チップの使い捨て利用が可能であり、小さなチップ上の微小空間に多数の機能単位を集積することができるため、ハイスループットでスマートな分析デバイスを実現できる (Whitesides 2006; Craighead 2006)。そのため、マイクロチップは組織 (Huh et al. 2012)、細胞 (El-Ali, et al. 2006)、分子 (Arata et al. 2005; Rondelez et al. 2006) に至る生体の各階層を対象とした、多種多様な分析実験に応用されてきた。しかしながら、これらのマイクロデバイスを専門的に扱うコミュニティーと植物科学関連領域との連携研究の事例は、2010 年を過ぎるまで皆無であった (新田 and 東山 2014)。そのため、植物科学分野においては、顕微鏡観察下で微小なサンプルを任意の位置、方向、角度に高精度で配向、操作し、又は外部からピンポイントで刺激を与えその応答を観察するなど、マイクロデバイスが最も得意とする技術領域に、大きなフロンティアが存在している。

そのような背景のもと、著者らは、MEMS 技術を基盤としたマイクロデバイスやマイクロ流体デバイスによる植物に関わる個体 (植物寄生性センチュウ、幼植物)、組織 (胚珠)、細胞 (花粉管)、分子 (タンパク質、ペプチド等)、各レベルでの様々なサンプルを生きたまま顕微鏡下でイメージングするためのマイクロシステムの開発と、これらの技術の植物科学分野への普及を目指した研究を行ってきた。本稿では、ポリジメチルシロキサン (PDMS: poly-dimethylsiloxane) を用いたマイクロデバイスによる、雄組織である花粉管と雌組織である胚珠を扱った最新の成果二つを紹介する。一つ目はマイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析、二つ目はマイクロケージアレイを用いた胚珠の長時間ライブイメージングである。PDMS は透明で微細加工が容易であるだけでなく、高い生体適合性、低価格など、生物実験との相性が極めて高い。更に、真空チャンバなどで脱気をした PDMS は自動的に空気を吸い込むため (Hosokawa et al. 2004; Arata et al. 2012)、しばしば実験の妨げとなる狭い空間に入り込んだ気泡を自動的に除去することができるという利便性も兼ね備えている。

2. マイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析

花粉が雌しべに受粉すると、花粉から伸び出した花粉管細胞が標的の卵装置（胚のう）に精細胞を運び、受精が行われる。この過程は、花粉管と雌しべとの間で複雑かつ精密な細胞間コミュニケーションにより達成されるため花粉管ガイダンス（花粉管誘導）と呼ばれている。近年、花粉管ガイダンスに関わる様々な興味深い分子機構が明らかにされつつあり、雌しべ内での複雑なシグナリングの実態解明からは、学術的に価値の高い知見ばかりでなく、食糧、環境、エネルギー問題解決への糸口が期待できる。これらの研究は、従来のアガロースゲル培地上での体外受精系にて遂行されてきたが、従来法においては無数の花粉管がゲル上で無秩序に伸長してしまうため、その伸長速度や方向の定量的な解析だけでなく、ゲル上で物質を定量的に添加したり計測したりすることも困難であった（図1; Higashiyama et al. 2001）。我々は、マイクロ流路デバイスを用いて花粉管伸長を定量解析することにより、花粉管と雌しべ間コミュニケーションの定量解析を目指した基盤技術の開発を行ってきた。

花粉管伸長速度計測実験用に製作したPDMS マイクロ流路デバイスは、受粉した花柱から伸びた多数の花粉管を個別にチャンネルに誘導する形状であり、流路の高さが5~20 μm で、幅は8、12、16、20 μm のデバイスをそれぞれ製作した（図2）。花粉管伸長実験においては、デバイス内に液体培地を充填した後、受粉させたトレンニア（花瓜草：*Torenia fournieri*）の花柱を1 cm程度の長さに切り、花柱差込口に設置した。受粉後約3~5時間で、伸長した花粉管は花柱を通過、デバイス内に進入し、マイクロ流路に到達する。このように、花粉管が*in vivo*から*in vitro*環境下へ、負荷なく伸長し、その挙動をライブイメージングできるシステムとプロトコルを確立した。花粉管一本を2次元空間に閉じ込め、かつ無理なく伸長させることができる最適なチャンネルの高さは5 μm から12 μm の範囲であることをつきとめた。流路幅は花粉管の速度に影響を与えず、5 μm から12 μm の範囲であれば花粉管一本のみが進入することが分かった。また、従来のアガロースゲルを用いた花粉管伸長アッセイと本手法での花粉管伸長の計測速度を比較すると、前者（ $10.2 \pm 6.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ）に比べ、後者（ $50.2 \pm 9.6 \mu\text{m}/\text{min}$ ）が測定値も高く、かつ相対的にバラつきも抑えられていた。これは、アガロースゲル上では花粉管は垂直方向にもランダムに伸長することが要因の一つであると考えられる。また、流路内での伸長速度は、*in vivo*での伸長速度を、花柱を通過する時間から計測した先行研究（約40 $\mu\text{m}/\text{min}$ ）（Higashiyama et al. 1997）により近い値であるため、本計測法は従来法に比べ、*in vivo*により近い環境での花粉管伸長速度計測が可能であることを示した（Horade et al. 2014）。マイクロ流路又はスリット内で花粉管伸長を計測する本手法を用いると、花粉管伸長は顕微鏡焦点面内に限定されるので、高精度で高効率な個々の花粉管の伸長観察が可能となる。本計測法を用いることにより、花粉管が誘引シグナルを受容し応答するしくみや、花粉管が誘引シグナルに応答できるようになる受精能獲得のしくみ、助細胞以外のガイダンス因子の探索など、学術的価値の高い知見の獲得が期待できる。

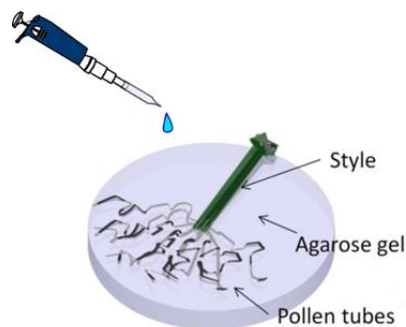


図1 アガロースゲルを用いた、従来の花粉管伸長実験（体外受精系）。

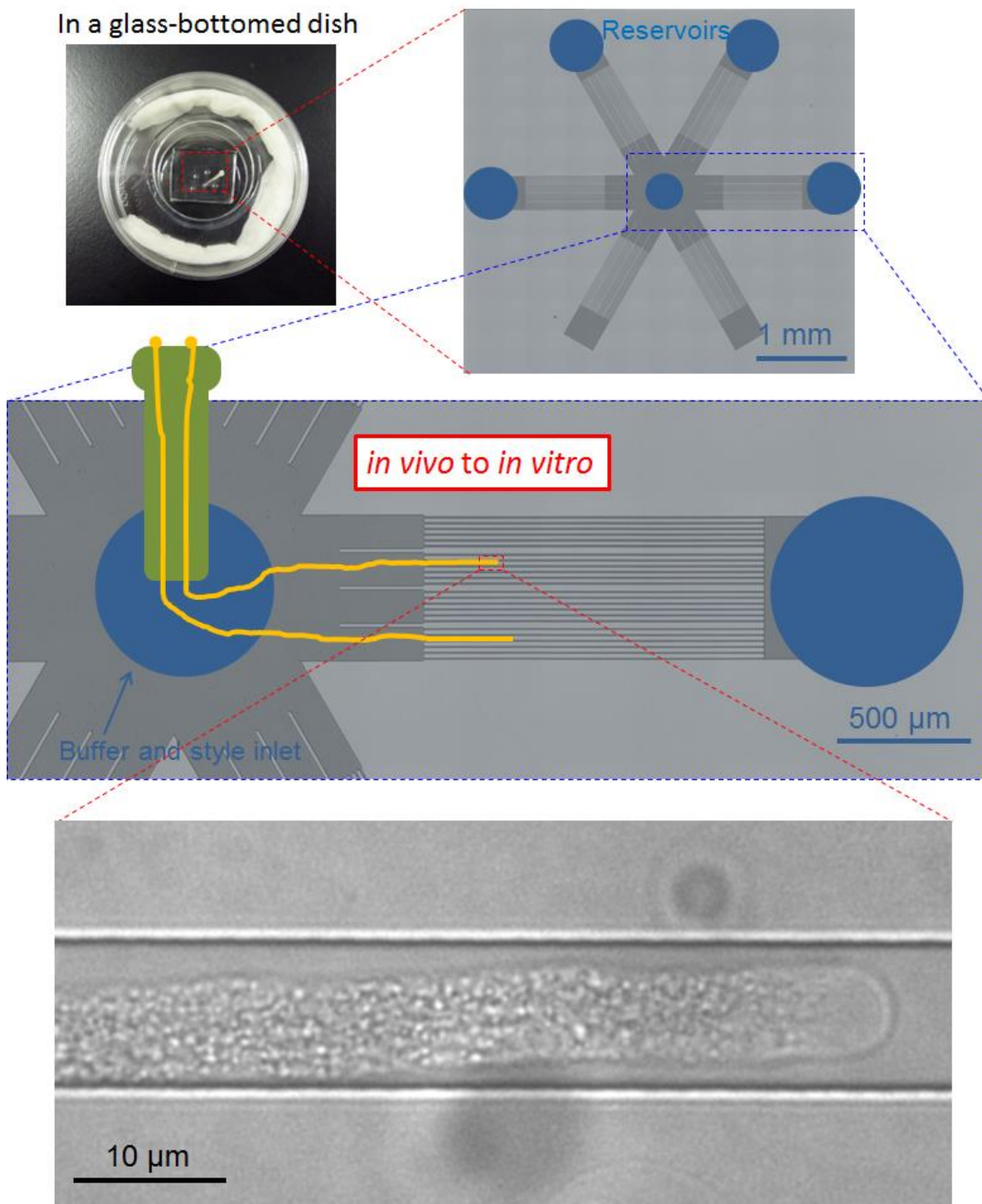


図2 花粉管伸長速度計測用マイクロ流路デバイス。PDMSで製作されたマイクロ流路デバイスはガラスボトムディッシュ内に配置され、流路内に液体培地を充填した後、受粉させた花柱を1 cm程度の長さに切り、花柱差込口に設置することにより、伸長した花粉管が花柱を通過後デバイス内に入し、マイクロ流路に到達する。

3. マイクロケージアレイを用いた胚珠の長時間ライブイメージング

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つである。胚発生の機構解明のためには安定した種子（胚珠）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るが、水溶液中でその成長を観察する従来の手法では、観察中に胚珠が移動してしまい、長時間に渡って経時的に観察することが難しかった。また、マイクロニードルなどの既存の実験器具を用いて固定しようとする、その成長を阻害してしまうなどの問題があった。そのため、胚珠の成長を阻害することなく長時間、安定的に培養する技術の開発が重要な課題となっていた。また、多数の胚珠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た。本研究では、微小なケージ（檻）型の構造物をアレイ化したマイクロデバイスにより、胚珠を固定し、長時間固定するというアイデアを考案した。

培養されたシロイヌナズナの胚珠の寸法を参考にして、マイクロケージ・マイクロアレイの設計を行った。その後、PDMS を素材とし、ソフトリソグラフィ（マイクロ加工技術の一種）により、多数のマイクロケージとマイクロピラーをアレイ（配列）状に配置したマイク

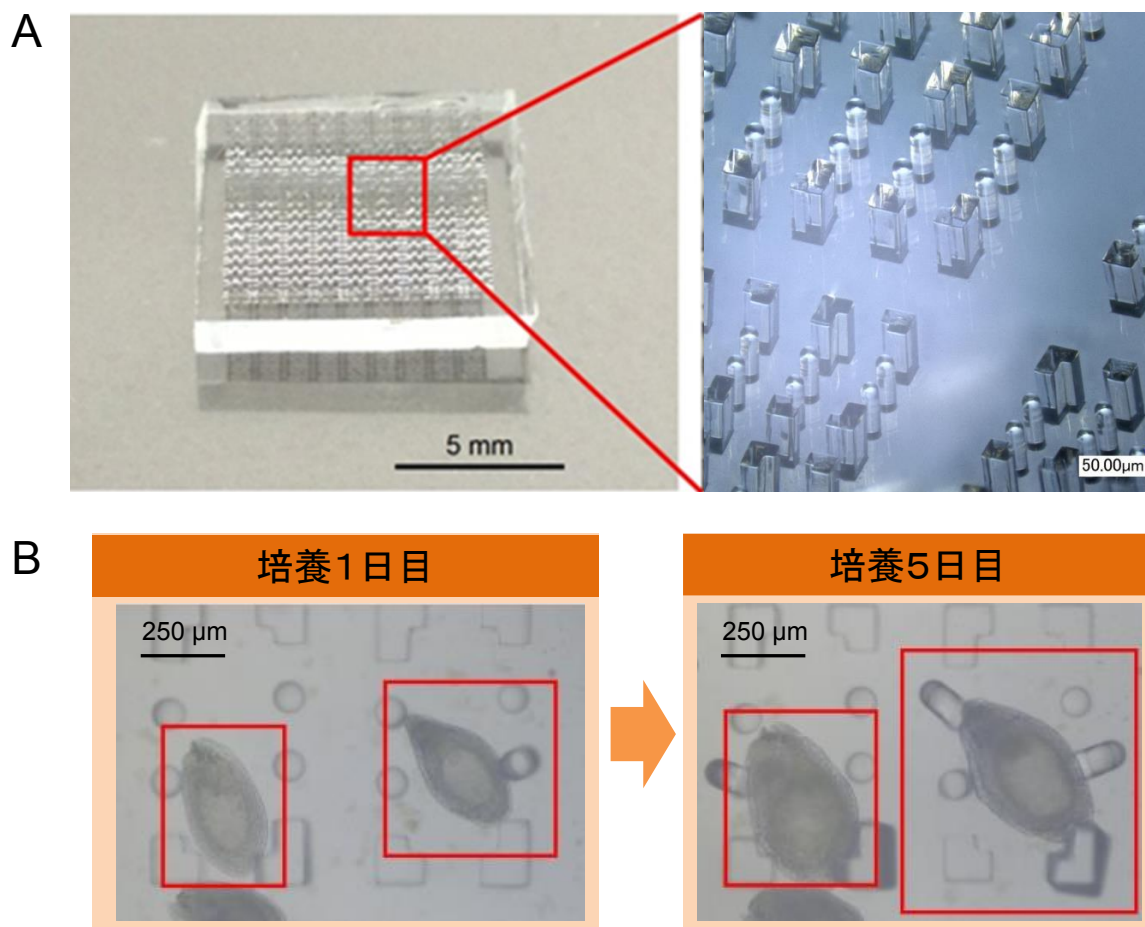


図3 (A) ケージの幅が $250 \mu\text{m}$ のマイクロケージアレイの全体図（左）と、その拡大図（右）。デバイス全体は、一辺が約1センチメートルの正方形の形になっていて、その中に96個（ケージ幅 $200 \mu\text{m}$ のアレイでは112個）のマイクロケージが配列されている。(B) マイクロケージアレイ内で培養され、成長する胚珠。

マイクロアレイを作製した (図 3 A)。PDMS は柔軟性を持つため、胚珠の成長を阻害する物理的な影響を与えずに、長時間の培養が可能である。ケージの設計では、その全長は胚珠の成長後の長さを想定し、650 μm に設計したが、幅は 150, 200, 250, 300 μm の四つの異なる幅を持つデバイスを作製して、胚珠を格納するために最適な規格を割り出す検証実験を行った。その結果から、長期間にわたる胚珠の培養に適するケージ幅として、200 μm と 250 μm を選択した。その後、マイクロアレイを用いて、胚珠を固定し、1 週間培養を行い、その成長を記録した (図 3 B)。その結果、胚珠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、胚珠の成長を物理的負荷により阻害しないことも確認できた。このように、マイクロアレイを用いて胚珠を固定することで、観察対象の胚珠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た (Park et al. 2014)。今回開発したマイクロアレイはその規格を変更するだけで、有用な農作物など、シロイヌナズナ以外の種の胚珠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、更には胚珠以外の植物組織の培養実験、長時間観察にも応用が可能であり、その実験効率を大幅に改善することができる。

4. 展望

本稿では、マイクロデバイスを用いて初めて可能となった、花粉管伸長解析、胚珠の長時間ライブイメージングについて紹介した。従来のバルク計測システムに比べ、マイクロデバイスを用いることにより、実験の高精度化、高速化だけでなく、多点観察や並列処理などが可能となる。今後、雄組織である花粉管解析用デバイスと、雌組織である胚珠観察用デバイスの要素技術を融合すれば、更に精緻で多様な実験や観察が期待できる。更に、実験チップの使い捨て利用や、少量の試料での実験を、生物系実験室の現場で、大がかりな設備なしに遂行できるなど、実用的なメリットも享受できる。そのため、マイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析や、マイクロアレイを用いた胚珠ライブイメージングの技術が植物科学コミュニティに普及すれば、関連分野の研究が加速され、学術的価値の高い知見の獲得だけでなく、農作物の収量の向上、乾燥や病気に強い作物を作り出す農業、育種技術、種子の成長向上や食料増産技術など、環境問題や食糧問題、エネルギー問題解決への糸口が期待できる。

PDMS やガラスを主な材料とし、その表面に微細加工を施したマイクロチップは、主に生物物理学分野で威力を発揮してきた磁気ピンセット、光ピンセット、一分子蛍光イメージングなど、ナノメートルスケールで生体試料を操作・計測する一分子システムと相性がよい。そのため、双方を融合させることにより、分子レベルでの精緻で高精度な実験や新たなパラメータの計測を実現し (Arata et al. 2009)、現在では生物物理学分野で必要不可欠な技術となった。これまでマイクロチップを用いたバイオ実験といえば、核酸や蛋白質など、分子スケールを対象とする実験ばかりが注目されてきた。しかし、植物科学への貢献を目指す場合、対象とすべき階層は組織から細胞であることも多く、そのスケールはミリメートルから数百マイクロメートルである。扱う試料のサイズも多岐にわたるため、これまでのトレンドから

視点を変え、ナノ・マイクロだけでなく、ミリの技術へ目を向けることも重要な方向性の一つであると考えている。従来の掘削型精密加工技術だけでなく、近年複雑な立体構造物製作が可能となった光造形技術（通称3Dプリンタ）などを積極的に取り込むことにより、スマートで実用的な” Plant/Machine Interface (PMI)” 技術が期待でき、その応用は無限に広がるといっても過言ではない。マイクロスケールのプラットフォームを基盤に、ナノからミりに渡るスケール横断的技術連携から、植物科学、ひいては農業技術にブレークスルーをもたらす新技術が生まれるものと確信している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、科学技術振興機構 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト、並びに科学研究費補助金若手研究（A）（研究課題番号：25706013）の助成により遂行された。

引用文献

- 新田英之、東山哲也 2014. 極微小デバイスを用いた生体分子・細胞・組織の顕微操作と解析. *Plant Morphology* 25: 61-66
- Arata, H. F., Rondelez, Y., Noji, H., Fujita, H. 2005. Temperature alternation by an on-chip microheater to reveal enzymatic activity of beta-galactosidase at high temperatures. *Analytical Chemistry* 77: 4810-4814
- Arata, H. F., Fujita, H. 2009. Miniaturized thermocontrol devices enable analysis of biomolecular behavior on their timescales, second to millisecond. *Integrative Biology* 1: 363-370
- Arata, H., Dupont, A., Miné, J., Disseau, L., Renodon-Cornière, A., Takahashi, M., Viovy, J.L., Cappello, G. 2009. Direct observation of twisting steps during Rad51 polymerization on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 19239-19244
- Arata, H.F. 2010. Portable diagnostic technologies for resource poor environments, *Micro Electro Mechanical Systems, MemS: Technology, Fabrication Processes and Applications*, Chapter 11, Nova Science Pub Inc.
- Arata, H., Komatsu, H., Hosokawa, K., Maeda, M. 2012. Rapid and Sensitive MicroRNA Detection with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification on Power-Free Microfluidic Chip. *PLOS ONE* 7, p.e48329
- Auroux, P. A., Iossifidis, D., Reyes, D. R., Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry* 74: 2637-2652
- Bogue, R. 2007. MEMS sensors: past, present and future. *Sensor Review* 27: 7-13
- Craighead, H. 2006. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* 442: 387-393
- Dao, D.V., Nakamura, K., Bui, T.T., Sugiyama, S. 2010. Micro/nano-mechanical sensors and actuators based on SOI-MEMS technology. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol* 1: 013001- 013010
- El-Ali, J., Sorger, P.K., Jensen, K.F. 2006. Cells on chips. *Nature* 442: 403-411
- 藤田博之 2003. 「マイクロ・ナノマシン技術入門」工業調査会

- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., Kuroiwa, T. 1997. Kinetics of double fertilization on *Torenia fournieri* based on direct observation of the naked embryo sac. *Planta* 203: 101–110
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483
- Horade, M., Yanagisawa, N., Mizuta, Y., Higashiyama, T., Arata, H. 2014. Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device. *Microelectronic Engineering* 118: 25-28
- Hosokawa, K., Sato, K., Ichikawa, N., Maeda, M. 2004. Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis. *Lab on a Chip* 4: p.181–185
- Huh, D., Torisawa, Y.S., Hamilton, G.A., Kim, H.J., Ingber, D.E. 2012. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a chip* 12: 2156-2164
- Park, JH., Kurihara, D., Higashiyama, T., Arata, H. 2014. Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation. *Sensors & Actuators B: Chemical* 191: 178–185
- Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry* 74: 2623-2636
- Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K. V., Arata, H., Fujita, H., Takeuchi, S., Noji, H. 2005. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nature Biotechnology* 23: 361-365
- Whitesides, G. M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442: 368-373
- Toshiyoshi, H., Fujita, H. 1996. Electrostatic micro torsion mirrors for an optical switch matrix. *Journal of Microelectromechanical Systems* 5: 231-237