

様式 C - 7 - 1

令和元年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	細川 陽一郎		

1. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 2. 課題番号 18H05493

3. 研究課題名 顕微技術を駆使した計測と制御による細胞構造のしなやかさの高精度解析

4. 研究期間 平成30年度～令和4年度 5. 領域番号・区分 8005 計画研究

## 6. 研究実績の概要

AFMにより植物個体を適切に評価するための試料の固定方法について、従来まで用いられてきた接着剤、両面テープによる固定方法に加え、フォトリソグラフィーとウエットエッチングにより作製したガラス製のマイクロピラーチップを作製した。このマイクロピラーチップのピラーの間にシロイヌナズナの根を伸長させることに成功し、さらに伸長した根はピラーに絡まりしっかりと固定された。この方法では、接着剤、両面テープなどと異なり、根の成長は阻害することではなく、成長するシロイヌナズナの根の日単位の弾性応力の変化をAFMにより検出することができるようになった。さらに超長作動対物レンズを用いた光学システムをAFMと組み合わせ、AFM探針側から細胞表面を細胞レベルで観察しながら測定対象となる細胞にフェムト秒レーザーを集光照射し、細胞表面の弾性・塑性できるシステムを構築した。このシステム構築により、植物生理の研究で広く用いられているシロイヌナズナを対象として研究を進められるようになった。フェムト秒レーザーを細胞壁に照射することにより、細胞内の膨圧を緩和させることに成功し、膨圧に依存しない細胞壁の弾性応力を評価することができた。その結果、植物細胞の弾性評価には、これまでフォースカーブの解析に用いられてきたヘルツの理論に基づく方法が適さないことが分かり、植物細胞特有である細胞壁の壁構造を建築学に基づく物理からアプローチし解析しようとしている。

## 7. キーワード

原子間力顕微 フェムト秒レーザー フォースマッピング 顕微細胞操作 液胞制御

## 8. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由

前年度に植物細胞のAFM計測を推進しているフランスの研究グループを訪問し、ここで植物個体を接着剤もしくは両面テープにより顕微鏡に固定してAFM計測を行うことにより計測する技術指導をうけた。しかしこの方法では、基板に植物個体を接着することによりその成長を妨げるため、日単位の長期間で同一試料の評価ができないことが分かった。そこで、これまで我々が培ってきた、ガラスの微細加工技術を適用し、マイクロピラーチップを作製し、試料を固定することを考案し、その方法で従来方法を上回る性能で植物細胞の弾性応力の変化を計測できるようにした。この方法は、共同研究を実施している出村、藤原、澤、小竹グループなどに注目されており、今後シロイヌナズナの試料提供を受け、その評価を推進していくことを予定している。

また、前年度、超長作動対物レンズの納品が遅れ、若干の計画の遅れが生じていたが、AFM探針側から細胞表面を細胞レベルで観察しながら測定対象となる細胞にフェムト秒レーザーを集光照射装置を順調に構築できた。この装置により、従来方法では適用できなかったシロイヌナズナの上皮細胞にフェムト秒レーザーを集光照射できるようになり、そのレーザー照射前後の細胞の弾性応力の変化より、膨圧によらない細胞壁の弾性応力を評価することができた。その弾性応力が示した結果は、当初の予測とは異なるものであり、従来までの解析に用いられてきたヘルツの理論に基づくものではなく、植物細胞特有の構造に由来することに帰結できるものであった。これらの研究により得られた知見は、本研究領域の趣旨に合致するものであり、計画は概ね順調に進んでいると言える。

## 9. 今後の研究の推進方策

細胞壁の物理モデルをAFMによる実験にて得られるフォースカーブと照合する方法を確立し、モデルの妥当性を示す。さらに、これまでの研究で生きた植物細胞の細胞壁のヤング率や張力の定量値は明確には示されていない。今後の研究では、実験データと物理モデルを照合することにより、これらの定量値を導出する手法の構築を目指す。この定量評価を実現するために、細胞壁を物理モデルに照合しやすくなるようにフェムト秒レーザーで加工し、AFM測定をおこなうことを新たに計画している。さらに、プレッシャーブローパーにより細胞内圧を調べる別方法と組み合わせていく。

超長作動対物レンズを用いたAFMを併用できるフェムト秒レーザー集光照射装置を構築できることにより、植物生理の研究で広く用いられているシロイスナズナを対象として研究を進められるようになった。これまでシロイスナズナを用いた研究を推進している澤、森田、藤原、小竹らから、細胞壁の構造を改変した植物細胞の提供をうけ、AFMとフェムト秒レーザーを用いた実験をおこない、分子レベルの細胞壁構造の変化が、マクロレベルの細胞壁のヤング率や張力に如何なる影響を与えるかを明らかにしていく予定をしている。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著論文 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhen-Yi Hong, Kazunori Okano, Dino Di Carlo, Katsunori Tanaka, Yaxiaer Yalikun and Yoichiro Hosokawa	4. 卷 297
2. 論文標題 High-speed micro-particle manipulation in a microfluidic chip by directional femtosecond laser impulse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators A: Physical	6. 最初と最後の頁 111566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.sna.2019.111566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoichiro Hosokawa	4. 卷 Vol. 58, No. 11
2. 論文標題 Applications of femtosecond laser-induced impulse to cell research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JJAP invited review	6. 最初と最後の頁 110102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.7567/1347-4065/ab4749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Taufiq Indra Rukmana, Gabriela Moran, Rachel Meallot-Renault, Misato Ohtani, Taku Demura, Ryohei Yasukuni & Yoichiro Hosokawa	4. 卷 9
2. 論文標題 Enzyme-Assisted Photoinjection of Megadalton Molecules into Intact Plant Cells Using Femtosecond Laser Amplifier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-019-54124-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名  
細川陽一郎2. 発表標題  
顕微技術を駆使した計測と制御による細胞構造のしなやかさの高精度解析3. 学会等名  
新学術領域研究「植物構造オプト」第2回班会議（招待講演）4. 発表年  
2019年1. 発表者名  
Takanori Maeno, Takanori Uzawa, Izumi Kono, Kazunori Okano, Takanori Iino, Taro Ogawa, Osamu Iwata, Takuro Ito, Kengo Suzuki, Keisuke Goda, Yoichiroh Hosokawa2. 発表標題  
Femtosecond laser photoporation of fluorogenic peptide aptamers for highly sensitive imaging of polysaccharides in Euglena gracilis3. 学会等名  
The 8th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (国際学会)4. 発表年  
2019年1. 発表者名  
Yusuke Ajikawa, Tomoyuki Suzuki, Yalikun Yaxiaer, Yoichiroh Hosokawa2. 発表標題  
Acoustic cell arrangement in micro-fluidic chip for cells sorting by femtosecond laser-induced impulsive force3. 学会等名  
M&BE2019 (国際学会)4. 発表年  
2019年1. 発表者名  
Y. Yalikun, Z. Tianlong, C. Fang, M. Namoto, Y. Hosokawa2. 発表標題  
Particle Arrangement in Microfluidic Chip by Additive Femtosecond Laser Processing in the Channel3. 学会等名  
15th International Conference on Laser Ablation (国際学会)4. 発表年  
2019年

## 1. 発表者名

Yoichiroh Hosokawa

## 2. 発表標題

Femtosecond Laser-induced Impulsive Force in Applications for Cell Research

## 3. 学会等名

第80回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

Yansheng Hao, Chaoying Fang, Ming Li, Yaxiaer Yalikun, Yoichiroh Hosokawa

## 2. 発表標題

A Transparent Flow Velocity Sensor of Ultra-thin Glass Sheet Fabricated by Femtosecond Laser Processing

## 3. 学会等名

第80回応用物理学会秋季学術講演会

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

Tianlong Zhang, Misuzu Namoto, Chaoying Fang, Ming Li, Yalikun Yaxiaer, and Yoichiroh Hosokawa

## 2. 発表標題

Femtosecond Laser-processed Pattern on Glass Substrate for Focusing Microparticles in Fluid

## 3. 学会等名

第80回応用物理学会秋季学術講演会

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

秋田絵理, 竹林竜, 岡野和宣, Yalikun Yaxiaer, 岸田佳祐, 國枝正, 出村拓, 澤進一郎, 細川陽一郎

## 2. 発表標題

ガラス製マイクロデバイスを用いた植物組織のAFM力学計測

## 3. 学会等名

第80回応用物理学会秋季学術講演会

## 4. 発表年

2019年

1. 発表者名  
竹林竜, 秋田絵理, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎

2. 発表標題  
原子間力顕微鏡とフェムト秒レーザーを用いた細胞組織の力学特性解析

3. 学会等名  
第80回応用物理学会秋季学術講演会

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
Taufiq Indra Rukmana, Gabriela Moran, Rachel Meallet-Renault, Misato Ohtani, Taku Demura, Ryohei Yasukuni, Yoichiro Hosokawa

2. 発表標題  
Photoinjection of Fluorescence Nanoparticles into Plant Cells Using Femtosecond Laser Amplifier with Additional Enzyme Treatment

3. 学会等名  
第80回応用物理学会秋季学術講演会

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
岸田 佳祐, 國枝 正, 津川 晓, 細川 陽一郎, 出村 拓

2. 発表標題  
VND7木部道管細胞誘導系を用いたシロイヌナズナの二次細胞壁パターン形成制御の解析

3. 学会等名  
日本植物学会第83回大会

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
秋田絵理, 竹林竜, 岡野和宣, Yalikun Yaxiaer, 岸田佳祐, 國枝正, 大谷美沙都, 出村拓, 澤進一郎, 細川陽一郎

2. 発表標題  
AFM力学計測のための新規ガラスマイクロデバイスの開発

3. 学会等名  
植物構造オプト第1回若手の会

4. 発表年  
2019年

## 1. 発表者名

竹林竜, 秋田絵理, 岡野和宣, 細川陽一郎

## 2. 発表標題

フェムト秒レーザーアブレーション法とAFMを組み合わせた単一植物細胞の力学計測装置の開発

## 3. 学会等名

植物構造オプト第1回若手の会

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

上田勇真, Taufiq Indra Rukmana, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎, 出村拓, 大谷美沙都

## 2. 発表標題

フェムト秒レーザーを用いた単一植物細胞への巨大分子導入

## 3. 学会等名

植物構造オプト第1回若手の会

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

山本将也, 阿路川雄介, 寺西教裕, 安國良平, 細川陽一郎

## 2. 発表標題

マイクロデバイス中のフェムト秒レーザー誘起衝撃力の数値解析

## 3. 学会等名

植物構造オプト第1回若手の会

## 4. 発表年

2019年

## 1. 発表者名

岸田佳祐, 國枝正, 津川暁, 秋田絵理, 岡野和宣, 細川陽一郎, 出村拓

## 2. 発表標題

シロイヌナズナ木部道管細胞誘導系によって形成される二次細胞壁の力学的解析

## 3. 学会等名

植物構造オプト第1回若手の会

## 4. 発表年

2019年

1. 発表者名 細川陽一郎
2. 発表標題 AFM Force Measurement of Arabidopsis Utilizing Femtosecond Laser Processing and Glass Micro-Device
3. 学会等名 熊本大学ミニシンポ "Strategies of mechanical optimization in plants" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川陽一郎
2. 発表標題 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞間の力学相互作用の解明
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹林竜, 秋田絵里, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎
2. 発表標題 フェムト秒レーザーと原子間力顕微鏡を用いた単一植物細胞の力学計測
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安國良平
2. 発表標題 フェムト秒レーザーを用いた植物細胞へのナノ粒子導入
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

1 1 . 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4 . 備考

-