

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	生体プロセス工学研究室 (細川 陽一郎 教授)		
学籍番号	2221025	提出	令和 6年12月17日
氏名	山崎 勇輝		
題目	Quantification of mechanical states of living plant cells utilizing atomic force microscope 原子間力顕微鏡を駆使した植物生細胞の力学状態の定量評価に関する研究		

【序章】 第1章では、本研究の背景と目的について述べた。植物細胞の形状や構造は、細胞内圧となる膨圧と細胞壁の応力のバランスによって維持されており（図1）、これらの力学バランスの変化は植物の形態変化をもたらす。形態変化の理解を深めるために、このバランス変化を時系列として定量評価する手法の確立が

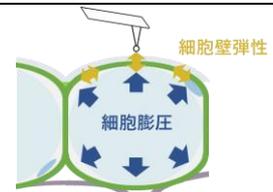


図1 植物細胞の力学状態模式図

望まれており、非破壊測定のアトム間力顕微鏡（AFM）を利用した測定が注目されている。AFMによる荷重-変位曲線（フォースカーブ）測定では、生細胞を垂直に押し込むため、膨圧と細胞壁の応力を含む。しかし、フォースカーブから、膨圧と細胞壁応力を分離して定量評価する有効な方法は確立されていない。そこでAFMによる植物細胞の力学測定と、その解析手法の問題点を明らかにし、新たな解析手法を開発することを目的とした。

【実験原理と方法】 第2章では、本研究で用いたAFMとフォースカーブの解析原理について述べた。第3章では、フェムト秒レーザー導入AFM計測システムの装置構成と、使用したタマネギ試料や試薬の特徴について述べた。本研究で主として使用した試料は単層剥離したタマネギ鱗片葉表皮細胞である。本研究ではAFMによるフォースカーブ測定とトポグラフィ測定をおこない、植物細胞への点荷重に対する応力と形状から力学状態を解析した。

【植物細胞の弾性測定】 第4章では、弾性体におけるフォースカーブの解析で広く用いられるヘルツの接触理論による定量評価の問題点を検証した。ここでは、成長によって植物細胞の細胞壁の弾性 E や膨圧 P が変化するとされる試料のフォースカーブ測定とヘルツ理論による解析、植物細胞とは異なる均質バルク試料を測定した結果と比較した。その結果、ヘルツの接触理論による弾性解析が植物細胞では適用条件を満たさないこと、得られる見かけの弾性 E' は膨圧 P の影響に支配されることが示された。

【見かけの弾性と膨圧の関係性】 第5章では、ヘルツ理論に代わる新たな解析方法の検討の指針を示すために、AFMフォースカーブ測定、トポグラフィ測定と植物細胞の膨圧状態依存性を調査した結果について述べた。ここでは、膨圧変化に伴う可能性がある生理状態変化の影響を排除するために、フェムト秒レーザーパルス照射によって細胞の膨圧を瞬時に緩

和させる手法を用いた。膨圧減少前後でフォースカーブの傾き k と、トポグラフィーから得た細胞の膨らみ高さ H の変化を比較した結果、 k と H は膨圧に連動して減少することが明らかになった。これは、膨圧による膨らみによって表面積が増加したことで形成された引張構造により、細胞が硬くなることを示している。また、フェムト秒レーザー穿孔による膨圧減少から得た結果と、浸透圧調整による膨圧減少から得た結果は、どちらも同様の傾向を示した。これは膨圧変化過程では細胞の力学状態を変化させるような生理状態変化は発生しないことを示している。細胞の硬さ変化は、内圧によって支持された薄膜の物理に関する問題と考えることができる。

【シェル理論による細胞壁弾性と膨圧の同時測定】

第 6 章ではここまでで明らかになった事実に基づき、シェル理論とヤングラプラス方程式を組み合わせた弾性と膨圧の同時解析手法を提案した。弾性シェル理論では、内圧に支持された薄膜における押し込み試験を定式化している。一方、ヤングラプラス方程式は内圧によって膨張する弾性薄膜の形状決定を定式化している。 P と E に関する 2 式のグラフ上での交点は、対象の植物細胞の細胞壁弾性と膨圧を一意に決定する。また、これらの式の計算に必要なパラメータは膜厚を除きすべて AFM で取得できる。本解析法の検証は、FEM シミュレーションと比較と、浸透圧調整中の細胞を解析して得られた弾性と膨圧変化の評価によって行った。

FEM シミュレーションとの比較では非常に良い一致が確認された(図 2)。また、浸透圧制御調整下にある細胞の経時測定では、細胞壁弾性 E が変化し、膨圧 P が減少することが示された(図 3)。ここで得られた $P=0.01\sim 1$ MPa、 $E=100\sim 100$ MPa は、これらの値を個別に測定した過去の測定とおおむね一致している。

【総括】 AFM を用いた細胞弾性・膨圧測定手法における既存の方法の限界と問題点を明らかにした。次に、膨圧による膨らみと引張構造が細胞の硬さに影響を及ぼしていることを明らかにした。これらの結果からシェル理論を用いた解析方法を提案した。最後に、浸透圧調整中の細胞に適用して弾性と膨圧変化を評価し、本手法が植物細胞の細胞壁弾性と膨圧の同時解析に有効であることを示した。

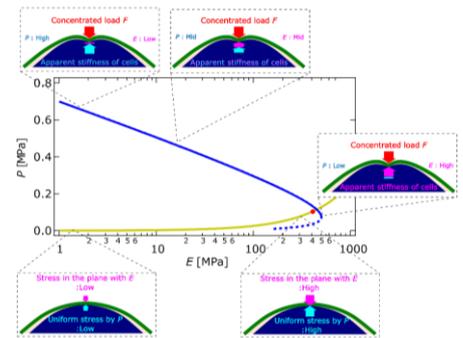


図 2 シェル理論(青線)とヤングラプラス方程式(黄線)の交点に対する FEM シミュレーション結果(赤点)

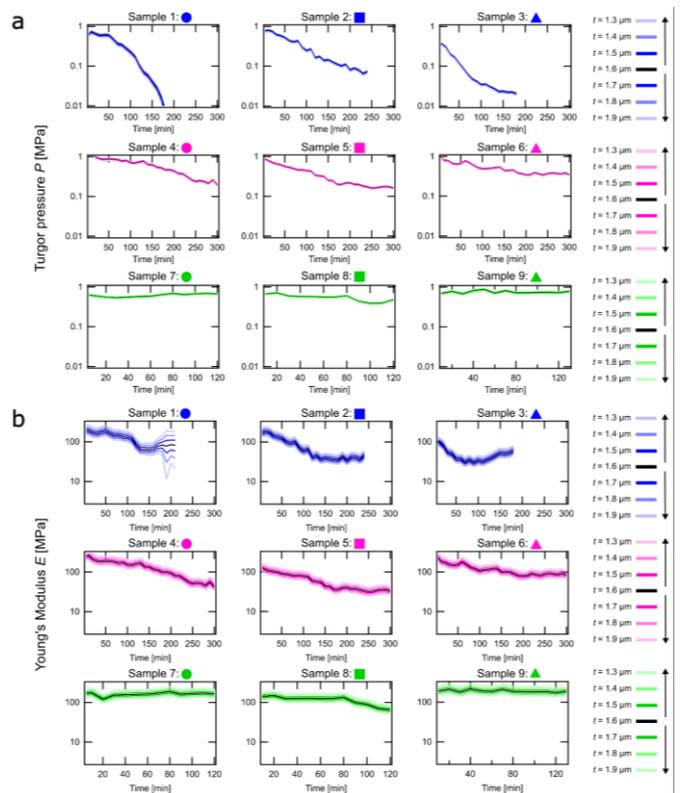


図 3 浸透圧調整中の細胞(青、マゼンダ)と純水中の細胞の力学状態変化。(A) 膨圧 P (B) ヤング率 E

(論文審査結果の要旨)

植物細胞の細胞壁の硬さと細胞内圧(膨圧)は、生理状態に連動して柔軟に変化し、植物の形態形成や環境に適用する動的変化のための原動力となっている。しかしながら、これらの植物細胞を理解するための基本パラメーターの動的変化を、細胞を壊さずに測定する手法がなかった。本論文では原子間力顕微鏡(AFM)測定により、植物細胞の弾性と表面形状を測定し、得られた定量値を解析することにより、細胞壁の弾性と膨圧を非破壊かつ同時に得られる新手法について記されている。

試料としてタマネギ鱗片葉が準備され、ガラスボトムディッシュ上に固定され、鱗片葉の表皮細胞にAFM探針を接触させた押し込み試験(フォースカーブ計測)と表面形状測定(トポグラフィー測定)が行われた。フォースカーブ計測により細胞の見かけの弾性率(バネ定数)を、トポグラフィー測定により細胞表面の曲率が見積もられた。これらの定量値を、弾性シェル理論に基づく細胞壁に加わる外力と細胞壁の張力のつり合いの式と、ヤングラプラス方程式に基づく細胞壁に加わる外力と細胞壁の張力のつり合いの式からなる連立方程式に代入し、その解より細胞壁の弾性と膨圧を求めた。この手法では、細胞を破壊することではなく、フォースカーブ計測とトポグラフィー測定を繰り返していくことで、細胞壁の弾性と膨圧の時間変化を同時並行で追跡できる。

本論文では、その実験および解析方法が記され、得られた細胞の細胞壁の弾性と膨圧の定量値が、従来の破壊計測で得られた値と比べて妥当であることが述べられている。さらに細胞に高濃度マンニトール溶液を添加し、浸透圧により膨圧が低下していく細胞の弾性と膨圧の変化を計測し、弾性と膨圧の時間変化が追跡できることを示している。

上記のとおり、本論文に示された手法は、従来法では不可能であった生きた植物細胞の細胞壁の弾性と膨圧の逐次的な同時測定を実現しており、その成果は、新規の計測技術の開発にとどまらず、今後の植物学の研究に大きなインパクトを与えると期待される。よって審査員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。