

様式 C - 7 - 1

平成24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）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 補助事業期間 平成22年度～平成26年度
5. 課題番号

2	2	1	2	0	0	1	0
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題 フェムト秒レーザーを駆使した植物細胞の局所操作と刺激法の開発

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 4 4 8 0 8 8	ホソカワ ヨウイチロウ 細川 陽一郎	物質創成科学研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

高強度のフェムト秒レーザーを顕微鏡で集光した時、集光点で多光子吸収が引き起こされ、さらには切断現象や爆発現象が引き起こされる。本研究では、この局所的な切断現象や爆発現象を駆使し、生きた植物組織のレーザーマイクロダイセクションを実現し、さらには単一レベルの植物細胞の機能制御を目指している。本年度、明状態と暗状態にある植物細胞内の葉緑体とペルオキシソームの接着力を、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いて評価する新しい手法開発を進めた。シロイヌナズナの葉の切片を顕微鏡ステージに固定し、葉の表層から3層目の細胞にフェムト秒レーザーを集光し、そこに存在するペルオキシソームが接着した葉緑体近傍にフェムト秒レーザーを集光照射し、そこで数10 μmに局在した衝撃力を発生させ、それにより葉緑体に接着したペルオキシソームを引き剥がすことに成功した。明状態と暗状態にあるペルオキシソームの引き剥がし確率を調べ、さらに確率のレーザー光強度依存性を求めた。細胞内で衝撃力が発生する条件を水中で再現し、その近傍に原子間力顕微鏡の探針を配置し、探針の振動挙動を解析することにより、細胞内で発生する衝撃力の大きさを定量化した。これらのデータを下に明状態と暗状態でのペルオキシソームの引き剥がし確率の衝撃力強度の依存性を求め、統計解析を行った結果、明状態におけるペルオキシソームの接着強度が暗状態の2倍程度になることが初めて明らかになった。さらに、植物細胞壁にフェムト秒レーザーにより遺伝子を導入するため、フェムト秒レーザーを導入できる顕微鏡下で外圧を制御できる容器（ホルダー）を作製した。空気を封入したガラスキャピラリーを容器内に配置し、10気圧程度の圧力を制御できることを確かめた。この圧力容器を用いて植物細胞への遺伝子導入を検討していこうとしている。

10. キーワード

- | | | | |
|---------------|----------|-------------------|-------------|
| (1) フェムト秒レーザー | (2) 植物細胞 | (3) レザ-マイクロイェクシヨソ | (4) レザ-細胞操作 |
| (5) レザ-衝撃波 | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

本年度の研究は、ペルオキシソーム研究の権威である本研究領域の計画班研究者である西村幹夫先生と共同研究を進めることにより達成されたものである。上記に示した実験結果は、他の方法で得ることはできない。この成果により、我々が有するフェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した先端計測技術が、従来法の置き換え技術ではなく、植物学研究における新規な知見を得るための独創的なツールと成り得ることが具体的に示された。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

本実験において、ペルオキシソームが受ける力を見積もり、それを接着力の指標としたが、実際のペルオキシソームと葉緑体間の接着エネルギーを評価できた訳ではない。今後、この問題について深めていきたいと考えている。ペルオキシソームと同等の大きさを持つ1 μ mのポリスチレン微小球の表面に生化学的な処理を施し、基板に接着させ、微小球と基板の接着力を評価する。このモデル系を用いることにより、植物細胞内よりも再現性良く、多数の微小物体に働く接着エネルギーを評価することができる。ここで得られた実験データを運動方程式に基づく数値計算と照合することにより、微小物体に作用するレーザー衝撃力を運動方程式から予測できるようにする。

さらに、具体的な形でフェムト秒レーザーを利用した先端技術の有用性を示していくために、領域内外の植物学研究者との交流を深め、共同研究を促進し、植物学における新規性のある成果をあげていきたい。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(4)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名	論文標題【掲載確定】			
Takumi Higaki	Statistical organelle dissection of Arabidopsis guard cells using image database			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
LIPS, Sci. Rep.	有	Vol. 2	2 0 1 2	pp.405_1-405-9
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1038/srep00405				

著者名	論文標題【掲載確定】			
Hiroshi Yoshikawa	Spatially Precise, Soft Microseeding of Single Protein Crystals by Femtosecond Laser Ablation			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Cryst. Growth Des.	有	Vol. 12, No. 9	2 0 1 2	pp. 4334-4339
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1021/cg300018t				

著者名	論文標題【掲載確定】			
Yoichiro Hosokawa	Photomechanical ablation of biological tissue induced by focused femtosecond laser and its application for acupuncture			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Appl. Phys. A	有	Vol. 110, No. 3,	2 0 1 3	pp.613-616
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1007/s00339-012-7138-5				

著者名	論文標題【掲載確定】			
澤田晃佑	高速カメラによる氷核発生の観察とそのメカニズムの検討			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
電気学会 光・量子デバイス研究会資料	無	Vol. OQD-13-021	2 0 1 3	*
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
なし				

(学会発表) 計(23)件 うち招待講演 計(7)件

発表者名	発表標題【発表確定】		
細川陽一郎	超短パルスレーザーによる高等動物胚へのDDS		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第51回日本生体医工学会大会(招待講演)	2012年05月11日	福岡国際会議場(福岡)	

発表者名	発表標題【発表確定】		
細川陽一郎	フェムト秒レーザーを駆使した植物細胞の局所操作と刺激法の開発		
学会等名	発表年月日	発表場所	
2012年度新学術領域研究「植物の環境感覚: 刺激受容から細胞応答まで」研究成果報告会	2012年06月15日	岩手大学(岩手)	

発表者名	発表標題【発表確定】		
細川陽一郎	超短パルスレーザー細胞プロセス		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第6回バイオナノシステムズ研究会「バイオナノサイエンスと工学の接点」(招待講演)	2012年08月21日	日本工業大学(埼玉)	

発表者名	発表標題【発表確定】	
熊野 悟, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力による過冷却水からの氷化誘導1 -氷化誘導実験系の構築-	
学会等名	発表年月日	発表場所
第73回応用物理学会学術講演会	2012年09月12日	愛媛大学・松山大学(愛媛)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Takanori Iino, Man Hagiyama, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, Yoichiro Hosokawa	Relationship between Intercellular Adhesion Strength and Communication Detected by Femtosecond Laser-induced Impulsive Force	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月23日	名古屋大学(名古屋)

発表者名	発表標題【発表確定】	
細川陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力によるタンパク質の接着乖離と結晶化誘導	
学会等名	発表年月日	発表場所
酵素クラブ第5回セミナー(招待講演)	2012年09月28日	奈良女子大学(奈良)

発表者名	発表標題【発表確定】	
熊野 悟, 澤田 晃佑, 細川陽一郎	フェムト秒レーザーによる氷化誘導	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「植物環境感覚」第3回若手の会	2012年10月17日	浜名湖カリアック(静岡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
重政彰徳, 細川陽一郎	フェムト秒レーザーによる葉緑体とペルオキシソームの接着力評価	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「植物環境感覚」第3回若手の会	2012年10月17日	浜名湖カリアック(静岡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
竹中将信, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー衝撃力によるシロイナズナの芽生えの変形解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「植物環境感覚」第3回若手の会	2012年10月17日	浜名湖カリアック(静岡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
新屋龍太郎, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー照射実験試料の圧力制御	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「植物環境感覚」第3回若手の会	2012年10月17日	浜名湖カリアック(静岡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
小林淳子, 細川陽一郎, 望月伸悦, 長谷あきら	フェムト秒レーザーを用いた避陰応答の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
平成24年度 近畿植物学会講演会	2012年11月10日	近畿大学(奈良)

発表者名	発表標題【発表確定】	
細川陽一郎	超短パルスレーザーによる細胞プロセッシング	
学会等名	発表年月日	発表場所
東工大応用セラミック研究所セミナー「局所高密度励起の化学と応用」(招待講演)	2012年12月06日	東京工業大学(神奈川)

発表者名	発表標題【発表確定】	
細川陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力が拓くバイオテクノロジー	
学会等名	発表年月日	発表場所
レーザー学会学術講演会第33回年次大会(招待講演)	2013年01月29日	姫路商工会議所(兵庫)

発表者名	発表標題【発表確定】	
熊野 悟, 澤田晃佑, 飯野敬矩, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力による 過冷却水の氷化誘導2-高速カメラによる氷化過程の観察-	
学会等名	発表年月日	発表場所
レーザー学会学術講演会第33回年次大会	2013年01月29日	姫路商工会議所(兵庫)

発表者名	発表標題【発表確定】	
澤田晃佑, 熊野 悟, 飯野敬矩, 細川陽一郎	高速カメラによる氷核発生の観察とそのメカニズムの検討	
学会等名	発表年月日	発表場所
光・量子デバイス研究会	2013年03月08日	くにびきメッセ(島根)

発表者名		発表標題【発表確定】	
新屋龍太郎, 坂口さや香, 細川陽一郎		物試料へのフェムト秒レーザー分子導入のための圧力制御装置の開発	
学会等名		発表年月日	発表場所
2013年 第60回応用物理学会春季学術講演会		2013年03月30日	神奈川工科大学(神奈川)

発表者名		発表標題【発表確定】	
Yoichiro Hosokawa		Single Cell Patterning and Modification by Femtosecond Laser Impulsive Force	
学会等名		発表年月日	発表場所
Energy Material Nanotechnology 2012 EMN Meeting (招待講演)		2012年04月16日	Orland, USA

発表者名		発表標題【発表確定】	
Yoichiro Hosokawa		Femtosecond Laser Manipulation and Analysis of Plant Cells on Frontier of Green Photonics	
学会等名		発表年月日	発表場所
International Symposium on Green Photonics for Photon-Harvesting Materials and Reactions		2012年11月16日	Nara, Japan

発表者名		発表標題【発表確定】	
Masanobu Takenaka, Takanori Iino, and Yoichiro Hosokawa		Bending Movement of Biological Micro-Object Induced by Femtosecond Laser Impulse and Its Detection by AFM Toward Estimation of Internal Stress of Biological Micro-Object	
学会等名		発表年月日	発表場所
International Symposium on Green Photonics for Photon-Harvesting Materials and Reactions		2012年11月16日	Nara, Japan

発表者名	発表標題【発表確定】	
Shinya Ryutaro, Sayaka Sakaguchi, and Yoichiroh Hosokawa	Development of Pressure Control System to Realize Femtosecond Laser Photoporation of Plant Cell	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Symposium on Green Photonics for Photon-Harvesting Materials and Reactions	2012年11月16日	Nara, Japan

発表者名	発表標題【発表確定】	
Kousuke Sawada, Satoshi Kumano, Takanori Iino, and Yoichiroh Hosokawa	High-speed Imaging of Ice Formation Induced by Femtosecond Laser Impulsive Force	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Symposium on Green Photonics for Photon-Harvesting Materials and Reactions	2012年11月16日	Nara, Japan

発表者名	発表標題【発表確定】	
Yoichiroh Hosokawa	Femtosecond Laser Manipulation and Analysis Techniques for Plant on Frontier of Green Technology	
学会等名	発表年月日	発表場所
GIST-NAIST-NCTU Joint Symposium(招待講演)	2012年11月18日	Hsinchu, Taiwan

発表者名	発表標題【発表確定】	
Hirohisa Uedan,* Takanori Iino, P.L. Lin, W.Z. Wang, J.H. Deng, Y.X. Lu, Man Hagiwara, Akihiko Ito, F.J. Kao, and Yoichiroh Hosokawa	Estimation of Intercellular Adhesion Strength Using Femtosecond Laser Impulse and Its Kinetic Analysis	
学会等名	発表年月日	発表場所
Annual Meeting of the Physical Society, Republic of China, Taiwan, 2013	2013年01月29日	Hualien, Taiwan

(図書) 計(0)件

著者名	出版社			
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--