

様 式 C - 7 - 1

平成 2 5 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. 研究期間 平成 2 2 年度～平成 2 6 年度
5. 課題番号

2	2	1	2	0	0	1	0
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 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

水中にポリスチレン微小球を分散させた試料を細胞培養用のガラスボトムディッシュに入れ、そこにフェムト秒レーザーを集光照射すると、集光点で発生する衝撃力により、微小球は移動する。本研究では、レーザー照射前の微小球の位置（ X ）とレーザー照射前と照射後の微小球の変位（ ΔX ）の関係を調べる実験系を構築し、さらに X と ΔX の関係を調べるための専用ソフトを作製し、一つの実験条件で、1000個以上の微小球に対する X と ΔX の関係を調べることに成功した。得られた関係を解析するために、衝撃力と水の粘性抵抗を考慮した運動方程式を構築してこの運動方程式を数値計算により解き、実験結果で得られた X と ΔX の関係を照合することにより、微小球に作用する衝撃力の時間変化を定量評価することに成功した。さらに原子間力顕微鏡により得られている衝撃力のモデルと整合性をとることができた。これらの結果をもとに、葉緑体からペルオキシソームを剥離するために必要な衝撃力は、明状態で60 fN/nm²、暗状態で20 fN/nm²であることが示された。

植物試料の浸透圧を調整し、膨圧を緩和した植物細胞に対してフェムト秒レーザーを集光照射することにより、標的とした単一の植物細胞へ遺伝子を導入することを試みた。タバコBY2細胞を蛍光標識したデキストランと高濃度マンニトールを加えた溶液に浸し、レーザー照射条件を検討した結果、タバコBY2細胞に対してデキストランをレーザー照射により導入することに成功した。さらに同じレーザー照射条件でGFP遺伝子の導入を検討した結果、GFP遺伝子をタバコBY2細胞内に導入し、さらに1日培養することによりGFPの発現を確認することができた。さらに、タマネギとシロイヌナズナに対しても同様の実験をおこない、両方でBY2細胞と同様にデキストランを導入することに成功した。

10. キーワード

(1) フェムト秒レーザー	(2) 植物細胞	(3) レーザーマイクロダイセクション	(4) レーザー細胞操作
(5) レーザー衝撃波	(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)

本来、葉緑体とペルオキシソームの接着力を評価するためには、葉緑体とペルオキシソームとの間の接着ポテンシャルを推定する必要があり、そのためには参照実験として、接着蛋白質により吸着したポリスチレン微小球にフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させ、衝撃力の作用と同時に、ポリスチレン微小球の接着ポテンシャルを推定する必要がある。しかしながら、安定にかつ再現性よくポリスチレン微小球を基板に接着させることに難航しており、次年度の課題となった。一方で、本年度の実験で導かれた「fN/nm^{-x}の力で葉緑体からペルオキシソームが乖離する」という結果は非常に興味深いものである。室温での分子の熱揺らぎを考えると、一つの蛋白質分子同士の結合を引きはがすためにはpN程度の力が必要になるが、本実験で得られた結果はnmサイズである分子あたりにfN程度の力を加えられたときに葉緑体からペルオキシソームが乖離するという結果である。これは一見、矛盾をきたす結果であるが、力の集中(応力集中)を考慮すると妥当な結果であると考えられる。本研究により生体に対する力の作用を考えると、応力集中が極めて重要であることが示唆されたことは、現在のメカノバイオロジーの展開を考慮しても意義深い結果であると考えられる。

昨年度の交付申請書では、植物細胞への遺伝子導入を外圧の制御により細胞内の膨圧を緩和することにより達成しようと考えていたが、浸透圧調整による制御に方針を切り替えた。結果としてタバコBY2細胞に対して、遺伝子導入のみならず発現を確認するまでの成果をえるまでに至った。フェムト秒レーザーにより植物細胞に遺伝子を導入し、発現させることができたのは本研究が世界初となる。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

上記記載の通り、安定かつ再現性よくポリスチレン微小球を基板に接着させることに難航しており、まずはこの問題を解決することが不可欠である。これまで、接着蛋白質をポリスチレン微小球と基板に、静電吸着により接着していたが、安定を図るために化学反応により接着蛋白質をポリスチレン微小球と基板に共有結合で接着させることを試みる。これにより、ポリスチレン微小球と基板間の蛋白質の結合が安定に乖離する系を構築し、その剥離挙動を解析することにより、植物細胞内の小器官の蛋白質同士による結合、さらには細胞同士のポテンシャルを推定できるようにする。

植物細胞内の遺伝子導入について昨年度、シロイヌナズナやタマネギについても検討を進めたが、GFP遺伝子を導入し発現させることができなかった。これらの場合においても細胞のもつ膨圧を解消するために、バッファに高濃度のマンニトールを添加して浸透圧調整を行ったが、この浸透圧調整により細胞の活性を低下させてしまったため、GFP遺伝子を導入できたものの、発現させることができなかった可能性が考えられる。本年度は、昨年作製した外圧制御システムを浸透圧調整と併用することにより、植物細胞の負担を軽減し、高等植物で遺伝子を発現させることを試みる。

さらに顕微鏡下で試料を凍結させるシステムの開発にも成功しており、細胞内、細胞外での氷結晶発生を制御しながら直接観察し、植物細胞の耐凍性と氷結晶発生と関わりについて調べていく。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(2)件

著者名		論文標題			
Man Hagiya, Takao Inoue, Tadahide Furuno, Takanori Iino, Saori Itami, Mamoru Nakanishi, H. Asada, Yoichiro Hosokawa and Akihiko Ito		Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatiti			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Brit J Dermatol.	有	Vol. 168, No. 4	2 0 1 3	pp.771-778	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1111/bjd.12108					

著者名		論文標題			
*Kazunori Okano, Ai Matsui, Yasuyo Maezawa, Ping-Yu Hee, Mie Matsubara, Hideaki Yamamoto, Yoichiro Hosokawa, Hiroshi Tsubokawa, Yaw-Kuen Li, Fu-Jen Kao, Hiroshi Masuhara		In situ laser micropatterning of proteins for dynamically arranging living cells			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Lab Chip.	有	Vol. 13, No. 20	2 0 1 3	pp.4078-4086	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1039/c3lc50750e					

(学会発表) 計(35)件 うち招待講演 計(5)件

発表者名		発表標題	
飯野敬矩		フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞間接着機構の解明に関する研究	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本学術会議「第3回先端フォトニクスシンポジウム」	2013年04月26日	日本学術会議(東京)	

発表者名		発表標題	
敬矩敬矩		レーザー衝撃力と名のイメージングによる細胞接着の光定量計測	
学会等名		発表年月日	発表場所
第79回レーザー加工学会講演会(招待講演)		2013年05月07日～2013年05月08日	関西大学(大阪)

発表者名		発表標題	
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波による水化誘導と高速カメラによる観察	
学会等名		発表年月日	発表場所
2013年光化学討論会		2013年09月11日～2013年09月13日	愛媛大学(愛媛)

発表者名		発表標題	
飯野敬矩, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 細川陽一郎		フェムト秒レーザー誘起衝撃力による神経-マスト細胞間の情報伝達の評価	
学会等名		発表年月日	発表場所
2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会		2013年09月16日～2013年09月20日	同志社大学(京都)

発表者名		発表標題	
新屋龍太郎, 坂口さや香, 細川陽一郎		フェムト秒レーザーを用いた植物試料への単一細胞分子導入の検討	
学会等名		発表年月日	発表場所
2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会		2013年09月16日～2013年09月20日	同志社大学(京都)

発表者名	発表標題	
河野達也、澤田晃佑、飯野敬矩、細川陽一郎	集光フェムト秒レーザーによる純水とスクロース水溶液の氷化誘導	
学会等名	発表年月日	発表場所
応用物理学会関西支部講演会	2013年10月09日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良)

発表者名	発表標題	
細川陽一郎	先端レーザー技術を駆使して生物より学ぶ、- 新しいグリーンテクノロジーの可能性 -	
学会等名	発表年月日	発表場所
大阪産業大学 セミナー(招待講演)	2013年10月15日	大阪産業大学(大阪)

発表者名	発表標題	
飯野敬矩	フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いた植物の力学機構の顕在化	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
上段寛久	フェムト秒レーザー誘起衝撃力が微小物体にもたらす力学作用の解析	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
新屋龍太郎, 坂口さや香, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー照射による単一植物細胞へのGFP遺伝子の導入	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
河野達也, 澤田晃佑, 飯野敬矩, 細川陽一郎	集光フェムト秒レーザーを用いたスクロース水溶液の氷化過程の調査	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
福嶋亮介, 飯野敬矩, 細川陽一郎	フェムト秒レーザーと原子間力顕微鏡によるシロイヌナズナの弾性変形解析	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
丸山彰大, 上段寛久, 飯野敬矩, 細川陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力が接着物体にもたらす力学作用の調査	
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」若手の会	2013年10月20日～2013年10月22日	小豆島ふるさと村(香川)

発表者名	発表標題	
Akinori Shigemasa, Yoshitaka Nakayama, Takanori Iino, Hidetoshi Iida, and Yoichiro Hosokawa	Individual Analysis of Changes in Calcium Concentration Induced by Femtosecond Laser Impulse in Single Fission Yeast Cells(フェムト秒レーザー誘起衝撃力による分裂酵母細胞のカルシウムイオン応答の個別解析)	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	京都国際会館(京都)

発表者名	発表標題	
細川陽一郎	フェムト秒レーザーによる植物細胞の新しい加工・操作・計測技術	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域「植物細胞壁の情報処理システム」新学術領域「植物発生ロジックの多元的開拓」平成25年度シンポジウム「細胞を創る操る」(招待講演)	2013年11月28日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良)

発表者名	発表標題	
小林幹康, YU, Zhanqin, 鈴木友美, 細川陽一郎, 長谷あきら	シロイヌナズナ表皮細胞における力学的刺激に応答した細胞質ゾル蛋白質の動態変化	
学会等名	発表年月日	発表場所
第2回近畿植物学会講演会	2013年12月07日	帝塚山大学(奈良)

発表者名	発表標題	
細川陽一郎	フェムト秒レーザー衝撃波による水化誘導	
学会等名	発表年月日	発表場所
第3回グリーンフォトンクスセミナー「分子の自己組織化で考えるグリーンテクノロジー」	2013年12月12日	キャンパスプラザ京都(京都)

発表者名	発表標題	
細川陽一郎	レーザーが拓くグリーンバイオナノ	
学会等名	発表年月日	発表場所
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部フロンティア研究センター講演会(招待講演)	2013年12月13日	徳島大学(徳島)

発表者名	発表標題	
細川陽一郎	フェムト秒レーザーによる顕微鏡下での氷化の時空間制御	
学会等名	発表年月日	発表場所
北海道大学 低温科学研究所シンポジウム「結晶表面・界面での成長カインेटイクスの理論とその場観察」(招待講演)	2014年01月14日～2014年01月15日	北海道大学 低温科学研究所(北海道)

発表者名	発表標題	
及川和聡, 真野昌二, 林 誠, 山田健志, 近藤真紀, 東 正一, 渡辺 正勝, 三ツ井 敏明, 飯野敬矩, 重政彰徳, 細川 陽一郎, 西村幹夫	フェムト秒レーザーを用いた光依存的オルガネラ間接着力評価	
学会等名	発表年月日	発表場所
第55回日本植物生理学会年会	2014年03月18日～2014年03月20日	富山大学(富山)

発表者名	発表標題	
飯野敬矩, 萩山 満, 古野忠秀, 伊藤 彰彦, 細川 陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力による単一神経細胞の機械応答	
学会等名	発表年月日	発表場所
2014年第61回応用物理学会春季学術講演会	2014年03月17日～2014年03月20日	青山学院大学(神奈川)

発表者名	発表標題	
Yoichiroh Hosokawa, Satoru Kumano, Kosuke Sawada, and Takanori Iino	Spatial and Temporal Control of Ice Formation Induced by Femtosecond Laser Impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim(CLEO-PR 2013)	2013年06月30日 ~ 2013年07月04日	Kyoto, Japan

発表者名	発表標題	
Takanori Iino, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, and Yoichiroh Hosokawa	Femtosecond Laser-Assisted Estimation of Time Evolution of Cell-Cell Adhesion Force Between Neurite and Mast Cell	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim(CLEO-PR 2013)	2013年06月30日 ~ 2013年07月04日	Kyoto, Japan

発表者名	発表標題	
Takanori Iino, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, and Yoichiroh Hosokawa	New method to analyze time evolution of intercellular adhesion force by femtosecond laser-induced impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
LPM2013- The 14th International Symposium on Laser Precision Microfabrication HPL2013- The 6th International Symposium on High Power Laser Processing	2013年07月23日 ~ 2013年07月26日	Niigata, Japan

発表者名	発表標題	
Takanori Iino, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, and Yoichiroh Hosokawa	Statistic Analysis of Cell-Cell Adhesion between Neurite and Mast Cell by Femtosecond Laser-Induced Impulsive Force	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013)	2013年10月06日 ~ 2013年10月11日	Ischia, Italy

発表者名	発表標題	
Ryutaro Shinya, Sayaka Sakaguchi, Yoichiroh Hosokawa	Molecular Introduction into Single Plant Cell by a Femtosecond Laser Ablation	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013)	2013年10月06日 ~ 2013年10月11日	Ischia, Italy

発表者名	発表標題	
Ryutaro Shinya, Sayaka Sakaguchi, Hitoshi Endo, Arata Yoneda, Taku Demura, Yoichiroh Hosokawa	Femtosecond Laser-Induced Molecular Introduction into Single Plant Cell	
学会等名	発表年月日	発表場所
2013 GIST-NAIST-NCTU International Joint Symposium	2013年11月21日 ~ 2013年11月26日	Nara, Japan

発表者名	発表標題	
Tatsuya Kono, Kousuke Sawada, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa	Freezing process of sucrose solution induced by femtosecond laser impulse: in situ observation by high-speed imaging	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Akihiro Maruyama, Hirohisa Uedan, Sayaka Sakaguchi, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa	Motion analysis of micro-beads detachment from substrate by femtosecond laser impulse: toward elucidation of cell adhesion	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Ryutaro Shinya, Hitoshi Endo, Takanori Iino, Sayaka Sakaguchi, Arata Yoneda, Taku Demura, Yoichiroh Hosokawa	Femtosecond Laser-induced photoporation into Tobacco BY-2 cell	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Takanori Iino, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, Yoichiroh Hosokawa	Signal transmission between nerve and mast cells induced by mechanical stimulation by femtosecond laser-induced impulsive force	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Tatsuya Kono, Kousuke Sawada, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa	High-speed imaging of freezing process of sucrose and glucose solutions induced by femtosecond laser impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, Taiwan

発表者名	発表標題	
Akihiro Maruyama, Hirohisa Uedan, Sayaka Sakaguchi, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa	Femtosecond Laser Impulse-Induced Detachment of Micro-Beads Adhered on Substrate by Avidin-biotin Binding and Its Motion Analysis	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, Taiwan

発表者名	発表標題	
Ryutaro Shinya, Hitoshi Endo, Takanori Iino, Sayaka Sakaguchi, Arata Yoneda, Taku Demura, Yoichiroh Hosokawa	Molecular introduction of bio-molecules into single plant cells by focused femtosecond laser irradiation	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, Taiwan

発表者名	発表標題	
Takanori Iino, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, Yoichiroh Hosokawa	Mechanical Stimulation of Single Neuro2a cells by Femtosecond Laser-Induced Impulsive Force	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, 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

--