

フェムト秒レーザー加工を駆使した植物細胞の弾性の AFM 計測

AFM Measurement of Elasticity of Plant Cells Applying Femtosecond Laser Processing

奈良先端大物質¹, 奈良先端大バイオ², 神戸大院理³, °伊藤 賢四郎¹, 秋田 絵理¹,

岡野 和宣¹, 安國 良平¹, 津川 暁², 出村 拓², 三村 徹郎³, 細川 陽一郎¹

Div. Mat. Sci. NAIST¹, Div. Bio. Sci. NAIST², Dept. Bio. Univ. Kobe³, °Kenshiro Ito¹, Eri Akita¹,
Kazunori Okano¹, Ryohei Yasukuni¹, Satoru Tsugawa², Taku Demura², Tetsuro Mimura³,
Yoichiro Hosokawa¹

E-mail: ito.kenshiro.id8@ms.naist.jp

植物細胞は、細胞壁がその形態を維持し、環境刺激から内部を保護する。細胞壁の機能を理解するには、細胞壁の力学特性を知ることが不可欠である。細胞の弾性は、細胞壁の弾性率だけでなく、細胞内圧、さらには細胞内圧により生み出される細胞壁の張力に依存すると考えられる。近年これらの特性が、原子間力顕微鏡 (AFM) によって評価されているが、AFM 計測だけでは、これらの力の要素を個別に評価し、細胞の弾性の詳細を理解することは難しい。そこで本研究では、細胞壁のフェムト秒レーザー加工により、細胞内圧を緩和させ、細胞壁の弾性率を細胞内圧と分離して AFM 計測を行い、さらに細胞壁の加工形状依存性より、植物細胞の弾性の起源を明らかにしようとした。

タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗茎葉の内面 10 mm 角の表皮の単層組織を剥がし、ガラスボトムディッシュにシリコンシートで挟み込んで固定した。AFM 測定は、水中で行われ、先端形状が球状 (半径 0.4 μm) の AFM 探針 (ばね定数: 42 N/m) を、タマネギの表皮細胞に接触させ、探針のたわみ量と細胞壁の歪量の関係 (フォースカーブ) を計測した。このフォースカーブをヘルツの接触モデルに基づき解析し、細胞の弾性をヤング率として求めた。次に、フェムト秒レーザーパルス (150 fs, 800 nm, 200 nJ, 5 pulses) を、20x 対物レンズ (NA=0.46) で AFM 計測領域から 100 μm 離れた位置に集光放射し (Fig. 1)、レーザー照射 30 分後に、同じ領域でフォースカーブ測定を再度行った。また、参照実験として、浸透圧調整により細胞内圧を低下させた試料についても同様の実験を行った。この実験では、フォースカーブのマッピング後に、ガラスボトムディッシュ中の水を 0.8 M のマンニトール水溶液に置換し、30 分後に同じ領域でフォースカーブ測定を再度行った。さらにその後レーザーを照射してフォースカーブ測定を行った。

Fig. 2 (A) に示すように、処理前の細胞のヤング率は平均で 8.5 MPa であったが、レーザー照射後、ヤング率は初期値の約 50% に低下し、その平均値は 4.1 MPa となった。このヤング率の減少は、レーザー照射により細胞壁に貫通孔が形成され、細胞内圧が緩和したこと起因すると考えられる。しかし、植物細胞の内圧は、最大でも 1 MPa であることが知られており、この緩和はそれを上回るものである。0.8 M マンニトール水溶液による浸透圧調整では、処理後のヤング率は初期値に依存せず、さらに低下して 2.1 MPa となった (Fig. 2 (B))。浸透圧調整では、計測対象となる細胞のみでなく、全ての細胞の内圧が低下し、また細胞内では原形質分離などの状態変化も生じる。これらの細胞の弾性変化は、細胞壁にかかる張力が細胞内圧により緩和することで説明できると考えており、それを実証するための細胞壁の弾性率の加工形状依存性についての検討を進めている。

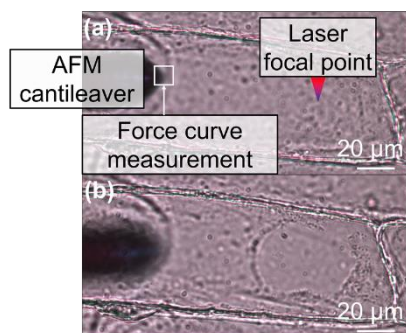


Fig.1 A microscopic image of an onion epidermal cell and AFM cantilever before (a) and after (b) the laser processing.

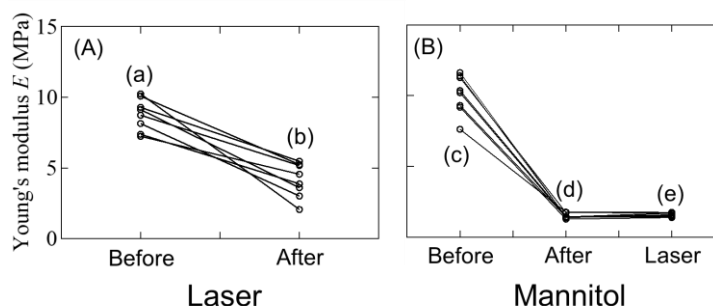


Fig.2 (A) Young's modulus of onion epidermal cells before (a) and after (b) fs laser processing. (B) Young's modulus of onion epidermal cells before (c) and after (d) mannitol treatment. Laser processing was performed after the mannitol treatment (e).