

研究報告書

「超解像蛍光顕微鏡による珪藻のバイオミネラルゼーションの解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 堀田 純一

1. 研究のねらい

光合成生物は太陽光エネルギーを利用した営みの中で光合成をはじめとする様々な物質変換を行っている。数多くの光合成生物の中で、珪藻は海洋における一次生産者として生態系を支えるとともに、海洋における炭酸ガスの固定の多くを担っており、地球環境の維持においても非常に重要な位置を占めている。さらに、珪藻の持つ特徴的な物質変換能力の一つとして、バイオミネラルゼーションによるナノ構造シリカ被殻形成があげられる。珪藻のバイオミネラルゼーションは、常温常圧で非常に安定な機能性ナノ構造材料を創り出すことを可能とする新しいスタイルのものづくりに応用可能であると期待される。

従来、珪藻等の微生物の生態観察は光学顕微鏡により行われてきた。しかしながら、光学顕微鏡には「回折限界の壁」と呼ばれる光の波長の半分程度すなわちサブマイクロメートル程度に空間分解能の限界があり、微生物の内部構造を詳細に観察するためには、不十分であると言わざると得なかった。近年、ファーフィールド超解像蛍光顕微鏡によりその壁を乗り越えて3次元的にナノメートルの解像度で生物を生きたままの姿で観測することが可能となりつつある。しかしながら、珪藻をはじめとする光合成微生物は光合成色素による高い蛍光バックグラウンドを持つために、超解像蛍光顕微鏡による空間分解能の向上の恩恵を得ることはできなかった。

本研究では、珪藻のように光合成色素による自家蛍光バックグラウンドが高い光合成生物でも使用可能な超解像蛍光顕微鏡の開発を行い、珪藻のシリカ被殻およびその形成に関するタンパク質を遺伝子操作等により蛍光ラベルして超解像蛍光顕微鏡により解析して、そのメカニズムを明らかにするとともに、創製した蛍光シリカ被殻の記録媒体、発光素子等のナノ光デバイスとしての工学的応用、さらには珪藻のバイオミネラルゼーションは太陽光による有用資源精製システムであるという視点に立ち、地球に優しい有用資源等の回収法としての応用もねらった。

2. 研究成果

(1) 概要

超解像蛍光顕微鏡をはじめとする高感度蛍光顕微鏡技術を活用することにより、珪藻のバイオミネラルゼーションを解析するとともに、その応用を目指して研究を行った。「光合成生物用超解像蛍光顕微鏡システムの開発および蛍光色素の探索」として、光合成生物での超解像蛍光顕微鏡測定に適した蛍光プローブの精査を行った。Alexa488 を蛍光色素として用い、珪藻被殻表面に存在するタンパク質を標識して dSTORM 測定を行うことに成功した。蛍光色素の自発的な取り込みを利用して珪藻被殻形成過程のタイムラプスイメージングを行うことに成功した。構造化照明顕微鏡法を用いることにより、生きた珪藻における超解像蛍光顕微鏡

測定を行うことに成功した。「珪藻用融合タンパク質発現ベクターの作成」として、ゲノム配列が公開されている *Thalassiosira pseudonana* の恒常的に発現しているタンパク質のプロモーター及びターミネーター領域を用いたベクターを開発した。「珪藻への高効率遺伝子発現システムの開発」として、従来用いられてきたオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質ではなくサンゴ由来の蛍光タンパク質を用いて、より明るく蛍光する形質転換体を得ることができた。「珪藻シリカ被殻を利用した光学素子の開発」として、珪藻被殻の表面のタンパク質または珪藻被殻中に蛍光色素を導入することにより作製した蛍光性珪藻被殻に顕微鏡下でパターンを書き込むことに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「光合成生物用超解像蛍光顕微鏡システムの開発、および蛍光色素の探索」

珪藻をはじめとする光合成生物は、光合成関連の色素により700nm付近に強い蛍光を持つため、その蛍光とスペクトル的に分離可能な蛍光色素、蛍光タンパク質を使用する必要がある。そこで、超解像蛍光顕微鏡に用いられてきた蛍光色素のみでなく、これまで使われていなかった蛍光プローブ等についても単一分子レベルでのオン・オフ状態を精査するとともに超解像蛍光顕微鏡での利用の可能性を検討

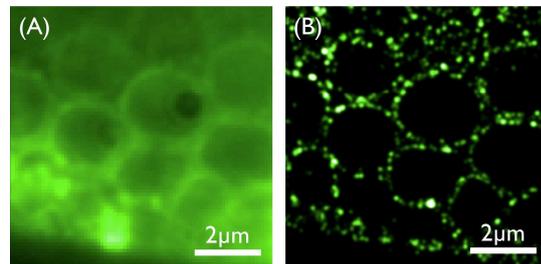


図1 Alexa488 により表面タンパク質を標識した珪藻被殻の(A)蛍光像、(B)dSTORM 像

した。その結果、超解像蛍光顕微鏡で使用可能な蛍光色素として Alexa488, Dronpa, EGFP 等は特に適していることが分かった。珪藻被殻の微細構造の観察を目的として Alexa488-NHSEster により珪藻被殻を標識して、超解像蛍光顕微鏡 (dSTORM) 測定を行った。その結果、珪藻被殻表面のタンパク質を Alexa488 により標識し、珪藻被殻表面の微細構造を図1に示すとおり 20~30nm の空間分解能で観察することができた。

蛍光色素を培地中に含有させて染色を行いながらライブイメージングを行う際は、一般に培地中に存在する蛍光色素からのバックグラウンド蛍光が問題となることが多い。そこで、高コントラストの測定が可能な系を探索するために、日本沿岸から採集した数種の珪藻についてローダミン B およびフルオロセインを珪藻被殻染色のための蛍光色素として用い測定を行った。その結果、ローダミン B を 0.1 μM の濃度で培養液中に添加した場合、比較的大型の *Coscinodiscus*, *Chaetoceros*, *Aulacoseira*

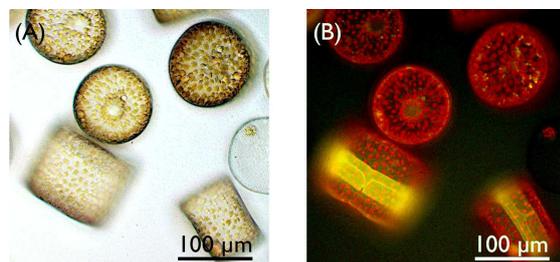


図2 0.1 μM のローダミン B を含有する f/2 培地中の *Coscinodiscus* sp. の (A) 透過像、(B) 蛍光像

について、培養液中の蛍光色素によるバックグラウンドは存在するが、新しく形成された珪藻被殻が相対的に明るく蛍光する様子が観測された。測定結果を図2に示す。また、タイムラプ

スライミングを行い、珪藻の被殻形成過程を可視化することにも成功した。

光合成生物は、光合成を行わない生物と比較して光合成色素の光吸収のために高強度の光に対して光毒性が顕著に現れやすいことが知られている。そこで、従来型の蛍光顕微鏡と同程度の光強度の励起光照射により、2倍程度空間分解能の高い超解像蛍光顕微鏡像の取得が可能となる構造化照明顕微鏡法による測定を行った。ローダミン B を 0.1 μM 添加した培地中で淡水産の珪藻である *Aulacoseira sp.* を培養して被殻を染色しながら測定を

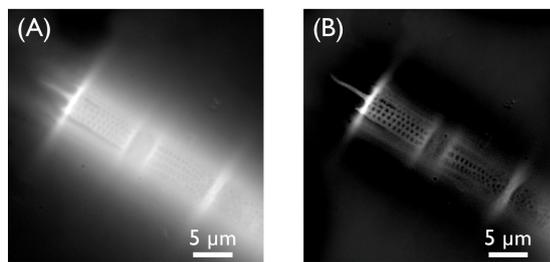


図3 *Aulacoseira sp.*の(A)蛍光像、(B)構造化照明顕微鏡法による超解像蛍光顕微鏡像

行った。図3に、構造化照明顕微鏡法により撮像した *Aulacoseira sp.*の蛍光像を示す。従来型の蛍光像と比べて高解像度・高コントラストの蛍光像を得ることができたことがわかる。

以上の結果から、抽出した珪藻被殻については、dSTORM、生きた珪藻の被殻の測定には構造化照明顕微鏡法が適していることがわかった。

研究テーマ B「珪藻用融合タンパク質発現ベクターの作成」

珪藻における遺伝子組換え系では、発現レベルの高さから光合成に関するタンパク質のプロモーター・ターミネーター領域が使われていたが、本研究では汎用性のあるベクターの開発を目的として他の恒常的に発現するタンパク質のプロモーター・ターミネーター領域の利用について検討した。*Thalassiosira pseudonana* ゲノム上の恒常的に発現するタンパク質のプロモーター領域をクローニングし、それらを元に抗生物質である Nourseothricin の耐性遺伝子を発現させるベクターを構築し形質転換を行ったところ、プロモーター活性を持つことを示唆するデータを得ることができた。

研究テーマ C「珪藻への高効率遺伝子発現システムの開発」

羽状目珪藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) を宿主として用い、サンゴ由来の蛍光タンパク質の発現効率について検討した。その結果、形質転換珪藻を得ることに成功するとともに、従来のオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質よりもより明るく蛍光させることに成功した。このことにより、超解像蛍光顕微鏡で用いられる Dronpa や KikGR と同様にサンゴ由来の蛍光タンパク質が珪藻内で発現可能であることが確認できた。また、細胞内小器官に局在するいくつかの融合蛍光タンパク質発現のテストを行った結果、蛍光タンパク質を珪藻の核に局在させて発現させることに成功した。

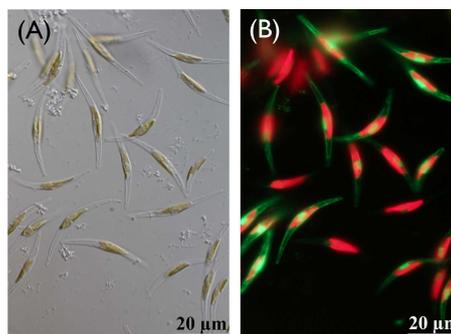


図4 *Phaeodactylum tricornutum* におけるサンゴ由来蛍光タンパク質の発現 (A)透過像、(B)蛍光像

研究テーマD「珪藻シリカ被殻を利用した光学素子の開発」

珪藻におけるバイオミネラリゼーションにより形作られる被殻は、従来のバイオテクノロジーに基づくタンパク質等の物質生産と異なり、長期保存可能なナノ構造を有するマイクロメートルサイズの構造体としての性質を持つ。その応用の第一歩として、珪藻被殻を蛍光色素により染色し、蛍光性珪藻被殻の光情報記録媒体としての可能性について

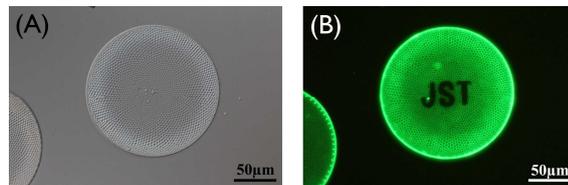


図5 蛍光性珪藻被殻へのパターン記録
(A)透過像、(B)蛍光像

て検討した。パターン記録システムとして、試料の共役面にパターンマスクを配置し、試料に光パターンを照射するシステムを構築した。抽出した珪藻被殻に Alexa488-NHS ester を用いて作製した蛍光性珪藻被殻、ローダミン B を培地中に 0.1 μM の濃度で含有させて作製した蛍光性珪藻被殻について、それぞれパターン記録を行い任意のパターンを記録することに成功した。

3. 今後の展開

珪藻がバイオミネラリゼーションにより被殻を形成していく過程を高解像度の蛍光像により観察することが可能となり、蛍光性珪藻被殻の応用例として光パターンの記録にも成功した。今後、珪藻被殻形成過程の可視化によって工業的利用に適した珪藻のスクリーニングが期待される。珪藻被殻が培養液中に含有させた蛍光色素によって観察可能であるということは、蛍光色素をはじめとする有機化合物を珪藻被殻に濃縮させて回収可能であることを示している。今後、蛍光色素のみではなくその他の有機化合物、例えば有害化学物質等の回収法、すなわち太陽光エネルギーを利用した環境浄化法として応用できる可能性がある。珪藻において蛍光タンパク質をより明るく発現させて観察することも可能となり、従来よりも高感度・高精度の蛍光顕微鏡測定が可能となることが期待される。しかしながら、さらに高精度・高解像度の珪藻のバイオミネラリゼーションプロセスのバイオナノイメージングによる解析には、さらに洗練された有機蛍光色素や超解像蛍光タンパク質の開発、高効率の遺伝子組換えシステムが必要であるという問題点も明らかとなった。今後、これらの解析を行い珪藻のバイオミネラリゼーションを利用した新しいものづくりの実用化を目指すためには、さらなる研究が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

研究計画立案時のモチベーションは、私が研究者を目指すきっかけとなった珪藻とその被殻形成過程を詳細に光学顕微鏡で観察し、それを応用して世の中の役に立つものづくりを行いたい！ということであった。そのために、光合成生物の観察に適した超解像蛍光顕微鏡技術と蛍光プローブの探索、観察に適した珪藻の探索、珪藻の遺伝子組換え系など多くの技術について研究を展開する必要があった。珪藻のバイオミネラリゼーションを超解像蛍光顕微鏡により解析するという目標に対しては、抽出した珪藻被殻については dSTORM、生きた珪藻については構造化照明顕微鏡法により可視化することができた。また、珪藻被殻の工学的応用

を目指すという目標に対しては、蛍光性珪藻被殻へのパターン記録に成功した。しかしながら、蛍光タンパク質を珪藻被殻にタグしてバイオミネラリゼーション関連タンパク質の動きを解析するとともにバイオテクノロジーに基づく新たなものづくりを提案するという目標に対しては、珪藻の遺伝子組換えが新しいベクターを使って可能になりつつあるとはいえ、現時点でやっと本格的に取りかかり始めることができた段階にあると言わざるを得ない。しかしながら、本研究を行わせて頂いたことにより、本当に非常に多くのことを学ぶことができた。特に研究開始以前の超解像蛍光顕微鏡技術に加えて遺伝子組換え技術を研究の柱として加えることができたので、本研究のテーマをライフワークとしてさらに発展させていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

地球上の光合成は主に海洋中で行われている。珪藻は海洋における炭酸ガスの固定など一次生産者として重要な役割を果たしている。珪藻はその被殻をバイオミネラリゼーションによるナノ構造シリカで形成している。機能性ナノ構造材料としても興味深い。珪藻が営む光合成とバイオミネラリゼーションは光エネルギーと資源循環の視点からも大変興味深い研究対象と言える。堀田純一博士は、超解像蛍光顕微鏡などに関する自身の着実な研究実績を基礎に、超解像観察の生体試料として珪藻に着目し、自家蛍光の強い生体試料をいかにして超解像観察するについて意欲的な研究提案を行い採択された。珪藻を機能性ナノ構造材料としても着目し新しい記録材料開発への挑戦も提案した。さきがけ研究開始直後にベルギーから日本に異動し、さらに異動後も新しい研究施設への移転など、困難な状況を克服しながら誘導期間を経て、実際に超解像顕微鏡測定装置を立ち上げ、新たに日本沿岸から採集した数種の珪藻について蛍光色素の自発的な取り込みを利用して珪藻被殻形成過程のタイムラプスイメージングを行うことに成功している。構造化照明顕微鏡法を用いることにより、生きた珪藻における超解像蛍光顕微鏡測定を行うことにも成功した。光合成生物用の新しい蛍光タンパク質の開発にも挑戦している。これまでの論文発表状況は必ずしも充分とは言えないが、今後のいっそう集中した研究展開を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. Chiba, H. Fujiwara, J. Hotta, S. Takeuchi, K. Sasaki. Experimental evaluation of diffusion constant in a thin polymer film by triplet lifetime analysis of single molecules. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2012, 238, 24-28
--

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. J. Hotta, Biomineralization in Diatoms, *Seventh International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCPP12)*, 2012. 6. 23, Kusatsu, Japan
2. 堀田純一, 超解像蛍光顕微鏡によるバイオナノイメージング, 一珪藻のバイオミネラリゼーションの解析を目指して—第25回つくば藻類・プロテISTフォーラム, 2013年2月18日, 筑波大学
3. J. Hotta, High resolution microscopy in biology, diatoms, Remise de la médaille de bronze du CNRS à Michel Sliwa, Scientific Symposium, 2013. 11. 5, Lille, France
4. 堀田純一, 超解像蛍光顕微鏡技術の開拓, フロンティア研究センター講演会, 2013年12月13日, 徳島大学

国際会議

1. J. Hotta, H. Mizuno, P. Dedecker, J. Hofkens, Optical patterning on fluorescently labeled diatom shells, *The 26th International Conference on Photochemistry (ICP 2013)*, 2013. 7. 21–26, Leuven, Belgium
2. J. Hotta, Optical microscopy of diatoms, Post-Conference ICP2013 held in honour of Prof. Dr. Frans C. De Schryver and Prof. Dr. Hiroshi Masuhara, 2013.7.26., Leuven, Belgium

総説・解説

1. 堀田純一, 水野秀昭, センペルス ウーター, ホフケンス ヨハン, 超解像蛍光顕微鏡の最近の進歩, *光化学*, 42(3) (2011).

アウトリーチ活動

1. 堀田純一, 最先端科学で利用される生物の色素の秘密を探る —生命システムの機能を最先端科学に応用する—, サイエンスカフェ@米沢 生き物の色と形, 2012年11月7日, 山形大学