



ナノ薄膜干渉基板を用いたカビの 蛍光増強イメージング法の開発

安田 充

関西学院大学 理工学部
〒669-1337 兵庫県三田市学園 2-1

Fluorescence Enhancement Imaging of a Filamentous Fungus Using an Optical Interference Mirror Slide

Mitsuru Yasuda

School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University
2-1 Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1337, Japan

< 1. 背景・目的 >

近年、薬剤耐性を獲得したカビ（糸状菌）の世界的な感染流行（パンデミック）が危惧されている。カビのなかでも、糸状の菌糸からなる糸状菌は菌糸の先端を伸ばしながら細胞組織へと侵入することで感染する。菌糸が伸びる仕組みを明らかにすることがパンデミックの阻止につながるため、菌糸伸長機構の解明が緊急の課題となっている。

菌糸の伸長機構はこれまで、主に蛍光イメージング法により調べられてきた。しかし、既存の蛍光イメージング法では、菌糸の伸長に重要な役割を果たすと推測される細胞内低濃度分子を観察することが困難であった。これは低濃度分子に標識できる蛍光分子の数が限定された結果、観察される蛍光の明るさが極めて暗いことが原因である。この明るさの問題は蛍光分子からの蛍光を増強することで解決できる。そこで、本研究では Ag 基板上に Al_2O_3 の誘電体超薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板に着目した (図 1)。

研究代表者はこれまでにナノ薄膜干渉基板を用いることで蛍光分子からの蛍光を 200 倍増強することに成功した [1]。一般的なガラス基板と比較し、3 桁の増強は他に例がない。ここでの蛍光は主に蛍光の光学干渉と励起光の光学干渉の二重の効果に基づく [2]。具体的には、基板表面に発生した増強

電場が蛍光分子の吸収係数や量子収率を増大させ、電子から放出される蛍光の発光効率が向上することで蛍光が増強する。

この光学干渉に基づく蛍光増強効果を巧みに利用することで、卵白などに含まれるタンパク質 Avidin/Streptavidin [3] や、食中毒に関連するサルモネラ菌遺伝子 DNA [4] の検出における蛍光を 50 倍以上増強できる。したがって、ナノ薄膜干渉基板の高い蛍光増強効果を糸状菌に適用すれば、微弱な蛍光を観察できるようになる、すなわち、菌糸の伸長に重要な役割を果たす低濃度分子からの蛍光を観察できるようになり、菌糸伸長の仕組み解明に多大な貢献をもたらすことが期待される。

そこで、本研究では、ナノ薄膜干渉基板を用いた糸状菌の蛍光増強イメージング法の開発を目的とした。具体的には、蛍光染色した糸状菌からの蛍光の明るさを、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板と比較することで、蛍光増強イメージングを実証した。

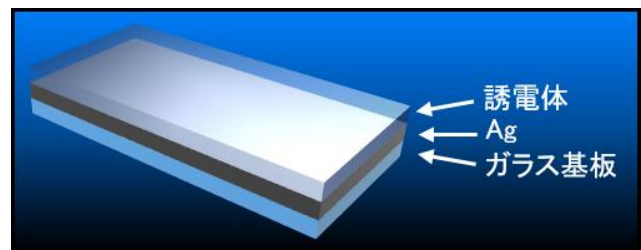


図 1. ナノ薄膜干渉基板の模式図。

< 2. 実験方法 >

2-1. ナノ薄膜干渉基板の作製

スパッタリング装置を用いてガラス基板上に Cr, Ag, Al₂O₃ の順でナノ薄膜を成膜することでナノ薄膜干渉基板を作製した (図 2)。Cr はガラスと Ag の接着層である。Cr と Ag の膜厚はそれぞれ 10 nm, 500 nm であった。Al₂O₃ については使用する蛍光染色剤によって最大蛍光増強をもたらす Al₂O₃ 膜厚が異なるため、最適な Al₂O₃ 膜厚を光学干渉理論により見積もった [2]。その結果、蛍光が最も増強する Al₂O₃ 膜厚は 90 nm 付近であったことから、本研究では 90 nm の Al₂O₃ 膜厚を使用することとした。Al₂O₃ の膜厚はエリプソメータで、また Cr と Ag の膜厚は触針型表面形状解析装置で測定した。

2-2. 糸状菌の培養

毒性の低い安全な糸状菌として、カビのモデルとして広く利用されている *Aspergillus nidulans* TN02A3 を使用した。培地には最小限の栄養だけを加えた最少培地 (pH 6.5) を使用した。*A. nidulans* の孢子を寒天最少培地 (pH 6.5) に植菌し、25°C のインキュベーターで数日間、培養した。



図 2. 実際に作製したナノ薄膜干渉基板。

2-3. 糸状菌の観察

糸状菌の生態を把握するため、最初に実体顕微鏡 (M205C, Leica 社製) を用いて、培養した寒天最少培地上の糸状菌のジャイアントコロニーを観察した。つぎに、そのコロニーから糸状菌をピックアップしてスライドガラス上に塗抹した後、超純水を 1 滴滴下し、カバーガラスを被せてプレパラートを作成した。このプレパラートに封入した糸状菌を、正立型生物顕微鏡 (BX51, Olympus 社製) を用いて微分干渉コントラスト観察を行った。今度は、糸状菌を液体最少培地中で培養し、倒立型光学顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, Nikon 社製) を用いて菌糸が伸長している様子のタイムラプス観察を行った。

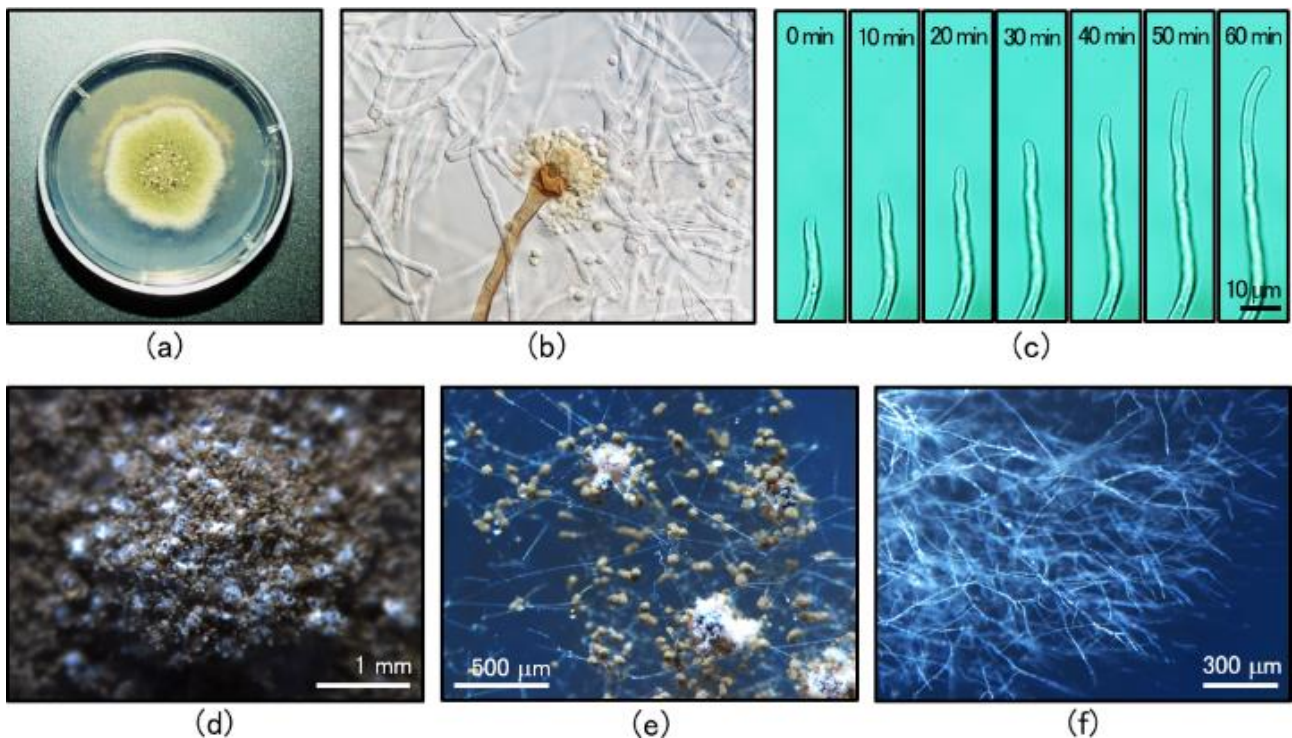


図 3. 糸状菌の顕微鏡観察. (a) 寒天培地上のコロニー. (b) プレパラートに封入した糸状菌の微分干渉コントラスト観察. (c) 液体培養した菌糸のタイムラプス観察. (d-f) コロニーの実体顕微鏡観察.

2-4. 菌糸の蛍光染色

真菌に分類される糸状菌用の蛍光染色剤として、ファンギフローラ Y を使用した。ファンギフローラ Y は真菌の細胞壁を構成する多糖類 (セルロースやキチン等) に結合する蛍光染色剤である。糸状菌の染色方法としては、ナノ薄膜干渉基板にファンギフローラ Y を 1 滴滴下し、そこに菌糸を塗抹してカバーガラスを被せた。同じ操作を比較用のスライドガラスでも行った。

2-5. 染色した菌糸の蛍光イメージング

蛍光染色した糸状菌を正立型蛍光顕微鏡で観察し、観察される蛍光を CCD カメラで撮影した。またナノ薄膜干渉基板と比較用スライドガラスでの蛍光強度を測定し、蛍光の明るさを比較した。これにより、カビの蛍光増強イメージングを実証した。

< 3. 結果・考察 >

3-1. 糸状菌の生態

糸状菌の生態を把握するため、最初に様々な観察法を用いて糸状菌を観察した。その写真を図 3 に示す。図 3a は糸状菌のジャイアントコロニーであり、緑色の部分が孢子、白色の部分が菌糸である。このコロニーからプレパラートを作成し、正立型生物顕微鏡で観察したものが図 3b である。茶色が分生子柄、その先端にある丸い形状のものが孢子、その周りにある糸状のものが菌糸である。図 3c は菌糸が伸びる様子のタイムラプス観察である。伸長速度は培養時間や菌糸ごとに異なるが、今回、標

的とした菌糸は 1 時間で数十マイクロメートル以上伸長した。図 3d-f は実体顕微鏡で観察した糸状菌のコロニーである。図 3d はコロニーの中心部分、図 3e は分生子柄と孢子、図 3f は菌糸である。

一般に、糸状菌の生育は孢子の発芽から始まる。発芽して形成された菌糸は伸長しながら分岐する。ある程度、生長すると、菌糸細胞が分化し、分生子柄が形成される。この分生子柄の先端では孢子が作られ、その孢子が新たな環境で発芽する、というライフサイクルにより、糸状菌は厳しい生存競争を勝ち抜いている。このように、多様な手法で糸状菌を観察することで、知識としての生態ではなく、実際の観察でおおまかな糸状菌の生態を把握することができた。

3-2. 染色した菌糸の蛍光観察

つぎの段階として、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板での蛍光強度を定量的に評価するには、糸状菌をムラなく染色する必要がある。そこで、スライドガラス上で糸状菌を蛍光染色した。そのときの蛍光像を図 4 に示す。本研究で使用した蛍光染色剤は真菌の細胞壁を構成する多糖類 (セルロースやキチン等) に結合するため、図 4a に示すように菌糸が染色されている。また図 4b に着目すると、分生子柄の先端には楕円状のフィアライドまたはメトレが、さらにその先には球状の孢子がある様子をはっきりと観察できる。このときの蛍光像では図 4c に示すように、フィアライドやメトレ、さらには孢子が染色されている様子を確認できる。このように、糸状菌をムラなく蛍光染色することができた。

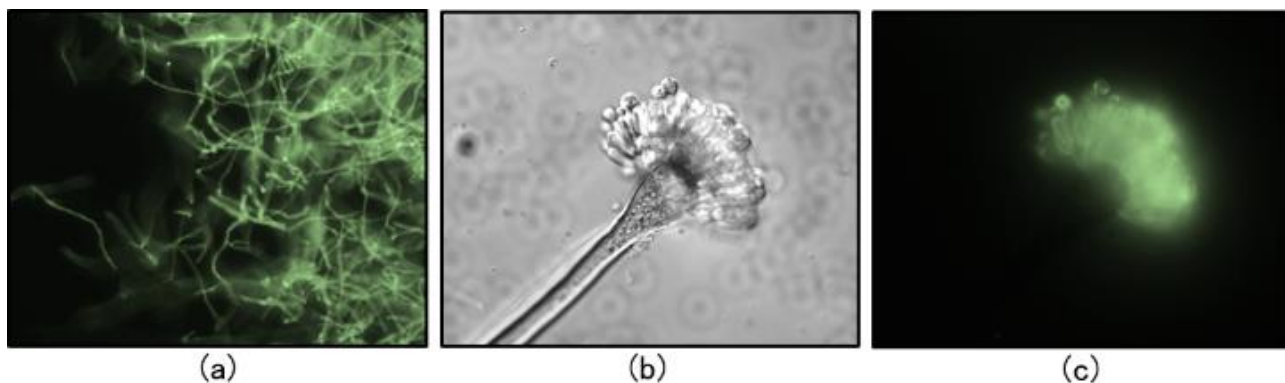


図 4. スライドガラス上で染色した糸状菌の蛍光観察. (a) 対物レンズ 20x の菌糸の蛍光. (b,c) 対物レンズ 100x. (b) 分生子柄と孢子の微分干渉コントラスト観察. (c) 染色されたフィアライドまたはメトレと孢子の蛍光.

3-3. 蛍光増強イメージング

糸状菌の蛍光増強イメージングを実証するため、図 5 にナノ薄膜干渉基板上で観察した糸状菌の蛍光像を示す。図 4 と同様に、蛍光染色剤によりムラなく染色された菌糸をはっきりと確認できる。菌糸内で明確な線のように光っているものは隔壁である。ここで、ナノ薄膜干渉基板で観察された菌糸の蛍光強度とガラス基板での菌糸の蛍光強度を比較した。その結果、ナノ薄膜干渉基板はガラス基板よりも高い蛍光強度を示した。しかし、蛍光の増強度は予想よりもはるかに低い 2 倍程度であった。

これまでのナノ薄膜干渉基板を用いた研究ではタンパク質 [3] や DNA [4] の検出において 50 倍以上の蛍光増強を達成していた。そのため、本研究においても数十倍の蛍光増強を想定していた。しかし、実際は 2 倍程度の増強であった。これにはいくつかの要因が考えられる。

過去の経験では、紫外域に光吸収特性をもつ蛍光分子からの蛍光はあまり増強しなかった。今回使用した蛍光染色剤ファンギフローラ Y も同様に紫外域に光吸収特性をもつため、紫外域ではナノ薄膜干渉基板の蛍光増強効果が得られにくいかもしれない。一方、蛍光増強は蛍光分子の蛍光波長が短くなるにつれて低下する現象も過去の成果より得られている [2]。これらを考慮すると、現時点では蛍光増強メカニズムが未解明であるが、高い蛍光増強を得るには今回よりも長い波長の蛍光を発する染色剤を使用する必要があると考えられる。

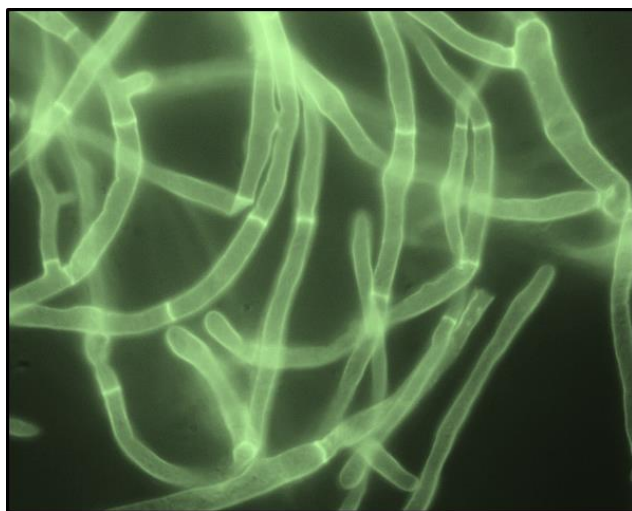


図 5. ナノ薄膜干渉基板上で染色した菌糸の蛍光増強観察。対物レンズは 100x を使用。

3-4. 蛍光タンパク質を発現する糸状菌の観察

蛍光増強が予想以上に低かったため、糸状菌の専門家より蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) と RFP (Red Fluorescent Protein) を発現する組換え糸状菌 *A. nidulans* SDM1004 を提供して頂いた。GFP は青色の光を吸収し、緑色の蛍光を発するため、ファンギフローラ Y と似ている。一方、RFP は橙色の光を吸収し、赤色の蛍光を発することから、紫外域から離れた領域に光吸収特性をもち、なおかつファンギフローラ Y よりも長い波長の蛍光を発し、より高い蛍光増強が期待される。そこで、組換え糸状菌を寒天最少培地で培養し、スライドガラス上で観察した。その結果を図 6 に示す。

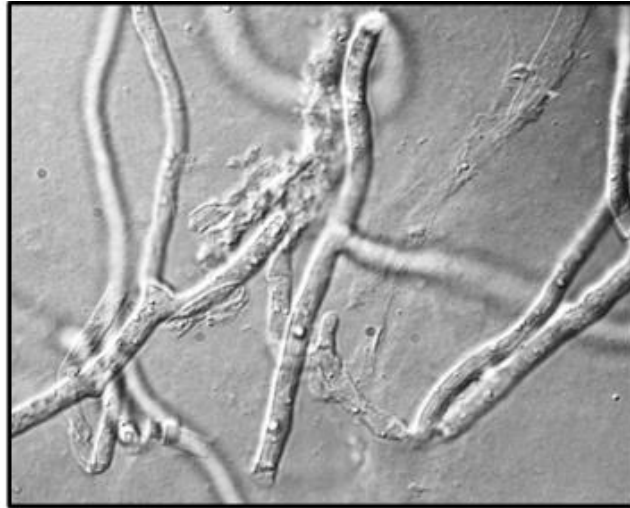
緑色に光っている部分はミトコンドリア、赤色に光っている部分は細胞核である。このように、GFP と RFP を発現する組換え糸状菌の蛍光観察から、ミトコンドリアと細胞核の局在を確認できた。今後は蛍光染色実験と並行して蛍光タンパク質の蛍光増強観察実験を実施する。

< 4. まとめと今後の展望 >

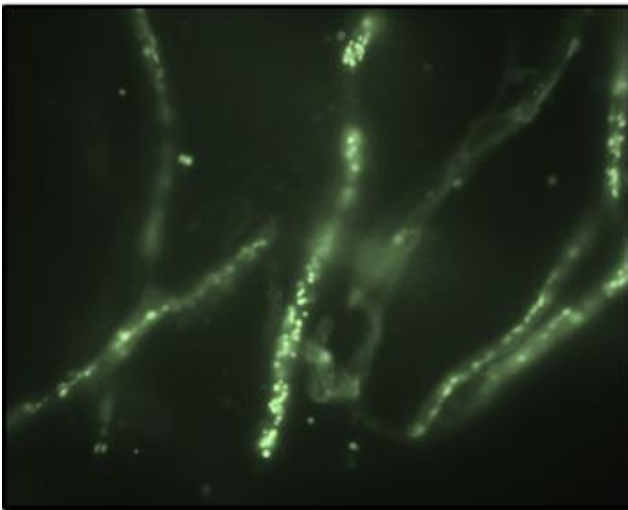
本研究ではナノ薄膜干渉基板を用いることで、従来のスライドガラスと比較し、染色したカビの蛍光増強観察を実証することに成功した。しかし、実際の蛍光増強度はたったの 2 倍程度であった。これまでの経験から、紫外域の光吸収特性をもつ蛍光分子からの蛍光はあまり増強しなかったため、今後は別の蛍光染色剤や組換え糸状菌を用いて、さらなる蛍光増強を目指す。そして、高い蛍光増強を実証することで、ナノ薄膜干渉基板が菌糸の伸長機構の理解に対して強力なツールとなることを証明していく。将来的には蛍光イメージングとラマン分光法を融合した新たな技術開発へとつなげていく。

< 5. 謝辞 >

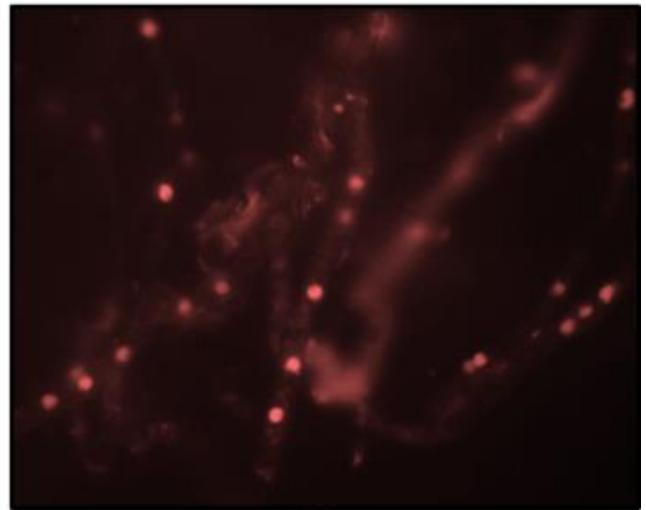
本研究は高柳健次郎財団の支援のもとに行われた。ここで、本研究の実施にあたり多大なるご支援を承りました高柳健次郎財団に心より御礼申し上げます。



(a)



(b)



(c)

図 6. 蛍光タンパク質を発現する組換え糸状菌 *A. nidulans* SDM1004 を用いた菌糸の蛍光観察. 対物レンズは 100x を使用. (a) 微分干渉コントラスト観察. (b) GFP により緑色に発色するミトコンドリア. (c) RFP により赤色に発色する細胞核.

< 6. 参考文献 >

- [1] T. Akimoto, M. Yasuda, and I. Karube, "Effect of the polarization and incident angle of excitation light on the fluorescence enhancement observed with a multilayered substrate fabricated by Ag and Al₂O₃," *Appl. Opt.* 47 (21), pp3789–3794 (2008).
- [2] T. Akimoto and M. Yasuda, "Fluorescence enhancement and reflection of the excitation light observed with a multilayered substrate," *Appl. Opt.* 49 (1), pp80–85 (2009).
- [3] M. Yasuda and T. Akimoto, "Highly sensitive fluorescence detection of avidin/streptavidin with an optical interference mirror slide," *Anal. Sci.* 28 (10), pp947–952 (2012).
- [4] M. Yasuda and T. Akimoto, "Enhanced fluorescent DNA microarray using an optical interference mirror slide," *Sens. Mater.* 30 (1), pp59–66 (2018).