

糸状菌イメージング研究の実用例

超解像顕微鏡による菌糸伸長の解析，麹菌の破精込み

竹下 典男

はじめに

糸状菌は菌糸と呼ばれる管状の細胞を伸ばして生長し、先端生長と分岐によりネットワーク状の菌糸体を形成する。菌糸を伸ばして生長する際に、多くの酵素を細胞外に出して有機物を分解し、栄養を吸収する。自然界では分解者として重要な役割を果たしており、物質循環に必要である。糸状菌の中には、コウジカビのように伝統的な発酵食品（酒・醤油・味噌など）の生産に関わるものがある。近年では、有機酸・有用酵素・抗生物質の生産などのバイオ産業にも利用される。一方で、ヒトや農作物の細胞に侵入して病原性を示し、甚大な被害をもたらすものもある。糸状菌の高い酵素分泌能と病原性は、菌糸状の生育様式と密接に関連していることから、菌糸が伸びる仕組みの解明を目指している。菌糸生長の仕組みと動態については、本誌第98巻第4号¹⁾で解説しているので、そちらを参照していただきたい。ここでは新技術として、超解像顕微鏡技術PALMを、菌糸伸長の解析例を用いて解説する。また、異分野融合の成果として、本誌でも馴染み深い麹菌が蒸米に破精込む様子をイメージングした研究を併せて紹介する。

超解像顕微鏡への流れ

目に見えない微生物を研究するために、顕微鏡が大きな役割を果たしてきた。さらに、特定のタンパク質や分子に特異的に蛍光標識することで、細胞内のオルガネラ・膜・細胞骨格・各タンパク質の局在や動態を、生きた細胞で観察できるようになり、蛍光顕微鏡技術は微生物学だけでなく生命科学全般で大きく発展し重要な役割を占めている。約20年前に、筆者が研究室に配属になった際の研究テーマは、糸状菌の細胞壁合成酵素に緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）を付加し、その局在を解析するものであった。その後の私の研究に、蛍光顕微鏡の発展は大きな影響を与えている。タイムラプス、Z-スタック、共焦点、多色観察、分光制御、カメラ/検出器の高感度化、空間的・時間的解像度の改良、一分子観察、ライトシートなど、蛍光顕微鏡の発展の

ピードは目まぐるしい。機能の高度化・細分化・自動化が進んでいるため、装置の特性と限界を十分に認識して、目的に合わせて装置と機能を選択する必要がある。自動化で色々なことができるようになった反面、暗室で長時間も当時の顕微鏡を覗いていた経験が、観察眼を育てたようにも思う。

筆者は、幅が約2 μmの菌糸の生長様式、菌糸先端での生長機構を研究してきた。膜小胞、細胞骨格、極性を制御するタンパク質などの局在と動態、関わり合いを解析した。その過程で、菌糸先端の頂点の、さらに細かい部位で何が起きているのかを明らかにしたいという動機が生じた。その結果、2011年当時所属していたドイツのカルスルーエ工科大学内で、超解像顕微鏡の開発を進めていた物理学科U. Nienhaus教授と共同研究を行う機会を得た。

超解像顕微鏡（Super resolution microscopy）の説明をする前に、解像度：resolutionについて触れる必要がある。Resolutionの定義は、二つのものが二つと認識できる最小の距離のことであり、分解能という訳の方が近いと思われる（図1A）。より細かい格子/画素で画像を示すことができるので、（画面）解像度が高いとも言える。光の波としての性質上、光学顕微鏡では光の波長の半分程度までしか分解能がない。可視から近赤外の光の波長は400–900 nmであり、蛍光顕微鏡の分解能は200–450 nmと言われる。一分子からの光であってもレンズを通った後は、波長の半分までには絞込みせず、その距離内に二分子があると二分子とは認識できない。共焦点顕微鏡で光を絞っても解像度は180–250 nmと言われている²⁾。

この解像度の限界を超えるものが超解像技術と呼ばれ、近年その存在感を増している。大別して、STED (Stimulated emission depletion), SIM (Structured illumination microscopy), PALM (Photoactivated localization microscopy) /STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy)の3種類の方法がある。これらの超解像技術の開発者であるE. Betzig, S. W. Hell, W. E. Moernerの3名には、2014年にノーベル化学賞が授与されている。ここでは、筆者が実際に使用しているPALM/STORM

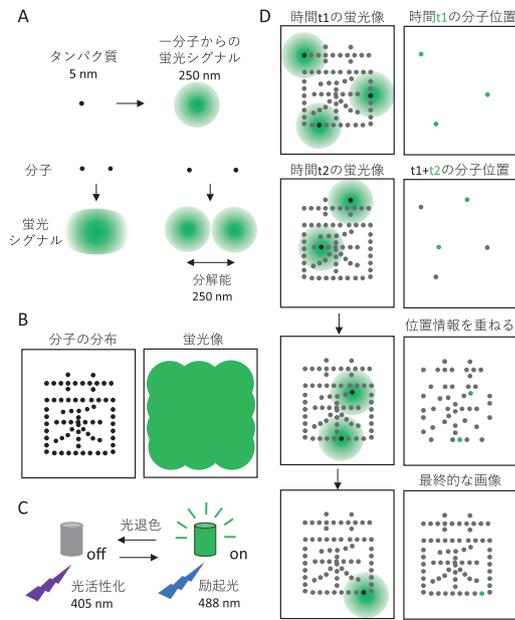


図1. PALM/STORMの原理

について解析例をあげて掘り下げる。STED, SIMに関しては日本語の文献を紹介³⁾, 原理と特徴をごく簡単に触れることとする。

STEDでは共焦点顕微鏡の光学系に観察用励起光のレーザー光とドーナツ状のSTED光と呼ばれるレーザー光の2種類をほぼ同時に照射する。ドーナツ状のSTED光は、励起された蛍光の発光を抑制する波長となっており、ドーナツ状の中心のきわめて狭い空間の蛍光だけを励起することができる(解像度は ~ 40 nm)⁴⁾。

レンズの開口数NA (Numerical aperture) は、レンズの分解能を示す指標である。開口数の値が大きいくほど、より多くの回折光を取り込める。顕微鏡の解像度を上げるには、より多くの回折光を顕微鏡に取り込む必要があるが、取り込める角度は対物レンズのNAで制限される。SIMではストライプ状のパターンで蛍光を励起し、縞の方向を変化させながら蛍光像を取得する。画像演算により微細構造を抽出して画像を構築することで、2倍のNAの対物レンズで取得したような画像を取得することができる(解像度は ~ 100 nm)。

超解像顕微鏡技術PALM/STORM

通常の蛍光顕微鏡では多くのタンパク質などの分子からの蛍光を同時に観察する(図1B)。分子が分解能よりも近い位置に分布している場合、蛍光像からその分布を正しく認識することができない。そして、その蛍光像をいくら拡大しても分子の分布は判別できない。しかし、個別の分子を別々に発光させることができれば、話は変

わってくる。PALM/STORMは試料中の分子を個別に発光させ、一分子の蛍光信号を検出することで分子の位置を決定し、その位置情報を重ね合わせることで、分子の分布を反映した画像を構築する手法である。一分子イメージングが可能であれば、その信号からフィッティングという画像解析により、分子の位置をある精度で測定できる。

蛍光分子を個別に発光させるために、発光可能な状態(on)と発光できない状態(off)を切り替えることができる(photoswitchable)蛍光タンパク質や色素が使用される。PALMではphotoswitchable蛍光タンパク質、STORMではphotoswitchable蛍光色素を使用するという違いで、原理はほぼ同じである。Photoswitchable蛍光タンパク質の例として、サンゴからクローニングされ改良されたタンパク質Dronpaを説明する(図1C)⁵⁾。Dronpaは発光可能な状態(on)と発光できない状態(off)を切り替えることができる。Dronpa(on)は488 nmの励起光により緑の蛍光を発し、通常の蛍光タンパク質と同様に光退色してDronpa(off)の状態になる。一つの蛍光タンパク質の光退色は通常は数秒以内で起きる。Dronpa(off)に400 nmの紫光を照射すると、光活性化と呼ばれる構造変化によりDronpa(on)の状態に変化する。光活性化にかかるエネルギー変化は、蛍光を発するエネルギー変化よりも大きく、400 nmの光の強度を制御することで試料内のDronpa(off)を徐々に確率的にDronpa(on)に変換することができる。緑から赤に蛍光色に変化するphotoswitchable蛍光タンパク質であるKaedeやEosも、400 nmの紫光照射による構造変化により赤色蛍光(off)から(on)に変換できる。

PALM/STORMはphotoswitchingを制御することで、試料中の分子を確率的に個別に発光させ、一分子の蛍光信号を検出する(図1D)。時間ごとの分子位置を決定し、その位置情報を重ね合わせることで、最終的に分子の分布を反映した画像を構築する。一分子の蛍光信号を検出するため、通常はバックグラウンドの低い全反射顕微鏡技術を用いる。その空間分解能は、どれほど正確に分子位置を計測するか(測定精度)、フィッティングという画像解析処理にかかっている。一分子の蛍光信号からの光子の数と分布から計測され、数nmから数十nmの精度を持つ位置情報(座標)を重ね合わせて画像を構築する。

超解像顕微鏡技術PALMによる菌糸伸長機構の解析

糸状菌*Aspergillus nidulans*の菌糸先端の形質膜に局在する極性マーカーTeaRは、菌糸生長に必要なマシナリー

の局在を決定することで、菌糸の伸長方向・細胞極性を制御する^{6,7)}。TeaRにphotoswitchable蛍光タンパク質であるEosを付加し、その菌糸先端での局在を生細胞で観察した⁸⁾。400 nmの微弱な光をあて赤色蛍光(off)から(on)への構造変化を起こさせながら、561 nmの光でEosの赤色蛍光を励起し検出する。1秒間に20枚のイメージを取得するペースで、50秒間撮影し合計1000枚のイメージで超解像イメージを構築した。その結果、幅が約2 μmの菌糸先端で、TeaRは約120 nmのサイズのクラスターを形成していることが判明した(図2A)。この120 nmという限られた領域で、アクチンケーブルが合成され、分泌小胞が集積し、エキソサイトーシスが起きると考えられる⁸⁻¹⁰⁾。

PALMは時間分解能が低いと言われる。一分子の10-50 nm程度の精度を持った点座標で、像を構築するため、1秒間20枚のイメージで像を構築しても座標の情報が少ない。何秒何枚のイメージが必要であるかは、試料中の分子の数と分布に依存する。そのため、小胞輸送のような早い移動を伴う現象(数十μm/s)の解析には向かない。400 nmの光の強度を調節し、蛍光(off)から(on)への頻度を調整しながら、イメージを取得する。画像構築はデータ取得後に行うので、像の情報量を見ながら任意の時間(数秒から数分)のデータから像を構築できる。

私達は、moving windowという手法(使用するデータセットの時間をずらすこと)で2.5秒ごとのタイムラプ

スでPALM像を構築した。これにより、TeaRが約120 nmのクラスターを形成した後、形質膜の拡張に伴い膜上で拡散する様子を捉えた(図2B)。これは、TeaRクラスター部位でエキソサイトーシスが起きるためだと考えられる(図2C)。TeaRが再び極性部位に集合するには、微小管の菌糸先端の形質膜への到達が関わる⁸⁾。

細胞壁合成に関わるキチン合成酵素の一つ、ChsBについても同様にPALMによる超解像イメージング解析を行った¹¹⁾。タイムラプスPALMによりChsBが菌糸先端のどこに局在化し、どのように菌糸が伸長するかを超解像レベルで示した。さらに、一分子解析である特徴を活かし、そこに局在するタンパク質分子の数を定量化し、その時間的変化も合わせて示すことに成功した(図2D, E)。

これら超解像イメージング解析で明らかにされた結果は、時空間的に制御された菌糸伸長機構の解明につながった。アクチン・エキソサイトーシス・Ca²⁺の蛍光ライブイメージングにより、Ca²⁺の周期的な流入が、アクチン脱重合化とエキソサイトーシスを同調的に引き起こすことで菌糸生長のタイミングが制御される機構が判明した¹²⁾。つまり、菌糸の伸長速度が一定ではなく、少し伸びて止まり、また少し伸びて止まるといった周期的な伸長を繰り返している¹³⁾。これは環境シグナルに素早く応答し、菌糸生長の速度や方向、分岐を制御することで、より良い環境を選択し生存空間を拡大するという利点が考えられる。

麹菌の破精込み

糸状菌の菌糸生長を利用する応用例の一つとして、酒造りにおける米麹があげられる。蒸米にコウジカビを生やすと、菌糸が米の内部に入り込み生長する。この菌糸の入り具合は破精込みと呼ばれ、米麹の品質に重要である。米内に生長する菌糸がアミラーゼなどの酵素を分泌し、米のデンプンを糖に分解する。その糖化の具合が、酵母の生育と発酵に、そして酒の品質に大きく影響する。

米は表面にタンパク質や脂肪が多く、中心はデンプンである¹⁴⁾。清酒の雑味を減らすため、米麹には米表面の豊富なタンパク質や脂質が削られた米を用いる。玄米に対する白米重量を精米歩合といい、通常の食用米は精米歩合90%であるが、清酒造りでは精米歩合70%以下まで磨かれた酒米を使用する。

私達は、GFPで蛍光標識された*Aspergillus oryzae*と精米歩合の異なる酒米・食用米を用いて米麹を作製し、蛍光イメージングにより破精込みを可視化し解析を行った¹⁵⁾。米の表面を10%程度削った精米歩合90%の酒米・食用米よりも、精米歩合50%の酒米で米の内部により深く

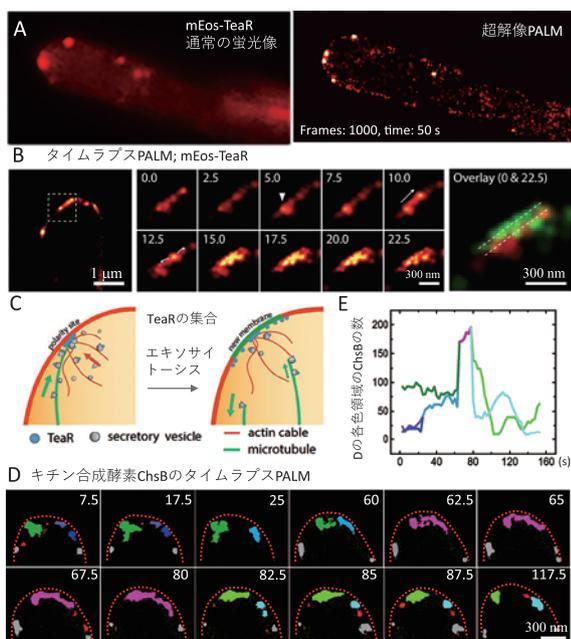


図2. PALMによる研究結果

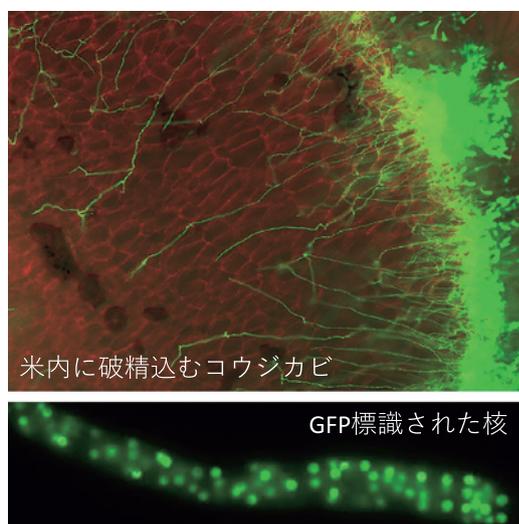


図3. *A. oryzae*の破精込みと核

菌糸が破精込む傾向が見られた（図3上）。特に菌糸が米の細胞間を伸長する様子が観察された。トランスクリプトーム解析の結果と合わせて、精米歩合90%の酒米・食用米では米表面付近に比較的多いタンパク質や脂質を利用して生育し菌糸が深く破精込まないのに対して、精米歩合50%の酒米では菌糸が米深部へ、より破精込むことが予想される。今後、米やコウジカビの種の組合せや米麴の作製方法と、破精込みの相関、酒品質との相関についての解析が期待される。

この研究の過程で、*A. oryzae*本株では、培養時間に従って核の数が劇的に増加するという特徴的な形質が明らかになった。培養1日目では菌糸先端の細胞には20個程度の核数であったのが、培養3日目には200個以上になるものが見られた（図3下）。この形質は*A. oryzae*の酵素分泌能の高さと相関があるかもしれない。近縁種である*Aspergillus flavus*ではこのような形質は見られないことから、伝統的な育種の過程で*A. oryzae*が獲得した形質であることも考えられる。*Aspergillus sojae*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus kawachii*など、醤油や焼酎生産に関わる種についても似たような形質があるのか興味を持たれる。今後、この形質に関わる分子機構の解明が進めば、応用への新たなアプローチにつながることも期待される。

おわりに

ERATOテクノロジー特集ということで、超解像イメージングの手法と実例を解説し、異分野融合の成果として米麴における菌糸の破精込みを紹介した。誌面の都合上、破精込み関しては多くを紹介できなかったが、本論文はFungal Biol Biotechnol誌で、日本の糸状菌研究特集で公開されている¹⁵⁾。麴菌利用の伝統と未来という趣旨で総説と論文が集められているので、是非そちらも参照していただきたい。

超解像イメージング技術は、まだ誰もが必要とする技術ではないかもしれない。また、技術や設備のハードルが高く現実的な選択肢ではないかもしれない。しかし、これまで見えなかったものが見えるようになる発見や説得力は、これまでの顕微鏡の発展の歴史からも明らかである。超解像イメージング技術の普及のためにも、興味のある方はぜひ連絡をいただきたい。高いハードルを乗り越える手助けができる体制が整いつつある。

謝 辞

本研究の一部は、科学技術振興機構ERATO野村集団微生物制御プロジェクト(JPMJER1502)により実施したものである。

文 献

- 1) 竹下典男：生物工学，**98**, 183 (2020).
- 2) Schermelleh, L. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **190**, 165 (2010).
- 3) 藤田克昌：生物物理，**50**, 174 (2010).
- 4) Rittweger, E.: *Nat. photon*, **3**, 144 (2009).
- 5) Habuchi, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9511 (2005).
- 6) Takeshita, N. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **19**, 339 (2008).
- 7) Fischer, R. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **68**, 813 (2008).
- 8) Ishitsuka, Y. *et al.*: *Sci. Adv.*, **1**, e1500947 (2015).
- 9) Bergs, A. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **7**, 682 (2016).
- 10) Takeshita, N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 1693 (2016).
- 11) Zhou, L. *et al.*: *Sci. Adv.*, **4**, e1701798 (2018).
- 12) Takeshita, N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 5701 (2017).
- 13) Takeshita, N.: *Fungal Genet. Biol.*, **110**, 10 (2018).
- 14) Okuda, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 1428 (2019).
- 15) Yasui, M. *et al.*: *Fungal Biol. Biotechnol.*, **7**, 8 (2020). Special issues; Fungal research in Japan: tradition and future.