

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「新たな光機能や光物性の発現・利活用
を基軸とする次世代フォトニクスの基盤技術」
研究課題「魚のバイオリフレクターで創る
バイオ・光デバイス融合技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年 3月

研究代表者：岩坂 正和
(国立大学法人広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

魚のグアニン微小板を中心に、生物が環境光の高効率利用に用いているバイオリフレクターとその関連物質の光機能解明と、新たな応用展開の可能性を切り拓くための研究を推進した。

岩坂グループで魚類のグアニン微小板の光特性の新奇現象とそのメカニズムの解明を進め、浅田グループとグアニン結晶の人工的作製に取り組んだ。その際、大場グループでの深海魚（ハダカイワシ等）の発光器におけるグアニン結晶関連遺伝子の探索で得られる情報も参考とした。開発検討した人工的なグアニン結晶作製法の中からひとつの手法の知財化プロセスを実行し、企業（化粧品関連）との産学連携活動も行った。水産業の廃棄物として得られるグアニン微小板の調査と、その効率的な回収法の開発検討も行った。

魚のグアニン微小板の光機能解明と利用に関しては、各グループが独自の研究を行いつつ、各グループでの成果が互いに相互干渉し有意義な成果が生じることを狙った。岩坂グループで得られたグアニン板の光干渉効果（モアレ光干渉縞）の基礎的な知見を、浅田グループはマイクロ分光器の開発へ繋げた。そのための MEMS 基盤技術として、グアニン結晶を磁場や電場でハンドリングするための微細加工技術の開発を行った。

グアニン微小板を用いた光制御技術に関し、岩坂グループは、水中浮遊した微小板の磁場配向により反射光の強度を 2 倍程度増加させた。この光制御は蛍光の微弱発光系においても実現可能となった。その厚みが 100nm~200nm のグアニン微小板が水中に浮遊している状態での光学特性の詳細を解明した。高分解能レンズを具備した実験系に加え、電磁界シミュレーションおよびレンズフリー型 CMOS 観察系を駆使し、他の材料では観察できない現象として、グアニン微小板が水中で画像素子上に直接投影するマイクロ・ナノ構造体イメージを明らかにした。これまで均一な一枚板と考えられていた、魚のグアニン微小板の内部にナノスケールの三角形構造が存在し、この構造が板表面にグレーティング構造を形成し光回折を引き起こしうることを実験とシミュレーションで実証した。

生体系におけるグアニン微小板のさまざまな応用可能性の開拓も岩坂グループは行った。培養細胞・生体組織へのグアニン板付与によるイメージングコントラストの向上、水中での音響振動を可視化するためのグアニン微小板応用などを開拓した。特に、可聴音を光に変える光マイクロフォンの新技術として振動板表面の水滴を用いる手法を提案し、この水滴中に浮遊させた魚類グアニン微小板が音変換率の増幅効果とイコライザー効果を有する音響光トランスデューサとして機能することを明らかにした。

大場グループと岩坂グループは、深海発光魚の発光器におけるグアニン微小板の光制御機能の解明で協力した。また、浅海魚やクシクラゲの体の新規バイオリフレクターの発掘を岩坂グループが水族館や水産業関連分野の協力のもとで行い、世界中に分布する海水魚のトウゴロウイワシの一種であるヤクシマイワシの体表で数 Hz の光反射点滅を引き起こす色素胞を発見した。これらの成果をもとに、魚の体表に分布する色素細胞と呼ばれる数種類の細胞の中で、グアニン微小板を微弱反射光増強のために有効に利用する手法の理解が深まった。また、深海発光魚ハダカイワシの発光器においてグアニン微小板が果たす物理光学的な役割と動物行動学的な意義を解明し、発光タンパク質による微弱な生物発光の制御にグアニン微小板の関与する原理が明確化した。

生物が光反射を制御するために用いるバイオリフレクターに対し発光生物内部から照射される発光という現象について、大場グループは新たな展開を行った。発光タンパク質が消化プロセスで分解されず再利用されていることを発見し、さらに、発光生物（蛍）の発光色の進化に関し、太古の時代にまで遡って遺伝子解析による発光色の再現に成功した。

蛍や蝶々など昆虫のバイオリフレクターとの比較を磁気・光反射応答において行った結果、魚のバイオリフレクターであるグアニン微小板との共通点が見いだされるとともに、グアニン微小板固有の光特性を活用できる技術が明らかとなった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. バイオリフレクターを用いて数ヘルツ以上の速度で光点滅を行う魚の発見

概要: 多くの魚の体表にはグアニンを含むイリドフォア(虹色素胞)が存在し光反射パターンを形成している。ヤクシマイワシの頭部や背中、胴体の各所に配置したイリドフォアが、数 Hz 以上の高速光反射点滅を引き起こすことを明らかにした。そのメカニズムとして側線系における機械振動などの可能性を提案し、バイオミメティクスの道筋を開拓した。動物の体表で光散乱を高速制御する虹色素胞の発見は、神経生理と MEMS アクチュエータの新たな接点を切り拓くと期待される。

2. 生物発光酵素ルシフェラーゼの祖先配列復元

概要: ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列(約 30 データ)をデータセットとして、最尤法により祖先型ルシフェラーゼ遺伝子の配列を復元した。この復元された祖先ルシフェラーゼ配列に基づきリコンビナントタンパク質を作り、ルシフェリンと混合したところ波長 548 nm の光が再現された。その発光色はルシフェリン結合ドメイン周囲の環境を変えることで制御できることが示唆された。既存のルシフェラーゼの発光色をグアニン型光反射板の性能に合わせて調整できると思われる。

3. 魚類グアニン微小板の内部構造と光散乱特性の解明

概要: 高分解能光学顕微鏡および電子顕微鏡を用い魚類グアニン微小板の内部構造の詳細な解析を行った。厚み 100nm 程度のグアニン微小板表面に三角形のくぼみが直線状に並んだグレーティング構造が形成されていることが明らかとなった。側方入射光に対して水中浮遊グアニン板が引き起こす複数の虚像形成も明らかとなり、そのメカニズムを FDTD 電磁界シミュレーションに基づき、厚み 100nm 程度で数ミクロン角の板が引き起こす光反射・回折パターンとして解明できた。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 魚のグアニン微小板によるオンチップ動体イメージング

概要: CMOS イメージセンサーの上にグアニン板が浮遊する水層を形成し、側方からの照射でオンチップ・イメージングを行う装置を開発した。水中の各グアニン板からの散乱光をレンズフリーにて投影スポットとして可視化することに成功した。グアニン微小板と周囲の物体との相互作用をイメージセンサーへ投影することが可能となった。水中のマクロ空間での物体の動きを可視化することが、従来技術に比べはるかにコンパクトな装置サイズで実現可能となった。

2. 魚のグアニン微小板を音響トランスデューサとして用いた動体センシング

概要: 水滴あるいは薄層液体セル内にグアニン微小板集団を分散し、その液体に与えた音響信号情報を光干渉パターンと光反射強度の時間変化に含ませる技術を開発した。グアニン含有液体で変調された反射光を用いた光スピーカーを提案し、屋内空間に配置した光センサーに向けた音の光送信を実現した。この技術を顕微鏡での生体観測に適用し、マイクロ物体の動きで発生する可聴音～超音波領域の測定法を開発した。繊毛運動に含まれる音響信号の光検出に成功した。

3. グアニン結晶およびグアニン微小板を多量に得る手段の確立

概要: グアニン結晶の再生産に関し、強塩基水溶液中でのグアニン Na 塩結晶の作製を行い、その技術を中性水溶液中で不溶の結晶化へと展開した。漁業・水産業での廃棄物からのグアニン微小板回収の方法を検討し、漁港での船倉残留海水からの精製法、廃棄魚からのグアニン微小板回収の調査を進めた。魚由来のグアニン微小板の供給体制に関し、漁業関係機関における廃棄魚からのグアニン結晶回収について見通しを得た。魚体から剥離したウロコからの回収以外に、廃棄魚の皮膚からの回収など、手立ては多いことが明らかとなった。

<代表的な論文>

1. Masakazu Iwasaka, Hironori Asada, “Floating photonic crystals utilizing magnetically aligned biogenic guanine platelets” *Scientific Reports*, 8, 16940, Page(s): 1 - 11, 2018
DOI:10.1038/s41598-018-34866-x

概要：魚由来グアニン結晶板の輝きが強いの原因について、結晶板同士での光干渉効果とそのひとつであることを水中浮遊させた結晶板の磁場配向の詳細な解析で明らかにした。さらに、魚由来グアニン結晶板の高分解能光学顕微像について、新たに開発した一軸性暗視野照明法により新規発見をなした。厚み 100nm の結晶板が数 100nm 間隔のグレーティング構造を持つことで、反射・屈折光を回折させ強い光干渉パターンを形成する性能を有するという知見を得た。

2. Masakazu Iwasaka, “Flashing spots on the dorsal trunk of hardyhead silverside fish”, *Royal Society Open Science*, 8(4), 201578, 2021, DOI: 10.1098/rsos.201578

概要：トウゴロウイワシの 1 種の海洋魚であるヤクシマイワシの背中に点在する色素胞の集団が円形のスポットを形成し、外部光を反射する方式で光点滅を行うことを発見した。この直径 100mm 程度の円形のスポットは青い背景色を基調としつつ、緑～黄色への色変化および光強度変化を 1 秒以内に引き起こした。その周期的変化の周波数は数 Hz 以上であった。直径 10mm 以下の虹色素胞が、その内部のグアニン微小板によって反射光を制御したと考えられる。

3. Y. Oba, K. Konishi, D. Yano, H. Shibata, D. Kato, T. Shirai,
“Resurrecting the ancient glow of the fireflies”, *Science Advances*, 6(49), eabc5705, 2020,
DOI: 10.1126/sciadv.abc5705

概要：既存のルシフェラーゼを使用環境に合わせた特性を持つように最適化するため、ホタルルシフェラーゼをモデルに、X 線結晶構造解析を使った機能構造相関を調べる研究を行った。最尤法により祖先型ルシフェラーゼ遺伝子の配列を復元し、リコンビナントタンパク質を作り、ルシフェリンと混合したところ 548 nm というホタル類としてはきわめて短波長の光が再現された。現在のホタルがもつ黄緑色や黄色の光(より長波長の光)を制御する構造的な仕組みを解明できた。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 岩坂グループ

研究代表者: 岩坂 正和 (広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所 教授)

研究項目: バイオリフレクターの微弱光制御機能の解明と光制御手法の開発

- ・新奇リフレクター機能の発掘と解析
- ・天然グアニン結晶の光機能を模倣する手法の開発
- ・ベシクルでのイリドプレート形成
- ・グアニン結晶の再生産手法の開発

② 菊池グループ

主たる共同研究者: 菊池 裕 (広島大学大学院理学研究科 教授)

研究項目: バイオリフレクターの再生産手法の開発

- ・魚類グアニン結晶形成を制御する遺伝子の同定
- ・大腸菌等での再生産

③ 大場グループ

主たる共同研究者: 大場 裕一 (中部大学応用生物学部 教授)

研究項目: 深海発光魚における発光器特異的遺伝子の特定と、深海光コミュニケーションの解明

- ・深海魚の発光器に特異的に発現する遺伝子群の探索
- ・深海発光魚の光コミュニケーションの解明

④ 浅田グループ

主たる共同研究者: 浅田 裕法 (山口大学大学院創成科学研究科 教授)

研究項目: バイオリフレクターの光 MEMS 化のための技術開発

- ・グアニン結晶を用いた微細加工技術の開発
- ・磁気駆動グアニン結晶型グレーティングミラー
- ・グアニン結晶の磁性アシスト法の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

水族館と連携することで、2017年に英国ブリストル大のロバーツ教授が来日し、広島県宮島水族館にて、カタクチイワシの眼のグアニン結晶層の共同実験を実施した。カタクチイワシを常に飼育している機関を探索し、国内の水族館および水族館へカタクチイワシを納入する水産業者との連携を行った。九州大学水産実験所において、生きたカタクチイワシのウロコに付着した新鮮な状態のグアニン微小板の解析を行う体制を確立できた。

深海魚の採集に関しては、2017年の国際活動支援を受け沖縄の水族館(美ら島財団研究所)と連携し、共同実験プロジェクトを開始した。ベルギーの深海サメ研究者であるマレフェ教授を招聘し、フジクジラという深海サメの発光器の共同実験を実施した。

大場グループでは、発光キノコの発光メカニズムに関する国際共同研究をロシア科学アカデミー、シベリア連邦大学、サンパウロ大学と進めた。また、ホタルゲノム解読に関し、MIT ホワイトヘッド研究所と岡崎基礎生物学研究所との共同研究を継続した。発光ゴカイルシフェラーゼの研究に関しては、米モントレー水族館研究所との共同で行った。発光ミズ分子系統解析に関し、チュラロンコン大学(タイ)との共同で進めた。

浅田グループではグアニン結晶の電界駆動に関する研究を呉工業高等専門学校と共同で行った。また、テラヘルツ光に関する研究を大阪大学と共同で行った。