

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310078

研究課題名（和文）環境感受性色素による生体膜界面水素イオン濃度・膜電位の同時近接場光学計測法の開発

研究課題名（英文）Development of near-field optical microscopy for hydrogen ion concentration and membrane potential using environmental sensitivity dye

研究代表者

梅田 倫弘（UMEDA NORIHIRO）

東京農工大学 大学院工学研究院・教授

研究者番号：60111803

研究成果の概要（和文）：本研究は、ミトコンドリア内膜の水素イオン濃度の勾配形成を可視化するために、二光子吸収励起レシオ計測蛍光近接場光学顕微鏡（TARF-SNOM）を開発することを目的とした。そのために、フェムト秒短パルスレーザーを励起光源とした pH 感受性蛍光色素とコレクションモード近接場光学顕微鏡によるレシオ計測光学系を組み合わせた開発装置の pH 値計測性能を明らかにするとともに、活性ミトコンドリアの pH 計測変化を計測できることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, a dual-wavelength pH-sensitive dye was excited by two-photon absorption initiated using a femtosecond pulse laser. In addition, fluorescence from the dye was directly collected from the fluorescent point using the collection-mode probe of a scanning near-field optical microscope. By this proposed method, a pH calibration curve was obtained from the fluorescent intensity ratio of the dye solution, and temporal pH variations with 0.1 s time resolution following the addition of acid were observed. Moreover, mitochondrial activity on the basis of the pH changes was successfully observed in three different mitochondrial densities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：ナノフォトニクス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：近接場光学顕微鏡、蛍光感受性色素、ミトコンドリア、pH、ネクロシス、多光子吸収、プロトンポンプ

FIR から pH 値を算出できる。

SNARF-4F を、スクロース、EDTA を含むトリスバッファーで混合させた。トリスバッファーは、ミトコンドリア以外の要因による pH 値変動を避けるためである。本研究では SNARF-4F を 0.02mM の濃度で利用した。

(2) 実験装置

本研究で構築した実験装置の配置を図 2 に示す。フェムト秒パルスレーザー（波長

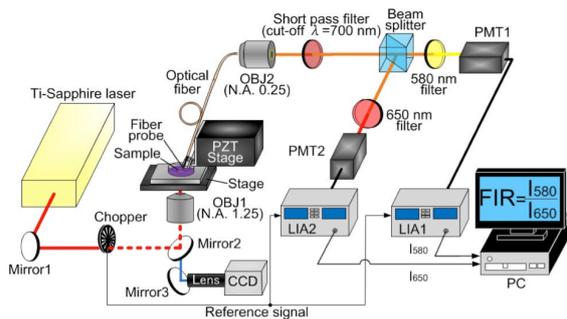


図2 実験装置

800nm、パルス幅 100fs) を、2 光子吸収のための励起光源として使用した。レーザービームはチョッパーで周波数 230Hz で強度変調する。変調ビームは、NA0.65 の対物レンズで試料に集束させ、集束点で 2 光子吸収を発生させた。2 光子励起によって放出された蛍光は、先端曲率が 50nm 程度の溶融延伸光ファイバプローブを接近させて散乱収集させた。収集蛍光は、ファイバー内を伝搬して他端からの出射光を、励起光カットフィルター (700nm) を通してビームスプリッター BS で 2 分割する。2 分割された光は、580 および 650nm のバンドパスフィルターを通して冷却光電子増倍管で光電検出される。

FIR を 2 つの比を算出して求め、pH と FIR の校正曲線から pH 値を求める。

(3) 実験手順

まず、FIR の pH に対する校正曲線を実験的に求めた。5.0 から 8.5 までの pH の色素溶液を製作し、図 2 の実験装置を用いて各溶液に対する FIR を求め、データシートからの

FIR と比較した。

また、栄養素を付加するための最適な方法を検討するために、シャーレ内での注入位置および滴下量の最適化を行った。

4. 研究成果

(1) SNARF-4F の校正曲線

SNARF-4F の pH5.0-8.5 に対する FIR の測定結果を図 3 に示す。2 光子吸収励起によって得られた校正曲線は、単光子吸収およびデータシートによる特性と相関係数が 0.984 でほぼ一致していることが分かる。これらの結果から、SNARF-4F は、提案する方法で利用できること、および pH 値が校正曲線を利用して FIR から算出できることが明らかとなった。とくに、図 3 から、pH7 付近で FIR が大きく変化している。これは、ミトコンドリアの pH 活性領域である中性から弱酸性領域とほぼ一致しており、ミトコンドリアの活性度評価をする上で適していることがわかる。

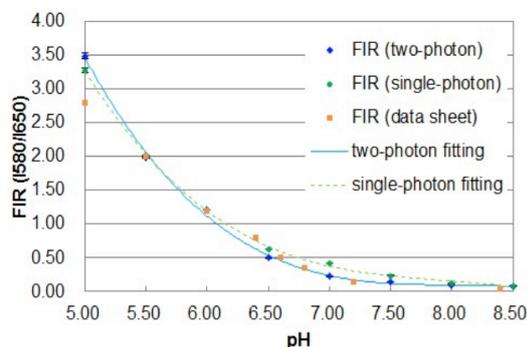


図3 pHの校正曲線

(2) 塩酸および栄養剤の添加

塩酸を蛍光色素に添加したことによる FIR の時間的変化を図 4 に示す。これから注ぎ込み

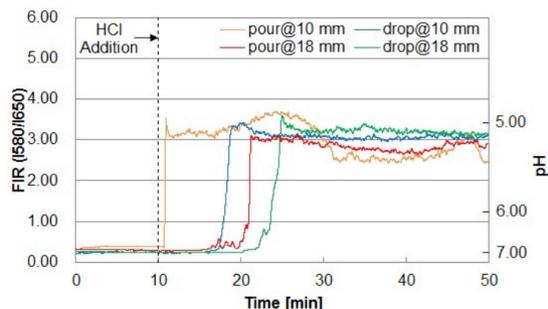


図4 塩酸の添加によるFIR応答

によって塩酸を添加する方法が、早い FIR 変化を得られることが分かる。また、この実験結果から構築した実験装置の応答時間が 0.1s であることが分かる。つまりミトコンドリア活性度の応答評価は、0.1s の時間分解能で計測できることを示している。

次に、ミトコンドリアがない状態の蛍光色素溶液に栄養剤を添加した時の FIR の変化を測定した。その結果を図 5 に示す。栄養剤と色素溶液の pH を調整して同一にしている。これから、栄養剤の添加によってわずかな FIR の変動が見られる。この変化を pH 値に換算すると、0.0070 および 0.0077 であり、実験装置の測定誤差範囲内であり、問題ないことが分かる。

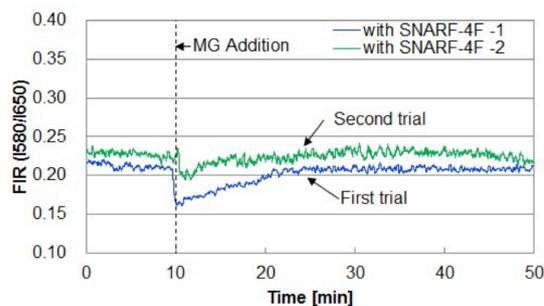


図5 栄養素添加によるFIRの変化

(3) ミトコンドリアの活性度評価

ミトコンドリアの活性度の測定結果を図 6 に示す。ミトコンドリアを栄養剤 MG を添加させて活性化させた時、FIR が急激に上昇していることが分かる。これらの結果は、pH の減少、すなわちプロトン濃度の上昇を反映している。この図の FIR 変化から、pH 変化は、ミ

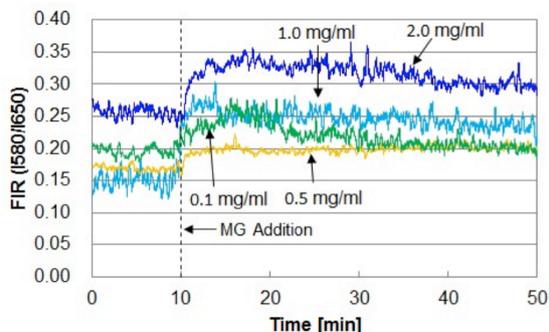


図6 ミトコンドリアの活性応答

トコンドリア濃度が 0.5, 1.0, 2.0mg/ml に対して 0.063, 0.113, 0.200 であることが分かる。この FIR の増加分は、図 4 に示した pH 変化量に比べて明らかに大きくなっており、ミトコンドリアの活性によるものと考えられる。

図 7 は、測定の再現性を確認するため、ミトコンドリアの異なる濃度に対するミトコンドリアの活性度の測定結果を示す。ミトコンドリアの数による pH 変化量が異なることが期待される。この実験結果から、ミトコンドリアの濃度が大きくなるにつれて pH 変化量 Δ pH が異なっていることが分かる。

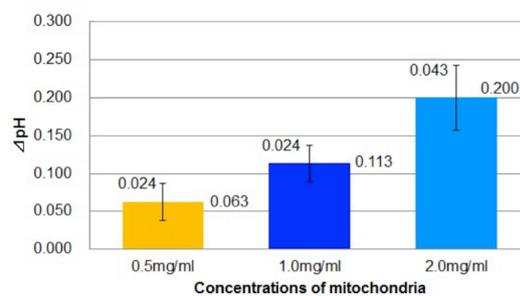


図7 ミトコンドリア濃度に対する pH 変化

(4) まとめ

本研究では、2 波長 pH 感受性蛍光色素の 2 光子吸収励起と近接場光学顕微鏡に基づく新しい pH 計測法を提案した。本手法は、色素の局所励起を行うために、フェムト秒パルスレーザー励起による 2 光子吸収現象を用いている。さらに、発生した蛍光は、局所蛍光を確実に収集するために光ファイバプローブを利用した。本手法により pH 校正曲線を得ることに成功するとともに、2 光子吸収と単光子吸収による校正曲線は高い相関係数が得られた。さらに、濃度のことなるミトコンドリアに対する pH 変化を計測し、その濃度に比例して pH 変化量が大きくなることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Y. Kanazashi, Y. Li, T. Onojima, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “pH measurement using dual wavelength fluorescent ratio by two-photon excitation for mitochondrial activity”, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 51 (2012) 117001-1~117001-5

doi:10.1143/JJAP.51.117001

②長谷田圭亮、兼松啓太、太田善浩、ミトコンドリアの内部密度の評価法の開発とその応用、バイオイメージング、査読有、21, (2012)15-21

<http://www.tuat.ac.jp/~ohta>

③Yongbo Li*, Ryosuke Shinohara, Kentaro Iwami, Yoshihiro Ohta and Norihiko Umeda, Observation of Mitochondrial Activity Based on Temporal and Spatial pH Variation Measured by Near-Field Fluorescent Ratiometry, Science China Physics, Mechanics and Astronomy, 査読有, 54(2011) 2225-2229 Doi:10.1007/s11433-011-4533-4

④Y. Kanazashi, Y. Li, T. Onojima, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “Two-photon fluorescence near-field pH measurement for mitochondria activity”, SPIE Digital Library NanoScience + Engineering: Instrumentation, Metrology, and Standards for Nanomanufacturing, Optics, and Semiconductors V, 査読無, 81050E (2011)

[学会発表] (計 14 件)

①Y. Kanazashi, Y. Nomura, D. Yoshimatsu, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “Evaluation of Mitochondrial Activity by Membrane Potential Observation and pH measurement”, APNFO2013, (2013.7.5, Singapore) (発表確定)

②金指 康明, 野村 雄一, 李 永波, 吉松 大輝, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “ミトコンドリア活性評価のための膜電位観測と 2 光子吸収 pH 測定”, 2013 年春季第 60 回応用物理学関係連合講演, 28a-G16-5 (2013.3.28, 厚木、神奈川工科大学)

③野村 雄一, 金指 康明, 吉松 大輝, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “膜電位観測と 2 光子吸収励起 pH 測定によるミトコン

ドリア活性評価”, 日本光学会年次学術講演会 OPJ2012, 25aC5 (2012.10.25, 東京・タワーホール船越)

④Y. Kanazashi, Y. Li, T. Onojima, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “pH measurement for mitochondrial activity evaluation using two-photon excitation”, NF012, ThP-007 (2012.9.6, San Sebastian, Spain)

⑤Y. Kanazashi, Y. Li, T. Onojima, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “pH measurement for mitochondrial activity evaluation using fluorescent ratiometry by two-photon absorption”, ICHC2012, P2-13 (2012.8.28, 京都・京都国際会館)

⑥金指 康明, 李 永波, 小野島 匠, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “ミトコンドリア活性評価のための 2 光子吸収励起による近接場 pH 測定”, 日本光学会・ナノオプティクス研究グループ研究討論会第 20 回記念シンポジウム, P18 (2012.5.23, 横浜、慶応大学)

⑦金指 康明, 李 永波, 小野島 匠, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “2 光子吸収励起による pH 値測定を用いたミトコンドリア活性評価”, 2012 年春季 第 59 回 応用物理学関係連合講演, 17a-F8-5 (2012.3.17, 東京、早稲田大学)

⑧Y. Kanazashi, Y. Li, T. Onojima, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “Two-photon fluorescence near-field pH measurement for mitochondria activity”, SPIE Optics + Photonics, 8105-16 (2011.8.25, San Diego, USA)

⑨金指 康明, 李 永波, 小野島 匠, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “2 光子励起による 2 波長蛍光レゾを用いた微小領域 pH 測定”, 第 37 回レーザ顕微鏡研究会 (2011.7.6, 和光、理化学研究所)

⑩金指 康明, 李 永波, 小野島 匠, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “2 光子蛍光励起による近接場 pH 値測定”, 2011 年春季第 58 回 応用物理学関係連合講演, 27p-BH-5 (2011.3.27, 厚木、神奈川工科大学)

⑪Y. Li, Y. Kanazashi, K. Iwami, Y. Ohta, N. Umeda, “Temporal and Spatial pH Variation Measurement by Near-Field Fluorescent Ratiometry for Observation of Mitochondrial Activity”, 東京農工大学・電気通信大学第 7 回合同シンポジウム “ナノ未来材料とコヒーレント光科学”, T1 (2010.12.11, 調布、電気通信大学)

⑫李 永波, 金指 康明, 岩見 健太郎, 太田 善浩, 梅田 倫弘, “蛍光レゾ近接場顕微鏡法によるミトコンドリア活性の観測”, 日本光学会年次学術講演会 OPJ2010, 10pH2 (2010.11.10, 東京、中央大学)

⑬長谷田 圭亮, 李 永波, 篠原 亮輔, 金指

康明, 小野島 匠, 岩見 健太郎, 梅田 倫弘,
太田 善浩, “近接場光学プローブを備えた
蛍光顕微鏡によるミトコンドリア周囲の pH
の計測の試み”, 第 48 回日本生物物理学会
年会, 1P319 (2010.9.20, 仙台、東北大学)
⑭ 李 永波, 金指 康明, 岩見 健太郎, 太田
善浩, 梅田 倫弘, “蛍光レシオ近接場顕微
鏡法によるミトコンドリア活性の観測”, 第
36 回レーザー顕微鏡研究会 (2010.7.6, 和光、
理化学研究所)

[その他]

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/~umedalab>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 倫弘 (UMEDA NORIHIRO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：60111803

(2) 研究分担者

岩見 健太郎 (IWAMI KENTAROU)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80514710

太田 善浩 (OHTA YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10223843

(3) 連携研究者 なし