

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21550090

研究課題名（和文） 自己相関蛍光法の特性解析と応用法拡大に関する研究

研究課題名（英文） Study on characteristic analysis and extension of application for auto-correlation spectroscopy.

研究代表者 藤原 祺多夫 (FUJIWARA KITAO)
 東京薬科大学・生命科学部・教授
 研究者番号：90090521

研究成果の概要（和文）：前年度までの研究成果を踏まえて、蛍光相関法について、通常の蛍光光度法の光学系を用いた、細胞形状の変化（大腸菌のサイズに対するマイトマイシンの影響評価）、円石藻の殻（円石）の付着による水中内運動性の評価、共焦点光学系を用いたローダミン6Gによる水/アルコールの粘度測定について研究した。本研究では、ラマン散乱への自己相関法の応用を目的に含めたが、研究には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：On the base of the previous study, the size variation of *E. coli* cell induced by MitomycinC(MMC) and Effect of Coccolith surrounding the cell of *Pleurochrysis hatonemofera* on its fluid dynamics were investigated with the ordinary fluorescent configuration. With con-focal fluorescent system, the viscosity of water/ethanol binary solution was inspected with dissolving Rhodamine 6G. In this study, auto-correlation spectroscopy was not investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
年度			
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：蛍光分光法・自己相関分光法・細胞・分子計測

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛍光相関法 (Fluorescent Correlation Spectroscopy 略して FCS) は、はじめて登場したのは、Elson 等の論文ではないかと考える (E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers*, **13**, 1-27 (1974)). ここに共焦点光学顕微鏡が導入されて、単一分子のサイズ測定がなされるようになったのは、Rigler 等の論文が最初と思われる (R. Rigler, J. Widengren, *J. BioScience*, **2**, 189-183 (1990)). しか

し Rigler が *Anal. Chem.* 誌に発表して以来 (M. Gösch, H. Blom, J. Holm, T. Heino, R. Rigler, *Anal. Chem.*, **72**, 3260-3265 (2000))、DNA、タンパク質等の生化学を中心とした分野で、2000年代後半には、毎月数十報の論文が発表されるようになっていく。

(2) 本研究は、安価な通常の光学系で、細胞サイズでの粒径変化がどこまで測定できるか、という点から始め、共焦点光学系を組

み立てて、その応用も図った。共焦点顕微鏡は、市販のものでは数千万円に及び、とても通常の研究者では手の出るものではない。安価な共焦点光学系による蛍光相関法を目指すとともに、原理的にはラマン散乱法への応用も出来るはずであり、分子レベルでのサイズ測定としては、興味ある対象である事は間違いない。しかし本研究では金額的、時間的制約から、この分野への研究はできなかった。

2. 研究の目的

(1) 自己相関分光法について、様々な光学系での特性を明らかにし、簡便かつ安価な方法の確立を目的とした。

(2) 蛍光相関法では、対象像の拡大なしに、どこまで情報が得られるかを追求した。また共焦点光学系については、浜松ホトニクス製のオプティカルブロックを組み合わせる事により作成し、分子レベルのFCSを目指した。

3. 研究の方法

(1) 通常の蛍光光学系による蛍光相関法の応用：セル中に乱流を作り、この乱流内のサイズの選別を行う事によって、細胞レベル(μm レベル)でのサイズ測定を目指した。光源には、はじめHe-Cd(325nm)を光源に用いたが、GFP(緑色蛍光たんぱく質)を励起するために、アルゴンレーザーに変えて測定した。

(2) 浜松ホトニクス製のオプティカルブロックを購入する事によって、安価な共焦点光学顕微鏡の光学系を達成し、一分子レベルでの蛍光相関法を行った。

4. 研究成果

(1) 通常蛍光光学系を用いた蛍光相関法と大腸菌サイズに対するマイトマイシンCの影響測定 (Observation of Cell-Size Variation under Environmental Stress by Fluorescence Correlation Spectroscopy without Objective Image Magnification) Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) without objective image magnification (without using confocal microscope) was applied to observe the variation in cell size of *Escherichia coli* (*E. coli*) induced by the anti-cancer agent MitomycinC (MMC). In the system without image magnification followed in this study, the suspension of *E. coli* cells was stirred, and the difference in movement due to the different cell sizes induced by the compulsive solution flow was detected. The addition of 0.1-0.4 $\mu\text{g/L}$ of MMC elongated the *E. coli* cell length from about 3.6 to 7.8 μm . The flow cell (i. d. = about 1 mm)

also produced a size-dependent correlation curve. The present system is not based on single molecular FCS but is inexpensive and effective at observing the variation in cell size induced by environmental changes.

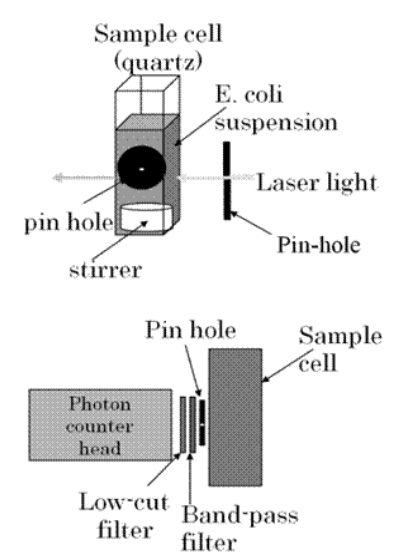


図1. 通常光学系による乱流下でのFCSの装置図

(2) 蛍光相関分光法による円石藻の流体挙動の解析

当実験では、円石藻の外殻の有無による細胞表面の粘性抵抗の差を利用し測定するため、円石藻の脱灰処理を行った。円石藻は pH を調整することにより容易に脱灰処理をすることができる。今回は pH5.5 に調整したが、pH をかえることで殻のはずれぐあいをかえることができる。

脱灰方法は、円石藻を 2200 G で 2 分間遠心分離を行。その後、円石藻は沈殿するため、上澄み液を排気し、排気した量と同量の MES-NaOH (pH5.5 に調整したもの) を加えピペティング処理をした。その後、再度 2200 G で 2 分間遠心分離を行った。この作業により円石藻の脱灰作業は終了である。そのため脱灰された円石藻が沈殿するため、上澄み液を

廃棄し、排気した上澄み液と同量の IMS 培地を加えピペティング処理をし、脱灰済み円石藻溶液とした。

実験結果

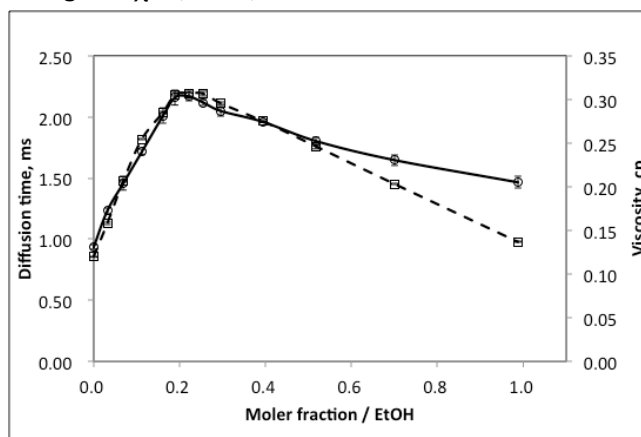
フローサイトメトリーで円石藻の大きさと表面の粗さを測定した。フローサイトメトリーで円石藻を測定する際、縦軸を count 横軸を前方散乱で測定した。前方散乱は、サンプルの大きさを測っているため前方散乱を測定することで今回使用している円石藻の大きさを測定することができる。この結果からわかったことは脱灰している円石藻としていない円石藻で細胞の大きさに変化はなかった。また $6 \mu\text{m}$ の標準ビーズと $10 \mu\text{m}$ の標準ビーズでフローサイトメトリーで測定した結果と円石藻の測定結果から比で計算した結果、今回使用した円石藻の大きさは $15 \mu\text{m}$ であることがわかった。

先に示した装置を用いて、脱殻した円石藻と元の円石藻を測定したが、FCS 攪拌速度をあげて測定してみた結果、脱殻の有無で生じる結果が反転してしまった。このことから考えられることは、細胞表面が粗い方が水流に乗りやすく、水流による力の方が水中を移動する際に付加する抵抗値より大きくなるためそのような結果がしようじたと考えられた。先に述べた FCS 装置で、細胞表面の粗さを反映した溶液内流動性が測定できた。

(3) 共焦点光学系による水/アルコール混合溶媒の粘度測定 (Viscosity of Water-Ethanol Binary Solution with Rhodamine6G By Fluorescence Correlation Spectroscopy)

Rhodamine 6G (R6G) obtained from Kanto Kagaku Co Ltd, was dissolved in ethanol/water binary solution. As a light source, a 473 nm semiconductor laser

with a single mode optical fiber output (Model 473-5F, purchased from Sumitomo Osaka Cement Co. Ltd.) was used and connected with the optical block (Hamamatsu Photonics). The each optical block was connected with optical fibers. Figure 1 shows the diffusion time obtained by FCS and the viscosity for ethanol and water mixture. In this figure, the peak for the diffusion time coincide with that of the viscosity at the same molar fraction (χ) of ethanol (around $\chi=2.0$). In Fig. 1, the axis of the diffusion time is adjusted to fit the viscosity in the region of the lower χ than 0.2. Therefore, the diffusion time becomes larger than the value of the viscosity in the side of higher χ (> 0.3).



It can be considered that the bulky structure constructed around the dye molecules makes increase in the apparent volume of dye (r in the equation 2), which affects to obtain the larger diffusion time. On the other hand, it can be interpreted that the disruption of the water cage makes the decrease in the apparent volume of R6G (smaller r in the equation (2)), showing smaller diffusion time in the region of higher χ .

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)

[原著論文] (計 4 件)

1. Uchida, M., Kumata, H., Koike, Y., Tsuzuki, M., Uchida, T., Fujiwara, K., Shibata, Y., Radiocarbon-based source apportionment of black carbon (BC) in PM10 aerosols from residential area of suburban Tokyo. Nucl. Instrum. Methods B, **268(7-8)**, 1120-1124, (2010).]
2. 藤原祺多夫、大迫祐太、佐々木孝奈、熊田英峰、青木元秀、川島範男、天然水中有機物の光分解装置の制作と化学発光法を用いたその性能評価、分析化学、**59**, 1021-1028 (2010).
3. Kumata, H., Mori, M., Takahashi, S., Takamiya, S., Tsuzuki, M., Uchida, T., Fujiwara, K., Environ. Sci. Technol. **45**, 9990-9997 (2011).
4. Fujiwara K., Horiuchi, K., Goryouda, S., Hqashidume, Y., Horiguchi, Y., Miyakawa, T., Takasu, M., Aoki, M., Observation of cell-size variation under environmental stress by fluorescence correlation spectroscopy without objective image magnification. J. Environ. Sci. Eng. A(U.S.A.), **1**, 364-370 (2012)

[学会発表] (計 47 件)

1. Horiuchi, K., Tsuyuki, A., Aoki, M., Fujiwara, K., Viscosity measurements of a water-ethanol binary solution with Rhodamine 6G by fluorescence correlation spectroscopy. 12th European

Meeting on Environmental Chemistry, 2011/12/5-7, Clermont-Ferrand, France.

2. Horiuchi, K., Goryoda, S., Horiguchi, N., Aoki, M., Fujiwara, K., Determination of cell-size variation under the environmental stress by fluorescence correlation spectroscopy without image-magnification. 11th European Meeting on Environmental Chemistry, Portoroz, Slovenia. 8-11 December 2010.
3. Akiyama, J., Yanagisawa, S., Fujiwara, K., Uchida, T. The ultrasensitive real-time detection of the volatile organic compound with the nanocrystal-related semiconductor sensor. 11th European Meeting on Environmental Chemistry, Portoroz, Slovenia. 8-11 December 2010.
4. Aoki, M., Matsumoto, H., Takahashi, T., Sato, K., Kumata, H., Fujiwara, K. Thallium Induces Morphological Changes in the Photosynthetic Apparatus of *Synechocystis* sp. PCC6803. In the PS2010 Proceedings, 15th International Congress on Photosynthesis Held at Beijing, China, in press.
5. Matsumoto, H., Aoki, M., Takahashi, T., Sato, K., Kumata, H., Fujiwara, K., Thallium induces morphological changes in the photosynthetic membrane of *Synechocystis* sp. PCC6803, 15th International Congress of Photosynthesis, Beijing, China. August 22-27 2010
6. Takenaka, K., Kikuchi, A., Aoki, M., Kumata, H., Fujiwara, K., Gene Expression Analyses of Putative

Chromate Transporters and Stress Response Factors under Chromate Exposure Condition in a Cyanobacteria. 11th European Meeting on Environmental Chemistry, Portoroz, Slovenia. 8-11 December 2010

7. Yuya Osako, Motohide Aoki, Hidetoshi Kumata, Kitao Fujiwara, Development of the method for photo-decomposition and chemiluminescence evaluation of chemical oxygen demand, 10th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC10), 02-05 December 2009, Limoges, France.
8. Sa-ai, N., Midorikawa, M., Aoki, M., Fujiwara, K.
Toxicity of cobalt complex isomers to micro-algae, 10th European Meeting on Environmental Chemistry, 02-05 December 2009, Limoges, France.
9. Takahashi, T., Aoki, M., Fujiwara, K.
Analysis of proteins responded to thallium exposure in *Synechocystis* sp. PCC6803, 10th European Meeting on Environmental Chemistry, 02-05 December 2009, Limoges, France
10. Takenaka, K., Aoki, M., Fujiwara, K.
Identification of stress response genes to hexavalent chromium in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, 10th European Meeting on Environmental Chemistry, 02-05 December 2009, Limoges, France.
11. Kikuchi, A., Aoki, M., Fujiwara, K.
Analysis of the transporters of hexavalent chromium in cyanobacterium

Synechocystis sp. PCC6803, 10th European Meeting on Environmental Chemistry, December 02-05 2009, Limoges, France.

他 3 6 件

[図書] (計 1 件)

1. 斎藤勝裕、藤原祺多夫、“わかる×わかった 環境化学”、オーム社 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祺多夫 (FUJIWARA KITAO)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：90090521

(2) 研究分担者

青木 元秀 (AOKI MOTOHIDE)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917

(3) 連携研究者

()

研究者番号：