

理化学研究所 ニュース

No. 97

March 1988

パルスレーザー蛍光顕微鏡

はじめに

生き物の研究、とくに細胞レベルでは、昔も今も顕微鏡が一番大切な道具の一つです。最近顕微鏡技術もずいぶん進んで、ついこのあいだまではとても見えなかったようなものが次々と見えるようになってきました。ここでは、最近私達が開発した「一瞬を見る」(超高速現象の可視化)技術と、その細胞工学への応用について紹介したいと思います。

パルスレーザー蛍光顕微鏡

細胞研究でよく活躍するのは、蛍光顕微鏡です。たんに拡大して見るというだけでなく、蛍光色素を結合した特定の分子だけを浮かび上がらせられます。そのうえ便利な蛍光色素がいろいろあって、細胞内のpHやカルシウムイオン濃度、細胞膜電位などが刺激に応じて変化する様子を、蛍光強度、蛍光スペクトルなどの変化としてとらえられます。細胞のさまざまな活動のうちある側面を選んでスポットライトを当て、動的解析ができるのです。

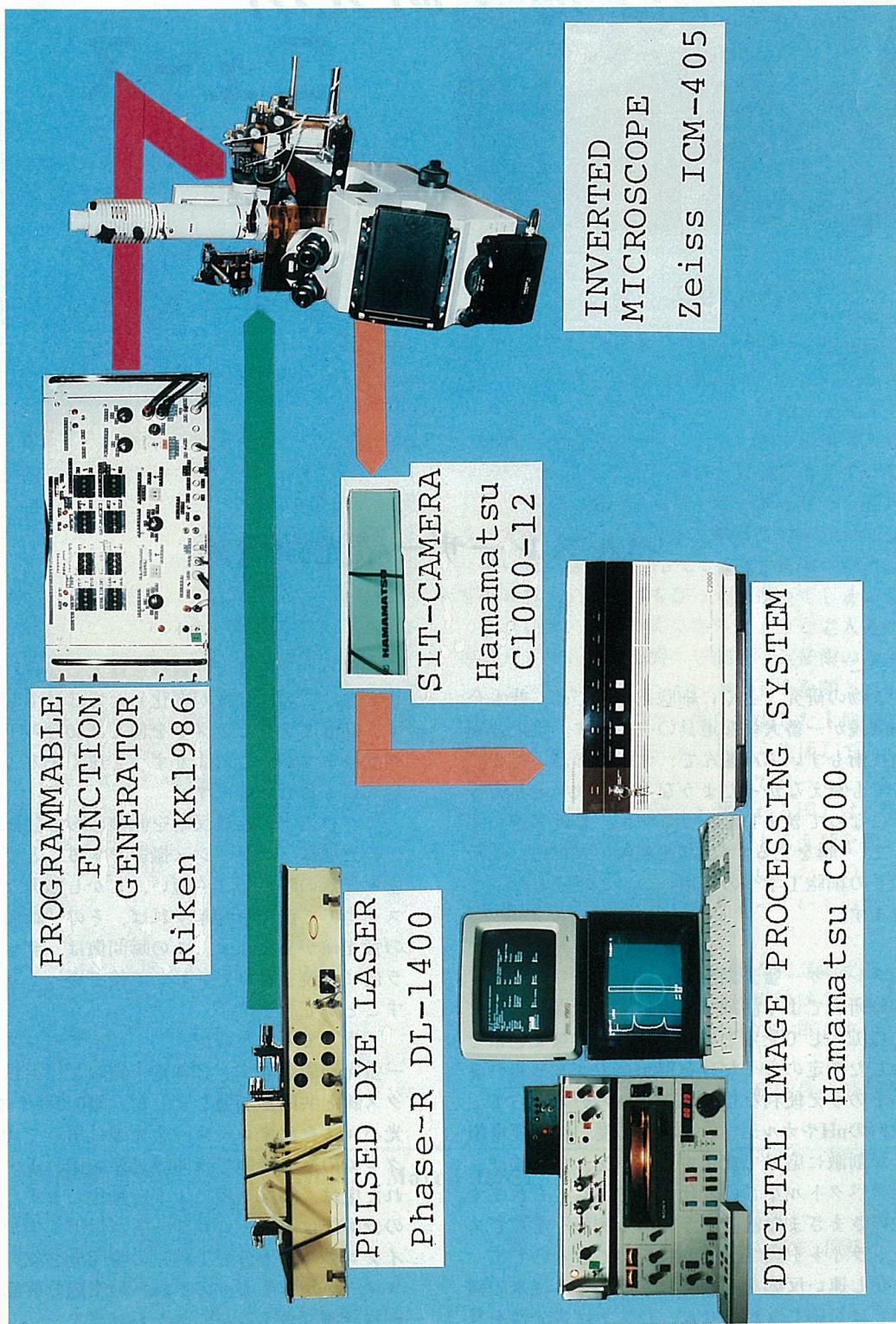
しかし速い反応を解析したくると、従来の顕微鏡では対応しきれません。たとえば蛍光像を写

真に撮ろうとすると、数秒も露光しなければなりません。この間に像が変化したらぼけてしまいます。高感度テレビカメラを使えば30分の1秒で像が撮れますが、これよりずっと速くすることは原理的にも難しいのです。

ミリ秒以下の高速反応を画像の形で記録する唯一の方法は、フラッシュ撮影をすることです。反応中任意の時点でごく短い、しかし強力な光パルス当てて蛍光を励起すれば、その「瞬間」だけの蛍光像が見えます。この瞬間像は、テレビカメラ内に「焼き付けて」おいて後でゆっくり読み出すことができます。

こうしてできたのが、[図1](#)に示すパルスレーザー蛍光顕微鏡です。日本電子(株)および浜松ホトニクス(株)と共同で開発しました。幅0.3マイクロ秒の光パルスを出すレーザーを光源に用いて、0.3マイクロ秒の露光時間で瞬間蛍光像が撮れます。得られた像は、画像処理により定量化します。顕微鏡の分解能は1マイクロメートル以下ですから、マイクロ秒(百万分の1秒)の時間分解能、マイクロメートル(1万分の1cm)の空間分解能を持つ細胞計測システムができたわけです。

図1 パルスレーザー蛍光顕微鏡



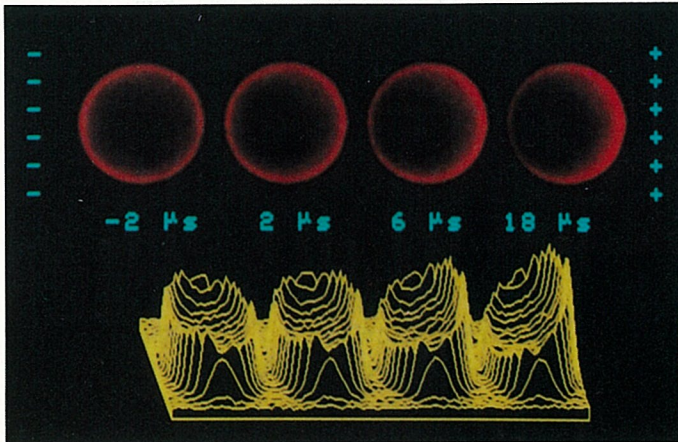
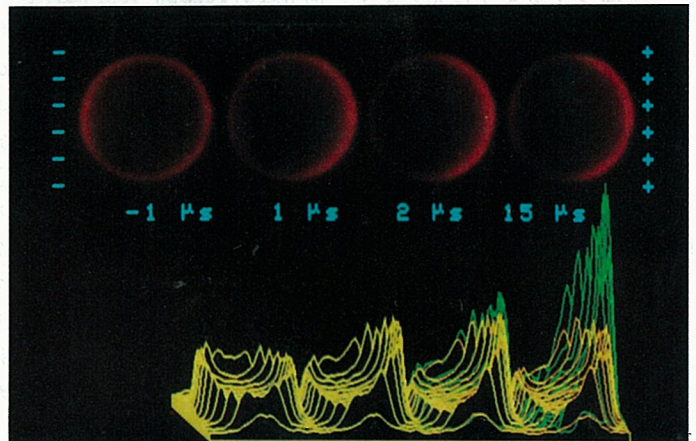


図2 外部電場による
細胞膜電位の誘起過程

図3 細胞電気穿孔にともなう
誘起膜電位の頭打ち現象



細胞膜電位の瞬間測定

図2に、パルスレーザー蛍光顕微鏡を使って細胞の高速応答を実際に測定した例を示します。細胞の表面は細胞膜で覆われていますが、これを赤い蛍光を出す蛍光色素で染め、瞬間蛍光像を撮りました。細胞としてまん丸のウニ卵を選んだので、外周が円形に光ります(図2左上)。細胞の両側に電極をおいて図の右から左へ向かう電場をかけ、何が起きるか見てみました。

図中の4つの像は、電場をかけてからの時間経過です(一番左はかける前)。マイクロ秒単位で細胞の右側(陽極側)の蛍光強度が増加し、左側(陰極側)で減少することが見て取れます。図の下側に黄色で示した強度分布を見るとよくおわかりでしょう。ここで使ったのは実は膜電位感受性蛍光色素というもので、細胞膜の外側表面に吸着して

おり、細胞膜をはさむ内外の電位差(細胞膜電位)にしたがって蛍光強度が変化します。ですから、細胞に外から電場をかけることにより膜電位が発生する様子が見えたわけです。細胞の陽極に面する側では細胞の外が内に対して正になるような電位(蛍光強度は増加)、陰極側ではその逆の電位(蛍光強度減少)が、数マイクロ秒で立ち上がります。

ここで見られた膜電位発生は、細胞内外をイオンにより運ばれる電流が、電気を通さない細胞膜のところにつかえるために起きる物理現象です。電位発生に数マイクロ秒かかるのは、細胞膜がコンデンサーの役目をしてそれをイオンの流れで充電するのに時間がかかるからです。たんなる物理現象ですが、今世紀初めまだ電子顕微鏡もなく細胞膜などとても見えなかった頃、厚さわずか百万分の1cmの絶縁体の膜が細胞表面に存在すること

を証明するという生物学上重要な役割を果たしました。といっても当時膜電位が直接見えたわけではなく、間接的に推定したのです。数十年たった今、初めて直接の検証ができました。

細胞電気穿孔の瞬間が見えた

外からかける電場の大きさを増すと、それに比例して誘起される膜電位も大きくなります。ではいくらか大きな膜電位を発生できるかというところ、そうはいきません。図3は図2と同じような実験ですが、かける電場を4倍にしてみました。1マイクロ秒のところまでは確かに膜電位が立ち上がってくるのですが、そのあとが頭打ち、ないしかえって減少するように見えます。何もなければ図3下側の緑色で表したような蛍光強度変化(膜電位)が期待されるところなのです。

いろいろ調べてみると、誘起される膜電位は約1Vという限界値を越えないことが分かりました。図3もよく見ると、図で細胞の上下の部分、すなわち膜電位の値の小さなところでは時間とともに膜電位が上昇し続け、左右で±1Vに達したところではそこで頭打ちになっています。

膜電位が限界値を越えると、その瞬間に(1マイクロ秒以内に)膜にたくさんの小孔が開き、そこをイオンが流れるようになるのでそれ以上膜電位がかからなくなるのです。図3下側の緑と黄の差が、小孔の効果です。この差はずいぶん大きくて、小孔のせいで膜がスカスカになってしまったことを示します。このままの状態が続くと細胞はすぐ壊れてしまうはずなのですが、電場を切るやいなや(100マイクロ秒くらいで)小孔は縮んでしまい、直径10ナノメートル(1千万分の1cm)程度になってしまうことがわかりました。

細胞に大きな電場を数マイクロ秒かけると細胞膜に小孔が残ることは、細胞電気穿孔と呼ばれ十年ほど前に発見された現象です。この小孔の径は制御でき、必要に応じて完全に閉じることもできるので、細胞内組成を人為的に操作する技術として使えます。細胞を薬物担体に利用したり、細胞内への遺伝子導入、細胞内環境を制御しながら細胞機能の研究など、応用・基礎両面でいろいろな使い道が考えられます。

しかし細胞電気穿孔がどういう仕掛けで起きるの

かはまだ分かっていないのです。電場がかかっている最中の出来事はマイクロ秒という高速現象のため、パルスレーザー蛍光顕微鏡のおかげで初めて見えてきたところです。

2つ以上の細胞が接触した状態で電場をかけてやると、細胞どうしを融合させることができます。巨大細胞を造ったり、異種細胞間の融合もできます。私達も巨大ウニ卵を造ってみたいと思っています。融合は、接触した細胞膜部分に電気穿孔の場合と同様な構造変化が起きることが原因と考えられます。私達は、これら細胞電気穿孔、細胞電気融合の分子機作の解明を通して、「細胞電気工学」の発展に寄与したいと考えています。

展望

膜電位の時間・空間分解測定は、神経系の働きの解明などにも使えると期待しています。ただし、膜電位測定はパルスレーザー蛍光顕微鏡の応用の一例にすぎません。はじめに述べたように蛍光はいろいろな情報を与えてくれます。たとえば、細胞膜中に分子がどんなふうに配列しているかを見ることができ、じっさい私達は電気穿孔現象の解明に利用しています。

ここでは電気刺激にともなう高速現象を取り上げましたが、そのほかにも見たい現象はいろいろあります。とくに、もう1台パルスレーザーを使えば光パルス照射にともなう生物反応・光化学反応の解析ができます。ユニークな働きをする光反応試薬が次々と開発されていることも考えると、この分野には無限の可能性がありそうです。

くわしく述べませんでした。いまのパルスレーザー蛍光顕微鏡には泣きどころが一つあります。基本的に、一回の事象につき一枚の画像しか撮れないのです。図2や図3のように時間変化を追おうとすると、同じ事象を繰り返させて時間をずらせながら撮っていくしかありません。一回きりの現象を相手にするためには、マイクロ秒間隔の連続撮影ができるように改造する必要があります。これはなかなか難しいのですが、不可能ではありません。いま、工夫をこらしているところです。

生物物理研究室

副主任研究員 木下 一彦

理化学研究所一般公開のご案内

理化学研究所は「科学技術週間」の一環として、次のとおり研究室・施設の公開、講演会の開催、科学映画の上映を行います。また、技術相談にも応じます。
所外の皆様のご参加をお待ちしております。

記

和光本所

日 時：昭和63年4月21日(木)

研究室・施設公開 10:00～16:00

講演「原子・分子を見る、触る、動かす」 14:00～15:00

(摩擦工学研究室 主任研究員 青野 正和)

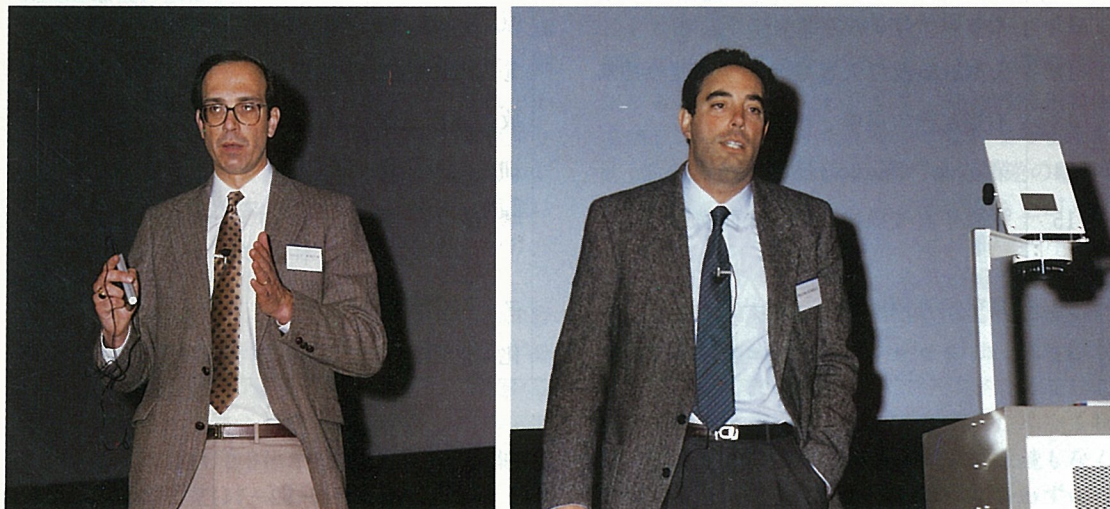
映画「スーパーバグの世界」 15:00～15:30

ライフサイエンス筑波研究センター

日 時：昭和63年4月22日(金) 10:00～16:00

S R 国際シンポジウム「先端科学技術と放射光」盛況裏に幕

当研究所では、日本原子力研究所と共催で、去る1月12、13の両日、大阪国際交流センターにおいて、「先端科学技術と放射光—大型高輝度光源で何ができるか—」と題する標記シンポジウムを開催した。大学、国・公立研究機関、産業界等から約500名の研究者が参加し、欧米で計画されている大型のS R (シンクロトロン放射光)施設の紹介や、S Rを利用した研究成果が発表され盛況裏に閉幕した。



▲講演する米国アルゴンヌ国立研究所のモンクトン所長(左)とヨーロッパ放射光研究施設のアルタレリ研究部長(右)。

昭和63年度前半 理研シンポジウム開催予定表

下記のように、理研シンポジウムを開催いたします。
所外の皆様のご参加をお待ちしております。

	テ ー マ	担当研究室	共 催 予 定 (交渉中を含む)	開催予定日
1	有限要素法による板材成形シミュレーション	変 形 工 学	日本塑性加工学会	4/4
2	第5回「研究を支える技術」	技 術 部		5月下旬
3	高温超伝導と磁性	磁 性	日本物理学会	6月
4	レーザー核分光	サイクロトロン 固 体 化 学		7月
5	重粒子線の生物医学的研究	放射線生物学	放射線生物学東京談話会	8/20
6	超伝導体材料とデバイス	マイクロ波物理		9/1
7	細胞内情報伝達の制御物質—構造と作用—	抗 生 物 質	抗生物質学術協議会	9/2
8	不安定核二次ビームを利用した研究	リニアック		9/10
9	第9回「非接触計測と画像処理」	情 報 科 学	日本ロボット学会 計測自動制御学会	9/22
10	第7回「有機合成化学の新展開」	有機合成化学	日 本 薬 学 会 日 本 化 学 会 有機合成化学協会	9/27
11	光と原子分子	原 子 過 程	原子衝突研究協会	9月
12	大型計算及び大容量データ処理の将来	電子計算機委員会		9月
13	不安定核の崩壊と核構造	放 射 線		10/20
14	第6回「細胞表層糖鎖の化学」	細胞制御化学		11月上旬
15	単原子直接操作による表面構造の制御	摩 擦 工 学	応用物理学会 日本物理学会	11/15
16	真空紫外領域のレーザー分光	マイクロ波物理	日本分光学会	11月中旬
17	バイオプロセスエンジニアリング	化 学 工 学	化学工学協会	11/17～18

連絡先：理化学研究所 図書発表課
電話 0484-62-1111 内線2392、2393

最近公開された当所の特許一覧 (62年9月～62年12月)

公開番号	出願番号	発 明 の 名 称
62-201581	61- 43530	新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG ₁ Fc領域蛋白質の製造方法
62-201582	61- 43531	新規プラスミド、微生物細胞及びヒト免疫グロブリンG ₁ Fc領域蛋白質の製造法
62-205038	61- 47048	4-フルオロ-1-ブテン誘導体の製造方法
62-205047	61- 45992	光学活性(-)-オーデマンシンBの合成法
62-205048	61- 45993	光学活性(-)-オーデマンシンBの合成法
62-205065	61- 47047	オキサゾロン化合物の製造方法
62-207204	61- 50069	植物病害防除剤
62-207234	61- 50067	ジイン化合物及び制癌剤
62-207235	61- 50068	イソプロペニルエーテル又はエステル誘導体の製造方法
62-207284	61- 50071	抗生物質RK-955A及びその製造法
62-208278	61- 50072	アミラーゼ及びその製造法
62-228464	61- 72258	結晶性酸化チタン層を有するチタン材の製造法
62-229694	61- 71662	電界発生装置
62-231136	61- 74729	超微小材料試験装置
62-232386	61- 76285	セルラーゼ遺伝子
62-232919	61- 76284	結晶成長方法
62-234079	61- 76283	アプラスモマイシン合成用中間体及びその製造法
62-234113	61- 78465	時分割光学調整方法
62-234623	61- 78464	しごき絞り加工法および装置
62-234857	61- 78463	電子ビーム源
62-235280	61- 78405	耐摩耗性炭素質表層を有する材料及びその製造法
62-235337	61- 77101	貴金属光沢を有する高分子材料及びその製造方法
62-235517	61- 78466	標点方向検出器の構成
62-238674	61- 81295	超伝導体の製造方法
62-256428	61- 97876	炭素質薄膜の製造方法
62-260058	61-101766	結晶性窒化アルミニウム層を有するアルミニウム材の製造方法
62-262457	61-104900	高分子LB膜電気素子
62-262772	61-104899	高分子LB膜
62-262987	61-106393	細胞培養方法
62-265613	61-109049	光ビームの2次元偏光装置
62-267819	61-111927	ライトペン
62-269692	61-111928	セルラーゼ遺伝子
62-270544	61- 50070	ジヒドロカルコン化合物及び制癌剤
62-278736	61-121967	電子ビーム励起イオン源
62-284071	61-126703	ニッケル基材面にパーマロイ層を形成する方法
62-285349	61-128863	イオンビーム引き出し電極
62-289224	61-131630	レーザーを用いたシリコンを主成分とする固体生成物の製造法
62-297458	61-139924	パーマロイ薄膜の製造法

お問い合わせ先：理化学研究所 開発調査室

電話 0484-62-1111 内線 2303 又は

研究業務部 特許課 内線 2382、2383



ボストンにて

昨年の十二月の初めアメリカでのマテリアル・リサーチ・ソサイエティーの秋の年会に出席するため、ボストンへ行きました。冬の欧米は、音楽のシーズンで、チャンスがあればと楽しみにしてましたところ、ちょうど、小沢征爾指揮のボストン・シンフォニック・オーケストラが公演の最中でしたので、電話をしたところマチネ公演の切符が手に入りました。この切符の予約がアメリカ的で、電話で日にちを予約してクレジットカードの番号を言うだけ、後は当日受付へ行って名前を言えば切符が用意されているという次第です。

その日の出し物は、ブラームスの交響曲第三番、ストラビンスキーのピアノとオーケストラのためのカプリチオ。ピアノのピーター・ゼルキンは有名なルドルフ・ゼルキンの息子さんで、まだ若いアメリカのピアニストです。歯切れのよい素敵な演奏を聞かせてくれます。そして、同じくストラビンスキーのコーラス付きの交響曲でした。この三曲目のは近代的な少々難解な曲でしたが、バラエティーに富んだ曲目でした。

さて、当日予約した切符を受け取り、やっとみつけた席は二階で、ひとまず席に着いたものの、開演までにはまだ二十分以上も有ったので、中二階にあるバーへ足を運んでみました。途中の階段には、熱心なクラシックファンの婦人グループがサンドイッチを片手にプログラムの勉強をしています。バーに行き回りを見回しているうちに、不思議な気持ちになってきました。

なにか変なのです。回りは、白髪の老人ばかり、まるで養老院かなにかのようです。この写真はそのときの物です。さきほど階段に腰掛けていたお



ばさんたちも真っ白な髪をしていましたし、こうやって回りを見渡すと、若い人は数えるほどしかいません。昼間の音楽会は老人たちの数少ない楽しみのひとつらしく、もう腰が曲がってほとんど歩けない人までがせっせと通ってきているのがよく判ります。演奏が始まってから回りを見ても、若い人の姿は殆ど無く、知合い同士の御老人で占められていました。シーズン買いでもしているのでしょうか。後ろからズービーズービーと音がするので振り返ってみると、眠っているわけではない凄く荒い息の、80すぎでしょうかお婦人が楽しんでおられる。いまにもひっくり返ってしまいそう。

そういう、ふらふらになったような老人達が手を携えて冬の寒い金曜の昼間、小沢征爾のボストン・シンフォニック・オーケストラを聞きに行くなんて素敵です。個人主義の発達した土地柄ですから、老後も楽しみを持ちながら生活しているのでしょうか。日本でだったら、家でじっとしているのでしょうか。福祉国家と言われる国では、老人福祉の為に税金が高く大変だと言う話を聞いたことがあります、まさにこういったものに支えられてこういった生活が成り立っているのだなと思いました。

日本も、高齢化社会に向い種々の問題を抱えつつあるようですが、是非自分の老後はこのように優雅でありたいと思ってしまった次第です。

触媒研究室 研究員 川合真紀

理化学研究所ニュース No.97, March 1988

発行日・昭和63年3月31日

編集責任者・佐田 登志夫

編集発行・理化学研究所

問合せ先・開発調査室 (内線 2303)

〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号

電話 (0484) 62-1111 (代表)