3P345

超音波によるチロシナーゼ不活化機構の解明

○高橋 吏、佐藤 政義、鈴木 友子、寺川 健太、平岡 和佳子
(明治大・理工・物理)

皮膚のメラニン色素沈着の過程では、メラノサイト内でチロシンなどの基質がチロシナーゼの活性化に伴いドーパ、ドーパクロムと反応を進めることでメラニンが生成されると考えられている。このメラニン色素沈着を防御・解消するためには、現在薬物療法が主として行われているが、新しい治療法として超音波治療の可能性が近年クローズアップされている。メラニン色素沈着の超音波治療のメカニズムとしては、抗酸化薬物の浸透性の亢進や超音波によるメラニン色素の分解など様々な可能性が考えられているが、その一つに超音波によるチロシナーゼ酵素の不活化機構があげられる。本研究は、超音波によるチロシナーゼ酵素の不活化機構を明らかにすることを目的としている。実験系には、L-ドーパを基質としてマッシュルームチロシナーゼによって生成される赤色のドーパクロムを定量することにより、酵素活性の指標とした。超音波装置には、1 MHz 超音波治療器 ultax UX-301 を使用した。この反応溶液に超音波を照射して、酵素活性への影響を観察したところ、超音波強度が 0.47 W/cm^2 までは一過性の反応速度の低下が見られたが、照射を停止することにより、反応速度は回復した。 0.47 W/cm^2 以上の強度では、照射後も反応速度の低下が見られた。ラジカルスカベンジャーを使った実験と ESR-スピントラッピング法による活性酸素種の測定からは、超音波によるチロシナーゼの不活性化は、キャビテーション効果によって発生する活性酸素種には依存しないということが明らかとなった。さらに、各種の2価金属を使った実験で、チロシナーゼの活性中心である Cu^{2+} を系に過剰添加することで酵素活性の回復がみられたことから、超音波照射によるチロシナーゼの不活化は、活性中心の銅が超音波により外れることに起因していることが示唆された。

T.Takahashi, M.Sato, T.Suzuki, K.Terakawa and W.Hiraoka: Mechanism of ultrasound-induced inactivation of tyrosinase

3P347

カーボンナノチューブの蛍光顕微鏡・走査型電子顕微鏡における同一サンプルの観察

○清水 彬生¹、永井 萌士²、新井 史人²、福田 敏男²、石島 秋彦¹ (¹名大院・工・マテリアル理工、²名大院・工・マイクロ)

カーボンナノチューブ (CNT) はその電気・化学・物理的特性、ナノレベルの構造であることから幅広い応用が期待されている。またその特性から CNT は従来のカンチレバー、ポリスチレンビーズでは困難であった新しい計測のプロブとして応用できる可能性がある。

これまで CNT は主に原子間力顕微鏡、電子顕微鏡を用いて乾燥中で観察・操作されてきた。CNT を生体分子の計測に応用するためには、乾燥中ではなく水溶液中で観察・操作することが必要になってくる。昨年の年会では暗視野・蛍光顕微鏡を用いた CNT の同時観察について報告した。しかし光学顕微鏡と電子顕微鏡で同一 CNT の観察はできてなく、また蛍光観察の際に背景光が高いという問題があった。

そこで今回水溶液中に分散した多層カーボンナノチューブを誘電泳動で操作することで基盤に固定し暗視野顕微鏡で観察後 (図左)、走査型電子顕微鏡で同一 CNT を観察した (図右)。その結果直径 60nm 程度、長さ 10 μm 程度の CNT が暗視野顕微鏡で観察できていることがわかった。

今後、蛍光観察の際の背景光の問題を解決し蛍光顕微鏡・走査型電子顕微鏡で同一 CNT の観察を行い、CNT の太さと蛍光強度の関係を考察し報告するとともに CNT の応用について議論する予定である

A.Shimizu, M.Nagai, F.Arai, T.Fukuda, A.Ishijima: Observation of the Carbon Nanotube by Fluorescence Microscope and Scanning Electron Microscope

3P346

位相差電子顕微鏡用の無帯電位相板

大河原 浩¹、○永山 國昭² (¹自然科学機構・生理研、²自然科学機構・岡崎統合パイオ)

炭素などの軽元素からなる試料の電子顕微鏡像は、コントラストが低い。軽元素試料は電子線をほとんど吸収散乱せず、位相変化のみを変えるからである。このため、従来は試料を重金属で染色したり、フォーカスをずらしてコントラストをあげるなどの手法が取られてきた。前者は、吸収散乱コントラスト、後者は位相コントラストと呼ばれる。位相差電子顕微鏡は、従来の電子顕微鏡と比較し、位相コントラストを効率よく表現でき、コントラストの付きにくい軽元素からなる試料を無染色観察できる利点を持つ。我々の研究室では位相差電子顕微鏡を開発してきたが、位相板の帯電による顕微鏡像の歪みが問題となっていた。帯電の原因は、真空ポンプの油などの有機物、加工時の酸化金属、マイカ板などの無機物、電子顕微鏡観察時の生物由来有機物、FIB 加工時のコンタミなどが考えられた。これらを除去するために有機溶剤などで洗浄したり、UV クリーニング、O₂ アッシング、プラズマクリーニングなどを行ったが、汚れは取りきれないことがわかった。そこで、汚れがあっても帯電効果を抑止できる方法を考案した。導電体で位相板全体を覆う方法である。そのテストとして SiO₂ 薄膜と C/SiO₂/C 薄膜を使った実験を行った。位相板として SiO₂ 薄膜を取り付け、Ge 薄膜を試料として電子顕微鏡観察すると、電子線量を変えたとき Ge 薄膜像が変化した。一方、位相板ホルダーに C/SiO₂/C 薄膜を取り付け、同様な実験を行うと、電子線量を変えても Ge 薄膜像は変化しなかった。このことから SiO₂ 薄膜を導電体である C 薄膜で覆うことにより帯電を除去できることがわかった。以上のことから、位相板を C 薄膜で覆ってやることにより無帯電位相板を実現できることが示唆された。

H.Okawara and K.Nagayama: Anti-static phase-plate for phase TEM

3P348

大腸菌の細胞分裂によって生じる極性の1細胞計測

○綾野 賢¹、井之上 一平^{1,2}、塩見 大輔³、川岸 郁朗⁴、安田 賢二¹ (¹東大・院・総合文化、²味の素、³University of Texas Medical School、⁴名大・院・生命理学)

細菌である大腸菌は長軸方向に伸長した後、細胞の中心で分裂することにより2つの娘細胞を生み出す。その際生じた娘細胞の一方の先端は親細胞においても細胞の先端として機能しており(古い極)、もう一方の先端は細胞分裂によって新たに生成されたもの(新しい極)である。この新しい極と古い極の間には性質の違いがあるのだろうか。また細胞にこのような極性があるとすれば、それは細胞の振る舞いにどのような影響を与えるだろうか。本研究はこのような疑問を明らかにすることを目的とする。具体的には大腸菌の両極に局在する事が知られているアスパラギン酸レセプター Tar に着目し、細胞内の蛋白質局在と細胞分裂によって生じる極性との関連を調べる。

すでにこれまで1細胞長期培養観察系によって大腸菌の成長・分裂について1細胞レベルの計測・解析が行われている。今回このシステムを応用し、大腸菌1細胞を新しい極/古い極に着目しながら経時観察可能なシステムを新たに構築した。細胞内の Tar 蛋白質を GFP によって可視化した大腸菌を、この観察システムを用いて培養し、数世代に渡って蛋白質局在変化ダイナミクスを経時的に観察した。本年会ではより詳細な実験結果・考察について報告する予定である。

S.Ayano, I.Inoue, D.Shiomi, I.Kawagishi and K.Yasuda: Single-cell analysis of E.coli's polarity