

報 文

## 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いる酵母菌体へ吸着した水溶性ポルフィリン誘導体の吸光光度定量

松本 朋子<sup>①</sup>, 中原 卓郎<sup>②</sup>, 松本 仁<sup>②</sup>, 白上 努<sup>②</sup>, 保田 昌秀<sup>②</sup>

機能性色素の定量法を開発するために、水溶性のメトキソ(アルキルオキシ)テトラフェニルポルフィリナトアンチモン臭化物錯体 (**1a**~**c**) をモデル発色団に、酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデル細胞として用いて吸着実験を行った。酵母菌に吸着した **1** の濃度について共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた顕微吸光光度分析によって定量を行い、吸着量を測定した。菌体水溶液を試験管に採取し、**1** 水溶液を試験管に加え、菌体のブラウン運動を止めるために、寒天を加えた。調製した **1** ( $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ )、酵母菌 ( $1.0 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-3}$ )、及び寒天 (0.4 wt%) を含む水溶液を、スライドガラス上に置かれた 1 辺 1 cm の正方形に切り抜かれた厚さ 50  $\mu\text{m}$  の口の字型シリコン製スパーサーに適当量を採取し、カバーガラスで覆い CLSM のステージに固定した。次に 60 倍の対物レンズを用いて設定した直径 1.42  $\mu\text{m}$  の測定領域を約 5  $\mu\text{m}$  の菌体の中心線上に合わせ、**1** の極大波長の 554 nm での吸光度及び菌体粒径を測定して、Lambert-Beer 則による吸光光度分析によって菌体内濃度を決定した。その結果、吸着量は **1a**, **1b**, 及び **1c** に対して、それぞれ  $54.2 \pm 7.3$ ,  $49.8 \pm 6.2$  及び  $22.5 \pm 15.5 \text{ mmol dm}^{-3}$  と求められた。これらのことから CLSM を用いる吸光光度分析は、水溶性ポルフィリンの定量評価方法として活用できることが確認された。

### 1 緒 言

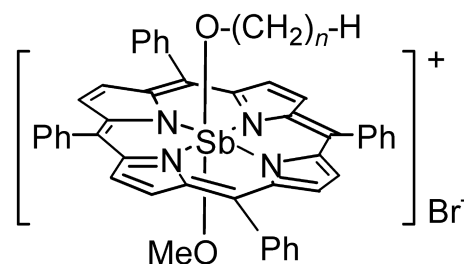
ポルフィリン誘導体は生体親和性色素として多用され、光線力学療法 (PDT) 薬剤への応用の観点から、高い生体親和性のある水溶性ポルフィリンの開発に関心が集められている<sup>1)</sup>。生体親和性の評価のためには、細胞内の水溶性ポルフィリン色素量を正確に求めることが重要である。電気泳動法<sup>2)</sup>及びクロマトグラフィー<sup>3)4)</sup>による成分分析法による生体色素の定量については多くの報告があるが、生きた菌体内の色素の分析方法についての報告が少ない。

著者らは共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いる顕微吸光光度分析法を開発し、数十ミクロンの光透過性材料の定量分析に活用している<sup>5)6)</sup>。そこで、今回、生体親和性色素として水溶性メトキソ(アルキルオキシ)テトラフェニルポルフィリナトアンチモン臭化物錯体 (**1**, Fig. 1)<sup>7)</sup> を用い、菌体サイズが 5  $\mu\text{m}$  と比較的大きな酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) をモデル細胞に選び、CLSM を用いる顕微吸光光度分析による酵母菌体中の **1** の定量法について検討し、吸着量測定による生体親和性の定量法を開発したので報告する。

### 2 実 験

#### 2.1 測定装置

CLSM は、一般的にレーザー光をガルバノミラー及び対物レンズによって試料上を走査し、試料の表面及び内部の焦点面から発した蛍光を対物レンズ及び共焦点に位置するピンホールを経て検出し、コンピュータ処理によって画像に変換する顕微鏡である。本研究に用いた CLSM では、本体 (Olympus 製 FV-300) に分光器 (Seki Technotron 製, STFL 250) をガラスファイバーでつなぎ、画像解析だけでなく蛍光及び吸収スペクトルの測定ができる。吸光光度分析では顕微鏡の透過照明装置のハロゲンランプを光源とし



**1a**;  $n = 6$ , **1b**;  $n = 10$ , **1c**;  $n = 12$

Fig. 1 Water-soluble porphyrins (**1**)

<sup>1</sup> 宮崎大学工学部教育研究支援技術センター: 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

<sup>2</sup> 宮崎大学工学部物質環境化学科: 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

て用い、試料を透過した透過光は対物レンズで集光され、ピンホール及びファイバーを通り、分光器及び検出器 (PMT) で検出されて吸収スペクトルを与える (Fig. 2).

## 2.2 菌体溶液の調製

酵母菌の種菌をバクトトリプトン (Difco 製,  $10 \text{ g dm}^{-3}$ ), イースト菌抽出物 ( $5 \text{ g dm}^{-3}$ ), 及び NaCl ( $10 \text{ g dm}^{-3}$ ) を含む培養液 (pH 6.5) 中で空気下  $30^\circ\text{C}$  において 8 時間培養した. 培養後, 10 分間遠心分離して得た菌体をエッペンチューブに取り, 生理食塩水 ( $9 \text{ g dm}^{-3}$ ) 及び水で洗浄した. 紫外 (UV) スペクトルで濁度を測定し, あらかじめ作製した菌体濃度と濁度の検量線を使って菌体濃度を約  $2.5 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-3}$  に合わせた菌体水溶液 (水溶液 I) を調製した.

## 2.3 水溶性ポルフィリン (1) の調製

1 は既報に従って合成した<sup>4)</sup>. 1 の水溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定し, 419 nm の Soret 帯及び 553 nm の Q 帯の極大吸収波長 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) におけるモル吸光係数 ( $\epsilon_{419}$  及び  $\epsilon_{554}$ ) を決定した. 1 の水に対する溶解度 ( $C_s$ ) は文献<sup>7)</sup>の値を採用した. Table 1 に 1a~c の  $C_s$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  及び  $\epsilon$  の値を

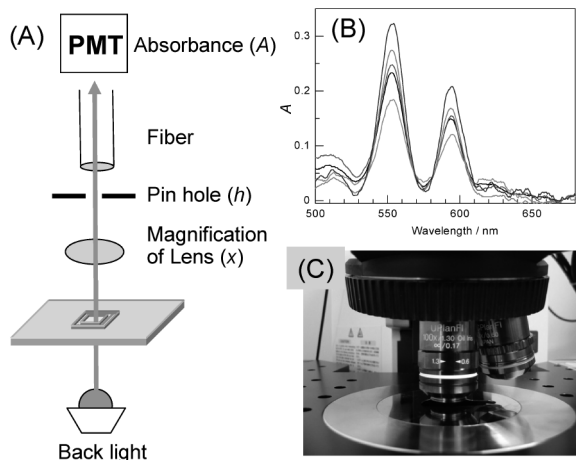


Fig. 2 (A) Absorption spectrophotometry using CLSM. (B) Absorption spectra of 1b adsorbed in *S. cerevisiae* measured by CLSM. (C) Objective lens

示す. 次に, Soret 帯の吸光度と  $\epsilon_{419}$  を用いて濃度調整を行い,  $25.0 \sim 87.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  の 1 の水溶液 (水溶液 II) を得た.

## 3 結果及び考察

### 3.1 菌体への吸着実験

一般に微生物は緩衝液中で扱われ, 純水中では菌体内の浸透圧が上昇して死滅するために取り扱えない. 一方, 今回用いた 1 の溶解度は, 生理食塩水やリン酸緩衝液中では極めて低くなった. そこで, 純水中で長時間生きることができ, 菌体の大きさが比較的大きい酵母菌をモデル細胞として選び, 純水中での吸着実験を行った.

1 の菌体への吸着実験は, 菌体水溶液 I ( $1.0 \text{ cm}^3$ ) を試験管に採取し, 1 の水溶液 II ( $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ,  $0.5 \text{ cm}^3$ ) を試験管に加え, ボルテックスで攪拌することで行った. しばらく放置後, 菌体のブラウン運動を止めるために, 寒天 ( $1 \text{ wt}\%$ ,  $1.0 \text{ cm}^3$ ) を加えて水溶液 III を調製した. 同時に 1 辺 1 cm の正方形に切り抜かれた厚さ  $50 \mu\text{m}$  の口の字型シリコーン製スぺーサーをスライドガラス上に準備した. 水溶液 III の寒天が凝固する前に, 水溶液 III から適当量を採取し, スライドガラス上の口の字型切り抜き部分に滴下し, カバーガラスで覆い CLSM のステージに固定した (Fig. 3). この水溶液 III は, 1 ( $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ), 酵母菌 ( $1.0 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-3}$ ), 及び寒天 ( $0.4 \text{ wt}\%$ ) を含んでいる. 同様の操作で, 1 の濃度が  $5.0 \sim 17.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  の水溶液 III も調製した. また, 菌体は 1 の添加後も生菌状態にあることが確認されている.

### 3.2 CLSM による定量法

CLSM による菌体の吸光度分析は, 均一溶液の場合と同様に行い, 吸光度 ( $A$ ) は Lambert-Beer 則 [式(1)] に従って光路長 ( $b$ , 単位 cm),  $\epsilon$ , 及び 1 の菌体内濃度 ( $[1]_{\text{in}}$ ) の積で表される.

$$A = b\epsilon [1]_{\text{in}} \quad (1)$$

$[1]_{\text{in}}$  の測定は次のように行った. 対物レンズを用いて試

Table 1 Properties of water-soluble porphyrins (1)

1	MW <sup>a)</sup>	$C_s$ <sup>b)</sup> / $\text{mmol dm}^{-3}$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ( $\epsilon/\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ) <sup>c)</sup>	
			Soret band	Q band
1a	946.6	1.09	419 ( $3.20 \times 10^5$ )	550 ( $1.16 \times 10^4$ )
1b	1002.7	2.10	419 ( $2.62 \times 10^5$ )	553 ( $1.59 \times 10^4$ )
1c	1030.4	2.21	419 ( $2.88 \times 10^5$ )	553 ( $1.32 \times 10^4$ )

a) Molecular weight ; b) Saturated concentration ( $C_s$ ) in water. Data from ref. 7 ; c) Absorption maxima and molar absorptivity of 1 at Soret and Q bands in aqueous solution.

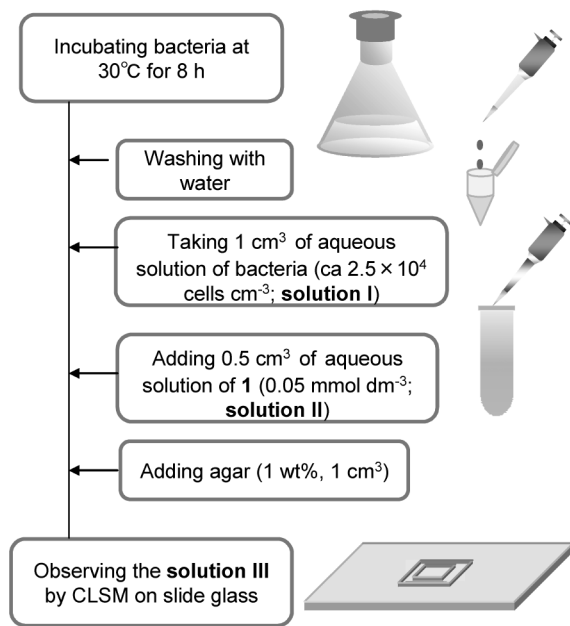


Fig. 3 Procedure of adsorption experiments

料像を拡大し、菌体の大きさが  $5\ \mu\text{m}$  程度の菌体を選び、ステージを移動させて菌体の中心線が視野の中心に来るようにした。寒天を加えたことによって菌体の動きは完全に抑制され、いずれの倍率でも容易に菌体の中心に CLSM の測定領域を合わせることができた。本装置は  $488\sim 775\ \text{nm}$  の波長のスペクトル解析に対応しており、1 の Q 帯の吸収を利用して吸光光度分析を行った。菌体外の場所を空試験値として吸収スペクトルを測定し、 $554\ \text{nm}$  付近の吸収極大における  $A$  を求めた。吸収スペクトルの例を Fig. 2B に示す。

また、 $b$  は蛍光による三次元画像の解析によって計測した。CLSM では、空気と水（又は油と水）の屈折率の差の関係で、観測光方向 ( $z$  方向) での距離精度が悪いので、菌体を球体と仮定して、観測光に垂直 ( $xy$ ) 方向の蛍光画像によって菌体内の蛍光が観測される部分の直径を測定して、 $b$  とした。また、この装置の測定可能な最小の  $A$  値は  $0.012$  であり、菌体の直径を約  $5\ \mu\text{m}$  と仮定すると、 $[1]_{\text{in}}$  の測定下限濃度は  $1.65\ \text{mmol dm}^{-3}$  と算出できる。このようにして、5 つの菌体について  $A$  及び  $b$  を測定し、式 (1) から  $[1]_{\text{in}}$  を求め、平均化した。

### 3.3 CLSM 分析条件の最適化

CLSM を用いて蛍光強度分布を酵母菌体の中心を通る断面について解析した結果、1 は菌体内部まで浸透して吸着しているが、細胞壁には吸着していないことが分かった。しかし、Fig. 4A に示すように、 $543\ \text{nm}$  のレーザー光で透過率分布を 1b について測定した結果、吸着濃度に偏りが

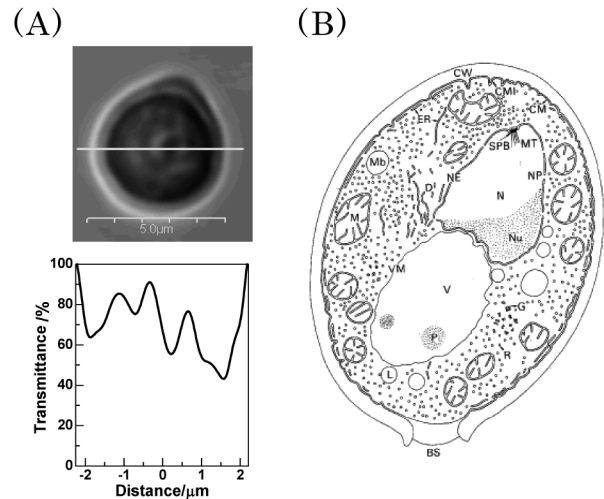


Fig. 4 (A) Transmittance (%) of 1b at cross-section under  $543\ \text{nm}$ -laser irradiation. (B) Structure of *S. cerevisiae* referred from ref. 8

BS : bud scar ; CM : cell membrane ; CMI : cell membrane invagination ; CW : cell wall ; D : dictyosome ; ER : endoplasmic reticulum ; G : glycogen ; L : lipid granules ; M : mitochondria ; Mb : microbody ; MT : microtubule ; N : nucleus ; Nu : nucleolus ; NE : nuclear membrane ; NP : nuclear membrane pore ; P : polyphosphate ; R : ribosome ; SPB : spindle pole body ; V : vacuole ; VM : tonoplast

見られた。酵母内には、Fig. 4B に示すように、親水性及び疎水性の様々な器官があるために、1 の分布が一様でないと推測されるので<sup>7)</sup>、できるだけ広範囲の領域を吸光光度分析して平均化したほうが、ばらつきが少なくと考えられる。

一方、吸光光度分析の測定領域は、対物レンズの倍率 ( $x$ ) 及びピンホール大きさ ( $h$  :  $300\ \mu\text{m}$ ) によって式 (2) から直径 ( $d$ ) の円形内と求めることができる<sup>5)</sup>。  $x$  が 40 倍の対物レンズに対して  $d$  は  $2.14\ \mu\text{m}$  と算出され、最短光路長 ( $b$ ) は  $b$  と  $d$  の値から  $3.72\ \mu\text{m}$  と算出され、菌体の直径に当たる最長光路長 ( $b$ )  $4.29\ \mu\text{m}$  との差は 13% 程度と誤差が大きくなっている。そこで、対物レンズを 40 倍、60 倍 (水浸レンズ)、又は 100 倍 (油浸レンズ) を用いて測定した  $[1b]_{\text{in}}$  の標準偏差 (STD) を比較すると、60 倍において最も小さくなった (Table 3)。このことから、光量がある程度多く、光路長の誤差が少ない 60 倍の対物レンズが最適と判断された (Table 2)。最適条件で測定した  $[1]_{\text{in}}$  の値を STD とともに Table 3 に示す。

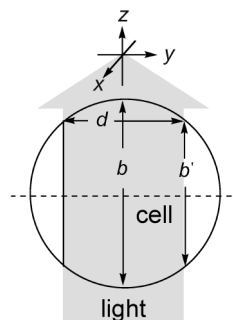
$$d = h / (3.5x) \quad (2)$$

Fig. 5 に、 $[1b]_{\text{in}}$  の  $[1b]_{\text{out}}$  ( $5.0\sim 17.5\ \mu\text{M}$ ) に対する濃度依存性を示す。 $[1b]_{\text{in}}$  の値は、 $[1b]_{\text{out}}$  が  $10\ \mu\text{M}$  以上のと

Table 2 Effect of magnification of objective lens<sup>a)</sup>

$x$ <sup>b)</sup>	$d/\mu\text{m}$ <sup>c)</sup>	$b/\mu\text{m}$ <sup>d)</sup>	$b'/\mu\text{m}$ <sup>e)</sup>	$b'/b$	$[\mathbf{1b}]_{\text{in}}^{\text{f)}}$ / $\text{mmol dm}^{-3}$
40	2.14	$4.29 \pm 0.33$	3.72	0.87	$49.3 \pm 10.5$
60 <sup>g)</sup>	1.42	$4.32 \pm 0.38$	4.08	0.94	$49.8 \pm 6.2$
100 <sup>h)</sup>	0.86	$4.25 \pm 0.27$	4.16	0.98	$47.7 \pm 11.6$

a) For an aqueous solution containing **1b** ( $[\mathbf{1b}]_{\text{out}} = 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ), *S. cerevisiae* ( $1 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-3}$ ), and agar (0.4 wt%); b) Magnification of objective lens; c) Diameter of measurable area on CLSM calculated by eq (2); d) Path length measured by CLSM; e) Minimum path length. See right figure; f) The average concentrations of **1b** adsorbed inside cell along with STD; g) Using water-immersing objective lens; h) Using oil-immersing objective lens

Table 3 Measurement of  $[\mathbf{1}]_{\text{in}}$ <sup>a)</sup>

<b>1</b>	$[\mathbf{1}]_{\text{out}}/\mu\text{mol dm}^{-3}$	$[\mathbf{1}]_{\text{in}}^{\text{b)}}$ / $\text{mmol dm}^{-3}$
<b>1a</b>	10	$54.2 \pm 7.3$
<b>1b</b>	5.0	no <sup>c)</sup>
<b>1b</b>	7.5	$34.3 \pm 11.6$
<b>1b</b>	10	$49.8 \pm 6.2$
<b>1b</b>	17.5	$40.8 \pm 5.0$
<b>1c</b>	10	$22.5 \pm 15.5$

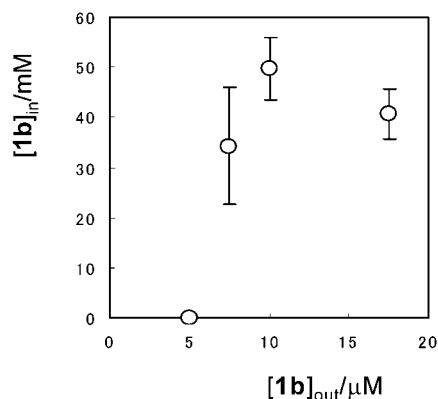
a) Measured for an aqueous solution containing **1** ( $[\mathbf{1}]_{\text{out}}$ ), *S. cerevisiae* ( $1 \times 10^4 \text{ cells cm}^{-3}$ ), and agar (0.4 wt%) using 60 magnification of objective lens on CLSM; b) The average concentrations of **1** adsorbed inside *S. cerevisiae* with STD; c) Lower than a detection limit ( $1.65 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

きにほぼ一定値を示したことから、飽和吸着濃度であることが分かる。同条件の  $10 \mu\text{M}$  において **1a** 及び **1c** の吸着実験を行った結果、いずれの **1** についても高い  $[\mathbf{1}]_{\text{in}}$  が得られ、高い生体親和性が示された。

#### 4 結 言

CLSM は画像解析とスペクトル解析を行うことができる分析装置であり、光透過性に微小材料の分析に活用することができる<sup>5)</sup>。今回、吸光度分析によって酵母菌体内に吸着した色素の濃度を生菌状態で測定することに成功した。

著者らは、今までにアンチモンポルフィリン誘導体をシリカゲルに担持させた光触媒が、大腸菌及びレジオネラ属菌などの可視光殺菌剤として働くことを既に見いだしている<sup>9)10)</sup>。今回、水溶性アンチモンポルフィリン(**1**)は、菌体外濃度  $10 \mu\text{M}$  に対して、 $22.5 \sim 54.2 \text{ mM}$  の菌体内への吸着濃度を示し、高い生体親和性が示されたことから、殺菌剤、PDT などの新しい用途開発への展開が期待できる。

Fig. 5 Dependence of  $[\mathbf{1b}]_{\text{in}}$  on  $[\mathbf{1b}]_{\text{out}}$ 

#### 文 献

- 1) R. P. Haugland: "Handbook of Fluorescent Probes and Research Products", 9th ed., Ed. by J. Gregory, Molecular Probes, (2002), (Eugene Molecular Probes, OR).
- 2) C. L. Colyer, C. S. Klindade, P. J. Viskari, J. P. Landers: *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 559 (2005).
- 3) R. V. Swanson, A. N. Glazer: *Anal. Chem.*, **188**, 295 (1990).
- 4) L. Zolla, M. Blanchetti: *J. Chromatogr. A*, **912**, 269 (2001).
- 5) 松本朋子, 白木隆一, 松本 仁, 白上 努, 保田昌秀: *分析化学 (Bunseki Kagaku)* **57**, 819 (2008).
- 6) J. Matsumoto, T. Matsumoto, Y. Senda, T. Shiragami, M. Yasuda: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **197**, 101 (2008).
- 7) J. Matsumoto, T. Shiragami, M. Yasuda: *Chem. Lett.*, **37**, 886 (2008).
- 8) 柳島直彦, 大嶋泰治, 大隅正子編: "酵母の解剖", p. 5 (1981), (講談社サイエンティフィック).
- 9) 保田昌秀, 白上 努, 松本 仁: *光化学*, **38**, 9

(2007).

*Photochem. Photobiol. C : Rev.*, **6**, 227 (2005).

10) T. Shiragami, J. Matsumoto, H. Inoue, M. Yasuda : *J.*

---

Quantitative Analysis for Water-soluble Porphyrin Derivatives Adsorbed in  
*Saccharomyces cerevisiae* by Absorption Spectrophotometry  
Using Confocal Laser Scanning Microscope

Tomoko MATSUMOTO<sup>1</sup>, Takuro NAKAHARA<sup>2</sup>, Jin MATSUMOTO<sup>2</sup>,  
Tsutomu SHIRAGAMI<sup>2</sup> and Masahide YASUDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Technical Center, Faculty of Engineering, University of Miyazaki, Gakuen-Kibanadai, Miyazaki-shi, Miyazaki 889-2192

<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, University of Miyazaki, Gakuen-Kibanadai, Miyazaki-shi, Miyazaki 889-2192

(Received 27 January 2009, Accepted 19 March 2009)

An evaluation of the bio-affinity of methoxo(alkyloxo)-tetraphenylporphyrinatoantimony bromide (**1**) was examined by an absorption experiment of **1** toward *Saccharomyces cerevisiae*. An aqueous solution of **1** was added to an aqueous solution of *S. cerevisiae*. Then an aqueous solution of agar was added into the solution in order to stop the Brownian motion of bacteria during analysis. A prepared aqueous solution containing **1** ( $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ), *S. cerevisiae* ( $1.0 \times 10^4$  cells  $\text{cm}^{-3}$ ) and agar (0.4 wt%) was taken inside a space surrounded by a silicone spacer (1 cm  $\times$  1 cm, thickness 50  $\mu\text{m}$ ) put on a slide glass, which was set on a confocal laser scanning microscope (CLSM) stage. By measuring the diameter of the cell and the absorbance on CLSM, the concentrations of **1** adsorbed inside *S. cerevisiae* were determined to be  $54.2 \pm 7.3$  for **1a**,  $49.8 \pm 6.2$  for **1b**, and  $22.5 \pm 15.5$   $\text{mmol dm}^{-3}$  for **1c** according to Lambert-Beer's law.

**Keywords** : absorption spectrophotometry ; confocal laser scanning microscope ; water-soluble porphyrin ; *Saccharomyces cerevisiae* ; bio-affinity.