

目 次

“測定法シリーズ”刊行にあたって i

まえがき：蛍光測定から得られる多様な情報について
——「データ」を「情報」に変換するものは何か
.....御橋廣真 iii

第 I 部 蛍光分光法の基礎と応用1

1 章 蛍光分光法で何がわかるか

- 1.1 蛍光法の特徴御橋廣真 3
- 1) 蛍光ラベルという「窓」 3
 - 2) 光の「粒子性」と「波動性」 4
 - 3) 2つの「時計」——蛍光寿命とビデオレート 6
 - 4) 「1分子の統計」は「分子集団の統計」と同じか? 7
- 1.2 蛍光分光の基本的なパラメータ御橋廣真 8
- 1) 光の吸収から発光までのプロセス——蛍光寿命の意味 8
 - a) 光子の吸収——蛍光分子の電子状態が励起される 8/ b) 励起エネルギーの分子内緩和 9/ c) 発光——そして再び基底状態へ 10
 - 2) 吸収スペクトルと発光スペクトル——その波長とスペクトル幅について 12
 - 3) 蛍光強度 13
 - 4) 蛍光の偏光 14

a) 光選択の原理	15 /	b) 蛍光の偏光と蛍光強度の関係	16 /
c) 蛍光の偏光解消の要因	19 /	d) 蛍光分子の回転ブラウン運動による偏光解消	22 /
e) 蛍光分子間の励起エネルギー移動による偏光解消	23 /	f) 剛体球モデルで近似した解析——水和水の局在性と流動性	24
5) 定常光励起で観測した蛍光の偏光——ペラン・ウェーバーのプロット	28		
6) 蛍光の消光現象	29		
7) 励起エネルギー移動による蛍光強度の変化——分子内および分子間の距離を測る	31		
1.3 巨大分子のゆらぎ	34	御橋廣真	
1) コンフォーメーション変化と局所構造のゆらぎ	34		
2) ゆらぎの時間スケールを解析する	35		
1.4 1分子科学へのトレンド——1分子の物理, 生物の1分子	38	石井由晴	
1) 1分子の蛍光	39		
2) 蛍光分子を目印に生体分子の動きを見る	44		
3) 蛍光分子を通して1分子の構造・状態のダイナミクスを見る	47		
4) 化学反応と1分子——確率過程と1分子	49		
5) 生体分子の機能	52		
a) ゆらぎと機能	52 /	b) 生体分子の多様な側面とその間の関連(機能, 同時計測)	52
6) 物理システムと生物システム	53		
a) 少数の現象の重要性	53 /	b) 複雑なシステムを別の切り口から見る	54
文献	55		
2章 定常励起光による測定	57	石井由晴	
2.1 はじめに	57		
2.2 試料の調製	58		

1) 生体分子のラベル	58
2) 蛍光測定のための試料の準備	60
3) ラベル化の機能への影響	62
2.3 蛍光分光光度計について	63
1) 蛍光分光光度計の概要	63
2) 基本操作	65
a) 光源	66 /
b) 波長設定	66 /
c) スリット幅 (バンド幅)	67 /
d) 計測モード	67 /
e) 高圧電源	68 /
f) シャッター	69
3) 蛍光スペクトル	69
a) 励起波長の設定	69 /
b) スペクトル測定に関するパラメータ	69 /
c) スペクトル補正	71 /
d) 蛍光スペクトルに現れるバンド	72
4) 励起スペクトル	74
5) 時間スキャン	74
2.4 安定な蛍光信号から確実なデータへ	75
1) 明るい信号	75
2) 安定な信号	76
2.5 さまざまな蛍光分光技術	78
1) スペクトル変化の測定	79
2) 消光の実験	80
3) 蛍光共鳴エネルギー移動	81
4) 偏光解消	88
5) 緩和過程	89
2.6 生体分子の計測への応用	90
1) 生体分子の構造・状態変化の計測	90
2) 分子間の相互作用(結合)の計測	91
3) 再構成系への応用	94
2.7 おわりに	95
参考書	95

3章 蛍光色素	三木正雄 97
3.1 はじめに	97
3.2 蛍光団について	99
1) アニリノナフタレンスルホン酸類	99
2) アミノナフタレン類	100
3) ピレン	100
4) スチルベン	101
5) クマリン	101
6) NBD	102
7) フルオレセイン	102
8) エオシン, エリスロシン	103
9) ローダミン, テトラメチルローダミン	103
3.3 反応基について	104
1) チオール基の修飾	104
a) アセトアミド基	104 / b) マレイミド基 104 / c) その他 105
2) アミンの修飾	105
a) イソチオシアネート	105 / b) コハク酸イミドエステル 106 / c) スルホン酸ハロゲン化物 106
3.4 蛋白質へのラベルの例	106
1) チオール基の蛍光標識	107
a) 1,5-IAEDANS	108 / b) ビレンチオール反応試薬 108 / c) スチルベンチオール反応試薬 108 / d) アニリノナフタレンスルホン酸チオール反応試薬 109 / e) クマリンチオール反応試薬 109 / f) フルオレセインチオール反応試薬 109 / g) エオシン, エリスロシンチオール反応試薬 110 / h) ローダミンチオール反応試薬 110
2) アミノ基の蛍光標識	110
a) イソチオシアネート	111 / b) スクシニル 111 / c) スル

d) その他	114
3) その他のアミノ酸残基の修飾	114
a) チロシン残基の修飾	114 / b) グルタミン残基の修飾 116
4) 蛍光性ヌクレオチドアナログ	118
a) 塩基部分が蛍光性のアナログ	118 / b) リン酸部分に蛍光団を持つアナログ 119 / c) 糖部分に蛍光団をつけたアナログ 119
3.5 生体膜のラベル	123
1) ジフェニルヘキサトリエン	123
2) PATMAN	124
3) アンスロイル脂肪酸	125
4) ピレン	126
5) シアニン	126
3.6 蛍光蛋白質	128
文 献	129
4章 蛍光相関分光法	金城政孝, 西村吾朗 133
4.1 はじめに	133
4.2 蛍光相関分光法の原理と装置	134
1) 原理	134
2) 装置	135
3) ゆらぎの原因	137
4) 相関関数による解析	138
a) 相関関数と分子の数	140 / b) 相関関数と分子の大きさ 141 / c) 蛍光相関関数の解釈 142
5) 装置の自作について	144
4.3 分子量の測定	145
1) DNA 鎖長の測定	145
2) 球状蛋白質の大きさ	145
3) 酵素反応の反応過程の解析	147

4) 分子診断の可能性	149
4.4 新しいFCSの測定	151
1) 単一細胞におけるFCS測定	151
2) 蛍光相互相関分光法	152
3) 2光子(多光子)蛍光相関分光法	154
a) 2光子蛍光相関分光装置	155 /
b) 紫外色素の測定	156
4.5 おわりに	158
文 献	159

第II部 イメージングの技法161

5章 ビデオ蛍光顕微鏡法	船津高志	163
5.1 はじめに		163
5.2 光源の種類		164
5.3 光学系の物理		167
1) レンズによる結像の原理	167	
a) 倍 率	167 /	
b) 開口数	168 /	
c) 分解能	169 /	
d) 被写界深度	170	
2) 照明光学系	170	
a) 暗視野蛍光顕微鏡	170 /	
b) 落射蛍光顕微鏡	171 /	
c) 全反射型エバネッセント場蛍光顕微鏡	173 /	
d) 共焦点蛍光顕微鏡	179 /	
e) 2光子励起蛍光顕微鏡	181	
3) 観察光学系	182	
a) 対物レンズ	183 /	
b) 励起フィルター, 吸収フィルター	184 /	
c) ダイクロイックミラー	186 /	
d) スライドガラスとカバーガラス	187 /	
e) 多重観察法	188	
5.4 カ メ ラ		189
5.5 ビデオとデジタル化の手法		198
5.6 1分子蛍光イメージング法		203

5.7 光ピンセットによるマイクロマニピュレーション	204
文 献	208

6章 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡によるイメージング

.....鈴木直哉	211
6.1 共焦点走査型落射蛍光顕微鏡の原理	211
6.2 実際の共焦点レーザー走査落射蛍光顕微鏡	213
1) 点光源の代わりにレーザーを用いる	213
2) 光検出器は光電子増倍管	216
3) 走査はガルバノミラーで	216
6.3 リアルタイム共焦点顕微鏡	217
1) 共振型ガルバノミラータイプ	217
2) 音響光学素子タイプ	218
3) ニボウディスクタイプ	218
6.4 対物レンズの選択	220
6.5 イメージのキャリブレーション	222
6.6 空間分解能のチェック	222
6.7 イメージの3次元観察	230
6.8 イメージの定量測定と解析	232
6.9 デコンボリューション法について	233
6.10 多光子励起蛍光顕微鏡について	235
文 献	236

7章 画像処理と画像解析長谷川 聡 239

7.1 はじめに	239
7.2 画像処理・画像解析の目的と方法	240
7.3 画像処理・画像解析のための基礎知識	241
1) デジタル画像とは	241
2) 画像の特性	242
a) 蛍光像の特徴	242 /
b) 計測装置に起因する画像特性	243 /

c) 画像特性を調べる	244
3) 画像処理・解析の手順	245
7.4 基本的な画像処理	246
1) 空間フィルタ	246
a) 平均フィルタ	247 / b) ソーベルフィルタ 248 / c) ラプラシアンフィルタ 248 / d) ランクフィルタ 250
2) 周波数フィルタ	250
3) 輝度変化の勾配を変える	250
a) 輝度勾配の変換と輝度値変換曲線	250 / b) 輝度範囲の拡大とヒストグラムの平坦化 252
4) 2 値化	254
5) 2 値画像に対する処理	254
a) 膨張	254 / b) 収縮 254 / c) 膨張・収縮の組合せ(モルフォロジカルフィルタ) 255 / d) 細線化 255
6) 画素値演算	255
a) 算術演算(加算・減算・乗算・除算など)	256 / b) 論理演算(論理積 AND・論理和 OR・排他的論理和 XOR など) 256
7) 時空間フィルタ	257
7.5 発展的画像処理とその応用	257
1) 画像の精鋭化(画質を改善して見やすくする・解析しやすくする)	257
2) 特徴の強調・画像の再構成(目的に合った画像を作る)	258
3) 画像解析のための前処理(適応 2 値化など)	258
7.6 画像解析	260
1) 2 値画像の計測(幾何学的特徴量の計測)	261
2) 濃淡画像の計測(光学的特徴量の計測)	263
3) モデルの当てはめによる解析(2 値化によらない画像解析)	263
4) 運動性の解析(画像から抽出した時系列データの解析)	264
a) 速度の定義と算出法	264 / b) 進行方向とその変化 267 / c) 持続 267 / d) 運動性の変化 268 / e) 変形度 269

5) 自動追跡	269
6) 抽出したデータの利用と解釈	271
文献	271
索引	275