

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3482440号
(P3482440)

(45)発行日 平成15年12月22日(2003. 12. 22)

(24)登録日 平成15年10月17日(2003. 10. 17)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/00	Z
C 1 2 Q 1/00		G 0 1 N 21/64	Z
G 0 1 N 21/64		33/483	C
// G 0 1 N 33/483		C 1 2 N 15/00	A

請求項の数4(全 6 頁)

(21)出願番号 特願2000-84518(P2000-84518)
(22)出願日 平成12年3月24日(2000. 3. 24)
(65)公開番号 特開2001-269171(P2001-269171A)
(43)公開日 平成13年10月2日(2001. 10. 2)
審査請求日 平成12年3月24日(2000. 3. 24)
前置審査

(73)特許権者 501203344
独立行政法人農業・生物系特定産業技術
研究機構
茨城県つくば市観音台3-1-1
(72)発明者 大島 正弘
新潟県上越市稲田1丁目4番6-301号
(72)発明者 大槻 寛
新潟県上越市本城町5番3-102号
(74)代理人 100063565
弁理士 小橋 信淳 (外1名)
審査官 三原 健治
(56)参考文献 特表 平11-500825 (J P, A)
Biotech. Bioeng., V
ol. 55, No. 6 (1997), p. 921
-926

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法及び観察装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、

前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入処理における遺伝子導入生細胞の識別を行うことを特徴とする発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法。

【請求項2】 励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、

前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い

波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入生細胞における導入遺伝子発現特性の検証を行うことを特徴とする発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法。

【請求項3】 励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、

前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入個体における導入遺伝子発現特性の検証を行うことを特徴とする発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法。

【請求項4】 励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励

起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察装置において、前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ1ないし2以上の素子を選択して用い、フィルターを介して肉眼で観察できる光量を得ることを特徴とする発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子導入個体の早期選抜・新規遺伝子の発現特性の確認等、バイオ研究全般にわたり幅広い利用が想定される発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法及び観察装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、遺伝子発現を検出する方法としては、CAT遺伝子(CAT:Chloramphenicol Acetyl Transferase)やGUS遺伝子(-glucuronidase)、LUC遺伝子(Luciferase)を生細胞に導入し、これら遺伝子の発現により生成した酵素と基質を反応させ、反応生成物を測定する方法が採られている。これらの方法では、導入細胞に直接基質を作用させるか(GUS, LUC)、生成した酵素を導入細胞内より抽出する(GUS, LUC, CAT)ことが必要となる。これらの酵素に対する基質は人工合成されたもので生細胞に対して有害である。また酵素の抽出は必然的に導入細胞の破壊を伴うので、同一の導入細胞を継続的に観察することは不可能である。

【0003】これに対し、遺伝子発現の検出に、GFP遺伝子(GFP:Green Fluorescent Protein)に代表される生細胞に由来する蛍光性タンパク質の遺伝子を用いた場合、外来性の基質は不要であり、観察対象である導入細胞に励起光を照射しその蛍光発光を観察することで、非破壊的に発現の検出が可能となった。

【0004】しかしながら、従来の技術では、図4に示すように、蛍光物質1の検出には蛍光顕微鏡や蛍光実体顕微鏡が用いられ、励起光2として使用する光源3は、ハロゲンランプ、キセノンランプ、水銀ランプ等が主流であり、フィルタ4を通して蛍光物質1に照射される。これらの光源3を励起用光源として使用する場合、光源3が放射する光の波長帯域が赤外光から紫外光に至るまで広範に広がっているため、蛍光物質1への励起光2の照射を目的として励起に必要な波長のみを透過するフィルタ4で波長帯域を制限した場合、非常に弱い励起光2しか得ることができず、蛍光発光5としてフィルタ6を通して顕微鏡下で観察する程度の光量7しか得られない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】キセノンランプ、水銀ランプは強力な光源3ではあるが、非常に高価であり、寿命が非常に短い。また、ハロゲンランプに限らず、従

来の光源は消費電力が多く、高熱を出すため冷却が必要であり、小型化が不可能である。照射範囲については顕微鏡レベルの視野に照射することができる程度で、広範囲な励起光2の照射は不可能であり、蛍光発光5を直接肉眼で観察できるような強力な励起光2を発することはできない。このことから、観察対象が極めて狭い範囲に限定されるだけでなく、病原性や無菌状態の維持等の事由により、シャーレ等密閉容器内に置かれている場合には顕微鏡の構造上密閉容器内の観察対象に焦点を合わせることが困難である。また、励起光の照射範囲が狭いため、再分化した個体全体等、大きな対象を観察することは不可能である。更に、従来の方法では必要となる機器の大きさの点からも観察対象のある現地での観察は不可能である、といった各種の解決すべき課題があった。本発明は、生細胞における遺伝子発現を簡便かつ非破壊的・継続的に観察する方法、及び強い励起光を照射しうる小型の励起光照射装置を備えた観察装置を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するため本発明は、以下の手段、構成を有している。

A．励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入処理における遺伝子導入生細胞の識別を行う。

B．励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入生細胞における導入遺伝子発現特性の検証を行う。

C．励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察方法において、前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ素子を選択して肉眼で検出するに足りる光量を得、遺伝子導入個体における導入遺伝子発現特性の検証を行う。

D．励起光の照射により蛍光を発する蛋白をコードする遺伝子を導入した任意の形状の生細胞への励起用光源として発光ダイオードを用いる蛍光物質観察装置において、前記発光ダイオードに、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ1ないし2以上の素子を選択して用い、フィルターを介して肉眼で観察できる光量を得る。

【0007】そして、励起用光源として発光ダイオード

ドを利用し、必要とされる励起光波長に近い波長に極大をもつ発光ダイオード素子を選択することを特徴としている。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、図示した実施例に基づき、本発明の実施形態について詳述する。なお、上記従来例と同じ構成部分には、同じ符号を付して詳しい説明は省略する。

【0009】本発明による発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察用励起光照射装置は、図1及び図2に示すように、観察に使用する蛍光物質1の励起光2の波長に近い波長を発光特性のピークとする発光ダイオード素子を光源10として選択する。必要に応じて、この発光ダイオードを2個またはそれ以上束ねることにより光量を確保する。更に所要により発光帯域を狭める必要がある場合には所要の励起光2の波長のみを透過させるフィルター4を装備する。発光ダイオード素子からの放射光の帯域は狭いため、励起光2の波長のみを透過するフィルター4で波長帯域を制限した場合でも強い励起光2が得られる。

【0010】発光ダイオードは電気から光への変換効率が高く、乾電池程度の電源でも十分な光量が得られ、また、発光ダイオード素子の寿命は長く、素子は熱を持ちにくいことから小型化することができる。従って、乾電池またはACアダプターを電源として使用することができる。

【0011】本装置は破損しやすい管球やフィラメント類を使っていないため、可搬性に優れ、暗室や温室、人工気象室内など場所を選ばず容易に移動して、照射、観察が可能となる。

【0012】本装置は発光ダイオードの選択により、各種の蛍光性物質1の検出に使用可能であるが、好ましい使用例としては、オワンクラゲより単離された蛍光タンパクGFPに由来する改変型GFPの励起波長である488nmに近い発光特性を有する発光ダイオードを使用し、GFPを発現する形質転換植物細胞を511nmの蛍光発光によって肉眼で識別できる光量11とすること、あるいは、イソギンチャク近縁種Discosona striataより単離された蛍光タンパク(RFP:Red Fluorescent Protein)の改変型DsRedの励起波長である558nmに近い発光特性を有する発光ダイオードを使用し、RFPを発現する形質転換細胞をDsRedの583nmの蛍光発光によって識別することがあげられる。

【0013】また、別の好ましい使用例として、導入遺伝子の発現を起こさせるための装置であるプロモーターの発現特性を、適当な、再分化された個体を対象として、組織毎、あるいは生育ステージ毎に、GFPにあっては511nm、RFPにあっては583nmの蛍光発光を各々検出することにより明らかにすることがあげられる。

【0014】本装置は軽量かつコンパクトな設計が可能となるので、開発中の遺伝子組換え植物等のみだりに移動できない植物の観察にも、優れた効果が期待できる。

【0015】本装置は強力な励起光2を照射することができるため、蛍光発光も強力となり、肉眼での蛍光観察(肉眼で識別できる光量11)が可能となる。

【0016】

【実施例】改変型GFPの励起波長である488nmに、極大発光波長に近い発光ダイオード素子20本を光源10とし、発光部正面に488nm±5nmを透過するフィルター6を装着して励起光照射装置とした。本照射装置に必要な7.5~8Vの直流電源は1.5Vの電池5本あるいは市販のACアダプターによって供給される2電源方式とした。

【0017】観察対象としては、カリフラワーモザイクウイルス35S遺伝子プロモーターあるいはそれに由来する改変プロモーターによってGFPを発現せしめるキメラ遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子と共にアグロバクテリウム法によって導入したイネ「日本晴」由来のカルスを選択し、導入処理後、カルスを上記の装置で照射し、経時的に形質転換植物細胞におけるGFPの発現を511nmの蛍光発光によって目視観察した。図3において(a)、(a=部分拡大図)、(a=部分拡大図)は可視光、(b)、(b=部分拡大図)、(b=部分拡大図)は蛍光発光を示す。

【0018】その結果、除菌開始後、通常で9日目、早い場合では7日目までに形質転換細胞が出現した。これらの形質転換細胞はカナマイシンあるいはG418存在下で旺盛に増殖し、1ヶ月後には発光細胞だけからなるカルス塊に成長した。一方、蛍光発光が認められないカルスは、カナマイシンあるいはG418存在下では増殖せず、縮退してしまうことが観察された。以上の観察は最初から特定の細胞に限定して経時的に観察されたものであり、従来は最終的な結果しか分からなかった形質転換細胞塊成立の様子を初めて観察したものである。

【0019】上記の発光を認めた形質転換細胞からなるカルス塊より再分化した幼苗を、同じく本装置によって観察したところ、葉面、根、特に根端部などでGFPの蛍光発光が観察された。これは従来ノーザン解析などで報告されてきた、カリフラワーモザイクウイルス35S遺伝子プロモーターあるいはそれに由来する改変プロモーターによって発現された導入遺伝子の発現様式と完全に一致し、本装置による観察がプロモーター特性の検討にも極めて有効であることが確認された。

【0020】

【発明の効果】以上説明したように、本発明による発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察方法及び観察装置においては、遺伝子導入植物など今後のバイオテクノロジーの発展にとって重要な対象について簡便かつ非破壊的に観察するための方法及び観察装置が提供される。ま

た、本発明により、同一の細胞・個体などを経時的に観察することが可能となり、新規遺伝子の発現特性の解析に最適な方法及び観察装置が提供される。さらに、本発明の観察装置は軽量・小型であり、乾電池程度の電源でも十分な光量が得られ、目視での観察も容易であり、可搬性に優れ、暗室や隔離温室、人工気象室内など場所を選ばず観察が可能となるため、開発中の遺伝子組換え植物等のみだりに移動できない植物にも適用できる優れた観察装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る発光ダイオードを光源とする蛍光物質観察用励起光照射装置の概略説明図である。

【図2】本発明による発光ダイオードからなる光源及びフィルタの側断面図である。

【図3】本発明の蛍光物質観察用励起光照射装置によってイネカルスに対し励起光を照射し、経時的に形質転換

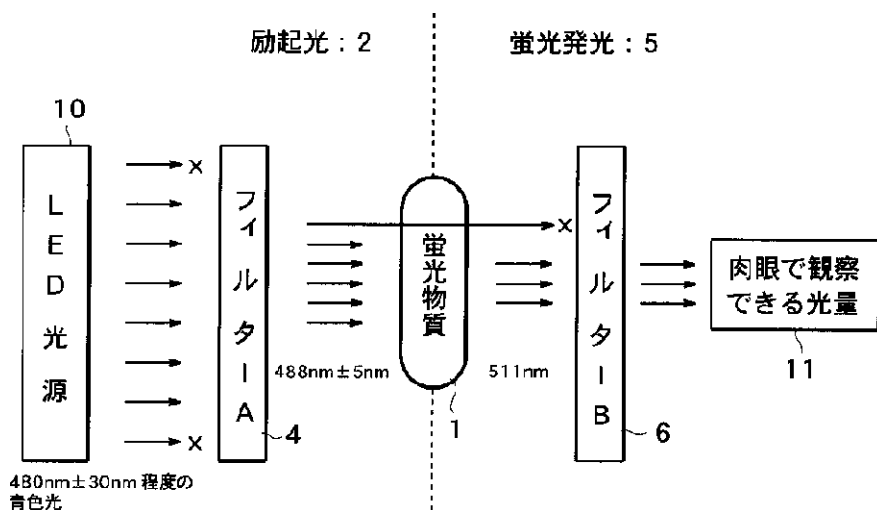
植物細胞におけるGFPの発現を蛍光発光によって目視観察した例であり、(a)、(a = 部分拡大図)、(a = 部分拡大図)は可視光、(b)、(b = 部分拡大図)、(b = 部分拡大図)は蛍光発光を示す。

【図4】従来の蛍光物質観察用励起光照射装置の概略説明図である。

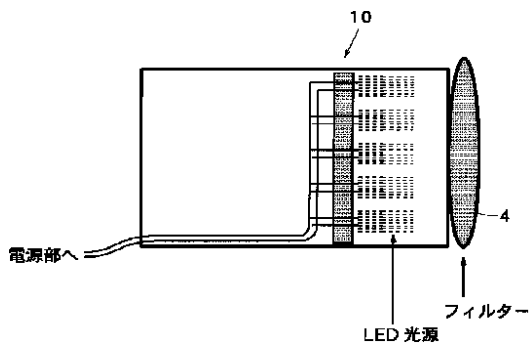
【符号の説明】

- 1 蛍光物質
- 2 励起光
- 3 ハロゲンランプ等からなる光源（従来例）
- 4, 6 フィルター
- 5 蛍光発光
- 7 顕微鏡下で観察する程度の光量（従来例）
- 10 発光ダイオードからなる光源（本発明）
- 11 肉眼で観察できる光量

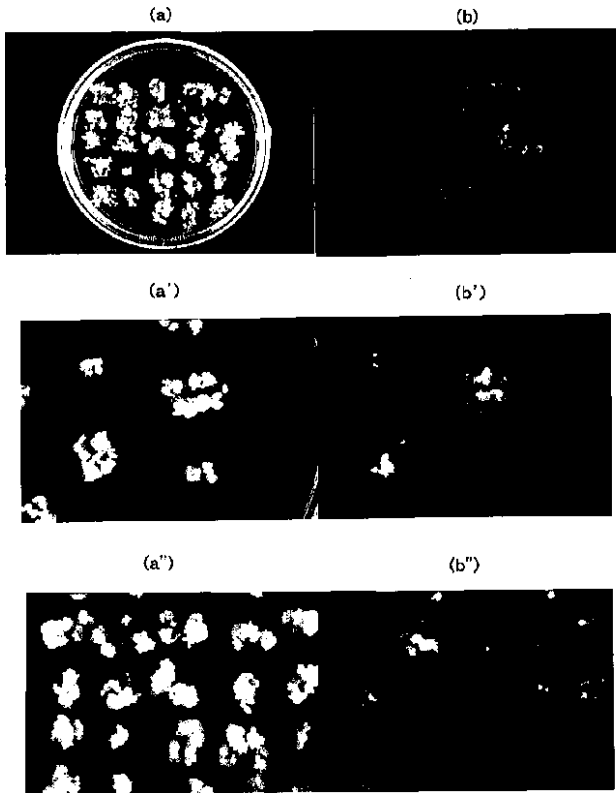
【図1】



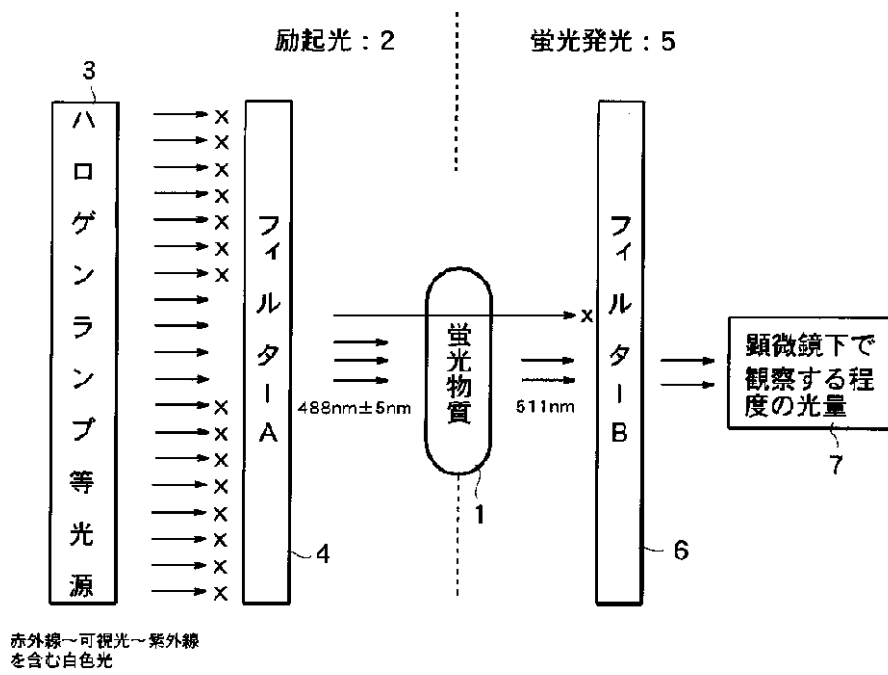
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 1/70

G01N 21/62 - 21/83

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus (JOIS)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

PubMed