

赤外超解像顕微鏡法による酢酸菌の赤外分光イメージング —バイオセルロース生合成メカニズムの解明を目指して—

(東工大・資源研) ○北次加奈、菅野靖史、菊地克也、田島朋樹、藤井正明、酒井誠

【序】ある種の酢酸菌から作られるバイオセルロースは、ナタ・デ・ココの名称でデザート食品に用いられると共に数10 nmの微細な繊維からなる網目構造を生かした材料開発も行われている。一方、バイオセルロースの生合成機構については未だ不明な点が多い。酢酸菌から1本のリボン状物質が伸びた状態の電子顕微鏡画像が報告されて以来、セルロースが酢酸菌体内で合成されており、菌体表面の様々な場所から排出された非常に細いセルロースが直径数10 nmのリボン状のセルロースを形成すると考えられている[1]。しかし、電子顕微鏡での観察結果で得られたリボン状物質はセルロースと同定されておらず、また、リボン状セルロース形成過程についても未だに確定的な証拠はない。

そこで本研究では、我々が開発した振動和周波発生(VSFG)検出赤外超解像顕微鏡[2]を用いて、酢酸菌(*Gluconacetobacter xylinum*)の赤外分光イメージングを行い、分光学的に生成物がセルロースであることを同定するとともに、リボン状セルロース形成過程の直接観察を目指した。VSFG検出赤外超解像顕微鏡は、VSFG分光法を顕微鏡技術に応用したものである。この方法では赤外吸収を可視のVSFG光の発生により検出できるため、空間分解能は可視光に対する回折限界で決まる。従って赤外イメージを赤外光に対しては回折限界以下の空間分解能で測定することができる。この特徴を生かし、2 μm 程度の大きさの酢酸菌菌体の直接観察を試みる。また、VSFG検出赤外超解像顕微鏡では糖類から非常に強い発光を得ることができるため、酢酸菌が生成した微量なバイオセルロースからのVSFG信号を観測できることが期待される。

【実験】VSFG分光の原理図を図1に示す。VSFGは、赤外光と可視光を同時に試料へ入射したとき、そのエネルギーの和に相当するVSFG光が発生する非線形光学効果の1つである。赤外波長が分子振動に共鳴するときVSFG光の強度が著しく増大するので、赤外吸収をVSFG光の発生により検出できる。

測定に用いた赤外光と可視光は、再生増幅器によって増幅されたTi:Sapphireレーザーのピコ秒パルスを変換することで得た。光の波長にはそれぞれ2800-3600 nm ($2790\text{-}3584\text{ cm}^{-1}$)および613 nmを用いて、それぞれの強度は3 $\mu\text{J/pulse}$ および100 nJ/pulse と設定した。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせ、CaF₂レンズ($f=100$)を用いてサンプル上に照射した。発光は背面から対物レンズ(N.A. = 0.4-0.6)を用いて集め、VSFG発光(500-550 nm)のみが透過するバンドパスフィルターを通した後にICCDカメラ上に結像した。

試料は、2種類作成した。1つは酢酸菌菌体を観察するための試料であり、試験管内で酢酸菌を静

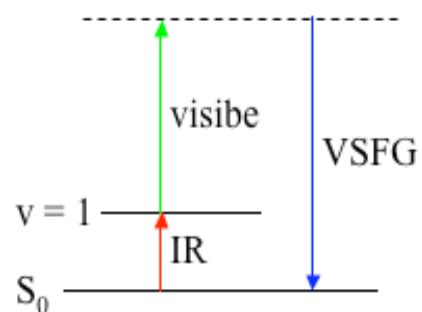


図1 赤外励起による
和周波発生の
エネルギーダイアグラム

置培養後、培養液を遠心分離処理し得られた菌体を水で懸濁した。それをカバーガラスに載せ、さらに2時間静置した後新しいカバーガラスを重層し乾燥させてプレパラート化した。もう1つは、バイオセルロースの標準試料であり、静置培養後の培養液表面にゲル状に生成したバイオセルロース(ペリクル)を用いた。ペリクルは水を加えて温浴中加熱処理後、アルカリ処理を行いさらに中和処理した。それをカバーガラスに載せ、乾燥させてプレパラート化した。

【結果と考察】図2にバイオセルロース標準試料のVSFGスペクトルを示す。2850 cm^{-1} 、2970 cm^{-1} 、3330 cm^{-1} に観測されたバンドをそれぞれ $-\text{CH}_2$ 対称伸縮振動、 $-\text{CH}_2$ 逆対称伸縮振動及び $-\text{OH}$ 伸縮振動と帰属した。これらの振動バンドを用い、酢酸菌の赤外超解像イメージを測定した。

図3(a)、(c)は酢酸菌菌体の透過像であり、いくつかの菌体が凝集して観察されている。(b)は(a)に対して $-\text{CH}_2$ 対称伸縮振動に対応した赤外光(2850 cm^{-1})を用いて得られたVSFG像であり、菌体から強いVSFG信号が観測されている。一方、(d)は(c)に対してバイオセルロースに赤外吸収のない赤外光(3110 cm^{-1})を用いて得られたVSFG像である。一見してわかるように、(d)は(b)に比べてVSFG強度が減少している。これらの結果から、(b)で得られたVSFG信号は主に、酢酸菌が体内で生成し排出したバイオセルロースの発光であると考えられる。

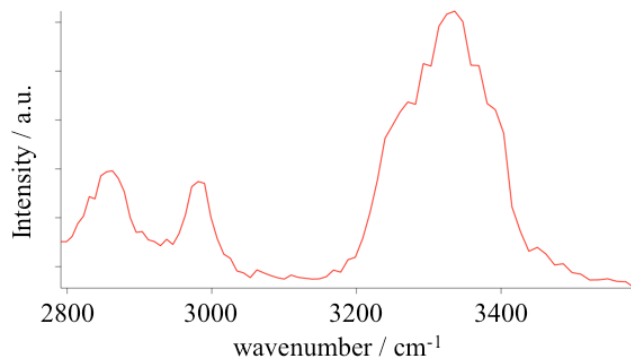


図2 バイオセルロースのVSFGスペクトル
可視光は613 nmを用いた。

一方で、(d)はバイオセルロースに赤外吸収がない赤外光を用いて測定したにも関わらず、菌体からの発光が観測されている。これは、酢酸菌菌体自身からのVSFG信号が観測されているものと考えられる。

発表では、セルロースがより多く生成する培養条件で作成した試料の赤外超解像と合わせて、より詳細な議論を行う予定である。

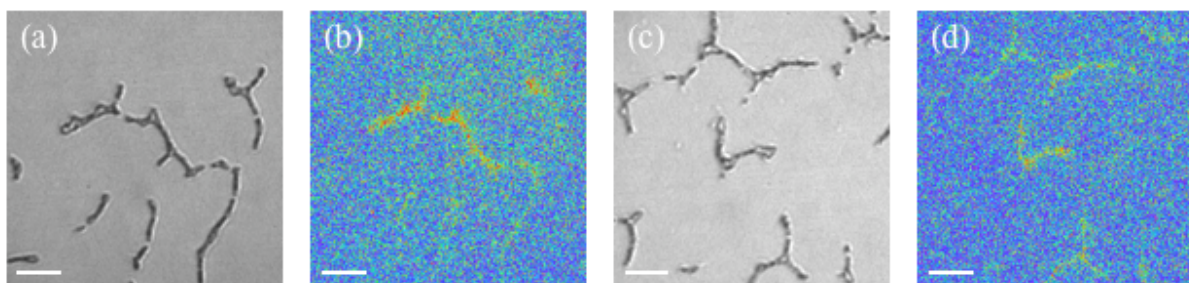


図3 酢酸菌の(a)、(c)透過像、(b)赤外光(2850 cm^{-1})、(c)赤外光(3110 cm^{-1})を用いて測定したVSFG像。

可視光はどちらも613 nmを用いた。スケールバーは10 μm

【参考文献】

- [1]吉永文弘,外内尚人,渡部乙比古., 化学と生物, **35**,11(1997)
- [2]Keiichi Inoue, Masaaki Fujii, and Makoto Sakai., *Applied Spectroscopy*, **64**, 3(2010)