

生活環境バイオフィルムの顕微ラマン分光イメージング

(関学大院・理工) ○佐々木舞、重藤真介

Raman Microspectroscopic Imaging of a Life Environment Biofilm
(Graduate School of Science and Technology, Kwansai Gakuin Univ.)

○Mai Sasaki, Shinsuke Shigeto

【序論】私たちの身の回りには、様々な微生物が生息している。その中で、固着性の微生物は、集団で固液あるいは気液界面に構造体を形成する。このような集団微生物の構造体をバイオフィームと呼ぶ。バイオフィーム中の微生物は浮遊状態の微生物とは性質が大きく異なることから、近年注目を集めている。浴室や台所に発生するぬめりは、私たちの生活環境に存在するバイオフィームの一例である。これらのバイオフィームは乾燥や洗浄剤に対する耐性を備えているので、その分子レベルでの解析はバイオフィームの形成を抑制する表面コーティングや効果的にバイオフィームを除去する界面活性剤の開発などの点から重要である。しかし、生活環境バイオフィームの詳細な研究例は少ない。本研究では、顕微ラマン分光法を用いて、浴室の排水溝付近に形成されたバイオフィームの組成を空間分解して調べることを試みた。ラマン分光法は、非破壊・非侵襲かつ染色を必要としない分光手法であるので、バイオフィーム試料をそのままの状態で測定することができる [1,2]。また、ラマン分光法は赤外分光法と比べて水の妨害を受けにくいという利点を有しているため、水回りに形成されるバイオフィーム中の振動スペクトル測定に適している。

【実験】浴室の排水溝付近より採取したバイオフィームをスライドガラス上で薄くのばし、カバーガラスをのせてマニキュアで密閉し、プレパラートを作成した。バイオフィームの空間分解ラマンスペクトルの取得には共焦点顕微ラマン分光装置(inVia, Renishaw 社製)を用いた。励起レーザー波長は 532 nm、試料におけるレーザーパワーは約 3 mW、露光時間は 60 s または 120 s とした。

【結果・考察】バイオフィーム中のいくつかの点で得られた空間分解ラマンスペクトルを図 1、2 に示す。図 1(a)を見ると 1741, 1655, 1438, 1297 cm^{-1} にラマンバンドが観測されていることから試料バイオフィーム中には脂質が含まれていることがわかる。

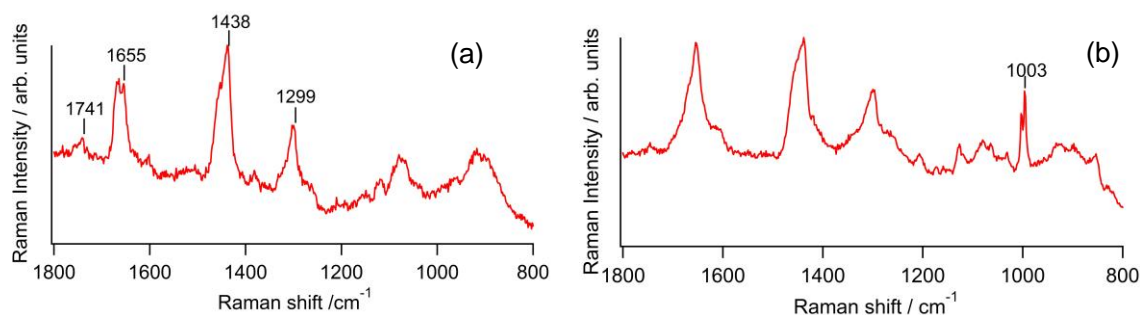


図 1 : 浴室バイオフィーム中で観測された脂質(a)とタンパク質(b)のラマンスペクトル。

また、図 1(b)をみると脂質に特有のバンドに加え、 1003 cm^{-1} に鋭いピークが観測されており、これはタンパク質のフェニルアラニン残基によるものだと考えることができる。これらはバイオフィームを形成する微生物由来もしくは浴室排水に含まれていた有機物由来であると考えられる。

バイオフィーム中に広範囲で観測されたラマンスペクトルを図 2 に示す。図 1 のスペクトルとは全く異なるパターンを示し、 1513 , 1154 , 1007 cm^{-1} に目立った 3 本のラマンバンドが観測された。これらのバンドはカロテノイドに特徴的なバンドであり、それぞれ $\text{C}=\text{C}$ 二重結合伸縮振動、 $\text{C}-\text{C}$ 単結合伸縮振動、 $\text{C}-\text{CH}_3$ 横揺れ振動に帰属される[2]。この結果から、浴室バイオフィームを構成する微生物はカロテノイドを有することが明らかになった。カロテノイドは抗酸化剤として働くことが知られており、バイオフィーム中の微生物のストレス耐性機構と密接に関係していると考えられる。したがってカロテノイドのバイオフィーム内での局在の解明は非常に重要である。バイオフィーム中のカロテノイドに関するより詳細な知見を得るため試料中の異なる点で測定した空間分解ラマンスペクトルを図 3 に示す。いずれのスペクトルにおいても 1513 , 1154 , 1007 cm^{-1} にカロテノイドのラマンバンドが観測された。それら 3 本のバンドに加えて、 1128 cm^{-1} にもはっきりとしたピークが見える。 1128 , 1154 cm^{-1} における隣接した 2 本のバンドは、カロテノイドの共役二重結合鎖におけるシス - トランス異性体を反映しているものと考えられる。図 3 から 1128 , 1154 cm^{-1} のピーク強度比がバイオフィーム内の場所に大きく依存することがわかる。このことは、複数種類のカロテノイドがバイオフィーム中で不均一に分布していることを示しており、非常に興味深い。このような情報は他の分析法では得難いもので、ラマン分光法の環境バイオフィーム分析に対する有用性を示すものである。

[1] H. Ventaka, N. Nomura, S. Shigeto, *J. Raman Spectrosc.* **42**, 1913–1915 (2011)

[2] Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013)

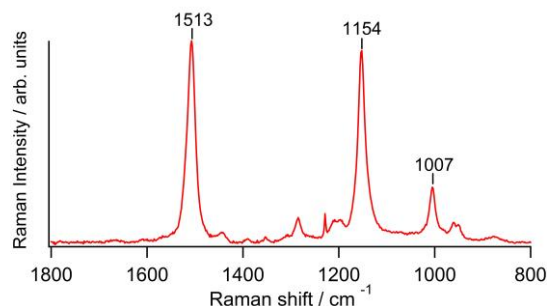


図 2 : 浴室バイオフィーム中で観測されたカロテノイドのラマンスペクトル。

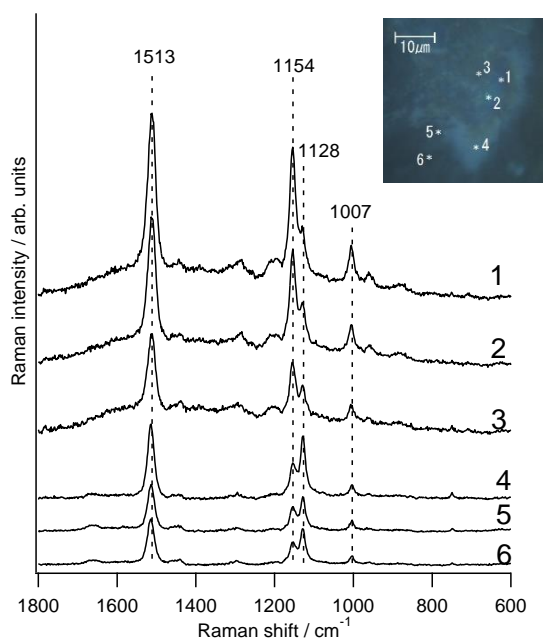


図 3 : バイオフィーム試料の空間分解ラマンスペクトル。(測定点 1~6 を挿入図である光学顕微鏡像に示す。)