

光照射に伴う細菌内 pH 変化の分光測定とプロトン移動過程

(阪大院工応物¹, 北陸先端大材料²) 根岸 貴幸¹, 田中 豪¹, 朝日 剛¹, 増原 宏¹,
水上 卓², 辻本 和雄²

【緒言】高度好塩菌は、塩湖や塩田のような極めて高濃度の NaCl 水溶液中に生息する古細菌であり、太陽光を利用して細胞内外のプロトン濃度差を作り出し、生命活動に必要なエネルギーを得ている (Fig.1)。この光エネルギー/ATP 変換過程を調べるために、高度好塩菌の細胞膜から膜タンパク質 (バクテリオロドプシン) を取り出し、その光応答挙動や物理化学的性質を調べる研究が広く行われている。一方、我々は細胞機能としてのバクテリオロドプシンの働きに着目し、生きた高度好塩菌が多数存在する系で分光測定を行い、その光応答挙動について報告している [1,2]。この集団系での測定と併せて単一生細菌毎の測定を行うことができれば、個々の細菌のイオン移動や代謝物輸送の違いや、細菌周囲の環境を考慮した解析が可能になり、高度好塩菌の光応答挙動の詳細な議論が可能になると考えられる。そこで、本研究ではレーザートラップした単一高度好塩菌の顕微蛍光測定を行い、赤色光照射時の単一細菌内 pH 変化について考察した。

【実験】pH 感応性蛍光色素 (BCECF/AM) を取り込ませた高度好塩菌 (*Halobacterium salinarum* S-9) を 4 M NaCl を含む HEPES 緩衝液 (pH = 7.2) 中に分散させ、顕微鏡下で単一生細菌をレーザー光 (1064 nm, 100 mW, ns pulse, 1 MHz) により捕捉した。この細菌に赤色光 (590 nm) を照射した時の蛍光強度変化 (励起光: 490 nm) をマルチチャンネル CCD で測定した。 (Fig.2)

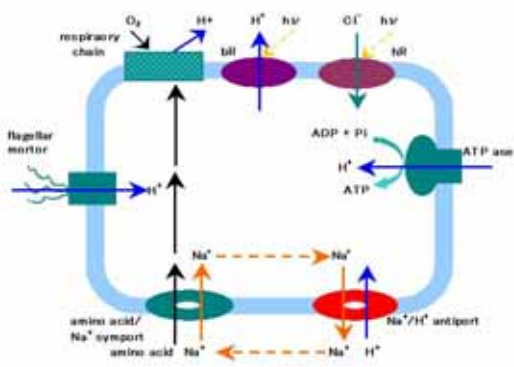


Fig.1 高度好塩菌の膜タンパク質とイオン輸送 (bR: バクテリオロドプシン, hR: ハロロドプシン, sR: センサリーロドプシン, pR: フォボロドプシン)

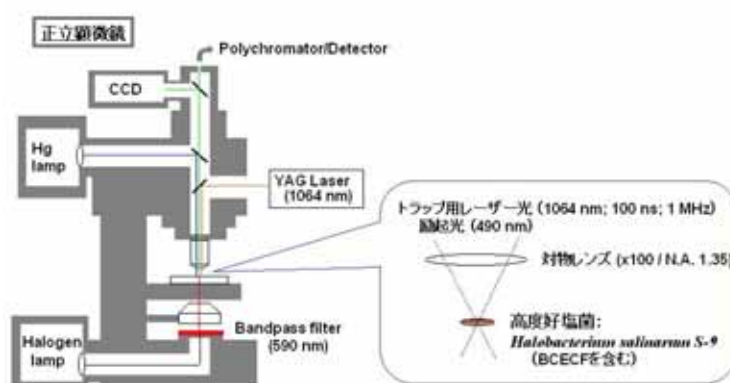


Fig.2 単一高度好塩菌のレーザートラッピングと顕微蛍光測定

【結果および考察】レーザートラップした幅 $\sim 0.8 \mu\text{m}$ 、長さ $\sim 3 \mu\text{m}$ 程度の単一生細菌を、ブラウン運動や細菌自体の動きを抑制し、測定時間中生存させたまま集光位置に保持できた。また、単一生細菌からの蛍光は赤色光の照射とともに上昇し、照射を止めると緩やかに減少した (Fig.3 (a))。この個体の細胞内 pH 変化の挙動やそのタイムスケールは細菌が多数存在する系で測定した場合と同程度であったが[1]、別の個体では pH 変化の小さいもの (Fig.3 (b)) や、赤色光照射前より pH が減少したもの (Fig.3 (c)) も見受けられた。これらの結果は光刺激への応答挙動が細菌個体ごとに異なっていることを示唆している。

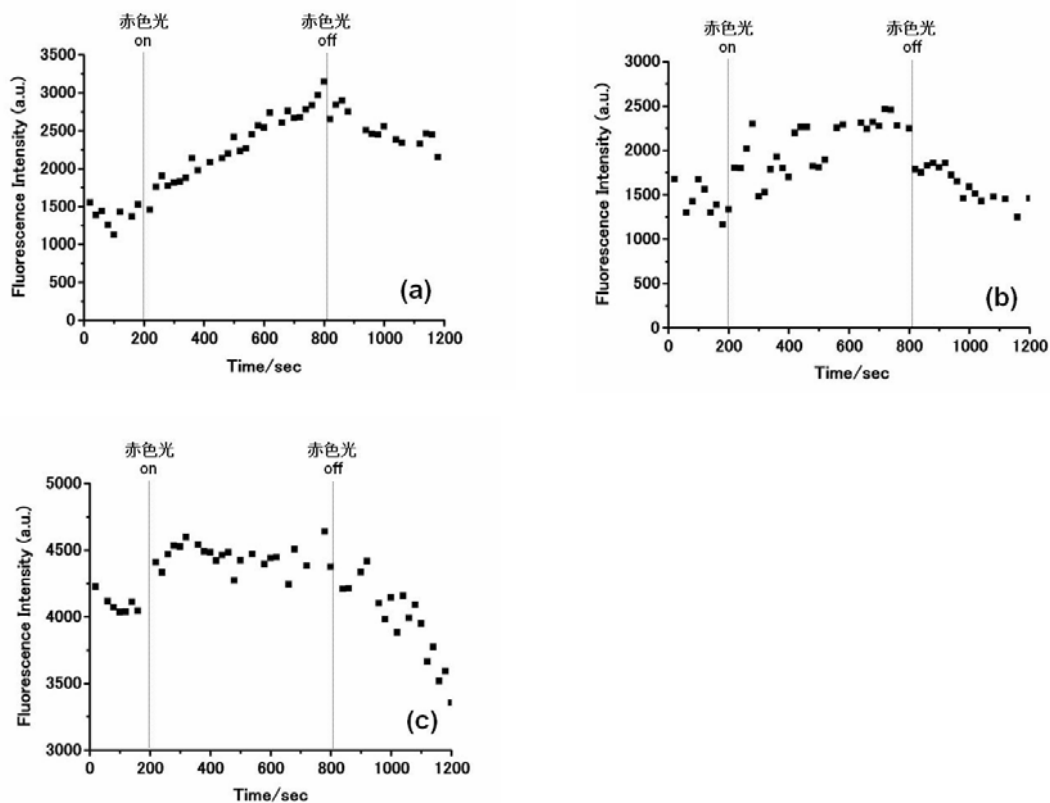


Fig. 3 赤色光照射による単一生細菌の蛍光強度変化
200 秒から 600 秒まで赤色光を照射 ($65 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; 590 nm)
細菌形状:棒状, 長さ; (a) $3 \mu\text{m}$, (b) $3 \mu\text{m}$, (c) $2 \mu\text{m}$

参考文献

- [1] Hikaru Ueno, Taku Mizukami, and Kazuo Tsujimoto, *Chem. Lett.*, **1997**, 1217
- [2] Kazuo Tsujimoto, Marco Semadeni, Margaret Huflejt, and Lester Packer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 155, 123