

## 蛍光寿命イメージングによる高度好塩菌の 細胞内 pH と外部電場効果

(北大電子研<sup>1</sup>・北陸先端大材料<sup>2</sup>・北大薬<sup>3</sup>) ○王 会平<sup>1</sup>・中林孝和<sup>1</sup>・  
辻本和雄<sup>2</sup>・宮内正二<sup>3</sup>・加茂直樹<sup>3</sup>・太田信廣<sup>1</sup>

**【序】**高度好塩菌は、高濃度の塩溶液中で生育する古細菌であり、プロトン輸送機構、走光性、極限環境適応機構など、様々な角度から盛んに研究が行われている。高度好塩菌の細胞内の状態を理解するためには、イオン感応性色素を用いて細菌を染色し、色素の蛍光強度を測定する方法がよく用いられている。しかし絶対強度を定量的に測定することが難しいために、蛍光顕微鏡とイオン感応性色素とを組合せた研究は殆ど行われていなかった。

我々は蛍光寿命イメージングを用いて、細胞内の様々な現象を解明することを目的とした研究を行っている。蛍光強度は蛍光分子の濃度や励起光強度に依存するのに対し、蛍光寿命は分子固有の値であり、光退色や励起光強度に依存しない。そのため強度測定に比べて定量性が増加し、多くの系に適用することができる。本研究では、pH感応性色素である BCECF(2',7'-Bis(carboxyethyl)-4 or 5-carboxyfluorescein)によって染色された高度好塩菌 (*Halobacterium Salinarum*, S-9)の蛍光寿命イメージングを測定し、単一生細菌の細胞内pHについて検討した。さらに高度好塩菌を含んだ溶液に外部電場を印加し、電場に対する応答機構について、蛍光強度および蛍光寿命イメージングを用いて検討した。

**【実験】**フェムト秒レーザーと共焦点顕微鏡を用い、マッピングの各点において光子計数検出による蛍光減衰曲線の測定を行うことにより、蛍光寿命イメージングを得た。蛍光減衰曲線を4分割し、分割された値から蛍光寿命を算出している<sup>1)</sup>。試料は、4 M NaClを含むHEPES緩衝溶液(基本液)にBCECF/AMを加えて3日間暗所放置する。その後十分に遠心洗浄を行ない、基本液に分散させたものを用いている。

**【pHと蛍光寿命】**BCECFはpH6.4～7.6の範囲内で蛍光強度とpHとの間に相関関係がある。本研究では初めに、BCECFの蛍光寿命とpHとの関係について検討した。図1に緩衝溶液中におけるBCECFの蛍光減衰曲線を示す。蛍光減衰曲線は、2成分の指数関数を用いて再現することができる。pHと蛍光寿命( $\tau_f$ )との関係を図示した結果を図2に示す。得られた結果は、以下のpolynomial functionを用いて再現することができた。

$$\text{pH} = -212.64 + 188.16 * \tau_f - 53.803 * \tau_f^2 + 5.1457 * \tau_f^3 \quad (1)$$

(1)式を用いることにより、蛍光寿命から溶液中のpHを求めることができる。

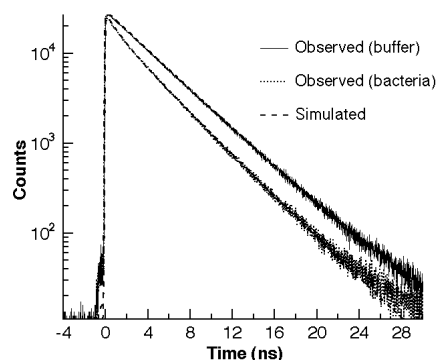


図1 BCECFの蛍光減衰曲線。実線：緩衝溶液中 (pH=8.4), 点線：細胞内 (pH=8.5), 波線：計算値。励起波長：450 nm, 蛍光波長：530 nm.

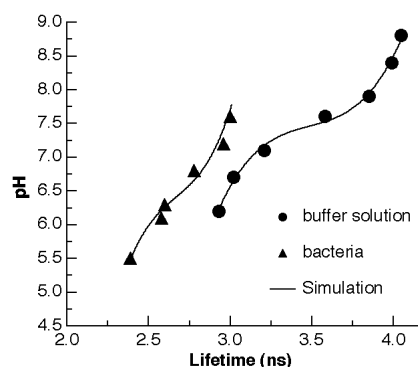


図2 BCECFの蛍光寿命とpH。●：緩衝溶液中, ▲：細胞内, 実線：計算値。励起波長：450 nm, 蛍光波長：530 nm.

同様に細胞内のpHと蛍光寿命との関係についても検討した。細菌が分散された基本液にモネンシン溶液を滴下し、10分以上放置する。その後基本液のpHを変化させ、細菌内の色素の蛍光寿命のpH依存性を測定した。モネンシンによって、細胞内外のpHは等しくなっている。細胞内の色素の蛍光減衰曲線は、3成分の指数関数を用いて再現することができた(図1)。pH5.5~7.6の範囲内におけるpHと蛍光寿命( $\tau_f$ )との関係は図2のようになり、以下の式を用いて再現することができた。

$$pH = -133.19 + 149.91 * \tau_f - 54.546 * \tau_f^2 + 6.7358 * \tau_f^3 \quad (2)$$

pH7.7の基本液に分散させた高度好塩菌の蛍光寿命は2.93 nsであった。(2)式より細胞内pHは7.2と計算され、この値はレシオ法による蛍光強度から求めた値と一致している。

**【蛍光寿命イメージング】** 図3(a)-(d)に高度好塩菌の時間分解共焦点蛍光画像を示す。蛍光減衰曲線を0-2 ns, 2-4 ns, 4-6 ns, 6-8 nsと4分割しており、時間が経つにつれて、蛍光強度が弱くなる様子がわかる。この時間分解画像から得られた蛍光寿命イメージングを図3(e)に示す。高度好塩菌の蛍光寿命の多くは約2.6 nsと計算され、単一指数関数を仮定した時間ゲート法では、蛍光寿命の値が約10%小さく見積られる。しかし図3の蛍光寿命イメージングから明らかなように、2.6 nsの成分の他に、およそ2.1 nsの蛍光寿命を持つ細菌も存在することがわかる。蛍光寿命はpHと相関関係があり、pHが7.2の細菌とpHが6程度の細菌の2種類の細菌が存在することがわかった。このようなpHの違いは、細菌の活性度と相関があると考えられる。細菌一つ一つのpHを蛍光寿命イメージングから得ることができることがわかる。

**【外部電場効果】** 高度好塩菌を含んだ基本液に、2枚の電極を導入し、高度好塩菌の外部電場効果について検討した。外部電場の印加に伴う高度好塩菌の蛍光強度画像の変化を図4に示す。電圧印加前では、一つ一つの細菌が分散して観測されるのに対し(図4(a)), 電極間距離3.5 cm, 3 Vの電圧を100分間印加すると、細菌がその形状を保ったまま会合体を形成することがわかった。しかし会合体を形成しても蛍光寿命の値は大きく変化しないことから(図4(c)), 細胞内

pHは会合体形成に対して、ほぼ一定であることがわかる。講演では、印加電圧依存性から、会合体の形成機構について考察を行う。

1) 中林他, 分光研究 55 (2006) 31.

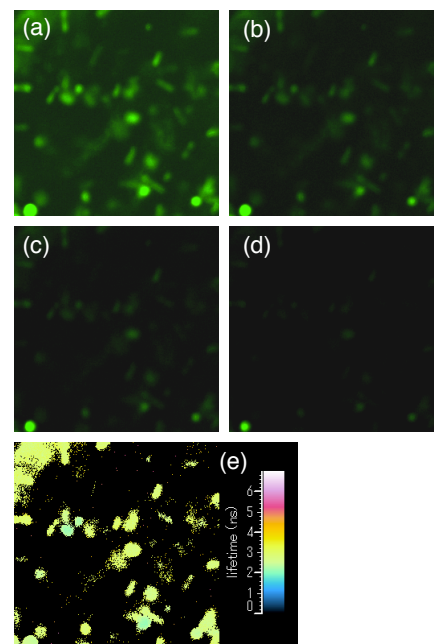


図 3 (a-d) BCECF が含有された Halobacterium Salinarum (S9) の時間分解共焦点蛍光画像。蛍光減衰曲線を (a) 0-2 ns, (b) 2-4 ns, (c) 4-6 ns, (d) 6-8 ns と 4 分割している。(e) 蛍光寿命イメージング。励起波長: 450 nm, 蛍光波長: 515-560 nm.

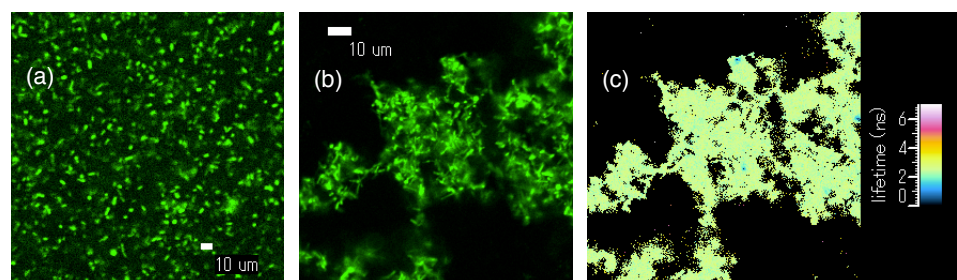


図 4 (a, b) BCECF が含有された Halobacterium Salinarum (S9) の共焦点蛍光画像。電圧印加時間: 0 分 (a), 100 分 (b)。(c) 蛍光寿命イメージング。励起波長: 450 nm, 蛍光波長: 515-560 nm.