2L1700

単一ミトコンドリアを対象とした蛍光色素による膜電位計測方法の開発

○太田 善浩、中山 智（農工大・工・生命工）

〔目的〕ミトコンドリアには蛋白質複合体からなるコンダクタンスの大きなチャネルが存在する。このチャネルが開くとミトコンドリア膜の溶質に対する透過性が急激に増大し、生理的にはアポトーシスや細胞質のCa²⁺信号増幅の原因となっている。チャネルの開閉は従来ミトコンドリア集団を対象に調べられていたが、近年、1個のミトコンドリアでリアルタイムで検出が出来るようになった。この方法は、膜電位感受性の蛍光色素を用いてチャネルの開閉を調べるものであるが、膜電位の変化は検出できるものの、何mVの電位なのか絶対値を求めることは出来なかった。そこで、本研究では色素の蛍光強度変化からmV単位の電位変化に換算する技術の開発を目指した。

〔方法〕豚心筋細胞から単離したミトコンドリアを用い、これをカバーガラスに吸着させた。次に、このミトコンドリアを膜電位感受性蛍光色素TMREで染色し、個々のミトコンドリアから発せられる蛍光を冷却CCDカメラで時間分解測定した。ミトコンドリア内外でKC1の濃度勾配を人為的に作り、K⁺のイオノフォアであるバリノマイシンを添加した。このときに生じる、ミトコンドリア膜電位の時間変化にともなうTMREの蛍光強度変化を測定して、膜電位の絶対値を求めることを試みた。

〔結果〕バリノマイシンを添加してミトコンドリアに作用させると、添加後TMREの蛍光強度が上昇し、やがて徐々に下降した。KC1濃度勾配が大きいほど、蛍光強度の上昇速度、及び下降速度ともに大きくなった。この過程を解析することにより、ミトコンドリアの蛍光強度を膜電位の大きさ（mV）におおよそ換算することができた。当日は詳しい解析結果を報告したい。

Y.Ohta, S.Nakayama : Measurements of membrane potential in single mitochondria with fluorescent dye.

2M1330

PCR法を用いた微生物生態系の解析II：生ごみ処理機への適用

井上 高一、山口 博子、○関口 達彦（三洋電機・筑波研究センター）

生ごみ処理機は家庭から出る食物残さを微生物によって、水、二酸化炭素および塩類に分解する。このプロセスには多くの種類の微生物が関与することが知られている。本研究では生ごみ処理機を1つの生態系として捉え、ランダムPCR法の一種であるSSC-PCR法を用いて生態系の変化を経時的に観察した。【生ごみ処理機処理槽の環境変化】生ごみ処理機に1日1kgの生ごみを土日を除く週5日間、計200日投入した。当初処理槽内のpHは6.0-6.5であったが処理が進むにつれて上昇し、1ヶ月後くらいからpH9.0前後に落ち着いた。一方、処理槽内の木質チップ懸濁液（チップ5g＋純水45ml）電導度は全期間を通じて単調に増加し、158日目には4.0mS/cmとなった。【最適生育環境の変化】pH5.0,7.0,9.0,11.0およびNaCl濃度0.25,0.5,1.0,2.0Mからなる16種類の寒天培地を用意し、運転開始後21日目と200日目の処理槽から取り出した微生物を培養した。その結果、21日目のサンプルではpH7.0, NaCl 0.25Mの寒天培地で、200日目のサンプルではpH9.0, NaCl 0.5Mの寒天培地で最も生菌数が高かった。【SSC-PCR法による解析】運転開始直後から158日目まで、一定期間ごと（初期1～2日ごと、2ヶ月目以降は1週間ごと）に採取したサンプルにSSC-PCR法を適用した。その結果、運転開始後2ヶ月目までは頻繁にバンドの生成・消滅が見られたが、3ヶ月目以降はいくつかのバンドが維持された。上記の結果は、環境の変化に伴い、主要細菌の交代が起きたことを示唆するとともに、本手法によって多種類の微生物が存在する系の解析が出来ることを示している。

T.Inoue, H.Yamaguchi and T.Sekiguchi : Analysis of bacterial flora by PCR method II: application to biodegradation system for foods

2M1315

PCR法を用いた微生物生態系の解析：菌株の識別

○河野 永治¹、井上 高一¹、山口 博子¹、岩間 明文^{1,2}、江崎 孝行²、関口 達彦¹（¹三洋電機（株）・筑波研究センター、²岐阜大・医）

細菌の同定は医療、食品衛生等の分野において重要な課題であるため、DNAを解析し正確に細菌を同定する方法が検討されている。特に特定遺伝子（16S-rRNA遺伝子など）の配列を比較する方法は種特定のための有効な手段となっている。一方、同一種でも株によって病原性等の性状が異なるため株の識別も必須とされている。しかし、一般的に株の違いとなる遺伝子領域は特定されていないため、多くの菌種に適用できる一般的なDNA解析手法は開発されていない。そこで、DNAを多数のフラグメントに分割し、その分布から種の同定および株の識別を可能にする情報が得られるかどうか検討した。まず19種、35株の細菌からDNAを抽出した。次いで、PCR法により1株から多数のDNAフラグメントを作成した。PCRにはRAPD法を応用し12bpの任意プライマーを複数用いた。反応条件は1.5mMのMg溶液を用いて熱変性（94℃、1分）・アニーリング（45℃、2分）・伸長反応（72℃、3分）のサイクルを35回繰り返した。最後にDNAフラグメントの分布を見るため、PCR生成物を1%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し写真撮影した。この結果、(1)複数株について調べた各細菌において、いずれも株ごとに特有なバンドパターンとなること、(2)同一種ならば、株が異なってもバンドパターンは類似していること、(3)異なる細菌間ではバンドパターンが大きく異なることなどが分かった。従って、データベースを整えることで、種の推定とともに株の識別を可能とする方法になり得ると考えられる。

E.kono,T.Inoue,H.Yamaguchi,A.Iwama,T.Ezaki and T.Sekiguchi : Analysis of bacterial flora by PCR method I:discrimination of bacterial strain

2M1345

たばこ主流煙中のNOラジカル(III) 改良型模擬喫煙装置による発生メカニズム

○時本 孝行、品川 興造（大阪市大・医・第一生理）

ESRスピントラッピング法を用いて、たばこ（*hi-lite* 1本）主流煙に由来するNOが喫煙直後より生成し始め、約25分後まで急速に増大し、その後徐々に一定値に達することを報告した。さらに、模擬喫煙実験に代えて、SNAP溶液（52 μM: NO標準発生試薬）を種々の濃度のH₂O₂溶液で前処理することにより、約1mM H₂O₂溶液の添加で、喫煙時と同様なNO発生経過をシミュレートできた。また亜硝酸ナトリウム水溶液を用いた実験によって、Fe(II) 過剰存在下（還元状態）で、NO₂⁻濃度依存的にNOが産生されたが、硝酸ナトリウム水溶液（NO₃⁻）からでは高濃度でも生成されなかった。今回、喫煙中に発生するNOを検出する目的で、従来の模擬喫煙装置の前段に洗浄槽を備えた改良型喫煙装置を用いて実験した。主流煙をアルカリ性ピログロールに通した場合、これまでのタバコ最大値の約80%のNOシグナルが喫煙直後より観察され、しかもその大きさのままで経過した。次に、前段に水溶液を通した場合、ピログロール溶液の場合に比べて約70%減少した。以上の結果、たばこ主流煙に発生したNOは速やかにNO₂に酸化され、同時に発生したNO₂と共に水系でNO₂⁻となり、過剰のFe(II)により徐々にNOに還元されたと考えられる。そこで改良型喫煙装置でアルカリ性ピログロールを通すと、O₂、NO₂共に除去されるために、喫煙直後から安定した大きなピークが観察された。これに対し、水槽に通した場合NO₂は吸収されるが、溶解せずに通過したO₂の影響でNOの生成が阻害されたと考えられる。

T. Tokimoto, K. Shinagawa : NO production in cigarette smoke and its origin