

講演番号：3C01-03

質疑応答日時、会場：3月20日 09:00～ ミーティングルーム C

細菌細胞内 pH モニタリングシステムを利用した大腸菌長期定常期のリアルタイム細胞内 pH 測定  
Real-time intracellular pH measurement of *Escherichia coli* in the long-term stationary phase using a bacterial intracellular pH monitoring system

○臼田 隆亮<sup>1</sup>、須藤 雅己<sup>2</sup>、蓮池 祐紀<sup>3</sup>、深田 悠太<sup>2</sup>、片岡 正和<sup>2</sup> (<sup>1</sup>信州大工、<sup>2</sup>信州大院 総合理工 生命医工、<sup>3</sup>信州大工 物質化学)

○RYUSUKE USUDA<sup>1</sup>, MASAKI SUTO<sup>2</sup>, YUKI HASUIKE<sup>3</sup>, YUTA FUKADA<sup>2</sup>, MASAKAZU KATAOKA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Eng., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., <sup>3</sup>Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

細胞内 pH は細胞培養や酵素反応を伴う生体プロセスにおいて、基本的ながら非常に重要なパラメータである。特に細胞内 pH 値の時間的変化を測定する試みは重要とされ、今日では、pH 感受性の蛍光色素を用いた方法が考案されているが、侵襲性や試薬の漏出があるために、生きたまま pH 値の時間的変化を測定することが不可能である。

我々は、細菌内での pH 変化を生きた状態のままリアルタイムに測定できる系の確立を目的として、2種類の蛍光タンパク質 (pHuji 及び GFPuv) を組み合わせて発現させた大腸菌を 37°C で 10 日間長期培養した際の、1 日ごとの細胞内 pH と外部 pH の値を測定した。細胞内 pH は培養開始後 pH7.0 周辺だったが、対数増殖期と定常期の間で上昇しアルカリ側へシフトする結果を得た。また細胞内 pH の変動は、培養開始後 72 時間以降の長期定常期で外部 pH の値に同調したことから、生育阻害の起こらない幅広いタイムスケールでの pH 値の時間的変化を測定できたと考えている。

本発表では、上記の研究とともに、現在取り組んでいる蛍光顕微鏡を用いた 1 細胞ごとの細胞内 pH の測定についても紹介する。

Intracellular pH ( $pH_{int}$ ) is a basic and very important parameter in biological processes involving cell culture and enzymatic reactions. Attempts to measure the temporal change in  $pH_{int}$  are important, and today, methods using pH-sensitive fluorescent dyes have been applied, but it is impossible to measure real-time changes of  $pH_{int}$  in living conditions due to invasiveness and reagent leakage.

In order to establish the system that allows real-time measurement of  $pH_{int}$  changes in bacteria, we measured daily  $pH_{int}$  and external pH ( $pH_{ext}$ ) *Escherichia coli* culture expressing with a combination of two fluorescent proteins (pHuji and GFPuv) during long-term incubation at 37°C for 10 days. The  $pH_{int}$  was around pH 7.0 after the start of culture, but it increased from the exponential phase to the stationary phases and shifted to the alkaline side. In addition,  $pH_{int}$  approached  $pH_{ext}$  value culture for 72 hours (long-term stationary phase), suggesting that we were able to measure the temporal change in  $pH_{int}$  over a wide range of timescales without growth inhibition.

In this presentation, we will present our current work on the measurement of  $pH_{int}$  of individual cell using fluorescence microscopy as well as the above studies.

Intracellular pH, Fluorescent proteins, Long-term stationary phase

発表責任者：臼田 隆亮 (ryuusuke\_u@shinshu-u.ac.jp)