

関西学院大学 研究成果報告

2022年 3月 7日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：菅野菜々子

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	分子分光プロファイリングによるポストコッホ生態物理化学
研究実施場所	理学部 重藤研究室
研究期間	2021年 4月 1日 ～ 2022年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

環境中にはバクテリア・アーキアにまたがり多様な微生物が生息しており、地球化学的物質循環に大きく関与している。近年の次世代シーケンサーを用いた遺伝子ベースの解析法により、様々な環境中の微生物多様性が報告されている。これら多様な微生物が担う役割を詳細に解析するためには、環境中のどの細胞がどのような能力を発揮しているのかを可視化する技術や、特定の微生物細胞をターゲティングしてその細胞を取り出し、より詳細に解析するためのスクリーニング技術が求められる。

本研究では環境微生物の能力を細胞レベルで可視化することを目標に、顕微ラマン分光法による環境微生物の系統群および生理活性物質識別法の開発を行っている。2021年度は、①昨年度までに構築した、細胞のラマンスペクトルと機械学習による1細胞レベルでの原核生物の識別手法について、再現性の確認とスペクトル処理法の再検討を行った。また、②メタン生成アーキアに着目し、メタン生成に重要とされる生理活性物質であるビタミンB₁₂類縁体とその種類、およびシトクロムを共鳴ラマン効果により検出可能であることを示した。①②について、論文誌上で報告した。

① 機械学習による原核生物細胞の種識別

昨年度までに、教師あり機械学習ランダムフォレストと原核生物の細胞のラマンスペクトルを用いて、1細胞レベルでの微生物種識別モデルの構築を行ってきた。その中で、アーキアを含む6種の原核生物種の識別、および人工的に作成した3種混合集団内の細胞の種の識別に成功した。本年度は、再現性の確認、およびベースライン補正などの解析手法の再検討を行い、得られた結果および顕微ラマン分光法とランダムフォレストを用いた原核生物の1細胞識別手法のワークフローをまとめ、これらについて論文誌上で報告した（発表論文1）。さらにメタン生成アーキア等、計5種のアーキアを対象として顕微ラマン測定を行い、機械学習に投入可能なスペクトルを、うち3種から取得することに成功した。来年度はバクテリアを中心として種類を増やし、バクテリア/アーキア識別法の構築を行う予定である。

1細胞レベルでの種の識別法を微生物の分離培養法へと応用するためには、レーザー照射の細胞への影響を評価する必要がある。顕微鏡ステージ上で微生物培養を可能とするステージインキュベーターを導入し、レーザー照射による細胞分裂活性への影響の調査を開始した。本年度は大腸菌を用いて実験系の構築を行ったので、来年度はモデル微生物の種を増やしつつ、レーザー照射条件の検討を行う予定である。

② メタン生成アーキアの細胞からコバミド・シトクロムのスペクトルを検出

メタン生成アーキアは、温室効果ガスのひとつであるメタンを発生させることから、環境中におけるメタン生成アーキアの分布や代謝活性が注目されている。一方でメタンはバイオガスとしてエネルギー面でも注目されており、さらにメタン生成アーキアはビタミンB₁₂類縁体（コバミド）などの有用な生理活性物質を生産する能力を持つため、産業面でも注目度が高い。昨年度までに、2種のメタン生成アーキア細胞より、532 nm 励起時にコバミドの共鳴ラマンスペクトルが得られることを明らかにしている。本年度は調査対象種を拡大し、計8種のメタン生成アーキアのラマンスペクトルを取得し、うち4種よりコバミドの検出に成功した。また、*Methanosarcina*属と*Methanopyrus*属では共鳴ラマンスペクトルの形状がわずかに異なり、生体内のコバミドの上部リガンドの種類が両者で異なる可能性を見出した。さらにシトクロムを持つ*Methanosarcina*属では、コバミドとシトクロムを同時に検出可能であることを明らかにした。これらの結果を論文誌上で発表した（発表論文2）。

【発表論文】

1, Kanno, N., S. Kato, M. Ohkuma, M. Matsui, W. Iwasaki, and S. Shigeto. 2021. Machine learning-assisted single-cell Raman fingerprinting for *in situ* and nondestructive classification of prokaryotes. *iScience*. 24(9): 102975.

2, Kanno, N., S. Kato, T. Itoh, M. Ohkuma, and S. Shigeto. 09 Jan. 2022. Resonance Raman analysis of intracellular vitamin B₁₂ analogs in methanogenic archaea. *Anal. Sci. Adv.* doi: 10.1002/ansa.202100042.

以 上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。