

# 関西学院大学 研究成果報告

2021年 3月 16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	理工学部 重藤研究室
研究期間	2020年 4月 1日 ～ 2021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・アーキアにまたがる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。2020年度は複雑な形状を取る生物試料のラマンスペクトルを微生物種の識別へと応用するため、機械学習モデルの導入を行った。また複数のバクテリア・アーキアのラマンスペクトルを取得・比較解析し、微生物種や微生物活性に特有なラマンスペクトルの探索を行った。

### ① ラマンスペクトルを用いた微生物識別への機械学習Random Forestの導入

機械学習では教師データを基にしてモデルを構築し、それによって未知データを識別することができる。機械学習アルゴリズムとしてRandom Forestを採用することとした。この手法ではどのような特徴量が識別に寄与したか、つまりどのような分子種の特徴を反映したラマンスペクトルが識別に寄与したかも解析できる。プログラミング言語Pythonのオープンソース機械学習ライブラリscikit-learnを導入した。ラマンスペクトルは装置の設定や実験条件、細胞の自家蛍光などの影響を受け、取得データが必ずしも比較できる状態にない。ラマンスペクトルの前処理として、使用するスペクトル範囲補正、ベースライン補正、規格化工程の検討を行い、機械学習投入前のデータ前処理から機械学習モデルの構築、評価までのワークフローを作成した。

### ② 機械学習による原核生物6種の識別及び複合微生物集団中の細胞の種識別

上記①で作成した機械学習モデルを用い、アーキアを含む6種の原核生物種の識別を行い、識別精度を評価した。また種の識別がどのようなラマンスペクトルの特徴に基づくものか解析を行った。バクテリアとして大腸菌、枯草菌、好熱菌*Thermus thermophilus*, アーキアとして*Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermococcus kodakaraensis*, アンモニア酸化アーキア*Nitrososphaera viennensis* を用いた。それぞれの種から30~40細胞程度のラマンスペクトルを取得して、訓練データとテストデータに分割しモデルの構築と評価を行った。その結果正解率100%の精度で6種を識別することに成功した。種の識別には人の眼では判別困難な生体高分子の組成・相対比や、生理活性物質が寄与した。また*N. viennensis*に特徴的なラマンピークを検出した。今後このピークに由来する物質を調査することでアンモニア酸化アーキアや周辺微生物のマーカーとなる可能性がある。

環境中の複合微生物集団を想定し、上記6種のうち3種(枯草菌, *T. thermophilus*, *N. viennensis*)を混合し、その混合集団内の細胞の種の識別を行った。結果、正解率98%以上の精度で識別することに成功した。今後、細胞の生理状態や実験条件の影響を検証することで、ラマンスペクトルと機械学習による1細胞レベルでの種の識別法を複合微生物系への応用につなげられると期待している。

以上の内容は日本農芸化学会2021仙台大会にて発表する：

2B04-15, シングルセルラマン分光と機械学習を用いた原核生物の非破壊微生物種識別, 2021年3月, オンライン開催

### ③ ラマンスペクトルを用いたメタン生成アーキアの生理活性物質の検出

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。一方でビタミンB<sub>12</sub>類縁体などの有用な生理活性物質を生産する能力を持ち、産業面でも注目度が高い。複数種のメタン生成アーキアのラマンスペクトルを解析したところ、いくつか特徴的なラマンピークを検出した。532 nm励起時に共鳴ラマンピークが現れ、これはビタミンB<sub>12</sub>類縁体であると帰属することに成功し、細胞レベルでビタミンB<sub>12</sub>類縁体の生産活性を観察できる可能性を見出した。また超好熱性メタン生成アーキアからは別の生理活性物質に由来すると考えられるラマンピークが検出されており、今後詳細に解析することで新たなメタン生成アーキアの生理活性解析につなげることができると期待される。

報告用紙②

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。