

## 微生物1細胞および集団のラマン分光イメージング

重藤 真介

## はじめに

生きた微生物の細胞およびその集団を非破壊的に観察する手法として、「光」は欠かせないものとなっている。Leeuwenhoekが自作の顕微鏡を用いて初めて微生物を観察して以来、「光」を用いた可視化技術の発展が微生物学の大きな推進力の1つであったことは論を俟たない。とくに、蛍光タンパク質を特定の細胞あるいは細胞内の特定の位置で発現させることで、標的とする細胞や生体分子を標識し観察する蛍光法は、微生物の機能や生態を時間と空間を分解して詳細に調べることが可能にした。

近年、蛍光法にない特長を有する新たな「光」としてラマン分光法が注目されている。ラマン分光法は、1928年にインドの物理学者RamanとKrishnanによって初めて報告<sup>1)</sup>された光の非弾性散乱現象を利用した分光手法である。物質に光を照射した際に生じる散乱光の大部分は入射光と同じ振動数を持っているが、ごくわずかに異なる振動数の散乱光が含まれている。これがラマン散乱光である。入射光とラマン散乱光の振動数差（ラマンシフトと呼び、通常 $\text{cm}^{-1}$ 単位で表す）は物質を構成する分子の振動状態に対応するものであるため、ラマン散乱光強度をラマンシフトに対してプロットしたグラフ（ラマンスペクトル）から分子固有の情報が得られる。蛍光法と比較したラマン分光法の大きな利点は標識を一切必要としない点である。これは、光照射以外に系への摂動がないため、細胞をより「あるがまま」に近い状態で観察できるだけでなく、既知の標的物質に限定されない探索的な研究もラマン分光法であれば可能であることを意味している。もう1つの長所はラマンスペクトルに含まれる情報量の豊富さである。分子振動は分子の種類や幾何構造、物理的・化学的状態、周囲の環境との相互作用などに関するユニークかつ詳細な知見を与える。この意味で個々の分子が示すラマンスペクトルはまさに分子の指紋 molecular fingerprints であり、多種多様な生体分子からなる微生物のそれは“microbial fingerprints”と呼ぶべきものである。しかもその指紋は微生物の状態を反映してダイナミックに変化し得る。我々は鑑識官のごとく、その microbial fingerprints を「採取」し「解説」することによって、微生物1細胞や集団の「あるがまま」

の姿を知ることができるのである。

本稿では、ラマン分光に基づいた微生物イメージングの応用例として、筆者の研究室で行った糸状菌の菌糸細胞<sup>2)</sup>および浴室バイオフィーム<sup>3)</sup>の研究を中心に紹介する。微生物のラマンスペクトルを主要な生体分子ごとの指紋に分解する手法である多変量波形分解-交互最小二乗 (multivariate curve resolution-alternating least squares, MCR-ALS) について簡単に解説し、MCR-ALSと融合させたラマン分光イメージングにより初めて明らかとなった糸状菌菌糸内の多糖類やシクロクロム、浴室バイオフィーム内のポリエン化合物の不均一な分布を示すことで、ラマン分光が導く微生物学の展開について述べる。なお、本稿ではいわゆる自発ラマン分光に焦点をあてる。イメージングスピードの点で優れる非線形ラマン分光については他の総説<sup>4)</sup>を参照されたい。

## 複雑なラマンスペクトルを解説するためには？

微生物に限らず細胞はDNA/RNA、タンパク質、脂質、糖類など多種多様な生体分子から構成され、その結果として細胞のラマンスペクトルはそれらの寄与が重なりあった複雑なパターンを示す。蛍光法と同じように、特定の振動数のラマン散乱強度を選択してマッピングを行うと<sup>5)</sup>、きわめて近い振動数を持つ異なる分子種からの信号を分離できないことになる。実際、上記の生体分子のラマンスペクトルは一般的によく類似しており、緑色蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質の発光のような明瞭な違いは望めない。そこで、細胞が示す複雑なラマンスペクトルを多変量解析の力を借りて解きほぐしてやる必要がある。

多変量解析には主成分分析などさまざまなタイプのものが存在するが、筆者らはMCR-ALSを用いている<sup>6-8)</sup>。MCR-ALSは図1に示すように、空間内の各点で測定したラマンスペクトルからなるデータ（ハイパースペクトルデータ）が少数の主要な成分の線形結合で表されると仮定し、ハイパースペクトルデータに対応する非負行列 $\mathbf{A}$ を各成分のスペクトルを要素とする行列 $\mathbf{W}$ と空間分布パターンを要素とする行列 $\mathbf{H}$ の積 ( $\mathbf{A} = \mathbf{WH}$ ) に分解する手法である。この分解に際して、 $\mathbf{W}$ と $\mathbf{H}$ の要素がすべて非負であるという拘束条件を課す（そのた

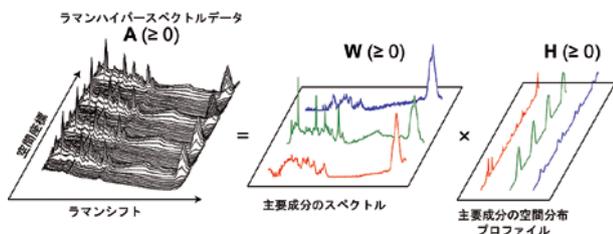


図1. MCR-ALSの概念図. ここではラマンハイパースペクトルデータAが3つの主要な成分(赤, 緑, 青)の線形和で表せるとした場合について示す.

めMCR-ALSは非負行列因子分解<sup>9,10)</sup>とも呼ばれる). 非負行列因子分解は一意的な分解ではなく, ある初期値からスタートしてWとHの要素をALSにより最適解へと導く. 筆者らがとくにMCR-ALSを用いている最大の理由は, 非負拘束条件 $W \geq 0$ ,  $H \geq 0$ のため, 得られたWおよびHの成分を特定の分子種のラマンスペクトルおよび相対濃度(どちらも物理的に負値は取り得ない)の空間分布にそれぞれ直接対応づけられるからである. 主成分分析などではアウトプット(ローディング)が正負両方の値を取るため, このような直接の対応関係は得られない. 正しいmolecular fingerprintsが得られて初めて, そこから詳細な分子情報を読み解くことが可能となる. データを構成する成分の数は特異値分解の結果を用いるなど何らかの方法で推定する必要があり, そこにはユーザーの介入が必要となる. 以下に紹介する例が示すようにラマンスペクトルのMCR-ALS解析は, 微生物細胞中の複数の生体物質のラベルフリー同時イメージングならびに他の手法では得難い化学情報の獲得にきわめて有力である.

### 糸状菌菌糸の多成分同時イメージング

糸状菌は発酵や抗生物質産生を行う生物工学的に有用な微生物であるだけでなく, 真菌感染症の原因として医学的にも非常に重要である. 基礎微生物学の観点からは, 糸状菌は酵母などの他の真菌あるいは細菌と違って, 菌糸の先端を伸長させることで成長し, 長く伸びた菌糸は複数の核と隔壁を含む空間的・機能的に異なる区画から成り立っている点に関心が持たれてきた. とくに菌糸先端成長の分子メカニズムは盛んに研究されており, 超解像顕微鏡<sup>11,12)</sup>を含む蛍光イメージングにより先端成長に関わるアクチン, 微小管, ベシクルなどの役割と動態が明らかにされつつある.

筆者らは糸状菌のモデル微生物である *Aspergillus nidulans* の生きた菌糸の先端部, 分岐部, 基部(胞子に比較的近い, 枝分かれのない部分)に対してMCR-ALSラマンイメージング(励起波長532 nm)を行った<sup>2)</sup>.

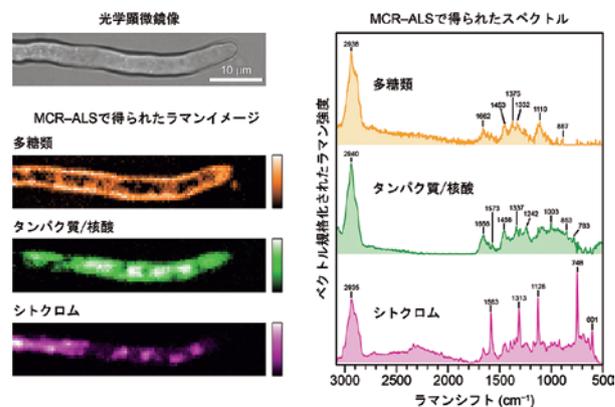


図2. 糸状菌 *Aspergillus nidulans* の菌糸先端を含む部分のMCR-ALSラマンイメージングの結果. 4成分を仮定して解析を行った. (左) 光学顕微鏡像および培地を除く3成分(多糖類, タンパク質/核酸, シトクロム)のラマンイメージ. (右) 3成分のラマンスペクトル.

MCR-ALSの成分数を4と仮定して得られた菌糸先端を含む部分の結果を図2に示す. 培地に由来する成分(図2では省略)を除くと, 多糖類, タンパク質/核酸(DNA/RNA), シトクロムの3つの分子種のラマンスペクトルと菌糸内分布をハイパースペクトルデータから分離・抽出することに成功した. 各成分がこのような帰属できる根拠は2つある. 1つは得られた分布像(ラマンイメージ)の生物学的な解釈に基づくものである. たとえば, 黄色で示した1番目の成分は菌糸の周縁部に局在しており, 細胞壁の構成成分の多糖類であると容易に判断できる. しかしながら, この帰属法は特徴的な細胞内分布を示す分子種に対してのみ有効で, 汎用性に欠ける. もう1つ—これがスペクトルの解釈に他ならないのだが—はMCR-ALSにより分離された各成分のラマンスペクトルから帰属を行う方法である. Ramanによる最初の報告以来, 膨大な量のラマンスペクトルデータが蓄積されている. その知見と, MCR-ALSにより得られたスペクトルに現れているピーク(ラマンバンド)とを照合すると, 3つの成分が多糖類(より具体的にはキチンのスペクトルパターンと一致), タンパク質/核酸, シトクロムであると断定することができる.

タンパク質の中でシトクロムという特定のタンパク質のみ独立した成分として分離されているのは, シトクロムが共鳴ラマン効果を受けているためである. 発色団としてヘムを有するシトクロムは本実験の励起波長である532 nm付近に電子吸収を示す. 電子吸収波長と一致した波長で励起した場合に, その吸収を示す分子のラマン散乱光が著しく増強される現象が共鳴ラマン効果であり, 非共鳴の場合と比較して約 $10^4$ 倍以上の強度増大が起こることが知られている<sup>13)</sup>. シトクロム以外のタンパ

ク質（および核酸）が核の部分で高い相対濃度を示しているのに対して（図2左の緑のイメージ），シトクロムはそれと相補的な分布を示しており（図2左の紫のイメージ）ミトコンドリアの分布に対応している。

このように，複数の分子種の細胞内分布を同時に可視化し，なおかつそれらのfingerprintsたるラマンスペクトルが得られる点がMCR-ALSラマンイメージングの強みである．ここでは，ラマンスペクトルから引き出せる，シトクロムの種類と酸化還元状態に関する *in vivo* の知見について解説する．MCR-ALSにより分離されたシトクロムのラマンスペクトルを先端部，基部，分岐部と比較すると，微細ながら有意な違いを見いだすことができる（図3a）．本研究の実験条件で共鳴ラマン効果による強度増大を受けるのはシトクロム *b* および *c* であり，どちらも酸化型あるいは還元型として存在する．*In vitro* での実験からこれら4種類のシトクロムのマーカーとなるラマンバンドはよく確立されている<sup>14,15</sup>．図3bに示すように，マーカーバンドの詳細な解析を行うことにより，シトクロム *c* に対する *b* の相対濃度は分岐部でもっとも高く，先端部でもっとも低いことが明らかとなった．また，酸化型シトクロム *b/c* のマーカーバンドは菌糸基部および分岐部のみでわずかに観測されたものの（図3aの矢印），先端部では見られなかった．この結果は，MCR-ALSラマンイメージングによりシトクロムの酸化還元状態をプローブすることで，菌糸成長の解明にミトコンドリアの活性およびエネルギー消費の観点から迫れる可能性を示唆しており，大変興味深い．

部位を問わず共通して見られるシトクロム，それ以外のタンパク質と核酸，多糖類の他に，分岐部においては脂肪滴から脂質および菌類のステロールとして重要なエルゴステロールを検出し，そのラマンスペクトルを得ることに成功している．筆者らの研究成果から，ラマンイ

メージングを用いることで標的を限定することなく取得可能な molecular fingerprints が，菌糸成長を分子レベルで理解するための新規な手がかりを与えてくれるものと期待される．

### ポリエン化合物をプローブとした 浴室バイオフィーム内の微生物分布の可視化

ラマン分光法はバイオフィームのような複合微生物の集合体の非破壊解析にも威力を発揮する<sup>16,17</sup>．本項では，筆者らが最近行ったピンクバイオフィームのMCR-ALSラマンイメージング（励起波長532 nm）について紹介したい．ピンクバイオフィームは浴室などの水回りに発生するピンク色をしたバイオフィームで，多くの人が（たとえどんなにキレイ好きであっても）一度は目にしたことがあるのではなからうか<sup>18</sup>．水道水のような貧栄養環境下でも増殖できる *Methylobacterium* 属細菌を含む複数種の微生物から構成される複合微生物系であり，いったん形成されると塩素系洗剤を用いても容易に除去できない厄介な代物であるばかりか，日和見病原体の潜在的なりザーバーであるとも考えられている<sup>19</sup>．そのため，ピンクバイオフィームのキャラクタリゼーションは衛生的な観点から意義が大きいですが，ほとんど行われていないのが現状である．とくに，複数の微生物種がピンクバイオフィームの内部でどのように分布しているのかに関する知見は乏しい<sup>20</sup>．

浴室の排水溝付近で採取したピンクバイオフィームのMCR-ALSラマンイメージング結果を図4に示す．ピンクバイオフィームから得られるラマンスペクトルの最大の特徴は，2つないし3つのラマンバンドのみが支配的な，きわめて単純なパターンを示すことである．このスペクトルパターンはカロテノイドを含むポリエン化合物に特有のものである<sup>17</sup>．前項で述べたシトクロムと同様，長鎖ポリエンは可視域に吸収を持ち，共鳴ラマン効果に

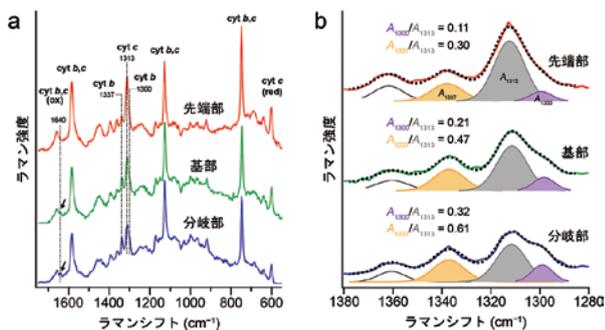


図3. MCR-ALSにより得られた糸状菌 *Aspergillus nidulans* 菌糸の先端部，基部，分岐部のラマンスペクトルの比較 (a) および1290–1370  $\text{cm}^{-1}$  付近のシトクロム *b*，*c* のマーカーバンドのフィッティング解析結果 (b)．cyt = シトクロム，red = 還元型，ox = 酸化型．

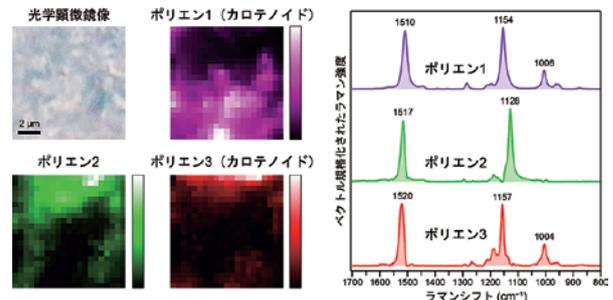


図4. ピンクバイオフィームのMCR-ALSラマンイメージング結果．3成分を仮定して解析を行った．(左) 光学顕微鏡像および3種類のポリエンのラマンイメージ．(右) 3成分のラマンスペクトル．

よる増大を受けているため、他の細胞内物質やバイオフィルムのマトリックスである細胞外多糖などに由来するラマンバンドは相対的に見えなくなっていることに注意されたい。筆者らはMCR-ALSを用いて、ピンクバイオフィルムを構成する微生物細胞中に主なポリエン化合物が3種類(図4中のポリエン1-3)存在することを突きとめた。スペクトルパターンからポリエン1, 3は明らかにカロテノイドに帰属されるが、ポリエン2は一般的なカロテノイドでは説明できない $1128\text{ cm}^{-1}$ のラマンバンドを示す。種々の検討の結果、この成分は、カロテノイドとは異なりポリエン部に置換基を持たない直鎖ポリエンであることがわかった(有力候補としてフレキシルビンが挙げられる)。

ピンクバイオフィルム中の微生物がカロテノイドを生産すること自体は驚くに当たらないが、注目すべきはポリエン1と2のラマンイメージがまったく重なりのない排他的なバイオフィルム内分布を示している点である(図4左の紫および緑のイメージを比較してみたい)。これはポリエン1, 2が異なる微生物によって生産されたものであることを強く示唆している。逆に言えば、図4のラマンイメージはピンクバイオフィルム中の異なる微生物の棲み分けの様子をポリエンのラマンスペクトルに基づいて描き出しているのではないかと推測できる。筆者らはこの作業仮説が正しいことを、ピンクバイオフィルムから単離した個々の微生物のラマンスペクトルを測定することによって実証した。ポリエン3についても、1, 2とは異なる微生物がつくるカロテノイドであることが確認された。

カロテノイドは多くの微生物が生産する天然色素で、多様な役割を担っている。ピンクバイオフィルムにとってとくに関係の深いカロテノイドの役割は抗酸化作用であろう。カロテノイドは長い $\pi$ 共役系を有するため、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素、一重項酸素などの活性酸素種を捕捉する機能を示す。したがって、栄養源の欠乏、乾燥、塩素を含んだ薬剤への曝露などストレスフルな環境に対処するために、ピンクバイオフィルム中の微生物がそれぞれにカロテノイドをはじめとするポリエン化合物を利用していることが考えられる。MCR-ALSラマンイメージングはポリエンが示す特徴的なラマンバンドに基づいて、集団における微生物の性質や振る舞いを、バイオフィルムを壊すことなく調べることが可能な方法として有望であることが示されたと言えよう。

## おわりに

本稿では多変量解析と組み合わせたラマン分光イメージングを糸状菌の菌糸と複合微生物系バイオフィルムに応用した成果について紹介してきた。ラマン分光法は多変量解析以外にもさまざまな技術との融合が可能である。たとえば、安定同位体( $^2\text{H}$ や $^{13}\text{C}$ )標識と併せ用いることにより、微生物細胞内の代謝ダイナミクスを可視化することも可能である<sup>21)</sup>。最近、筆者らはこの方法を駆使して、糸状菌と細菌の共生相互作用の分子レベル解明に取り組み、これらの微生物間での物質のやりとりを示す直接証拠を得つつある。今後、ラマン分光法に基づいた新技術が微生物学の革新に大きな貢献をなすことは疑いの余地がない。

## 謝 辞

本稿で紹介した研究は科学技術振興機構ERATO野村集団微生物制御プロジェクト(JPMJER1502)の支援のもとに行われたものである。共同研究者の関西学院大学大学院理工学研究科・安田充博士(現 慶應義塾大学医学部)、堀上裕登氏、佐々木舞氏、吉川友貴氏、筑波大学生命環境系・竹下典男准教授、豊福雅典准教授にこの場を借りて感謝の意を表したい。

## 文 献

- 1) Raman, C. V. and Krishnan, K. S.: *Nature*, **121**, 501 (1928).
- 2) Yasuda, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **91**, 12501 (2019).
- 3) Horiue, H. *et al.*: *Sci. Rep.*, **10**, 7704 (2020).
- 4) 加納英明: 分光研究, **68**, 51 (2019).
- 5) Huang, C.-K. *et al.*: *Chem. Commun.*, **47**, 9423 (2011).
- 6) Huang, C.-K. *et al.*: *Anal. Chem.*, **84**, 5661 (2012).
- 7) Noothalapati, H. and Shigeto, S.: *Anal. Chem.*, **86**, 7828 (2014).
- 8) Hsu, J.-F. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 17541 (2015).
- 9) Paatero, P. and Tapper, U.: *Environmetrics*, **5**, 111 (1994).
- 10) Lee, D. D. and Seung, H. S.: *Nature*, **401**, 788 (1999).
- 11) Takeshita, N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 5701 (2017).
- 12) Zhou, L. *et al.*: *Sci. Adv.*, **4**, e1701798 (2018).
- 13) 濱口宏夫, 岩田耕一 編著: ラマン分光法, p. 17, 講談社 (2015).
- 14) Brazhe, N. A. *et al.*: *PLoS One*, **7**, e41990 (2012).
- 15) Kakita, M. *et al.*: *J. Biophotonics*, **5**, 20 (2012).
- 16) Noothalapati Venkata, H. N. *et al.*: *J. Raman Spectrosc.*, **42**, 1913 (2011).
- 17) Zheng, Y.-T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **85**, 7295 (2013).
- 18) 井原 望: 生物工学, **94**, 207 (2016).
- 19) Kovaleva, J. *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 1317 (2014).
- 20) Xu, F.-F. *et al.*: *Microbes Environ.*, **29**, 388 (2014).
- 21) Noothalapati Venkata, H. N. and Shigeto, S.: *Chem. Biol.*, **19**, 1373 (2012).