

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14327

研究課題名（和文）表面増強ラマン散乱の生体内分子への適用法の開発とそれを用いた微生物代謝機能解明

研究課題名（英文）Application of SERS for understanding microbial metabolism at single-cell resolution

研究代表者

久保田 健吾（Kubota, Kengo）

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80455807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では微生物代謝解明のためにラマン散乱光を利用する方法に着目し、重水素を用いた培養によるC-D結合に基づいた代謝解明とそのピークを表面増強ラマン散乱（SERS: Surface Enhanced Raman Scattering）により高感度化する技術開発について検討した。その結果、過剰な金ナノ粒子の洗浄後、エンハンサーを加えて金増感反応を行ったところ、SERS効果によるC-D結合由来のラマンスペクトルが増強された。一方で、金ナノ粒子の発光による大腸菌細胞由来のラマンスペクトルの消失も見られたため、実験プロトコルのさらなる最適化が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の大部分の機能や代謝は未解明であり、特に原位置かつ細胞レベルでの振る舞いは分かっていない。本研究では、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析などによる遺伝子レベルでの解析では理解できない実際の環境におけるシングルセルレベルでの微生物の代謝を解明するための新規技術の開発に取り組んだものである。技術的課題は残るものの、今後の環境微生物生態解析において次の展開につながる新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focus on a method using Raman scattering for elucidation of microbial metabolism. After cultivation with deuterium containing media, microbial metabolism was measured based on the appearance of C-D bond peak. In addition, surface enhanced Raman scattering (SERS) was applied to enhance the sensitivity. After washing the excess gold nanoparticles, an enhancer was added to perform gold enhancement reaction. The Raman spectrum derived from the C-D bond was enhanced. On the other hand, since the disappearance of the Raman spectrum from E. coli cells due to the light emission from gold nanoparticles was also observed, further optimization of the experimental protocol is necessary.

研究分野：環境工学

キーワード：微生物代謝解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理技術では排水中の有機物や窒素分、有害物質を複合微生物群集を用いて分解・除去している。これら微生物群集の構造解析は盛んに行われているが、そこに存在する微生物の機能解明はなかなか進まない。微生物機能を細胞レベルで解明する方法として、遺伝子レベルでのアプローチ（機能遺伝子や mRNA を標的とした FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法）と代謝レベルでのアプローチ（MAR (microautoradiography)-FISH 法、NanoSIMS を用いる Gold-ISH 法、Raman-FISH 法など）が開発されているが、微生物の機能と系統を結びつける汎用性のある技術は未だ存在しないと言っても過言ではない。微生物の機能と系統を結びつける上で、代謝レベルでのアプローチは、より直接的に微生物反応を可視化できるため極めて有用であるが、MAR-FISH 法は放射性同位体を用いるためその取り扱いが煩雑になることや、窒素反応を直接的に追えないという問題がある。また NanoSIMS を用いる Gold-ISH 法などは、NanoSIMS へのアクセシビリティやランニングコストの観点から言えば、普及・汎用性には欠ける。これらに対し、安定同位体標識された分子のラマンシフトが変化することを利用して、微生物の基質利用（すなわち微生物代謝）を明らかにする Raman-FISH 法は、安定同位体を用い、かつ比較的安価な装置・ランニングコストであるラマン顕微鏡を用いる。しかしこの方法には、1. 極めて微弱なラマン散乱光を捉えるために、レーザー強度をあげることで細胞がダメージを受け、細胞内分子組成を明らかに出来るラマンスペクトルのメリットを享受できなくなる、2. 微生物を同定するために用いる蛍光遺伝子プローブの蛍光によりラマン散乱光の取得が困難になる、3. 微生物同定のためには、まず蛍光顕微鏡で微生物を観察し、それと全く同視野をラマン顕微鏡で観察する必要がある、といった問題がある。

2. 研究の目的

本研究ではラマン散乱光を利用する方法に着目し、既報の Raman-FISH 法が抱える問題を解決するために「表面増強ラマン散乱 (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering)」に着目した。表面増強ラマン散乱は、数十 nm サイズの金属粒子表面に吸着した分子のラマン散乱強度が何桁も増強する現象である。これにより微弱なラマン散乱光をより弱いレーザー強度で短時間に取得可能になり、細胞にダメージを与えることなく生体内分子組成を明らかにすることが出来る。これにより安定同位体標識基質を代謝した微生物を容易に追跡することが出来るようになる。そこで本研究では、細胞の分子を表面増強ラマン散乱光により観察する方法を開発し、微生物の代謝機能と系統を結びつけることが出来る新規微生物代謝機能解明法を開発する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 重水含有基質を用いた大腸菌の培養

まず大腸菌のピュアカルチャーを用いて大腸菌への重水への取り込みと、それによって発生するラマン散乱光の検出の確認を行った。培地には液体 LB 培地を使用し、前培養、本培養の二段階に分けて培養を行った。本培養では、重水の濃度を段階的に設定した液体 LB 培地 6mL をガラスチューブに加え、オートクレーブで滅菌したものを培地とした。37°C で振盪培養し、OD₆₀₀ が 0.3、0.6、1.0 の時に培養液 1 mL をサンプリングし、パラホルムアルデヒドで固定した。

(2) 重水含有培地による嫌気性汚泥の培養

嫌気性汚泥に重水濃度が 0%、12.5%、25%、50% になるように加え、培養を行った。定期的にガス生成量および組成分析を行い、サンプルの固定およびラマンスペクトルの計測を行なった。

(3) ラマンスペクトルの測定

脱塩処理を済ませたサンプルについて、ラマンスペクトルの観察を行った。励起波長 532 nm、対物レンズ 100 倍、露光時間 20 秒、積算 2 回、スリット幅 25×1000 μL、レーザー強度 25%、アパーチャー φ 4000μm を基本として観察を開始し、それぞれの項目について実験ごとに最適化を行った。

(4) 金ナノ粒子を用いた表面増強ラマン散乱

SERS 効果を発生させるために、基盤上で風乾させたサンプルの上から、金ナノ粒子を懸濁した溶液をマウントし、風乾させた。サンプルを風乾させた範囲の面積を算出し、金ナノ粒子を重ねることなく平面にならべた場合の投影面積からその面積被覆率を計算し、供試量を決定した。

4. 研究成果

(1) 重水含有基質中で培養した大腸菌のラマンスペクトル測定と測定条件の最適化

重水濃度 0%、33% のサンプルからは C-D 結合由来のラマンスペクトルが検出されなかった。

これは、大腸菌が重水ではなく軽水を優先して代謝し、菌体内への重水の取り込み、蓄積が良好に起きていない為であると思われる。また、金基盤を用いたことによりバックグラウンドで発光が起こってしまい、比較的小さな C-D 結合由来のラマンスペクトルのピークが消失してしまったことが考えられた。重水濃度 50% で培養したサンプルからは微弱であるが C-D 結合由来のラマンスペクトルが検出された。ただ、ピークが小さいことと、計測回数に対する検出数が少ないことから、より安定した検出が行えるよう、重水濃度 100% の条件で培養を行った。その結果、比較的安定して C-D 結合由来のピークを検出することができた。目的ピークは培養開始から 12 時間および 23 時間経過した時点でサンプリングを行ったいずれからも観察され、培養時間を長くとも検出可能であると考えられた。

(2) 重水含有基質中で培養した嫌気性汚泥サンプルのラマンスペクトル測定

重水を含む基質中で 6 日間培養を行った下水汚泥消化嫌気性汚泥サンプルについてラマンスペクトルの計測を行ったが、微生物細胞から C-D 結合由来のラマンスペクトルを得ることはできなかった。2,800~3,100 cm^{-1} の領域にピークが生じていることから微生物細胞のラマンスペクトルを計測できているものの、そのピークも小さく、重水が微生物細胞内に取り込まれていたとしても C-D 結合由来のピークを検出することは難しいと考えられた。また、微生物細胞の計測を行えない場合も多く、サンプリングを行う際にろ過などにより夾雑物を取り除く操作が必要であることが示された。この結果を受け、高温メタン発酵リアクターより汚泥を引き抜き、より代謝活性が強い消化汚泥を用いることで、微生物への重水の取り込みが行われやすい条件を想定した培養を行った。汚泥中の夾雑物が少なかったからか、重水の濃度に関わらず 2,800~3,100 cm^{-1} の領域のピークは良好に検出された。しかしながら、C-D 結合由来のラマンスペクトルは検出されなかった。そこで、SERS 効果を生じさせ、C-D 結合由来のラマンスペクトルの高感度検出を試みた。

(3) SERS 効果の発生

金ナノ粒子を 5.4×10^{13} 個マウントしたサンプルのラマンスペクトルは主に 3 種類のものが得られた。最も多く得られた波形では、2,800~3,100 cm^{-1} の領域のピークが確認されないこと、1,500~1,700 cm^{-1} の領域のピークが卓越していること、他の波形と比べて蛍光強度が非常に高いなどといった特徴があった。この波形が得られた原因として、金ナノ粒子の付加量が多すぎた為に金ナノ粒子の発光が起こってしまったことが考えられる。ただ 1,500~1,700 cm^{-1} の領域のピークは微生物細胞のラマンスペクトルを測定した際にも得られるピークであり、SERS 効果により増強された結果を示しているということも考えられる。微生物の代謝された重水はその量に応じて脂質や蛋白質に蓄積されるが、この領域、特に 1,600 cm^{-1} のあたりにラマンスペクトルのピークを持つ物質の一つに $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ の分子式で表されるエタノールアミンが存在する。この分子は細胞膜の大部分を占める脂質二重層の構成成分のうち二番目に多く存在する分子である。微生物細胞の表層に存在するため、マウントされた金ナノ粒子による SERS 効果を受けやすいと考えられる。二番目に多く得られた波形の特徴としては、1,080 cm^{-1} 、1,600 cm^{-1} 付近で比較的高いラマンスペクトルのピークが検出され、2,800~3,100 cm^{-1} の領域のピークも検出された。こちらは金ナノ量子の量が適度であり、SERS 効果の発生と微生物細胞由来のラマンスペクトルの計測を行うことができた結果であると考えられる。1,600 cm^{-1} 付近のピークに関してはエタノールアミン由来である可能性、1,080 cm^{-1} 付近のピークは同じく細胞膜二重層を形成している脂肪酸であるパルミチン酸、リノール酸、オレイン酸などからも検出されることが分かっている。SERS 効果の発生条件をより明確にするため、細胞の内部に金ナノ粒子が侵入しているのかどうか、一細胞につきどれほどの金ナノ粒子が付加されているかなどを確認するため、TEM 観察を並行して行った。

(4) 金増感を用いた SERS 効果発生効率化と TEM 観察における金ナノ粒子の可視化

観察を行ったサンプルから C-D 由来のラマンスペクトルのピークが、SERS 効果により一部増強されていることが確認されたものの、多くは細胞由来であるとは言えない波形を示した。これは金増感が強くかかりすぎたことによる影響であり、金ナノ粒子のマウント量が過剰であった時と同様、増感された金ナノ粒子による発光が起こることで大腸菌の細胞由来のラマンスペクトルが消失してしまったと考えられた。TEM 観察の結果、大腸菌の細胞以上にグリッドに対して金ナノ粒子が定着している状態であることがわかった。また広い粒径分布のもとで金ナノ粒子が増感されていることがわかった。しかし基盤上では大腸菌細胞に選択的に吸着した金ナノ粒子に対して強く増感が掛かってしまっていることから、金ナノ粒子を基盤またはグリッド上でマウントせずに大腸菌細胞内部、またはその表層に固定し、過剰な金ナノ粒子の除去を行ったのちに増感をかけられるようなプロトコルへの修正が求められた。

そこで過剰な金ナノ粒子の洗浄後、ペレットとしたものにエンハンサーを加えて 10 分間増強を行ったところ、SERS 効果による C-D 結合由来のラマンスペクトルが増強されていた。プロトコル修正前と比較し、金ナノ粒子の発光による大腸菌細胞由来のラマンスペクトルの消失は、全体の計測数の割合から考えると 3~4 割程度となり、過剰な増感の抑制がラマンスペクトル計測においては効果的であることがわかった。しかし、金ナノ粒子の発光を完全には抑制することはできなかった。また同じサンプル中の細胞であっても、金ナノ粒子の吸着量に大きな差が

生じていることが分かった。同じ環境下で反応を行った場合であっても、細胞一つ当りの金ナノ粒子吸着量は大きく異なっていた。

そこで金ナノ粒子と大腸菌細胞のボルテックス時間について検討を行なった。ボルテックス時間は2分、4分、6分とした。細胞ごとの金ナノ粒子吸着量に差があるものの、大腸菌細胞内に金ナノ粒子が侵入している様子がTEM観察により確認された。これらの結果より、ボルテックス時間2分の条件であっても、金ナノ粒子の大腸菌細胞への吸着は可能であることがわかった。次に金増感の時間について検討を行なった。エンハンサー濃度を50%にした場合、5分の増感時間では金ナノ粒子の増感があまり進んでいなかった。しかしながらある程度の粒度分布はあるものの、同程度の粒子径で増感が進んでいることが明らかになった。したがって、この条件のもと増感時間をさらに伸ばすことで、金ナノ粒子径に均一性をもたせた状態で増感が行える可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

- ① 羽鳥伸吾, 久保田健吾, 李玉友, 諸野祐樹. 嫌気性消化槽内で代謝活性を有する微生物の視覚的同定と検出の試み. 第51回日本水環境学会. 2017年.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：羽鳥 伸吾

ローマ字氏名：(HATORI, Shingo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。