

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630436

研究課題名(和文)生理活性物質のin vivoハイスループットスクリーニングシステムの構築

研究課題名(英文)Construction of in vivo high-throughput screening system for bioactive metabolites

研究代表者

竹山 春子 (Takeyama, Haruko)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60262234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境中の微生物から生理活性物質生産能を直接スクリーニングする新手法の開発を目的とした。顕微ラマン分光法を用いて、生理活性物質生産を非侵襲的に検出することを目指し、はじめに様々な生体分子のラマンスペクトルライブラリーの構築を行った。本結果をもとに、放線菌培養株や環境微生物からの生理活性物質のin situ検出を試みた。共鳴ラマン効果や多変量解析を用いることで、複雑なラマンスペクトルから各種抗生物質に由来するラマンバンドを検知することが可能となった。また、ハイスループットスクリーニングに向けて、マイクロ流体デバイスを基礎とした単一微生物の単離・培養とラマン分光測定への応用を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to develop a novel technique for screening of bioactive compound producers from environmental bacteria without bacterial cultivation or extraction and purification of the compounds. In order to detect bioactive compounds non-invasively, we firstly tried to obtain Raman spectral library of biomolecules. Based on this data library, we have succeeded in in situ detection of the Raman bands derived to antibiotics with the aid of resonance Raman effect and multivariate analysis technique. In addition, to achieve the high-throughput screening of bioactive compounds from environmental bacteria, we have developed the microfluidic bacterial culture and Raman spectral measurement systems and evaluated the performance of them.

研究分野：プロセス工学、生体機能・バイオプロセス

キーワード：ラマン分光 生理活性物質 非侵襲 マイクロ流体デバイス スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

天然生理活性物質の生合成資源として多様な微生物が探索され、現在までに 20000 種以上の生理活性物質が発見されている(Bérdy, 2005)。特に土壤に生息する放線菌は、1944 年に *Streptomyces griseus* の生産するストレプトマイシンが発見されて以来スクリーニングの格好の対象とされており、既知の天然抗生物質 9000 種のうち、約 60% が放線菌に由来する。

従来の生理活性物質探索では、特定菌群を環境から単離培養することが初期操作となる。抗生物質を対象とした場合、単離菌体から培養濾液を抽出し抗菌活性を試験する。抗菌活性が認められた際は、精製した化学物質を MS、NMR 等を用いて分子構造を同定する。しかし、自然界に存在する微生物のうち 99% は単離培養が困難な難培養性微生物であるため、培養に依存する同定法ではスクリーニングの候補菌体が非常に限られている。そのため、新しい抗生物質が発見されにくくなっており、抗生物質獲得数は 90 年台後半から減少傾向にある(Demain, 2009)。近年、遺伝子の改変を伴う育種技術を用いることで、放線菌の潜在的な二次代謝産物産生機能を活性化し、これまでにない抗生物質を創出する試みも取り組まれている。しかし、二次代謝産物の産生は、培養環境や形態分化状態によって大きく変動するため、最終的には多種多様な育種条件を試行し、網羅的なスクリーニングを実施することが必要となる。このように、生理活性物質生産菌の獲得には非常に煩雑な工程を要し、スクリーニングのハイスループット化は重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、微生物の培養や抽出操作を行わずに、生理活性物質生産能を直接評価する新しいスクリーニング法を開発することを目的とした。これをなし得る技術としてラマン分光法を用いた。物質に光を照射すると物質中の分子との相互作用によって振動数が変化したラマン散乱光が発生する。これは物質の分子構造に固有の値をとるため、非破壊、非標識で物質の同定を行うことができる。そのため、代謝物を産生している菌体をシングルセルレベルで同定できる。さらに、スクリーニングのハイスループット化・高精度化を達成する基盤技術としてマイクロ流体デバイスを利用した。これらの技術を用いることにより、環境中の多様な微生物の生理活性物質生産を非侵襲的にシングルセルレベルで検出する手法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラマンスペクトル測定

ラマンスペクトル取得には、Nd:YVO4 レーザー(532 nm)、He-Ne レーザー(632.8 nm)を光源とし、ツェルニ・ターナー型分光器、CCD を検出器として配したピエゾ電動ステージ

付倒立顕微鏡を用いた。

(2) 試料調製

ラマンスペクトルライブラリー構築のため、アミノ酸 20 種、核酸 16 種、脂質・脂肪酸 32 種、糖類 31 種、抗生物質 10 種、タンパク質 2 種を含める合計 121 種の生体物質について、各標準物質の固体状態及び溶液状態のラマンスペクトルを測定した。

Oligomycin 生産菌体である *Streptomyces avermitilis* 及び natamycin 生産菌体である *Streptomyces natalensis* はそれぞれの抗生物質生産培地で培養を行った後、菌糸体を回収し、一部をラマンスペクトル取得に用い、残りをバイオアッセイに用いた。菌糸体のラマンマッピング測定を行い、*S. avermitilis* については oligomycin のバンド強度を元に経時変化観察を行った。*S. natalensis* については多変量解析を用いて抗生物質の生産分布を調べた。

海綿共生微生物は海綿から抽出後菌体のラマンスペクトル取得、ラマンマッピングを行った。

(3) ラマンスペクトルの解析

S. natalensis から得られたスペクトルデータについて非負値行列因子分解法を用いた多変量スペクトル分解 (Multivariate curve resolution, MCR) を使用し、生理活性物質の検出を試みた。MCR とは、測定スペクトル行列 A を成分スペクトル行列 W と強度行列 H に分解する手法であり、解の最適化の手法として、ALS (Alternate Least Squares) を用いた。

(4) マイクロドロップレット作製

内部にクロスジャンクション構造を配したマイクロ流体デバイスを設計し、熱硬化性樹脂 poly(dimethylsiloxane) (PDMS) を用いてマイクロ流体デバイスを作製した。次に、マイクロシリンジを介してサンプル溶液をデバイス内に導入し、界面活性剤を含んだオイルを用いて溶液をせん断することによりドロップレットを連続形成した。サンプルとして、*Streptomyces nodosus* の胞子の混合溶液及び海綿共生微生物の菌体溶液を用いた。

4. 研究成果

(1) 生体分子のラマンスペクトルライブラリーの構築

一般的に、複数の物質の混合試料のラマンスペクトルは、試料内の全ての物質のラマンスペクトルの足し合わせで表現される。そのため、組成が複雑な生体試料では、測定されるラマンスペクトルが複雑な形になることが多い。複雑な形をしたラマンスペクトルから各物質の正確な化学情報を得るためには、基準となるラマンスペクトルが必要となる。そこで代表的な生体物質のスペクトルを測定し、スペクトルライブラリーの構築を行った。

励起波長に応じて共鳴ラマン効果等が生じ、ラマンスペクトルが変化する可能性があるため、複数の励起波長条件でスペクトルデータを計測した。今回は波長 532 nm、632.8 nm の 2 種類の励起波長を用いた。また、広波長域でのラマンスペクトル解析を行うため、指紋領域(800–1800 cm^{-1})から、CH 伸縮振動、OH 伸縮振動に由来する生体成分に特徴的なラマンバンドをカバーする領域 (-4000 cm^{-1}) におけるスペクトルを測定した。さらに、物質状態に伴う分子構造変化の影響を考慮するため、固体、液体の 2 種類を測定した。研究期間中に、総計 121 種の生体分子についてラマンスペクトルを計測した。本スペクトルデータ群を整理し、多変量解析時のスペクトル解析のリファレンスとして、その後の解析に用いた。また、取得データを整理しデータベースとして公開することを検討している。

(2)放線菌の生理活性物質生産の *in situ* 検出

S. avermitilis を oligomycin 生産培地で 1–5 日間培養し、菌糸体を回収してラマンマッピングを行った。Oligomycin からは、ポリエング構造に由来する 1660 cm^{-1} のラマンバンドが強く得られる。本ラマンバンドを元にし、スペクトル計測とラマンイメージングを行った結果、菌糸体中で oligomycin の生産が経時的に増加していることが確認でき、さらに、菌糸体中の oligomycin の分布の拡大を明らかにすることができた(Fig. 1)。

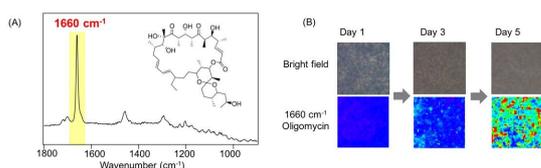


Fig.1 oligomycin 生産の経時的観察 (A)oligomycin のラマンスペクトル (B)*S. avermitilis* 培養 1–5 日目における oligomycin (1660 cm^{-1}) のラマンイメージング

次に、*S. natalensis* 内での natamycin の *in situ* 検出を検討した。*S. natalensis* を natamycin 生産誘導培地で培養後、菌糸体の末端部分のラマンマッピング測定を行い、得られたマッピングデータについて多変量解析を行った。タンパク質、脂質等試料中の大部分を占める分子のスペクトルを分離することで、natamycin に由来するラマンスペクトルを検知することが出来た(Fig.2)。このように、多変量解析を用いることで、複雑なスペクトルの中からわずかに存在する目的の化合物に由来するスペクトルを抽出することが可能であることが示された。

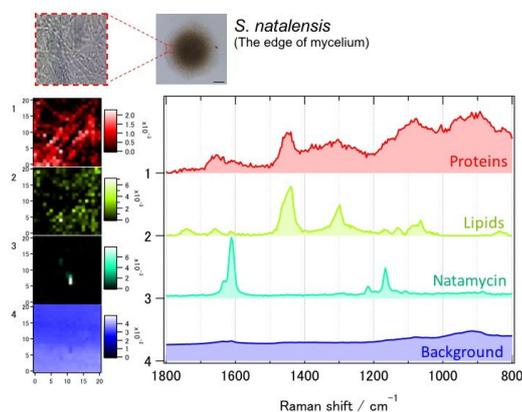


Fig.2 *S. natalensis* における MCR 解析

(3)環境微生物の生理活性物質生産の *in situ* 検出

海洋性海綿 *Theonella swinhoei* に共生する微生物を対象に生理活性物質生産の検出を試みた。海洋中に生息する海綿動物には多様な微生物が共生しており、医薬品として重要な天然物を多数生産することが知られている (Hentschel et al. 2002; Okamura et al. 2010)。しかし、それらの微生物は難培養性であることが多く、単離培養により微生物種を特定することができない。そこで、本手法を用いて生理活性物質生産菌体の *in situ* 検出を試みた。

海洋性海綿 *Theonella swinhoei* からは多数の生理活性物質が抽出されており、それらは細胞が数珠状に連なるフィラメント状のバクテリアから生産されることが知られている (Wilson et al. 2014)。そこで、それらの菌体のラマンイメージングを取得したところ、脂質やタンパク質といった生体成分は全ての菌体で検出された一方、特定の菌体でのみ生理活性物質である onnamide A の分布が確認された。さらに、*T. swinhoei* から抽出される生理活性物質の一つである aurantoside A についても一部の菌体で aurantoside A 由来のラマンバンドが検出された。これらの結果から、ラマン分光法により生理活性物質生産菌体を迅速に推定できることが示された。

(4)マイクロドロップレット内における菌体の培養及びラマンスペクトル測定

ドロップレット内に *S. nodosus* の胞子を封入し培養した結果、40 時間後には菌糸体を形成することが観察された(Fig.3)。また、ドロップレット内で菌体を培養することによって、一つ一つのドロップレットが互いに独立した環境を保つことから、各菌体の抗生物質生産をモニタリングできることが示唆された。

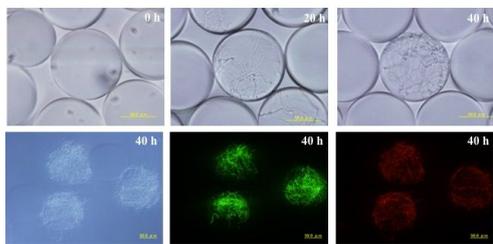


Fig.3 マイクロドロプレット内における *S. nodosus* の経時的観察(下中央: SYTO9、下右: PI)

さらに、ドロプレット内に封入した海綿共生微生物からラマンスペクトルを計測した結果、カロテノイド等の化合物生産を検出することに成功した(Fig.4)。この顕微ラマン分光法とマイクロ流体デバイスの統合を基礎技術として発展させることで、微生物の生理活性物質生産能の *in situ* 検出に基づくハイスループットスクリーニング系が構築できると考えられる。

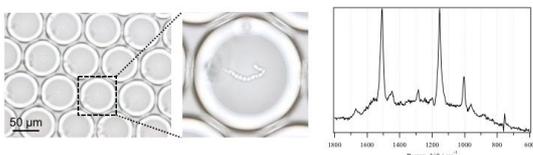


Fig.4 マイクロドロプレット内に封入された海綿共生微生物及び得られたラマンスペクトル

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Miyaoka R, Hosokawa M, Ando M, Mori T, Hamaguchi H and Takeyama H, In Situ Detection of Antibiotic Amphotericin B Produced in *Streptomyces nodosus* Using Raman Microspectroscopy, *Marine drugs*, 査読あり, 12, 2014, 2827-2839
DOI: 10.3390/md12052827

[学会発表](計6件)

竹山春子、環境遺伝子資源の利活用のための技術開発、システムナノ技術研究会第2回研究会「バイオ・ケミカルが必要とするシステムナノ技術」、2015年6月19日、機械振興会館・港区・東京

竹山春子、シングルセルを解析するための様々な試み、日本生物工学会「未来へのバイオ技術」勉強会「マイクロエンジニアリング」、2015年5月11日、バイオインダストリー協会・中央区・東京

竹山春子、海洋環境からの有用資源のスクリーニングとそれをサポートする技術開発、2015年4月24日、酵素工学研究会第73回講演会、大阪府立大学・堺市・大阪府

宮岡理美、安藤正浩、細川正人、モリテツシ、濱口宏夫、竹山春子、顕微ラマン分光法を用いた抗生物質生産菌体における二次代謝産物の *in situ* 検出、第3回日

本生物工学会東日本支部コロキウム、2015年3月3日、東京工業大学・横浜市・神奈川県

R Miyaoka R, Hosokawa M, Ando M, Mori T, Hamaguchi H, Takeyama H, In situ Raman imaging of secondary metabolites in antibiotic-producing bacteria, International Union of Microbiological Societies 2014, 2014年7月31日、モントリオール国際会議場・モントリオール・カナダ

Miyaoka R, Hosokawa M, Ando M, Mori T, Hamaguchi H, Takeyama H, In situ detection of secondary metabolites in antibiotic-producing bacteria, The Second Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 2014年6月23日、国立東華大学・花蓮県・台湾

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹山 晴子 (TAKEYAMA, Haruko)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 60262234