

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：34504

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05681

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Post-Koch Ecological Physical Chemistry Based on Molecular Spectroscopic Profiling

研究代表者

重藤 真介（Shigeto, Shinsuke）

関西学院大学・理学部・教授

研究者番号：10756696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 72,100,000円

研究成果の概要（和文）：未分離・未解明な微生物の種と機能を非破壊的に解析可能なポストコッホ型微生物解析装置を開発するため、ラマン分光を核とした分子分光手法と機械学習、マイクロ培養デバイスの融合技術を構築した。1細胞ラマンデータの機械学習により、細菌とアーキアの種およびドメインの高精度識別を達成した。土壌微生物をデバイスを用いて培養し、各ウェルで増殖した細胞のラマンスペクトルを測定しピックアップするプロトコルを実証・確立した。また、メタン生成アーキアや希少放線菌などの微生物が示す特徴的なラマンスペクトルを初めて観測することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したラマンスペクトルの機械学習によるバクテリアとアーキアの非破壊識別法を用いれば、生分解性プラスチックやカロテノイドなどの有用物質を多く生産するバクテリアやこれまでまったく未知であったアーキアを環境中で高精度に発見することが可能になると期待される。本研究の成果は生態系の理解の深化やバイオものづくりの革新を導く高い学術的・社会的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：To develop a "post-Koch" technique that allows for nondestructive analysis of the species and functions of unknown microbes, we combined Raman-based molecular spectroscopic techniques with machine learning and gel-filled microarray devices. Using machine learning of single-cell Raman data, we achieved highly accurate species- and domain-level classification of bacteria and archaea. We demonstrated and established protocols in which soil microbes are cultured on newly developed gel-filled microarray devices, subjected to Raman measurements, and picked up for further analysis. We also measured, for the first time to our knowledge, characteristic Raman spectra of methanogenic archaea and rare actinomycetes.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン分光 機械学習 シングルセル解析 微生物識別 アーキア 希少放線菌

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

地球の生態系は、多様な生物が地球環境(土壌、海洋、大気)と複雑に相互作用することでバランスを保ちながら成り立っている一つのシステム「超地球生命体」と理解される。この超地球生命体を理解・制御することができれば、エネルギー・環境・健康・食料など我々が抱える地球規模の喫緊課題の一举解決ならびに持続可能な社会の実現に向けた大きな一歩となる。この超地球生命体の最も重要な構成要素は、数100万~1000万種にも及ぶ微生物である。しかし、その99%以上は未分離・未解明のまま残されており(微生物ダークマター[1])、その生理的機能に関する情報も極めて乏しい状況にある。この現状を打破するためには、従来の微生物学に理工学ならびに情報学分野の新手法を導入することで、未解明の微生物の種と生理機能があるがままの状態を解析する新たな生態学「ポストコッホ機能生態学」を創成する必要がある。

細胞をあるがままの状態を観察し、その生理的機能を分子レベルで解析することが可能な顕微ラマン分光法は、微生物学を含む生命科学研究の新たなツールとして注目されている。しかし、顕微ラマン分光法を用いたこれまでの微生物研究は培養方法がすでに確立された単一種を主な対象としたものであった。環境試料のように様々な未知微生物からなる複合微生物系の同定および生理的機能の解析を可能にするために、これまでに開発された基本技術を網羅的な高速測定・解析技術へと進化させることが望まれていた。

2. 研究の目的

上記の研究背景のもと、本研究では、環境中の多様な未分離・未解明微生物の種をあるがままの状態と同定し、その生理的機能の解析を行うことができる画期的な「ポストコッホ型」微生物解析プラットフォームの構築とその応用を目的とした。ラマン分光を中心とした先端的顕微分光測定で得られる生物試料のスペクトルデータを超高次元化し(分子分光ビッグデータ)、それを情報学的手法を用いて解析することによって、環境中の複合微生物の網羅的プロファイリングを可能な技術(図1)の開発を目指した。

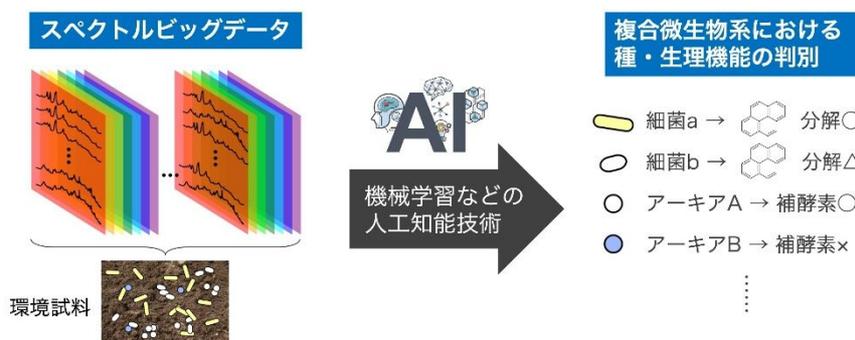


図1: 本研究で開発に取り組んだポストコッホ微生物解析技術の概要

この新しいポストコッホ技術を、アーキアに特有の化合物と代謝多様性、極限環境に生息する微生物の生理的機能、環境微生物の汚染物質分解能獲得の分子機構の解明などに応用した。未分離・未解明の微生物の属種とその代謝をそれらが示す分光学的性質に基づいて詳細に解析する「生態物理化学」とも呼ぶべき新分野の確立に挑戦し、未知微生物の発見、生物多様性の起源解明、生態学の革新などの学術的貢献だけでなく、創薬・環境浄化・再生可能エネルギー開発など社会と密接に関連した課題の解決にも資することを目標とした。

3. 研究の方法

コッホ型の微生物学技術では分離・培養・解析が困難な微生物の属種を判別し、さらにその生理的機能を明らかにする画期的な分光解析システムを開発し、その新システムを筑波大学のモデル圃場の土壌試料およびその他の微生物試料(アーキア、希少放線菌、環境汚染物質分解菌、光合成細菌など)に応用する。

(1) 多様な未分離・未解明微生物の種と生理機能(代謝)の識別を可能とするため、1細胞ラマンスペクトルに基づいた微生物識別モデルを作成した。レーザートラッピングにより捕捉した細胞のラマンスペクトルを取得し、培地の寄与の除去、ベースライン補正、ベクトル規格化など最小

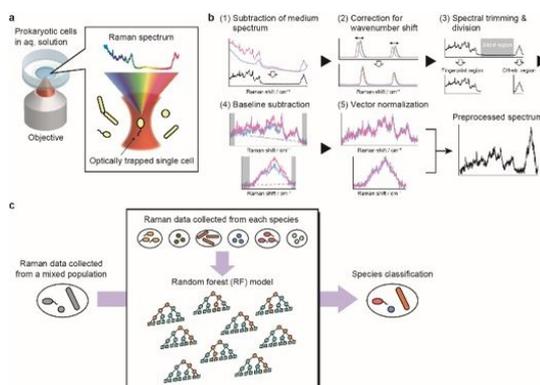


図2: 1細胞ラマンスペクトルの機械学習による微生物識別のワークフロー

限のスペクトル処理を施した後、アンサンブル学習アルゴリズムの一種である random forest を用いて識別モデルを構築し、その性能を評価した[2] (図2)。

(2) 1細胞ラマンスペクトルデータのビッグデータ化を図り、微生物識別の精度を向上させる目的で、ナノ秒波長可変レーザーを励起光源とした多波長励起顕微ラマン分光装置を開発し、カロテノイドの共鳴ラマンバンドを鍵とした光合成細菌の識別に応用した。

(3) 研究代表者らが構築したマルチブレイクスクヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) 顕微鏡[3]を拡張し、第二高調波発生 (SHG) 和周波発生 (SFG) 3次和周波発生 (TSFG) などの非線形光学信号を同時に計測できるマルチモーダル非線形分光顕微鏡 (図3) を新たに導入することによって、希少放線菌が形成する孢子囊の構成成分の可視化を行った。

(4) 開発した微生物解析システムを、光ピンセットやゲル充填マイクロウェルアレイデバイス[4] (A01-1班)と融合させることによって、まったく新しい「ポストコッホ微生物分離装置」を構築し、筑波大学のモデル圃場の土壌試料の解析に応用した。

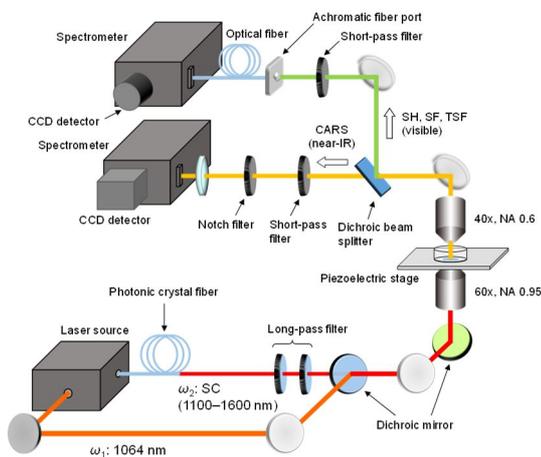


図3: 本研究で構築したマルチモーダル (CARS/SHG/SFG/TSFG) 非線形分光顕微鏡の概略

4. 研究成果

以下では、とくに重要な成果で、かつ学術論文として公表済みもしくは投稿済みのものを中心に記述する。

(1) ラマンスペクトルの機械学習によるバクテリアとアーキアの種およびドメイン識別

系統的に多様な微生物6種(バクテリア *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Thermus thermophilus* およびアーキア *Thermococcus kodakarensis*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Nitrososphaera viennensis*) の1細胞ラマンスペクトル(40スペクトル/種; 図4a)を学習データとして用いて random forest 識別モデルを作成した。その結果、6種での検証時正解率は $98.8 \pm 1.9\%$ (図4b)、6種のうち3種の微生物 *B. subtilis*, *T. thermophilus*, *N. viennensis* を人工的に混合した系における識別の正解率は98.4%であった。各特徴量の重要度のプロット(図4a)から、タンパク質 (~1000, 1650 cm^{-1})、DNA/RNA (~780 cm^{-1})、膜脂質 (~2850 cm^{-1}) 由来のラマンバンドが識別に重要であることが明らかとなった[5]。さらに、勾配ブースティングにより分類精度を高めた手法である LightGBM を用いて、バクテリア12種とアーキア13種を用いてドメインの識別を試みたところ、平均正解率84.4%での識別を達成することができた。したがって、環境中のアーキアを培養や破壊分析を介さずに識別し新種発見へとつなげることが可能な画期的な手法を実証したと言える。

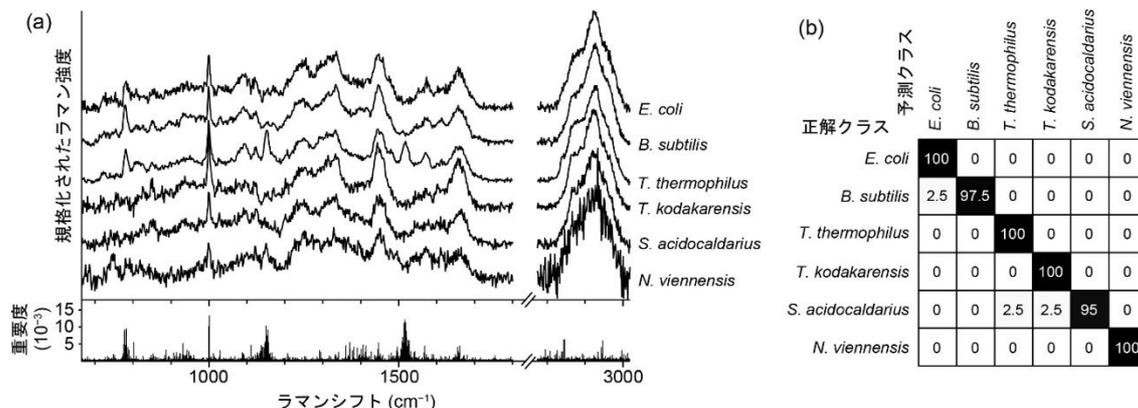


図4: Random forest アルゴリズムを用いた1細胞ラマンスペクトルデータによる6種の微生物の識別結果。(a)各微生物の平均ラマンスペクトルおよび各特徴量の重要度。(b)混同行列。

次に、random forest による微生物種の識別に生理状態の違いが及ぼす影響を調べた。6種の細菌 *E. coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas putida*, *B. subtilis*, *Lactobacillus plantarum* に対して、誘導期、対数期中期、対数期後期、定常期初期、定常期後期の5つの状態に対応する培養時間において測定した1細胞ラマンスペクトルを用いて random forest 識別モデルを作成し、細菌種の識別を行った。6種の平均正解率は、1つの生理状態のデータのみを学習した場合には50-60%にとどまったのに対して、対数期中期と定常期後期という顕著に異なる2つの生理状態のデータを学習した場合には83.3%に大きく上昇した。後者の識別に大き

く寄与したラマンシフト(特徴量)は、タンパク質や脂質などの生理状態間で比較的变化の少ない生物物質のバンドに属することが明らかとなった。

(2) 共鳴ラマン分光を用いたメタン生成アーキア細胞中のコバミドの高感度検出

メタン生成アーキアは嫌気環境下でメタン生成を行う微生物であり、ユニークな補因子を複数持つことが知られている。メタン生成過程およびメタン生成アーキアが用いる還元のアセチル CoA 経路では、ビタミン B₁₂ 類縁体(コバミド)を補欠分子族とする酵素がメチル基転移に関わる。メタン生成アーキアはこのコバミドを細胞内外に大量に蓄積することが報告されている。図 5a,b に 532 nm 励起で得られたメタン生成アーキア *Methanosarcina mazei* および *Methanopyrus kandleri* の細胞のラマンスペクトル(光褪色成分)をそれぞれ示す[6]。これらの共鳴ラマンスペクトルは図 5c に示すシアノコバラミン(ビタミン B₁₂)のラマンスペクトルと非常によく似たスペクトルパターンを示す。シアノコバラミンなどのコバミドは、コリン環の中心にコバルトが配位した構造で、コバルトの上下にさらにリガンドが結合する。この上部リガンドの種類によって、コバミドのラマンスペクトルがわずかではあるが有意に異なることが報告されており、1165, 1199 cm⁻¹ 付近に見られる 2 つのピークの相対強度が 2 種間で異なっていることから、*M. mazei*, *M. kandleri* のコバミドの上部リガンドが異なることが示唆された。

本研究の結果は、共鳴ラマン分光がメタン生成アーキアの種類や生理状態を非破壊的かつ高感度に調べる有用なアプローチであることを示すものである。また、プロピオン酸生産菌などビタミン B₁₂ を大量に生産する細菌が複数報告されており、コバミドの共鳴ラマン分光はこれらの細菌種のラマン分光解析にも応用できる可能性がある。

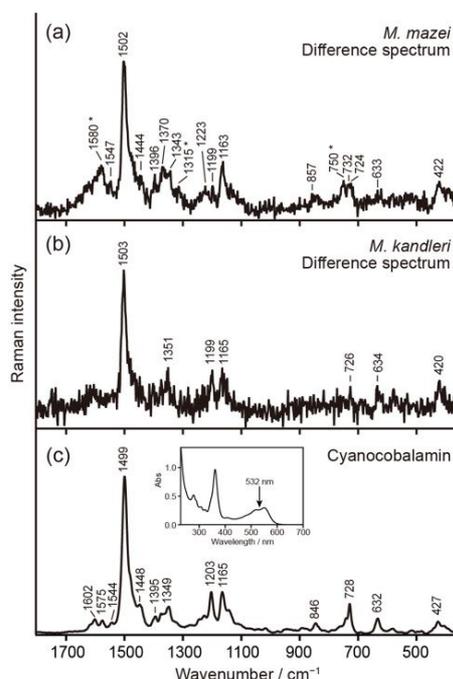


図 5: メタン生成アーキア *M. mazei* (a)、*M. kandleri* (b)、およびシアノコバラミン標品(c)の 532 nm 励起共鳴ラマンスペクトル

(3) 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の孢子囊の分子分光イメージング

A. missouriensis は数百個の孢子を内包した孢子囊を形成する。最近、*A. missouriensis* 孢子囊膜がユニークな構造と組成を持つことが明らかとなりつつあるが[7]、あるがままの孢子囊を分子レベルで詳細に研究した例は皆無であり、未解明な点が多く残されている。そこで我々は、水中の単一 *A. missouriensis* 孢子囊のラマンイメージングを行い、構成成分とその局在を可視化した[8]。その際、多変量データ解析の一種である multivariate curve resolution–alternate least-squares [9] (MCR–ALS) を用いて、イメージングデータ中の主な構成成分の分離を行った。ターゲットを選択的に標識して観測する蛍光イメージングと異なり、原理的にあらゆる生体分子種からの信号が重なって観測されるラマン分光では、MCR–ALS のようなスペクトル解析の利用が重要となる。MCR–ALS の結果(図 6)から、*A. missouriensis* 孢子囊は 3 つの主要な成分から構成されていることがわかる。成分 1, 2 はそれぞれタンパク質とカロテノイドに帰属され、孢子と孢子囊マトリクスに対応している。これらの成分に加えて、孢子囊膜にはっきりと局在する成分 3 が検出された。成分 3 のラマンスペクトルに現れているバンドの多くは脂質に特徴的なバンドであるが、1550, 1615 cm⁻¹ に観測された 2 つのバンドはこれまでに報告されている脂質を初めとした典型的な生体分子には見られないものであることが明らかとなった。したがって、成分 3 は脂質と似た炭化水素鎖を持つ、もしくは脂質と複合体を形成した新規な生体分子であること

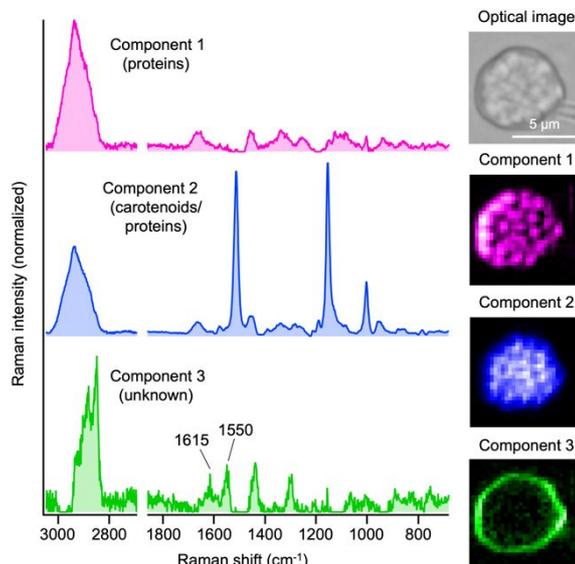


図 6: *A. missouriensis* 孢子囊の MCR–ALS ラマンイメージングの結果

が強く示唆される。

胞子嚢膜を構成する未知の生体分子に関してさらなる知見を得るため、新たに構築したマルチモーダル分光顕微鏡を用いてイメージングを行った。図7に示すように、CARSに加えて可視領域にSHG, SFG, TSFGの信号が胞子嚢膜で観測された。SHGは反転対称性を持たない媒質で活性となるので、胞子嚢膜は我々が発見した1550, 1615 cm^{-1} のラマンバンドを示す未知物質が規則正しく整列した層を含むと考えられる。*A. missouriensis*の遺伝子破壊株が形成する胞子嚢を用いた測定・解析から新規な生体膜構成成分の正体が明らかになりつつある。

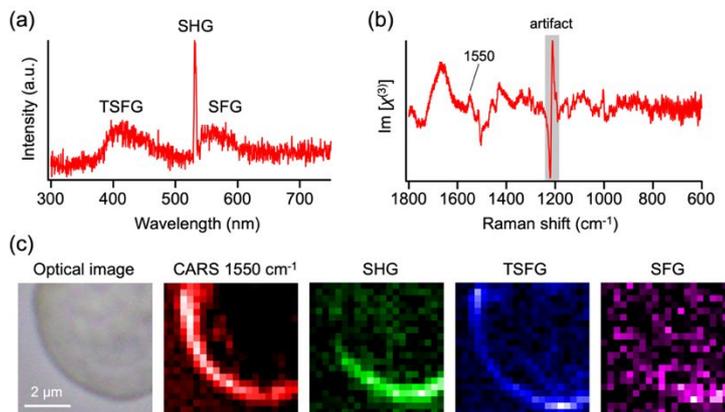


図7: *A. missouriensis* 胞子嚢のマルチモーダル非線形光学 (CARS/SHG/TSFG/SFG) イメージングの結果

図7: *A. missouriensis* の遺伝子破壊株が形成する胞子嚢を用いた測定・解析から新規な生体膜構成成分の正体が明らかになりつつある。

(4) ゲル充填マイクロウェルアレイデバイスを用いて培養した環境微生物の顕微ラマン分光解析

本研究では図8に示すような、 $600 \times 600 \mu\text{m}$ のウェル900個を持つポリメチルメタクリレート (PMMA) 製のマイクロウェルアレイデバイス[4]を用いた。各ウェルをゲル(寒天培地)で満たし、そこで筑波大学のモデル圃場から採取した土壌中の微生物を培養した。個々のウェルで増殖した様々な微生物細胞のラマンスペクトルを測定することに成功した。いくつかのウェルの微生物は、カロテノイドやポリヒドロキシアルカン酸に特徴的なラマンスペクトルを示した。さらに、ラマンスペクトルが得られたウェルから微生物細胞を取り出し、16S rRNA シーケンシングにより11種の微生物細胞を同定することができた。

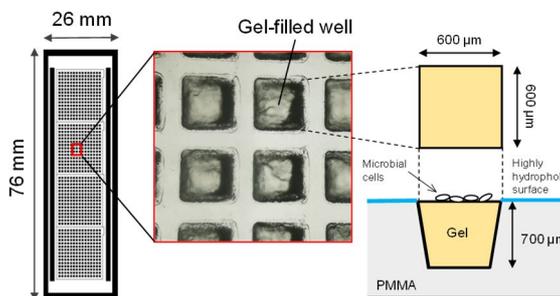


図8: 本研究で用いたPMMA製マイクロウェルアレイデバイスの概略

参考文献

- [1] C. Rinke et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter, *Nature*, **499**, 431–437 (2013).
- [2] N. Kanno, S. Kato, M. Ohkuma, M. Matsui, W. Iwasaki, S. Shigeto, Nondestructive microbial discrimination using single-cell Raman spectra and random forest machine learning algorithm, *STAR Protoc.* **3**, 101812 (2022).
- [3] R. Sasaki, S. Toda, T. Sakamoto, E. Sakuradani, S. Shigeto, Simultaneous Imaging and Characterization of Polyunsaturated Fatty Acids, Carotenoids, and Microcrystalline Guanine in Single *Aurantiochytrium limacinum* Cells with Linear and Nonlinear Raman Microspectroscopy, *J. Phys. Chem. B* **127**, 2708–2718 (2023).
- [4] C. Duran et al. Low-cost gel-filled microwell array device for screening marine microbial consortium, *Front. Microbiol.* **13**, 1031439 (2022).
- [5] N. Kanno, S. Kato, M. Ohkuma, M. Matsui, W. Iwasaki, S. Shigeto, Machine learning-assisted single-cell Raman fingerprinting for *in situ* and nondestructive classification of prokaryotes, *iScience*, **24**, 102975 (2021).
- [6] N. Kanno, S. Kato, T. Itoh, M. Ohkuma, S. Shigeto, Resonance Raman analysis of intracellular vitamin B₁₂ analogs in methanogenic archaea, *Anal. Sci. Adv.* **3**, 165–173 (2022).
- [7] T. Tezuka, Y. Ohnishi, Surface structure and nanomechanical properties of *Actinoplanes missouriensis* sporangia analyzed via atomic force microscopy, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **86**, 552–556 (2022).
- [8] K. Usami, T. Tezuka, Y. Ohnishi, S. Shigeto, *Anal. Chem.* submitted.
- [9] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, S. Shigeto, Disentangling Dynamic Changes of Multiple Cellular Components during the Yeast Cell Cycle by *in Vivo* Multivariate Raman Imaging, *Anal. Chem.* **84**, 5661–5668 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Suzuki-Minakuchi Chiho, Yamamoto Natsumi, Takahira Saki, Yamaguchi Masataka, Takeda Yutaro, Okada Kazunori, Shigeto Shinsuke, Nojiri Hideaki	4. 巻 90
2. 論文標題 Transcriptional heterogeneity of catabolic genes on the plasmid pCAR1 causes host-specific carbazole degradation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.01247-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeto Shinsuke, Takeshita Norio	4. 巻 37
2. 論文標題 Raman Microspectroscopy and Imaging of Filamentous Fungi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME22006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Nanako, Kato Shingo, Itoh Takashi, Ohkuma Moriya, Shigeto Shinsuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Resonance Raman analysis of intracellular vitamin B12 analogs in methanogenic archaea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Science Advances	6. 最初と最後の頁 165 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ansa.202100042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Nanako, Kato Shingo, Ohkuma Moriya, Matsui Motomu, Iwasaki Wataru, Shigeto Shinsuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Nondestructive microbial discrimination using single-cell Raman spectra and random forest machine learning algorithm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Risa, Toda Shogo, Sakamoto Takaiku, Sakuradani Eiji, Shigeto Shinsuke	4. 巻 127
2. 論文標題 Simultaneous Imaging and Characterization of Polyunsaturated Fatty Acids, Carotenoids, and Microcrystalline Guanine in Single Aurantiochytrium limacinum Cells with Linear and Nonlinear Raman Microspectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2708 ~ 2718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.3c00302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 菅野 菜々子, 重藤 真介	4. 巻 22
2. 論文標題 顕微ラマン分光法による微生物細胞の非破壊生体分子分析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 81 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50963/jenvbio.22.1_81	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanako Kanno, Shingo Kato, Moriya Ohkuma, Motomu Matsui, Wataru Iwasaki, Shinsuke Shigeto	4. 巻 24
2. 論文標題 Machine learning-assisted single-cell Raman fingerprinting for in situ and nondestructive classification of prokaryotes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102975 ~ 102975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiue Hiroto, Sasaki Mai, Yoshikawa Yuki, Toyofuku Masanori, Shigeto Shinsuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Raman spectroscopic signatures of carotenoids and polyenes enable label-free visualization of microbial distributions within pink biofilms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64737-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Yuki, Shigeto Shinsuke	4. 巻 74
2. 論文標題 A Simple Calibration Method of Anti-Stokes-Stokes Raman Intensity Ratios Using the Water Spectrum for Intracellular Temperature Measurements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0003702820933908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Mitsuru, Takeshita Norio, Shigeto Shinsuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Deuterium-labeled Raman tracking of glucose accumulation and protein metabolic dynamics in <i>Aspergillus nidulans</i> hyphal tips	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80270-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計47件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 11件)

1. 発表者名 菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 ラマン・蛍光スペクトルの同時検出による光合成細菌および葉圏微生物の1細胞色素分析
3. 学会等名 第13回日本光合成学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅野菜々子、加藤真悟、伊藤隆、大熊盛也、小田和佳、大谷竜哉、高橋愛香音、重藤真介
2. 発表標題 バクテリア/アーキアドメインをラマン顕微鏡による非破壊・非染色分析法で見分けられるか? : アーキア細胞に見られるラマン分光学的特徴
3. 学会等名 第35回日本Archaea研究会講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Novel Raman-Based Approaches to Nondestructive Microbial Analysis Using a Microwell Array Device and Machine Learning
3. 学会等名 8th Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuya Miyagawa, Nanako Kanno, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Multi-wavelength excitation Raman microspectroscopy for detecting different pigments in photosynthetic bacteria
3. 学会等名 8th Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rin Miyasaka, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Direct temperature determination in fission yeast spores using anti-Stokes to Stokes Raman scattering intensity ratios
3. 学会等名 8th Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Amu Sofue, Norio Takeshita, Yasunori Ichihashi, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Label-free molecular imaging of an arbuscular mycorrhizal fungus using multiplex CARS microspectroscopy
3. 学会等名 8th Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Moka Ogawa, Fumihiro Sassa, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Raman Microspectroscopic Observation of Microorganisms Cultured with a Glass Gel-Filled Micro Well Array Device
3. 学会等名 8th Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Raman microspectroscopy and imaging of oil-producing and degrading microorganisms
3. 学会等名 8th Asian Spectroscopy Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Megu Takemoto, Felipe Vejarano, Yuanhao Zhu, Chiho Suzuki-Minakuchi, Hideaki Nojiri, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Single-cell analysis of a pyrene-degrading bacterial consortium using Raman microspectroscopy with deuterium labeling
3. 学会等名 8th Asian Spectroscopy Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Usami, Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Label-free imaging of rare actinomycete sporangium using linear/nonlinear Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution
3. 学会等名 8th Asian Spectroscopy Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐美慶典、手塚武揚、大西康夫、重藤真介
2. 発表標題 線形・非線形顕微ラマン分光と多変量波形分解を用いた希少放線菌胞子囊のラベルフリーイメージング
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祖父江編、竹下典男、市橋泰範、重藤真介
2. 発表標題 マルチプレックスCARS顕微分光によるアーバスキュラー菌根菌と植物のラベルフリー分子イメージング
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮坂凜、重藤真介
2. 発表標題 ストークス・アンチストークスラマン顕微分光による分裂酵母胞子の温度測定
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 1細胞ラマンスペクトルの機械学習による微生物の非破壊・非染色識別
3. 学会等名 第21回医用分光光学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 ラマンスペクトルデータ解析による微生物細胞のイメージングと識別
3. 学会等名 日本分光学会近赤外分光部会第17回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宇佐美慶典、手塚武揚、大西康夫、重藤真介
2. 発表標題 ラマン散乱を中心とした分子分光法による微生物イメージング
3. 学会等名 第73回日本放線菌学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nanako Kanno, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Raman and fluorescence microspectroscopy visualization of pigment diversity expressed by phyllosphere bacterial cells
3. 学会等名 Plant Microbiota Research Network (PMRN) 第3回オンラインシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nanako Kanno, Shingo Kato, Takashi Itoh, Moriya Ohkuma, Nodoka Oda, Tatsuya Ohtani, Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 An attempt to discriminate prokaryotic domains at the single cell level in a non-destructive, non-staining manner using Raman microscopy
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回浜松大会・アジア微生物生態シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祖父江 編、宇佐美慶典、竹下典男、市橋泰範、重藤真介
2. 発表標題 植物-アーバスキュラー菌根菌共生体のマルチモーダル非線形光学イメージング
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宇佐美慶典、手塚武揚、大西康夫、重藤真介
2. 発表標題 ラマン分光を核としたマルチモーダルラベルフリーイメージングで迫る希少放線菌胞子囊の特異な構成成分
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 1細胞ラマン・蛍光顕微分光分析により明らかにする葉圏微生物の色素多様性
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Machine learning-assisted Raman microspectroscopy for microbial discrimination
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会（日台国際シンポジウム）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇佐美慶典、手塚武揚、大西康夫、重藤真介
2. 発表標題 顕微ラマン分光を用いた希少放線菌の孢子囊構成成分のラマベルフリー可視化
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田和佳、菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 細胞の生理状態が1細胞ラマンデータの機械学習による細菌種識別に与える影響
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本芽紅、Felipe Vejarano、Yuanhao Zhu、水口千穂、野尻秀昭、重藤真介
2. 発表標題 重水素標識顕微ラマン分光法を用いたピレン分解細菌コンソーシアムの1細胞レベル解析
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 ラマン・蛍光顕微分光で視る葉面微生物の多様な色素スペクトル
3. 学会等名 2022年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 ラマン・蛍光顕微分光を用いた光合成細菌および葉面微生物の1細胞色素分析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 祖父江編、竹下典男、市橋泰範、重藤真介
2. 発表標題 マルチプレックスCARS顕微分光によるアーバスキュラー菌根菌のラベルフリー分子イメージング
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinsuke Shigeto, Nanako Kanno, Shingo Kato, Motomu Matsui
2. 発表標題 Metabolite analysis and machine learning-assisted discrimination of archaea and bacteria using minimally invasive single-cell Raman microspectroscopy
3. 学会等名 Japan Geoscience Union Meeting 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinsuke Shigeto, Nanako Kanno, Shingo Kato, Motomu Matsui
2. 発表標題 Machine learning-assisted single-cell Raman microspectroscopy for in situ prokaryotic classification in complex microbial populations
3. 学会等名 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田和佳、菅野菜々子、重藤真介
2. 発表標題 1細胞ラマンデータの機械学習を用いた細菌の種・生理状態の識別: どのような分子種が鍵となるか?
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野菜々子、加藤真悟、大熊盛也、松井求、岩崎渉、重藤真介
2. 発表標題 顕微ラマン分光法と機械学習による1細胞レベル非破壊微生物種識別
3. 学会等名 2021年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 ラマン分光で挑む新しい微生物学
3. 学会等名 2021年度日本分光学会年次講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野菜々子、加藤真悟、大熊盛也、松井求、岩崎渉、重藤真介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Momoka Nakatsukasa、Manoj Prasad、Andrew S. Utada、Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 Raman microspectroscopic characterization of an oil-degrading bacterium in the biofilm
3. 学会等名 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Momoka Nakatsukasa、Manoj Prasad、Andrew S. Utada、Shinsuke Shigeto
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた細菌によるバイオフィーム形成及び油滴分解過程のラマン分光観察
3. 学会等名 2021年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 微生物細胞のラマンイメージング：代謝と相互作用を観る
3. 学会等名 東海コンファレンス 2021 in 愛知 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 オーランチオキトリウム単一細胞の多成分同時イメージング
3. 学会等名 第3回脂質駆動学術産業創生研究部会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 微生物の種と機能を観るラマン顕微鏡：機械学習・マイクロ流体デバイスとの融合
3. 学会等名 日本分光学会生細胞分光部会オンライン研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田大樹、菅野菜々子、佐々文洋、重藤真介
2. 発表標題 ゲル充填マイクロウェルアレイと顕微ラマン分光測定との融合：土壌微生物への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口雅貴、水口千穂、野尻秀昭、重藤真介
2. 発表標題 カルバゾール分解プラスミドを保持する細菌の代謝能の揺らぎの1細胞レベル検出
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中務百花、プラサド マノージュ、ウタダ アンドリュー、重藤真介
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスと融合させたラマン分光顕微鏡によるバイオフィーム中の油分解細菌の不均一性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮前靖弘、久能樹、重藤真介
2. 発表標題 鉄酸化細菌 <i>Leptothrix cholodnii</i> が作る鞘状酸化鉄の in-situ 多形分析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮野菜々子、加藤真悟、松井求、重藤真介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木里紗、戸田尚吾、阪本鷹行、櫻谷英治、重藤真介
2. 発表標題 線形および非線形ラマン分光を用いた高度不飽和脂肪酸を蓄積する微細藻類の1細胞分子イメージング
3. 学会等名 分子科学オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 ラマンデータ解析と微生物研究への展開
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重藤真介
2. 発表標題 微生物中の分子からの手紙 ラマンスペクトルを読み解く
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：63名（重藤真介、片山詔久、森田成昭、吉岡信明、杉江隆一、竹井弘之、下赤卓史、池田勝佳、藤井康裕、藤井直美、海野雅司、源川拓磨、中林孝和、梶本真司、山越博幸、袖岡幹子、藤田克昌、大嶋祐介、南川丈夫、奈良雅之ほか）、技術情報協会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 405
3. 書名 ラマン分光スペクトルデータ解析事例集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	劉 宗翰 (Liu Tsung-Han) (10825475)	関西学院大学・理工学研究科・助教 (34504)	削除：2022年10月27日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------