

ハイパースペクトルラマンイメージングにより明らかになった 浴室バイオフィルムの化学組成とその不均一空間分布

関学大院理工

○佐々木舞, 安田充, 重藤真介

Chemical Compositions and Their Heterogeneous Distributions in Bathroom Biofilms Revealed by Hyperspectral Raman Imaging

○Mai Sasaki, Mitsuru Yasuda, Shinsuke Shigeto

Graduate School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, Japan

【Abstract】 More than 90% of microorganisms on the earth are considered to inhabit structured communities known as biofilms that are formed at surfaces or interfaces. Biofilms are found in a diversity of environments ranging from deep sea to soil to home. Bacteria in biofilms have different features from the free-floating counterpart. Among many kinds of biofilms, household biofilms, such as those around water pipes, kitchens, and bathrooms, are arguably most familiar to us, but little has been understood about those household biofilms and their fundamental properties. In the present work, we use Raman microspectroscopy, which enables nondestructive chemical-component analysis without staining, to study biofilms formed in a bathroom (“pink biofilms”). We reveal the chemical compositions and their localizations in pink biofilms using hyperspectral Raman imaging analysis with multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR–ALS) method.

【序】身の回りには様々な微生物が存在しており、そのうちの多くはバイオフィームと呼ばれる構造を持ったコミュニティーを形成する。バイオフィーム中の微生物は浮遊状態のそれとは大きく異なる性質・機能を示すことが知られているが、そのメカニズムの分子レベルでの解明はまだ進んでいないのが現状である。本研究では、染色を必要とせず非破壊でバイオフィームを解析可能な顕微ラマン分光法を用いて、浴室に形成され汚れの原因となるバイオフィーム(“ピンクバイオフィーム”[1])の構成成分とそれらの空間的な分布に関する知見を得ることを目的とした。Multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR–ALS)法[2]を用いたハイパースペクトルラマンイメージングにより、カロテノイドなどの重要な2次代謝産物の局在を明瞭に可視化することができた。

【方法 (実験・理論)】自宅浴室の排水溝付近から採取したバイオフィームを試料とした。スライドガラス上に乗せ、蒸留水でおだやかに洗浄した後、余分な水分を除去してからカバーガラスを被せて封じたものをラマン分光測定に用いた。空間分解ラマンスペクトルの測定には、正立型の共焦点顕微ラマン分光装置(XploRA Nano, HORIBA)を用いた。励起波長は532 nm、試料におけるレーザーパワーは約4.4 mW、露光時間は1点あたり10 s(積算2回)であった。

得られたラマンイメージング結果は多変量データ解析の一種であるMCR–ALS法を用いて解析した。MCR–ALSは、ある非負行列 \mathbf{A} ($m \times n$)を、成分数に対応するパラメーター k を仮定し、交互最小二乗アルゴリズムを用いて $\|\mathbf{A} - \mathbf{WH}\|^2$ が最小となるように非負行列 \mathbf{W} ($m \times k$)と \mathbf{H} ($k \times n$)を求める方法である。特異値分解や主成分分析とは異なり、分解された行列 \mathbf{W} , \mathbf{H} の成分が負にならないため、物理的に解釈しやすい解が得

られる点が大きな特徴の一つである。マッピング測定によって得られた多数の空間分解ラマンスペクトルから成る行列を **A** として MCR-ALS 解析を行うことで、データを構成する化学成分のラマンスペクトルとその空間分布についての情報を得ることができる[2]。

【結果・考察】 浴室バイオフィルム試料中の 17×15 点(ステップ $2 \mu\text{m}$) の領域で測定した空間分解ラマンスペクトルデータを、成分数 $k=4$ を仮定し MCR-ALS 法を用いて解析した。4つの成分のうち生体分子に由来する主要成分3つのスペクトルを図1(a)に、それらの空間分布(ラマンイメージ)を図1(b)に示す。成分1は微生物中のタンパク質や脂質によるものであると考えられる。成分2は、 1521 , 1157 , 1006 cm^{-1} に特徴的な3本のラマンバンドを示す。これらはそれぞれ C=C 伸縮振動、C-C 伸縮振動、C-CH₃ 横揺れ振動に帰属されることから、成分2はカロテノイドであると判断できる[3]。カロテノイドは活性酸素による酸化を防ぐ抗酸化作用があることが知られており、浴室の環境で有利に生存していくためにバイオフィルム中の微生物が生産した可能性が考えられる。成分3は2と非常に良く似たスペクトルパターンを示し、C-C 伸縮振動領域のバンドのピーク位置(成分2では 1157 cm^{-1} であるが、成分3では 1129 cm^{-1} に観測されている)以外は、成分2のスペクトルとほぼ重なるため、当研究室のこれまでの研究では詳細な解析が困難であった。しかし、今回の MCR-ALS を用いた解析で独立した成分として分離できたことにより、ラマンスペクトル全体に基づいた考察を行うことが初めて可能となり、成分3が共役二重結合部分にメチル基を持たないカロテノイド類似のポリエン化合物[4]であることがわかった。図1(b)のラマンイメージも成分2と3で大きく異なる分布を示しており、それらが類似性の高いラマンスペクトルを示してはいるが異なる物質であるという結論を支持している。以上の結果は、MCR-ALS と組み合わせたラマン分光イメージングが、様々な微生物、物質から構成される極めて不均一な系であるバイオフィルムの非破壊分析に対して非常に有用であることを示している。成分2と3が異なる微生物に由来する物質である可能性を調べるため、現在、微生物を単離したうえでバイオフィルムを形成させそれらのラマンイメージングを行うことを試みている。

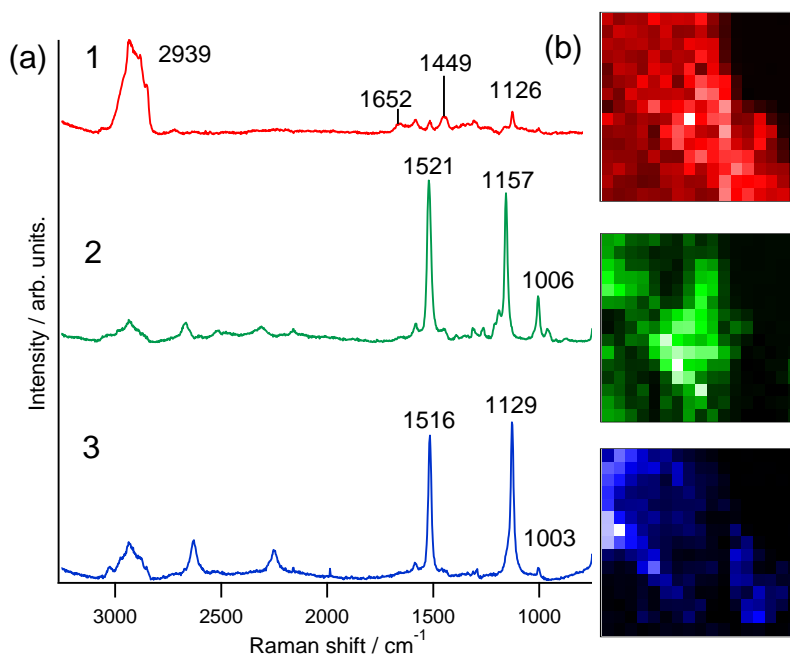


Fig. 1. Results of hyperspectral Raman imaging of a bathroom biofilm using the MCR-ALS method. (a) Raman spectra and (b) corresponding Raman images of the major three components.

【参考文献】

- [1] F.-F. Xu, et al. *Microbes Environ.* **84**, 5661 (2012)
- [2] C.-K. Huang, M. Ando, H. Hamaguchi, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **84**, 5661 (2012)
- [3] Y.-T. Zheng, M. Toyofuku, N. Nomura, S. Shigeto, *Anal. Chem.* **85**, 7295 (2013)
- [4] H. Okamoto, S. Saito, H. Hamaguchi, M. Tasumi, C. H. Eugster, *J. Raman Spectrosc.* **15**, 331 (1984)