

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02161

研究課題名(和文)非破壊・迅速分光分析に信頼性を - NMRメタボロミクスによるアプローチ -

研究課題名(英文) Ensuring the reliability of spectroscopy for rapid and nondestructive assessment: an approach from NMR metabolomics

研究代表者

池羽田 晶文 (IKEHATA, Akifumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長

研究者番号：40342745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外分光法は、PLS回帰などの機械的学習手法の助けもあり広く普及している。しかしそれらは定量原理が不明なまま使い続けられているのが現状である。そこで本研究では主にNMR法を用いたメタボローム解析によって、非破壊・迅速分光分析に利用されるシグナルがどの代謝物(群)に由来するかを調べた。果実糖度による選果に使用されているセンサーに使用されている波長は経験によって選ばれていることが多いが、NMRとの相関解析によってリンゴでは糖だが、桃のように追熟性の果実ではペクチンの加水分解に関係する波長も選択されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品や農産物の非破壊迅速評価法として知られる近赤外分光法は、PLS回帰などの機械的学習手法の助けもあり、生産現場に広く普及している。しかし、それらは定量原理が不明なまま使い続けられているため、有害物質の検出や医療応用など、高い信頼性が求められる分野への進展が滞っている。したがって、非破壊・迅速分光分析の信頼性担保のため、検量モデルが成立するメカニズムの理解が急務である。これらの点から、近赤外センシングの作用機序を明らかにする方法論を構築した本研究の意義は大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：Near-infrared spectroscopy has been widely used with the help of mechanical learning methods such as PLS regression. However, they are still used without knowing the cause. In this study, we used NMR-based metabolomic analysis to determine which metabolites are responsible for the signals used in non-destructive and rapid spectroscopic analysis. Correlation analyses with NMR revealed that wavelengths related to sugar were selected for apples, while wavelengths related to pectin hydrolysis were selected for peaches, which are a ripening fruit.

研究分野：分析化学

キーワード：メタボローム解析 量子化学計算 近赤外分光法 リアルタイム計測 NMR

### 1. 研究開始当初の背景

近赤外分光法などの非破壊・迅速分光手法が実用化されて久しい。果物の糖度センサーや穀類の成分分析をはじめ、すでに数々の実用化事例が知られている。分光データであるスペクトルから目的の成分量を知るには、検量モデルと呼ばれる変換式を予め準備しておく必要があるが、奇しくも部分的最小二乗(PLS)回帰などの多変量解析を用いれば、分光学の知識無しに目的に合った検量モデルが得られる。このため農産物の評価をはじめ、幅広い分野で実用化されている。しかし一方で、成分推定のメカニズム解明は置きりのままである。例えば選果場で使われる糖度センサーでは幾つかの有効波長が選択的に使用されているが、それらは必ずしもショ糖の吸収バンドと一致しない。では、それらは何に起因するのか？本格運用から20年以上経った今なお、ブラックボックスのまま使用されている。一方、測定限界を下回る微量成分についても検量モデルが成立することがある。酸度やミネラル(灰分)の近赤外分光法による定量が代表的な例である。これらは原理的に振動吸収が無いにもかかわらず、なぜか可能である。こうして現在では、ありとあらゆる成分について非破壊分析可能だとする論文が、無数に出版されている。検量モデルが成立すること自体は間違いではなく、単に目的達成のためならば、このような経験的モデルでも十分かもしれない。しかし、毒性の高い物質やアレルゲン等の検出、あるいは医療目的など、高い信頼性が求められる場面に分光学的手法を応用するには、やはり不十分である。検量モデルが成立するメカニズムを理解した上で、真の測定限界を明らかにしておく必要がある。



図1：農産物等の非破壊・迅速分光分析では様々な分析項目について有効波長(回帰係数)が得られる。しかしそれらが何の成分に由来するか明確でない。そこで分光学的原理から考えると、代謝の過程で生じるメタボローム(低分子)の複合的関与が推測できる。

### 2. 研究の目的

本研究は果実糖度センサーも、微量成分の測定が成功するのも、すべて対象が生物由来であることに起因するという仮説のもと実施した。即ち、目的のマイナー成分Aがモデル化できる場合、代謝の過程でAと同期するメジャー成分Bのシグナルが強く検出され、その強い寄与によって間接的に検量モデルが成立したと推測できる。近赤外分光法が特に食品や農産物と相性が良いのは、おそらくこうした理由によると思われる。したがって工業製品とは異なり、還元論的アプローチではこの問題を解くことはできない。検量モデルが成立するメカニズムの理解には生物代謝に沿って候補物質を網羅的にラインアップし、分光スペクトルに現れる吸収バンドとの相関を調べることが有効だと考える。そこでメタボロームデータ、特にNMRスペクトルとの比較によってこれを明らかにする。NMRスペクトルには抽出された全ての代謝物の情報が含まれ、しかもシグナルの帰属が明確である。且つ試料に重水を添加するだけで測定できるので非破壊条件に近く、しかも分子の観測部位が近赤外分光法のそれに近い点で相性が良い。多変量解析との組み合わせによる近赤外分光法の現場適応性の高さはすでに折り紙つきゆえ、科学的な根拠を得ることで新たな分野への速やかな応用展開が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料および装置

桃40果(あかつき, 茨城県産)とりんご150果(ふじ, 山形県産)を試料とした。実際に現場で使用される非破壊糖度計(フルーツセクターK-BA100R, 株式会社クボタ)を用いて検量モデルを作成し、その構造について検討した。この装置は可視-短波長近赤外分光器であり、500-1000 nmの拡散反射スペクトルを測定できる。果実の赤道部で非破壊的にスペクトル測定を行い、続いて計測部を含む果肉から果汁を搾り、Brix計測を実施した(PAL-BX/RI, アタゴ株式会社)。搾汁液の残りは一時凍結保存した。凍結保存した果汁は一斉に解凍し、内部標準(Sodium trimethylsilylpropanesulfonate, DSS)を加えて重水素置換リン酸緩衝液でpH 7.0に調整した後、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定(Bruker, AVANCE 500 MHz)に供した。

## (2) データ解析

近赤外スペクトルはベースライン変動を取り除くために二次微分処理を、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルはシフトの影響を回避するために 0.02 ppm 幅で強度ビンニングを行った。二次微分スペクトルの各波長における強度と <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの各強度の相関係数を総当りの計算し、これをヒートマップに表した (Statistical Heterospectroscopy, SHY, D. J. Crockford, E. Holmes, J.C. Lindon, et al., 2006, Anal. Chem., 78(2), 363–371)。解析には R を用いた。

## 4. 研究成果

まず近赤外スペクトルから PLS 回帰によって Brix 糖度の検量モデルを得た。この回帰ベクトルの構造を説明することが目標である。図 2(a)にリンゴの SHY マップを示す。特に 888 nm と 904 nm にそれぞれ正・負の強い相関が見いだされた。<sup>1</sup>H-NMR の既知のピークから読み取るとフルクトース、スクロース等が寄与物質であることが確認できる。なお、SHY マップをケミカルシフト方向(縦方向)に平均化すると、回帰ベクトルと類似のパターンが得られる。このことから、リンゴの近赤外スペクトルの変動は糖代謝(図 3(a))を強く反映しており、Brix 糖度による変化が代表されていることが示唆された。一方、図 2(b)にモモの SHY マップを示す。一見して水平方向に強い相関があることがわかる。5.27 ppm はガラクトシクロン酸、3.3 ppm はメタノールに帰属される。このことは図 3(b)に示すペクチンの加水分解を反映すると考えられる。モモの場合、糖の影響が 828 nm に強く出る理由は不明だが、糖代謝だけでなく追熟もまた検量モデルの構造に影響することが明確に捉えられた。

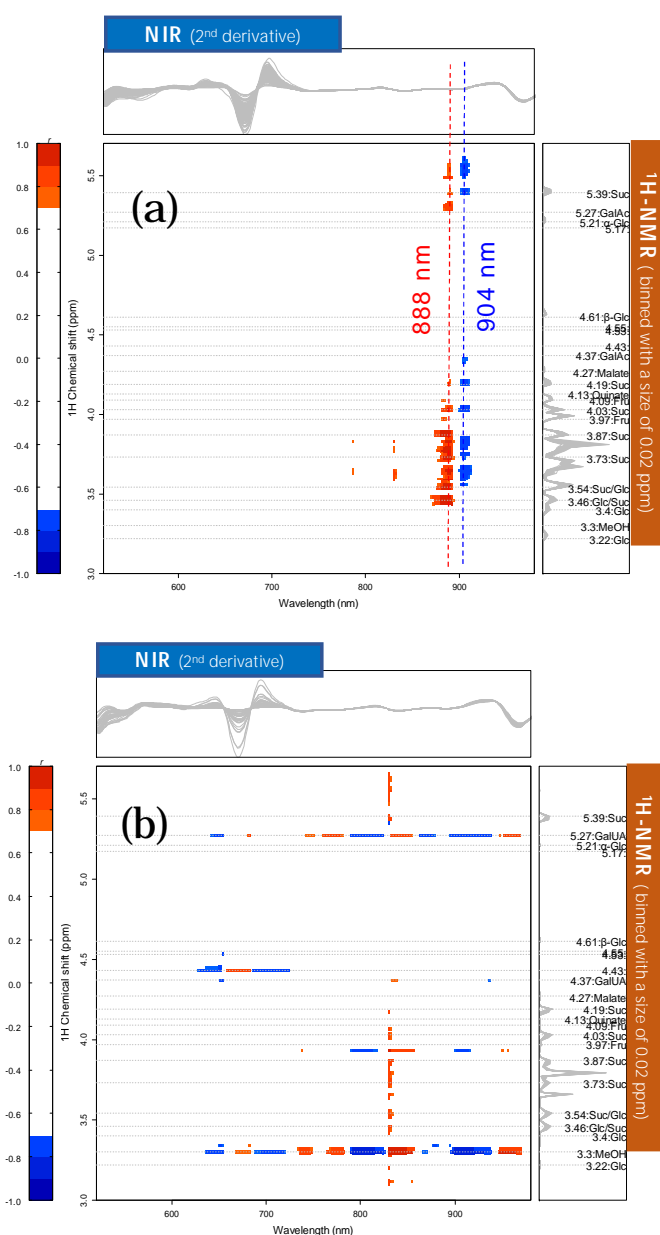


図 2: 可視 - 近赤外スペクトル (2 次微分) と <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの相関マップ (SHY)。(a)リンゴ, (b)モモ

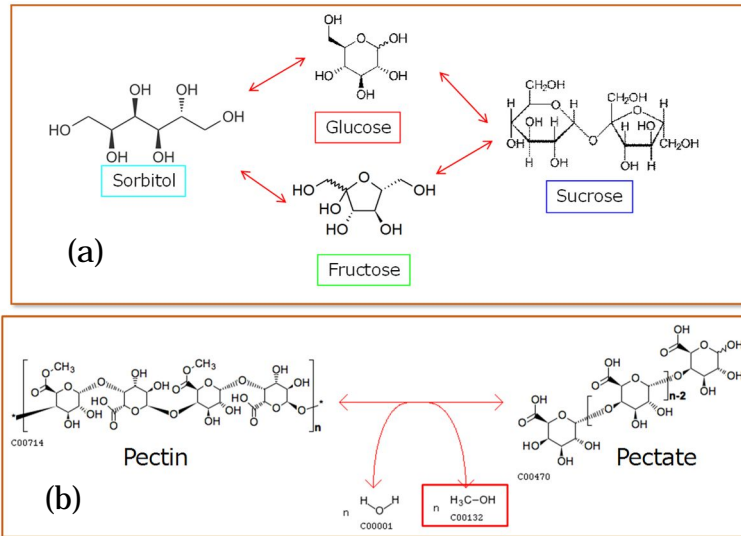


図 3：検量モデルに反映されていると考えられる代謝。(a)リング，(b)モモ

本研究では、メタボローム解析によって非破壊分光手法で観測されるシグナルが何の代謝物に由来するかを紐解くことができた。こうしたアプローチによって、メタボロミクスのためのリアルタイム計測ツールとして非破壊分光手法を再編集することが可能になる。これまでのように単なるポストハーベスト評価技術でなく、生理学等の学術面へ貢献できるユニークな分析法として確立するための一歩を踏み出せたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 池羽田晶文, 関山恭代
2. 発表標題 NMRメタボロミクスによって近赤外スペクトルを理解する試み
3. 学会等名 第35回近赤外フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池羽田晶文
2. 発表標題 非破壊分光分析によってメタボローム解析を補完する
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akifumi Ikehata, Yasuyo Sekiyama
2. 発表標題 Opening the black box of NIR prediction for sugar content of fruits with the aid of NMR-based metabolomics
3. 学会等名 International Near Infrared Spectroscopy (NIR2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akifumi Ikehata
2. 発表標題 Opening the black box of NIR prediction for sugar content of fruits: a complementary analysis by aquaphotomics and metabolomics
3. 学会等名 The 3rd Aquaphotomics International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池羽田晶文, 関山恭代
2. 発表標題 近赤外非破壊果実糖度推定のブラックボックスを開く
3. 学会等名 第12回メタポロームシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池羽田晶文, 関山恭代
2. 発表標題 NMR-NIRヘテロ相関解析による非破壊果実糖度検量モデルの構造解明
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akifumi Ikehata, Yasuyo Sekiyama
2. 発表標題 Structure of NIR prediction models for Brix of fruits: An understanding from heterospectroscopy with 1H-NMR spectra
3. 学会等名 International Conference on Advancing Molecular Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akifumi Ikehata, Yasuyo Sekiyama
2. 発表標題 The working mechanism of prediction models for Brix of fruits by NIR spectroscopy: An understanding from correlation analysis with 1H-NMR spectra
3. 学会等名 6th Asian NIR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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	関山 恭代  (SEKIYAMA Yasuyo)  (60342804)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員   (82111)	

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
---------	---------