

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658211

研究課題名（和文）アクアフォトミクスを用いた生体内水分子構造の解析による細胞の生存能力診断

研究課題名（英文）In vivo diagnosis of viability for cell using water molecule structure analysis by aquaphotomics

研究代表者

ルミアナ ツエンコヴァ（ROUMIANA TSENKOVA）

神戸大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30294200

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：近赤外分光法及び水分子と生体分子との相互作用から生体システムの動態を明らかにするための新しい分析法であるアクアフォトミクスを用いて、細胞の生存能力に關与する DNA の分析を行なった。DNA における近赤外スペクトルの水分子振動を表わす OH 第 1 倍音領域（1300-1600 nm）を解析することで、4 種類の異なる構造の DNA それぞれの濃度を定量化し、その回帰モデルから DNA の違いを明らかにした。また、直鎖 DNA と環状 DNA を識別し、DNA 構造の違いを表わす水分子吸収バンドを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：DNA related to viability of cell was investigated by aquaphotomics which is new scientific area in order to systemize the abundant information concerning the interactions of water in biological and aqueous systems by the use of the absorption band of water molecule structure changing with biological molecules based on near infrared (NIR) spectroscopy. The first overtone of the OH stretching vibration of water (located around 1300 – 1600 nm) was used for the analysis of DNA spectra. Four kinds of DNA which had different structure were prepared and measured by NIR spectroscopy. The DNA concentration was quantified for each DNA sample and the difference among DNA samples was appeared in each regression vector ranging 1300 – 1600 nm. Moreover, the deference between straight and circular structure of DNA was classified and the effective water absorption bands for classification of DNA structure were investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農業

科研費の分科・細目：農業工学・農業精密工学

キーワード：アクアフォトミクス・細胞・組織・分析化学・WAMACS・WAPS

研究開始当初の背景

(1) 複雑な生物機能の解明にはそこに關与する生体分子の検出が不可欠である。生物の体の中にある分子全体を網羅的に調べる学問（オミックス）により、DNA の塩基配列に従って産出される酵素や補酵素等のタンパク質・有機化合物の代謝経路が明らかに

されている。しかし、様々な生体分子の検出には、HPLC、GC、MS 等の高価・大型の機器を適切に使用し、解析するための専門知識と経験を要する。更にタンパク質の検出は電気泳動法により分離したタンパク質を転写膜へ結合させ、蛍光色素等で標識してからシグナルを検出するため、薬剤による前処理と長時

間の測定を要する。また、対象となる生体分子を単離しているため、水溶液中の生体分子システムまでは明らかになっていない。近赤外分光法を用いると、水へ深く浸透する弱いエネルギーの近赤外線を用いるため、生体を対象に非破壊・非侵襲で、簡易迅速なリアルタイム測定が可能となる。研究代表者はこの検出技術により、正常なプリオンがマンガンまたは銅と結合したタンパク質を識別した結果、それぞれのタンパク質の違いは1300-1600 nmに現れ、タンパク質分子の状態により水分子構造が異なるスペクトルパターンが示されることを明らかにした (Tsenkova, R., et al., Biochem. Bioph. Res. Co. 2004)。研究代表者はこの検出技術を発展させ、水を介して生体分子の構造変化を説明する「アクアフォトミクス」という概念を提唱した (Tsenkova, R. J. Near Infrared Spec. 2009)。アクアフォトミクスは、「水分子の吸収バンドが生体分子との相互作用の結果、生体分子の変化が水分子構造の変化として基準振動の第一倍音領域1300-1600 nmに水鏡のように現れる」という性質を利用し、水分子振動に帰属される12の特徴的な吸収バンドにおける強度変化のパターンから生体システムの変化を解析する手法である。

2. 研究の目的

農業や園芸分野で苗のクローン増殖として挿し木法が広く活用されているように、未熟な性質を持った細胞から、より特定の機能を有した細胞に変化すること(分化)が知られている。本研究では、研究代表者が提唱するアクアフォトミクスを植物細胞の分化可能性診断に応用する。生体内で起こる細胞周期の過程における、DNAの発現やタンパク質の経時的変化およびそれらの動態を、水分子の物理化学的性質の変化として包括的に捉えることを目指す。そして、細胞全体を満たす水をバイオマーカーとし、細胞の分化可能性を決定付ける要因を探る。

3. 研究の方法

(1) 4種類の異なるDNA(48502bpの2本鎖直鎖Lambda DNA、2686bp・2675bp・2238bpの環状2本鎖pUC18 DNA・pHSG298 DNA・pHSG396 DNA)を超純水に濃度が5ng/ μ Lとなるよう加え、2倍希釈により5から0.005ng/ μ Lの10段階の濃度における近赤外スペクトルを、室温で各サンプルに対して3回連続で測定した。OH伸縮振動の第1倍音領域を解析するため、近赤外スペクトルデータの1300-1600nm領域を用いた。

(2) 4種類の異なるDNA(直鎖Lambda DNA、および直鎖が含まれる環状複合鎖pUC18 DNA・pHSG298 DNA・pHSG396 DNA)を、超純

水を用いて濃度が5 ng/ μ Lとなるよう希釈した。また、 λ DNAを制限酵素HindIIIまたはXba Iで切断したサンプル、およびpUC18DNAまたはpHSG298をBamH Iで切断したサンプルを、それぞれ濃度5 ng/Mlとなるよう準備した。それぞれのDNAサンプルの塩基対数の違いは、アガロースゲル電気泳動の結果から確認された。各サンプルは、直接希釈により5・2.5・1.25・0.625 ng/ μ Lに調整した。濃度が4段階からなる8種類のDNAの総計32サンプルから近赤外スペクトルを室温で各サンプルに対して3回連続で測定し、水分子振動に関係するOH第1倍音領域(1300-1600 nm)を解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 解析結果の有効性を検討するため、データセットをDNA濃度の最高値(5 μ g/mL)・最低値(0.01 μ g/mL)を含むモデル構築セットと中間濃度のサンプルからなる予測セットに分割し、常用対数化したDNA濃度の定量分析を行った。PLS回帰分析による定量分析の結果、全ての回帰モデルで相関係数R=0.97以上が得られ、R=0.78から0.90の予測結果が得られた(Table 1)。

Table 1. PLS regression result for log₁₀(DNA conc. [μ g/mL])

	Latent variables	Inner validation		Outer validation	
		SEV	R	SEP	R
Lambda DNA	2	0.24	0.973	0.43	0.821
pUC18DNA	4	0.16	0.987	0.46	0.776
pHSG298DNA	4	0.23	0.976	0.37	0.900
pHSG396DNA	2	0.24	0.974	0.74	0.864

比較的精度の高い予測結果を与えるそれぞれのDNAに対する回帰ベクトルは異なった形状を示した(Fig. 1)。

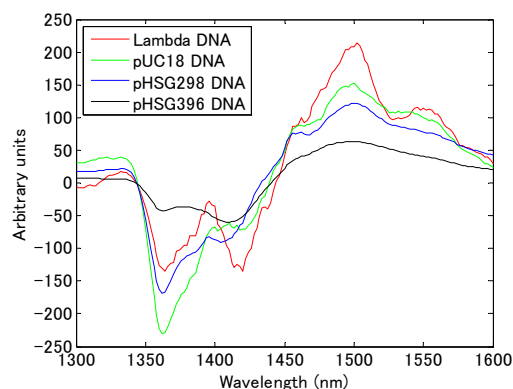


Fig. 1. Regression vector of concentration for each DNA solution by PLS regression

環状DNAでは1402 nmから1408 nmに微少なピークを示し、直鎖DNA(Lambda DNA)では1420 nmに大きなピークが見られた。また、DNAの塩基対数に従った強度の異なるピークが1500 nmに見られた。前者の微少なピークに近い1410.6 nmは水素結合のない水分子

(S0) の振動モードであるとされ (Maeda, H. et al. J. Near Infrared Spectrosc. 1995)、1412 nm は弱い水素結合状態の水構造であるとされる (Segtnan, V.H. et al. Anal. Chem. 2001)。また、1420 nm は強い水素結合から結合が弱くなる状態の水分子であるとされる (Segtnan, V.H. et al. Anal. Chem. 2001)。そして、1500 nm に近い 1492 nm は 3 つの水素結合を持つ水分子 (S3) であり (Maeda, H. et al. J. Near Infrared Spectrosc. 1995)、強い水素結合の水分子であるとされる (Segtnan, V.H. et al. Anal. Chem. 2001)。つまり、塩基対数が多いほど DNA は強い水素結合を持ち、環状構造の DNA は多くの自由水 (S0) を持つと考えられる。

この研究により、低濃度 DNA 溶液の近赤外スペクトルから比較的高い精度の定量分析結果が得られ、それらの回帰モデルは異なったピークを示し、DNA 構造の特徴を水分子マトリクス構造 (WAMACS) として近赤外スペクトルデータに反映していることを示した。

(2) DNA スペクトルから超純水スペクトルを差し引き、DNA の情報を強調させる差スペクトルを算出した。そして、主成分分析を用いた SIMCA 法により、 λ DNA および制限酵素により切断されたものを直鎖 DNA とし、切断しない環状 DNA との識別を行った。各サンプルを連続で測定したスペクトルから、1 回目・3 回目に測定したものをモデル構築セットとし、2 回目に測定したものを予測セットとした。直鎖および環状 DNA に対して、75% および 79% の識別モデルが構築され、75% および 75% の識別予測結果がそれぞれ得られた。この識別モデルにおいて、直鎖と環状 DNA の識別に有効な波長を示す識別力 (Discriminating power) から、1368・1422・1454・1506・1538 nm が主に識別に用いられていることを明らかにした (Fig. 2)。

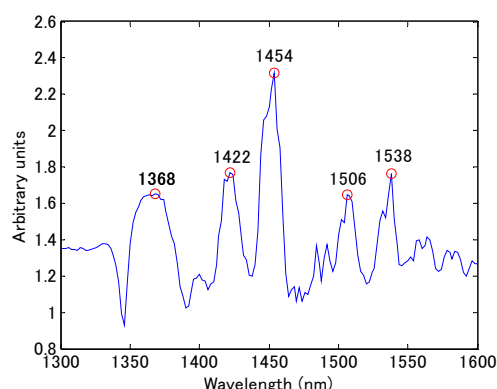


Fig. 2. Discriminating power obtained from SIMCA classification method for DNA structure

1420 nm は直鎖である Lambda DNA の濃度を定

量化する回帰モデルで示されたピークであり、1500 nm は DNA の塩基対数を反映したピークである。また、1450 nm は、OH 基の倍音や結合音が重なり合ったピークである (Gowen, A. A., et al., Anal. Chim. Acta, 2013)。本研究により、他の波長である 1368・1538 nm は DNA 構造の識別に有効であることを明らかにした。

(3) 当初の計画では、Mg イオン濃度に応じた DNA とヒストンタンパク質の複合体であるクロマチンの状態変化を近赤外スペクトルの水分子吸収バンドパターンから明らかにする予定であったが解析に至っていない。一方で、絶滅危惧種であるジャイアントパンダの発情期を尿スペクトル中の水分子吸収バンドパターンから明らかにし (Kinoshita, K. et al., Scientific Reports, 2012)、異なったイオンの濃度変化および温度変化に応じた水分子吸収バンドパターンの変化を明らかにした (Gowen, A. A., et al., Anal. Chim. Acta, 2013)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Matija, L. R.; Tsenkova, R. N.; Miyazaki, M.; Banba, K.; Muncan, J. S.; Aquagrams: Water Spectral Pattern as Characterization of Hydrogenated Nanomaterial, FME Transactions、査読有、Vol. 40, No. 2, 2012, pp. 51–56、http://www.mas.bg.ac.rs/istrazivanje/biblioteka/publikacije/Transactions_FME/Volume40/2/01_LRMatija.pdf
- ② Nakakimura, Y.; Vassileva, M.; Stoyanchev, T.; Nakai, K.; Osawa, R.; Kawano, J.; Tsenkova, R.、Extracellular metabolites play a dominant role in near-infrared spectroscopic quantification of bacteria at food-safety level concentrations、Analytical Methods、査読有、Vol. 4, 2012, pp. 1389–1394、DOI: 10.1039/c2ay05771a
- ③ Kinoshita, K., Miyazaki, M., Morita, H., Vassileva, M., Tang, C., Li, D., Ishikawa, O., Kusunoki, H., Tsenkova, R.、Spectral pattern of urinary water as a biomarker of estrus in the giant panda、Scientific Reports、査読有、Vol. 2, No. 856, 2012, pp. 1–9、DOI:10.1038/step00856
- ④ Gowen, A. A., Amigo, J. M., Tsenkova, R.、Characterisation of hydrogen bond

perturbations in aqueous systems using aquaphotomics and multivariate curve resolution-alternating least squares, *Analytica Chimica Acta*, 査読有、2013、Vol. 759、No. 8、pp. 8–20、DOI:10.1016/j.aca.2012.10.007

〔学会発表〕（計4件）

- ① Tsenkova, R.、NIR spectroscopy: a tool for aquaphotomics、15th International Conference on Near Infrared Spectroscopy（招待講演）、2011年5月15日、Capetown (South Africa)
- ② Gowen, A.（Tsenkova, R.）, NIR Transmission spectra of saline solutions: a testing ground for Aquaphotomics、15th International Conference on Near Infrared Spectroscopy、2011年5月19日、Capetown (South Africa)
- ③ Tsenkova, R.、Aquaphotomics: How invisible Light Makes Water a Mirror on Molecular Level、Wetsus Congress（招待講演）、2011年10月4日、Leeuwarden (Netherland)
- ④ 土坂祐太郎（ツェンコヴァ ルミヤナ）、近赤外分光法を用いたインスリンアミロイド形成過程の非破壊モニタリング、第28回近赤外フォーラム、2013年3月8日、沖縄県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ルミアナ ツェンコヴァ（ROUMIANA TSENKOVA）

神戸大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30294200

(2) 研究分担者

近江戸 伸子（OHMIDO NOBUKO）

神戸大学・人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：30343263