

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292156

研究課題名(和文) アクアフォトミクスによる水を介した生体機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biological functions through the water by Aquaphotomics

研究代表者

ルミアナ ツエンコヴァ (Tsenkova, Roumiana)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30294200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外分光分析と多変量解析を組み合わせることで生体内の水分子構造の微細な変化を解析する新たな手法であるアクアフォトミクスを用いて、植物とバクテリアの細胞を調査した結果、水の近赤外スペクトルパターンをバイオマーカーとして、細胞およびその機能性の識別、細胞の発達ステージの決定が可能であることが示された。本研究は、新しい生体計測技術の確立に大きく寄与するものであり、バイオテクノロジーおよび食品生産の場において、単成分分析から、直接的な *in vivo* での機能分析、定性分析への変革を推進させるものである。さらに科学分野においては、生体の大部分を占める水の役割を解明するための新しいアプローチとなる。

研究成果の概要(英文)：The main objective all over our research is to achieve more information about the roles of water molecular network in different living cells through the lens of NIR light using Aquaphotomics approach. *Lactobacillus* bacteria strains grown in liquid cultures and different plant cells were studied. Water spectral pattern has been successfully used as biomarker for plant cell identification, monitoring of developmental stages of plant and bacteria cells and for monitoring and identification of bacteria.

As the primary goal of this project we proved with experimental results that the concept of Aquaphotomics provide the opportunity to develop tools including spectrophotometer and data analysis methods and software to precisely identify specific water bands, which can be used as water matrix coordinates of spectral patterns to be further used as biomarkers.

研究分野：農業情報工学 農業環境・情報工学

キーワード：aquaphotomics NIRS cells probiotics water

### 1. 研究開始当初の背景

多様な生体機能の解明には、そこに関与する生体分子の検出が必須であるが、HPLC、GC、MS 等の高価・大型の機器と、解析の専門知識と経験を要する。また、薬剤による前処理と長時間の測定を要するうえ、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。

一方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, 303-314)。

アクアフォトミクスは、「水分子と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、水分子構造体の近赤外吸収帯領域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特徴的吸収バンドの強度変化から生体システムの変化を解析する手法である。この水分子吸収バンドの組み合わせをアクアグラムと名付けたバイオマーカーとして用い、ジャイアントパンダの発情期を尿スペクトルから明らかにして Nature 出版グループで発表した (Kinoshita, K. et al., Scientific Reports, 2012)。

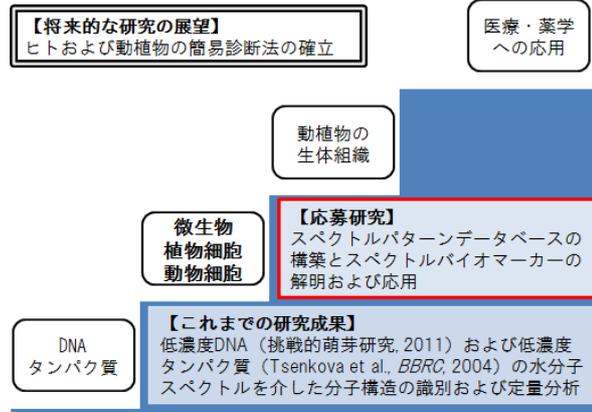
これまで申請者らは挑戦的萌芽研究により (課題番号 23658211) 生体分子を対象として 4 種類の DNA (直鎖 DNA および環状 pUC18・pHSG298・pHSG396DNA) について近赤外スペクトルの解析を行った結果、全ての DNA に対して高い定量精度 (相関係数  $R=0.99$ ) を示す回帰モデルを構築し、信頼できる予測精度  $R=0.85 \sim 0.93$  を得た。また、DNA 構造の特徴を水分子構造として近赤外スペクトルに反映し、識別できることを示した。また、正常なプリオンが金属と結合したタンパク質の識別を行った結果、タンパク質分子の状態により水分子構造が異なることが、スペクトルパターンの解析により示された (Tsenkova, R., et al., Biochem. Bioph. Res. Co. 2004, 1005-1012)。

以上、アクアフォトミクスにより生体分子とその構造変化を解析する手法を大きく発展させた。

### 2. 研究の目的

本研究では、前項で述べたの基礎的知見をもとに、細胞レベルでの発展研究を行うことを目的とする。植物細胞、バクテリア細胞を研究対象として、分光装置やデータ解析手法およびソフトウェアを発展させることにより、水スペクトルパターンの water matrix coordinate(WAMACS)として利用できる水の特徴的バンドを正確に検出する。将来的に

は、生体の水分子システムの近赤外領域の WAMACS データベース(aquaphotome)を構築し、細胞機能解明および診断のためのスペクトルバイオマーカーの開発を目指す。



本研究は、近赤外分光法による迅速、簡便かつ非破壊・非侵襲の特徴を合わせ持つ新しいリアルタイム測定技術を提供するものであり、動物、植物、ヒトなどのすべての生物に適用可能なものである。この新しい診断技術が確立されれば、微生物が生体に与える影響、細胞の病変診断だけでなく、食品・衛生学、医学、獣医学、薬学などの様々な分野への広範囲にわたる応用が可能となり、社会への貢献は計り知れない。

### 3. 研究の方法

前述の目的を達成するために、以下の順で研究を実施した。

#### (1) 植物細胞における水分子構造評価

イネカルス細胞および体細胞を用い、培養時間による経時変化を近赤外分光器により測定する。データ解析は、多変量解析モデルにより、特徴的な水分子構造のピークを抽出するアクアフォトミクスの手法を用いる。この特徴的な水構造が植物細胞の異なる成長ステージの識別と決定に利用できる可能性を評価する。

#### (2) プロバイオティクス菌株におけるプロバイオティック特性の識別評価

異なるプロバイオティック特性をもつバクテリア株の培養時間による経時変化を、近赤外分光法とアクアフォトミクスの手法により評価する。さらに、従来法である人工胃液耐性実験および人工胆汁耐性実験の結果と比較し、プロバイオティクス菌株の識別が可能か評価する。

#### (3) プロバイオティクス菌株の成長ステージ識別モデルの構築

項目(2)の発展研究として、異なるプロバイオティック特性を持つバクテリアの各成長ステージを決定するためのモデルを構築

する。これらの特徴的な水スペクトルパターンが細胞の機能性の違いを表すバイオマーカーとして利用可能か評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 植物細胞における水分子構造評価

###### 目的

イネカルス細胞および体細胞の、特徴的な水構造を決定する。さらに、この特徴的な水構造が植物細胞の異なる成長ステージの識別と決定に利用可能か評価する。

###### 実験方法

イネカルス細胞および体細胞 (*Oryza sativa*) 各 28 粒の成長を、可視および短波長の近赤外(Vis/SW-NIR)分光分析により 26 日間モニタリングした。近赤外分光器は、光ファイバーケーブルを搭載した SAIKA instrument (SAIKA Technological Institute Foundation) および PureSpect Control software(ver. 1.0., SAIKA Technological Institute Foundation)を用い、個々の種の透過スペクトルをレンジ(660-960 nm)、1nm ステップで測定した。

スペクトル解析は、多変量解析の手法により行った。主成分分析(PCA) (Cowe and McNicol 1985)により、スペクトルデータの多次元パターンの表示と、外れ値(outliers)の検出を行い、PLS 回帰 (PLSR) (Naes et al. 2002)により、スペクトルデータとモニタリング日数との関連性を評価した。PLSR モデルの検証は、leave one out cross validation により実施した。

解析結果に基づき、変化量の大きい水の吸収バンド群を用いてアクアグラム(注 1)を作成し、細胞の成長モニタリング中の変化を評価した。

###### (注 1)アクアグラム

異なるサンプルや時系列のスペクトル同士を比較するために、特定の水の吸収バンドについて吸光度を標準化し、レーダーチャートとして表すアクアフォトミクス手法である。

$$A_{i,\lambda} = \frac{I_{i,\lambda} - \bar{I}_\lambda}{\sigma_\lambda}$$

$A_{i,\lambda}$ : 波長 nm における測定時  $i$  ( $i=1, 2, 3, \dots, 10$ ) のサンプルのアクアグラム値

$I_{i,\lambda}$ : 波長 nm における測定時  $i$  のサンプルの吸光度の平均

$\bar{I}_\lambda$ : 波長 nm における全サンプルの吸光度の平均

$\sigma_\lambda$ : 波長 nm における全サンプルの吸光度の標準偏差

#### 結果と考察

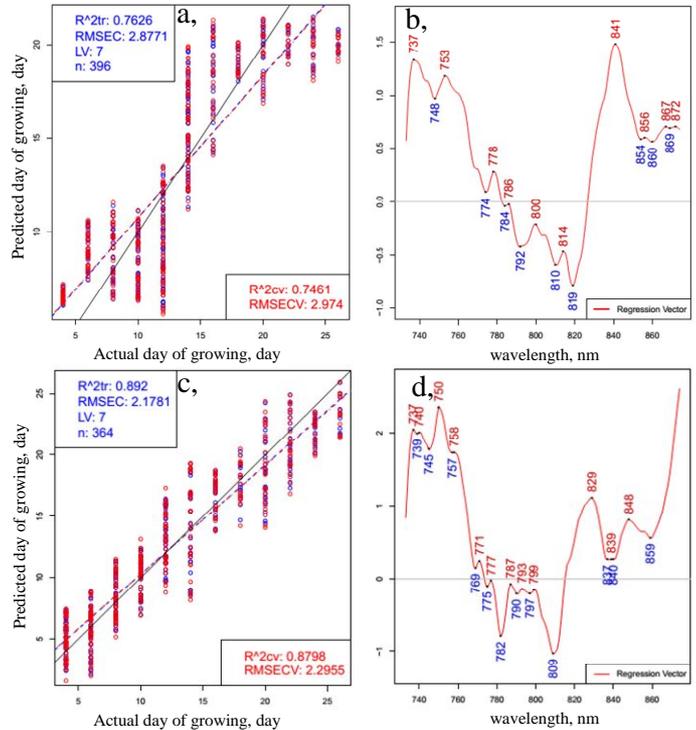


図 1 PLS 回帰結果(波長領域 730 ~ 870nm) : a. イネカルス細胞(28 サンプル)、c. イネ体細胞(28 サンプル)、回帰ベクトル: b. イネカルス細胞、d. イネ体細胞

イネカルスおよび体細胞の一日毎の平均水スペクトルと二次微分スペクトルは、720-780nm および 800-870nm の範囲で大きく変化した。これは、水の第三倍音領域とその組み合わせの領域に相当する。イネ体細胞の二次微分スペクトルは、イネカルスよりも小さいピークを示すが、両者は同じ吸収バンドでスペクトル変化していることがわかった。730-870nm 領域のスペクトルを切り出し、成長時間を目的変数として PLS 回帰モデルを構築した(図 1)。モデルフィッティングとモデルの品質パラメータについては、イネ体細胞(図 1 a)のほうがイネカルス細胞(図 1 c)よりもよく合っていた。イネカルスと体細胞それぞれにおいて決定係数 0.7461、0.8798、2乗平均平方根誤差 2.974 日、2.296 日が得られた。また PLS 回帰モデルの回帰ベクトルは(図 1 b、d)、730-750nm、760-800nm、830-870nm の領域で、イネカルス細胞と体細胞で大きく異なっていた。

モニタリング中の変化量が最も大きい水の第三倍音領域のアクアグラムを計算した(720-780 nm)ところ、体細胞のほうは、成長時間に従って明らかな傾向を示すのに対して、カルス細胞のアクアグラムは何らかの傾向を示すことがなかった。

この現象は以下のことを示唆している。イネカルス細胞、すなわち分化していない細胞に

おいては、水の構造変化は重要な役割を果たしていない。一方、体細胞の成長過程すなわち通常の植物の細胞においては、明らかな水の構造変化の時間依存性を示す。

イネ体細胞のスペクトル変化の傾向は、発達の初期段階では、ゆっくりとレッドシフト、すなわち水素結合の少ない水構造から水素結合の多い構造へと変化し、次に逆のスペクトル変化が起こるといったものである。アクアグラムのこうした違いは、イネ体細胞の発達に応じて水構造スペクトルパターンの変化が引き起こされていることを示唆している。

#### 結論

アクアフォトミクスと Vis/SW-NIR 分光との組み合わせで、イネカルスと体細胞の発達における水構造の変化をモニタリングすることができた。アクアグラムから分化していない細胞よりも体細胞のほうが、スペクトル変化が大きいことが示され、細胞の発達過程における生体内の水の構造変化に関する情報を得ることができた。

### (2) プロバイオティクス菌株におけるプロバイオティック特性の識別評価

#### 目的

異なるプロバイオティック特性を持つバクテリア株の迅速な選別と評価にアクアフォトミクスを応用できる可能性を調査する。

#### 実験方法

25 種類の *Lactobacillus* 株について、MRS 液体培地を用いて 37 で 24 時間培養し、菌株培養液の水スペクトルの変化を観察した。測定には FOSS XDS OptiProbe Analyzer と浸漬タイプのプローブを用いた。

スペクトル解析は、多変量解析の手法により行った。定量分析に主成分分析 (PCA) と OPLS-DA (Orthogonal Projection to Latent Structures Discriminant Analyses) を、定性分析に PLSR を使用した。モニタリング中の変化量が大きい波長のバンドを用いてアクアグラムを作成した。

#### 結果と考察

多変量解析の結果、*Lactobacillus* 株のプロバイオティクス性の有無を非常に正確に分類することができた (100%) (図 2)。この結果は、プロバイオティクス性の有無を評価する従来手法である人工胃液耐性実験と人工胆汁耐性実験の結果とよく一致している。

今回のモデリングにより抽出された水スペクトルバンド (WAMACS) は、株間のプロバイオティクス性の違いが主に、自由水分子、水の溶媒和シェル、プロトン化水、その他の構造の水 (水の溶媒和シェルとプロトン化水) の存在が影響していることを示している。プロバイオテクス菌株グループでは、他の 2 グループと比較して、多数のプロトン化水の小さなクラスター、自由水分子、弱い水素結合をもった水クラスターが多いことが分かった。それと対照的に、中間株グループには、

強い水素結合を持つ大きな水クラスターが多数存在する。プロバイオティクス菌株グループはまた、水・タンパク質相互作用領域に大きな吸収帯を持つ。

以上の結果から、溶液中に存在する様々な分子・化合物は、周囲の水分子システムマトリックスに影響を与え、水のバンド変化を引き起こしながら存在しており、水はそれらの分子鏡のような役割を果たすことが分かった。これらのバンドは、株の表現型の分類と予測を行うにあたって、細胞に存在する化合物の重要性を示している。これは、多くの水和した有機成分の違い、あるいは細胞の内外の水分子の構造の違いを示唆している可能性がある。

このようにして、水構造によって与えられる情報は、プロバイオティクス性の異なる *Lactobacillus* 株の間の重要な違いを表している。

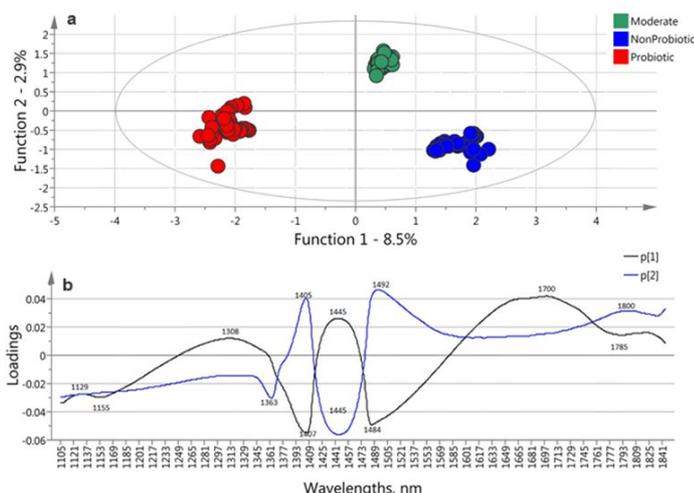


図 2 *Lactobacillus* 株の OPLS-DA1 モデル培養時間 (11.4-12 h (n = 150))、波長領域 (1100-1850 nm)、プロバイオティクス株、中間株、ノンプロバイオティクス株を識別: a. スコアプロット、b. ローディングプロット

#### 結論

NIR スペクトル分析により、バクテリアの非常に正確な定量分析および定性分析がなされ、水の水スペクトルパターンをプロバイオティクス識別のバイオマーカーとして利用できる可能性を示した。

### (3) プロバイオティクス菌株の成長ステージ識別モデルの構築

#### 目的

アクアフォトミクスの、プロバイオティクス識別のバイオマーカーとしてのさらなる可能性を追求し、バクテリアの成長ステージを識別するためのモデルを構築する。

#### 実験方法

人工胃液耐性と人工胆汁耐性の耐久性能の異なる 5 つのプロバイオティクス株と 4 つのノンプロバイオティクス株

(Lactobacillus 属)を使用した。実験の手法については、(2)項と同様である。

#### 結果と考察

増殖曲線の4次微分係数に基づく典型的な培養液増殖のWiddel's model(Widdel 2010)に従って、5つの増殖ステージを検出することができた。(図3) 株の生理学的な状態を正確に評価するために、バクテリアの成長サイクルの正確な識別は必要不可欠である。全培養時間のスペクトルを用いてPCAとSIMCAによりバクテリアの分類を行ったところ、フリーな水分子(Headrick et al. 2005)と、プロトン化水分子に相当する波長で大きな構造変化が見られた。これらの波長は、株の分類において最も重要である。

5つの増殖ステージについてSIMCA(Soft Independent Modeling of Class Analogy)解析を行った結果、初期の対数増殖期(exponential phase)においてLactobacillus株のグループを正確に分類できた。(図4, phase III and IV)

さらにPhase IVにおけるアクアグラムを計算した。(図5) プロバイオティクス株(耐性株)は吸光度とは逆に、1118.5~1198.5 nmの水の第二倍音、結合音領域で高い値を示す。1217.5~1224.5 nmでは、中間株とノンプロバイオティクス株(敏感株)で高い値を示した。耐性株グループ、敏感株グループともに、それぞれ、スペクトルパターンの似ている株は性質が似ており、スペクトルパターンの異なるものは似ていない傾向があった。中間株はどちらかと言うと敏感株と傾向が似ている。

アクアグラムに表示した波長(1160 nm および 1168 nm)は、プロトン化水分子の特徴であり、 $[H^+ \cdot (H_2O)_4,5] - H_3O^+$ の第二倍音の対称及び非対称伸縮振動の非対称OH伸縮振動によって表される。また、1217nm付近のバンドは水の第二倍音に帰属される。

人間の消化管におけるプロバイオティクス性能の評価については、本実験とは異なる様々なアプローチがなされてきた。従来法による選定における欠点は、プロテオミクス、ゲノミクスといったomicsアプローチにより克服されてきた。我々は、新たに、アクアフォトミクスが強力なツールであり、プロバイオティクスLactobacillus株の迅速な選定に効果的に利用できることを示し、その非侵襲的な方法論は、有力な候補株の迅速で包括的な調査を可能にした。

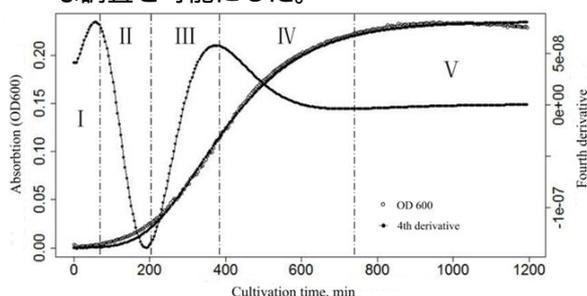


図3 Lactobacillus 株の増殖曲線

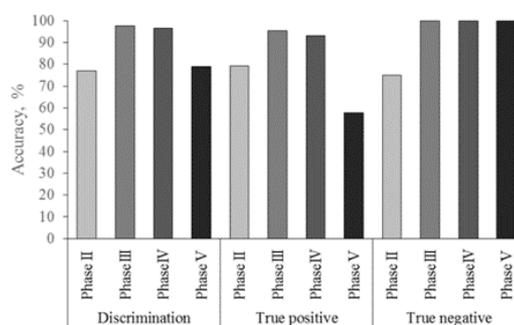


図4 SIMCA 分類結果(1100-1300 nm, n = 2700)

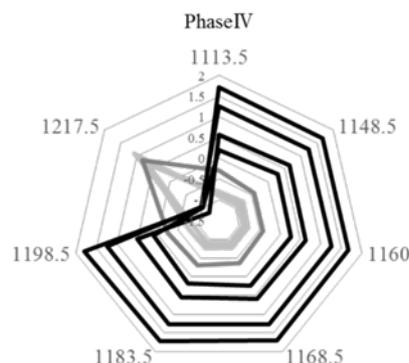


図5 Lactobacillus 株のPhase IVにおけるアクアグラム 黒線(プロバイオティクス株) 濃灰線(中間株) 淡灰線(ノンプロバイオティクス株)

#### 結論

1100-1300 nmの水の第二倍音、結合音領域の自由水分子、非対称OH伸縮振動、プロトン化水分子のバンドにおいて、株の耐性に関する有益な情報を得た。これらの違いは、異なる細胞代謝物および他の化学物質の存在の影響であり、あらゆるグループのバクテリア株の表現型の参考となるものである。

#### (4) 総括

本研究で植物とバクテリアの細胞を調査したことで、NIRとアクアフォトミクスの組み合わせは、近赤外線領域を網羅する水の水の全ての倍音領域において、細胞およびその機能性の識別、細胞の発達ステージの決定に最適であることが示され、新しい生体計測技術の確立に寄与することができた。今後の目標は、バイオマーカーとなるスペクトルパターンの波長マトリックスをより充実させ活用するために、水の特徴的バンドを正確に同定し、分光器やデータ解析手法やソフトウェアといったアクアフォトミクスツールをさらに発展させることである。それによってバイオテクノロジーおよび食品生産の場において、単成分分析から、直接的なin vivoでの機能分析、定性分析への変革を大きく推進させることになる。さらに科学分野においては、生体の大部分を占める水の役割についての、新しい現象理解に繋がるだろう。

## 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11件)

Bazar G, Kovacs Z, Tsenkova R, Evaluating spectral signals to identify spectral error, PLOS ONE、査読あり、11、2016、pp.1-15、[org/10.1371/journal.pone.0146249](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146249)

Kovacs Z, Bazar G, Oshima M, Shigeoka S, Tanaka M, Furukawa A, Nagaia A, Osawa M, Itakura Y, Tsenkova R, Water spectral pattern as holistic marker for water quality monitoring, TALANTA、査読あり、147、2016、pp. 598-608、[10.1016/j.talanta.2015.10.024](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.024)

Slavchev A, Kovacs Z, Koshiba H, Nagai A, Bazar G, Krastanov A, Kubota Y, Tsenkova R, Monitoring of water spectral pattern reveals differences in probiotics growth when used for rapid bacteria selection, PLOS ONE、査読あり、10、2015、pp. 1-18、[org/10.1371/journal.pone.0130698](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130698)

Bazar G, Kovacs Z, Tanaka M, Furukawa A, Nagai A, Osawa M, Itakura Y, Sugiyama H, Tsenkova R, Water revealed as molecular mirror when measuring low concentrations of sugar with near infrared light, ANALYTICA CHIMICA ACTA、査読あり、896、2015、pp. 52-62、[10.1016/j.aca.2015.09.014](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.014)

Goto N, Bazar G, Kovacs Z, Kunisada M, Morita H, Kizaki S, Sugiyama H, Tsenkova R, Nishigori C, Detection of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by near-infrared spectroscopy and aquaphotomics, SCIENTIFIC REPORTS、査読あり、5、2015、pp. 1-13、[10.1038/srep11808](https://doi.org/10.1038/srep11808)

Koshiba H, Slavchev A, Kovacs Z, Kubota Y, Tsenkova R, Easy and rapid screening of probiotic strains, JOURNAL OF THE JAPANESE SOCIETY OF AGRICULTURAL MACHINERY AND FOOD ENGINEERS、査読あり、77、2015、pp. 146-150

[学会発表](計31件)

Kovacs Z, Discovering the rules of water in biology using Aquaphotomics、International Symposium on Aquaphotomics: Water Spectroscopy and Quantum Electrodynamics in Biology.、2016.03.11、神戸大学

Tsenkova R, Aquaphotomics: Near infrared spectroscopy and water states in Biological systems, SAB Annual Meeting、2015.11.2-6、Santiago(Argentine)

Tsenkova R、Aquaphotomics:Water Spectral Pattern Reveals UV Induced Changes of DNA and Identifies Bacteria Functionality、Physics, Chemistry and Biology of Water、2015.10.1-4、Bulgaria  
Tsenkova R, Aquaphotomics-radically new

scientific platform for bio-and food technology、Aquaphotomics at CREA-FLC、2015.9.25、Lodi(Italy)

Tsenkova R、Aquaphotomics : Water Spectral Pattern as Molecular Mirror、EXPO 2015 NIR seminar in cooperation with ChemMed、2015.9.24、Milano(Italy)

Tsenkova R、Aquaphotomics leading to disease diagnosis and understanding、Bulgarian Academy of Science、2015.9.14、Sophia(Bulgaria)

小柴春樹、スラヴチェヴ アレクサンダー、コバチ ゾルタン、長井愛理、ツェンコヴァ ルミアナ、近赤外分光法及び Aquaphotomics を用いた Lactobacillus 属菌株のヒトの消化液耐性評価、第 30 回近赤外フォーラム、筑波大学、2014.11.26-28

Kovacs Z., Ohmido N., Bazar G., Tsenkova R.、Monitoring of the development of somatic and callus rice cells using aquaphotomics.、5<sup>th</sup> Kobe University Brussels European Center Symposium、2014.10.14、Brussels(Belgium)

Koshiba H., Slavchev A., Kovacs Z., Nagai A., Tsenkova R.、Near Infrared Spectroscopy (NIRS)and Aquaphotomics for Understanding Probiotic Lactic Acid Bacteria(LAB)、The 17th International Diffuse Reflectance Conference、2014.8.2-8、Chambersburg Pennsylvania(USA)

[図書](計2件)

Tsenkova R,Kovacs Z,Kubota Y, Springer International Publishing、Aquaphotomics:Near Infrared Spectroscopy and Water States in Biological Systems In: Disalvo E Anibal(Editor)Membrane Hydration、2015、284(189-211)

Toshiyuki Wako, Nobuko Ohmido 他、CRC Press、Plant Image Analysis:Fundamentals and Applications.Advances in Imaging Methods on Plant Chromosomes.、2014、30

[その他]

ホームページ等

神戸大学農学研究科生体計測工学研究室 HP  
[http://nirslab.org/index\\_ja.html](http://nirslab.org/index_ja.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

ツェンコヴァ ルミアナ(TSENKOVA Roumiana)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：30294200

(2)研究分担者

近江戸 伸子(OMIDO Nobuko )

神戸大学・人間発達環境学・教授

研究者番号：30343263