

# 関西学院大学 研究成果報告

2021年 5月 7日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学部生命医科学科  
職名：教授  
氏名：佐藤 英俊

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input checked="" type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	超微小領域 ( $5 \times 10^{-15}$ L) での糖濃度計測が可能な光学分析技術の開発と応用
研究実施場所	理工学部 V 号館 3 階 佐藤研究室
研究期間	2017年4月～2020年3月 ( 36 ヶ月)

## ◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

糖濃度の測定には、一般的に糖度計が用いられる。糖度計は屈折率の変化を計測して糖度を求める。一方、生体中に存在する糖には多くの種類がある。甘味料として利用されるグルコース（ブドウ糖）、フルクトース（果糖）などの単糖類、スクロース（ショ糖）、マルトース（麦芽糖）などの二糖類、オリゴ糖類などの他、エネルギー源となるデンプン、ヒトは分解できないセルロースやカラギーナンなどの多糖類も全て糖の一種である。糖の種類によって屈折率は異なり、また同様に屈折率に影響を与える塩が含まれると測定値は不正確になる。屈折率の測定には糖溶液とガラスの接触面が必要であり、微小な試料や非破壊の「その場分析」は困難である。近年は近赤外（NIR）分光法を用いた糖度測定により、果物などの糖度を非破壊的に分析する手法が実用化されている。NIR分光法ではその場分析が可能であるが、例えば細胞内の糖濃度など微小領域ではランベルト-ベール則が適用できず、分析が困難になる。

我々の目的は、「生体濃度」での糖の「局所分析」を実現することにある。生細胞分析にも利用されるラマン分光法を基礎とする着想を得た。ラマン分光法を用いた糖濃度分析は、飲料や糖蜜など高濃度での応用に関する報告があったが、生体内レベルの低濃度の分析例は、我々が調べた限り報告されていなかった。糖はグルコースやフルクトースなどの単糖類が構成単位となり、多数の単糖が結合して多糖類が形成される。分子構造を反映する振動分光法では、多くのバンドが重なり合って現れ、ノイズが多いスペクトルでは正確な分析が困難で

あった。従って、ラマンスペクトルを分析するために多変量解析法の応用が必須である。

本研究ではラマン顕微鏡を用い、微小領域 ( $5 \times 10^{-15}$  L) で各種糖類が共存する状況において、特定の糖の濃度分析を行う事を目指した。分光分析で定量分析を行う場合、最小二乗回帰分析 (PLSR) 法などの多変量解析技術を用いて解析モデルを作ることが一般的である。しかし、多数のよく似た糖類が共存する環境で個別の糖を分析するためには、解析モデルを作るためのモデル試料が必要である。例えば、3種類の糖が混ざった溶液で10段階の濃度変化を定量する場合、原理的には $10^3=1000$ 以上のモデル試料が必要となり、実用的では無い。モデル試料の数を減らすと、解析モデルの頑健性 (Robustness) が低下する。我々は、生体中で、グルコースやマルトースのような単糖類や二糖類が、デンプンなどの多糖類から酵素反応によって作り出されることに注目した。すなわち、酵素反応で作られる小さな糖と、多糖類の濃度の間には、酵素反応が規定するある程度の範囲内で、関係性があると考えられる。例えば、糖分解酵素であるアミラーゼは、一定の法則でデンプンの分解を進める。さらに、分析する糖によって、解析モデルに用いるスペクトル範囲を選択する方法をとった。その結果、デンプン、グルコース、マルトースの混合となる糖分解系において、数十程度のモデル試料数で精度の高い定量分析ができることを示した。モデル試料の減少は分析コストの削減につながり、実用化では重要なファクターである。本研究の内容は国際学術誌、*Applied Spectroscopy*に掲載された。

次に、定量分析技術に加えて微小領域計測の能力を活かし、ラマンイメージングで糖の原料となる多糖類の分布を、植物体内で画像化することに成功した。多糖類であるカラギーナンは、食品や美容の分野で用いられる安全な糖材料である。カラギーナンは熱帯地方の海に生息する紅藻類、キリンサイに多量に含まれている。インドネシアなどでは大きな養殖産業となっており、我が国も多量に輸入している。キリンサイのアイスアイス病はカラギーナン収量を左右する事が知られているが、その研究はほとんど進んでいない。また、藻類についてはラマン分光研究の報告例が少ない。藻類に含まれる光合成色素がラマン測定を強く妨害するからである。我々は、キリンサイを天日干しすることによって光合成色素が分解し、ラマン分光分析が可能になることを見いだした。3次元 (3D) ラマンイメージング技術を用い、カラギーナンのスペクトル情報からその濃度を求め、キリンサイ枝内の3Dの濃度マップを作ることに成功した。本研究の結果は国際学術誌、*J. Appl. Phycol.*に掲載された。カラギーナンを分解する能力を持つ細菌を探索した結果、複数の候補を発見するに至ったが、遺伝子解析などでは菌種の特定に至っていない。

本研究を進めるために貢献した学生のうち、博士学生1名は本研究の成果によって博士号を得た。また、3D解析ソフトウェアの開発など、新しい研究を推進することができ、2名の修士学生の修士論文において、本研究の成果が活かされた。本研究の成果は、ラマンハイパースペクトラルイメージの解析技術とソフトウェアに関する研究として、当研究室に引き継がれて発展している。

1. A. Maharadika, B.B. Andriana, AB Susanto, H. Matsuyoshi, and H. Sato, Development of quantitative analysis techniques for saccharification reactions using Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* **72**, 1606-1612 (2018)
2. A. Maharadika, B.B. Andriana, AB Susanto, H. Matsuyoshi, and H. Sato, Application of imaging Raman spectroscopy to study the distribution of kappa carrageenan in the seaweed *Kappaphycus alvarezii*, *J. Appl. Phycol.* 1-8 (2018).

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構 (NUC)

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。