

## 2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 石垣 美歌 (理工学研究科尾崎研究室)

研究課題 1. バイオエタノール原料中グリコーゲン濃度定量評価  
2. 液体肥料成分の分光分析  
3. 分光分析を用いた魚卵及びマウス受精卵の発生モニタリング及び卵質の判別分析

研究期間 2014年4月1日～2015年3月31日

研究成果概要

2014年度は、近赤外分光法を用いたバイオエタノール原料中グリコーゲン濃度定量評価及び液体肥料成分の分析、魚卵・マウス受精卵の発生モニタリング及び卵質の判別分析研究を行った。

まずバイオエタノール原料中のグリコーゲン濃度定量評価は、(株)住友電気工業と当研究室とが共同で開発した Composition を用いて行われた。バイオエタノールは環境問題から注目されてお

り、将来的なマーケットを考えると、リアルタイムなグリコーゲン濃度の定量評価技術の開発が求められている。そこでまず、バイオエタノール発酵過程 (0h～72h) における培養液中の複数成分 (グルコース・キシロース・キシリトール・グリセロール・アセテート・エタノール) の濃度を、部分的最少二乗法 (PLS) を用いて定量評価を行った。その結果 C-H, O-H 結合に関するバンド

により、98%以上の精度で定量評価を行うことができた。次に、バイオエタノールの原料である 6803 という藻の培養過程において、細胞内に蓄積したグリコーゲン濃度の定量分析を行った。その結果、図 1 に示すように 95%以上の精度で定量評価を行うことができた。以上の解析結果をまとめ、現在論文作成中である。

次に液体肥料成分の分光分析では、遠紫外 (FUV), ラマン (Raman), 赤外 (IR), 近赤外 (NIR) の4つの分光法を用いて、液体肥料中に含まれる窒素、リン酸、カリウムの複数成分の定量分析を行った。液体肥料の成分濃度は、特に水耕栽培における肥料として用いる際、植物に取り入れられた成分を評価する時に重要な情報となる。植物や成長過程における窒素、リン酸、カリウムの摂取量が異なるため、水耕栽培における溶液中の各成分濃度の

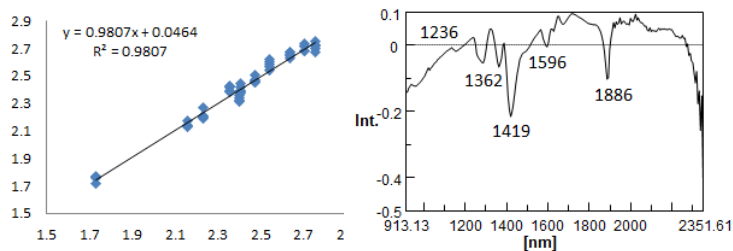


図 1: (左) SNV 処理後の吸光度スペクトルを用いて PLS 解析を行った際の検量線。(右) PLS 解析の Factor3。水由来の OH 基のバンドにより濃度を判別。

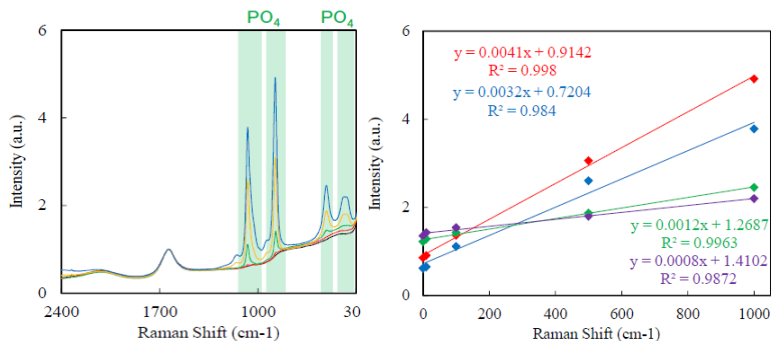


図 2: (左)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  の濃度を変化させた時のラマンスペクトル。(右)  $386\text{ cm}^{-1}$ ,  $511\text{ cm}^{-1}$ ,  $876\text{ cm}^{-1}$ ,  $1073\text{ cm}^{-1}$  を用いて計算した  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度の検量線。

の

変化をリアルタイムにモニタリングし、植物に必要な成分を随時注入することで、植物の成長をより促進することができると期待されるからである。そこで、市販の液体肥料に $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を加え、PLS解析により各成分の定量評価を行った。その結果、FUVでは $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 以外の成分は205nmのバンドを用いて99%以上の精度で、Ramanでは700、1050、1400 $\text{cm}^{-1}$ 付近の $\text{NO}_3$ と390、510、880、1070 $\text{cm}^{-1}$ 付近の $\text{PO}_4$ のバンド（図2）を用いて98%以上の精度で、各成分の定量評価を行うことができた。また、IRでは $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ については1340 $\text{cm}^{-1}$ 付近の $\text{NO}_3$ のバンドと936、1074、1152 $\text{cm}^{-1}$ の $\text{PO}_4$ のバンドを用いて、さらにNIRでは $\text{NH}_4\text{NO}_3$ については4640 $\text{cm}^{-1}$ 付近のNHのバンドを、他の2つについては5080、6830、7080 $\text{cm}^{-1}$ 付近のOHに代表される水との相互作用により、それぞれの各成分濃度を98%以上の精度で定量評価を行うことができた。このことから、水耕栽培における溶液中の各成分濃度の変化をモニタリングできる可能性が示唆された。

さらに分光分析を用いた受精卵の発生モニタリング及び卵質の判別分析において、まずメダカの受精卵を用いた研究では、受精から孵化までの近赤外スペクトルと近赤外イメージングにより、発生過程における脂質(4336 $\text{cm}^{-1}$ )、タンパク質(4864 $\text{cm}^{-1}$ )の変化をモニタリングした。その結果、受精卵を構成する油滴、卵黄、細胞質の3つの要素におけるそれらの物質の偏在を可視化することができた（図3）。さらに、タンパク質と脂質のバンド強度や主成分分析を用いることで、油滴、卵黄部分で孵化直前に起こる急激な生体物質の変化を捕えることができた。以上の解析結果をまとめて、現在論文作成中である。

最後に、マウス受精卵の質の判別研究においては、ラマン分光法を用いて未受精卵、前核期、2細胞期、4細胞期、8細胞期のラマンスペクトルを取得し、形態学的に見て質の良い卵とそうでない卵の物質の違いについて解析を行った。その結果、質の良くない卵では脂質の成分が相対的に多く含まれていることが分かった。また卵割が進むにつれて、タンパク質の2次構造が $\alpha$ -helixリッチなものから $\beta$ -helixリッチな構造へと変化していく結果が、主成分分析により得られた。今後これらの結果を用いて、卵内物質のラマンイメージングを作成し、受精卵発生過程のモニタリングを行う予定である。

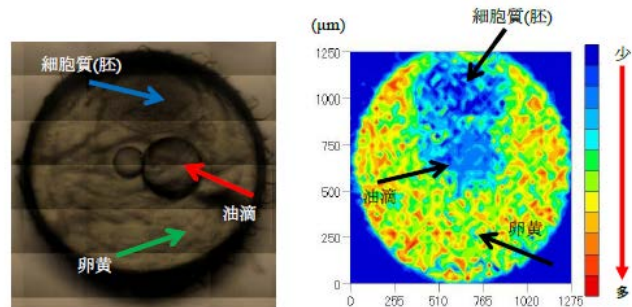


図 3: 受精 1 日目メダカ受精卵の近赤外イメージング (タンパク質)

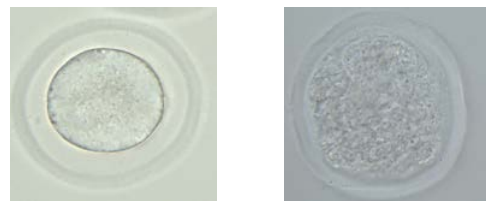


図 4: (左) 質の良い未受精卵。(右) 質の悪い未受精卵。

## 業績一覧

### 論文

- Raman spectroscopy in studies on live cells and tissues. Hidetoshi Sato, Akinori Taketani, Kamila Moor, Kosuke Hashimoto, Meksiarun Phiranuphon, Yasuhiro Maeda, Mika Ishigaki, Bibin B. Andriana. *Advanced Science, Engineering and Medicine* 6.8 (2014): 899-901.
- The discrimination of fish egg quality and viability by using Raman spectroscopy. Mika Ishigaki, Akinori Taketani, Hidetoshi Sato. *Analytical Methods* 6.23 (2014): 9206-9211.
- Imaging of Hydrophilicity and Its Inhomogeneity on a Titanium Dioxide Film Exposed to UV Irradiations by Using the Newly Developed NIR Camera (Compovision). Ichiro Tanabe, Daitaro Ishikawa, Daiki Furukawa, Mika Ishigaki, Takeyoshi Goto, Asako Motomura, Yoko Igarashi, and Yukihiro Ozaki. (発表予定)
- Diagnosis of esophageal cancer in an early stage by Raman spectroscopy with chemometrics techniques. Mika Ishigaki, Yasuhiro Maeda, Akinori Taketani, Bibin B Andriana, Ryu Ishihara, Kanet Wongravee, Yukihiro Ozaki, Hidetoshi Sato. (発表予定)
- Near-Infrared Spectra and Near-infrared Imaging Studies of Growth of Fertilized Egg of Medaka -In-vivo monitoring of the growth of the egg at the molecular level. Mika Ishigaki, Shoya Kawasaki, Daitaro Ishikawa, Yukihiro Ozaki. (発表予定)

### 学会発表

- 尾崎幸洋, 石川大太郎, 石垣美歌, 近赤外イメージングの装置開発とその分光分析への応用、日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月 17 日~19 日 (広島大学 東広島キャンパス)
- 石垣美歌, 橋本剛佑, 小川直哉, 尾崎幸洋, 佐藤英俊, ラマン分光法によるマウス受精卵の分子プロファイリング及びイメージング, 日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 17 日~19 日 (広島大学 東広島キャンパス)

### ポスター発表

- M. Ishigaki, K. Hashimoto, N. Ogawa, D. Ishikawa, D. Furukawa, Y. Ozaki, H. Sato: The discrimination of fish egg quality and viability by using Raman spectroscopy. SPEC (Aug. 2014 in Poland)
- Daitaro Ishikawa, Mika Ishigaki, Daiki Furukawa, Asako Motomura, Yoko Igarashi, Yukihiro Ozaki: Evaluation of Crystallinity in Poly Lactic Acid during Photolysis Process by Using a Newly Developed NIR Camera (Compovision), Scix2014, FACSS, 28 September – 3 October 2014 (Reno, Nevada, U.S)
- Mika Ishigaki, Yasuhiro Maeda, Bibin B Andriana, Ryu Ishihara, Akinori Taketani, Hidetoshi Sato: The analysis of early esophageal cancer by Raman spectroscopy, Biomedical Molecular Imaging 2014, 6 – 8 November 2014 (Taipei, Taiwan)
- K. Morimoto, M. Ishigaki, K. Hashimoto, N. Ogawa, H. Sato, Y. Ozaki: Analysis of mouse embryo by Raman spectroscopy, Biomedical Molecular Imaging 2014, 6 – 8 November 2014 (Taipei, Taiwan)
- 安田充, 曾采薇, 石垣美歌, 尾崎幸洋: 最培養液成分の近赤外光析, 第 30 回近赤外フォ

- ーラム 2014 年 11 月 26 日～ 28 日(筑波大学大学会館)
- 古川大貴, 石川大太郎, 佐藤春, 石垣美歌, **Kummetha Raghunatha Reddy**, 尾崎幸洋, 近赤外・分光法とそのシフトイメージングによるポリ乳酸ステレオコンプレックスの結晶構造形成, 第 30 回近赤外フォーラム, 2014 年 11 月 26 日～ 28 日(筑波大学 大学会館)
  - 川崎翔矢, 石垣美歌, 古川大貴, 石川大太郎, 安田充, 尾崎幸洋, 近赤外イメージングを用いたメダカ受精卵の分析, 第 30 回近赤外フォーラム 2014 年 11 月 26 日～ 28 日(筑波大学 大学会館)

#### **獲得研究資金**

- 科学研究費助成事業 挑戦的萌芽研究「ラマン分光法を用いた“受精卵の質”の判別」 課題番号：25560212 採択費 377 万円(間接経費込) H.25～H.27
- 日本学術振興会 特別研究員 採用内定 H.27.4.1 ～H30.3.31