

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07028

研究課題名(和文)単一生細胞内ミトコンドリア質量分析法の開発とミトコンドリオミクスの実現

研究課題名(英文)Development of mitochondrial mass spectrometry in live single-cell.

研究代表者

水野 初 (Mizuno, Hajime)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：30457288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内のミトコンドリアに局在する代謝物の網羅的解析を1細胞レベルで実現するため、細胞内のミトコンドリアを選択的に採取するためのナノスプレーチップの開発と蛍光顕微鏡によるミトコンドリア選択的サンプリング法の開発、チップ内誘導体化によるミトコンドリア中の微量代謝物の高感度質量分析法を開発した。さらに、これらの方法をがん細胞ミトコンドリア分析に適用し、がん細胞に特徴的な代謝物プロファイルを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生命活動に重要な役割を担うミトコンドリアの詳細な機能解明のため、細胞内のミトコンドリアのみを選択的にサンプリングして質量分析を行うことが可能な分析法の開発を目的としている。本方法の実現により、これまでの大量細胞分析では難しかったミトコンドリア内の代謝動態を調べることができ、がんなどの疾患メカニズム解明や治療法開発につなげることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to metabolomics in mitochondria at the single-cell level, we developed a nanospray tip and sampling method for collecting intracellular mitochondria under the fluorescence microscope observation. We also developed a highly sensitive MS analysis method for a trace amount of metabolites in single-cell mitochondria by in-tip derivatization. These methods were applied to a single cancer cell mitochondrial metabolomics to analyze the metabolic profile of cancer cells specifically.

研究分野：分析化学

キーワード：ミトコンドリア メタボロミクス 質量分析 1細胞分析 誘導体化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 多細胞を用いる従来型メタボロミクスの問題点

生体中存在するアミノ酸や脂質などの代謝物は様々な種類が存在し、これらが反応・代謝される過程を示した詳細な代謝マップも作成され、生命現象に関する代謝物の役割も明らかになってきた。しかし、大量の細胞や組織をすりつぶして行う従来型メタボロミクスでは代謝物や代謝反応の細胞内位置情報が失われてしまう。詳細な細胞現象メカニズムの解明には、代謝物が細胞内の何処に存在し、どのように代謝されるかを調べるのが重要である。そこで代謝物の細胞内局在がわかる新規メタボロミクスの開発が必要となる。

### (2) 単一細胞ダイレクト質量分析法の開発

私たちはこれまでの研究で、生きている細胞を顕微鏡観察しながら細胞内成分を先端口径 2  $\mu\text{m}$  ほどの金属コーティングしたガラスキャピラリー (ナノスプレーチップ) に採取し、そのまま質量分析することで、細胞質や液胞などの細胞内小器官に存在する代謝物を検出することに世界で初めて成功した<sup>(1)</sup>。この方法は植物 1 細胞分析にも応用され、様々なアプリケーションを開発してきた<sup>(1,2)</sup>。しかし現状では、細胞内代謝物の採取量の調節が難しく熟練した操作が必要であり、質量分析結果のばらつきも大きい。得られたデータから代謝物の定性的はできていても定量的な議論を行うのは難しかった。そこで誰もが簡単に定量分析できる、サンプリング方法及び質量分析イオン化法の新規開発が必要である。

## 2. 研究の目的

ミトコンドリアは細胞にとって必要不可欠なエネルギー源である ATP の合成に加え、脂質の酸化やイオンの調節、細胞周期やアポトーシスの調節など、細胞の制御や、生命の維持や生命現象の発現に非常に重要な役割を担っている。ミトコンドリアの機能や細胞現象メカニズムを解明するうえで、ミトコンドリア内の代謝物局在やその動態を詳細に調べることによって遺伝子解析では分からない新たな代謝経路や機能が解明される可能性がある。

本研究では、細胞内に存在するミトコンドリア部位を選択的に採取し、質量分析することにより、ミトコンドリアに存在する代謝物を網羅的に検出する。さらに細胞の状態を定量的に評価し細胞現象発現等の判断するために、ミトコンドリア内の TCA サイクル、ATP などのエネルギー関連分子などの主要代謝物について高感度かつ定量的な分析が可能なミトコンドリアメタボロミクス (ミトコンドリオミクス) を実現する。さらに本手法を用いてがん細胞ミトコンドリオミクスに適用し、がん細胞の主要代謝物の詳細な代謝動態を解明し、病態解明や治療法や診断法の開発へと繋げる。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内ミトコンドリアの高精度選択的サンプリング法の開発

細胞内のミトコンドリア部位をナノスプレーチップで正確に採取するために、ミトコンドリア部位を選択的に蛍光染色するとともに質量分析でも検出されてミトコンドリア採取のマーカー及び内部標準となるプローブを開発する。さらに現在使用しているナノスプレーチップやサンプリング方法を改良し、ミトコンドリア部位のみを細胞質など他の細胞内成分が混入すること無く採取する方法を開発する。

### (2) ミトコンドリア成分の高感度・高精度質量分析法の開発

1 細胞から採取したミトコンドリアに存在する微量成分を高感度で質量分析するために、カチオン性官能基を有する誘導体化試薬を用いて、ナノスプレーチップ内で直接誘導体化して測定するための誘導体化イオン化法を開発する。

### (3) がん細胞ミトコンドリオミクスへの適用

がんモデル細胞のミトコンドリアを採取して質量分析することでミトコンドリア局在代謝物を検出・同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内ミトコンドリアの高精度選択的サンプリング法の開発

これまでの研究で作製した、ミトコンドリア局在光反応プローブを用いた代謝物分析の有用性を検証した。培養細胞に本プローブを投与し、蛍光顕微鏡観察によりミトコンドリアへの移行を確認後、UVA を照射することでプローブとミトコンドリア代謝物を反応させた。これらの細胞抽出液を従来法である LC/MS/MS 分析した結果、ピークの  $m/z$  値と MS/MS フラグメントからプローブが結合したと考えられるピークが 3,000 本ほど検出された。これらの中には、 $\beta$ -ケトグルタル酸やユビキノンなどの TCA 回路関連の代謝物が含まれていることから、本プローブにおけるミトコンドリア代謝物分析の有用性が示された。

蛍光顕微鏡を用いて蛍光染色した細胞内の特定部位をサンプリングするため、先端口径 2~3  $\mu\text{m}$  のナノスプレーチップを用い、ヒト肝臓がん細胞 (HepG2) 内のミトコンドリアなどの特定部

位の選択的サンプリング法の検討を行った。さらに採取した細胞成分をナノスプレッチアップ内で可溶化させるために、可溶化法およびイオン化溶媒への抽出条件の検討を行った。これらの結果、15 μmほどの大きさの細胞であればミトコンドリア部位をサンプリングし、再現性良くミトコンドリア成分をイオン化・質量分析することができるようになった。

また、薬剤を投与してホスホリピドーシスを誘導した細胞に生成された脂肪滴を蛍光染色し、本方法により脂肪滴のみを採取して質量分析した結果、投与した薬剤の未変化体と代謝物が脂肪滴に局在していることが明らかとなった<sup>(3)</sup>。これらの結果から本方法により細胞内の特定部位のサンプリングが可能であることが示された。

## (2) ミトコンドリア成分の高感度・高精度質量分析法の開発、がん細胞ミトコンドリオミクスへの適用

細胞内の微量代謝物を高感度かつ高精度に質量分析するために、夾雑イオンによるイオン化効率の低下やサンプル間のデータのばらつきへの影響について検討した結果、ナトリウムなどの塩に対するイオン化抑制による感度低下やデータのばらつきを防ぐためには、ナノエレクトロスプレーイオン化を用いることに加え、複数の安定同位体標識体を内標準物質によりデータの正規化を行うことが有用であることを見出した。

ミトコンドリア内の主要代謝物である TAC 回路上の有機酸を高感度分析するために、これらの代謝物のカルボキシ基に対してカチオン性の官能基を持つ誘導体化試薬と反応させ、ポジティブイオンモードで高感度に質量分析するための方法を開発した。本方法を1細胞質量分析に適用した結果、誘導体化によって100倍以上の高感度化を達成した。さらにがんおよび正常細胞を用いて検出された代謝物を比較したところ、両細胞間で特徴的なピークパターンが確認されたことから、がん化することによりミトコンドリアの代謝状態が変化することが示唆された。

## < 引用文献 >

- (1) Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification., H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Harada, T. Masujima., J. Mass Spectrom., 43, 1692-1700 (2008).
- (2) Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry., T. Fujii, S. Matsuda, M. L. Tejedor, T. Esaki, I. Sakane, H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Masujima, Nat. Protoc., 10, 1445-1456 (2015).
- (3) Analysis of the intracellular localization of amiodarone using live single-cell mass spectrometry., K. Yahata, H. Mizuno, E. Sugiyama, K. Todoroki, J. Pharm. Biomed. Anal., 205, 114318 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yahata Kenji, Mizuno Hajime, Sugiyama Eiji, Todoroki Kenichiro	4. 巻 205
2. 論文標題 Analysis of the intracellular localization of amiodarone using live single-cell mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114318 ~ 114318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2021.114318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukui Serina, Sugiyama Eiji, Mizuno Hajime, Sakane Iwao, Asakawa Daiki, Saikusa Kazumi, Nishiya Yuki, Amano Yuri, Takahara Kentaro, Higo Daisuke, Toyo'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Rapid chiral discrimination of oncometabolite DL 2 hydroxyglutaric acid using derivatization and field asymmetric waveform ion mobility spectrometry/mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 3489 ~ 3496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jssc.202100350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asakawa Daiki, Mizuno Hajime, Sugiyama Eiji, Todoroki Kenichiro	4. 巻 92
2. 論文標題 In-Source Fragmentation of Phenethylamines by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Toward Highly Sensitive Quantitative Analysis of Monoamine Neurotransmitters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 12033 ~ 12039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Hajime, Kato Yoshihiro, Sugiyama Eiji, Toyo'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Live Single-Cell Mass Spectrometry for Single Cell Organelle Molecular Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 38 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S20-08	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 水野 初、工藤 忍、杉山栄二、轟木堅一郎	4. 巻 55
2. 論文標題 Live Single-cell質量分析法による動物細胞内代謝物局在解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 92～99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 阪田晟、水野初、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 1細胞質量分析のためのがん細胞特異的代謝物の探索
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内大揮、阪田晟、加藤良浩、水野初、工藤忍、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 1細胞質量分析による細胞内リン脂質分析法の開発
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西島公佳、竹内大輝、加藤良浩、水野初、工藤忍、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化による一細胞内代謝物の高感度質量分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田真依、山口侑季乃、水野 初、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 ミトコンドリア代謝物高感度検出法の開発
3. 学会等名 第52回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内大揮、阪田晟、加藤良浩、水野初、工藤忍、坂根巖、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 1 細胞質量分析による細胞内リン脂質分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime Mizuno, Natsumi Tanaka, Takamitsu Sasaki, Iwao Sakane, Eiji Sugiyama, Toshimasa Toyo ' oka, Koichi Yoshinari, Shinobu Kudoh, Kenichiro Todoroki
2. 発表標題 Development of mitochondria metabolomics using a novel mitochondria-localized photpaffinity probe
3. 学会等名 68th ASMS Conference on Mass Spectrometry ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野 初、田中奈津美、佐々木崇光、南 哲平、杉山栄二、豊岡利正、吉成浩一、轟木堅一郎
2. 発表標題 トコンドリア局在型光反応プローブによる細胞内ミトコンドリア代謝物分析法の開発
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤良浩、水野 初、工藤 忍、杉山栄二、轟木堅一郎
2. 発表標題 Development of a live single-cell metabolomics using direct nanoESI-MS
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤良浩、田中奈津美、水野 初、工藤 忍、豊岡利正、轟木堅一郎
2. 発表標題 ダイレクトnanoESI-質量分析における網羅的イオン化補正法の開発
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 初、津山尚宏、轟木堅一郎、工藤 忍
2. 発表標題 1細胞オルガネラメタボロミクス実現に向けた試料採取・解析技術の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hajime Mizuno, Kenichiro Todoroki, Iwao Sakane, Naohiro Tsuyama, Shinobu Kudoh
2. 発表標題 Live Single-cell Mass Spectrometry technique which allows direct analysis of xenobiotics and endogenous compounds in a living cell
3. 学会等名 12th EBF Open Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中奈津美、水野 初、佐々木崇光、南哲平、杉山栄二、豊岡利正、吉成浩一、轟木 堅一郎
2. 発表標題 細胞内ミトコンドリア代謝物分析のための新規光反応プローブの開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第9回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 初、田中奈津美、佐々木 崇光、南 哲平、杉山 栄二、豊岡 利正、吉成 浩一、轟木 堅一郎
2. 発表標題 ミトコンドリア局在型光反応プローブによる細胞内ミトコンドリア代謝物分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学薬学部生体機能分子分析学分野 <a href="https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analchem/">https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analchem/</a>
---

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	佐々木 崇光  (Sasaki Takamitsu)  (20382674)	静岡県立大学・薬学部・客員共同研究員    (23803)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	田中 奈津美  (Tanaka Natsumi)		
研究協力者	加藤 良浩  (Kato Yoshihiro)		
研究協力者	西島 公佳  (Nishijima Kimika)		
研究協力者	藤田 真依  (Fujita Mai)		
研究協力者	阪田 晟  (Sakata Jo)		
研究協力者	竹内 大揮  (Takeuchi Daiki)		
研究協力者	山口 侑季乃  (Yamaguchi Yukino)		
連携研究者	轟木 堅一郎  (Todoroki Kenichiro)  (70341451)	静岡県立大学・薬学部・教授    (23803)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	杉山 栄二  (Sugiyama Eiji)  (90806332)	静岡県立大学・薬学部・助教    (23803)	

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