

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350041

研究課題名（和文）個体発生・細胞分化過程の金属支援生体機能科学“メタロミクス”研究の推進

研究課題名（英文）Metalloomics of cells and organisms at different stages of development

研究代表者

梅村 知也(UMEMURA TOMONARI)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・准教授

研究者番号：10312901

研究成果の概要（和文）：細胞や組織、臓器などの微量の生体試料に対応した微量元素分析技術の開発に取り組むとともに、それらの技術を応用して、大腸菌やユーグレナ、さらにサケ受精卵の胚部分の網羅的な元素分析を実施した。これらの結果を通して、細胞内には Na、Mg、K、Ca 等の常量元素から Co、Mo、Ni、Cd、さらに U や REEs（希土類元素）等の超微量元素まで、あらゆる元素が存在していることを実証した。また、個体発生や細胞の分化・増殖の過程において、細胞内元素濃度に変化が見られたことから、元素が選択的に取り込まれ利用されていることが強く示唆される結果を得た。

研究成果の概要（英文）：In the "omics" era, there is a great need for comprehensive genome-wide multi-element analysis of a single cell and organism, because the combination of different metals and metalloids may exhibit an additive, synergistic, or antagonistic effect on cellular functions. Thus, we have had an intense interest in determining what kind of and how many elements are involved in cells, organs and organisms. In this paper, we have carried out multielement analysis of single celled bacteria (*Escherichia coli*) and organism (euglena) as well as embryos of chum salmon at different stages of development. The experimental results revealed that trace elements were to some extent selectively transferred from the culture media (or yolk sac) to the cell (or embryonic body) at an appropriate timing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：メタロミクス・オミックス・1細胞分解・受精卵・必須微量元素・
金属タンパク質・高速分離・モノリス

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読以降、タンパク質の総体（プロテオーム）や代謝物質の総体（メタボ

ローム）を網羅的に解析するプロテオミクスやメタボロミクスといった“オミックス”研究が世界的に展開されている。さらに、それら

のオミックス情報を統合し、“オミックス情報の総体から生命現象や細胞システムの解読にせまる”システムバイオロジーやケミカルバイオロジーと呼ばれる研究分野が急速に進展しつつある。このような状況の下、本研究グループは、生命システムを紐解く鍵として微量元素に着目し、Cell Microcosm（細胞小宇宙説：細胞内には個体発生と生命維持に必要なあらゆる元素が存在し、それらを活用して生命活動は営まれているという概念）の実証研究に取り組むとともに、これらの研究領域をメタロミクス（金属支援生体機能科学）として提唱し、生体金属を中心に据えた生体システムの体系化を目指した研究を展開してきた（特別推進研究「新学問領域“メタロミクス”（Metallomics）の創成」、H16-H18、研究代表者 原口紘丞教授）。なお、メタロミクスという用語は、現在、国際純正・応用化学連合（IUPAC）でも認知された学術用語となり、2009年には Metallomics の名前を冠した雑誌が英国化学会から刊行されるに至っている。

歴史的に見てみると、元素の網羅的な定量（多元素同時分析）は、1980年代のプラズマ分光分析法の飛躍的な進歩に後押しされて、他のオミックス研究と比較しても早くから試みられてきた。実際、海水や堆積物などの地球科学的な試料の分析・解析においては極めて大きな役割を担ってきたが、組織や細胞等の微小試料に対応した装置の開発が進まず、生命科学の分野ではプロテオミクスやゲノミクスに後れをとることとなった。なお、これまでの時代はマグネシウムや鉄、亜鉛等の特定の元素に特化した研究が全盛であり、全体像を俯瞰する研究の重要性があまり認識されなかったことにも起因する。しかし、その後のオミックス研究の進展により、生体影響が共存する他の成分との相互作用（相乗作用や拮抗作用）によって変化することが明らかになるにつれ、全体像の把握の重要性が認識されるようになり、メタロミクス研究が隆盛を迎えることとなった。ただし、これまでの概念先行の状況から脱却してステップアップするためには、分析対象を選定して具体的な研究を実施していく必要がある。また、sub- μL の超微量のサンプルでの全元素分析、レーザーアブレーション等の技術の導入による極微小・局所領域の多元素分析、さらに1細胞を直接プラズマイオン源に導入して質量分析を行うためのインターフェースの開発など、細胞や組織を対象とした（ゲノムスケールに適した）デバイス・装置・技術の開発、研究整備が不可欠となっている。

2. 研究の目的

細胞には生命維持に必要なすべての情報（遺伝子）と要素（構造形成や生理活性

物質の合成に必要な成分、栄養成分など）が含まれている。また、必要に応じて、適宜、外部から物質を取り入れることによって生命活動は営まれている。本研究では、サケの受精卵細胞、大腸菌やユーグレナを分析対象として、これらを様々な条件で飼育・培養し、その全元素分析、さらに化学形態別分析を時系列で実施することにより、個体発生や分化・増殖の各過程でどのような元素がどれほど取り込まれているのか、またそれらの元素が細胞内でタンパク質などの生体分子とどのように協調して生命システムを維持しているのかを考察することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、細胞・組織を対象とした微量分析技術の開発【(1)-(3)】と実試料の分析及びデータベースの構築【(4)-(5)】で構成される。

(1) ICP-MS 用脱着式マイクロネブライザーの開発及びマイクロ波酸分解法のダウンサイジング

市販の同軸型ネブライザーにキャピラリー管を挿入して着脱式のマイクロネブライザーを試作した（図1）。また、微量の固体試料の酸分解を、サンプルロスと希釈、さらにコンタミネーションを抑えて行うために、酸分解容器のダウンサイジングと酸及び酸化剤の種類と量の最適化を試みた。

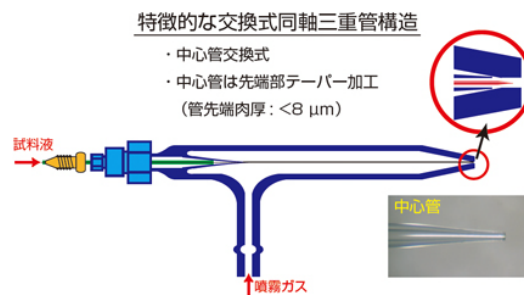


図1. 脱着式のキャピラリー挿入型ネブライザー

(2) 高性能モノリスカラムの作製とハイフネーテッド分析システムの構築

モノリスカラム技術により、タンパク質やDNAを精密分離するための有機ポリマー製モノリスカラムを試作した。また、高性能分離（高いピークキャパシティー）を実現するために、異なる分離モードのHPLC装置を2台接続した二次元分離分析システムを構築した。さらに、HPLCと無機質量分析装置（ICP-MS：誘導結合プラズマ質量分析計）、及び有機質量分析装置（MALDI-TOFMS：マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）を並列に結合させたハイフネーテッド分析システムを構築し、金属酵素、金属タンパク質の分析を通してその性能を評価した。

(3) プラズマイオン源への1細胞の直接導入技術の開発

1細胞を一つずつ等間隔(時間・空間)でプラズマイオン源に送入できるように、細胞懸濁液の濃度(cells/mL)、キャピラリー管の内径、さらに送液流量の最適化を図った。なお、本実験では、多元素同時計測が可能な飛行時間型の質量分析計を用い、スキャンニング計測時間の最適化も検討した。

(4) ゲノム解析の進んでいる大腸菌の網羅的な元素分析

LB培地やM9最小培地に様々な元素を添加して大腸菌を培養し、経時的に大腸菌をサンプリングした。洗浄、酸分解の後、ICP-MSで全元素分析を試み、細胞内元素数を算出した。増殖・成長の際に培地から取り込まれる元素を時系列で追跡することで、大腸菌の生育に寄与する微量元素を探索した(図2)。

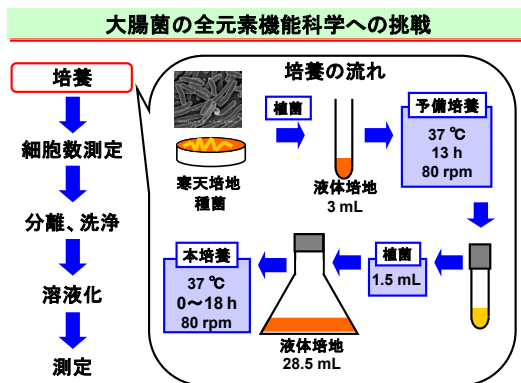


図2. 大腸菌の培養と元素分析実験の概略図

(5) サケ受精卵/仔魚の網羅的な元素分析

飼育管理が可能なサケの受精卵を、受精前から受精後稚魚期に亘って飼育した。成長段階毎にサンプリングし、胚部分を摘出して全元素分析を試み、経時変化を追跡した。また、成長の各段階で細胞質(卵黄囊)から胚へ移行し利用される元素のデータを収集し、個体発生や恒常性の維持に不可欠な微量元素を探索した(図3)。

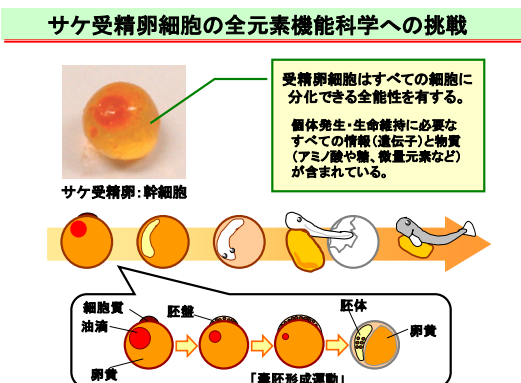


図3. サケ受精卵の胚発生過程の概念図

また、発生の過程(卵割、桑実期、胞胚期、発眼、孵化、仔魚)で発現してくる金属タンパク質、金属酵素の探索をHPLC/ICP-MSにより試みた。さらに、重金属を添加した水槽内でもサケ受精卵細胞を飼育し、通常飼育のサケ卵との結果を比較することで、重金属元素に対する耐性、許容範囲を検討した。

4. 研究成果

(1) ICP-MS用微量試料対応マイクロネブライザー/ループインジェクション試料導入システムの開発

内径75 μ m、外径150 μ mのキャピラリー管の挿入による噴霧口径の微小化とHPLC用のポンプを用いた定流量送液により、数 μ L/min~100 μ L/minの送液流量において微細液滴(直径が数 μ m以下)を効率よく生成させることに成功した。なお、このときの噴霧効率80%以上に達した。さらに、サンプルループを用いたループインジェクション(フローインジェクション)方式での試料導入により、従来比1/100から1/1000の試料消費量で従来と変わらぬ感度、精度を達成することに成功した。また、送液流量が1/100に低減されたことから、装置に及ぼす負荷が軽減され、有機溶媒100%、1mol/Lレベルの高濃度塩溶液をICP-MSに直接導入しても安定にプラズマを点灯させることが可能となった。

(2) マイクロ波酸分解法のダウンサイジング

数mgの固体試料をサンプルロスとコンタミネーションを極力抑えて完全に溶液化するために、内容量が1mLのPTFE(ポリテトラフルオロエチレン)製バイアル瓶を酸分解容器として使い、酸及び酸化剤の種類と量の最適化を図った。その結果、わずか10分程度で家庭用の電子レンジでも分解可能な条件を見出し、従来の数十分の1の試料量で定量的に分解することを可能とした。

(3) 内径1mmのモノリスカラムの試作とマイクロボアHPLC/ICP-MSシステムの構築

上記(1)で開発したマイクロネブライザーの流量に適したHPLC分離を行うために、モノリスカラム技術を応用して、内径1mmのマイクロボアカラムを試作した。タンパク質に結合している金属イオンの多くは、安定度定数が低いため、分析操作の過程においてタンパク質から脱離する。そこで、本研究では金属イオンの脱離が起こりにくい陰イオン交換モードのモノリスカラムの作製と分離条件の最適化を中心に検討した。イオン交換容量やグラジエント溶離条件の最適化を図った結果、温和な移動相条件下、市販カラムと同等ないしそれ以上の分離能で陰イオン交換分離を達成した。また、HPLCの後段にICP-MSを接続してヒト血清タンパク質の元素選択性検出を試みたところ、セルロプラスミンに結合した銅、トランスフェリンに結合

した鉄等のピークを明瞭に観察できた他、様々な微量元素が結合しているタンパク質・ペプチドの存在を明らかにすることができた。さらに、ICP-MS によるリンの選択的検出によりリン酸化タンパク質や DNA を高感度に定量することに成功した。一般に ICP-MS は ESI-MS のような有機質量分析法よりも感度が 2~3 桁高いため、プロテオーム解析の新たな切り口として期待される。

(4) 細胞直接導入/ICP-MS の試作と酵母細胞の多元素分析

細胞懸濁液の濃度 (cells/mL) をできる限り下げ、また、ネプライザーに接続するキャピラリー管の口径を細胞サイズ (10 μm 程度) にまで小さくすることで、1 個から数個の細胞をアルゴンプラズマに連続的に導入することを可能とした。また、多元素同時計測が可能な飛行時間型の質量分析計の採用とスキミング計測時間の最適化により、酵母細胞に関して、細胞 1 個で Mg, P, Ca, Fe, Cu, Zn 等の必須微量元素を同時定量することに成功した。今後、マイクロ流体デバイスを設計・試作し、細胞を並べて任意の速度で送液する技術を開発していく必要がある。

(5) サケ受精卵の発生過程における胚・仔魚中微量元素の網羅的な変動解析

数 mg 程度の微小な胚部分を摘出し、マイクロ波酸分解後、ICP-MS にて網羅的な元素分析を実施し、Na, Mg, K, Ca 等の常量元素から Co, Mo, Ni, Cd, U 等の超微量元素に至るまで、合わせて 47 元素の定量に成功した。受精後稚魚期まで経時的な濃度変化を追跡したところ、Zn, Fe, Se, Cu が発生の初期の段階において極めて高濃度で存在することが確認された。また、卵黄嚢から胚への元素の移行率を調査したところ、10%以下のものから 100%近いものまで実に様々であり、取り込まれる時期にも元素間で違いが見られた。これらの結果から、胚発生過程において元素が選択的に取り込まれ利用されていることが強く示唆された。さらに、受精卵の発育に及ぼす重金属曝露の影響を調査したところ、1 ppm の Cu, Zn, Pb に暴露させた受精卵では、死卵が増え、成長に遅れが見られた。この受精卵の内液を取り出し、HPLC/ICP-MS により化学形態別分析を実施したところ、メタロチオネイン様のタンパク質の合成が示唆される結果が得られた。

(6) 大腸菌、ユーグレナ 1 細胞に含まれる微量元素の存在度マップの作成

飼育が容易でゲノム解析の進んでいる大腸菌 (原核生物)、また、バイオ燃料や CO₂ 固定で注目を集めているユーグレナ (真核生物) を分析対象として、その網羅的な元素分析を実施し、1 細胞に含まれる元素の種類と個数を三次元周期表としてまとめた。一例として大腸菌 1 個に含まれる元素数を図 4 に示

す。ICP-MS により定量できた第三周期以降の微量元素のデータである。今後、こうした元素存在量マップをさらに多くの細胞や組織で系統的に調べ上げていくことで、元素の必須性や生命システムを理解する糸口が見つかるかと期待している。

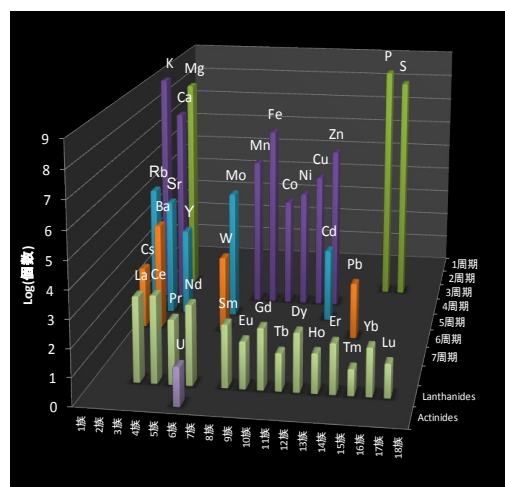


図 4. 3D 元素存在量周期表 (大腸菌 1 個に含まれる元素数)

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)

① Chemical Anchoring of Lauryl Methacrylate-Based Reversed Phase Monolith to 1/16" o.d. Polyetheretherketone Tubing
S. Shu, H. Kobayashi, M. Okubo, A. Sabarudin, M. Butsugan, T. Umemura, *J. Chromatogr. A*, **1242**, 59-66 (2012) 査読有り

② Atomic Mineral Characteristics of Indonesian Osteoporosis by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
Z. Noor, S. Sumitro, M. Hidayat, A. Rahim, A. Sabarudin, and T. Umemura, *The Scientific World Journal*, **2012**, Article ID 372972, 6 pages (2012) 査読有り

③ Development of Salt-Tolerance Interface for an High Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry System and Its Application to Accurate Quantification of DNA Samples
Y. Takasaki, S. Sakagawa, K. Inagaki, S. Fujii, A. Sabarudin, T. Umemura, H. Haraguchi, *Anal. Chim. Acta*, **713**, 23-29 (2012) 査読有り

④ Estimation of the Distribution of Intravenously Injected Adipose Tissue-Derived Stem Cells Labeled with Quantum Dots in Mice Organs through the Determination of their Metallic Components by ICP-MS

Y. Takasaki, M. Watanabe, H. Yukawa, A. Sabarudin, K. Inagaki, N. Kaji, Y. Okamoto, M.

Tokeshi, Y. Miyamoto, H. Noguchi, T. Umemura, S. Hayashi, Y. Baba, H. Haraguchi, *Anal. Chem.*, **83**, 8252-8258 (2011) 査読有り

⑤ Multielement Analysis of Micro-volume Biological Samples by ICP-MS with Highly Efficient Sample Introduction System

Y. Takasaki, K. Inagaki, A. Sabarudin, S. Fuji, D. Iwahata, A. Takatsu, K. Chiba, T. Umemura, *Talanta*, **87**, 24-29 (2011) 査読有り

⑥ Preparation and Characterization of Lauryl Methacrylate-Based Monolithic Microbore Column for Reversed-Phase Liquid Chromatography

S. Shu, H. Kobayashi, N. Kojima, A. Sabarudin, T. Umemura, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5228-5234 (2011) 査読有り

⑦ Chitosan Functionalized with di-2-propanolamine: Its Application as Solid Phase Extractant for the Determination of Germanium in Water Samples by ICP-MS

A. Sabarudin, T. Umemura, S. Motomizu, *Microchem. J.*, **99**, 34-39 (2011) 査読有り

⑧ Preparation of Monolithic Chelating Adsorbent Inside a Syringe Filter Tip for Solid Phase Microextraction of Trace Elements in Natural Water Prior to Their Determination by ICP-MS

D. Rahmi, Y. Takasaki, Y. Zhu, H. Kobayashi, S. Konagaya, H. Haraguchi, T. Umemura, *Talanta*, **81**, 1438-1445 (2010) 査読有り

⑨ Determination of REEs in Natural Water by ICP-MS with the Aid of an Automatic Column Changing System

Y. Zhu, A. Itoh, T. Umemura, H. Haraguchi, K. Inagaki, K. Chiba, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **25**, 1253-1258 (2010) 査読有り

⑩ Determination of REEs in Seawater by ICP-MS after on-line Preconcentration Using a Syringe-Driven Chelating Column

Y. Zhu, T. Umemura, H. Haraguchi, K. Inagaki, K. Chiba, *Talanta*, **78**, 891-895 (2009) 査読有り

⑪ Determination of Fe, Cu, Ni, and Zn in Seawater by ID-ICP-MS after Preconcentration Using a Syringe-Driven Chelating Column

Y. Zhu, K. Inagaki, K. Chiba, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **24**, 1179-1183 (2009) 査読有り

[学会発表] (計 38 件)

① プロテオミクス・メタロミクス研究への応用を目指したポリマーモノリスカラムの開発 (依頼講演)

梅村知也: 第 22 回クロマトグラフィー科学会議, 2011 年 10 月 20 日-22 日, さくらホール, 東北大学

② 放射線重合法によるモノリスの構造制御とオミックス研究への応用 (依頼講演)

梅村知也: 第 6 回高崎量子応用シンポジウム, 2011 年 10 月 13 日-14 日, 高崎シティーギャ

ラリー, 高崎

③ Comprehensive Trace Element Analysis of Cells and Organisms and Elemental Speciation Analysis by Multiply-Hyphenated Analysis System (招待講演)

T. Umemura, A. Sabarudin, Y. Takasaki, S. Sakagawa, K. Inagaki, H. Haraguchi: The 5th International Conference on Metals and Genetics, September 04-08 2011, Kobe, Japan

④ サケ受精卵細胞の分化過程の金属プロファイルリングアナリシス (招待講演)

梅村知也: 日本薬学会第 131 年会 特別シンポジウム “トキシコメタロミクスの新機軸—元素分析・イメージングと金属輸送・創薬のイノベーション—”, 2011 年 3 月 29-31 日, 静岡

⑤ メタロミクス研究を牽引するハイフネータッド分析システムの開発 (招待講演)

梅村知也: 第 2 回メタロミクス研究フォーラム, 2010 年 11 月 2 日-3 日, 京都

⑥ オミックス時代を生き抜くイオンクロマトグラフィー (依頼講演)

梅村知也: 第 26 回イオンクロマトグラフィー討論会, 2009 年 12 月 4 日-5 日, 伊香保

⑦ 放射線を利用した有機ポリマーモノリスの構造制御と分離機能材料の開発 (依頼講演)

梅村知也: 第 112 回ラドテック研究会講演会, 2009 年 4 月 16 日, 学士会館本館, 東京

[図書] (計 2 件)

① 改訂六版 分析化学便覧, 日本分析化学会編, 丸善 (分担執筆 5.4.4 メタロミクス) 2011

② 最先端メディカルエンジニアリング, 名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会編, Nagoya University eブックシリーズ 1 (分担執筆 モノリスカラム技術による分離分析法の高速化・高性能化, pp. 189-194) 2012

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 3 件)

① 名称: 液体クロマトグラフィー用カラム及びその製造方法

発明者: 佛願道男, 石井理紗, 梅村知也

権利者: 日立化成工業株式会社・日立化成テクノサービス株式会社・名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願第 2011-206335 号

出願年月日: 平成 23 年 9 月 21 日

国内外の別: 国内

② 名称: 噴霧器および分析装置

発明者: 稲垣和三, 藤井紳一郎, 高津章子, 千葉光一, 朱彦北, 黒岩貴芳, 中川孝郎, 阿部正昭, 高崎裕加, 梅村知也

権利者：(独)産業技術総合研究所・(株)エ
ス・ティ・ジャパン・名古屋大学

種類：特許

番号：特開第 2011-059030 号

出願年月日：平成 23 年 3 月 24 日

国内外の別：国内

③名称：液体クロマトグラフィー用カラム及
びその製造方法

発明者：梅村知也, 朱沁, 佛願道男

権利者：日立化成テクノサービス株式会社・
名古屋大学

種類：特許

番号：特開第 2012-008041 号

出願年月日：平成 22 年 6 月 25 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅村 知也(UMEMURA TOMONARI)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・准教
授

研究者番号：10312901

(2)研究分担者

稲垣 和三(INAGAKI KAZUMI)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標
準研究部門

研究者番号：50356490

朱 彦北(SYU YANBEI)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標
準研究部門

研究者番号：90422790

伴 真俊(BAN MASATOSHI)

独立行政法人水産総合研究センター・さけ
ますセンター

研究者番号：80425462