

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 1日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710187

研究課題名（和文） 組織内微小領域における代謝動態の時空間分解可視化

研究課題名（英文） Visualization of spatiotemporal metabolic dynamics in tissue micro-region

研究代表者

三浦 大典（MIURA DAISUKE）

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：40532627

研究成果の概要（和文）：

本研究課題は、申請者が開発した MALDI 法を基盤とした低分子量代謝物の超高感度測定法を質量分析イメージングへの応用を試みたものである。その結果、生命現象の物質的表現型であるメタボロームに時間・空間分解情報を付与し、世界に先駆けてこれまで全くの未知であった生体組織微小領域における代謝ダイナミクスを明らかとした。さらに、単一細胞から 100 を越える代謝物ピークを検出することに成功し、MALDI-MS によるシングルセルメタボロミクスの可能性を示す事に成功した。さらに、研究代表者は超高分解能質量分析が可能である FT-ICR-MS を用いる事で、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S 等の安定同位体に由来する同位体ピークが観測可能であることを発見し、標品非依存的にマススペクトルのみから一義的に組成式を決定することが可能な質量分析法および組成式決定アルゴリズムの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We successfully showed the applicability of a matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) system for getting chemically diverse metabolite profiles on a single-mammalian cell. This ultrahighly sensitive MALDI-MS technique enabled a spatially resolved detection of a broad range of metabolites including nucleotides, cofactors, phosphorylated sugars, amino acids, lipids, and carboxylic acids with their unique distributions. A combination of MS imaging and metabolic pathway analysis visualized a spatiotemporal behavior of metabolites in the central metabolic pathway regulated by an ischemia reperfusion in rat brain. Furthermore, we developed a novel strategy for determining the elemental composition of organic compounds using the peak ratio of isotopic fine structure observed by ultrahigh mass resolution mass spectrometric data.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：メタボローム

1. 研究開始当初の背景

メタボロミクスはゲノムの物質的最終表現型である代謝物を対象とするため、バイオマーカー探索や創薬ターゲットの同定、疾病発症メカニズム解明における重要性が強く指摘されている。一方、近年飛躍的に向上しつつあるメタボロミクス技術は、測定における種々の制約により組織からの代謝物の抽出・濃縮が不可欠である。結果的に得られる情報は生体組織全体の平均値となり、局所的なメタボローム変動情報は完全に消失してしまう。組織から二次元情報を保持しつつ直接代謝物を検出する技術があれば、疾患メタボロミクスやバイオマーカー探索における大きなブレイクスルーとなる。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化法 (MALDI 法) の超高感度化により、微量培養細胞を用いたハイスループットメタボリック・プロファイリング法を開発し、単一細胞メタボロミクスを達成した。本技術を質量分析イメージングに応用することで、生命現象の物質的表現型であるメタボロームに時間・空間分解情報を付与し、これまで全くの未知であった生体組織微小領域における代謝ダイナミクスを明らかとする。さらに本申請のキーテクノロジーである MALDI 法を先鋭化する事で、高等生物のシステム生物学的理解に資する新たな時空間分解・網羅的生体情報解析法を確立し、生体内局在情報を有する真のバイオマーカー探索技術への昇華を目指す。

3. 研究の方法

独自の基盤技術である「単一細胞レベルの検出感度による内在性低分子量代謝物の質量分析イメージング」をベースとし、

- a. マトリックス塗布条件の最適化
- b. 最適化した条件を用いたモデル動物組織内微小領域における代謝変動の時空間分解可視化
- c. 超高分解能質量分析装置を用いた標品非

依存的代謝物同定法の開発

上記三点について徹底的な検討を行った。以下に、具体的な内容を記す。

a. マトリックス塗布条件の最適化

申請者が既に見出していた低分子量代謝物の測定に適したマトリックスである **9-aminoacridine (9-AA)** は、質量分析イメージングに適用した例が存在しなかった。そこで、質量分析イメージング用サンプルの調製において重要な要因である、マトリックス溶媒・塗布量・温度・湿度について徹底的に精査し、最も高感度かつ均一な試料表面を作成できるサンプル調製法を検討した。

b. 最適化した条件を用いたモデル動物組織

内微小領域における代謝変動の時空間分解可視化

上記 a にて確立した手法を用いて、一過性中大脳動脈梗塞 (MCAO) 虚血-再灌流モデルラットを用いて、病態の進展に伴う脳内代謝動態の時空間分解可視化を試みた。

c. 超高分解能質量分析装置を用いた標品非依存的代謝物同定法の開発

質量分析イメージングでは測定原理上クロマトグラフィー等の分離技術との組み合わせが不可能であるため、代謝物の同定は困難を極める。そこで、超高分解能質量分析装置である FT-ICR-MS を用いて、質量分析データから一義的に組成式を決定できる測定法および計算アルゴリズムの開発を試みた。

4. 研究成果

a. マトリックス塗布条件の最適化

質量分析イメージングにおいて、サンプル調製法は測定感度や得られる画像データの均一性のみならず、結果の再現性に大きな影響を与えることから、慎重な条件検討が求められる。これまでに質量分析イメージングに用いられてきたマトリックスと異なり、**9-AA** は水への溶解性が非常に低いため、含水溶媒の使用が困難であった。そこで、比較的水溶性の高い有機溶媒数種類を用いて、**9-AA** の溶解性および質量分析イメージングに及ぼ

す影響について検討した。その結果、メタノールが最も高い溶解性を示した。さらに9-AAメタノール溶液を場合最も高い感度で測定出来る事を見出した。さらに、その他のパラメータについて検討した結果、エアブラシを用いて分速1.5 Lの流速、室温20°C、湿度約60%環境下にて試料表面に5 mg/mL 9-AA溶液を300 uL塗布することで、最も均一かつ高感度な測定が可能なサンプルを調製できることを見出した。

本手法の有用性および測定感度を検証するために、導電性スライドガラス上に培養したヒト培養細胞（HeLa 細胞）から直接代謝物測定が可能か検証した。その結果、単一細胞から100を越える代謝物ピークを検出することに成功し、MALDI-MSによるシングルセルメタボロミクスの可能性を示す事に成功した(図1)。

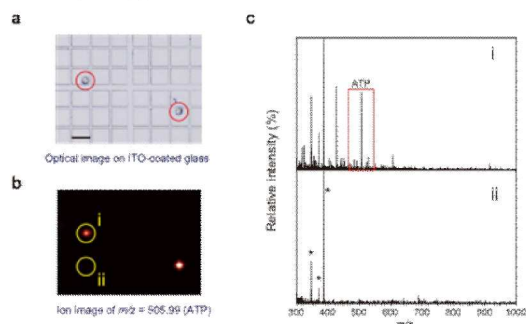


図1 単一培養細胞からの代謝物の直接検出

さらに、本条件にてサンプル調製を行ったマウス脳をモデル組織として用い、薄片片を作成後MALDI-MSにて測定しMSイメージングを行った。ネガティブイオンモードにて測定を行った結果、これまでに報告のあるリン脂質類の他に、生体内レドックス状態を反映する代謝物やエネルギー物質、セカンドメッセンジャー、中央代謝系(解糖系、TCA回路)中間体等が同定され、それぞれの組織内分布の可視化に世界で初めて成功した(図2)。

b. 最適化した条件を用いたモデル動物組織内微小領域における代謝変動の時空間分解可視化

上記aにて確立した手法を用いて、一過性中大脳動脈梗塞(MCAO)虚血-再灌流モデ

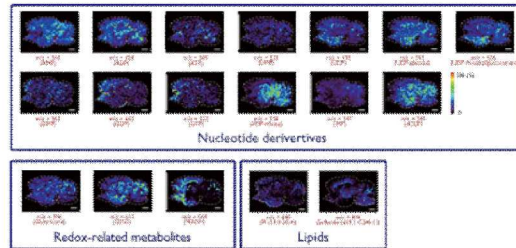


図2 メタボロミクスイメージングによるマウス脳内代謝物の分布可視化

ルラットを用いて、病態の進展に伴う脳内代謝動態の時空間分解可視化を試みた。その結果、過去の知見と整合性のある結果が得られ、さらにLC-MSを用いた抽出物測定では見えなかった劇的な代謝変動を捉えることに成功した。また、脳梗塞の進展初期に線状体においてクエン酸が高蓄積することも明らかとし、これはミトコンドリアにおける呼吸鎖のオーバーフローに伴うレドックス反応の亢進が原因であると考えられた。本成果は組織内微小領域におけるメタボロームの変動および局在可視化に世界で初めて成功したものである(図3)。

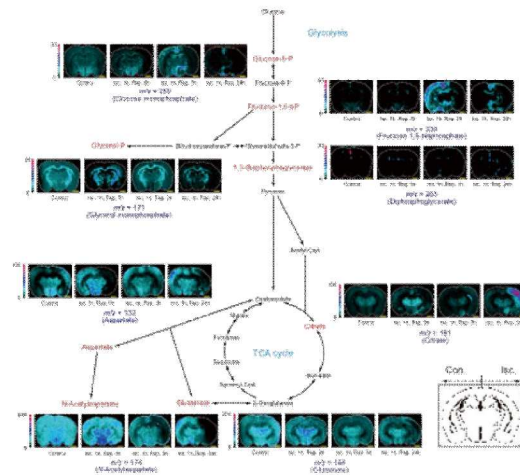


図3 メタボロミクスイメージングによるMCAOラット脳内における代謝変動の時空間分解可視化

本手法は、疾病発症メカニズム研究や疾患の早期発見、さらには高等生物のシステム生物学的解析に必須な基盤技術となり得る。生命システムにおける生体応答機構や、疾患発症メカニズムの解明に新たなブレイクスルーをもたらすと共に、臨床現場で利用可能な新たなバイオマーカー測定技術への展開が期待される。

c. 超高分解能質量分析装置を用いた標品非依存的代謝物同定法の開発

質量分析イメージングでは測定原理上クロマトグラフィー等と組み合わせることが不可能であるため、代謝物の同定は困難を極める。一般的にはMS/MSスペクトルを用いて同定を試みるが、分解能が低い質量分析装置では複数の化合物由来のピークが重なってしまうため、同定することは難しい。そこで、超高分解能(FWHM<1,000,000)を達成できるフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置(FT-ICR-MS)を用いて、低分子量代謝物の測定を試みた。その結果、非常に分子量に近い($\Delta m/z=0.0055$)代謝物のピークを完全に分離できることを見出した。さらに、安定同位体(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S)に由来する同位体ピークが、同位体毎に分離することも見出した。さらに、本分析データから、一義的に化合物の組成式を決定できることも見出した(図4)。

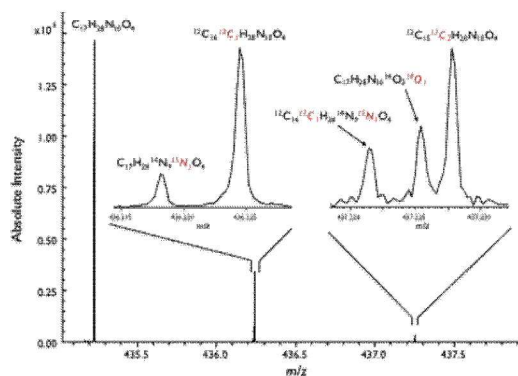


図4 超高分解能質量分析装置を用いた isotopic fine structure の観測

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6件)

1. Madla, S., Miura, D. and Wariishi, H. Optimization of extraction method for GC-MS based metabolomics for filamentous fungi. *J. Microb. Biochem. Technol.* (2012) 4, 5-9.
2. Madla, S., Miura, D.* and Wariishi, H. Potential Applicability of MALDI-MS for Low-Molecular-Weight Pesticide Determination. *Anal. Sci.* (2012) 28, 301-303. *Corresponding Author
3. Miura, D.*, Fujimura, Y., Yamato, M., Hyodo, F., Tachibana, H., Utsumi, H., and Wariishi, H. Ultra-highly sensitive *in situ* metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal. Chem.* (2010) 82, 9789-9796 *Corresponding Author
4. Miura, D., Tsuji, Y., Takahashi, K., Wariishi, H., and Saito, K. A Strategy for the Determination of the Elemental Composition by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Based on Isotopic Peak Ratios. *Anal. Chem.* (2010) 82, 5887-5891
5. Yukihiro, D., Miura, D., Saito, K., Takahashi, K., and Wariishi, H. MALDI-MS-Based High-Throughput Metabolite Analysis for Intracellular Metabolic Dynamics. *Anal. Chem.* (2010) 82, 4278-4282
6. Miura, D., Fujimura, Y., Tachibana, H., and Wariishi, H. Highly Sensitive MALDI-Mass Spectrometry for High-throughput Metabolic Profiling. *Anal. Chem.* (2010) 82, 498-504

[学会発表] (計5件)

Miura, D., Yukihiro, D., Fujimura, Y., and Wariishi, H. High-throughput Metabolic Profiling and *in situ* Metabolite Imaging by MALDI mass spectrometry. 59th ASMS Conference, June 8, 2011, Denver, USA.

三浦 大典 MALDI-MS を用いた高時間分解代謝動態解析法、第6回メタボロームシンポジウム、2011年11月14日、大阪大学

三浦 大典 質量分析による代謝動態の可視化、第49回電子スピンスサイエンス学会年会、2010年11月13日、名古屋大学

Miura, D., Yukihiro, D., Fujimura, Y., Tachibana, H., and Wariishi, H. MALDI-MS-based Metabolite Analysis for High-throughput Metabolic

Dynamics and *in situ* Metabolomics Imaging.
Metabolomics 2010, June 26, Amsterdam,
Netherlands

Miura, D., Fujimura, Y., Yamato, M., Hyodo, F.,
Tachibana, H., Utsumi, H., and Wariishi.
Visualization of Spatiotemporal Metabolic
Behaviors by *in situ* Metabolomic Imaging with
MALDI-MS. 58th ASMS Conference, May 25,
Salt Lake, Utah, USA.

[その他]
ホームページ等

<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 大典 (MIURA DAISUKE)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究
拠点・准教授

研究者番号 : 40532627