

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680073

研究課題名(和文)健康維持増進に資する食シグナル応答の包括的理解に向けた革新的多分子可視化戦略

研究課題名(英文) Innovative multi-molecular imaging strategy toward comprehensive understanding of food factor signaling response contributed to the health promotion

研究代表者

藤村 由紀 (Fujimura, Yoshinori)

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：20390304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円、(間接経費) 5,940,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、経口摂取した機能性食品因子の生体局所特異的作用(食シグナル応答)の把握のため、組織内微小領域の多次元情報(時空間変動情報)を内在性分子群に付与し、それらの包括的相互関係の理解を試みた。その結果、マトリックスレーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)技術を先鋭化し、メタボロームやプロテオームの組織内空間分布の可視化(マルチオミクスイメージング)と共に、経口投与後の緑茶カテキンの組織内分布や変動するメタボローム情報の同時画像化、緑茶カテキンの標的分子との共局在分析等も可能となった。以上の成果は、詳細な食シグナル応答を捉えるための基盤技術を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to understand the potential comprehensive relationship among a series of endogenous molecules with spatiotemporal information within tissue micro-regions for elucidating specific biological response to an orally dosed functional food factor. We succeeded in developing new techniques capable of two-dimensionally visualizing metabolome and proteome within tissue micro-regions, namely, multi-omics imaging, by improving a MALDI-MS technique. In addition, this analytical approach enabled us to simultaneously visualize orally dosed green tea catechin and metabolome within tissue micro-regions, and further visualized co-localization of green tea catechin and its target molecule. These results will provide a novel basic technology for understanding of precise food factor signaling response.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：質量分析イメージング 食シグナル メタボローム プロテオーム MALDI-MS マルチオミクスイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品同様、食品においても生体に存在する機能性因子の特定の作用点(標的分子)を介した相互作用の包括的理解が、その保健効果発現の仕組みを理解する上で必要不可欠であることが指摘されている。我々はそうしたコンセプトの下、代表的な機能性食品因子である緑茶カテキン(EGCG)と結合し、その多彩な生理作用を仲介する細胞膜受容体(*Nature Struct. Mol. Biol.*, 11,380,2004)とそのシグナル伝達経路の存在を世界に先駆けて明らかにしてきた。

一方、これまでの標的分子研究に関する多くの知見は細胞・個体レベルでの評価であり、食品因子の機能性の標的となる作用部位(組織内微小領域)における詳細な分子動態(時間的空間的制御情報)は全く未解明である。医薬品同様、生体局所における分子動態の包括的理解なくては厳密な食品因子の保健効果発現機序を捉えることは不可能である。

生命現象の物質的最終表現型である代謝物は、生理状態に最も反映した生体情報であることから、細胞の動きを包括的に理解しようとするとき、ゲノミクス・トランスクリプトミクス・プロテオミクスに加えて、代謝物の網羅的解析であるメタボロミクスが極めて重要となってくる。これまでに我々は、プロテオミクスで汎用されているマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)を用いて、緑茶カテキンの新たな表現型解析、すなわち、既存の常識を覆す生体代謝物の超高感度(数十 attomole レベル)測定法および微量細胞からの非標的型代謝物検出法の開発に成功し(*Anal. Chem.*, 82, 498, 2010)、さらに、これら技術を応用した質量分析イメージングによる組織形態情報を保持した代謝物の時間的空間的変動解析法の開発を進めている(*Anal. Chem.*, 82, 9789, 2010)。従来の食品因子応答性解析法の多くは、抽出・精製工程により、組織形態情報を消失し、包括的生体分子群の微細な時空間変動を見逃す危険性が極めて高かったが、我々が独自に見出した解析法は、既存技術では計測不可能な“微細な生体局所応答”を追跡できる革新的生体応答可視化法の基盤技術となり得ることが考えられた。

2. 研究の目的

緑茶カテキンに代表される機能性食品因子の生体内標的分子とその機能性発現を担う分子を把握するとともに、それら分子が食品因子の標的となる組織内微小領域の多様な生体分子とどのように協調して一連の食品因子応答(食シグナル)を生み出しているのかを解明する。そのため、生体局所分子群

の多次元変動情報(時間的空間的変動)を可視化できる“多次元マルチオミクスイメージング”技術を開発し、包括的食シグナル応答の実態に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

幅広い生体分子群を捉えるノンターゲット型質量分析における選択性と検出感度を決定づける最大の要因は対象物質のイオン化効率にある。そのため、メタボロームとプロテオーム等の組織内空間分解可視化技術(MALDI-MS イメージング法)を開発するためには、イオン化助剤(マトリックス)の最適化が必要不可欠である。

現在、多様な生体分子群の最適なイオン化効率を引き出すマトリックス情報は皆無である。そこで、申請者らが超高感度代謝物解析における有用性を見出した 9-AA とともに、様々なマトリックス候補化合物(約 20 種類)を用いて、代表的生体内代謝物標準品(同様に食品成分標準品)との適合性を検証した。さらに、標準品ベースで有用性が確認されたマトリックス候補を用いて、代表的食品成分として緑茶カテキンを摂取したマウス組織凍結薄片上(10 μm 厚)での生体分子群の可視化を検証した。なお、これら組織薄片上で効率的なイオン化が行われる最適条件(濃度・塗布条件・溶媒および組織適合性)を徹底的に検証した。これにより、生体内分子群の多成分同時計測可能な質量分析システムの基盤技術の構築が可能となる。

また、病態モデルにおいて技術的妥当性を評価するため、つぎのようなモデル動物実験を行った。すなわち、様々なアンチエイジング・抗脳神経変性疾患作用が報告されている緑茶カテキン EGCG を経口投与(0.1% w/v, 自由飲水, 1 ヶ月間)した若齢および老齢マウス(C57BL/6J, 雄性, 5 および 40-60 週齢)の脳組織の凍結切片に最適化したマトリックスをスプレーコーティング法で塗布し、MALDI-TOF-MS により部位・ m/z 特異的低分子量代謝物のイオンイメージを取得し、本研究で開発した技術の妥当性と共に、得られたデータの生物学的意義について検討を行った。

4. 研究成果

我々が超高感度代謝物解析における有用性を見出した 9-AA とともに、代表的な固体マトリックスならびに近年注目されている液体マトリックスを用いて、食品成分や生体内代謝物標準品との適合性を検証した。その結果、生体内代謝物(ATP やアセチル CoA など)とともに緑茶カテキンを高効率にイオン

化するマトリックス (β -Carboline 化合物など)を見出した。また、代謝物標準品ベースで有用性が確認された種々のマトリックス候補を用いて、食品成分を処理した組織切片上(脳、肝臓、腎臓、腫瘍など)でも効率的なイオン化が行われる最適条件(マトリックスの濃度・塗布条件・溶媒および組織適合性)を明らかにすることができた。このことは、内因性代謝物および食品成分の多成分同時計測可能になることを意味している。

また、 β -Carboline 化合物をマトリックスとして用いることで、緑茶カテキン EGCG の経口投与後の腎臓組織におけるメタボローム情報の一斉画像化が可能となり(図1)、さらに、これらの内在性分子群と共に、外来性の EGCG 自身およびその第二相代謝物(硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体)の同時画像化(図2)も実現可能となった(*Sci. Rep.* 2013)。また本技術の応用により、EGCG 以外のポリフェノールやトマト果実組織内代謝物も可視化できることも見出した。

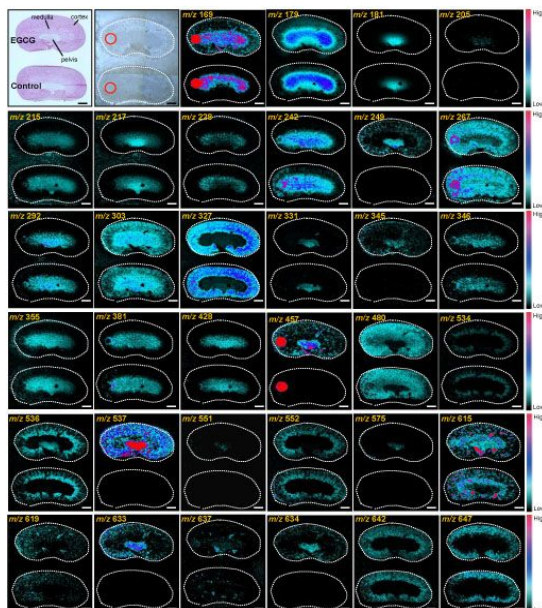


図1 緑茶カテキン EGCG 摂取後の腎臓組織内分子群の同時画像化

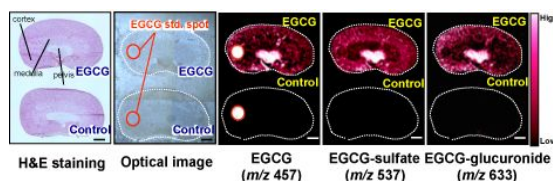


図2 緑茶カテキン EGCG および第二相代謝物の同時画像化

このような質量分析イメージング技術を活用することで、EGCG の組織内代謝分布をその標的分子である 67kDa ラミニン受容体 (67LR) タンパク質の分布(質量分析イメージングに用いた切片の隣接切片を用いた免疫組織化学染色)と同時に解析が可能となった(図3)。

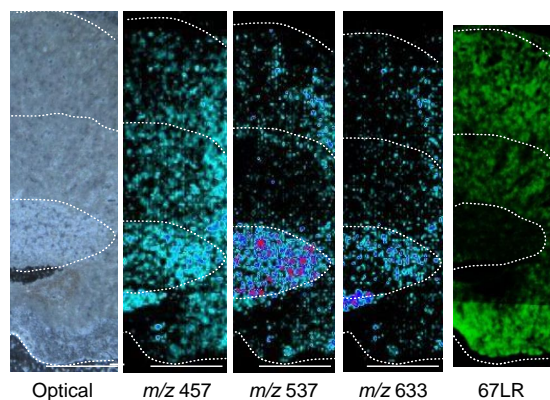


図3 緑茶カテキン EGCG の第二相代謝分布と 67LR タンパク質局在の同時画像化

また、本質量分析イメージング技術を応用することで、同一組織切片上のメタボローム(図4)とプロテオーム(図5)局在を同時に画像化(図6)することにも成功した。なお、本データは 9-AA を用いたメタボローム解析後に、組織切片を洗浄・固定化してトリプシン処理後に DHB によるプロテオームの可視化を行った。

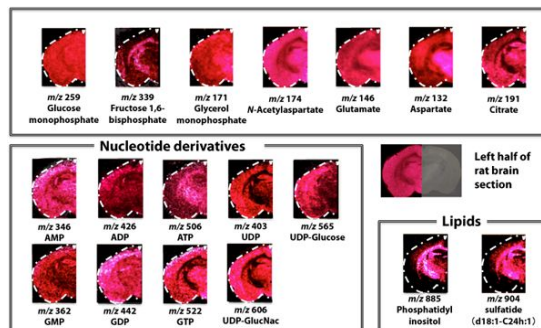


図4 マウス脳内メタボロームの可視化

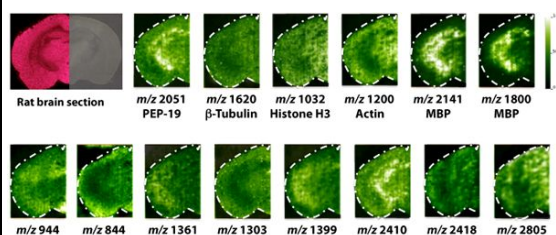


図5 マウス脳内プロテオームの可視化

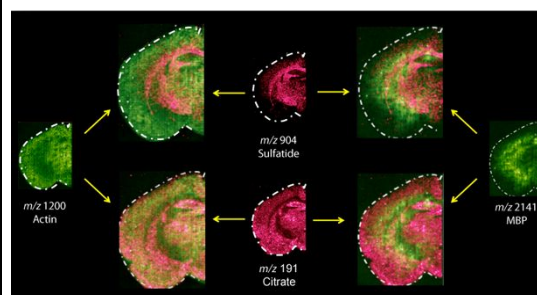


図6 マルチオミクスイメージング

最後に、病態モデルにおける質量分析イメージング技術の妥当性を検証した。緑茶カテキン EGCG を経口投与した若齢および老齢マウスの脳組織の凍結切片に最適化したマトリックスを塗布し、質量分析に供した結果、老化に伴って変動する代謝物（図7）や緑茶カテキン EGCG の投与によって変動する代謝物（図8）の二次元分布情報を可視化することに成功した。こうした解析を異なる時間ポイントで実施することで時空間動態解析が容易となる。このような微細な生体局所応答を捉える我々が提案した高分解能代謝物解析技術は、従来法では達成できない高い信頼性・精度を保持した機能性食品成分の有効性・安全性の新たな評価法を提案するものである（*Metabolites* 2014）。

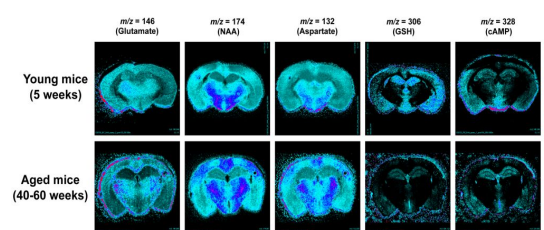


図7 老化により変動を示す代表的な脳内代謝物の二次元可視化

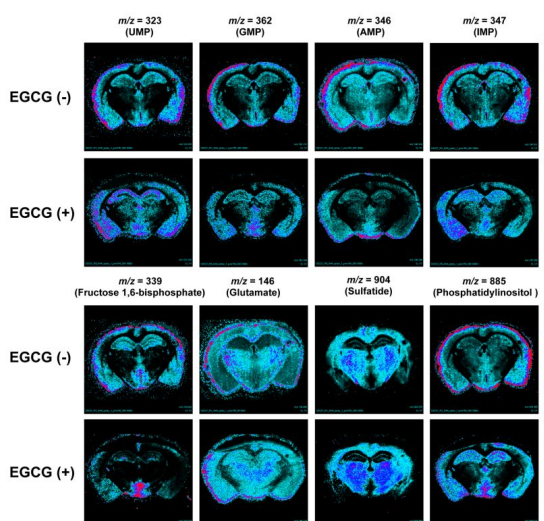


図8 老齢マウスの代表的な脳内代謝物に及ぼす緑茶カテキン EGCG の影響

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）

Fujimura Y and Miura D. MALDI Mass Spectrometry Imaging for Visualizing *In Situ* Metabolism of Endogenous Metabolites and Dietary Phytochemicals. *Metabolites* 2014;4:319-346.

doi:10.3390/metabo4020319. 査読有

Kim YH, Fujimura Y, Hagihara T, Sasaki M, Yukihiro D, Nagao T, Miura D, Yamaguchi S, Saito K, Tanaka H, Wariishi H, Yamada K, Tachibana H. *In situ* label-free imaging for visualizing the biotransformation of a bioactive polyphenol. *Sci. Rep.* 2013;3:2805. doi: 10.1038/srep02805. 査読有

Kim YH, Yoshimoto M, Nakayama K, Tanino S, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Tannic acid, a higher galloylated pentagalloylglucose, suppresses antigen-specific IgE production by inhibiting ϵ germline transcription induced by STAT6 activation. *FEBS Open Bio.* 2013;3:341-345. doi: 10.1016/j.fob.2013.07.008. 査読有

Fujimura Y, Sumida M, Sugihara K, Tsukamoto S, Yamada K, Tachibana H. Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor. *PLoS One.* 2012;7:e37942. doi: 10.1371/journal.pone.0037942. 査読有

Miura D, Fujimura Y, Wariishi H. *In situ* metabolomic mass spectrometry imaging: recent advances and difficulties. *J. Proteomics.* 2012;75:5052-5060. doi: 10.1016/j.jprot.2012.02.011. 査読有

Fujimura Y, Kurihara K, Ida M, Kosaka R, Miura D, Wariishi H, Maeda-Yamamoto M, Nesumi A, Saito T, Kanda T, Yamada K, Tachibana H. Metabolomics-driven nutraceutical evaluation of diverse green tea cultivars. *PLoS One.* 2011;6:e23426. doi: 10.1371/journal.pone.0023426. 査読有

〔学会発表〕（計 20 件）

藤村由紀. 緑茶の機能性を捉える低分子ケミカルセンシングに関する研究. *日本農芸化学会 2014 年度大会（招待講演）*, 2014年3月27日, 東京都.

Irie M, Honda Y, Fujimura Y, Setoyama D, Hyodo F, Yamato M, Miura D, Wariishi H. Time-Dependent Spatiotemporal Metabolic Variance in Mouse Kidney upon Cisplatin-Induced Acute Renal Injury. *SFRRI2014*, March23-26, 2014, Kyoto, Japan.

Fujimura Y. The biological function of tea via EGCG receptor. *The 2014 Annual Meeting and Symposium of Health Food Science of Taiwan (Invited)*, March7, 2014, Keelung, Taiwan.

中村純也, 三浦大典, 高橋勝利, 藤村由

紀, 割石博之. 質量分析イメージングによる傷害ストレス条件下でのトマト果実代謝物分布の可視化. **日本農芸化学会2014年度大会**, 2014年3月27-30日, 川崎市.

Kim YH, Fujimura Y, Sasaki M, Yukihira D, Miura D, Saito K, Wariishi H, Yamada K, and Tachibana H. In situ label-free visualization of the phase II metabolism of a green tea polyphenol. **ICOS2013**, November 6-8, 2013, Shizuoka, Japan.

佐々木雅子, 金允喜, 藤村由紀, 行平大地, 松本結実, 三浦大典, 割石博之, 山田耕路, 立花宏文. 緑茶成分ストリクチニンの *in situ* 質量分析イメージング法の開発. **第8回メタボロームシンポジウム**, 2013年10月3-4日, 福岡市.

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 低分子食品成分の組織内微小空間分布の非標識可視化法. **第67回日本栄養・食糧学会大会 (招待講演)**, 2013年5月25日, 名古屋市.

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 組織内微小領域における機能性食品因子の時空間分解可視化. **日本農芸化学会2013年度大会 (招待講演)**, 2013年3月27日, 仙台市.

Sumida M, Fujimura Y, Sugihara K, Tsukamoto S, Yamada K, and Tachibana H. Identification of green tea polyphenol EGCG sensing motif on 67-kDa laminin receptor. **The 25th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology**, November 27-30, 2012, Nagoya, Japan.

金允喜, 藤村由紀, 萩原立春, 行平大地, 山口歩, 永尾達彦, 齋藤和徳, 三浦大典, 割石博之, 山田耕路, 立花宏文. 緑茶カテキンの組織内二次元分布情報を非標識可視化する質量分析イメージング法の開発. **第17回日本フードファクター学会 学術集会および第9回日本カテキン学会 合同大会**, 2012年11月10-11日, 静岡市.

山口歩, 三浦大典, 藤村由紀, 割石博之. MALDI-MS による代謝物/タンパク質統合イメージング技術の開発. **第64回日本生物工学会大会**, 2012年10月23-26日, 神戸市.

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 食品機能性評価に向けたニュートリメタボロミクス. **第7回メタボロームシンポジウム (招待講演)**, 2012年10月11日, 鶴岡市.

藤村由紀. 質量分析を基盤としたプロテオミクス技術のメタボローム研究への応用. **第36回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)**, 2012年9月8日, 宮崎市.

藤村由紀, 三浦大典, 大和真由実, 兵藤文紀, 安川圭司, 市川和洋, 内海英雄, 割

石博之, 立花宏文. レドックス関連疾患の理解とニュートリメタボロミクス. **第65回日本酸化ストレス学会学術集会 (招待講演)**, 2012年6月7日, 徳島市.

Fujimura Y, Hagihara T, Kim YH, Yukihira D, Yamaguchi A, Miura D, Wariishi H, Yamada K, and Tachibana H. Development of mass spectrometry imaging technique towards two-dimensional visualization of green tea polyphenol in tissue micro-regions. **60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, May 20-24, 2012, Vancouver, Canada.

山口歩, 三浦大典, 藤村由紀, 割石博之. MALDI-MS による multi-omics イメージング技術の開発. **第6回メタボロームシンポジウム**, 2011年10月13-14日, 吹田市.

藤村由紀. ニュートリメタボロミクスを切り拓く多角的質量分析システムの開発. **日本農芸化学会西日本支部若手シンポジウム (招待講演)**, 2011年9月18日, 宮崎市.

藤村由紀. 食品機能性評価に向けた代謝物プロファイリング技術の開発. **産学官連携技術シーズセミナー in 福岡 (招待講演)**, 2011年9月1日, 福岡市.

Yamaguchi A, Fujimura Y, Miura D, and Wariishi H. An Integrated In Situ Proteomic and Metabolomic MALDI-MS Imaging toward Multi-Omics Studies. **59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, June 5-9, 2011, Denver, Colorado.

藤村由紀, 塚本俊太郎, 入江美穂, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 緑茶ポリフェノール EGCG の抗腫瘍効果に対する酸素応答性の理解に向けた細胞内代謝物プロファイリング. **第65回日本栄養・食糧学会大会**, 2011年5月13-15日, 東京都.

〔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

藤村 由紀 (FUJIMURA, Yoshinori)

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：20390304