

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24228004

研究課題名(和文) オンサイト・リアルタイム細胞分子計測によるスピーキング・セル・アプローチ

研究課題名(英文) Speaking Cell Approach by on-site/real-time cellular and molecular measurements

研究代表者

野並 浩 (NONAMI, Hiroshi)

愛媛大学・農学研究科・教授

研究者番号：00211467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 152,600,000円

研究成果の概要(和文)：直接、プレッシャープローブを用いることで栽培植物の細胞分子計測を行うことができるシステムを開発した。プレッシャープローブキャピラリー内のシリコンオイルにイオン液体を混合することにより、細胞溶液を質量分析のために効率よくイオン化することが可能となり、植物体を完全に破壊することなく、リアルタイムでの細胞分子計測が可能となった。プレッシャープローブで、水分生理状態を計測した後、計測した細胞で同時に分子情報を計測することが可能なことから、環境ストレスに応答した生理情報の解析がリアルタイムで可能となった。このことから、植物体の生理情報を捉えたうえでの効率の良い栽培環境制御が可能となる。

研究成果の概要(英文)：By using physiological molecular information, environmental conditions can be adjusted optimally to grow crops in plant growth factories. Such a control method uses physiological information to optimize energy efficiency and product quality control in plant growth factories, and is known as the "speaking cell approach" (SCA). In the present study, methods for on-site/real time cellular and molecular measurement techniques have been developed by using a cell pressure probe and probe electrospray ionization mass spectrometry for SCA. By mixing ionic liquid with the silicone oil in the pressure probe, pico pressure probe electrospray ionization mass spectrometry was developed to measure metabolite concentrations of single cells of plants. Hence, the water status and metabolite concentrations of single cells of plants can be measured simultaneously to evaluate the physiological conditions in real time to control environmental conditions in greenhouses.

研究分野：環境植物生理学

キーワード：細胞・組織 植物 質量分析 農業工学 プレッシャープローブ スピーキング・セル・アプローチ
植物工場 細胞分子計測

1. 研究開始当初の背景

平成 23 年 3 月末に、植物工場の国内研究拠点として、愛媛大学農学部植物工場が完成し、トマト栽培が行われ始めた。東日本大震災に代表される大災害からの復興、異常気象からの食料不足、野菜不足の回避が求められ、食の安定供給、食の安全の観点から、日本学術会議からの提言で、植物工場の実用化の必要性が示されており、緊急の課題として平成 20 年度 - 平成 24 年度実施中の基盤研究 (S) 研究課題の最終年度前年度の応募をするに至った。

2. 研究の目的

本研究は、植物工場においてプレッシャープローブで採集した細胞溶液を探針エレクトロスプレーイオン化により、直接、現場で質量分析を行うシステムを開発し、植物生理情報を制御要素として農業環境制御を行うスピーキング・セル・アプローチ (Speaking Cell Approach) (SCA) 法を創成することを目的としている。栽培作物のリアルタイム質量分析を実行し、環境要素変化に伴う代謝変化を植物生理学 (理学的)・栽培生理学 (農学的) に基づき解明して、省エネを考慮した SCA を確立することによって、食料生産の効率を格段に増大させ、日本が迎える食料危機の回避、食の安全性の確保により、国民を守ることを目指す。

3. 研究の方法

前処理なしでのサンプルの直接質量分析はこれまで行われておらず、探針エレクトロスプレーイオン化 (PESI) は混合物でのイオン化を可能にする。植物細胞膨圧を計測しながら、細胞壁にナノメートルオーダーの探針を突き刺し、細胞壁の成分を取り出すことができると、細胞壁の中に分子が組み込まれる状態が解明でき、植物の生理情報を作物をほとんど破壊することなく検出することが可能となるはずである。したがって、プレッシャープローブを用いての細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャル、細胞壁弾性率、水の細胞膜透過率、細胞体積などの物理的計測と、探針を用いてのナノメートルオーダーの細胞操作による化学分析を組み合わせることで、細胞分子情報を獲得し、SCA 法によりエネルギー効率が高く、高品質の農産物を生産することができる新世代の植物工場を創成することを目的としている。

4. 研究成果

質量分析 (MS) は、精製された純度の高いサンプル分子試料の分子量の計測および構造解析の手法として発展してきており、一般的に前処理を行った後、計測を行っている。本研究は、前処理無しの超微量サンプルで質量分析を行うものであり、これまでの質量分析の常識を覆す研究課題であり、新規性はとても高い。新規性のみでなく、本研究では、

独自に探針エレクトロスプレーイオン化法を開発し、細胞生体計測で使われていたプレッシャープローブと組み合わせ、分子計測を行うことで、細胞の位置の特定、生理情報の計測を同時に行い、生理情報のリアルタイムでの計測を行うことを目指した研究であり、独創性の高い研究といえる。

プレッシャープローブイオン化をプレッシャープローブに充填するシリコンオイルにエンジンオイル添加物を混合することで、シリコンオイル内で電気伝導度を上げ、細胞溶液のイオン化に成功した。生きた植物体の一つの細胞のそのままの代謝物を採り出し、イオン化する方法は、これまでに実施されておらず、この論文は Global Medical Discovery に最先端研究としてとりあげられた。エンジンオイル添加物は、シリコンオイルに均一に混合され、沈殿物もなく、イオン化を促進するものの、エンジンオイル添加物組成は商業的な特許で秘密になっており、イオン化においての不純物として検出されるので、分析精度を向上するためには望ましいものではない。そこで、電導性イオン液体を使うことで、検出信号をきれいに見分けることに成功した。検出感度は、発表論文成果よりも 1000 倍向上するようになり、革新的な結果が得られた。このイオン化質量分析法をピコ・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (pico pressure-probe electrospray ionization mass spectrometry: picoPPESI-MS) と命名した。トマトライコム細胞での代謝物分析を行うことで、picoPPESI-MS を確立した。

探針エレクトロスプレーのステンレス探針にエッチング処理をすることで先端を 150nm まで細くした上に、探針表面を化学処理で粗くし、親水性の表面になるように加工することに成功している。さらに、探針の表面に直径 30 μm のノズルを備えた圧電制御インクジェットから溶媒が付着するように設計している。この設計により、探針エレクトロスプレーのイオン化効率を格段に向上させることが可能になった。この方法では、サンプルの量を 1 ピコ (10^{-12}) リットル以下の量でもイオン化が可能であり、植物細胞 1 個からの細胞溶液のサンプリングおよび代謝物の同定を可能にしている。例として、ツツジの花の色素とその配糖体を検出した。ツツジの花の細胞体積が 35pL ~ 83pL のもの、ゼラニウムでは細胞体積が 2pL ~ 17pL のもの、ダイズでは細胞体積が 32pL ~ 56pL のものからサンプルし、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、マルビジン、ペチュニジン、ケルセチンおよびその配糖体、多糖類、有機酸、アミノ酸を検出している。

プレッシャープローブを用いると、細胞膨圧、細胞壁弾性率、膜水透過率、浸透圧、水ポテンシャルが計測できる。水分状態計測後、細胞から採集した細胞溶液を直接エレクトロスプレーイオン化することで、代謝物質の

計測が可能になった。さらに、イオン化法の改善で高感度計測が可能になりつつある。探針エレクトロスプレーイオン化では、細胞壁表面、細胞内分子の直接分析が可能であり、迅速なイオン化と超微量での高感度分析が可能になってきており、スピーキング・セル・アプローチのための計測手法が確立しつつある状況にある。

実際に栽培されているトマト果実に現れるトマト尻腐れ病について、開発した picoPPESI-MS を用いることで、トマト尻腐れ病の発生機構の解明に取り組んだ。水耕状態のトマト植物体にカルシウム塩を過剰に与えることで、果実にトマト尻腐れ病の発生を誘導した。発生率は 40~50% とすることで、尻腐れ病が発生していない果実と発生している果実を比較することで発生機構について解明を行った。プレッシャープローブを用いて細胞の水分状態計測を同時に行うことにより、環境要因の変化と細胞代謝物濃度の変化を関連付けることが可能となり、いかに代謝物濃度の変化が細胞膜崩壊と関連しているのか、解明できた。このことから、スピーキング・セル・アプローチのツールとして picoPPESI-MS の利用の可能性が提案できる。

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 24 件)

1. Gholipour, Y., Erra-Balsells, R., Nonami, H.: Blossom end rot tomato fruit diagnosis for in situ cell analyses with real time pico-pressure probe ionization mass spectrometry (2017) *Environmental Control in Biology*, 55 (1), pp. 41-51. DOI: 10.2525/ecb.55.51 査読有
2. Nakashima, T., Wada, H., Morita, S., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Nonami, H.: Single-Cell Metabolite Profiling of Stalk and Glandular Cells of Intact Trichomes with Internal Electrode Capillary Pressure Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry (2016) *Analytical Chemistry*, 88 (6), pp. 3049-3057. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03366 査読有
3. Yu, Z., Chen, L.C., Ninomiya, S., Mandal, M.K., Hiraoka, K., Nonami, H.: Piezoelectric inkjet assisted rapid electrospray ionization mass spectrometric analysis of metabolites in plant single cells via a direct sampling probe (2014) *Analyst*, 139 (22), pp. 5734-5739. DOI: 10.1039/c4an01068j 査読有
4. Gholipour, Y., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Nonami, H.: Living cell

manipulation, manageable sampling, and shotgun picoliter electrospray mass spectrometry for profiling metabolites (2013) *Analytical Biochemistry*, 433 (1), pp. 70-78. DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.001 査読有

[学会発表](計 35 件)

1. 野並浩・中島大賢・和田博史・森田敏・武森信暁・武森文子・Erra-Balsells, Rosa・平岡賢三(招待講演)(2015)リアルタイム・1細胞代謝物質計測のためのプレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化・日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会, シーガイアコンベンションセンター(〒880-8545 宮崎県宮崎市山崎町浜山), 2015 年 9 月 8 日(火)~9 月 11 日(金), 講演要旨集: OS25, Page 280-283.
2. 中島大賢・和田博史・森田敏・武森信暁・武森文子・Erra-Balsells, Rosa・平岡賢三・野並浩(招待講演)(2015)1細胞代謝物質・タンパク質計測のためのプレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化・日本質量分析学会 第 63 回質量分析総合討論会 2015 つくば, 2015 年 6 月 17 - 19 日, つくば国際会議場 エポカルつくば, 講演要旨集: 1D-01-144, Page 23.
3. T. Nakashima, N. Takemori, A. Takemori, R. Erra-Balsells, K. Hiraoka, and H. Nonami (招待講演) (2014) Highly Sensitive Quantitation of Single-cell Components using Pressure Probe Electrospray Ionization. University of Yamanashi International Symposium UYIS 2014 (October 3, 2014) Abstract book: 55-56.
4. 中島大賢・武森信暁・武森文子・Erra-Balsells, Rosa・平岡賢三・野並浩(招待講演)(2014)プレッシャープローブ・探針エレクトロスプレーイオン化を用いたタンパク質および代謝物質の超微量分析 第 41 回 BMS コンファレンス (BMS2014) [The 41st Biological Mass Spectrometry Conference], 日本質量分析学会 BMS 研究会, 能登ロイヤルホテル(〒925-0156 石川県羽咋郡志賀町矢蔵谷ラ-1), 「ライフサイエンスを牽引する日本の質量分析 ~天然物化学・バイオ医薬~」, 2014 年 7 月 7 日(月)~9 日(水), 講演要旨集: 154-158.
5. 野並浩 (2014)(招待講演)植物応答の早期検知技術としての SCA (Speaking Cell Approach) の可能性. 日本学術会議講堂(東京都港区六本木 7 - 22 - 34), 平成 26 年 3 月 18 日. 日本学術会議公開シンポジウム「太陽光植物工場の高精度環境調節を可能にする植物生態情報計測」講演要旨集: 8-11.

6. 野並浩 (2013) (招待講演) スピーキング・セル・アプローチを用いたリアルタイム植物工場制御法。「農業工学の新たな役割と展望」 食料生産のイノベーション技術と展望 日本農業工学会主催・新農林社共催 (日本農業工学会30周年・新農林社80周年記念合同シンポジウム) 平成25年10月11日 (金) 東京大学弥生講堂一条ホール, 日本農業工学会, 講演要旨集: 20-22.

[その他]

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~pbb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野並 浩 (NONAMI, Hiroshi)
愛媛大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 00211467

(2) 研究分担者

平岡 賢三 (HIRAOKA, Kenzo)
山梨大学・刈ヶ池農場研究センター・特命教授
研究者番号: 80107218

(3) 連携研究者

森田 敏 (MORITA, Satoshi)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上席研究員
研究者番号: 40391453

(4) 連携研究者

和田 博史 (WADA, Hiroshi)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・主任研究員
研究者番号: 40533146

(5) 連携研究者

中島 大賢 (NAKASHIMA, Taiken)
北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 70710945