

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660115

研究課題名(和文) 経口摂取分子群の一斉動態イメージングに向けた基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of imaging technique for simultaneously visualizing dynamics of multiple dietary factors

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)イメージング法の技術的問題点をイオン化助剤マトリックスの独自活用で改善し、複数の食品成分の組織内代謝を非標識で同時可視化できる基盤技術の創出を試みた。構築したマトリックスライブラリーと対象食品成分群との総当たりMALDI-MS分析により、対象物のイオン化の可否・効率とマトリックスとの関係性(構造機能相関)を見出すと共に、複合成分系の食品の品質や機能性に相関した多成分情報の取得や複数摂取成分の組織分布を可視化できるマトリックスが得られた。本成果は、複数の品質・機能性関連食品成分の同時検出に有用な戦略を提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Herein, we attempted to create the basic label-free technique for simultaneously visualizing multiple food factors within the tissue by improving the drawback of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry (MALDI-MS) on the basis of development or original usage of matrix. A brute force MALDI-MS analysis using both matrix library and various kinds of food factors revealed an ionizability and ionization efficacy of food factors and their structure-activity relationship to matrix. In addition, we enabled to obtain information on quality and functionality-related multiple food factors in foodstuff, consisted of various kinds of components and simultaneous visualization of orally dosed multiple food factors within the animal tissue by using newly selected matrix. These results suggest that this matrix screening-based MALDI-MS system may provide an effective strategy for simultaneously detecting quality and functionality-related multiple food factors.

研究分野：食品科学

キーワード：食品動態解析 質量分析イメージング MALDI-MS マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

食による健康維持増進や疾病予防を目指した機能性食品(特定保健用食品)の開発が活発に行われている一方、特定成分(サプリメント等)の過剰摂取による健康被害が多々報告され、このことは既存の食品機能性評価法の限界と共に、医薬品同様、食品においても機能性成分の厳密な科学的根拠(特に未熟な体内動態情報)の理解が、その保健効果発現の仕組みを理解する上で不可欠である。切れ味鋭い医薬品と違って、比較的緩慢で幅広い作用を示す複合成分系の食品機能性の理解には、着目する機能性成分とその効果に干渉しうる複数の共存成分の動態情報取得技術が求められている。

我々は原理的に非標識で多種成分同時分析可能な MALDI-MS イメージング法 (*in situ* 生体分子マッピング法) を応用して、いち早く低分子代謝物分析の高感度化・イメージング化の検討を始めており、実際に、単一動物細胞の核酸誘導体、アミノ酸、脂質、中央代謝系中間体など多岐にわたる構造を持つ低分子化合物(生体代謝物)の直接高感度一斉分析法および組織形態情報を保持した種々の代謝物群の時空間変動解析法 (*Anal. Chem.* 82, 498, 2010; *Anal. Chem.* 82, 9789, 2010; *J. Proteomics* 75, 5052, 2012; *Metabolomics*, 10, 473, 2014) を世界に先駆けて開発してきた。さらに、本法を応用して、既存法では計測困難であった緑茶ポリフェノールの未変化体とその第 II 相代謝産物の組織内局在の同時画像化にも初めて成功した (*Sci. Rep.*, 3, 2805 2013)。そこで、もしもこの MALDI-MS イメージング技術を活用できれば、既存法では計測困難な多種摂取成分の体内動態を同時に、かつ、簡便に捉えることができる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、原理的に非標識で多種成分一斉分析可能な MALDI-MS イメージング法の最大の欠点である、“見たい分子”の検出(イオン化)に最も影響を与えるイオン化助剤“マトリックス”の戦略的活用を見出すことで、経口摂取成分(食品成分)と複数の共存成分の組織内代謝動態を同時に画像化する複合動態イメージング技術を開発する。

特に、マトリックスの系統的かつ論理的活用を創出し、新規高感度高性能マトリックスライブラリーを構築することで、複数摂取成分の動態情報に基づく食品機能性の新たな科学的根拠の提示を可能とする革新的分子イメージング法の基盤システムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

多種成分の動態一斉分析を可能とする MALDI-MS の最大のボトルネックは、低分子測定におけるマトリックスの選択法がわずかな経験則に依存し、実用化には程遠いことにある。この状況を克服するため、対象化合物(低分子食品成分)の構造的特性から適切なマトリックスを絞り込む方法論を開発し、これを多種食品成分の複合的代謝動態解析に適用するところまでを目標とする。

複数の有望な化合物からなる“マトリックスライブラリー”を作成し、対象化合物群との「適応性」を構造機能相関解析に基づいて明確にする。これらの基礎情報をデータベース化し、標的食品成分の構造式から即座にマトリックス候補を絞り込む迅速スクリーニングを可能とする“最適マトリックス探索システム”を構築する。

このため、本研究では以下の項目を具体的に遂行した。

### (1) MALDI-MS 総当たり分析と構造機能相関解析

これまでのマトリックス探索研究の問題点として、マトリックスと同様、摂取する低分子食品成分の系統的構造機能相関に関する研究報告例がほとんどないことが挙げられる。そこで、既に申請者が低分子化合物検出の有効性を見出したマトリックスを基軸とした一連の構造類似物およびその他独自に収集した候補化合物を用いた MALDI-MS 総当たり分析を行うと共に (MALDI プレート上でマトリックスと食品成分混合物のスポット試験)、構造機能相関を明らかとし、その結果からマトリックスとして必須な分子構造やより効果的な構造要素をあぶり出した。

### (2) 複合成分系におけるマトリックスの有用性評価

上記分析で良好な結果が得られたマトリックスを複合成分系の試料(緑茶抽出物など)に適用し、その品質や機能性に関連する成分情報が取得できるか否かを検討した。また、一連のスポット評価で良好な化合物群(食品成分)は、最終的にモデル動物に複合投与後、摘出した組織切片に最適化されたマトリックスを塗布し、それら未変化体や代謝物群の一斉分布情報を MALDI-MS イメージングで取得した。

### (3) マトリックスライブラリーの作成

スクリーニングした食品成分を対象にイオン化性能のあるマトリックスを全て選出し、マトリックスライブラリーとすることで、分析対象成分に最適なマトリックスの最終

決定を迅速に行えるシステムの作成を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) MALDI-MS 総当たり分析と構造機能相関解析

はじめに、我々がこれまでに低分子化合物の検出に極めて有用であることを見出してきた 9-aminoacridin (9-AA) をマトリックスの基本骨格として、その構造類似物を新たに有機合成し、市販されているマトリックス候補化合物を含めた約 80 種類の化合物からなるマトリックスライブラリーを作成し、構造的視点を踏まえて生体重要性の高い化合物および食品成分を含めた約 380 種類に及ぶ化合物群を対象とした総当たり MALDI-MS 測定を行った。その結果、9-AA では検出困難な代謝物を感度よく検出できる種々のマトリックスやより幅広い数の代謝物を同時に検出できるマトリックスが存在することが明らかとなった。本結果は、有機合成的アプローチが高感度マトリックスを創出するのに極めて有用な戦略であることを示唆している。これらの成果の一部として、ファイトケミカルを対象としたイオン化性能の結果をヒートマップに示した(図1)。その結果、9-AA のようなアクリジン骨格を有する化合物よりもナフタレン骨格を有する化合物の方が高いイオン化傾向を示すことが新たに判明した。また、対象の食品成分に関して、Flavanone および Flavonol 骨格を有する分子は良好な検出感度を示し、特に、分子内の OH 基の数や位置、糖鎖の有無がそのイオン化に大きな影響を与えることが明らかとなった。一方、分子内に正電荷 (Anthocyanidin) や長鎖ポリエン構造 (Carotenoids) 中性の糖 (Disaccharides) 、ステロイド骨格 (Steroidal alkaloids) を有する分子のイオン化は極めて困難であった。

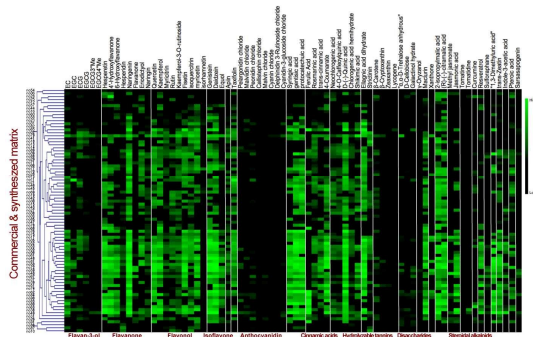


図1 ファイトケミカルとマトリックスライブラリー間の総当たり測定結果のヒートマップ

##### (2) 複合成分系におけるマトリックスの有用性評価

上記分析で良好な結果が得られた 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN) を用いて、ファイトケミカルを含む混合物試料に緑茶葉熱水抽出物 (Yabukita) を用いて、MALDI-MS 測定を行った結果、ファイトケミカルを含めた複数の成分情報を取得することができた(図2)。

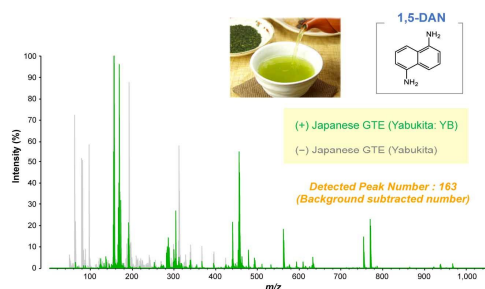


図2 1,5-DAN-MALDI-MS による緑茶抽出物の成分検出

本技術が食品の品質や機能性に関連する成分情報が取得できるか否かを明らかにするため、品種・収穫時期の異なる緑茶葉熱水抽出物を 1,5-DAN-MALDI-MS 測定に供し、ピーク抽出、アライメント後に主成分分析 (PCA) を行った(図3)。その結果、PCA では収穫時期や品種に応じて異なる分散 (成分プロファイル) を示し、これは 1,5-DAN により品質判別可能な成分情報が得られていることを意味している。また、1,5-DAN では得られた成分情報から収穫時期も判別可能であったが、マトリックス選定時に標準品のイオン化が良好でなかった 9-AA では、同様の判別結果を得ることはできなかった。この結果は、標準品レベルでのイオン化の可否情報の取得が、マトリックス選定のための有効な戦略となり得ることを示唆している。

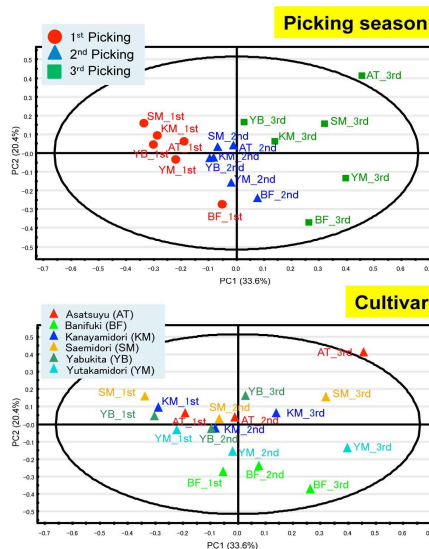


図3 茶期の異なる緑茶品種の MALDI-MS 測定後の PCA スコアプロット

つぎに、本技術が食品の機能性に関連する成分情報が取得できているのか否かを明らかにするため、代表的な抗酸化活性の一つである ORAC (活性酸素吸収能力: 抗酸化力) を指標とした緑茶抽出物の代謝物プロファイリングを行った。OPLS (直行型部分最小二乗法) による ORAC 値と代謝物プロファイルとの関係性を検証した結果、両者に相関関係があることが明らかとなり、信頼性の高い ORAC 予測モデルの作成に成功した (図 4)。本結果は、1,5-DAN-MALDI-MS が ORAC に関連する成分情報を取得可能であることを示した。

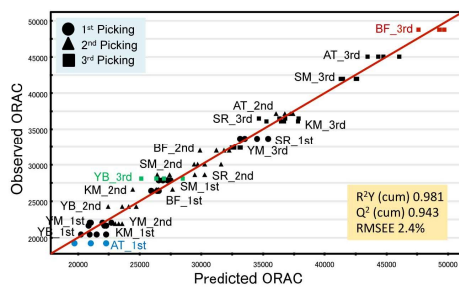


図 4 OPLS 回帰分析による ORAC の活性予測モデル

以上のようなコンセプトに基づいて得られたマトリックスが食品中の複数成分の同時検出に有効であることがわかり、さらに、ある種のマトリックスを用いることで、以下のように複数の食品成分からなる混合物を摂取後のマウス腎臓切片上でその未変化体と代謝物の分布を一度の分析 (MALDI-MS イメージング) で非標識同時画像化が可能であることを見出した (図 5)。本結果は、代謝物プロファイリングのみならず、代謝物イメージングにおいても、今回のマトリックススクリーニングに基づいた MALDI-MS 活用戦略が意味のある複数の食品成分情報を容易に取得可能にすることを示唆している。

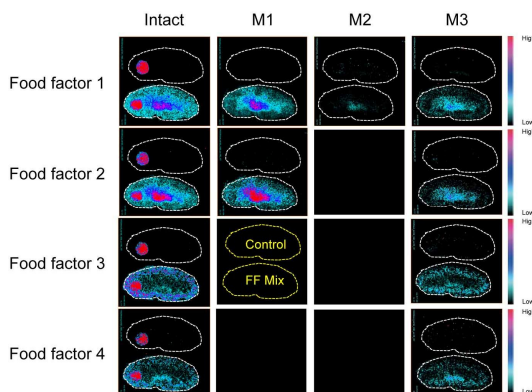


図 5 MALDI-MS イメージングによる複合摂取成分の未変化体とその代謝物の組織内分布

### (3) マトリックスライブラリーの作成

以上の結果により、9-AA や 1,5-DAN を含めた約 80 種類の化合物からなるマトリックスライブラリーと約 380 種類の化合物群の総当たり MALDI-MS 測定データが、最終的な食品の品質や機能性に関する複数の成分情報を同時に検出可能にする (プロファイリングやイメージングに活用できる) 最適なマトリックスの迅速決定に極めて有効であることが明らかとなった。また、本データから構造機能相関に関する多彩な情報が得られるため、興味分子をさらに高感度に検出できるマトリックスを戦略的・理論的に創出することが可能となった。今後、本データベースを基盤として、さらなる構造機能相関に関する解析を進めていくと共に、MALDI-MS 技術における様々な食品成分に対応可能なマトリックスの活用・創出を行っていききたい。

### 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 4 件)

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 緑茶ポリフェノールの生体内代謝の二次元可視化. *ビタミン*, 90, 26-29, 2016. 査読無

藤村由紀, 立花宏文, 割石博之, 三浦大典. MALDI-MS イメージング法の食品機能性研究への応用: 生理活性ポリフェノールの生体内代謝の二次元可視化. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 63, 149-152, 2015. 査読無

Fujimura Y. Small molecule-sensing strategy and techniques for understanding functionality of green tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 687-699, 2015. DOI:10.1080/09168451.2014.996205 査読有

Kim YH, Fujimura Y., Sasaki M, Yang X, Yukihiro D, Miura D., Unno Y, Ogata K, Nakajima H, Yamashita S, Nakahara K, Murata M, Wariishi H, Yamada K, and Tachibana H. In situ label-free visualization of orally dosed strictinin within mouse kidney by MALDI-MS imaging. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 9279-9285, 2014. DOI:10.1021/jf503143g 査読有

[学会発表] (計 15 件)

中村純也, 一瀬智美, 早川英介, 藤村由紀, 割石博之, 三浦大典. 質量分析イメージング法を用いたトマト果実の生理応答に対する代謝動態解析. *日本農芸化学会 2016 年度大会*, 札幌市, (2016/3/29)



藤村由紀. 代謝プロファイリングおよびイメージングを可能とするMALDI-MS技術の開発. **第20回異物・異臭に関する勉強会**, 蕨市 (2016/3/4)

Morikawa-Ichinose T, Nakamura J, Fujimura Y, Shindo M, Wariishi H and Miura D. Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Metabolites in Arabidopsis. *Pacificchem 2015*, Honolulu, Hawaii (2015/12-15-20)

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 緑茶カテキンの生体組織内分布の新たな可視化技術. **第12回日本カテキン学会年次学術大会**, 福岡市 (2015/12/5)

三浦大典. 質量分析を基盤とした時空間分解代謝解析システムの開発と応用. **第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム**, 熊本市 (2015/11/19)

中村純也, 一瀬智美, 早川英介, 高橋勝利, 藤村由紀, 割石博之, 三浦大典. MALDI-MSを用いたトマト果実内の局所的な代謝物空間情報の可視化. **第9回メタボロームシンポジウム**, 三島市 (2015/10/1-2)

藤村由紀, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 要素還元的手法を補完するメタボロミクス: 緑茶の機能性評価への応用. **日本食品科学工学会第62回大会**, 京都市 (2015/8/27-29)

Miura D. MALDI-MS-based metabolic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *17th The Scientific International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (SISS)*, Tokyo (2015/6/25)

藤村由紀, 中村純也, 一瀬智美, 金允喜, 佐々木雅子, 海野結実, 緒方是嗣, 中島宏樹, 立花宏文, 割石博之, 三浦大典. イメージング質量顕微鏡によるファイトケミカルの高感度分布解析. **日本農芸化学会2015年度産学官学術交流委員会フォーラム**, 岡山市 (2015/3/28)

藤村由紀, 中村麻子, 行平大地, 西牟田梨恵, 一瀬智美, 早川英介, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 抗酸化活性を有する緑茶抽出物のMALDI-MSを用いた代謝物プロファイリング. **第19回日本フードファクター学会**, 鹿児島市 (2014/11/8-9)

藤村由紀. 食品機能性評価に向けたメタボロミクスの技術開発に関する研究. **生物機能研究会**, 大分県玖珠郡九重町湯坪 (2014/7/12-13)

Nakamura J, Miura D, Fujimura Y, and Wariishi H. Visualization of the distribution of metabolites related to ripening in tomato fruit using MALDI-MS imaging. *Metabolomics2014*, Tsuruoka, Japan (2014/6/23-26)

Nakamura A, Fujimura Y, Yukihira D, Miura D, and Wariishi H. A trial of MALDI-MS in

metabolic profiling of green tea cultivars with antioxidant activity. *Metabolomics2014*, Tsuruoka, Japan (2014/6/23-26)

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. **第306回日本農芸化学会西日本支部例会**, 福岡市 (2014/5/23)

藤村由紀. MALDI-MSを基盤とした代謝プロファイリング技術の開発. **第27回九州分析化学会若手の会 春の講演会**, 福岡市 (2014/5/17)

[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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 研究分担者

瀬戸山 大樹 (SETOYAMA, Daiki)

九州大学病院・特任助教

研究者番号: 30550850

### (4) 研究分担者

早川 英介 (HAYAKAWA, Eisuke)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任助教

研究者番号: 20739809