

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14921

研究課題名(和文)空間分解メタボロミクスによる植物代謝動態可視化

研究課題名(英文) Spatially Resolved Metabolic Distribution for Unraveling the physiological Change and Response in Tomato Fruit by Spatially-resolved Metabolomics

研究代表者

三浦 大典 (Miura, Daisuke)

九州大学・農学研究院・特任准教授

研究者番号：40532627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新たに開発した質量分析イメージングにおけるサンプル調製法の最適化技術を用いて、トマト果実内における代謝動態の可視化に成功した。特に、傷害を与えた果実の傷害部位に特異的にトマチンが蓄積し、傷害部位における更なる外敵の侵入を防ぐ機構が存在することを明らかとした。現在シロイヌナズナ葉のサンプル調製法を開発しており、葉内部組織におけるグルコシノレート等の防御物質の代謝動態解析に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：We visualized the spatial distribution of metabolites within tissue sections of tomato fruit using a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) technique. This technique elucidated the unique distribution patterns of more than 30 metabolite-derived ions, including primary and secondary metabolites, simultaneously. To investigate spatiotemporal metabolic alterations during physiological changes, MALDI-MSI was performed using the different ripening phenotypes. The amounts of glutamate and adenosine monophosphate, umami compounds, increased in both mesocarp and locule regions during the ripening process. MALDI-MSI was also applied to evaluate more local metabolic responses to wounding stress. Accumulations of a tomatine and a low level of its glycosylated metabolite, esculeoside A, were found in the wound region. Their inverse levels were observed in non-wounded regions. Furthermore, the amounts of both compounds differed in the developmental stages.

研究分野：質量分析、メタボロミクス

キーワード：質量分析 イメージング メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

植物は生存戦略の一つとして、20万種にも及ぶ多種多様な二次代謝産物を合成することが知られている。一方、これら多彩な二次代謝産物の合成には、様々な一次代謝物が利用される。このような背景から、メタボロミクス研究は多彩な代謝機構がその生体機能を理解する上で極めて重要となる植物科学研究から発達してきた。しかしながら、現状のメタボローム解析はGC-MSやLC-MS、CE-MS等を用いた一斉分析であるため、分析に際し代謝物を「抽出」する必要がある。従って、組織内の「どこで」起きた代謝変動であるか理解することは極めて困難であった。質量分析を用いたイメージング技術は2000年代半ばより盛んに研究が進められており、既に1000報を超える論文が出版されている。しかしながら、そのほとんどは動物を対象とした研究であり、植物を対象とした研究は一割にも満たない。これは、技術開発を行う上での実験上の利点に起因する。MALDI法では利用できる既知マトリックスが数種しか無く、検出感度の問題から測定対象となるのはイオン化の容易な脂質分子(動物組織の脂質含量は30~70重量%)もしくは高濃度に投与した薬剤であることがほとんどである。しかしながら、多彩な二次代謝物を産生する植物をターゲットとするには、化合物群毎に最適マトリックスを探索する必要があり、必ずしも成功確率が高いとは言えない。一方、申請者らは最適なマトリックスを選択すれば植物の持つ複数の生理活性成分を同時に検出可能であることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに開発してきたマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法を基盤とした質量分析イメージング技術を先鋭化し、植物個体内微小領域における外的摂動(栄養・傷害など)に対する生体応答を「代謝物」という視点から捉え、これまで未知であった生体の空間的代謝応答を可視化する革新的代謝イメージング法の開発を目指す。植物が合成する一次代謝物(中央代謝系・エネルギー代謝・アミノ酸等)と同時に、多彩な二次代謝物の分布可視化を可能とするマトリックス探索を行い、植物代謝研究における新たな基盤技術の創生と生

理・形態学的情報を与える新たなオミクス解析ツールの提供を目指す。

3. 研究の方法

質量分析イメージングにおいて、測定対象のバリエーションおよび検出感度を左右するポイントは、対象物質のイオン化効率の一点につきる。これまでに研究代表者らは、9-AA自身もしくはその部分構造を基本骨格とした化合物群を新規に合成し、9-AAを遙かに凌ぐイオン化効率を示す36種の新規マトリックスの開発に成功した。これらは9-AAおよびその他の既知マトリックスでは測定が極めて難しい化合物群も検出可能であることを確認済みである。また、既知のマトリックスの構造類似体を用いた網羅的スクリーニングによって、MALDI法での分析が極めて困難であったカテキンを高感度に検出可能なマトリックスを発見することに成功した。このことは、構造特性に若干の変化を加えれば、マトリックスとしての機能が大幅に変わる可能性を示している。

本申請研究では、既に保有するMALDI用マトリックス候補化合物(既知マトリックス:40種、新規合成マトリックス:50種)および本申請にて購入する既知マトリックス誘導体(50種)食品(植物)に含まれる代表的な生理活性成分(ポリフェノール類・フラボノイド類・カロテノイド類・植物ホルモンなど)約50種類(本申請にて購入予定)に対する総当たりスクリーニングを行い、植物組織から直接低質量分子を検出するための、十分な感度(pmolオーダー)を達成できるマトリックスの探索を行った。

さらに本研究ではモデル系としてトマト果実を用い、傷害ストレスを与えたトマト果実における代謝応答の空間的変動を捉える事を試みる。果実は傷害を受けると通常の成熟速度よりも急速に成熟が促進されることが知られており、様々な二次代謝産物(エチレン、ジャスモン酸など)の関与が報告されている(Leon J. et al. 2001)。一方、果実内のどこでどのような代謝応答が起こっているかはほとんど分かっていない。申請者らが独自に開発した新規マトリックスおよび大規模スクリーニングにより発見した様々なフラボノイド類を高感度に検出可能なマトリックスを用いて、ナリンゲニンやトマチン、 β -カロテンなど、トマト果実に含まれることが既に明らかとなっている二次代謝産物を同時に分析可能なマトリックスを用いて質量分析イメージングに分布可視化を行う。さら

に連続切片を用いて、これまで申請者らが見出した一次代謝物を高感度に検出可能なマトリックスである 9-aminoacridine を用いた一次代謝物イメージングの結果と重ねることで、包括的な代謝動態の空間変動を捉える事に挑戦する。

4. 研究成果

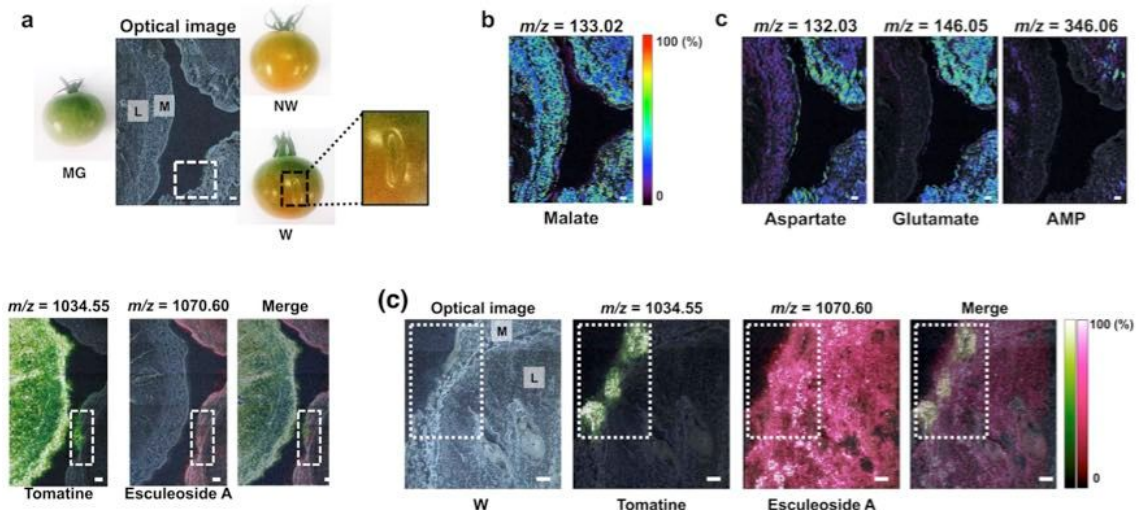
・マトリックススクリーニング

本研究でははじめに、代表的かつ入手可能な食品由来低分子生理活性成分 55 種を購入し、MALDI-MS によるイオン化に最適なマトリックスの探索を進めた。使用したマトリックスは既知マトリックスと独自に合成したマトリックス合わせて 100 種以上の化合物を用いて検討を進めた。スクリーニングはハイスルーブットなサンプル調製・分析が可能な 384 well ステンレスプレートを使用して行った。測定には MALDI-MS として AXIMA Performance (島津製作所) を用いた。その結果、第 1 段階のスクリーニングにて、食品由来低分子生理活性成分の代表的な構造骨格であるフラボノイド類に対して高いイオン可能を持つマトリックスが複数見出された。中でも、アミノナフタレン誘導體、ハルマン誘導體およびアミノアクリジン誘導體(合成マトリックス)は非常に高いイオン可能を持つことが示された。この中でも、特に 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN)を用いる事で、複数のフラボノイド誘導體に対して検出限界 1 pmol を達成した。しかしながら、ステンレスプレート上でのイオン化効率は夾雑分子によるイオン化抑制を受けないため、必ずしも質量分析イメージングを行う実サンプル上でのイオン化効率を反映していない。そこで第 2 段階のスクリーニングとして目的組織片上でのイオン化効率についても検討した結果、1,5-DAN のみが高いイオン化効率を維持できることが明らかとなった。

・トマト果実の成熟・傷害ストレスに対する代謝応答の時空間解析

トマトは世界で最も食される農作物の 1 つで

あり、ビタミン、ミネラル、抗酸化物質など多くの生理活性成分を有する事が知られている。トマト果実の生理学は歴史も長く、非常に多くの知見が蓄積されているが、低分子量代謝物、特に旨みや生理機能に関わる二次代謝物などがいつ・どこに・どのように存在するのはほとんど解っていない。そこで本研究では、上記の 2 段階スクリーニングによって選抜された 1,5-DAN をマトリックスとして用い、生育ステージの違いによるトマト果実中に含まれる旨み成分および二次代謝物分布変動の可視化を目指し、質量分析イメージングを試みた。サンプルとしてミニトマト (Micro-Tom) を用い、未熟果実および成熟果実を凍結し、凍結切片を作成した。マトリックスはエアブラシを用いたスプレーコーティング法にて凍結切片に塗付し、AXIMA Performance (島津製作所) を用いて質量分析イメージングを試みた。その結果、複数の低分子量代謝物の分布、特に二次代謝産物であるナリンゲニンの分布を可視化することに成功した。これまでにフラボノイド類の植物組織からの直接検出および分布の可視化は全く報告が無く、本研究で初めて得られた結果である。ナリンゲニンは抗酸化物質、ラジカル捕捉剤、抗炎症薬、炭水化物代謝促進剤、免疫系調節剤として生理活性を持つと考えられている物質であり、植物体にとっては UV 等の外的ストレスに対する防御物質であることが知られている。本研究によって成熟に伴って果実の外果皮に蓄積することが明らかとなった。また、成熟および傷害応答によって、果実内での「うまみ」物質が特徴的に蓄積することが明らかとなった。さらに、傷害を与えた果実の傷害部位に特異的にトマチンが蓄積し、傷害部位における更なる外敵の侵入を防ぐ機構が存在することを明らかとした。現在シロイヌナズナ葉のサンプル調製法および高感度分析が可能なマトリックス塗布法の開発を進めており、葉内部組織におけるグルコシノレート等の防御物質の代謝動態解析に取り組んでいる。



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 2件) 全て査読有り

1. Fujimura, Y., Kawano, C., Maeda-Murayama, A., Nakamura, A., Koike-Miki, A., Yukihiro, D., Hayakawa, E., Ishii, T., Tachibana, H., Wariishi, H. and Miura, D.* A Chemometrics-driven Strategy for the Bioactivity Evaluation of Complex Multicomponent Systems and the Effective Selection of Bioactivity-predictive Chemical Combinations. *Sci. Rep.* (2017) **7**, 2257.
2. Nakamura, J., Morikawa-Ichinose, T., Fujimura, Y., Hayakawa, E., Takahashi, K., Ishii, T., Miura, D.* and Wariishi, H. Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). *Anal. Bioanal. Chem.* (2017) **409**, 1697-1706.

〔学会発表〕(計 5件)

1. Ichinose, T., Fujimura, Y., Nakaya, S., Yamazaki, Y., Nakamura, J., Wariishi, H., and Miura, D. Visualization of leaf glucosinolate distribution by mass spectrometry imaging in *Arabidopsis*. **13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology** (P62-S1), 2016. (July 22-26, Vancouver, Canada)
2. Ichinose, T., Fujimura, Y., Nakaya, S., Yamazaki, Y., Nakamura, J., Hayakawa, E., Wariishi, H., and Miura, D. Optimal Sample Preparation Method for Visualizing Global Endogenous Metabolites by Mass Spectrometry Imaging in *Arabidopsis*. **64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics** (MP240), p70, 2016. (June5-9, San Antonio, Texas), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 27, suppl. 1, 70, 2016.
3. Morikawa-Ichinose T, Nakamura J, Fujimura Y., Shindo M, Wariishi H and Miura D. Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Metabolites in *Arabidopsis*. *Pacificchem 2015* (ENVR-6), p199, 2015. (December 15-20, Hawaii)
4. 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* (P220), p100, 2014. (June23-26, Tsuruoka, Yamagata, Japan)

5. Nakamura, J., Yukihiro, D., Wariishi, H., Fujimura, Y., and Miura, D. Systematic characterization of experimental conditions for high-throughput yeast lipid profiling by MALDI-MS. **62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics** (WP282), p134, 2014. (June15-19, Baltimore)*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 25, suppl. 1, 134, 2014.

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)

九州大学農学研究院・特任准教授

研究者番号：40532627

(2)研究分担者

藤村 由紀 (FUJIMURA, Yoshinori)

九州大学農学研究院・特任准教授

研究者番号：20390304

(3) 研究分担者

早川 英介 (HAYAKAWA, Eisuke)
沖縄科学技術大学院大学・研究員
研究者番号：20739809