

令和元年6月18日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21276

研究課題名(和文)細胞内in situ誘導体化による細胞内分子局在解析

研究課題名(英文)Subcellular molecular localization analysis by in situ derivatization

研究代表者

水野 初(Mizuno, Hajime)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：30457288

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)：本研究では、細胞内のミトコンドリアをターゲットとしたメタボロミクスを実現するために、細胞内のミトコンドリア選択的に局在し、ミトコンドリアに存在する代謝物と反応する誘導体化プローブを合成した。このプローブを細胞に投与してミトコンドリアへの移行を確認するとともに、質量分析によりこのプローブと結合したミトコンドリア内の代謝物が検出された。これらの結果より、本方法は細胞内代謝物の局在を調べるうえで非常に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ミトコンドリアなどの細胞内に存在する様々な微小領域ごとに存在する代謝物という生体機能の発現と密接にかかわる分子を見つけることを目的としている。本研究で開発した方法により、これまでの方法では不可能だった代謝物の正確な細胞内局在を調べることが可能となった。これにより、これまで分からなかったミトコンドリアをはじめとした様々な細胞内小器官の詳細な機能解明が可能となり、疾患メカニズムや治療法開発につながるができる。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics is a rapidly developing field in the post-genomic research. However, the conventional metabolic approaches are difficult to know the localization of cellular metabolites because these methods are analyzing homogenized large amounts of cells or tissues. In this study, in order to analyze metabolites located in the mitochondria, we developed an analytical method for metabolites in mitochondria by using mitochondrial localized photoaffinity probe. The probe we synthesized has a diazirin as photoaffinity probe and rhodamine as a mitochondrial affinity. From the result of a high resolution laser confocal microscope observation, it was confirmed that this probe was localized in mitochondria of HepG2 cells. The cells which this synthesized probe have been treated were irradiated with UVA. As the result of LC-MS/MS analysis of intracellular metabolites after photo reaction, some metabolite peaks reacted to the photo affinity probe were detected.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞内小器官 メタボロミクス 誘導体化 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞を用いたメタボロミクスの問題点

メタボロミクス研究の進展により、20,000 にも及ぶ代謝物が見つかるとともに、これらの代謝反応経路を示した詳細な代謝マップも作成され、生命現象に関する代謝物の係わりも明らかになってきた。より詳細な分子メカニズムの解明には、これらの代謝が細胞や組織のどこでどのように行われているか代謝反応の位置情報を得ることが重要であるが、大量の細胞や組織を丸ごとすり潰して行う従来のメタボロミクスでは代謝の位置情報が失われてしまうため、従来法に変わる、代謝局在がわかる新規メタボロミクス分析法の開発が必要不可欠である。

(2) 1 生細胞ダイレクト質量分析法の開発

私たちはこれまで、上記課題である代謝物局在を細胞レベルで解明するために、生きたままの細胞 1 個のオルガネラをサンプリングし、そのまま質量分析してオルガネラに局在する代謝物を検出する単一生細胞ダイレクト質量分析法を世界で初めて実現・実用化し、マスト細胞内に存在する顆粒内でヒスタミン合成が行われていることをつきとめた(引用文献 -)。しかし特定のオルガネラに存在する微量試料から様々な代謝物を網羅的に分析するためには、多細胞からオルガネラを集めて LC-MS 測定することも必要である。

2. 研究の目的

私たちは、細胞内代謝物の網羅的検出と細胞内小器官や組織特異的部位の局在を解明するため、代謝物をオルガネラ内部で誘導体化させ、誘導体化代謝物のみ分離・分析する方法を開発することとした。これにより、標的としたオルガネラに存在する代謝物のみを誘導体化することが可能となる。さらに誘導体化標識された代謝物を選択的に回収する分離分析法の開発により、細胞内の特定部位に存在する代謝物を本来の環境に近い状態のまま分析することができる。またこの方法を用いることで、多細胞サンプルを抽出した際に他のオルガネラ画分とコンタミネーションすることなく、標的オルガネラ代謝物のみを分離・分析することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 細胞内オルガネラ選択的局在・誘導体化プローブの開発

細胞の様々なオルガネラに存在する代謝物を正確に分析するために、オルガネラ選択的に取込まれ、オルガネラ内に存在する代謝物の誘導体化を、オルガネラ内で行うことができる誘導体化プローブを開発した。これにより代謝物の細胞内局在を保持したまま誘導体化を行うことが可能となる。次に、開発・合成した誘導体化プローブが細胞内に取り込まれ、目的とするオルガネラへの局在を調べるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いてプローブを投与した細胞の観察を行った。

細胞内のオルガネラなどの微小部位に存在する代謝物を選択的に分析するために、まずは細胞活動の中心的な役割を担っているミトコンドリアに存在する代謝物分析を目的とした誘導体化プローブを合成することとした。ミトコンドリアは生命現象の発現や維持に重要な器官であり、糖代謝や TCA などの重要な代謝経路が存在するほか、脂質などについても他の器官と組成が異なることなども報告されている。そのため、ミトコンドリアの代謝物局在を正確に分析することは細胞現象メカニズムを解明するうえで重要であると考え、本研究のターゲットオルガネラとすることとした。

(2) 誘導体化代謝物の選択的分離・検出

オルガネラ内誘導体化した細胞をホモジナイズ・溶媒抽出し、オルガネラ内で誘導体化された代謝物を回収し、LC-MS により分析した。オルガネラ内誘導体化代謝物の質量分析結果により得られた精密質量値および MS/MS フラグメントパターンにより代謝物の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内オルガネラ選択的局在・誘導体化プローブの開発

ミトコンドリア局在誘導体化プローブの開発

プローブの構造は、ミトコンドリアを認識して局在するローダミン骨格を持った部位と、細胞内部に導入しミトコンドリア以外での誘導体化反応の進行を防ぐため、誘導体化反応の on/off をコントロールすることができる光反応基を持つこととした。光反応基については、UV に比べて細胞への影響が低い UVA により反応が進行し、比較的反応収率が良いとされるジアジリンを用いることとした。

4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzylamine と Rhodamine B isothiocyanate とをピリジン存在下で室温にて 40 分間反応させることで Rhodamine B 標識ジアジリンを合成した。反応生成物を LC-MS/MS 分析した結果、 m/z 715.2675 に目的生成物のピークが検出された。続いて本合成プローブの光反応性を調べるため、トリプトファンなどのアミノ酸標品とともに光反応させて LC-MS 分析した結果、トリプトファンとプローブが結合した場合の質量数と一致す

るピークが新たに検出された。この結果から、本プローブが UVA 照射によって代謝物と光反応することが確認された。

培養細胞を用いた合成プローブの性能評価

で合成したプローブが細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアに移行することを確認するため、ヒト肝臓がんモデルである HepG2 細胞にこのプローブを投与し、レーザー共焦点顕微鏡により細胞観察を行った。比較のため、市販のミトコンドリア染色試薬である MitoBright Green と本合成プローブを同時に投与したところ、どちらの試薬を用いた場合も同一の細胞内部位が染色されたことから、本プローブがミトコンドリアへ局在していることが確認できた。

また本プローブの細胞毒性を調べるため、プローブの投与濃度 20 μM として 24 時間インキュベートした場合においても LDL 活性の上昇や細胞生存率の低下は確認されなかった。この結果から本プローブによる細胞への影響は低いと考えられる。

(2) 誘導体化代謝物の選択的分離・検出

ミトコンドリア局在光反応プローブを用いた細胞内ミトコンドリア代謝物の誘導体化

(1) で合成した光反応プローブを投与した細胞に対し光 (UVA) を照射して誘導体化反応を行った。細胞を回収して超音波によりホモジナイズを行い、細胞内成分をメタノール抽出して回収した。得られた細胞抽出液を LC-MS/MS により分析を行い、光照射前後の細胞抽出サンプルを比較した結果、光照射後のサンプルで光誘導体化された代謝物と思われるピークが検出された。これらのピークの精密質量値を用いて代謝物データベース検索を行った結果、NADH や有機酸、アミノ酸やその代謝物が推定された。

また、細胞内の微量代謝物を高感度かつ高精度に質量分析するために、エレクトロスプレーイオン化の際のフラグメント化メカニズムの解明や、夾雑イオンの影響によるイオン化効率のばらつきを網羅的に補正するための方法などの微量な誘導体化代謝物をより効率的にイオン化し、高感度検出するための質量分析基盤技術の開発も並行して行った。

これらの研究結果より、本合成プローブがミトコンドリア選択的に局在し、ミトコンドリア中の代謝物と光反応することが確認できた。誘導体化効率の向上のためは、より詳細な反応条件などの検討が必要であるが、本方法は細胞内代謝物の局在を調べるうえで非常に有用であると考えられる。

< 引用文献 >

Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification., H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Harada, T. Masujima., J. Mass Spectrom., 43, 1692-1700 (2008).

単一細胞ダイレクト質量分析法による細胞内小器官メタボロミクス, 水野 初, 津山 尚宏, 升島 努, BUNSEKI KAGAKU, 63, 477-484 (2014).

Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry., T. Fujii, S. Matsuda, M. L. Tejedor, T. Esaki, I. Sakane, H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Masujima, Nat. Protoc., 10, 1445-1456 (2015).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Takayama Takahiro, Mizuno Hajime, Toyo 'oka Toshimasa, Akatsu Hiroyasu, Inoue Koichi, Todoroki Kenichiro: Isotope Corrected Chiral and Achiral Nontargeted Metabolomics: An Approach for High Accuracy and Precision Metabolomics Based on Derivatization and Its Application to Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer 's Disease, Anal. Chem., 91, 4396 (2019).

Takashi Oka, Hajime Mizuno, Masumi Sakata, Hirofumi Fujita, Tadashi Yoshino, Yoshihisa Yamano, Kozo Utsumi, Tsutomu Masujima, Atae Utsunomiya: Metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy, Sci. Rep., 8, 14979 (2018)

Daiki Asakawa, Hajime Mizuno, Toshimasa Toyo 'oka: Gas-Phase Stability of Negatively Charged Organophosphate Metabolites Produced by Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 28, 2561-2568 (2017)

Hajime Mizuno, Kazuki Ueda, Yuta Kobayashi, Naohiro Tsuyama, Kenichiro Todoroki, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka: The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics, Biomed. Chromatogr., 31, e3864 (pp1-7) (2017)

Hajime Mizuno, Yasuto Miyazaki, Keisuke Ito, Kenichiro Todoroki, Jun Zhe Min,

Toshimasa Toyo ' oka: A rapid and sensitive detection of D-Aspartic acid in Crystallin by chiral derivatized liquid chromatography mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1467, 318-325 (2016)

[学会発表](計 27 件)

加藤良浩、田中菜津美、水野 初、工藤 忍、豊岡利正、轟木堅一郎:ダイレクト nano-ESI-質量分析における網羅的イオン化補正法の開発, 日本薬学会第 139 年会(千葉) 2019 年 3 月 22 日

Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Kenichiro Todoroki, and Shinobu Kudoh: Development and improvement of "Live single-cell mass spectrometry" for metabolomics in a single cell, 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜) 招待講演、2018 年 11 月 29 日

南 哲平、水野 初、豊岡利正、轟木堅一郎:クマムシ 1 個体を目標とした高精度微量メタボロミクスの開発, 病院薬剤師会・日本薬学会東海支部合同学術大会 2018(静岡) 2018 年 11 月 4 日

田中奈津美、水野 初、高山卓大、佐々木崇光、南 哲平、豊岡利正、吉成浩一、轟木堅一郎:ミトコンドリアメタボロミクスのための新規光反応試薬の開発, 病院薬剤師会・日本薬学会東海支部合同学術大会 2018(静岡) 2018 年 11 月 4 日

Takuya Shindo, Hajime Mizuno, Takahiro Takayama, Keisuke Ito, Toshimasa Toyo ' oka, Kenichiro Todoroki: Chiral proteomics to identify isomerized Asp residues in UV irradiated eye lens proteins, RSC International Conference 2018 (Makuhari), Sep. 7, 2018

田中奈津美、水野 初、高山卓大、佐々木崇光、南 哲平、豊岡利正、吉成浩一、轟木堅一郎:細胞内ミトコンドリア代謝物分析のための新規フォトアフィニティープローブの開発, 第 16 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 2018(三浦) 2018 年 9 月 3 日

水野 初、津山 尚宏:1 細胞質量分析法の開発, 第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(福岡) 2018 年 8 月 29 日

水野 初、南 哲平、豊岡利正、轟木堅一郎:ダイレクト質量分析を用いた微量生体成分分析法の開発, 第 64 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2018 年 6 月 30 日

加藤良浩、田中菜津美、水野 初、工藤 忍、豊岡利正、轟木堅一郎:ダイレクト質量分析における網羅的イオン化補正法の開発, 第 64 回日本薬学会東海支部大会(名古屋) 2018 年 6 月 30 日

Hajime Mizuno, Kenichiro Todoroki, Naohiro Tsuyama, Iwao Sakane, Shinobu Kudoh: Live Single-cell MS Analysis for Cellular Phospholipid Dynamics, 66th ASMS Conference (San Diego), Jun. 6, 2018

南 哲平、小澤祐太、水野 初、豊岡利正、轟木堅一郎:クマムシ 1 個体をターゲットとした高感度代謝物分析法の開発, 第 78 回分析化学討論会(宇部) 2018 年 5 月 26 日

水野 初:質量分析を用いた高精度・高感度メタボロミクスの開発, 第 31 回九州分析化学会若手の会 春の講演会(福岡) 招待講演、2018 年 5 月 19 日

田中奈津美、水野 初、高山卓大、佐々木崇光、南 哲平、豊岡利正、吉成浩一、轟木堅一郎:光反応による細胞内ミトコンドリア代謝物分析法の開発, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会(吹田) 2018 年 5 月 17 日

田中奈津美、南 哲平、水野 初、高山卓大、豊岡利正、轟木堅一郎:光反応による細胞内ミトコンドリア代謝物分析法の開発, 日本薬学会第 138 年会(金沢) 2018 年 3 月 27 日

小林勇太、水野 初、高山卓大、豊岡利正、轟木堅一郎:LC-ECD-ESI-MS による高感度代謝物分析法の開発, 日本分析化学会第 66 年会(葛飾) 2017 年 9 月 10 日

進藤卓弥、水野 初、高山卓大、伊藤圭祐、豊岡利正、轟木堅一郎:誘導体化法による Asp 異性化ペプチド保持分離挙動解析, 第 15 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム 2017(金沢) 2017 年 9 月 4 日

水野 初:Single cell metabolomics, OIIB Summer School 2017(岡崎) 招待講演、2017 年 8 月 17 日

進藤卓弥、宮崎康人、水野 初、伊藤圭祐、関 俊哲、轟木堅一郎、豊岡利正:カルボキシル基誘導体化による Asp 異性化ペプチド選択的分析法の開発, 第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム(仙台) 2017 年 6 月 16 日

進藤卓弥、宮崎康人、水野 初、伊藤圭祐、関 俊哲、轟木堅一郎、豊岡利正:キラル誘導体化による Asp ラセミ化ペプチド選択的分析法の開発, 第 65 回質量分析総合討論会(つくば) 2017 年 5 月 18 日

小林勇太、水野 初、轟木堅一郎、関 俊哲、豊岡利正:LC-ECD-ESI-MS を用いた脂溶性物質の高感度分析法の開発, 日本薬学会第 137 年会(仙台) 2017 年 3 月 25 日

21 宮崎康人、進藤卓弥、水野 初、伊藤圭祐、関 俊哲、轟木堅一郎、豊岡利正:キラル誘導体化法を用いたタンパク質中 D-Asp の選択的分析, 第 27 回クロマトグラフィー科学会議(東京) 2016 年 11 月 17 日

- 22 小林勇太、上田一樹、水野 初、轟木堅一郎、関 俊哲、津山尚宏、豊岡利正：安定同位体標識化クロレラを用いた多成分高精度分析法の開発，新アミノ酸分析研究会第6回学術講演会（東京）2016年11月4日
- 23 水野 初、上田一樹、小林勇太、津山尚宏、轟木堅一郎、関 俊哲、豊岡利正：安定同位体標識化クロレラを用いた高精度分析法の開発，第10回メタボロームシンポジウム(鶴岡)2016年10月21日
- 24 小林勇太、水野 初、轟木堅一郎、関 俊哲、豊岡利正：LC-ECD-MS を用いた代謝物の高感度・網羅的分析法の開発，日本分析化学会第65年会（札幌）2016年9月14日
- 25 Yasuto Miyazaki, Hajime Mizuno, Keisuke Ito, Jun Zhe Min, Kenichiro Todoroki, Toshimasa Toyo'oka : A rapid and sensitive detection of D-Asp in protein by chiral derivatization RSC Tokyo International Conference 2016（千葉）2016年9月9日
- 26 宮崎康人、水野 初、伊藤圭祐、関 俊哲、轟木堅一郎、豊岡利正：キラル誘導体化法を用いたタンパク質中 D-Asp の選択的分析，第29回バイオメディカル分析科学シンポジウム（京都）2016年9月2日
- 27 上田一樹、小林勇太、水野初、轟木堅一郎、関 俊哲、津山尚宏、豊岡利正：ノンターゲットメタボロミクスにおける高精度分析法の開発，第76回分析化学討論会（岐阜）2016年5月28日

〔その他〕

ホームページ等

<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/analchem/>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：轟木堅一郎、豊岡利正、上田一樹、小林勇太、宮崎康人、進藤卓也、南哲平、田中奈津美、加藤良浩

ローマ字氏名：Kenichiro Todoroki, Toshimasa Toyo'oka, Yasuto Miyazaki, Kazuki Ueda, Yuta Kobayashi, Takuya Shindo, Teppei Minami, Natsumi Tanaka, Yoshihiro Kato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。