

自己評価報告書

平成23年4月24日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20228004

研究課題名(和文) 細胞膨圧計測—探針エレクトロスプレーによる細胞分子情報計測

研究課題名(英文) Cell Turgor Measurement - Probe Electrospray Ionization (PESI)
Mass Spectrometry for Molecular Profiling Techniques

研究代表者

野並 浩 (NONAMI HIROSHI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：00211467

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：植物、細胞・組織、探針エレクトロスプレー、質量分析、スピーキング・セル・アプローチ、膨圧計測、
プレッシャープローブ

1. 研究計画の概要

植物の細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャルをプレッシャープローブで計測した後、細胞溶液を前処理無しにそのまま探針エレクトロスプレーイオン化質量分析により解析することで、リアルタイムでの細胞分子情報を獲得することを目指し、スピーキング・プラント・アプローチ法を駆使して、植物工場における植物生体情報を取り入れたナノ制御農業の創成を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) 研究代表者の野並を中心に、これまでのプレッシャープローブの改造を試みた。通常は、プレッシャープローブのキャピラリーとして外径1mmのものを使用してきたが、このキャピラリーに替えて、キャピラリー電気泳動装置などに使われているナノサイズフューズドシリカ製キャピラリーへの代替を行った。キャピラリー装着部をHPLCのフェルトが使えるように加工し、HPLC用フェルトコネクタにプラスチックのPEEKチューブを連結し、PEEKチューブを連結する部分を圧力センサー付きセンサーチャンバーに連結した。センサーチャンバーには、マイクロメーターを連結したプランジャーを動かすことができるようにし、ピコリットル以下の溶液を正確に採取する操作を実現した。さらに、プレッシャープローブの操作を精度高で行うために、ピエゾモーターをキャピラリー部分に装着し、ステップ進行を精密に行うことを可能にした。

(2) 分担者の平岡により、探針エレクトロスプレーの設計および使用方法の検討がなされ、生体サンプルの計測が数多くなされた。

チューリップ鱗片組織を使つての計測を行ったところ、プレッシャープローブを用いての細胞レベルでのMALDI MS分析結果、およびMALDI MSでの組織直接分析で得られた結果と同等結果が探針エレクトロスプレーイオン化質量分析で得られ、論文として報告した。

(3) 各種のナノパーティクルを使用することにより、感度高いMALDI分析が可能となった。このMALDI質量分析と探針エレクトロスプレーイオン化質量分析は補足的な関係にある。探針エレクトロスプレーイオン化質量分析では前処理を必要としないため、リアルタイムでの分析が可能である。ミオグロビン溶液のpHを変更することにより、タンパク質の立体構造を変化させる処理を行った。この立体構造の変化は、アミノ酸の電荷の変化による解離と関連しているため、探針エレクトロスプレーイオン化における電荷の付加状態に変化が起こる。ミオグロビンの立体構造の変化と関連して起こる電荷付加の変化を秒単位で計測することに成功した。タンパク質を重水に入れると、タンパク質の立体構造においてもっとも外側に面して水分子と接している部分の水素原子が重水素原子に置き換えられる。重水素への置換は重水への移行処理後、時間とともに進行し、タンパク質の立体構造に依存して最も外側にどのようなアミノ酸が露出しているかによって置換速度が変化する。探針エレクトロスプレーイオン化法を用いることで、グラミジンを重水に移行させた後、リアルタイムで前処理することなく重水置換の様子を計測することが可能となり、タンパク質でどの部位のアミノ酸がもっとも外側にあるのか、タ

ンパク質の水溶液での立体構造の解析が可能となった。これらのことから、探針エレクトロスプレーイオン化質量分析によるリアルタイム分子計測法を確立することができた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

分析試料サンプルの前処理無しのイオン化を探針エレクトロスプレーイオン化で実現し、質量分析を行うことができる研究成果は世界で最初であり、学術的価値は高い。とくに、リアルタイムで遅れ時間無しに生きたサンプルで質量分析を行うことはこれまでになされておらず、計測された結果を、同じサンプルを使用して、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法で確認しており、計測の正確さを実証することができた価値は高い。リアルタイムでの分析法を超微量（ピコリットル以下のレベル）で行うことができる技術はこれまでに開発されておらず、タンパク質などの構造解析も微量サンプルで可能になった。プレッシャープローブを使用した計測では、植物水分状態計測と同時に分子計測することを植物体を破壊せずにリアルタイムで行うことが可能となり、植物工場におけるスピーキング・プラント・アプローチとして、植物工場における環境制御および品質管理の研究へも波及させることが可能となってきた。

4. 今後の研究の推進方策

愛媛大学農学部では、植物工場が大幅に拡張され、トマト栽培が継続して行われており、トマト植物体における細胞膨圧計測－探針エレクトロスプレーイオン化質量分析が可能になれば、スピーキング・プラント・アプローチ制御法による植物工場の環境制御を行う環境条件はそろっている。

これまでに、探針エレクトロスプレーイオン化質量分析が、前処理無しにリアルタイムで植物サンプルおよび微量サンプルを計測できることを実証してきた。残されている研究課題は、植物工場内および温室内で成長中の植物試料を探針エレクトロスプレーイオン化法およびプレッシャープローブイオン化法を使用して、精度高く計測することにある。探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法をリアルタイムで行うことを可能にしたため、この分析法を植物細胞に応用することで、本課題の目的を達成することが可能になる。本課題研究の一部として、植物工場および温室でのトマト栽培、生理計測も並行して行っており、トマト果実における計測も進行中である。これまでの研究成果から、当初の目標に向けて順調に研究が進展しており、

予定どおりの成果が見込まれるといえる。

5. 代表的な研究成果

(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 15 件)

- ①Yousef Gholipour, Silvana L. Giudicessi, Hiroshi Nonami, and Rosa Erra-Balsells (2010) Diamond, Titanium Dioxide, Titanium Silicon Oxide, and Barium Strontium Titanium Oxide Nanoparticles as Matrixes for Direct Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry Analysis of Carbohydrates in Plant Tissues. *Analytical Chemistry* 82: 5518-5526. 査読有り
- ②Yu, Z., Chen, L. C., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2010) Real-time reaction monitoring by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (11), pp. 1507-1513. 査読有り
- ③Yu, Z., Chen, L. C., Suzuki, H., Ariyada, O., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2009) Direct Profiling of Phytochemicals in Tulip Tissues and In Vivo Monitoring of the Change of Carbohydrate Content in Tulip Bulbs by Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (12), pp. 2304-2311. 査読有り
- ④Yousef Gholipour, Hiroshi Nonami, and Rosa Erra-Balsells (2008) Application of Pressure Probe and UV-MALDI-TOF MS for Direct Analysis of Plant Underivatized Carbohydrates in Subpicoliter Single-Cell Cytoplasm Extract. *J Am Soc Mass Spectrom* 19: 1841-1848. 査読有り
- ⑤Yousef Gholipour, Hiroshi Nonami, Rosa Erra-Balsells (2008) In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix. *Analytical Biochemistry* 383: 159-167. 査読有り

[その他]

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/%7Eepbb/newpage5.html>