

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2011

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 Cell 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

研究成果の概要（和文）：

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た。プレッシャープローブのシリコンオイルにエンジンオイル添加物を混合させた結果、生きた植物細胞を用いた場合でも、プレッシャープローブで採集した細胞溶液のイオン化に成功し、細胞代謝物質の質量分析を可能とした。

研究成果の概要（英文）：

A cell pressure probe measures cell turgor of plants, and can extract cell solution directly from actively growing plants. The pressure probe technique and the probe electrospray ionization (PESI) mass spectrometry (MS) can be combined together in order to analyze cell molecular components in intact growing crops. When a small amount of engine oil additives was mixed with silicon oil in the pressure probe, ionization of cell metabolites was successfully conducted for MS analyses. By using physiological molecular information, environmental conditions can be adjusted optimally to grow crops in plant growth factories.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,900,000	6,570,000	28,470,000
2009年度	56,600,000	16,980,000	73,580,000
2010年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2011年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
年度			
総計	109,300,000	32,790,000	142,090,000

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：生物環境調節、植物、細胞・組織、探針エレクトロスプレー、質量分析、スピニング・セル・アプローチ、膨圧計測、プレッシャープローブ

1. 研究開始当初の背景

質量分析の分野では、2002年度のノーベル化学賞が田中耕一、John B. Fenn に授与されたことに象徴されるようにタンパク質

を始めとして、糖質、核酸、脂質などの生体高分子が分析できるようになり、人工ポリマーまで分析対象が広がっている。質量分析は精製された純品の物質を分析するのが一般

的であったが、近年、国外では DESI の開発により、実試料の非破壊分析ができるようになってきた (Takats, Z. et al. Science 2004, 306, 471-473.)。しかしながら、DESI はサンプル表面にある物質しか分析対象にならず、またイオン化されやすい分子に限定されるので、生体内部情報の非破壊計測はできない。山梨大学の平岡賢三は探針エレクトロスプレーを開発し (第 55 回質量分析総合討論会 (2007) 3P-03-A03)、細胞等の生体組織を鋭いステンレス針で刺した後、針先端に付着した分子をイオン化する方法で、細胞の分子イメージングを開発した。例えば、探針エレクトロスプレーを用いれば、試料の調製なしで、バナナの解糖過程の経時変化、オレンジのプロフィールイメージング、マウスの脳や肝臓の直接測定、イクラ、ヒト尿、ヒトの血液など、実試料に対して、強いイオンシグナルでマススペクトルが得られることを見出している。この成果は、従来のキャピラリーを用いる際の目詰まりなどの問題がなく、また必要とされる試料採取量がナノエレクトロスプレーの報告値、数 10 ナノリットル (nL)(Shiea, 2006)の 100 分の 1 以下、即ち、ピコリットル (pL) 以下である点で画期的である。しかも、一回の試料採取とそれに続くエレクトロスプレーで、数 10 アットモル (amol) 程度の試料が十分強いマススペクトルのシグナルを与えることが明らかとなっている。

植物の細胞膨圧の計測法は、プレッシャープローブで確立している。細いキャピラリーを直接細胞に刺し、細胞内の圧力を計測し、その直後に、細胞内溶液をキャピラリーで吸い取り、細胞溶液の浸透圧を計測することが可能である (野並浩「植物水分生理学」(2001) 養賢堂、pp263)。また、細胞膨圧変化と体積変化から、細胞壁の弾性率を求めることが可能であり、膨圧の緩和時間から、細胞膜の水透過率を求めることも可能である。特徴として、プレッシャープローブは生きた植物をほとんど破壊することなく水分状態計測できる計測器である。もし、探針エレクトロスプレーとプレッシャープローブを併用するシステムが開発されれば、植物においての“分子情報”と“細胞生理情報”を同時に獲得することが可能となる。このような 2 つの異なる微量計測法を融合することで質量分析に技術革新を起こすことを意図したことが背景にある。

2. 研究の目的

本研究は、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により直接質量分析するシステムを開発し、植物工場において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・プラント・アプローチ (Speaking Plant Approach) (SPA) 法と直結するナノ・プレジジョン・アグリカルチャー (Nano-Precision Agriculture) (ナノ精度農業) を創成することを目的としている。

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 (PESI: Probe Electrospray Ionization) 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、細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャルなどの物理的計測と、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、SPA 法によりエネルギー効率の高く、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。

3. 研究の方法

具体的には、非破壊植物から細胞溶液を採集した上に、サブピコリットルレベルで給液量を調整できるプレッシャープローブに改良し、探針エレクトロスプレーと組み合わせた装置を開発して、植物の細胞分子情報を獲得することを計画している。

植物細胞から採取した試料液をプレッシャープローブ先端から押し出して、これを探針と接触させてサンプリングし、エレクトロスプレーすることによって試料液の質量分析を行う装置を製作し、栽培している植物から採集した細胞溶液を質量分析する。

分担者の平岡賢三は、探針エレクトロスプレーを開発し、国際特許申請中である。鋭い探針を数ないし数 10 Hz で上下運動させ、下至点において試料と接触させて探針先端に試料を捕捉し、上至点において、数 100-1000 V の高電圧を探針に印加して、探針先端に捕捉した試料をエレクトロスプレーし、生成した気相イオンを質量分析する。

探針エレクトロスプレー法により、生体試料中の糖、ペプチド、タンパク質、リン脂質等が検出された。先端の曲率半径数 10 nm の探針使用で、生体試料に 1 回接触させるだけでマススペクトルが得られ、数 10 アットモル以下という超微量試料検出が可能となっている (Hiraoka et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry (2007) 21 (18), pp. 3139-3144)。

分担者の平岡と協働し、プレッシャープロ

ープと探針エレクトロスプレーを組み合わせた装置を開発する。その際、ポスドクとして山梨大学博士課程修了生を雇用する。野並はこれまでプレッシャープローブの操作、計測法の開発、改造を手がけてきた(野並浩「植物水分生理学」(2001) 養賢堂、pp263)。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1 mm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う。キャピラリー装着部をHPLCの金属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する。センサーチャンバーには、プレッシャープローブの模式図、写真(野並浩「植物水分生理学」(2001) 養賢堂、pp263)にあるようにマイクロメーターを連結した電動モーターが備えられ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する。これは通常プレッシャープローブで行うことができ、精度の高い操作が可能である(野並浩「植物水分生理学」(2001) 養賢堂、pp263)。プレッシャープローブの内部は気体が溶存しないように工夫されたシリコンオイルで満たされており、プレッシャープローブの先端のキャピラリー部で圧力を計測した後、キャピラリー内に細胞溶液をプランジャーモーターで取り込む(野並浩「植物水分生理学」(2001) 養賢堂、pp263)。この採集した細胞溶液をキャピラリーから押し出し、これを探針で捕捉した後、探針に高電圧を印加してエレクトロスプレーを発生させて、発生したイオンを質量分析計で測定する。初年度は、質量分析計に導入する前段階のプレッシャープローブの改造を愛媛大学にて行う。また、改造したプレッシャープローブの機能の確認と探針エレクトロスプレーとの結合実験を山梨大学において行う。

4. 研究成果

(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1 mm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く行うために、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、グラミシ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。

(4) プレッシャープローブで生きた細胞から抽出した細胞溶液を直接イオン化するために、高電圧印加を試みた。プレッシャープローブのキャピラリーに充填するシリコンオイルにエンジンオイル添加物を少量混合することによって、イオン化が促進されることが発見され、生きた細胞から取り出した細

胞溶液を直接質量分析することが可能となった。高電圧を印加しても、プレッシャープローブの圧力センサー側には高電圧は印加されず、プレッシャープローブの機能を妨げることなく、プレッシャープローブとして連続して細胞計測が可能であり、細胞溶液を抽出し、そのまま質量分析計のオリフィスの入口にイオン化した細胞代謝物を導入できるようになった。質量分析計に導入する前にサンプルの体積を正確に計測できるため、定量計測の可能性が出てきた。

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 25 件)

- ① Gabriela Petroselli, Mridul Kanti Mandal, Lee Chuin Chen, Gustavo T Ruiz, Ezequiel Wolcan, Kenzo Hiraoka, Hiroshi Nonami, Rosa Erra-Balsells (2012) Mass spectrometry of rhenium complexes: a comparative study by using LDI-MS, MALDI-MS, PESI-MS and ESI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* Volume 47, Issue 3, pages 313–321, March 2012. DOI 10.1002/jms.2965 査読有り
- ② M. K. Mandal, L. C. Chen, Z. Yu, H. Nonami, R. Erra-Balsells and K. Hiraoka (2011) Detection of Protein from Detergent Solutions by Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 46: 967-975, (2011.10) DOI 10.1002/jms.1977 査読有り
- ③ Nonami, H., Gholipour, Y., Erra-Balsells, R. (2011) Plant cell measurements with mass spectrometry for speaking cell approach in plant growth factories. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-Papers Online)* 18 (PART 1), pp. 1791-1795. DOI: 10.3182/20110828-6-IT-1002.00450 査読有り
- ④ Yousef 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. DOI: 10.1021/ac1003129 査読有り
- ⑤ Yu, 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. DOI: 10.1002/rcm.4556 査読有り
- ⑥ 平岡賢三 (2010) 基礎から学ぶマスマスペクトロメトリー／質量分析の源流 第8回 エレクトロスプレーの基礎 (Fundamentals of Mass Spectrometry—Fundamentals of Electrospray—) *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, Vol.58 (No.4), 139-154 査読有り
- ⑦ 平岡賢三 (2010) 探針エレクトロスプレーの開発と応用. *BUNSEKI KAGAKU* Vol.59 (No.2), 95-105 査読有り
- ⑧ Silvana L. Giudicessi, M. Kaniz Fatema, Hiroshi Nonami, and Rosa Erra-Balsells (2010) Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) as an Auxiliary Tool in the Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Native and Derivatized β -Cyclodextrins, Maltoses, and Fructans Contaminated with Ca and/or Mg. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21 (9), pp. 1526-1529. doi:10.1016/j.jasms.2010.05.002 査読有り
- ⑨ Leandro N. Monsalve, M. Kaniz Fatema, Hiroshi Nonami, Rosa Erra-Balsells, Alicia Baldessari (2010) Lipase-catalyzed synthesis and characterization of a novel linear polyamidoamine oligomer. *Polymer* 51 (14), pp. 2998-3005. doi:10.1016/j.polymer.2010.04.071 査読有り
- ⑩ Yu, 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. doi:10.1016/j.jasms.2009.08.023 査読有り
- ⑪ Olga I. Tarzi, Hiroshi Nonami and Rosa Erra-Balsells (2009) The effect of

temperature on the stability of compounds used as UV-MALDI-MS matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-trihydroxyacetophenone, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, nor-harmane and harmane. J. Mass Spectrom. 2009, 44, 260–277. DOI 10.1002/jms.1506 査読有り

- ⑫ Yousef 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. doi:10.1016/j.jasms.2008.08.006 査読有り
- ⑬ Yousef 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. doi:10.1016/j.ab.2008.08.034 査読有り

[学会発表] (計 25 件)

- ① 野並浩 (2011) 細胞水分生理計測と質量分析を組み合わせたスピーキング・セル・アプローチ. 北海道大学, 札幌市 (2011年9月6~8日) 日本生物環境工学会 2011年札幌大会 (オーガナイズドセッション招待講演) 講演要旨: OS25:365-370.
- ② Hiroshi Nonami, Rosa Erra-Balsells, Yousef Gholipour (2011) In situ Monitoring of Pesticide Residues on the Surface of Tomato Fruit with Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. The CIGR International Symposium WEF 2011, September 19-Sept. 23, 2011, Tower Hall Funabashi, Tokyo, Japan. Program and Abstract: 23C02:48-49.
- ③ Erra-Balsells, R., Gholipour, Y. Giudicess, S.L., Nonami, H. (2011) Nanoparticles as Matrices for Direct UV-MALDI-MS Analysis of Neutral Carbohydrates in Plant Tissues. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, May 22-26,

2011, Kyoto International Congress Center, 24P102 (ICAS11-P0307): Page 122.

- ④ Nonami, H., Gholipour, Y., Erra-Balsells, R. (2010) Direct Tissue and Cell Analysis of Tulip Plants by Combining Pressure Probe and UV-MALDI-MS. 28th International Horticultural Congress. Lisboa Congress Centre, August 22-27, 2010, Lisbon, Portugal, Book of Abstract: T12 MICROPROPAGATION; T12.010 Page 229.
- ⑤ Rosa ERRA-BALSELLS, Hiroshi NONAMI, Yousef GHOLIPOUR (2010) Speaking Plant Approach Combining Pressure Probe and MALDI Mass Spectrometry. The 58th Annual Conference on Mass Spectrometry & 1st Asian and Oceanic Mastrometry Conference, Tsukuba, Japan, 2010 Book of Abstracts 18P-066: Page 367.

[図書] (計1件)

- ① 平岡賢三 (編著) 株式会社国際文献印刷社、質量分析の源流 - 基礎から学ぶマスマススペクトロメトリー - 2011, pp243, ISBN: 978-4-902590-19-7

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

平岡 賢三 (HIRAOKA KENZO)

山梨大学・クリーンエネルギー研究センター・特命教授

研究者番号: 80107218

(3) 研究協力者

ERRA-BALSELLS, Rosa (ERRA-BALSELLS ROSA)

ブエノスアイレス大学・基礎自然学部 (大学間学術交流協定・学部間学術交流協定締結校)・教授

研究者番号: