

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19111

研究課題名（和文）コロナ放電イオン化法を用いた新規質量分析による植物の揮発性代謝物分析法の確立

研究課題名（英文）Establishment of new analytical method for plant volatile organic compounds using corona discharge ionization mass spectrometry

研究代表者

白武 勝裕（Katsuhiro, Shiratake）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：簡便、迅速、非破壊、リアルタイム分析が可能な新規質量分析技術「コロナ放電イオン化質量分析」が、植物が発生する揮発性有機化合物（VOCs）の分析に有効であるかの検証を行った。果実の香りに関わるVOCsをコロナ放電イオン化-質量分析で捉えられるかを検証するために、リンゴのVOCsを分析したところ、従来法GC-MSと同等、あるいは化合物によってはGC-MSより高感度でVOCsを捉えることができた。また、コロナ放電イオン化質量分析により、果実が病原菌に感染した時に発生するマーカー化合物を同定し、さらに、マタタビの葉が傷害を受けた時に発生するVOCsをリアルタイムで分析することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の揮発性有機化合物（VOCs）の分析には、GC-MSが用いられることが多かったが、GC-MSではVOCsの捕集/注入やクロマトグラフィーによる分離など、手間や時間のかかるステップが必要であった。本研究で用いた「コロナ放電イオン化-質量分析」は、植物が発生するVOCsを直接コロナ放電によりイオン化して質量分析装置に導くため、簡便、迅速、非破壊、リアルタイム分析が可能である。本研究では、リンゴのVOCs分析などから、コロナ放電イオン化-質量分析が植物のVOCs分析に有効あり、植物科学や農作物の成分分析に威力を発揮する技術であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have verified a new mass spectrometry technique, corona discharge ionization-mass spectrometry, that is simple, rapid, nondestructive, and capable of real-time analysis, is applicable to the analysis of volatile organic compounds (VOCs) from plants. To verify whether corona discharge ionization-mass spectrometry can analyze VOCs related to fruit aroma, we analyzed apple VOCs and found that corona discharge ionization-mass spectrometry can detect apple VOCs as sensitive as conventional GC-MS, or more sensitive than GC-MS for some compounds. In addition, we identified marker compounds from the fruits infected by pathogens, and we also succeeded in analyzing VOCs from leaves after being injured in real time.

研究分野：園芸生理・生化学

キーワード：コロナ放電イオン化質量分析 アンピエントイオン化質量分析 揮発性有機化合物 VOCs リアルタイム質量分析 リンゴ香気成分 罹病果実マーカー マタタビ揮発性有機化合物

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

作物に含まれる代謝物は、作物の生理状態を知る上での重要な指標となるだけでなく、作物の品質を決定する成分、すなわち食味成分や香り成分、機能性成分そのものあり、代謝物分析は作物の成長の理解や品質評価を行うための必要不可欠なツールである。

しかしながら、現在、行われている代謝物分析は、試料からの代謝物の抽出や前処理などの煩雑な作業や、LC、GC、CE などの時間を要する分離ステップが存在するため、これらが解析のネックとなっている。そこで、研究代表者の白武は生体試料に針を刺すだけで、秒オーダーで代謝物の分析が可能な、探針エレクトロスプレー/タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) が、植物の内性代謝物の分析に大きな威力を発揮することを明らかにした。

PESI/MS/MS が植物の内性代謝物の分析に有効であることが明らかになったため、次に、植物が発生する揮発性有機化合物 (VOCs) を簡便・迅速に分析できる技術として、『コロナ放電イオン化質量分析』に着目した。植物が発生する VOCs は、アレロパシー物質として他植物とのコミュニケーションに用いられたり、昆虫、動物、微生物など植物以外の生物の誘引や忌避に働いたりしている。そして作物が発生する VOCs は香りや日持ち性など、作物の品質に深く関与する物質でもある。

コロナ放電イオン化質量分析は、分担者であり質量分析におけるイオン化技術の専門家である関本が開発した技術である。コロナ放電イオン化質量分析は、大気中の化合物をコロナ放電により直接イオン化し、質量分析装置に導くことで分析を行う技術であり、簡便、迅速、非破壊、リアルタイム分析が可能な分析法である。しかしながら、コロナ放電イオン化質量分析は、これまでに植物が発生する VOCs の分析で活用されたことがない。このため、コロナ放電イオン化質量分析が、植物の VOCs 分析に有効あり、植物科学や農作物の成分分析に威力を発揮する技術であることを示す必要がある。

2. 研究の目的

コロナ放電イオン化質量分析は、大気中の化合物をコロナ放電により直接イオン化して質量分析を行う技術であり、植物が放出する VOCs をそのままイオン化して質量分析できると考えられる。これまで、植物が発生する VOCs の分析には、GC-MS が用いられることが多かったが、GC-MS では VOCs の捕集と GC への注入、クロマトグラフィーによる分離など、手間や高額な装置、そして時間を要するステップが必要であった。

コロナ放電イオン化質量分析を用いることにより、植物が発生する VOCs を捕集することなく、クロマトグラフィーによる分離を必要とせず、直接、質量分析することが可能となる。コロナ放電イオン化質量分析により、植物が発生する VOCs を簡便かつ迅速に質量分析できるだけでなく、リアルタイム分析することも可能となる。

そこで、本研究では、i) 果実が発生する VOCs をコロナ放電イオン化質量分析により測定し、香りに関わる成分を同定できるか、ii) 病原菌が感染した植物が発生する VOCs をコロナ放電イオン化質量分析により測定し、病原菌感染のマーカー化合物を特定できるか、iii) 植物に外的刺激を与えた時の VOCs の変化を、コロナ放電イオン化質量分析によりリアルタイムモニターできるかを明らかにし、植物研究や作物研究におけるコロナ放電イオン化質量分析の有効性を示すことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

i) 果実が発生する VOCs の解析には、農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点 (盛岡) において 2021 年および 2022 年に収穫されたリンゴ 9 品種‘ふじ’、‘さんさ’、‘つがる’、‘紅玉’、‘ジョナゴールド’、‘王林’、‘ガラ’、‘あかね’、‘ゴールデンデリシャス’を供試した。

ii) 病原菌が感染した植物が発生する VOCs には解析には、農研機構果樹茶業研究部門リンゴ研究拠点または JA つがる弘前のリンゴおよびセイヨウナシの選果過程で発生した輪紋病果を供試した。

iii) 植物に外的刺激を与えた時の VOCs の解析には、名古屋大学内で栽培した、トマト、イヌハッカ、マタタビ、ミヤママタタビ、あるいは岐阜県内の山に自生するマタタビの葉を供試した。

(2) 質量分析

コロナ放電イオン化装置を装備した、名古屋大学または横浜市立大に設置されたタンデム四重極型質量分析装置、横浜市立大に設置された四重極-オービトラップ型質量分析装置を使用した。GC-MS は協力機関の GC-QTOF 質量分析装置を使用した。

果実の VOCs の分析は果実をプラスチック製の容器または袋に密閉し、容器内または袋内の気体をコロナ放電イオン化装置に導いて分析した。その他の材料については、直接、植物体 (葉) から揮発する VOCs をコロナ放電イオン化装置に導いて分析した。

4. 研究成果

(1) 果実が発生する VOCs をコロナ放電イオン化質量分析

コロナ放電イオン化質量分析の植物 VOCs 分析への応用は、本研究が初めてである。このため、コロナ放電を発生させるニードル(針)の形状や位置、印加する電圧などの最適化を行う必要がある。そこで、まずこのイオン化法の最適化を実施し、これまで植物 VOCs 以外の分析に用いていた針(昆虫針)、位置、電圧で、植物 VOCs を感度良く分析できることを明らかにした。

また、植物 VOCs を捕集ツール(モノトラップ)に捕集・濃縮して分析する方法[捕集・濃縮分析]と、植物試料から発生する VOCs を、直接、コロナ放電発生ニードルに導いてイオン化して分析する方法[直接分析/リアルタイム分析]を比較したところ、[直接分析/リアルタイム分析]の方が感度良く、より多くの VOCs を捉えることができることが明らかとなった。このため、今後は[直接分析/リアルタイム分析]を中心に分析することとした。果実の VOCs の分析に関しては、果実をプラスチック製の容器または袋に密閉し、容器内または袋内の気体をコロナ放電イオン化装置に導いて分析することにより安定して分析できることが分かったため、この方法により分析を行うこととした。

(2) 果実が発生する VOCs をコロナ放電イオン化質量分析

2021年、2022年の2年間に渡り、農研機構果樹茶業研究部門が供給するリンゴ9品種の果実について、コロナ放電イオン化タンDEM四重極型質量分析装置による VOCs のターゲット分析、コロナ放電イオン化四重極-オービトラップ型質量分析装置による VOCs のノンターゲット分析、さらに当初計画には無かったが、VOCs 分析に一般的に用いられている GC-MS(本研究では TDU-GC-O-FPD-QTOF 質量分析装置を使用)によるノンターゲット分析を実施した。

その結果、3法で概ね同様の結果が得られ、クロマトグラフィーの無いコロナ放電イオン化質量分析装置によっても、従来法 GC-MS と同等の結果が得られることが示された。また、コロナ放電イオン化質量分析装置では、GC-MS では捉えにくかった比較的分子量が大きな VOCs やエステル類を感度良く、検出できることも明らかとなった。そして、検出した VOCs、特にエステル類のプロファイルから、リンゴ果実の VOCs の品種間差異を示すことができた。具体的な結果を以下に記す。

図1には、コロナ放電イオン化法(正イオンモード)で得られたリンゴ発散香气成分のマススペクトルの例を示す。いずれのリンゴ品種でも、主に $C_nH_{2n}O_2$ ($n = 2-12$)のプロトン付加分子 $[C_nH_{2n}O_2 + H]^+$ が検出されたが、そのイオン強度は品種によって異なった。 $C_xH_{2x}O_2$ は飽和エステル ($R_1-COO-R_2$) または飽和カルボン酸 (R_1-COOH) であり、構造異性体も多く存在する。そこで、それぞれのリンゴ品種においてどのような化合物が含まれているかを調べるため、各種 $[C_xH_{2x}O_2 + H]^+$ に対して衝突誘起解離法(CID)を実施した。 $[C_nH_{2n}O_2 + H]^+$ のフラグメンテーションパターンから、カルボン酸(R_1-COOH)、メチルエステル($R_1-COO-CH_3$)、またはその他のエステル ($R_1-COO-R_2$)を見分けることが可能で、さらには酸側(R_1)とアルコール側のアルキル基(R_2)の長さ分かる(Nishikido and Sekimoto, in review)。CIDの結果より、(i) $C_nH_{2n}O_2$ の多くはエステルであること、また、(ii) 主要な $C_nH_{2n}O_2$ の n 数や各 n 数における異性体の分布は、リンゴの各品種によって大きく異なることが明らかとなった。例えば、ガラから検出される主要なエステルは $C_{10}H_{20}O_2$ 、 $C_8H_{16}O_2$ 、 $C_{12}H_{24}O_2$ であったが(図2a)、あかねの場合は $C_{11}H_{22}O_2$ や $C_8H_{16}O_2$ であった(図2b)。また、 $C_8H_{16}O_2$ を構成する異性体は、ガラでは $C_3H_7-COO-C_4H_9$ (51%)と $CH_3-COO-C_6H_{13}$ (45%)であったのに対し(図2a)、あかねでは $C_4H_9-COO-C_3H_7$ (42%)、 $C_3H_7-COO-C_4H_9$ (41%)、および $CH_3-COO-C_6H_{13}$ (14%)であった(図2b)。

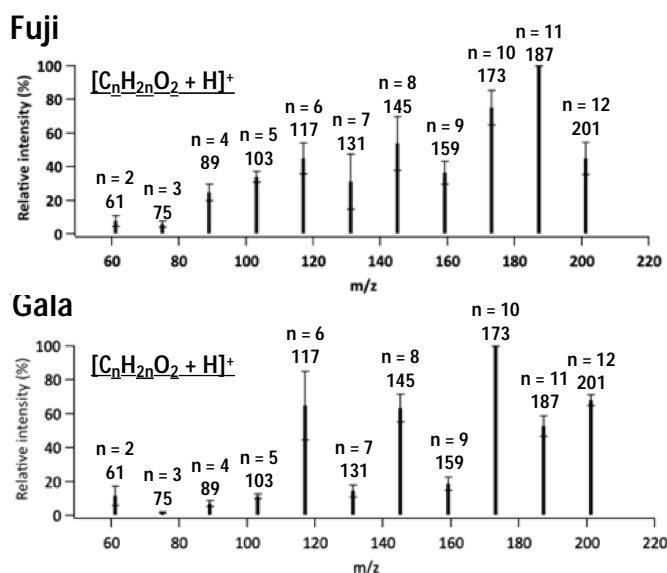


図1. リンゴ果実が発生する VOCs の質量スペクトル。2年間測定したリンゴ9品種のデータのうち、2022年の‘ふじ’と‘あかね’のデータを示した。Q Exactive Focus 四重極-オービトラップ型質量分析装置を分析に用いた。エラーバーは5回の反復測定の標準誤差を示す。本スペクトルでは、 $[C_nH_{2n}O_2 + H]^+$ のイオン種のみ抜き出している。

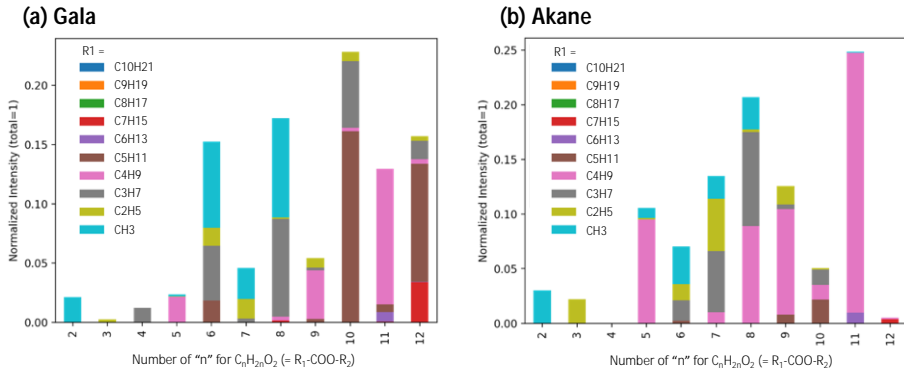


図2 .2年間測定したリンゴ9品種のデータのうち、2022年の‘ガラ’と‘あかね’に由来する $C_nH_{2n}O_2$ ($n=2-12$)に含まれる異性体の分布。

さらに、リンゴ果実以外にも、バラの花、カンキツ類の果実、ミツバヤシソの葉などの園芸作物のVOCsを、コロナ放電イオン化タンデム四重極型質量分析装置より検出し、それぞれの作物に特徴的な既知化合物を含め、VOCsを捉えることに成功した。バラの花については、芳香が異なる多数の品種を分析し、バラの花のVOCsの品種間差異を示すことができた。

(3) 病原菌が感染した植物が発生するVOCsをコロナ放電イオン化質量分析

輪紋病に罹患したセイヨウナシおよびリンゴの発生するVOCsを、コロナ放電イオン化四重極-オービトラップ型質量分析装置によりノンターゲット分析したところ、多数の化合物ピークを得た。その中でエタノールが特徴的に罹病果で発生していたことから、エタノールが罹病果のマーカーとなる可能性を示すことができた。

(4) 植物に外的刺激を与えた時のVOCsの変化

まず、当初計画に従いトマトの葉に含まれるVOCsを、コロナ放電イオン化タンデム四重極型質量分析装置より分析した。

トマトの葉に傷害を与えない時には、ほとんどVOCsのピークは検出されなかったが、葉にカミソリで傷を与えると、草の青臭さの原因物質として知られるヘキサナール (m/z 99)をはじめとするVOCsが検出された(図3)。また、カミソリの刃で葉の表面を1回やさしく撫でた時(トライコームを壊した時)と、カミソリの刃で葉の表皮細胞や葉肉細胞を傷つけた時では、発生するVOCsが異なり、前者ではヘキサナールが発生せず、後者で発生した(図3)。この結果から、トマトのトライコームに含まれるVOCsは、表皮細胞や葉肉細胞に含まれるVOCsとは異なり、ヘキサナールはトライコームには含まれず、表皮細胞や葉肉細胞に含まれることが明らかとなった。また、灌水後、経時的に葉に傷をつけてVOCsを測定したところ、灌水後に経時的に発生するVOCsの量が増えることも明らかにした。

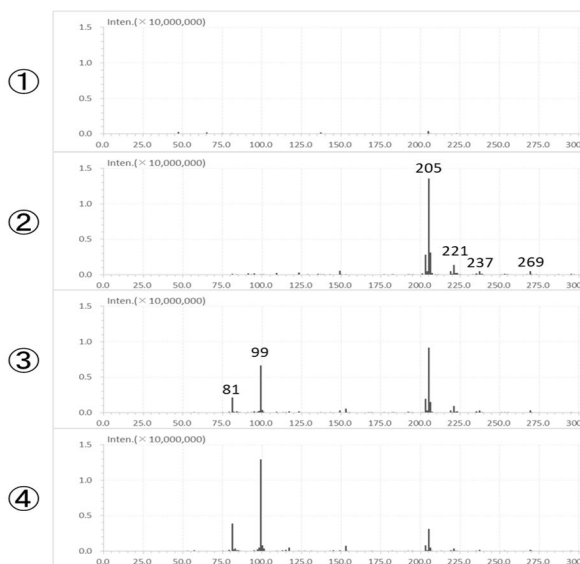


図3 . トマトの葉に傷害を与えた時に発生するVOCsの質量スペクトル。無処理、カミソリで表面を1回撫でた時(トライコームを傷つけるようにし、表皮細胞を極力傷つけないように撫でた時)、カミソリで5回でた時(表皮も傷つけるように撫でた時)、カミソリの刃を葉に何度も押し当てた時(表皮細胞および葉肉細胞まで傷つけた時)に発生するVOCsをコロナ放電イオン化タンデム四重極型質量分析装置より分析した。

次に実験材料を、マタタビ、ミヤママタタビ、イヌハッカに変更して、実験を続けた。その結果、健全なマタタビ葉からはネペタラクトールが検出されず、葉を揉んで傷害を与えた後にネペタラクトールが発生する過程を、コロナ放電イオン化タンデム四重極型質量分析装置により、リアルタイムに捉えることに成功した。一方、ネペタラクトールを蓄積しないミヤママタタビでは、健全な葉からも、傷害を与えた葉からも、ネペタラクトールは検出されなかった。

イヌハッカでは、健全な葉からも、傷害を与えた葉からも、ネペタラクトンが検出され、イヌハッカは、葉のトライコームにネペタラクトンを蓄積し、傷害の有無に関わらずネペタラクトンを葉から発散していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 財津桂, 高橋一誠, 江口盛一郎, 井口亮, 白武勝裕	4. 巻 63
2. 論文標題 簡便に・迅速に・誰にでも」使える分析手法: 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) の食品分析への応用と展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本食品衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 J-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 白武勝裕, 財津桂	4. 巻 5
2. 論文標題 PESI/MS/MSの植物成分分析への活用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 関本奏子	4. 巻 63
2. 論文標題 質量分析におけるイオン化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本食品衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 J-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大野木涼乃, 関本奏子	4. 巻 56
2. 論文標題 衝突誘起解離質量分析 (CID-MS) 法によるモノテルペン異性体の識別	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本化粧品技術者会誌	6. 最初と最後の頁 395-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5107/sccj.56.395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Misaki, Zaitzu Kei, Yoshikawa Ikue, Otagaki Shungo, Matsumoto Shogo, Oikawa Akira, Shiratake Katsuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 High-throughput analysis of anthocyanins in horticultural crops using probe electrospray ionization tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhad039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 白武勝裕, 財津桂財	4. 巻 54
2. 論文標題 PESI/MS/MSの植物の代謝物分析への活用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 841-843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 本郷 やよい, 関本 奏子	4. 巻 70
2. 論文標題 MSデータを取る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 202 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S22-53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 本郷 やよい, 関本 奏子	4. 巻 70
2. 論文標題 MSデータ - マススペクトル - を読む	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 274 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S22-64	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 本郷 やよい, 関本 奏子	4. 巻 71
2. 論文標題 MSデータ - MS/MSスペクトル - を読む	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 19 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S23-06	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石橋美咲, 吉川郁恵, 財津桂, 及川彰, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕
2. 発表標題 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (PESI/MS/MS) による園芸作物におけるアントシアニンのハイスループット分析
3. 学会等名 70回日本質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白武勝裕
2. 発表標題 理研鶴岡と共に歩んだ園芸作物のメタボローム研究 ~大果変異セイヨウナシのオミクス研究を中心に~
3. 学会等名 理研CSRS鶴岡サテライトミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanako Sekimoto, Yuto Nishikido, Toshio Hanada, Kazuhisa Uchiyama, Katsuhiro Shiratake
2. 発表標題 Profiling of volatile ester isomers emitted from apple fruits by atmospheric pressure corona discharge ionization mass spectrometry
3. 学会等名 71st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関本奏子
2. 発表標題 揮発性植物分子が作り出す大気環境とは？
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会 シンポジウム「分子から探る植物 気候フィードバック」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関本奏子, 大野木涼乃	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術教育出版社	5. 総ページ数 10
3. 書名 化粧品機能創製・処方・素材開発・解析評価技術と美容理論「第30章 香りの構成要素分析 CID-MS法によるモノテルペン異性体のリアルタイム識別」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関本 奏子 (Sekimoto Kanako) (40583399)	横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)・准教授 (22701)	
研究分担者	花田 俊男 (Hanada Toshio) (30707641)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------