

## 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24年 5 月 7 日現在

機関番号：17102  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22658043  
研究課題名（和文） ニュートリメタボロミクスを切り拓く高精度質量分析システムの開発  
研究課題名（英文） Development of highly precise mass spectrometric analytical system for creation of nutrimetabolomics  
研究代表者  
藤村 由紀（FUJIMURA YOSHINORI）  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授  
研究者番号：20390304

研究成果の概要（和文）：本研究では、食品・生体由来代謝物の超高感度局所解析を可能とする先鋭的 MALDI 質量分析システムを開発し、生体局所応答に基づく食品成分の新奇機能性評価法の確立を目指した。質量分析での選択性と検出感度を決定づける最大の要因が対象物質のイオン化効率にあるため、食品・生体代謝物の検出を可能とするイオン化助剤（マトリックス）のスクリーニングとその最適化を行った。その結果、得られたマトリックスは、経口投与した緑茶カテキン EGCG の組織内局在情報の可視化と共に、EGCG に連動した生体内代謝物の二次元分布情報の可視化を可能にした。こうした技術は、従来法では困難な高い信頼性・精度を保持した機能性食品成分の有効性・安全性の新たな評価法を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：Herein, we attempted to establish a novel evaluation method of function of food factor based on two-dimensional molecular behavior in local tissue micro-regions, by developing an advanced MALDI-MS system capable of visualizing of both exogenous food factors and endogenous metabolites simultaneously. Because MS selectivity and detection limit against various molecules are dependent on its ionization rate, we performed the screening of matrix, which can aid the ionization of both food factor and endogenous metabolites, and its optimization. The obtained matrix enabled us to two-dimensionally visualize the green tea catechin EGCG in tissue micro-regions after the oral administration of EGCG and endogenous metabolites in response to EGCG. These results suggest that our proposed MS system may contribute to the establishment of highly precise and reliable technique for evaluating the potential function of food factor in view of efficacy and safety.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：食品機能、緑茶カテキン、ニュートリメタボロミクス、代謝物、MALDI-MS、マトリックス、質量分析イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品の有効性・安全性評価や作用機序の解明に代謝物総体を解析するメタボロミクスの適用事例が飛躍的に増加しており、食品機能性分野においても食品および生体因子の局所動態を同時に追跡できるメタボロミクスの基盤技術が確立されれば、従来にない高精度の食品機能性評価が可能となるだけでなく、信頼性や標的性の高い食品の作用メカニズム解明に新たなブレイクスルーをもたらすことが期待される。

申請者らは、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) により、既存の常識を覆す生体代謝物の超高感度 (数十 attomole レベル) 測定法および微量細胞からの非標的型代謝物検出法の開発に成功した (Anal. Chem., 82, 498, 2010)。また、これら技術を応用した質量分析イメージングによる組織形態情報を保持した代謝物の時空間変動解析法の開発も進めている (Free Radic. Biol. Med., 49, 191, 2010)。さらに、機能性食品成分の標的分子を介した生理作用の分子基盤を明らかにしてきたが (Nature Struct. Mol. Biol., 11, 380, 2004; J. Biol. Chem., 283, 3050, 2008)、食品の機能性を高精度に評価できるシステムの構築には至っておらず、上述の先鋭的質量分析技術を食品機能性評価へと応用できる可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

食品成分と生体内代謝物の多成分同時計測可能な新規イオン化助剤 (マトリックス) を見出すとともに、これらを組合せた MALDI-MS 法による超高感度計測技術および組織内空間分解可視化技術を開発し、生体局所における食品成分の高精度な機能性評価システムを確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

質量分析における選択性と検出感度を決定づける最大の要因は対象物質のイオン化効率にある。そのため、食品成分と内因性代謝物の多成分同時計測可能な超高感度計測技術およびその検出感度を利用した組織内空間分解可視化技術を開発するためには、イオン化助剤 (マトリックス) の最適化が必要不可欠であり、これを達成することで、質量分析 (MALDI-TOF-MS) による新規食品機能性評価システムの構築が可能となる。このため、本研究では以下の項目を遂行した。

(1) 標品ベースでのマトリックス適合性・

最適化の検討

(2) 生体試料ベースでのマトリックス適合性・最適化の検討

(3) 病態モデルにおける食品成分の効果の検討

それぞれの詳細については、以下に示した。

(1) 標品ベースでのマトリックス適合性・最適化の検討

現在、多様な食品成分の最適なイオン化効率を引き出すマトリックス情報は皆無である。そこで、申請者らが超高感度代謝物解析における有用性を見出した 9-アミノアクリジン (9-AA) とともに、様々なマトリックス候補化合物 (約 20 種類) を用いて、食品成分標品 (同様に代表的生体内代謝物標品) との適合性を検証した。なお、食品成分として、これまでに機能性研究実績のある緑茶カテキン EGCG を対象として、マトリックスの濃度・塗布条件・溶媒適合性など各種段階の徹底的な精査を行った。

(2) 生体試料ベースでのマトリックス適合性・最適化の検討

標品ベースで有用性が確認されたマトリックス候補を用いて、食品成分を処理した細胞および組織切片上でも効率的なイオン化が行われる最適条件 (濃度・塗布条件・溶媒および組織適合性) を明らかにし、食品成分および内因性代謝物の多成分同時計測可能な質量分析システムの完成を試みた。

(3) 病態モデルにおける食品成分の効果の検討

様々なアンチエイジング・抗脳神経変性疾患作用が報告されている緑茶カテキン EGCG を経口投与 (0.1% w/v, 自由飲水, 1 ヶ月間) した若齢および老齢マウス (C57BL/6J, 雄性, 5 および 40-60 週齢) の脳組織の凍結切片に最適化したマトリックスをスプレーコーティング法で塗布し、MALDI-TOF-MS により部位・ $m/z$  特異的低分子量代謝物のイオンイメージを取得し、本研究で開発した技術の妥当性と共に、得られたデータの生物学的意義について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 標品ベースでのマトリックス適合性・最適化の検討

申請者らが超高感度代謝物解析における有用性を見出した 9-AA とともに、代表的な固体マトリックスならびに近年注目されている液体マトリックスを用いて、食品成分や生体内代謝物標品との適合性を検証した。その結果、生体内代謝物 (ATP やアセチル CoA など) とともに緑茶カテキンを高効率にイオン化するマトリックス ( $\beta$ -Carboline 化合物など) を見出した (表 1)。

表 1. マトリックスの代謝物検出能

マトリックス	検出した代謝物数
DHB	4
CHCA	6
Sinapic acid	38
HPA	19
4-Aminopyridine	35
5-Aminosalicylic acid	19
Salicylamide	14
1,5-DAN	64
9-AA	53
Ferulic acid	31
Caffeic acid	33
DHAP	19
THAP	11
Dihuranol	17
DMAN	63
Norhamane	79
Hamane	50
Hamalol	29
Hamine	55
Hamol	58

### (2) 生体試料ベースでのマトリックス適合性・最適化の検討

代謝物標品ベースで有用性が確認された種々のマトリックス候補を用いて、食品成分を処理した組織切片上 (脳、肝臓、腎臓、腫瘍など) でも効率的なイオン化が行われる最適条件 (マトリックスの濃度・塗布条件・溶媒および組織適合性) を明らかにすることができた。このことは、食品成分および内因性代謝物の多成分同時計測可能になることを意味している。また、 $\beta$ -Carboline 化合物をマトリックスとして用いることで、経口投与後の肝臓組織において、EGCG の二次元分布情報の可視化にも成功した。

### (3) 病態モデルにおける機能性食品成分の効果検証

緑茶カテキン EGCG を経口投与した若齢および老齢マウスの脳組織の凍結切片に最適化したマトリックスを塗布し、質量分析に供した結果、老化に伴って変動する代謝物 (図 1) や緑茶カテキン EGCG の投与によって変動する代謝物 (図 2) の二次元分布情報を可視化することに成功した。このような微細な生体局所応答を捉える我々が提案した高分解能代謝物解析技術は、従来法では達成できない高い信頼性・精度を保持した機能性食品成分の有効性・安全性の新たな評価法を

提案するものである。

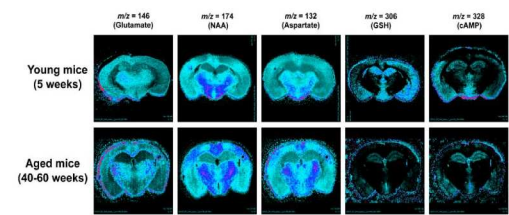


図 1. 老化により変動を示す代表的な脳内代謝物の二次元可視化

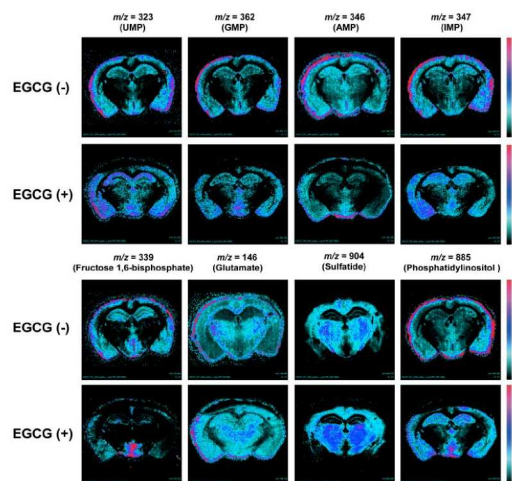


図 2. 老齢マウスの代表的な脳内代謝物に及ぼす緑茶カテキン EGCG の影響

## 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 4 件)
- ① Miura D, Fujimura Y, and Wariishi H. In situ metabolomic mass spectrometry imaging: Recent advances and difficulties. *J. Proteomics*, in press, 2012. 査読有り.
  - ② Fujimura Y, Kurihara K, Ida M, Kosaka R, Miura D, Wariishi H, Maeda-Yamamoto M, Nesumi A, Saito T, Kanda T, Yamada K, and Tachibana H. Metabolomics-driven nutraceutical evaluation of diverse green tea cultivars. *PLoS ONE*, 6, 2011, e23426. 査読有り.
  - ③ Miura D, Fujimura Y, Yamato M, Hyodo F, Utsumi H, Tachibana H, and Wariishi H. Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal. Chem.*, 82, 2010, 9789-9796. 査読有り.

- ④ Byun EH, Fujimura Y, Yamada K, and Tachibana H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *J. Immunol.*, 185, 2010, 33-45. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 萩原立春, 藤村由紀, 金允喜, 行平大地, 山口歩, 三浦大典, 割石博之, 山田耕路, 立花宏文. 組織内微小領域における緑茶カテキンの二次元可視化に向けた質量分析イメージング法の開発. *日本農芸化学会2012年度大会*, 平成24年3月23日, 京都女子大学 (京都市)
- ② 藤村由紀. ニュートリメタボロミクスを切り拓く多元的質量分析システムの開発. *日本農芸化学会西日本支部若手シンポジウム (招待講演)*, 平成23年9月18日, コテージヒムカ (宮崎市)
- ③ 藤村由紀. 食品機能性評価に向けた代謝物プロファイリング技術の開発. *産学官連携技術シーズセミナー in 福岡 (招待講演)*, 平成23年9月1日, 福岡市リファレンス駅東ビル (福岡市)
- ④ 寺井 康了, 行平 大地, 三浦 大典, 藤村由紀, 割石 博之, 新藤 充. 生体低分子のMALDI-MS測定に有効なマトリックスの開発. *第48回化学関連支部合同九州大会*, 平成23年7月9日, 北九州国際会議場 (北九州市)
- ⑤ Miura D, Yukihira D, Fujimura Y, and Wariishi H. High-throughput Metabolic Profiling and in situ Metabolite Imaging by MALDI mass spectrometry. 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Jun 8, 2011, Denver, USA.
- ⑥ 藤村由紀, 塚本俊太郎, 入江美穂, 三浦大典, 割石博之, 立花宏文. 緑茶ポリフェノール EGCG の抗腫瘍効果に対する酸素応答性の理解に向けた細胞内代謝物プロファイリング. *第65回日本栄養・食糧学会大会*, 平成23年5月14日, お茶の水女子大学 (東京)
- ⑦ Miura D, Fujimura Y, Yamato M, Hyodo F, Tachibana H, and Wariishi H. Visualization of spatiotemporal metabolic behaviors by in situ metabolomic imaging with MALDI-MS. 58th ASMS Conference on Mass

Spectrometry and Allied Topics, May 25, 2010, Salt Lake, Utah, USA.

- ⑧ Miura D, Fujimura Y, Yamato M, Hyodo F, Irie M, Tachibana H, and Wariishi H. Mass spectrometry-based metabolic profiling of transient middle cerebral artery occlusion model. PACIFICHEM 2010, December 19, 2010, Honolulu, Hawaii.

[その他]

ホームページ等

<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤村 由紀 (FUJIMURA YOSHINORI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号: 20390304

### (2) 研究分担者

立花 宏文 (TACHIBANA HIROFUMI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 70236545

三浦 大典 (MIURA DAISUKE)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号: 40532627