

## 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

Cell Turgor Measurement - Probe Electrospray  
Ionization (PESI) Mass Spectrometry for  
Molecular Profiling Techniques



野並 浩 (NONAMI HIROSHI)  
愛媛大学・農学部・教授

### 研究の概要

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。

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、植物工場、質量分析、細胞計測、生物環境調節

### 1. 研究開始当初の背景

質量分析は一般に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。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。細胞内部の分子情報を計測する手法の開発が急速に望まれる背景があった。

### 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。

### 3. 研究の方法

非破壊で植物から細胞溶液を採集し、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を開発し、これを、探針エレクトロスプレーと組み合わせてシステム化し、植物の細胞分子情報を獲得することを計画している。

### 4. これまでの成果

これまでに水分生理学的な研究実績を積み上げているチューリップ球根を材料として使用し、プレッシャープローブで個々の細胞から採集した細胞溶液を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法を用いて分析し、フラクタンを中心とする糖質分子の計測に成功した。ピコリットルレベルでの細胞溶液サンプルをレーザーイオン化マトリックスと適宜混合させ、細胞レベルでの分子計測を行った。細胞溶液を採集した同じ組織で、直接カミソリを用いることで組織切片を作成し、レーザーイオン化マトリックスを表面に塗布した後、乾燥させ、レーザー照射を行って MALDI-MS を行った。組織切片の切断面にある細胞で計測された分子が、プレッシャープローブを用いて計測した分子と同様であったことから、組織および細胞レベルで精度高く分子計測がなされていることが確認できた。

使用したチューリップ球根を探針エレクトロスプレーイオン化質量分析による計測を行った。探針を用いて、球根鱗片、細胞分裂箇所、球根基部、花芽、葉組織のサンプリングを行い、高電圧を印加することでイオン化を誘導した。前処理無しの直接サンプリングによる探針エレクトロスプレーイオン化法により得られた分子情報は、プレッシャープローブで採集した分子情報、組織の直接 MALDI 分析を行った分子情報と同様のものであった。このことから、探針エレクトロスプレー

レーイオン化法で迅速に質量分析が可能であることが検証された。

探針エレクトロスプレーイオン化法で迅速に質量分析が可能であることから、ミオグロビンの溶液の pH を変化させる反応を誘導し、時間の経過とともに pH が変わるにつれてミオグロビン分子のコンフォーメーションが変わっていく様子を検出することに成功した。このような前処理無しでのリアルタイムでの質量分析計測法は世界でも革新的な成果といえる。

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から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素置換の経時変化を計測することが可能となり、タンパク質の水溶液での立体構造の解析法が確立された。サンプル量は、マイクロリットルレベルであり、実測に使われるサンプル量はピコリットル ( $10^{-12}$ L) レベルで十分である。微量サンプルの操作法を確立している研究室であれば、試料の損失を最小限に抑えながら計測を進めることも可能である。今後、タンパク質の構造を扱う酵素化学の分野でも応用できるようになり、酵素化学の急速な発展が見込まれる。

エレクトロスプレーイオン化では、塩の種類によってイオン化効率が大きく変わることを解明し、EDTA の添加により、イオン化効率を向上させることを発見した。探針エレクトロスプレーイオン化は、新しいイオン化法であるため、従来の ESI と MALDI で得られたデータと比較しながら計測を並行して進める必要がある。ESI および MALDI 法でのイオン化法の改善について研究を同時進行させており、多くの成果が得られている。

植物組織の直接計測は、MALDI の新たなマトリックスの発見で格段に改善された。植物組織の切片にナノパーティクルを塗布する MALDI 法により、切断された細胞内容を効率よくイオン化することに成功した。この MALDI 法と探針エレクトロスプレーイオン化法は相補的な関係にあり、両方で共通に計測された代謝物は細胞内に確実に存在する分子であることが保証できる。いずれの方法も、サンプルの前処理無しに計測が可能であり、分子生物学の飛躍的な発展へつながると期待される。

## 5. 今後の計画

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。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

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.

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.

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.

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.

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.

ホームページ等

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