

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 24 年度採択分
平成 27 年 3 月 12 日現在

オンサイト・リアルタイム細胞分子計測によるスピーキング・セル・アプローチ

“Speaking Cell Approach” by on-site/real-time cellular and molecular measurements

課題番号：24228004

野並 浩 (NONAMI Hiroshi)

愛媛大学・農学部・教授



研究の概要

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、現場で質量分析を行うシステムを開発し、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・セル・アプローチ (SCA) 法を創成することを目的としている。栽培作物のリアルタイム質量分析を実行し、環境要素変化に伴う代謝変化を植物生理学・栽培生理学に基づき解明する。

研究分野：農業工学

キーワード：細胞・組織、植物、質量分析

1. 研究開始当初の背景

平成 23 年 3 月末に、植物工場の国内研究拠点として、愛媛大学農学部植物工場が完成し、トマト栽培が行われ始めた。東日本大震災に代表される大災害からの復興、異常気象からの食料不足、野菜不足の回避が求められ、食の安定供給、食の安全の観点から、日本学術会議からの提言で、植物工場の実用化の必要性が示されており、緊急の課題として平成 20 年度～平成 24 年度実施中の基盤研究 (S) 研究課題の最終年度前年度の応募をするに至った。

2. 研究の目的

本研究は、植物工場において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イオン化により、直接、現場で質量分析を行うシステムを開発し、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・セル・アプローチ (Speaking Cell Approach) (SCA) 法を創成することを目的としている。栽培作物のリアルタイム質量分析を実行し、環境要素変化に伴う代謝変化を植物生理学(理学的)・栽培生理学(農学的)に基づき解明して、省エネを考慮した SCA を確立することによって、食料生産の効率を格段に増大させ、日本が迎えつつある食料危機の回避、食の安全性の確保により、国民を守ることを目指す。

3. 研究の方法

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

スプレーイオン化 (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、プレッシャープローブを用いての細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャル、細胞壁弾性率、水の細胞膜透過率、細胞体積などの物理的計測と、探針を用いての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、SCA 法によりエネルギー効率が高く、高品質の農産物を生産することができる新時代の植物工場を創成することを目的としている。

4. これまでの成果

質量分析 (MS) は、精製された純度の高いサンプル分子試料の分子量の計測および構造解析の手法として発展してきており、一般的に前処理を行った後、計測を行っている。本研究は、前処理無しの超微量サンプルで質量分析を行うものであり、これまでの質量分析の常識を覆す研究課題であり、新規性はとても高い。新規性のみでなく、本研究では、独自に探針エレクトロスプレーイオン化法を開発し、細胞生体計測で使われていたプレッシャープローブと組み合わせ、分子計測を行うことで、細胞の位置の特定、生理情報の計測を同時に行い、生理情報のリアルタイム

での計測を行うことを目指した研究であり、独創性の高い研究といえる。

プレッシャープローブイオン化をプレッシャープローブに充填するシリコンオイルにエンジンオイル添加物を混合することで、シリコンオイル内で電気伝導度を上げ、細胞溶液のイオン化に成功した。生きた植物体の一つの細胞のそのままの代謝物を採り出し、イオン化する方法は、これまでに実施されておらず、この論文は Global Medical Discovery に最先端研究としてとりあげられた。エンジンオイル添加物は、シリコンオイルに均一に混合され、沈殿物もなく、イオン化を促進するものの、エンジンオイル添加物組成は商業的な特許で秘密になっており、イオン化においての不純物として検出されるので、分析精度を向上するためには望ましいものではない。そこで、電導性イオン液体を使うことで、検出信号をきれいに見分けることに成功した。検出感度は、発表論文成果よりも 1000 倍向上するようになり、現在、論文発表の準備中であり、革新的な結果が得られる可能性が出てきた。

探針エレクトロスプレーのステンレス探針にエッチング処理をすることで先端を 150nm まで細くした上に、探針表面を化学処理で粗くし、親水性の表面になるように加工することに成功している。さらに、探針の表面に直径 30 μm のノズルを備えた圧電制御インクジェットから溶媒が付着するように設計している。この設計により、探針エレクトロスプレーのイオン化効率を格段に向上させることが可能になった。この方法では、サンプルの量を 1 ピコ (10^{-12}) リットル以下での量でもイオン化が可能であり、植物細胞 1 個からの細胞溶液のサンプリングおよび代謝物の同定を可能にしている。例として、ツツジの花の色素とその配糖体を検出した。ツツジの花の細胞体積が 35pL~83pL のもの、ゼラニウムでは細胞体積が 2pL~17pL のもの、ダイズでは細胞体積が 32pL~56pL のものからサンプルし、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、マルビジン、ペチュニジン、ケルセチンおよびその配糖体、多糖類、有機酸、アミノ酸を検出している。

プレッシャープローブを用いると、細胞膨圧、細胞壁弾性率、膜水透過率、浸透圧、水ポテンシャルが計測できる。水分状態計測後、細胞から採集した細胞溶液を直接エレクトロスプレーイオン化することで、代謝物質の計測が可能になった。さらに、イオン化法の改善で高感度計測が可能になりつつある。探針エレクトロスプレーイオン化では、細胞壁表面、細胞内分子の直接分析が可能であり、迅速なイオン化と超微量での高感度分析が可能になってきており、スピーキング・セル・アプローチのための計測手法が確立しつつある状況にある。

5. 今後の計画

イネの栽培に適した LEP 照明を装備したグロースチャンバーを平成 26 年度に設置し、照度の調整、温度、湿度、日長、 CO_2 濃度の制御、根圏の温度制御を可能として、イネの栽培環境制御と代謝計測を開始した。グロースチャンバーが 2 機併設されており、その前に隣接して質量分析計をレールで移動可能な設計にしている。そのため、グロースチャンバー内で育つイネを破壊することなく、プレッシャープローブで玄米細胞を計測し、細胞から採集した計測代謝物を質量分析できるシステムを構築した。

この設備では、根圏を異なった温度に調節することや、イネの穂のみを別の温度に調節することも可能であり、さらに、 ^{13}C 、 ^{15}N を利用しての同位体ラベリングも可能である。植物体を破壊することなく、連続して使用することが可能であり、スピーキング・セル・アプローチにおける環境制御要因と代謝生理の関連性を解明することが可能となり、独創的で新規性の高い研究成果が期待できる。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Gholipour, G, Erra-Balsells, R, Hiraoka, K, *Nonami, H (2013) Living Cell Manipulation, Manageable Sampling, and Shotgun Picoliter Electrospray Mass Spectrometry for Profiling Metabolites. *Anal. Biochem.* 433(1): 70–78.

Mandal, MK, Ozawa, T, Saha, S., Rahman, MM, Iwasa, M, Shida, Y, Nonami, H and *Hiraoka, K (2013) Development of Sheath Flow Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry and its Application to Real Time Pesticides Analysis. *J. Agri. Food Chem.* 61 (33): 7889-7895.

*Wada, H., Masumoto-Kubo, C., Gholipour, Y., Nonami, H., Tanaka, F., Erra-Balsells, R., Tsutsumi, K., Hiraoka, K. and Morita, S. (2014) Rice Chalky Ring Formation Caused by Temporal Reduction in Starch Biosynthesis during Osmotic Adjustment under Foehn-induced Dry Wind. *PLoS ONE* 9(10): e110374. doi:10.1371/journal.pone.0110374

*Yu, Z, Chen, LC, Ninomiya, S, Mandal, MK, Hiraoka, K, Nonami, H (2014) Piezoelectric inkjet assisted rapid electrospray ionization mass spectrometric analysis of metabolites in plant single cells via a direct sampling probe. *Analyst* 139 (22): 5734-5739.

ホームページ等

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