



Title	ナノフロー液体クロマトグラフ/質量分析計による植物代謝産物の高感度定量分析法の開発
Author(s)	和泉, 自泰
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2112
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

ナノフロー液体クロマトグラフ/質量分析計による
植物代謝産物の高感度定量分析法の開発

2009年

和泉自泰

目次

第一章 緒論	1
第二章 微量生理活性物質の網羅的高感度定量分析系の構築	
2-1. 緒言	8
2-2. 実験方法	
2-2-1. 試薬	11
2-2-2. 実験材料	12
2-2-3. 分析機器	12
2-2-4. スプレイヤーチップ一体型ナノフローカラム作製法	13
2-2-5. インフュージョン分析条件	14
2-2-6. キャピラリーLC/MS/MS 分析条件	14
2-2-7. ナノフローLC/MS/MS 分析条件	17
2-2-8. サンプル調製法	18
2-3. 結果	
2-3-1. スプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムを用いた分析系の検証	20
2-3-2. 植物ホルモン類のイオン化・フラグメント化効率の検討	22
2-3-3. ナノフローLC/MS/MS による植物ホルモンの網羅的高感度定量測定	25
2-3-4. 抽出・精製法の最適化	29
2-3-5. 生体試料への適応	33
2-4. 考察	37
第三章 植物ホルモン分析法の生命科学分野への応用	
3-1. 緒言	41
3-2. 実験方法	

3-2-1. 実験材料	44
3-3. 結果	
3-3-1. サイトカインシグナルによるソースシンクバランス制御の解析	45
3-3-2. タバコ遺伝子組換え体の網羅的植物ホルモンプロファイリング	46
3-4. 考察	47
第四章 高空間分解能を有したファイトアレキシン定量分析への応用	
4-1. 緒言	48
4-2. 実験方法	
4-2-1. 試薬	51
4-2-2. 実験材料	52
4-2-3. キャピラリーLC/MS/MS 分析条件	52
4-2-4. ナノフローLC/MS/MS 分析条件	53
4-2-5. エンバク葉切片サンプルの調製法	54
4-2-6. 高空間分解能での生細胞サンプリング法	54
4-2-7. ラインスキャンレーザー顕微分光解析条件	56
4-2-8. 蛍光顕微鏡観察法	56
4-3. 結果	
4-3-1. エンバク葉切片のファイトアレキシン定量分析	57
4-3-2. 葉肉細胞におけるエリシター応答時の細胞内変化の観測	60
4-3-3. 高空間分解能を伴った時期特異的ファイトアレキシン定量分析	62
4-3-4. ファイトアレキシンの細胞内局在解析	64
4-3-5. ファイトアレキシン生合成と過敏感反応との関連性	67
4-4. 考察	68
第五章 総括	71

謝辞	73
引用文献	74
発表論文	88
学会発表	89

第一章 緒論

近年，液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS, LC/MS/MS) は大量の定性情報が得られる上に感度が高いという利点からプロテオミクス^{1,2}やメタボロミクス^{3,4}，薬物代謝解析⁵など幅広い分野で使用されている．文献検索ソフトである SciFinder Scholar で「LC/MS」をキーワードとして発表論文本数の検索を行ったところ，その数は 1990 年頃から飛躍的に増加し続けており，LC/MS がすぐれた分析手法であることが伺える (図 1-1)．

LC/MS 分析法が発展した背景は，1984 年の John B Fenn*らによるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) の開発⁶によるものといっても過言ではない．大気圧中で高電圧をかけた細管から試料溶液を噴霧し，帯電した微細な液滴を作り，この液滴が気化し小さくなると最終的に試料分子がイオン化することが原理となる．ESI 法の特徴はソフトイオン化法であるため分子の開裂が起きることなくイオン化を行えること，低分子から分子量 10 万位までの高分子まで幅広くイオン化を行うことができること，さらに，これまで

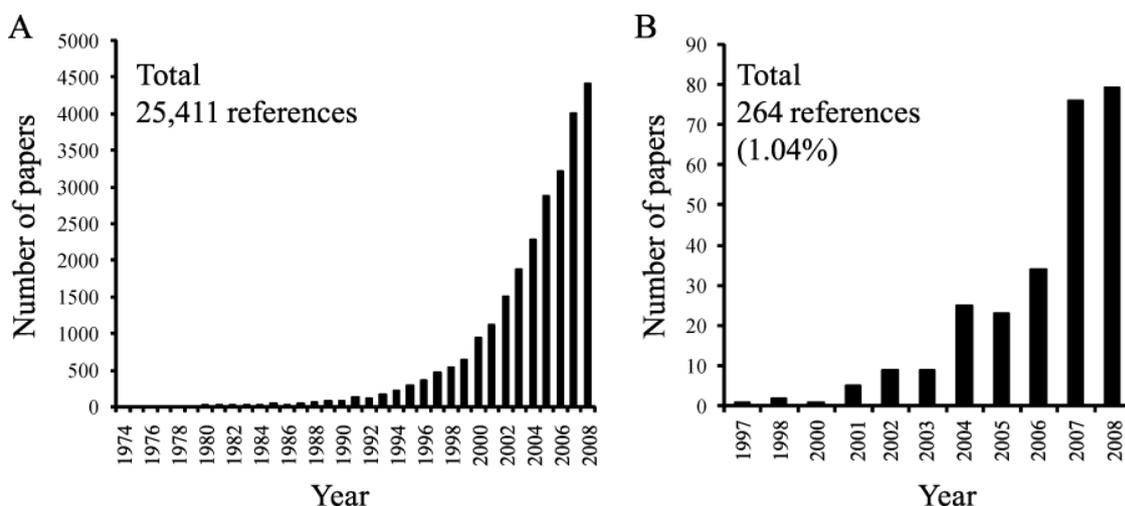


図 1-1. SciFinder Scholar によるキーワード文献検索結果 (2008 年までの結果を記載)。(A) 「LC/MS」をキーワードとした発表論文本数。(B) 「nano LC/MS」をキーワードとした発表論文本数。

* 2002 年のノーベル化学賞受賞者

移動相が液体であるために接続が困難であった液体クロマトグラフィー (HPLC) と容易に連結させることが可能となったことが挙げられる。また、イオン化されて生じた分子量関連イオンは、質量分離部で電磁気的な相互作用により m/z に従い分離され、最終的に二次電子増倍管などの検出器にて検出される。質量分析計 (MS) の種類としては、磁場型 (sector), 四重極型 (quadrupole, Q), イオントラップ型 (ion-trap, IT), 飛行時間型 (time-of-flight, TOF), フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (Fourier-transform ion cyclotron resonance, FTICR) があり、近年ではこれらの MS を直列に組み合わせた三連四重極型 (triple-stage quadrupole, QqQ) やイオントラップ・飛行時間型 (IT-TOF) などのハイブリッド型 MS が製品化されている。MS の性能を評価する上で重要なキーワードとしては、精密質量, 質量分解能, 定量性, ダイナミックレンジ, スキャンスピード, 感度が挙げられる。しかし、現状ではこれらの要件を全て最高性能で満たす MS は存在しない。つまり、研究の目的に応じて MS を選定する、もしくは使用する MS の特性を熟知した上でしかるべき研究を行うことが重要であると考えられる。また、MS を用いて厳密な定量分析を行うには詳細な検討が要求される。分子のイオン化効率や化合物によって大きく異なること、生体試料の測定の際には未知化合物の夾雑物の影響 (マトリックスエフェクト) により目的化合物の定量性が低下することが理由として挙げられる^{7,8}。したがって、試料を MS に直接導入するインフュージョン法はスループットの観点から有用な分析手法であるが、定量性が要求される場合、本分析法のみでは不十分であると考えられる。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法は、特にタンパク質など高分子量物質の測定に大変有用なイオン化法の一つであるが、前述と同様の理由から定量性が懸念される。

化合物の分離手段である HPLC の特性は物質の物理・化学的性質を考慮して様々な固定相と移動相の組み合わせにより分離できることである。化合物を分離することにより MS での定量性と検出感度の向上に繋がり、また MS では識別が困難である異性体の分離検出も可能となる。一方、LC/MS を運用する場合、主に揮発性の観点から HPLC に使用できる移動相は限定されるために、従来ではシリカゲル表面にオクタデシルシリル

(ODS) 基を修飾した逆相担体の利用がほとんどであった。ショットガンプロテオミクスでのトリプシン消化断片¹や薬物⁹、植物二次代謝産物¹⁰のような成分は、比較的疎水性が高くその物性値範囲が一定であるために ODS 担体による疎水性相互作用による保持・分離でおおよそ要求は満たされる。しかしながら、メタボロミクスの場合、代表的な代謝物は解糖系、トリカルボン酸回路やアミノ酸、核酸合成経路の代謝中間体となり、極性・イオン性成分を多く含むため、逆相 LC/MS で保持分離することは困難である。現段階では、これらのイオン性代謝産物の網羅的測定は、キャピラリー電気泳動/質量分析計 (CE/MS) が有用技術であると考えられているが¹¹⁻¹³、近年の固相担体の精力的な開発によって LC/MS においても、これまで苦手としていた極性・イオン性成分の分離検出も可能となってきた。固定相にペンタフルオロフェニルプロピル (PFPP) 基を導入したフッ素含有逆相カラムを用いて、誘導体化を伴わずにアミノ酸、有機酸、核酸などの一斉分析が報告され¹⁴、また、親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography; HILIC) のひとつであるスルホベタイン基が導入された ZIC[®]-HILIC カラムにおいては、糖、糖アルコール、糖リン酸の分析が可能である¹⁵。さらに、水溶液中のイオン性物質に対して、逆荷電のカウンターイオン、すなわちイオンペア試薬の添加により全体の荷電を中和することで逆相カラムへの保持が可能となる逆相イオンペア液体クロマトグラフィーも有効な分析手法である¹⁶。しかし、イオンペア試薬を必要としない分析系と並行で使用する場合、イオンペア試薬の使用により ESI 部や MS 内部が試薬由来の分子により汚染され、感度や再現性の劇的な低下につながる場合があることから、その運用方法には細心の注意が必要である。以上を踏まえると、現状では、単一モードのクロマトグラフィーであらゆる物性の低分子代謝物の分離分析を行うことは難しいものの、数種のカラムと移動相の組み合わせにより、一台の LC/MS で網羅的な代謝産物のプロファイリングを行うことは実現可能となってきた。

ところが、生体内代謝物の測定を行う場合、個々の代謝物の存在比が大きく異なることが観測を困難にさせる場合がある。植物ホルモンのような微量生理活性物質はその内生量が pmol/g fresh weight (FW)、もしくはそれ以下であり、代謝中間体を含む通常の一

次、二次代謝産物の内生量 (nmol–mmol/g FW) の 10^{-9} – 10^{-3} 微量となる。また、質量分析計による植物代謝物測定は、葉や根のような器官が対象となり、0.1–1 g FW の出発材料がスプープットの観点からも現実的なサンプル量となる。2000 年に Oliver Fiehn らが発表した、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) によるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ロゼット葉 (300 mg FW) のメタボロミクス分析において、約 160 種の代謝物が同定され注目を集めたが、同定された代謝物の中に植物ホルモン類は含まれていなかった¹⁷。つまり、分析化学の側面から考えた場合、植物ホルモン検出のためには「分析系の高感度化」が最重要課題に挙げられる。植物ホルモンは成長、分化、代謝、形態形成、開花、結実などの生活環を調節し、環境応答のなかだちをしているきわめて重要な低分子化合物である。有用物質生産のための代謝改変植物の作出や、バイオマス資源としての植物を有効活用していくためには、植物ホルモンを介した代謝制御を解明することは重要となる。さらに、植物ホルモンは生体内で低濃度かつ僅かな濃度変化により生理機能を調節していることから、内生量の正確な定量分析も必要となる。また、近年の分子遺伝学的研究により、複数のホルモン類の複雑なクロストークが明らかとなってきており^{18–23}、いくつかのホルモン類の網羅的解析によっても、代謝上でのクロストークが存在することが示唆されている^{24–26}。例えば、シロイヌナズナのサイトカイニンとオーキシンの同時分析によってオーキシンがサイトカイニン生合成を制御していることが明らかとなった²⁶。したがって、植物ホルモン類のクロストークやネットワークを解明していくためには観測する植物ホルモンの網羅性も重要な項目である。すなわち、近年の植物ホルモン研究において、網羅性と定量性を伴ったより高感度の分析手法が望まれていると考えられる。

一方、「分析系の高感度化」の要求は生体内の微量成分分析だけに限らない。シングルセル代謝物解析のような出発材料が制限される場合も同様である。例えば、植物の葉肉 1 細胞は約 10 pL であることから 10 ng FW と概算でき、通常の代謝物分析に使用している出発材料 (0.1–1 g FW) と比較すると 10^{-8} – 10^{-7} 少量となる。ヒトや植物などの高等生物は異なる器官や組織、あるいは特殊な細胞から構成されており、各細胞の機能が

統合して 1 個体を形成している。従来の部位特異的代謝解析は技術的限界から器官毎の分析が主であり、構成する細胞の応答をその「平均」として観測してきた。高い空間分解能で生体分子を測定できれば、細胞間情報伝達、発生、分化、毒性物質のような外部刺激に対する生理応答など複雑な生物システムの理解につながり²⁷、ひいては癌などの疾患における知見を前進させる可能性を秘めていると期待されている²⁸。

LC/MS は高感度化の観点において、GC/MS や CE/MS に比べて理論的にも実用的にも先行している分析手法といえる。LC/MS の高感度化の一般的な手段としては、HPLC における充填剤のマイクロ化とカラム内径のスケールダウンが挙げられる。前者は 2 μm 以下の微細充填剤と 60–100 MPa 程度の高圧 HPLC システムが各社から市販されており、UPLC、UFLC 等の名称で一般化されつつある。利点としては LC 分離能の向上、分析時間の短縮、さらにピーク形状の改善 (S/N の向上) による高感度化である²⁹。次に、後者であるカラム内径のスケールダウンについて説明する。1980 年から内径 250 μm 以下のフューズドシリカキャピラリーに担体を充填したカラムのマイクロ化が報告され、マイクロキャピラリー LC と呼ばれていた³⁰。その後、1984 年に ESI が開発されたことにより⁶、マイクロキャピラリー LC と ESI-MS の接続も可能となり、分析物の ESI-MS における検出感度は UV や蛍光検出器と同様に、検出器に導入される際の溶液中の濃度 (the maximum peak concentration; C_{max}) に依存することが以下の計算式に基づいて実験的に示された³¹。

$$C_{\text{max}} = \frac{mN^{1/2}}{(2\pi)^{1/2}V_0(1+k)}$$

m : カラムに注入された分析物, N : カラムの理論段数, k' : 分析物の保持比,

V_0 : カラム内のデッドボリューム

上式において C_{max} に最も影響を与えるパラメータは、カラム内のデッドボリューム (V_0) である。 V_0 は担体の種類、カラムの長さが同じであるならば、カラムの内径が狭いほど小さくなるため、その結果 C_{max} は増加する。つまり、カラム内での化合物の希釈を抑制することが感度増加に繋がるのである。さらに、ESI-MS において先端径の細いスプ

レーニードルを用いて低流速で試料を導入することにより感度が向上すると考えられている。当該イオン化法はマイクロ ESI, またはナノ ESI と呼ばれており, 微細な液滴を噴霧することによってイオン化効率は向上し, またニードル先端をオリフィスに近づけることで MS への導入効率が上昇する^{32,33}。LC/MS の検出感度向上の原理をまとめると, 内径の狭いカラムにより低流速で LC 分離を行い, ESI でのイオン化効率を高め, そして MS 内部への導入効率を上げることで達成される^{31,34-36}。現在では, 内径 10–150 μm のカラムを使用して流速 10–1000 nL/min で行う HPLC を「ナノ LC (ナノフロー LC)」と総称しており³², ナノフロー LC/MS は LC/MS の中で最も高感度の分析系となる。一般的に定義されている HPLC の名称, カラム内径, 流速をまとめたものを表 1-1 に示す。このように, ナノフロー LC/MS は, 高感度化を達成するための有用なツールであると考えられる。しかし, 「LC/MS」(通常, LC/MS とは, 汎用 LC, またはセミマイクロ LC による分析系を指す)と同様に「nano LC/MS」をキーワードとして発表論文本数の検索を行ったところ, 増加傾向にはあるものの, 報告数の合計は LC/MS の約 1%に過ぎなかった (図 1-1)。ナノフロー LC/MS 法はそのコンセプトは比較的単純であるにも関わらず汎用的な手法であるとは言い難い。実用的に運用するためには, さらなる詳細な技術的検討が必要であると考えられた。実際, ナノフロー LC/MS の適応例は正イオン(ポジティブ)モードでの定性情報の取得を主眼としたショットガンプロテオミクスが大多数である^{1,2,34,36-38}。低分子代謝産物の高感度測定の場合, アニオン性代謝物も測定対象となるため, 負イオン (ネガティブ) モードでのイオン化も必要となる。しかしながら, 現在までにナノフロー LC/MS による負イオンモードでの測定例は報告されていない。

表 1-1. HPLC の定義

名称	カラム内径	流速	本論文中での呼び名
conventional HPLC	3.2–4.6 mm	0.5–2.0 mL/min	汎用 LC
microbore HPLC	1.5–3.2 mm	100–500 $\mu\text{L}/\text{min}$	セミマイクロ LC
micro-LC	0.5–1.5 mm	10–100 $\mu\text{L}/\text{min}$	
capillary-LC	150–500 μm	1–10 $\mu\text{L}/\text{min}$	キャピラリー LC
nano-LC (nanoflow-LC)	10–150 μm	10–1000 nL/min	ナノフロー LC

また、ナノフローLC/MSによる定量性を検証した報告はごくわずかであり³⁹、その上、生体試料からの正確な絶対定量分析の実施には至っていない。

以上のような背景を踏まえ、本研究ではナノフローLC/MSによる低分子代謝物の実用的な高感度定量分析系を構築することを第一の目的とした。また、分析系の高感度化の指標として、絶対感度がf molに到達することを目標とした(図1-2)。さらに、構築した分析手法を用いて従来技術では到達できなかった植物代謝の応用研究を展開することを第二の目的とした。具体的な応用研究としては、微量生理活性物質植物ホルモン類の網羅的高感度定量分析と高空間時間分解能を伴った微量サンプルからのファイトアレキシン定量分析となる。

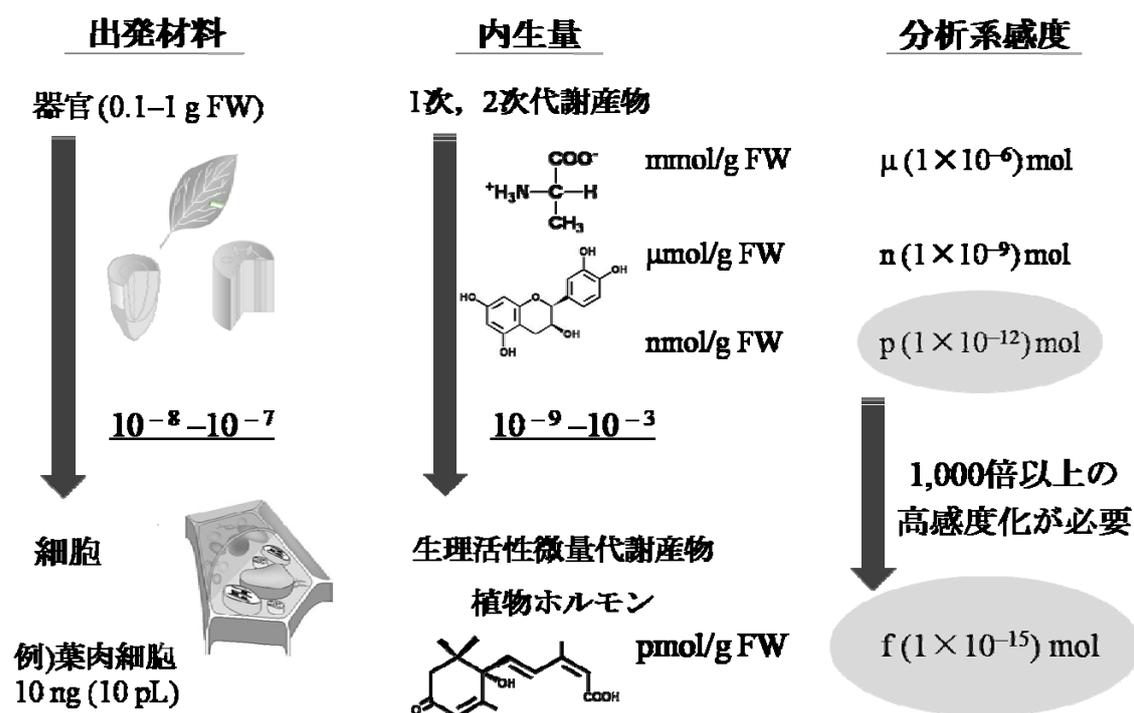


図 1-2. 植物代謝分析における出発材料，代謝物の内生量，分析系の検出感度の関係。

第二章 微量生理活性物質の網羅的高感度定量分析系の構築

2-1. 緒言

第一章で述べたように、近年の植物ホルモン研究においてホルモンネットワークとその機能、ダイナミクスを解明するために網羅性と定量性を伴ったより高感度の分析手法が望まれている。植物ホルモンは化合物の構造と生理機能の観点からオーキシン、サイトカイニン (CK)、アブシシン酸 (ABA)、ジベレリン (GA)、エチレン、ジャスモン酸 (JA)、サリチル酸 (SA)、ブラシノステロイドに大きく分類される。

植物ホルモン定量分析のために、間接的な分析手法である enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) がその検出感度の高さから (ABA 検出限界, 95 fmol)⁴⁰ 古くから使用されてきた^{41,42}。しかしながら、分子の選択性は抗体の特異性に依存するため、精製を行ったとしても類縁体の cross-reactivity が問題となり特定の植物ホルモンを精度良く定量できているかどうかは定かではない。一方、MS は ELISA に比べて分子の選択性が高いことが最大の利点であり、植物ホルモン分析において欠かすことのできない分析手法となっている^{43,44}。GC/MS、もしくは GC/MS/MS は植物ホルモン定量分析に最も普遍的に使用されてきた手法であるが、分析を行うには誘導体化が必要となる。また、abscisic acid-glucosyl ester (ABA-GE) のような熱に不安定な化合物は GC の導入部分やカラム内での高温により分解され⁴⁵⁻⁴⁸、*trans*-zeatin-*O*-glucoside (ZOG) のような高極性化合物は一般的に GC-MS 分析に適していない。さらに、indole-3-acetic acid (IAA) を分析する場合、揮発性を高めるための誘導体化として、diazomethane や trimethylsilyldiazomethane などを使用したカルボキシル基のメチル化が通常行われる^{25,45,48,49}。しかしながら、MeIAA が生体内に存在していることが確認された⁵⁰ ことにより、今後は IAA を正確に定量するためには誘導体化の方法には工夫が必要となると考えられる。

近年では、選択性・感度の観点および誘導体化が必要ないことからマルチプルリアクションモニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 法による LC/MS/MS 分析が植

物ホルモン定量解析において主流となりつつある⁴⁴。MRM法とは分析対象化合物に特異的なプロダクトイオンを選択的にモニタリングする手法でありバックグラウンドノイズを除去できることから選択性と感度の高い分析手法となる。QqQMSは、MRM法による高選択、高感度分析を達成することを重要戦略の一つとして開発されたMSである。以後、MRM法を用いたLC/MSをLC/MS/MSと表記する。LC/MS/MSにより、IAA⁵¹⁻⁵⁶、ABA⁵⁷⁻⁶⁰、CK⁶¹⁻⁶⁴の内生量が様々な植物サンプルにおいて定量されている。また、表2-1に示すようにいくつかの研究グループにおいて、3-6の種の異なるホルモン類を網羅的に定量分析した事例が報告されている^{24, 46, 50, 65, 66}。このように、LC/MS/MSは網羅的植物ホルモン定量分析に適した分析手法であることが伺える。しかしながら、多くの場合、測定のために必要なサンプル量は100 mg dry weight (DW)、または1 g FW以上であることから現状では検出感度が十分であるとはいえない。なぜなら、植物ホルモンを介した未知なる生理応答を解明していくためには、生物的、非生物的環境との相互作用を器官・組織・細胞ごとに観測していくべきであり、そのためには限られたサンプル量(芽、頂端分裂組織、様々な特異的組織や細胞など)からホルモン類を定量する必要があるためである。さらに、表2-1で示した網羅的ホルモンプロファイリングに使用されているMSは全てQqQMSであり、セミマイクロLCとQqQMSを接続することでおよそ1-10 fmolの検出感度を達成しているが、QqQMSは大変高価なMSである。一方、ITMSはQqQMSと比べて感度は不十分であるが相対的に安価であり、また長期間

表 2-1. LC/MS/MS による網羅的植物ホルモン定量分析事例

著者 (所属国)	測定対象ホルモン	LC カラム	MS	発表年	引用文献
Durgbanshi, A. <i>et al.</i> (ドイツ)	IAA, ABA, JA	2.0 mm × 100 mm, C18, 5 μm	QqQ	2005	65
Chiwocha, S. D. <i>et al.</i> (カナダ)	IAA, ABA, CK, GA	2.1 mm × 100 mm, C18, 4 μm	QqQ	2003, 2005	24, 46
Kojima, M. <i>et al.</i> (日本)	IAA, ABA, CK, GA	2.1 mm × 100 mm, C18, 1.7 μm	QqQ	2009	66
Pan, X. <i>et al.</i> (アメリカ)	IAA, ABA, CK, GA, JA, SA	2.0 mm × 150 mm, C18, 5 μm	QqQ	2008	50

安定的に使用できることが利点である⁴⁹。さらに、1台のMSにてMSⁿ分析が可能であることから、化合物の構造情報解析やショットガンプロテオミクスなどに利用されており世界中に幅広く普及しているMSの一つである。また、ITMSは分析を行う上でいくつかの制約は想定されるが、原理上MRM測定が可能である。ナノフローLCとITMSを用いて、QqQMSによるLC/MS/MSと同等、もしくはそれ以上の検出感度で網羅的プロファイリングが達成できればその有用性は計り知れない。したがって、本研究では網羅的高感度ホルモン定量分析系構築にITMSを検出器として採用した。

また、微量成分である植物ホルモンの定量を行うためには植物組織から効率よく抽出し、さらにESIにおける感度と定量性の低下の原因となるイオン化サプレッションの影響(マトリックスエフェクトの1つであり夾雑物によりイオン化効率が減少する現象)^{7,8}を軽減するために多量に含まれる一次、二次代謝物を取り除く精製操作が必要となる。これまで、抽出・精製法は数多く考案されてきたが普遍的な方法はなく、植物の種類や組織に合わせて最適化する必要があると考えられている⁵⁷。また、植物ホルモンを網羅的に定量した論文において、個々の植物ホルモンの回収率やマトリックスエフェクトなど、抽出・精製法を評価する上で必要な詳細な情報は記述されていない^{24,46,50,66}。高感度、高選択性のMRM法を用いた分析系においても、抽出・精製法、特に精製操作が実サンプルの網羅的内生ホルモン定量分析に与える影響を詳細に検討する必要がある。

本章では、様々な生体試料を対象として、サイトカイニン、アブシシン酸、オーキシニン、ジベレリンの4種のホルモン類の網羅的高感度定量分析系を構築することを目的とした。まず、ナノフローLCの最適化を行い高感度かつ安定なナノフローLC/MS分析系を検討した。次に、抽出物の精製操作と分析系の高感度化が実用的植物ホルモン定量分析に与える影響を詳細に検証した。最終的にモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とタバコ (*Nicotiana tabacum*) の少量サンプルからの定量分析を実施することで、ナノフローLC/MS/MS分析法が微量生理活性代謝物の定量測定を行う上で有用な手法と成り得るかを考察した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

本研究で使用した植物ホルモン類とその類縁体, およびそれらの内部標準物質の名称, 本論文で使用する略称を表 2-2 に示した. iP はナカライテスク (京都) から, IAA, GA₃, GA₄, Z, ZR, iPR, ABA は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した. その他の非標識化合物, および全ての重水素標識化合物は OlChemIm Ltd. (Olomouc, Czech Republic) から購入した. アベナンスラミ A (*N*-(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxyanthranilic acid, avenanthramide A) は石原亨 (京都大学大学院, 現・鳥取大学) が合成したものを譲渡して頂いた. 純水と酢酸は和光純薬 (大阪) の HPLC グレードのものを使用した. アセトニトリル, メタノールも同様に HPLC グレードのものをキシダ化学 (大阪) から購入し使用した. ギ酸, アンモニア水溶液は和光純薬から分析グレードのものを購入した. 各化合物の保存溶液はメタノール, もしくは純水を用いて調製した.

表 2-2. 分析対象とした植物ホルモンとその類縁体および内部標準物質のリスト

分類 ^a	化合物名	略称	内部標準物質	略称
CK	<i>trans</i> -ゼアチン- <i>O</i> -グリコシド	ZOG	[² H ₇]ジヒドロゼアチン- <i>O</i> -グリコシド	d ₇ -DHZOG
CK	<i>trans</i> -ゼアチン	Z	[² H ₃]ジヒドロゼアチン	d ₃ -DHZ
CK	ジヒドロゼアチン	DHZ	[² H ₃]ジヒドロゼアチン	d ₃ -DHZ
CK	<i>trans</i> -ゼアチンリボシド	ZR	[² H ₃]ジヒドロゼアチンリボシド	d ₃ -DHZR
CK	ジヒドロゼアチンリボシド	DHZR	[² H ₃]ジヒドロゼアチンリボシド	d ₃ -DHZR
CK	イソペンテニルアデニン	iP	[² H ₆]イソペンテニルアデニン	d ₆ -iP
CK	イソペンテニルアデノシン	iPR	[² H ₆]イソペンテニルアデノシン	d ₆ -iPR
ABA	アブシシン酸グルコシルエステル	ABA-GE	[² H ₆]アブシシン酸	d ₆ -ABA
GA	ジベレリン A ₁	GA ₁	[² H ₂]ジベレリン A ₁	d ₂ -GA ₁
GA	ジベレリン A ₃	GA ₃	[² H ₂]ジベレリン A ₁	d ₂ -GA ₁
auxin	インドール-3-酢酸	IAA	[² H ₅]インドール-3-酢酸	d ₅ -IAA
ABA	アブシシン酸	ABA	[² H ₆]アブシシン酸	d ₆ -ABA
GA	ジベレリン A ₄	GA ₄	[² H ₂]ジベレリン A ₄	d ₂ -GA ₄
GA	ジベレリン A ₇	GA ₇	[² H ₂]ジベレリン A ₄	d ₂ -GA ₄

^a CK: サイトカイニン, ABA: アブシシン酸, auxin: オーキシン, GA: ジベレリン.

2-2-2. 実験材料

本章ではシロイヌナズナ (ecotype, Columbia) とタバコ (cv. Xanthi) を実験材料として使用した。播種後12日目のシロイヌナズナ実生サンプルは、1.5% (w/v) スクロースを添加した1/2MS (Murashige and Skoog)⁶⁷液体培地⁶⁸で22°C, 24時間明期 (光合成光量子束密度, $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 条件で培養し回収した。シロイヌナズナとタバコは、グローブチャンバー (16時間明期/8時間暗期, 光合成光量子束密度, $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) にて、それぞれ22°C, 25°Cの温度条件で栽培した。シロイヌナズナロゼット葉は播種後40日目, タバコ葉は播種後60日目の植物体からサンプリングを行った。全てのサンプルは重量を計測した後に2-mLチューブ (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) に回収した。回収したサンプルは直ちに液体窒素で凍結させ、サンプルの抽出時まで-80°Cで保存した。

2-2-3. 分析機器

本章における分析はキャピラリーLC/ITMS, もしくはナノフローLC/ITMSシステムを使用した。当該システムは、SwitchosローディングポンプとFamosオートサンプラーが付随したUltimateキャピラリー, またはナノフローLC (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) とESI, またはナノESIイオン源を装着したITMS, Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) から構成されている。LC, MS, データ収集はEsquire Control 5.1 software (Bruker Daltonics) を用いて制御した。データ解析はData Analysis 3.1 software (Bruker Daltonics) により行った。

2-2-4. スプレイヤーチップー体型ナノフローカラム作製法

スプレイヤーチップー体型ナノフローカラムは、以前に報告された方法³⁸に従い作製した (図2-1). 内径75 μm , 外径375 μm のフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences, 東京) を加熱することでキャピラリー表面のポリイミドコーティングを剥がした. 次に, コーティングを除去することによりシリカが剥き出しとなった箇所に対してCO₂レーザーを基盤としたキャピラリープラー (モデルP-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) により微細加工処理することで先端径が7-9 μm のナノフローLC用のスプレイヤーチップーを作製した. 続いて, カラム充填器 (日京テクノス, 東京) を用いて充填剤, Inertsil ODS-3 C18 (粒子径3 μm , ポアサイズ100-Å, GL Sciences) をスプレイヤーチップー後方から窒素ポンベにより5 MPa程度の圧力を利用することで15 cm充填させた.

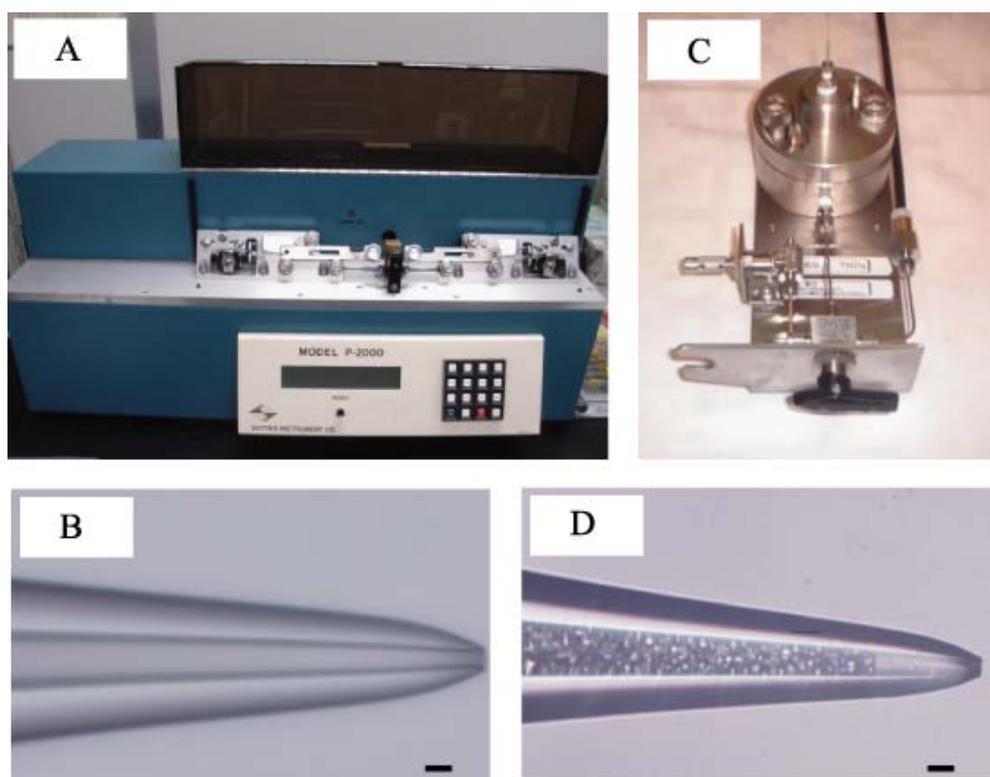


図 2-1. スプレイヤーチップー体型ナノフローカラムの作製.

(A) キャピラリープラー (モデル P-2000, Sutter Instrument 社製). (B) 先端径が 8 μm のスプレイヤーチップ (内径 75 μm , 外径 375 μm キャピラリー使用). (C) カラム充填器 (日京テクノス社製). (D) スプレイヤーチップー体型ナノフローカラムの先端部. スケールバー, 10 μm .

2-2-5. インフュージョン分析条件

非標識体と重水素標識体の植物ホルモン類とその類縁体をそれぞれアセトニトリル/水/酢酸 (50/50/0.05, 体積比) 水溶液で希釈し10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度に調製した. それぞれの調製溶液をシリンジポンプ (74900 series, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) を使用して4 $\mu\text{L/min}$ の流速でESI-ITMSにてインフュージョン分析を行った. サイトカイニン (非標識体7種: ZOG, Z, DHZ, ZR, DHZR, iP, iPR, 重水素標識体5種: d₇-DHZOG, d₃-DHZ, d₃-DHZR, d₆-iP, d₆-iPR) は正イオンモードで, アブシシン酸 (非標識体2種: ABA-GE, ABA, 重水素標識体1種: d₆-ABA), オーキシシン (非標識体1種: IAA, 重水素標識体1種: d₅-ABA), ジベレリン (非標識体4種: GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, 重水素標識体2種: d₂-GA₁, d₂-GA₄) は負イオンモードで分析を行った. 走査範囲 m/z 50–500でのフルスキャンモードでのMS条件は次のように設定した. 走査速度は13,000 u s^{-1} , ネブライザーガス圧力は9.0 psi, ドライガス流量は4.0 L/min, ドライガス温度は250°C, 正イオンモードでのキャピラリー電圧は–4.0 kV, 負イオンモードでは4.0 kV, サンプル安定度は100%, トラップ駆動レベルは標的代謝物ごとに10, 50, 100%のいずれかの最適値に, ターゲットマスは標的化合物の m/z 値に設定した. ターゲットイオン数は正イオンモードで50,000, 負イオンモードで10,000, 最大イオン蓄積時間を100 msに設定し積算回数7とした. ITMS内でイオンの飽和を防ぐためにイオンチャージコントロールによりイオン蓄積時間とイオン数に基づき制御した. MS/MSスペクトル取得のためのプロダクトイオンスキャンはオートMS/MSモードで行い, ヘリウムガスを伴った衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) のパラメータであるフラグメント振幅電圧は1.0 Vに設定した. 各化合物の MRMトランジションは, プリカーサーイオン由来のプロダクトイオンの中で最もイオン強度の高い m/z を選択して設定した.

2-2-6. キャピラリーLC/MS/MS分析条件

サンプルを保持・濃縮させるためのプレカラムとして300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$, 粒子径5 μm , Inertsil ODS-3 C18カラム (Dionex) を用いた. ローディングポンプの移動相には0.05%の

酢酸水溶液を用いて、流速10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。分析系へのサンプル注入量は10 μL に固定した。サンプルは5分間プレカラムに保持・濃縮され、その後、バルブを操作することで流路を切り替え、サンプルをキャピラリーLCカラムに送液した。分離のためのキャピラリーLCカラムは300 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, 粒子径3 μm , Inertsil ODS-3 C18 カラム (GL Sciences) を使用した。移動相の溶媒組成は水/アセトニトリル/酢酸 (95/5/0.05, 体積比), (A液), アセトニトリル/水/酢酸 (95/5/0.05, 体積比), (B液) とした。流速はCAP-200スプリッター (Dionex) を用いて4 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。分離はアセトニトリル濃度を上げるグラジエント溶出にて行った。塩基性代謝物であるサイトカニンと酸性代謝物であるアブシシン酸, オーキシシン, ジベレリンは異なるLC条件で実施した。サイトカイニンのグラジエント条件は, B液0–30% (20分間), 30–90% (5分間), 90% (10分間) 行い, 3分後初期状態に戻し7分間カラムの平衡化を行った。アブシシン酸, オーキシシン, ジベレリンの条件は, B液20–40% (15分間), 40–65% (10分間), 65–90% (2分間), 90% (8分間) 行い, 3分後初期状態に戻し7分間カラムの平衡化を行った。両者の条件ともLC分離時間の合計は45分であった。

MRM モードでのキャピラリーLC/MS/MS 分析は, 正イオンモードでの MRM 法 1 (サイトカニン) と負イオンモードでの MRM 法 2 (アブシシン酸, オーキシシン, ジベレリン) にて実施した。最適化した一部の MRM 法の MS/MS パラメータを表 2-3 に示した。MRM 法 1 における 12 種の MRM トランジションは表 2-3 に記載したように化合物の溶出時間に基づき 3 種のタイムピリオド (ピリオド 1 : 0–15.0 分, ピリオド 2 : 15.0–23.0 分, ピリオド 3 : 23.0–45.0 分) に分けて行った。MRM 法 2 における 11 種の MRM トランジションも同様に, 3 つのタイムピリオド (ピリオド 1 : 0–14.5 分, ピリオド 2 : 14.5–25.0 分, ピリオド 3 : 25.0–45.0 分) に分割して行った。表 2-3 に示した以外の MRM モードでの最適化した MS パラメータは次のように設定した。走査範囲は m/z 50–500, 走査速度は $13,000 \text{ u s}^{-1}$, ネブライザーガス圧力は 9.0 psi, ドライガス流量は 4.0 L/min, ドライガス温度は 250°C , サンプル安定度は 100%, MRM 法 1 でのキャピラリー電圧は–3.0 kV, MRM 法 2 では 3.0 kV, ターゲットイオン数は MRM 法 1 で 500,000, MRM 法 2 で 100,000,

最大イオン蓄積時間を 50 ms に設定し積算回数は 4, 全ての MRM トランジションにおけるフラグメント振幅電圧は 1.0 V に設定した. 植物ホルモン類の定量を行うための検量線作成は, 以下の濃度を示した混合標準品溶液を使用して行った. 0, 0.05, 0.1, 0.5,

表 2-3. キャピラリーLC, またはナノフローLC/MS/MS での MRM 法の最適値

MRM 法 1 (正イオンモード)					
タイムピリオド	対象化合物	MS/MS パラメータ			
		ターゲット マス (m/z)	トラップ駆動 レベル (%)	プリカーサー イオン (m/z)	単離幅 (Da)
1	ZOG			382.0	2.0
	d ₇ -DHZOG			391.0	2.0
	Z	250	100	219.9	1.0
	DHZ			221.9	1.0
	d ₃ -DHZ			224.9	1.0
2	ZR			352.0	1.0
	DHZR			354.0	1.0
	d ₃ -DHZR	300	100	357.0	2.0
	iP			203.9	3.0
	d ₆ -iP			209.9	3.0
3	iPR			336.0	3.0
	d ₆ -iPR	340	100	342.0	3.0
MRM 法 2 (負イオンモード)					
1	ABA-GE			424.6	4.0
	GA ₁			346.7	1.0
	d ₂ -GA ₁	345	50	348.7	1.0
	GA ₃			344.7	1.0
2	IAA			173.5	2.0
	d ₅ -IAA			178.5	2.0
	ABA	200	10	262.6	3.0
	d ₆ -ABA			268.6	3.0
3	GA ₄			330.7	1.0
	d ₂ -GA ₄	330	50	332.7	1.0
	GA ₇			328.7	1.0

その他の MRM パラメータは 2.2.6, 2.2.7 に記載.

1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 nmol/L (全ての水溶液に対して 100 nmol/L: d₇-DHZOG, d₃-DHZR, d₆-iP, d₆-iPR, d₆-ABA, 500 nmol/L: d₂-GA₁, d₃-IAA, d₂-GA₄, 1,000 nmol/L: d₃-DHZ の固定濃度での重水素標識体を含む). 植物ホルモン類の検量線作成における分析は各濃度で3回ずつ行い, それぞれのホルモン類ごとに非標識体と重水素標識体とのMRM クラマトグラムのパークエリアの比率から検量線を作成した.

フルスキャンモード (走査範囲 m/z 50–500) でのキャピラリーLC/MS 分析条件は, ターゲットマス, m/z 250 ; トラップ駆動レベル, 100% (正イオンモード), 50% (負イオンモード); ターゲットイオン数, 50,000 (正イオンモード), 10,000 (負イオンモード) に設定し積算回数7とした. その他のMSパラメータはMRMモードでの分析時と同じ値に設定した.

2-2-7. ナノフローLC/MS/MS 分析条件

ナノフローLCは, 2-2-4.で自作したスプレイヤーチップ一体型ナノフローカラム (75 μm \times 150 mm, 粒子径 3 μm , Inertsil ODS-3 C18) を使用した. カラムとスプレイヤーが独立した分析系の場合は, ナノLCカラム (75 μm \times 150 mm, 粒子径 3 μm , Inertsil ODS-3 C18, GL Sciences) とスプレイヤーチップである Pico TipTMEmitter (チップ先端径 10 \pm 1 μm , New Objective Inc., Woburn, MA, USA) を用いて実施した. 流速はCAP-75 スプリッター (Dionex) を用いて 350 nL/min に設定した. その他のLC条件は, 2-2-6.でのキャピラリーLC分析時と同じ条件で行った.

ナノフローLC/MS/MS分析条件の一部は, 表2-3に示したキャピラリーLC/MS/MSと同じ数値を使用した. MRM法1における12種のMRMトランジションは表2-3に記載したように化合物の溶出時間に基づき3種のタイムピリオド (ピリオド1: 0–13.5分, ピリオド2: 13.5–23.0分, ピリオド3: 23.0–45.0分) に分けて行った. MRM法2における11種のMRMトランジションも同様に, 3つのタイムピリオド (ピリオド1: 0–13.5分, ピリオド2: 13.5–23.0分, ピリオド3: 23.0–45.0分) に分割して行った. 表2-3に示した以外のMRMモードでの最適化したMS/MSパラメータは次のように設定した. 走査範囲は m/z 50–500,

走査速度は $13,000 \text{ u s}^{-1}$, ドライガス流量は 3.0 L/min , ドライガス温度は 150°C , サンプル安定度は100%, MRM法1でのキャピラリー電圧は -1.8 kV , MRM法2では 2.8 kV , ターゲットイオン数はMRM法1で500,000, MRM法2で100,000, 最大イオン蓄積時間を50 msに設定し積算回数は4, 全てのMRMトランジションにおけるフラグメント振幅電圧は 1.0 V に設定した. 植物ホルモン類の定量を行うための検量線作成は, 以下の濃度に示した混合標準品溶液を使用して行った. 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 nmol/L (全ての水溶液に対して20 nmol/L: $d_7\text{-DHZOG}$, $d_3\text{-DHZR}$, $d_6\text{-iP}$, $d_6\text{-iPR}$, 100 nmol/L: $d_6\text{-ABA}$, 200 nmol/L: $d_3\text{-DHZ}$, 500 nmol/L: $d_2\text{-GA}_1$, $d_5\text{-IAA}$, $d_2\text{-GA}_4$ の固定濃度での重水素標識体を含む). 検量線作成も2-2-6.で示した同様の方法で行った.

2-2-8. サンプル調製法

植物ホルモン類の抽出は, 以前に報告された方法⁶¹を一部修正して行った. 2-mLチューブ内で -80°C で保存していた植物試料に対して, ジルコニア製ボール1個を加え, 20 Hzで1分間ボールミル (Model MM301, Retsch GmbH, Haan, Germany) により破碎した. 次に, 1 mLの重水素標識体の内部標準物質を含む抽出溶媒 (modified Bielecki's solvent, メタノール/水/ギ酸: 75/20/5, 体積比) にて抽出した. キャピラリーLC/MS/MS定量分析の場合の抽出溶媒への内部標準物質の添加量は, 10 pmol ($d_7\text{-DHZOG}$, $d_3\text{-DHZR}$, $d_6\text{-iP}$, $d_6\text{-iPR}$, $d_6\text{-ABA}$), 50 pmol ($d_2\text{-GA}_1$, $d_5\text{-IAA}$, $d_2\text{-GA}_4$), 100 pmol ($d_3\text{-DHZ}$) であった. ナノフローLC/MS/MS定量分析の場合は, 2 pmol ($d_7\text{-DHZOG}$, $d_3\text{-DHZR}$, $d_6\text{-iP}$, $d_6\text{-iPR}$), 10 pmol ($d_6\text{-ABA}$), 20 pmol ($d_3\text{-DHZ}$), 50 pmol ($d_2\text{-GA}_1$, $d_5\text{-IAA}$, $d_2\text{-GA}_4$) の内部標準物質を抽出溶媒に添加した. その後, サーモミキサー (Eppendorf) を用いて 37°C , 1,200 rpmで30分間攪拌した. 次いで, 出力を最大にして1分間ボルテックスした. 抽出物を16,000gで3分間遠心分離した後, 新しい2 mLチューブに上清800 μL を移した. 上清回収後のサンプルの入ったチューブに再度抽出溶媒700 μL を加え, 前述と同一の条件で攪拌, 遠心分離後, 上清700 μL を回収し1回目の抽出液と混合した.

抽出されたサンプルからの植物ホルモン類の精製操作はこれまで報告された主要な2

種の方法^{46,69}を一部修正して使用した。

1つ目の精製方法は以前に報告された手法⁴⁶を改良したものであり以下に詳細を記載した。サンプル抽出液は遠心濃縮機 (VC-36S, タイテック, 東京) を使用して溶媒を除去した後に1 mLの1 mol/Lギ酸水溶液で再溶解させた後に30 mg Oasis HLBカートリッジ (Waters Corp., Milford, MA, USA) を使用して精製を行った。Oasis HLBカートリッジはあらかじめ1 mLのメタノールで活性化させ, 1 mol/Lのギ酸水溶液1 mLで平衡化させた。続いて再溶解したサンプルをカートリッジに導入し1 mLの1 mol/Lギ酸水溶液で洗浄後, サイトカイニン, アブシシン酸, オーキシシン, ジベレリンを1 mLのメタノール/水/ギ酸 (79/20/0.1, 体積比) 溶液で溶出させ回収した。溶出液は遠心濃縮機で乾燥させた後に, 100 μ Lの0.05%酢酸水溶液で再調製し, 0.45 μ mフィルター (GL Sciences) に通したものを分析系に供した。当該精製法を以後, 「シングルモード精製法」と表記する。

2つ目の方法は以前に報告された手法⁶⁹を一部改良したものである。サンプル抽出液をあらかじめ1 mLメタノールで活性化させた30 mg Oasis HLBカートリッジに素通りさせ, 遠心濃縮機を用いて回収したサンプル中の溶媒を除去した。乾燥させた抽出物を1 mLの1 mol/Lのギ酸水溶液で再溶解させ, 30 mg Oasis MCX (Waters) カートリッジにて精製を行った。Oasis MCXカートリッジは1 mLのメタノールで活性化させ1 mLの1 mol/Lギ酸水溶液で平衡化させた。続いて再溶解したサンプルをカートリッジに導入し1 mLの1 mol/Lギ酸水溶液で洗浄後, 酸性代謝物であるアブシシン酸, オーキシシン, ジベレリンの画分を1 mLのメタノールで溶出させ回収した。その後, カートリッジを0.35 mol/Lアンモニア水溶液1 mLで洗浄し, 次いで1 mLの0.35 mol/Lアンモニア60%メタノール溶液でサイトカイニン画分を溶出させ回収した。本論文中において本精製法を「ミックスモード精製法」と表記する。

2-3. 結果

2-3-1. スプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムを用いた分析系の検証

第一章で述べたように、カラム内径のスケールダウンにより ESI-MS の検出感度は向上することが知られている。一方、カラム内径の違いによる相対的感度増加率の理論値 (theoretical downscaling factor; f_{theor}) は次式から算出することができる³¹。

$$f_{\text{theor}} = C_{\text{max}} \text{ ratio} = (d_{c1}/d_{c2})^2$$

d_{c1} : 基準となるカラム内径, d_{c2} : 比較対照のカラム内径

粒子径を含む担体の種類とカラムの長さが同じであるならば、理論的には内径 4.6 mm の汎用 LC カラムよりも、2.0 mm のセミマイクロ LC カラムは 5 倍、0.3 mm のキャピラリー LC カラムは 235 倍、75 μm のナノフロー LC カラムは 3,762 倍、感度増加が期待できる。また、0.3 mm のキャピラリー LC カラムを基準とした場合、75 μm のナノ LC カラムは 16 倍高くなることが理論的には算出される (表 2-4)。通常のナノフロー LC/MS システムは図 2-2 A に示すようにナノフロー LC カラムと先端径を 15 μm 以下にテーパ状に加工したスプレイヤーチップを接続して使用する。しかしながら、本分析システムにおいてはカラム出口からスプレイヤーチップにいたるまでの配管のデッドボリュームによりピークの拡散が起こった。さらに、数回分析を行うと配管の接続時に生じた微細なガラス破片や移動相にわずかに含まれる汚れ等がスプレイヤー先端に詰まり (図 2-2 B)、保持時間や質量分析感度が一定しない問題が生じた。

そこで、次に上記の問題を解決するために 2002 年に石濱ら³⁸が考案したナノフロー LC カラムとスプレイヤーチップが一体型となったカラムを作製して再度検証を行った。

表 2-4. カラム内径の違いによる相対的感度増加率

	Column i.d. (mm)			
	4.6	2.0	0.3	0.075
f_{theor}	1	5	235	3,762
			1	16

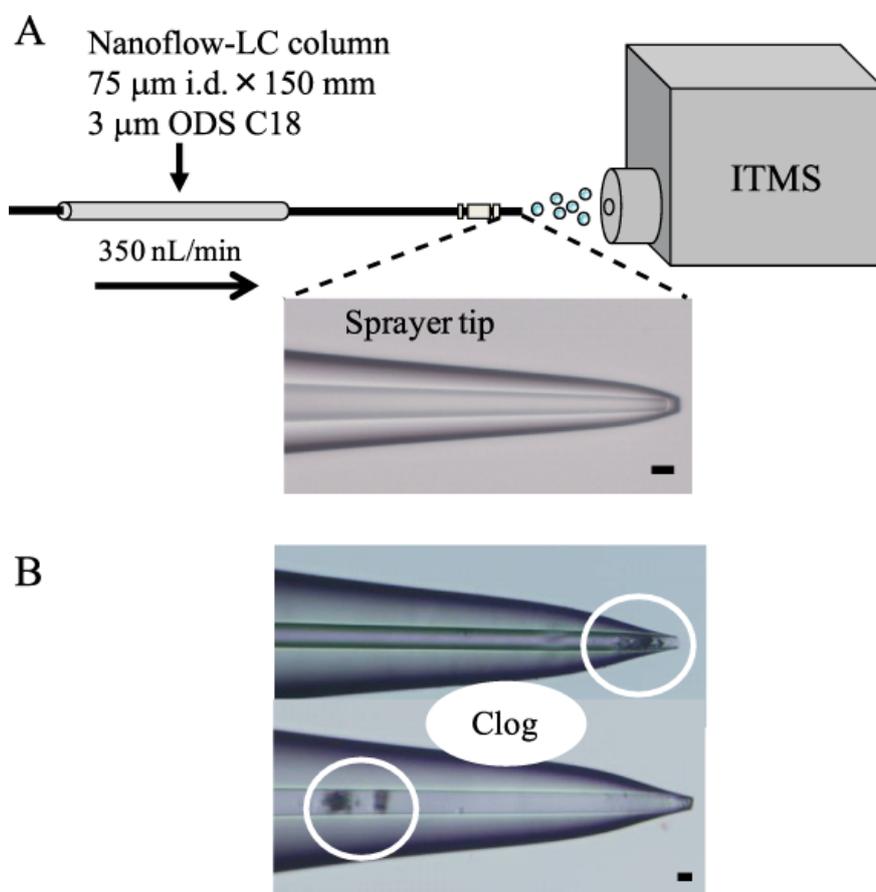


図 2-2. カラムとスプレイヤーチップが独立したナノフローLC/MS 分析系.

(A) 通常のナノフローLC/MS 模式図. (B) スプレイヤーチップ先端が詰まった様子. スケールバー, 10 μm .

当該カラムは熔融石英管をナノスプレイヤー形状に加工し, 内部に逆相担体を充填したものとなる. スプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムを用いた分析系の模式図を図 2-3 (A) に示す. 本分析法の有用性を検証するために図 2-2 A に示した従来分析法との比較を行った. それぞれの分析系において同一量のアベナスラミド A 標準溶液を注入した際の, m/z 298 の MS クロマトグラムを図 2-2 B に示した. その結果, スプレイヤーチップ一体型カラムを用いることでピーク形状および分子イオン強度は大幅に改善された. そこで, 次に当該分析手法を用いて 4 種の植物ホルモン類の高感度かつ安定なナノフローLC/MS/MS 定量分析系を構築することとした.

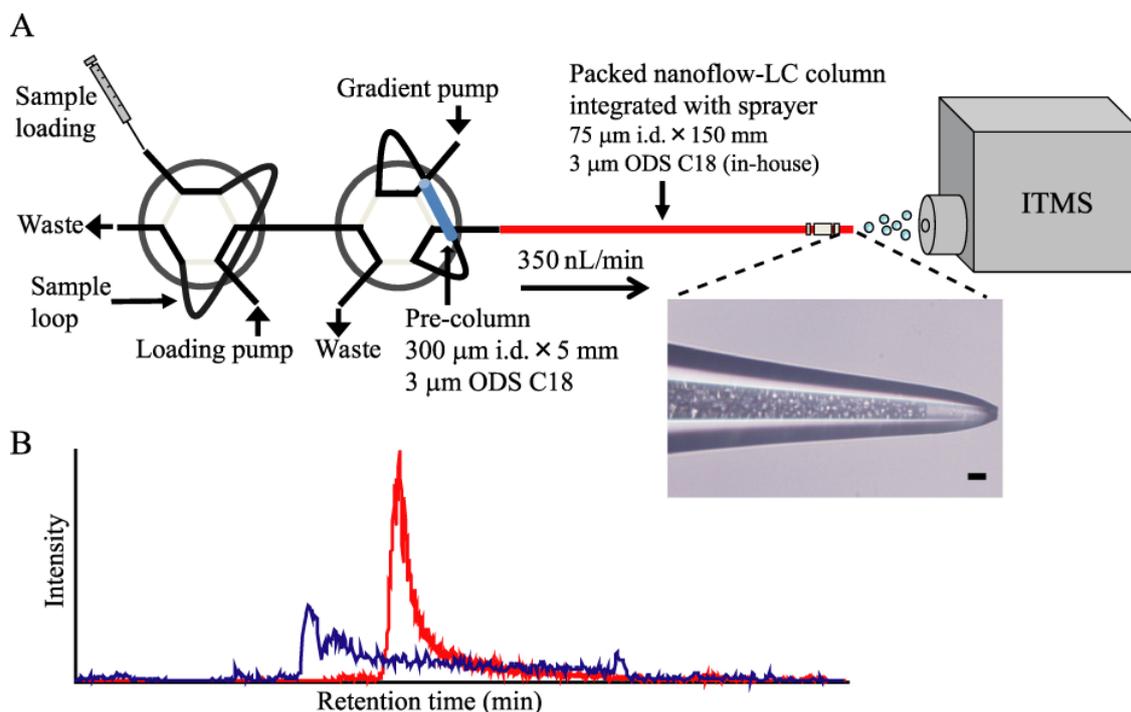


図 2-3. スプレイヤーチップ一体型カラムを用いたナノフローLC/MS 分析系.

(A) 一体型カラムを用いたナノフローLC/MS 模式図. (B) 2 種のナノフローLC/MS 分析系の比較. サンプル, アベナンスラミド A (負イオンモード, m/z 298); 注入量, 300 fmol; フルスキャンモードにて実施. 赤線, 一体型カラムを用いた分析系 (図 2-3 A) による m/z 298 の MS クロマトグラム. 青線, カラムとスプレイヤーが独立した分析系 (図 2-2 A) による m/z 298 の MS クロマトグラム. スケールバー, 10 μm .

2-3-2. 植物ホルモン類のイオン化・フラグメント化効率の検討

測定対象としたサイトカイニン, アブシシン酸, オーキシシン, ジベレリンの非標識および重水素標識の標準品 (表 2-2) に対して, MRM トランジションを設定するためにイオン化効率, フラグメントパターンの確認をインフュージョン分析にて行った. サイトカイニン類は正イオンモードにおいて, アブシシン酸, オーキシシン, ジベレリン類は, 負イオンモードにおいてイオン化が良好であった. また, MS のパラメータ (ターゲットマス, トラップ駆動レベル) は各々のプリカーサーイオンの強度が最も高くなるように設定した. それぞれの化合物のプリカーサーイオンに対して, ヘリウムを伴った CID により MS/MS スペクトルを取得した. その際の CID のパラメータであ

るフラグメント振幅電圧は最適値の 1.0 V に設定した。得られたフラグメントパターンの一例を図 2-4 に示した。各化合物において検出されたプロダクトイオン (MS/MS スペクトル) の中で最もイオン強度の高いプロダクトイオンを選択し, MRM トランジションを設定した (表 2-5)。また, プリカーサーイオンおよび特定の選択したプロダクトイオンの絶対強度を図 2-5 に示した。各々のプリカーサーイオンのイオン化効率を比較したところ, ほぼ同程度であるのに対して, 特定のプロダクトイオン強度の場合, 化合物により大きく異なることが観測された。DHZR と GA₄ のフラグメントパターンを比較した場合, DHZR は 1 箇所解離が起こるのに対して, GA₄ は複数の箇所解離が起こった (図 2-4)。

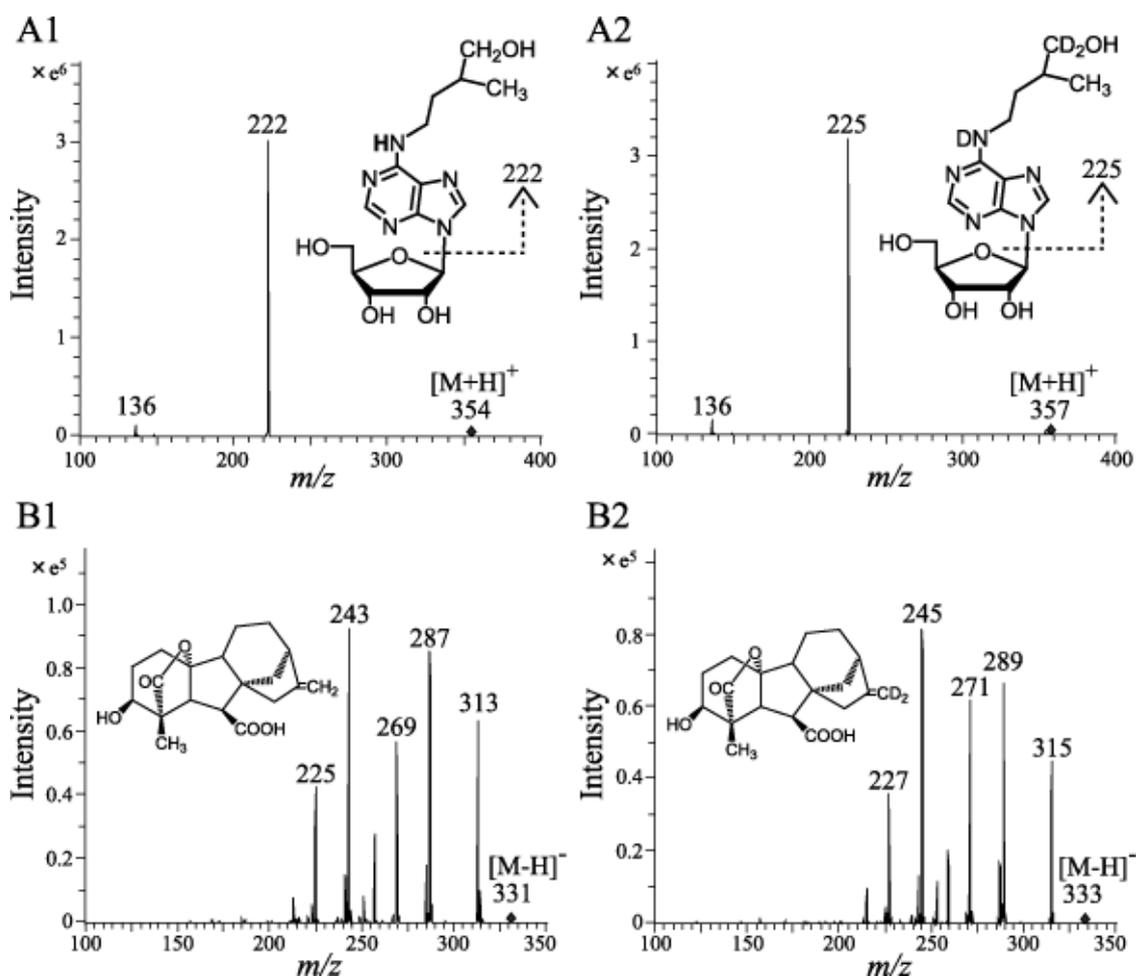


図 2-4. (A1) DHZR, (A2) d₃-DHZR, (B1) GA₄, (B2) d₂-GA₄ の MS/MS スペクトル。

表 2-5. 植物ホルモン類とそれらの内部標準物質の MRM トランジション

対象化合物	MRM トランジション	内部標準物質	MRM トランジション
ZOG	382 > 220	d ₇ -DHZOG	391 > 229
Z	220 > 136	d ₃ -DHZ	225 > 136
DHZ	222 > 136	d ₃ -DHZ	225 > 136
ZR	352 > 220	d ₃ -DHZR	357 > 225
DHZR	354 > 222	d ₃ -DHZR	357 > 225
iP	204 > 148	d ₆ -iP	210 > 148
iPR	336 > 204	d ₆ -iPR	342 > 210
ABA-GE	425 > 263	d ₆ -ABA	269 > 159
GA ₁	347 > 259	d ₂ -GA ₁	349 > 261
GA ₃	345 > 239	d ₂ -GA ₁	349 > 305
IAA	174 > 130	d ₅ -IAA	179 > 135
ABA	263 > 153	d ₆ -ABA	269 > 159
GA ₄	331 > 243	d ₂ -GA ₄	333 > 245
GA ₇	329 > 223	d ₂ -GA ₄	333 > 245

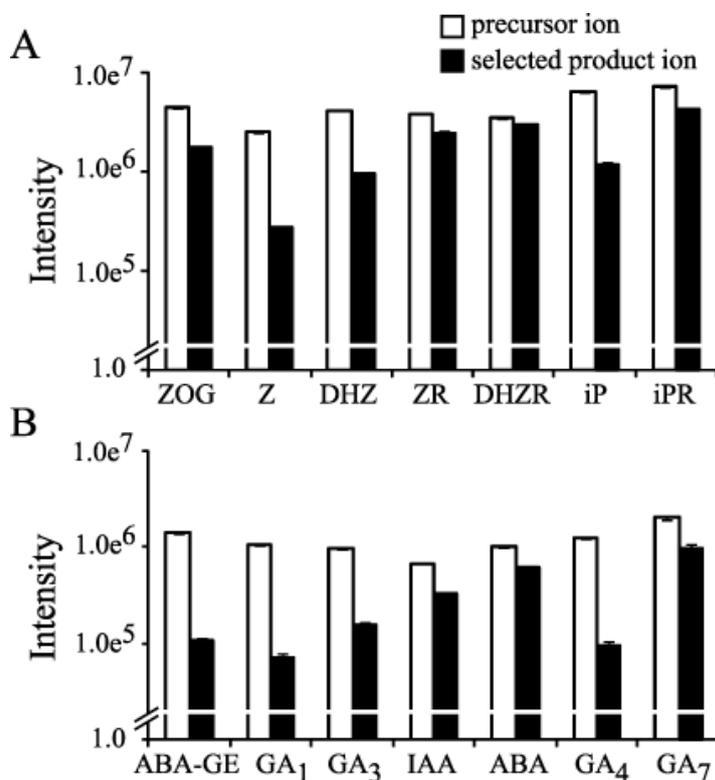


図 2-5. プリカーサーイオンおよび選択したプロダクトイオンのシグナル強度。

(A) 正イオンモードでのインフュージョン分析結果. (B) 負イオンモードでのインフュージョン測定結果. 平均値 ± 標準偏差 (n=3).

2-3-3. ナノフローLC/MS/MSによる植物ホルモンの網羅的高感度定量測定

キャピラリーLCやナノフローLCのような内径1 mm以下のカラムを用いる場合、カラム内容積はそれぞれ約10 μL , 1 μL であるためにカラムへの注入量は通常制限される。我々はこの問題を解決するためにプレカラムとバルブスイッチング法を採用した。キャピラリーLC, およびナノフローLCシステムの両者において、10 μL の試料をプレカラムで保持・濃縮操作を行い、その後バルブを切り替えることで濃縮を行った試料を分析カラムに導入した。

LC/MS/MS分析は正イオンモード(MRM法1)と負イオンモード(MRM法2)の2種類の分析手法を用いて行った。最適化した主要なMRMパラメータを表2-3に示した。また、MRM法1の12種のMRMトランジション、またはMRM法2の11種のMRMトランジションは化合物のLC溶出時間に基づいて、それぞれ3つのタイムピリオドに分割し行った(表2-3)。ITMSによるMRM測定はMS内部で次の手順に従い行われる。ステップ1. 走査範囲の分子イオン(ここでは m/z 50-500)のトラップ、ステップ2. 特定のプリカーサーイオンの単離、ステップ3. プリカーサーイオンの断片化(フラグメンテーション)、ステップ4. 特定のプロダクトイオンの単離。以上の工程を1つのMRMトランジション毎に順次行っていく。一方、QqQMSはステップ1. Q1で特定のプリカーサーイオンを単離し、ステップ2. Q2でフラグメンテーションを行い、ステップ3. Q3で特定のプロダクトイオンの単離を行うため、各MSでの役割は特化されている。したがって、ITMSでは、QqQMSに比べて1つのMRMトランジションを遂行する(データポイントを取得する)ためにより多くの時間を要するため、結果的にMRMトランジションの数は制限される。感度と定量性、再現性を考慮すると1つのタイムピリオドあたりに導入できるMRMトランジションの数は最大で5つであった。

負イオンモードでのナノフローLC/MS/MS測定は、移動相にギ酸よりも弱酸である酢酸を0.05%添加し、イオン化の際に重要なMSパラメータであるキャピラリー電圧値を正イオンモード(-1.8 kV)の時よりも2.8 kVとやや高めに設定することで、移動相に5%のアセトニトリル等の有機溶媒が含まれる場合、安定なイオン化を達成した。

キャピラリーLC/MS/MS とナノフローLC/MS/MS の両者の分析系を比較するために、使用したカラムは粒子径を含む担体の種類、カラムの長さを同一にした。また、グラジエントなどの LC 条件や MS/MS 分析条件も可能な限り同じにした。対象とした植物ホルモン類の検量線は、化合物ごとに非標識体とそれらに対応した重水素標識体との相対ピークエリア比に基づいて作成した。標準品を用いたキャピラリーおよびナノフロー LC/MS/MS の分析結果を表 2-6、表 2-7 にそれぞれ示した。また、キャピラリー、ナノフロー LC/MS/MS クロマトグラムを図 2-6 に示した。MRM 法を用いることで、GA₁ や GA₃ のような LC では分離不可能な代謝物においても MS 内部で選択的に分離することが可能であった (図 2-6)。ナノフロー LC/S/MS を用いた植物ホルモン類の保持時間の精度は相対標準偏差 (relative standard deviations, RSDs) 1.1%以下であり、ピークエリアのばらつきは RSDs 10.7%以下で、キャピラリーLC/MS/MS と同程度であり、高い再現性

表 2-6. キャピラリーLC/MS/MS による植物ホルモン分析系のバリデーション

対象化合物	保持時間 (min)	再現性, RSD (n=6) (%) ^a		検量線 <i>R</i> ²	直線範囲 (fmol)	検出限界 (fmol) ^d	
		保持時間 ^b	ピークエリア ^c				
MRM 法 1	ZOG	11.0	0.8	9.2	0.9989	5–1000	2.3
	Z	11.8	0.9	13.5	0.9924	100–10000	84
	DHZ	11.8	1.1	10.2	0.9919	100–10000	52
	ZR	16.1	0.7	6.8	0.9983	5–1000	3.2
	DHZR	16.3	0.4	7.7	0.9996	5–1000	1.3
	iP	21.2	0.7	8.0	0.9995	10–1000	4.9
	iPR	25.0	0.3	3.8	0.9998	1–1000	0.55
MRM 法 2	ABA-GE	7.9	3.4	12.9	0.9995	50–5000	14
	GA ₁	12.1	0.4	7.1	0.9967	50–5000	28
	GA ₃	13.0	0.5	9.5	0.9988	50–5000	12
	IAA	16.3	0.5	7.5	0.9993	50–5000	13
	ABA	18.0	0.2	7.8	0.9929	5–1000	3.1
	GA ₄	28.3	0.3	8.0	1.0000	500–5000	170
	GA ₇	28.5	0.7	7.0	0.9980	10–1000	3.8

^a 注入量, 1 pmol (ZOG, ZR, DHZR, iP, iPR, ABA, GA₇), 5 pmol (ABA-GE, GA₁, GA₃, IAA, GA₄), 10 pmol (Z, DHZ). ^b 相対保持時間 (対象化合物/内部標準物質). ^c 相対ピークエリア (対象化合物/内部標準物質). ^d S/N=3.

を得られた。相関係数を示す R^2 値は 0.9937–1.0000 であることから高い直線性があることも示された (表 2-7)。同様にキャピラリー LC/MS/MS においても同程度の結果を得た (表 2-6)。また、両者の結果を比較する上で最も重要な検出限界においては、約 10 倍向上した。さらに、ZOG, ZR, DHZR, iPR, ABA, GA₇ の検出限界範囲は 66–720 amol であり fmol 以下の検出感度を達成した。一方、近年 4.6 mm i.d. × 150 mm の C18 カラムを使用したコンベンショナル LC と本研究で使用した同型のイオントラップ MS を接続したシステムの MRM 分析における IAA 標準品の検出限界は 1.1 pmol と報告された⁵⁶。また、2.1 mm i.d. × 150 mm の C18 カラムを使用したセミマイクロ LC と他社のイオントラップ MS を接続した MRM 分析系での IAA 標準品の定量限界は 38.2 pmol と報告された⁷⁰。本研究でのナノフロー LC/MS/MS の IAA の検出限界は、2.2 fmol であり (表 2-7) 上記の報告結果よりも 500–17,000 倍検出感度が向上した。

表 2-7. ナノフロー LC/MS/MS による植物ホルモン分析系のバリデーション

対象化合物	保持時間 (min)	再現性, RSD (n=6) (%) ^a		検量線 R^2	直線範囲 (fmol)	検出限界 (fmol) ^d	
		保持時間 ^b	ピークエリア ^c				
MRM 法 1	ZOG	7.7	0.6	6.0	1.0000	0.5–1000	0.17
	Z	8.4	0.6	9.7	1.0000	50–10000	18
	DHZ	8.6	1.1	10.0	0.9998	10–10000	8.5
	ZR	15.0	0.8	6.8	0.9967	0.5–1000	0.20
	DHZR	16.0	0.5	6.0	0.9979	0.5–1000	0.33
	iP	20.8	0.8	7.8	1.0000	5–1000	3.4
	iPR	26.6	0.3	7.5	0.9989	0.1–1000	0.066
MRM 法 2	ABA-GE	11.1	0.6	10.7	0.9987	5–5000	3.1
	GA ₁	11.4	0.5	7.9	0.9988	10–5000	7.5
	GA ₃	11.7	0.8	4.0	0.9949	10–5000	4.0
	IAA	15.9	0.4	5.0	0.9937	5–5000	2.2
	ABA	19.7	0.6	7.9	0.9998	0.5–5000	0.14
	GA ₄	29.9	0.1	10.1	0.9986	50–5000	17
	GA ₇	29.4	0.2	2.0	0.9994	1–5000	0.72

^a 注入量, 200 fmol (ZOG, ZR, DHZR, iP, iPR), 1 pmol (ABA, GA₇), 2 pmol (Z, DHZ), 5 pmol (ABA-GE, GA₁, GA₃, IAA, GA₄). ^b 相対保持時間 (対象化合物/内部標準物質). ^c 相対ピークエリア (対象化合物/内部標準物質). ^d S/N=3.

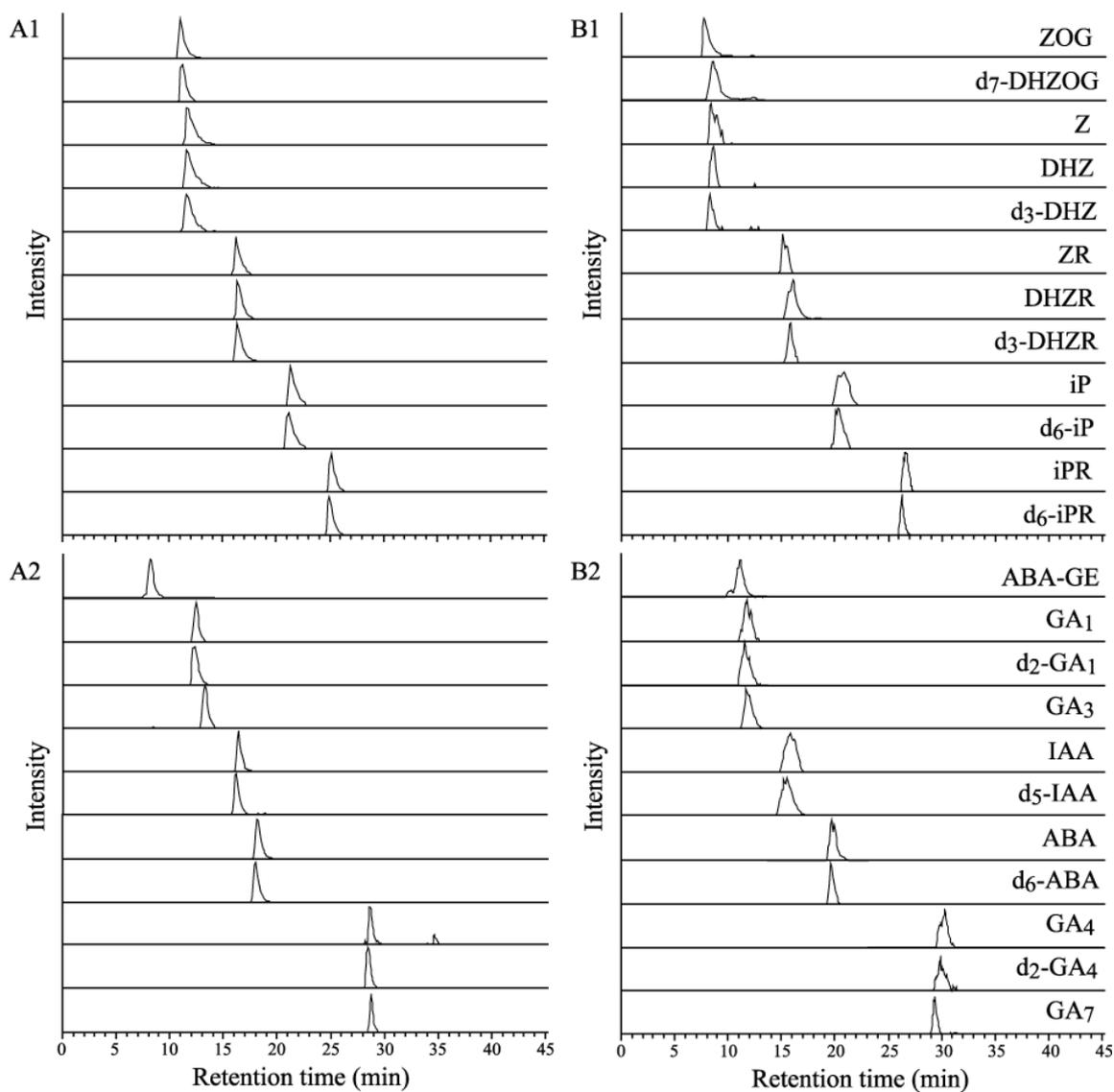


図 2-6. 植物ホルモン標準物質の MRM クロマトグラム.

(A) キャピラリー LC/MS/MS, (B) ナノフロー LC/MS/MS, (A1, B1) サイトカイニン (MRM 法 1), (A2, B2) アブシシン酸, オーキシン, ジベレリン (MRM 法 2).

2-3-4. 抽出・精製法の最適化

LC/MS/MS を使用し、高い精度と正確さを伴って代謝物の定量分析を行うためには、抽出時に分析対象とする代謝物の安定同位体標識体を加えた安定同位体希釈法による定量分析を行うことが望ましい^{71,72}。植物の種類や部位、生育時期によって、生体内での一次、二次代謝物の存在比は大きく異なる、つまりマトリックスの影響は変化するため、サンプルの種類に応じてスパイク操作を伴う定量分析手法に比べて、安定同位体希釈法はスループットの観点からも非常に優れている。

シロイヌナズナの芽生え後の植物体 (100 mg FW) と乾燥種子 (10 mg DW) を用いて抽出・精製操作を評価した。抽出溶媒はメタノール/水/ギ酸 (75/20/5, 体積比)⁶¹ を使用した。抽出操作は抽出効率を上げるために 2 回繰り返す、また Zhou らが指摘したように⁵⁹、サーモミキサーによる攪拌とは別に、最大値に設定したボルテックスを用いて 1 分間攪拌を行った。精製はこれまで報告されている代表的な 2 つの方法を一部修正して比較検討した。1 つ目のシングルモード精製法は、シリカベースの逆相担体 (ODS C18) よりも極性基の保持に優れたジビニルベンゼンと *N*-ビニルピロリドンの 2 つのモノマーの共重合体である Oasis HLB カートリッジの使用である。Oasis HLB, またはシリカベースの逆相担体の使用は、精製操作におけるスループットが高いことが利点であり、これまで植物ホルモン精製工程に数多く使用されてきた^{24, 46, 53, 55, 57-59, 70}。2 つ目のミックスモード精製法は、Oasis HLB カートリッジとジビニルベンゼンにスルホン基を修飾したカチオン交換担体、Oasis MCX カートリッジを使用したもので、サイトカニン類の精製に優れた方法である^{61, 69}。また、30 mg (1 mL) と 60 mg (3 mL) の固相担体を使用した際に回収されたホルモン量に統計学的に有意な差はなかったため、Zhou らの見解⁵⁹と同様に出発材料が少量である場合は、30 mg (1 mL) の固相担体の使用で抽出物をロスなく回収できていると考えられた。また、全ての抽出・精製操作は 2-mL 以下のチューブで行うことが可能であった。標準化合物のみの抽出工程および 2 種の精製操作における回収率は、すべての化合物において 70–100% 以上であった。2 つの異なる精製操作が及ぼすマトリックスエフェクトは、抽出時に添加した重水素標識体の回収率を指標に評

価した。その際に、9種の重水素標識体のみを使用して、抽出・精製操作を行い、キャピラリーLC/MS/MSで検出された各ピークエリアを基準とした。

シロイヌナズナの芽生え後の植物体 (100 mg FW) と乾燥種子 (10 mg DW) を用いてシングルモード、もしくはミックスモード精製法を行った際の各重水素標識体の回収率を表2-8に示した。シロイヌナズナの芽生え後の植物体と乾燥種子サンプルの両者とも、大部分の重水素標識体においてミックスモード精製法の方がシングルモード精製法に比べて回収率は増加した。また、これらのサンプルのフルスキャンモードによるキャピラリーLC/MS分析を行った際のトータルイオンクロマトグラムを図2-7に示した。さらに、同一サンプルに対してMRMモードで測定を行った際の個々の重水素標識体のMRMクロマトグラムを図2-8に示した。これらの結果から、以後の実験においては全て内部標準物質の回収率が高かったミックスモードでの精製法を採用した。

表 2-8. シロイヌナズナ抽出サンプルを用いた 2 種の精製法の回収率評価

内部標準物質	重水素標識体の回収率 (%)			
	シロイヌナズナ実生サンプル ^a		シロイヌナズナ乾燥種子サンプル ^b	
	シングルモード	ミックスモード	シングルモード	ミックスモード
d ₇ -DHZOG	9 ± 5	73 ± 6 ^{**}	0	62 ± 9
d ₃ -DHZ	45 ± 8	68 ± 5 [*]	0	47 ± 7
d ₃ -DHzR	37 ± 2	80 ± 2 ^{**}	0	64 ± 2
d ₆ -iP	48 ± 15	79 ± 4 [*]	46 ± 5	89 ± 7 ^{**}
d ₆ -iPR	65 ± 8	95 ± 3 [*]	20 ± 6	90 ± 2 ^{**}
d ₂ -GA ₁	38 ± 8	61 ± 11 [*]	0	13 ± 6
d ₅ -IAA	55 ± 6	55 ± 4	0	19 ± 11
d ₆ -ABA	16 ± 5	26 ± 2 [*]	7 ± 6	17 ± 2
d ₂ -GA ₄	5 ± 2	8 ± 1	3 ± 2	12 ± 2 ^{**}

^a 播種後 12 日目のシロイヌナズナ実生サンプル(100 mg FW). ^b 乾燥種子 (10 mg DW). 回収率は 9 種の重水素標識体のみを用いて抽出・精製操作を行った際のキャピラリー LC/MS/MS で検出された各ピークエリアを 100%として実サンプルの値を算出した。平均値 ± 標準偏差 (n=3). *, **はそれぞれ危険率 5%, 1%で有意差があることを示す。

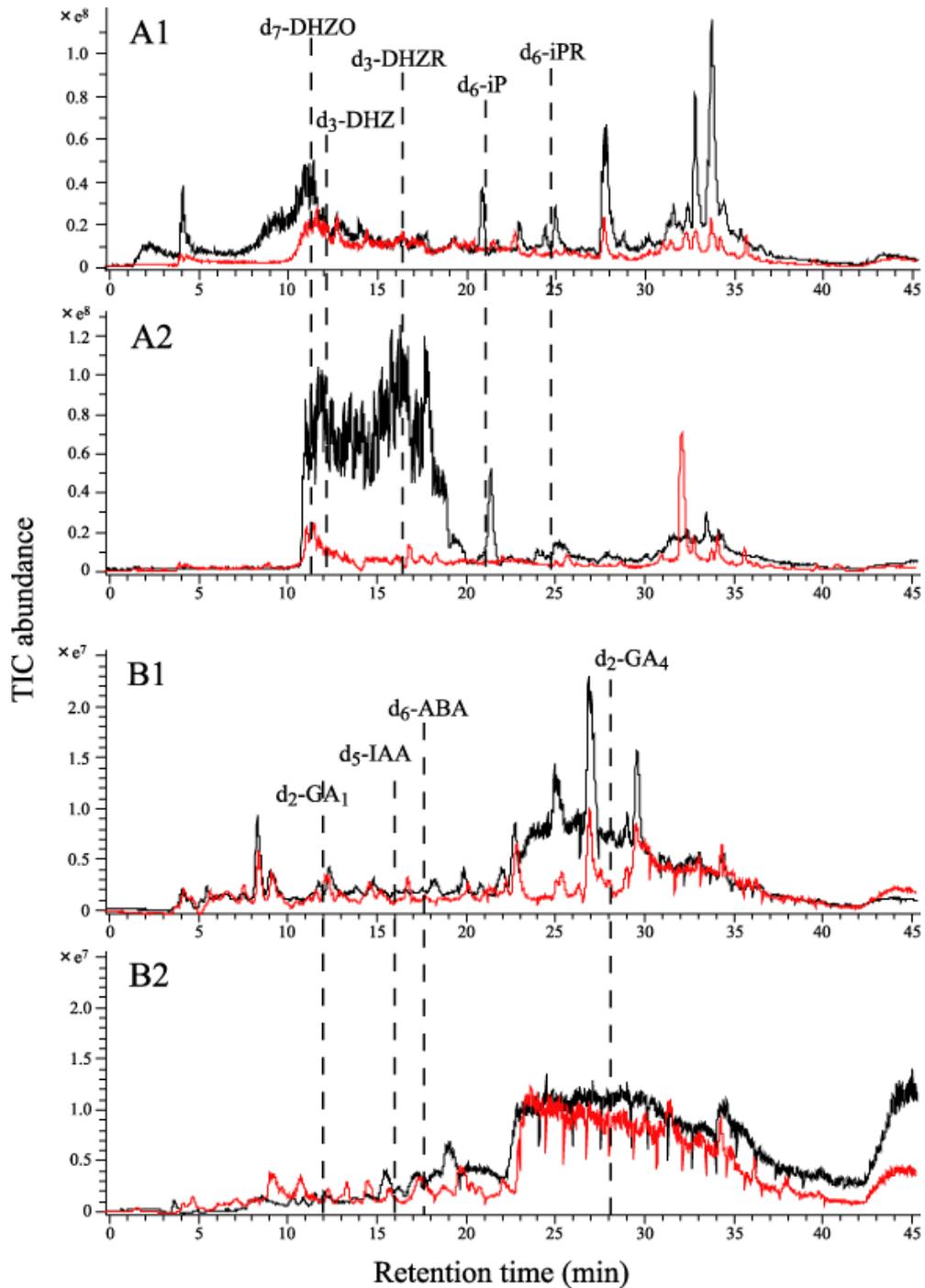


図 2-7. シロイヌナズナ抽出・精製サンプルのフルスキャンモード (m/z 50–500) でのキャピラリーLC/MS トータルイオンクロマトグラム。

(A) 正イオンモードでの測定, (B) 負イオンモードでの分析, (A1, B1) 播種後 12 日目の実生サンプル(100 mg FW), (A2, B2) 乾燥種子 (10 mg DW). 黒線, シングルモード精製法. 赤線, ミックスモード精製法.

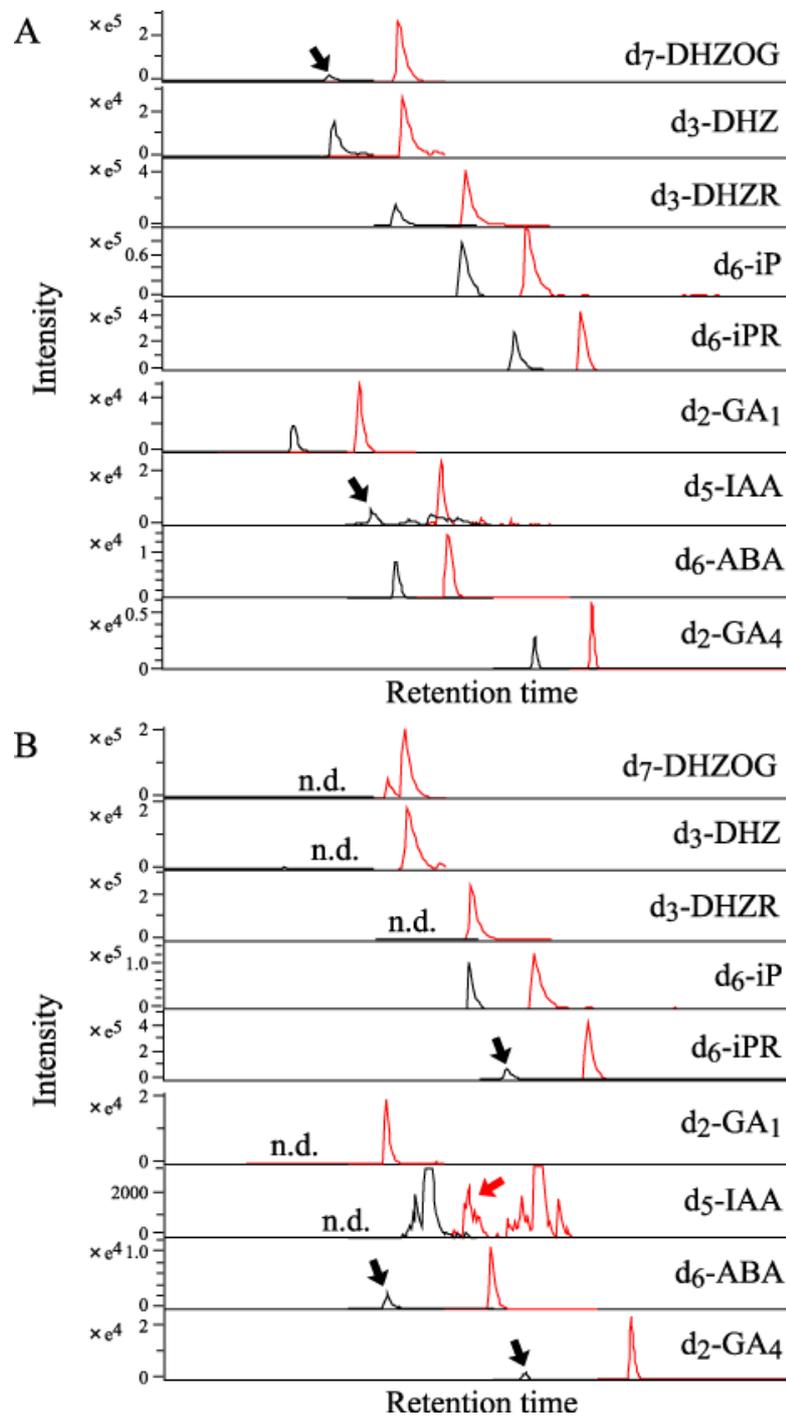


図 2-8. シロイヌナズナ抽出・精製サンプルから検出された重水素標識体のキャピラリー LC/MS/MS クロマトグラム。

(A) 播種後 12 日目の実生サンプル(100 mg FW), (B) 乾燥種子 (10 mg DW). 黒線, シングルモード精製法. 赤線, ミックスモード精製法. シグナル強度の明確な比較を行うために赤線で示した MRM クロマトグラムは水平方向に移動させた. n.d. (not detected), 検出限界以下を示す.

2-3-5. 生体試料への適応

まず始めに、生体試料分析時の MRM 測定法の有用性を検証した。同一のシロイヌナズナ乾燥種子 (10 mg DW) 抽出・精製サンプルをフルスキャンモードと MRM モードでの測定結果の一例を図 2-9 に示した。フルスキャンモードで DHZR のピークは検出されなかったが、MRM モードの測定においては、はっきりとピークが確認された。続いて、分析系の高感度化が実サンプル測定において有用であるのかを検討した。抽出・精製後のシロイヌナズナ乾燥種子 (10 mg DW) サンプル中のサイトカイニン類をキャピラリーおよびナノフロー LC/MS/MS によりそれぞれ分析を行った結果を図 2-10 に示した。その結果、分析系の感度上昇に伴い明らかにピークエリアの増加が確認された。以上の結果から、実用的な植物ホルモン分析において MRM 法の有用性と分析系の高感度化が測定結果に強く依存することを示した。

次に、確立したナノフロー LC/MS/MS 分析系および抽出・精製法を用いてシロイヌナズナとタバコのようなサンプルの定量分析を実施した。植物サンプルのホルモン定量結果を表 2-9 に示した。また、検出されたホルモン類のナノフロー LC/MS/MS クロマトグラム結果の一例を図 2-11 に示した。ZOG, ZR, DHZR, iP, iPR, ABA-GE, IAA, ABA が生体サンプルから定量された。また、播種後 40 日目のシロイヌナズナロゼット葉におけるサイトカイニン類 (ZOG, ZR, iP) の内生量は、これまでの報告 (播種後 55 日目のシロイヌナズナロゼット葉)⁶¹ と類似しており、また報告されたシロイヌナズナ乾燥種子中の内生 ABA の定量結果は、 $(4.1 \pm 1.0) \times 10^2$ pmol/g DW⁵⁷ であり同等の値を示した。したがって、当該分析手法は高い精度と正確さを伴って定量分析が実施可能であった。また、タバコ乾燥種子においては、わずか 17 粒 (1 mg DW) から数種のホルモン類の定量に成功したことから、分析系の高感度化によって出発材料をさらに減らすことが可能であることを示した。さらに、自作したスプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムは、交換せずに一連の分析が終了するまでの 400 回超の耐久性を達成した。

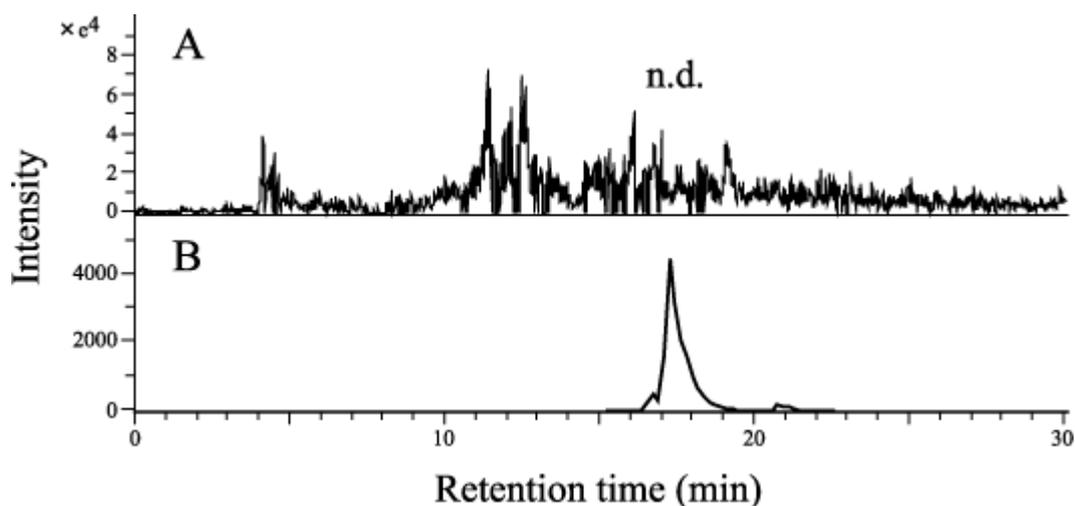


図 2-9. フルスキャンモードと MRM モードでの実サンプル測定における比較.

シロイヌナズナ乾燥種子 (10 mg DW) からの抽出・精製サンプル. (A) フルスキャンモードでの DHZR (m/z 354) のキャピラリー-LC/MS クロマトグラム. (B) MRM モードでの DHZR (354 > 222, m/z 222) のキャピラリー-LC/MS/MS クロマトグラム. n.d., 検出限界以下を示す.

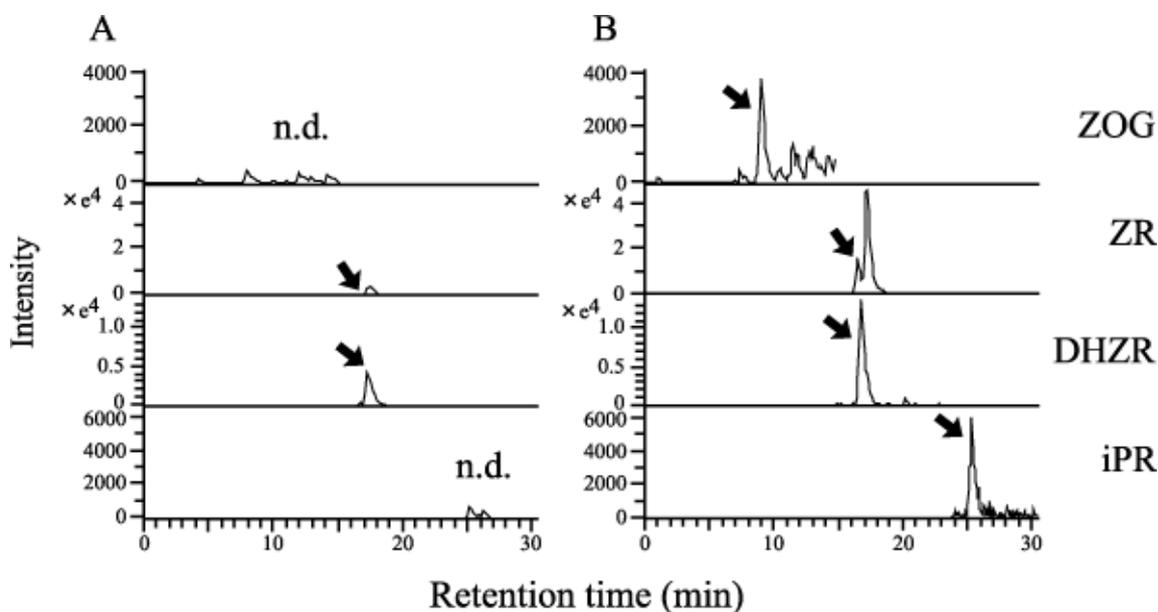


図 2-10. (A) キャピラリー-LC/MS/MS と (B) ナノフロー-LC/MS/MS における実用的感度比較.

シロイヌナズナ乾燥種子 (10 mg DW) からの抽出・精製サンプル. (A) キャピラリー-LC/MS/MS クロマトグラム, (B) ナノフロー-LC/MS/MS クロマトグラム. n.d., 検出限界以下を示す.

表 2-9. ナノフローLC/MS/MS によるモデル植物の網羅的植物ホルモン定量分析結果

化合物	シロイヌナズナ			タバコ		
	乾燥種子 10 mg DW (pmol/g DW)	実生 ^a 100 mg FW (pmol/g FW)	ロゼット葉 ^b 100 mg FW (pmol/g FW)	乾燥種子 10 mg DW (pmol/g DW)	乾燥種子 1 mg DW (pmol/g DW)	葉 ^c 100 mg FW (pmol/g FW)
ZOG	2.3 ± 0.6	6.2 ± 1.1	13 ± 1	3.5 ± 0.5	5.7 ± 1.4	6.2 ± 1.4
Z	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DHZ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ZR	3.5 ± 0.6	26 ± 1	3.1 ± 0.7	0.28 ± 0.07	n.d.	n.d.
DHZR	3.9 ± 0.4	0.66 ± 0.19	0.43 ± 0.05	1.7 ± 0.2	3.1 ± 1.0	1.0 ± 0.2
iP	n.d.	4.5 ± 0.8	1.6 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.
iPR	0.91 ± 0.19	23 ± 2	12 ± 5	0.98 ± 0.13	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.7
ABA-GE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(8.7 ± 1.4) × 10 ²
GA ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GA ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IAA	(2.6 ± 0.4) × 10 ²	25 ± 5	(1.8 ± 0.5) × 10 ²	(2.5 ± 0.3) × 10 ²	(2.0 ± 0.3) × 10 ²	(2.0 ± 0.6) × 10 ²
ABA	(2.9 ± 0.5) × 10 ²	4.8 ± 0.3	38 ± 6	(3.9 ± 0.6) × 10 ²	(4.8 ± 1.0) × 10 ³	(1.5 ± 0.2) × 10 ³
GA ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GA ₇	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a 播種後 12 日目の実生サンプル. ^b 播種後 40 日目のシロイヌナズナロゼット葉サンプル. ^c 播種後 60 日目のタバコ葉サンプル. 平均値 ± 標準偏差 (n=3). n.d., 検出限界以下を示す.

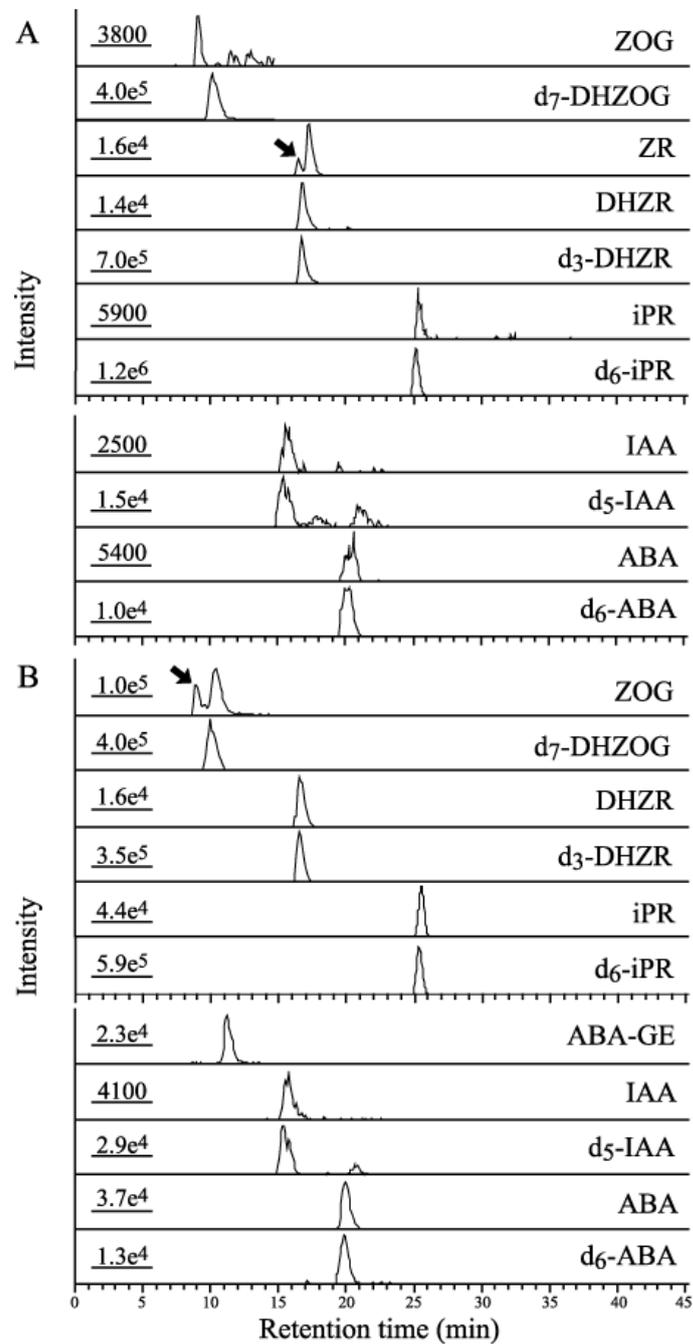


図 2-11. 検出された植物ホルモン類のナノフローLC/MS/MS クロマトグラム.

(A) シロイヌナズナ乾燥種子 (10 mg DW) サンプル. (B) 播種後 60 日目のタバコ葉. 各 MRM クロマトグラム中の下線付きの数字は最も高いピーク強度を示す. 矢印は ZR, ZOG をそれぞれ示す.

2-4. 考察

本章では、ナノフローLCに世界的にユーザー数の多いITMSを接続することによってLC/MS/MS分析系の高感度化を図り、サイトカイニン、アブシシン酸、オーキシシン、ジベレリンの4種の網羅的植物ホルモン定量分析系を構築することを検討した。

高感度かつ安定な分析系を構築するためにスプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムを作製した。当該カラムはスプレイヤーチップ先端まで充填剤が詰まっているため安定なスプレーが可能であり、またカラム分離後のデッドボリュームは2 pL以下であることから、代謝物は分離後直ちにスプレーされることでピークのブロードを抑制できた(図2-3)。

次に、インフュージョン分析の結果に基づき分析対象の植物ホルモン類の最適なMRMトランジションを設定した(表2-5)。しかしながら、Z, GA₁, GA₃, GA₄の化合物においては、MS/MSで選択したプロダクトイオンのシグナル強度は低い結果となった(図2-5)。この理由としては、図2-4 B1, B2に示したように複数のフラグメント化によって特定のプロダクトイオンの生成効率が悪くなったためと考えられた。化合物の構造情報を得るためには、複数のフラグメントが生じた方が情報を多く得ることができ有用となるが、MRMを高感度で行う場合は特定のプロダクトイオンのみが生じることが望ましい。コリジョンエネルギーや不活性ガス圧などを細かく調節できるQqQMSを用いた場合でも⁴⁶、複数のプロダクトイオンの生成を防ぐことはできないため同様の問題は生じていると考えられる。

植物ホルモン類の最適なLC分離の条件とMSでの分析条件を組み合わせることで、内径0.3 mmのカラムを用いたキャピラリーLC/MS/MS、または内径75 μmのスプレイヤーチップ一体型カラムを使用したナノフローLC/MS/MS分析系を構築した。また、負イオンモードでのナノフローLC/MS/MS分析は我々が最初の報告であった。ナノフローLC/MS/MS分析系の検出感度はキャピラリーLC分析系と比べて約10倍向上し、数種の植物ホルモンにおける検出感度はfmol以下を達成した。標準物質による当該分析系の検出感度は、これまで報告されたセミマイクロLCとQqQMSを接続した分析系と同等、

もしくはより高感度であることを示したことから、カラム内径のスケールダウンが検出感度に大いに影響を与えることは明らかであった。しかしながら、表 2-4 に示したキャピラリーLC を基準としたナノフローLC の相対的感度増加率の理論値よりも今回の実測値は低い値となった (理論値, 16 倍; 実測値, 約 10 倍)。この原因はデッドボリュームによるクロマトグラムの性能の低下によるものだと考えられている^{31,35}。本研究で行ったキャピラリーLC/MS/MS とナノフローLC/MS/MS クロマトグラムを比較した場合においても同様に、カラムを小型化することでクロマトグラムの性能は低下しピーク幅が大きくなっていることが観測された (図 2-6)。我々が使用した自作のナノフローLC カラムにおいては、ポストカラムのデッドボリュームによるピークの拡散は最小にできていると考えられる。プレカラムとナノフローLC カラムの間のデッドボリューム、もしくはカラムに充填した担体の空隙率が高くなっていることが理由として考えられる。また、スプレイヤーチップ一体型カラム作製に使用したフェーズドシリカキャピラリー (未修飾) の残存シラノール基が分離に悪影響を及ぼしている可能性も大いに考えられるため、今後検討が必要である。また、Z や GA₄ において満足のいく検出感度を達成することができなかった理由は、前述で説明した選択したプロダクトイオンの生成効率が相対的に低いことが最大の理由であると考えられた。

抽出・精製法の最適化においては、シロイヌナズナの芽生え後の植物体 (100 mg FW) と乾燥種子 (10 mg DW) を用いてシングルモード、もしくはミックスモード精製法を用いて比較検討を行った。その結果、両者のサンプルとも大部分の重水素標識体においてミックスモード精製法の方がシングルモード精製法に比べて回収率は増加した (表 2-8)。図 2-7 の結果から、ミックスモード精製法はシングルモード精製法に比べてマトリックスエフェクト (主にイオン化サプレッション) が軽減されたことにより、各重水素標識体の回収率が増加したと考えられる。ITMS により植物ホルモンのような微量成分を分析するためには、MS 内部でイオンを選択的に分離する MRM 法測定を実施したとしても十分な精製操作が必要であり測定結果に強く影響を与えた (図 2-8)。以上のことから、網羅的に植物ホルモンを観測するためには、シリカベースの逆相担体や Oasis HLB のみ

では不十分であると考えられた。しかしながら、QqQMS を用いた MRM 分析においては、シリカベースの逆相担体の精製のみ⁴⁶、もしくは未精製の抽出物⁵⁰から網羅的にホルモン類を観測できている。今回評価に用いた植物サンプルと生育時期や植物種が異なるために厳密に言及することはできないが、おそらく ITMS よりも QqQMS の方がイオン化以降の MS 内部での特定のイオンの単離性能が優れていると考えられる。つまり、ITMS は一定量のイオンを蓄積して、その後、特定のイオンを単離するため、夾雑物が多くある場合、特定のイオンをロスする可能性が高くなるのに対して、QqQMS は Q1 の時点である特定のイオンのみを通すことで単離を行うため、夾雑物の影響を受けにくいのもかもしれない。一方、アニオン性の植物ホルモンである GA, IAA, ABA においてはミックスモードの精製法を用いても精製が十分であるとはいえなかった (表 2-8)。逆相とアニオン交換の特性を持つ固相担体である Oasis MAX によるさらなる精製を試みたが、重水素標識体の回収率に統計学的に有意な差は見られなかった。この結果は Dobrev らの見解と一致し、植物生体内に数多くのアニオン性代謝産物が存在していると考えられる⁷³。現状では、ハイスループットで網羅的にアニオン性植物ホルモン類を定量するためには、MS 内部での MRM 法による特定イオンの単離性能に頼るしかないと考えられる。

続いて、構築した高感度定量分析系と最適化した前処理法を用いて生体試料の測定を行った。その結果、MRM 測定法の有効性 (図 2-9) と分析系の高感度化の有用性 (図 2-10) を示した。タバコの乾燥種子をサンプルとした場合、わずか 17 粒 (1 mg DW) で測定が可能であったことから、LC/MS/MS 分析系の高感度化によって出発材料を減らすことができることを実証した。また、分析系の高感度化によって、抽出・精製の全ての操作を 2-mL 以下のチューブで行うことが可能となったことからスループットの観点においても非常に有用であるといえる。さらに、安定同位体希釈法を用いることによって、ナノフロー LC/MS/MS においてもきわめて正確な定量分析が可能であることも示された。また、図 2-11 A において ZR (図中矢印) と同じ MRM トランジションで検出されたもうひとつのピークは、逆相カラムに対する溶出順序からも *trans*-ZR の幾何異性体で

ある *cis*-ZR ではないかと考えられる⁶²。同様に、図 2-11 B において示した ZOG (図中矢印) と同じ MRM トランジションで検出されたもうひとつのピークは、*trans*-ZOG の幾何異性体である *cis*-ZOG, もしくは構造異性体である *trans*- or *cis*- zeatin 7- or 9-glucoside のいずれか、もしくはそれらの混合物ではないかと考えられる^{61,62}。

一方、Z, DHZ, GAs は全てのサンプルにおいて検出されなかった。理由の一つは、表 2-7 で示したようにこれらの化合物の検出感度がその他のホルモン類に比べて低いと認められる (GA₇ 除く)。また、Chiwocha らが行った野生型のシロイヌナズナの乾燥種子 (発芽試験 0 時間のサンプル) 中の定量結果によると、Z, GA₁, GA₃, GA₇ は検出されておらず、GA₄ のみが 75 pmol/g FW 検出されている²⁴。Novák らが行ったシロイヌナズナの芽生え 10 日後のサンプルにおいては、検出された Z と DHZ の内生量はそれぞれ 0.61 ± 0.16 , 0.02 ± 0.01 pmol/g FW⁶² と極めて微量であった。このように、検出できなかった植物ホルモン類の内生量が比較的少ないことも要因の一つであると考えられる。さらに、GAs に関しては、表 2-8 で示したように精製が不十分であるために、イオン化サプレッションの影響を強く受けていることも検出を困難にする原因ではないかと考えられる。したがって、これらのホルモン類を容易に検出するためには改良が必要である。抽出、精製法においては、抽出溶媒や固相担体の改良が考えられ、LC 部分においては、HILIC などの逆相モードとは異なる LC 分離法、粒子径が 2 μ m 以下の担体のカラムを使用した UPLC によるクロマト分離能の改善、さらなるカラム内径のダウンサイジングによる高感度化により上記の問題を解決できることが期待される。

本高感度定量分析系は、シロイヌナズナやタバコの遺伝子欠損体や組換え体の少量サンプルに対して適応可能であるために、植物ホルモンネットワーク、ホルモンの作用機構や代謝研究を前進させる有用な分析手法であると考えられる。

第三章 植物ホルモン分析法の生命科学分野への応用

3-1. 緒言

前章において、ナノフローLC/MS/MS 分析系とサンプルの前処理法を最適化することにより、実用サンプルに適応した植物ホルモン類の網羅的高感度定量分析手法を確立した。当該分析法の利点は、これまで検出困難であったサンプルからの網羅的な定性・定量情報を取得できること、出発材料を軽減できることである。したがって、本章では構築した分析法の利点を生かして植物ホルモン類の応用研究を展開することを目的とした。

最初の題材は少量サンプルからの植物ホルモンプロファイリングによる応用研究である。植物は栄養成長期に光エネルギーを利用しソース（栄養）器官である葉で炭素や窒素を同化し糖やアミノ酸を合成する。そして、生殖成長期になるとこれらの同化産物をシンク（生殖）器官である実へに輸送し蓄積・利用する。このソースシンクのバランス制御は植物の成長制御における重要な要素である。また、ソース器官の代謝は、シンク器官からのシグナルによって制御されていると考えられている。この制御機構の解明は、人為的な有用化合物の効率的な蓄積技術の開発に繋がると考えらる。

五十嵐大亮（味の素，ライフサイエンス研究所）は、窒素化合物の代謝制御に着目し、シロイヌナズナのモデル実験系を構築してシンクソースバランス制御に関わる因子の同定を目指した。ソースシンクバランスの一過的な改変手法としてシロイヌナズナ結実後（播種後5週間）に抽台茎の切除、つまりこの操作によりシンク器官からのシグナルを遮断する（図3-1）。また本操作法を以後 EOL (Excision of organs above the rosette leaves) 処理と呼ぶ。EOL 処理24時間後、ソース器官であるロゼット葉での代謝物（アミノ酸）、遺伝子発現の変化を解析しその影響を調べた。また、その際に実施した DNA マイクロアレイ解析の結果によると、多くの遺伝子発現量は EOL 処理により変化しなかった。しかしながら、窒素代謝に重要なアミノ酸（アスパラギン，アスパラギン酸，グルタミン，グルタミン酸）の蓄積量とグルタミン酸合成/分解酵素をコードする遺伝子 *GDH3*

の発現量が増加していることを確認した。アミノ酸が増加した理由としては、ソース器官の何らかのシグナルが葉でのアミノ酸代謝を制御しているため、またはシンク器官へのアミノ酸の輸送が遮断された影響、の2つが考えられた。また、ソース活性の指標となる Rubisco small subunit, *RBCS-1B* 遺伝子の発現量も増加したことから、シンク器官の存在は、ソース器官での遺伝子発現制御に影響を与えていることが示唆された。一方、植物ホルモンの中で、サイトカイニン葉におけるクロロフィルの合成や葉の老化に関係性があると考えられている⁷⁴。また、窒素代謝も制御していると考えられているが、詳細な関係性は不明である⁷⁵。EOL 処理により処理後2時間においてサイトカイニン合成のキー酵素であるイソペンテニルトランスフェラーゼ⁷⁶をコードする遺伝子、*AtIPT3* の発現量が3倍増加することを見出した(その他のアイソザイム、*AtIPT1-2, 4-9* 遺伝子の発現量は変化しない)。

したがって、以上の遺伝子解析の結果から、サイトカイニンがソースシンクバランスの窒素代謝に関わる一部のアミノ酸を制御していることが示唆されたため、本研究ではサイトカイニンの内生量を定量することで仮説を立証することを目的とした。また、EOL 処理により *AtIPT3* 遺伝子の発現量はロゼッタ葉の主脈において高発現していることから、主脈部分とその他の部分に分けてサンプリングを行いロゼット葉の部位特異的な定量分析を実施することとした。分析対象としたサイトカイニン類を図3-2に示した。

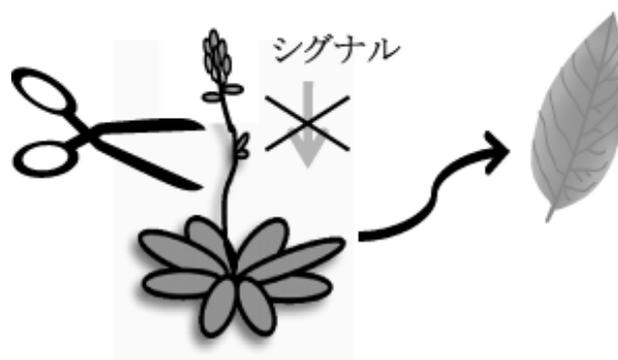


図 3-1. ソースシンクバランスの一過的な改変手法 (EOL 処理) 模式図。

シロイヌナズナ結実後(播種後5週間, ステージ2)に抽台茎の切除によりシンク器官からソース器官であるロゼット葉へのシグナルを遮断。

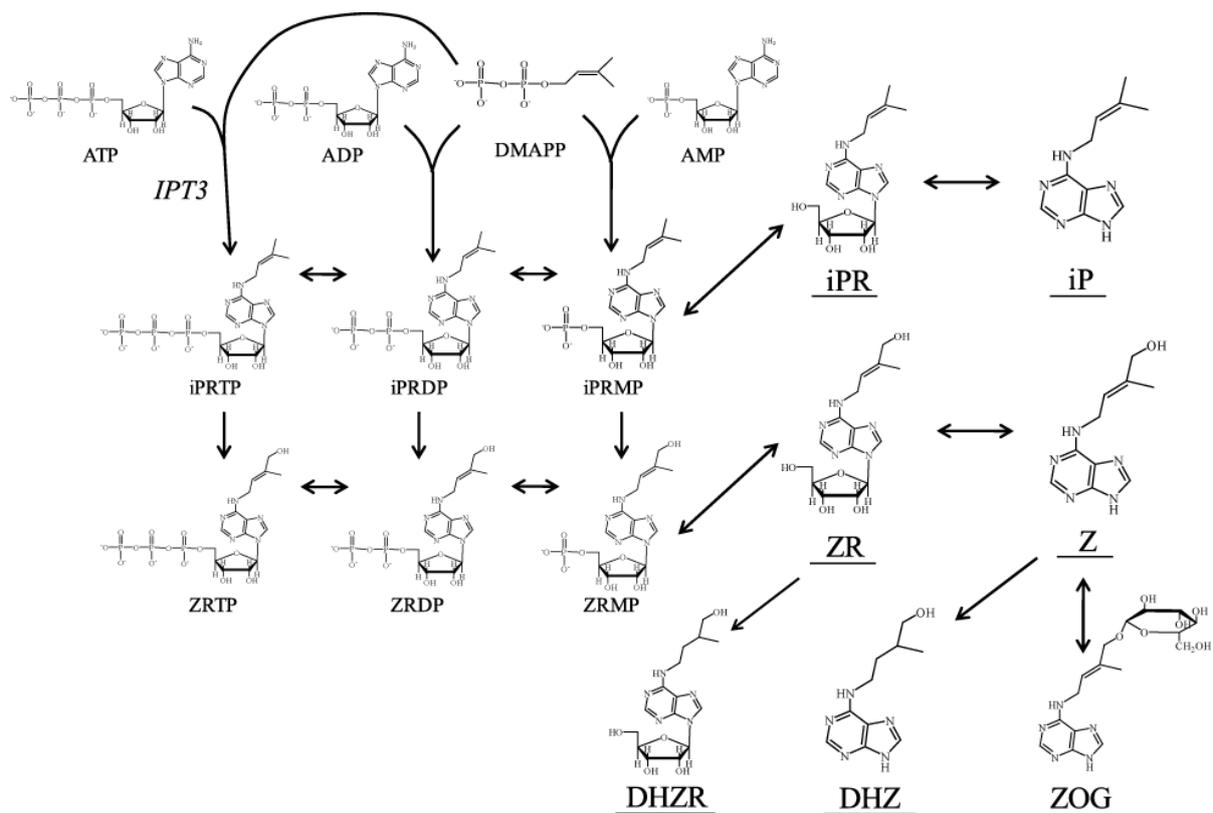


図 3-2. サイトカイニン代謝マップ.

IPT3, イソペンテニルトランスフェラーゼ3遺伝子. 下線付きのサイトカイニンが分析の対象.

次の題材は遺伝子組換え体の網羅的植物ホルモンプロファイリングである. 植物による有用物質生産やバイオマス資源としての植物を有効活用するためには人為的な代謝改変戦略が重要となる. ところが, 当初の目論見どおりに都合よく代謝が改変されることはむしろ稀であり, 全体の代謝バランスは大幅に崩れ目的を達成できないことが頻繁に起こることが経験的に知られている. 一方, 植物ホルモン類は代謝上でクロストークを行うことで全体の生理機能や代謝制御を行っている重要な代謝物であるため, そのネットワークを解明することが人為的な代謝制御の成功に繋がると考えられる. また, 植物ホルモンネットワークはより複雑であるために, 野生株 (WT) を用いた実験系だけで解明していくことは困難である. 一方, 遺伝子組換え体や欠損体のリソースの利用はこの問題を解決するための有効な手段の一つと想定される. しかしながら, 遺伝子組換

え体の網羅的植物ホルモンプロファイリングの知見は皆無といっても過言ではない。網羅的植物ホルモンプロファイリングを行ったとしても、有用な知見を得られるのかどうかは定かではない。そこで、2つ目の課題として、遺伝子操作を行った際に、代謝上で実際にホルモン類のクロストークが起こるのかを検証することとした。

本研究ではタバコ遺伝子組換え体 ZW-2 (*Brevundimonas* sp.由来の β -carotene ketolase, CrtW ならびに β -carotene hydroxylase, CrtZ 遺伝子の葉緑体形質転換) を実験材料として使用した。本遺伝子組換え体は葉においてアスタキサンチンを高蓄積させるのに成功したカロテノイド代謝改変体である⁷⁷。一方、カロテノイド代謝系の下流には、植物ホルモンの一つである ABA が存在するため、WT と ZW-2 の葉における内生ホルモン量を定量し、カロテノイド代謝改変時の ABA を中心としたホルモンネットワークの知見を得ることとした。

3-2. 実験方法

3-2-1. 実験材料

播種後35日目のシロイヌナズナ (ecotype, Columbia) の抽台茎を切除した (EOL処理)。EOL処理5時間後にロゼット葉をサンプリングし、主脈部分とその他の部分をそれぞれ100 mg FWずつ取り分けた。コントロールサンプルは、EOL処理無しのものとした。タバコWT (cv. Xanthi) とカロテノイド遺伝子組換え体ZW-2は播種後60日目の植物体から葉をそれぞれ100 mg FW回収した。回収した全てのサンプルは直ちに液体窒素で凍結させ、サンプルの抽出時まで -80°C で保存した。生育条件は2-2-2.と同じ。

3-3. 結果

3-3-1. サイトカイニンシグナルによるソースシンクバランス制御の解析

EOL処理の有無によるロゼット葉のサイトカイニンプロファイリング結果を図3-3に

示した。EOL 処理に伴い、主脈とそれ以外の葉身の両部位とも ZR, iP, iPR の内生量増加が確認された (図 3-4 A1, B1)。図 3-4 A2, B2 に示したトータルのサイトカイニン量の比較解析においても統計学的に有意な差が認められた。また、ZOG は主脈部分よりもそれ以外の葉身部分において約 3 倍内生量が多いことが観測された。

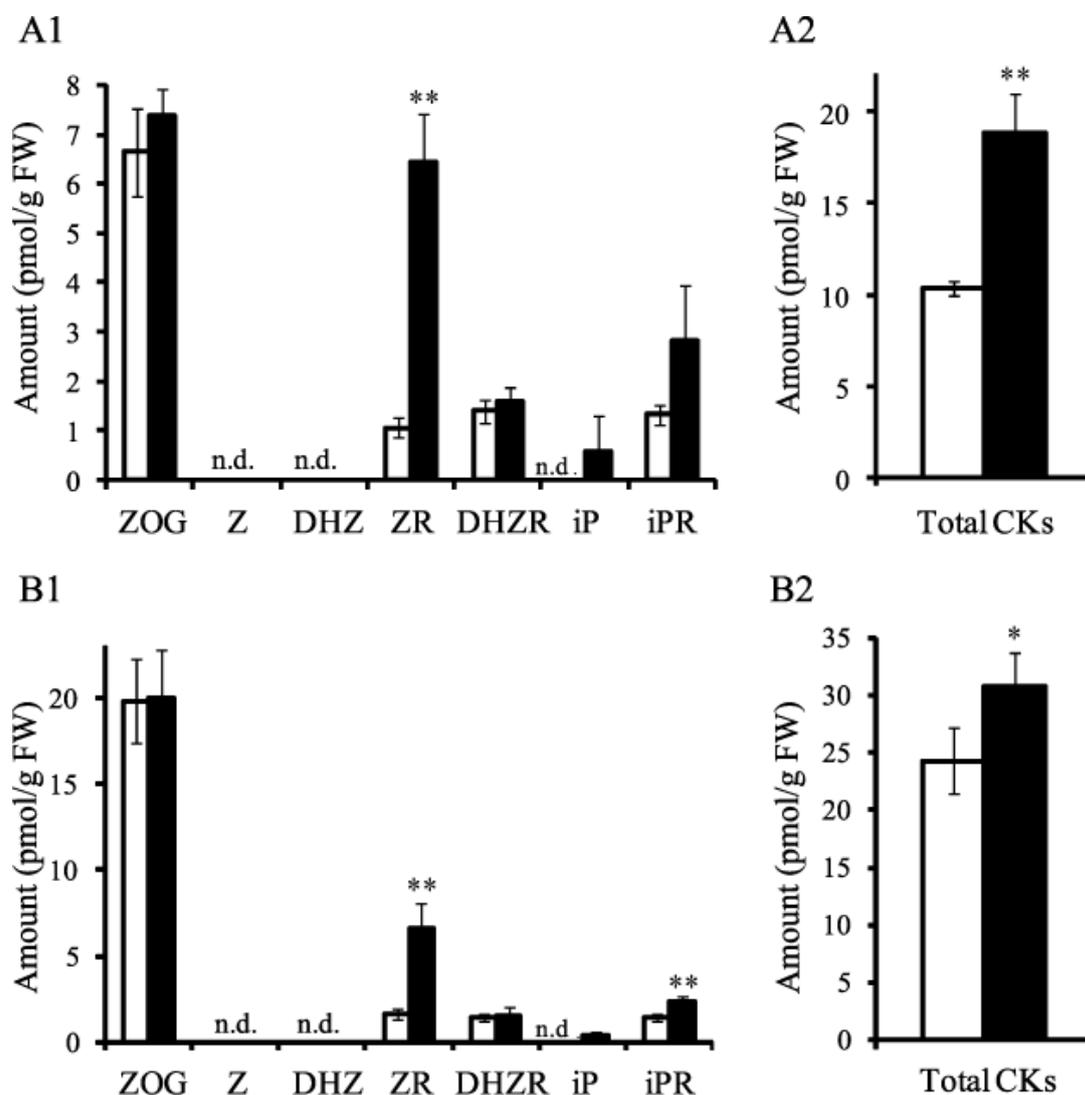


図 3-3. EOL 処理の有無によるロゼット葉のサイトカイニンプロファイリング。

白色のバー, EOL 処理無し (コントロール). 黒色のバー, EOL 処理. (A) 葉の主脈サンプル, (B) 主脈を除いた残りの部分. (A1, B1) 各々のサイトカイニン内生量, (A2, B2) トータルのサイトカイニン蓄積量. 平均値 ± 標準偏差 (n=4). *, **はそれぞれ危険率 5%, 1%で有意差があることを示す. n.d., 検出限界以下を示す.

3-3-2. タバコ遺伝子組換え体の網羅的植物ホルモンプロファイリング

タバコ WT と ZW-2 の葉における網羅的植物ホルモンプロファイリング結果を図 3-4 に示した. ZW-2 は ABA-GE, ABA の内性量は WT に比べ減少していた (図 3-4 B). 一方, サイトカイニン (図 3-4 A) と活性型のジベレリン GA₄ (図 3-4 C) は WT に比べ増加した.

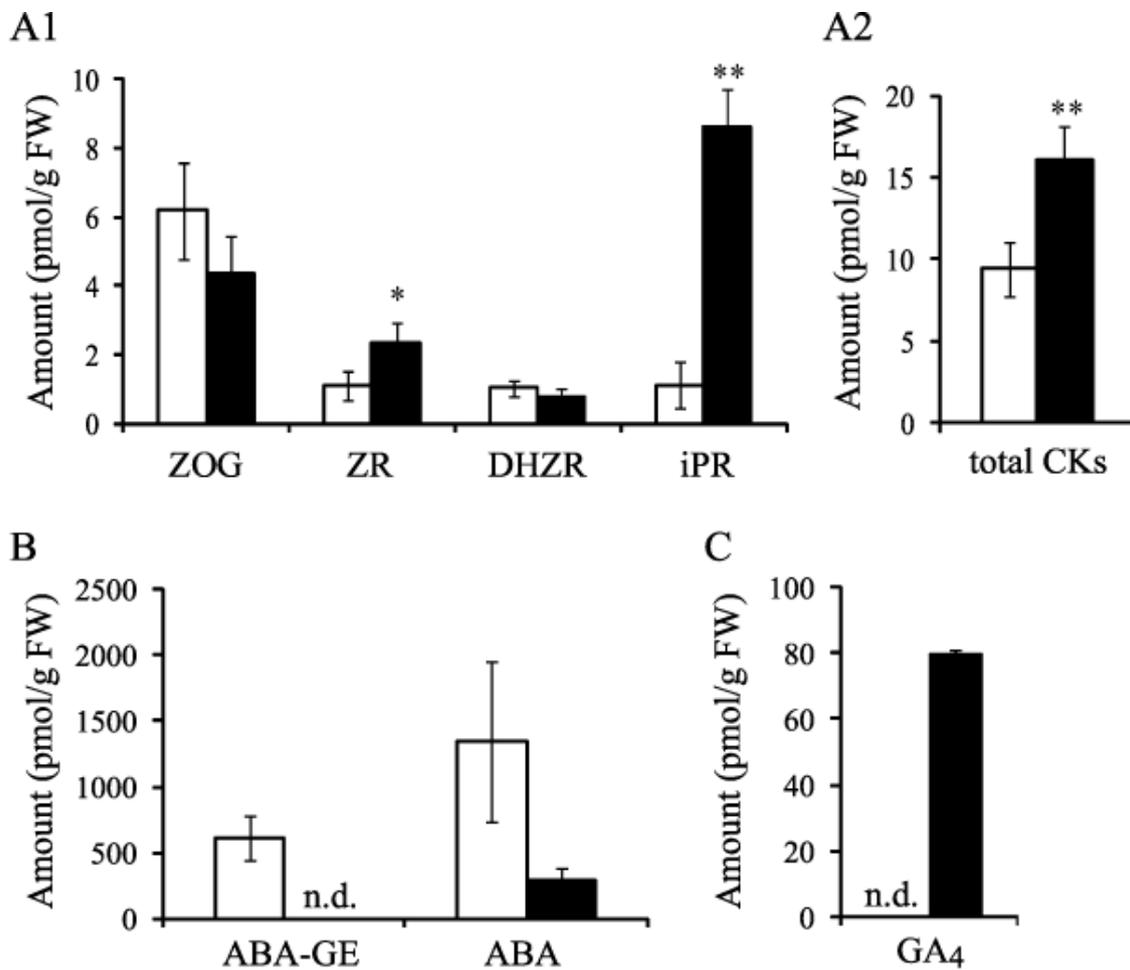


図 3-4. タバコ WT と ZW-2 の葉における網羅的植物ホルモンプロファイリング.

白色のバー, WT. 黒色のバー, ZW-2. (A1) サイトカイニン, (A2) トータルサイトカイニン, (B) アブシシン酸, (C) ジベレリン. 平均値 ± 標準偏差 (n=4). *, **はそれぞれ危険率 5%, 1%で有意差があることを示す. n.d., 検出限界以下を示す.

3-4. 考察

本章では、第二章で構築した分析手法を用いて植物ホルモンプロファイリングの応用研究を行った。

まず、窒素代謝のシンクソースバランス制御に関して、サイトカイニンの関与を検証した。EOL 処理に伴い、主脈とそれ以外の葉身の両サンプルとも ZR, iP, iPR の内生量増加が確認された (図 3-4)。また、ZOG は貯蔵型サイトカイニンとしての役割があると考えられている⁷⁸。貯蔵型 ZOG が再び活性型になるためには β -グルコシダーゼにより糖が除かれると考えられているがその機構は明らかではない。今回の実験では、ZOG の内生量には変化はないため貯蔵型のサイトカイニンが使用されたのではなく、*de novo* 合成された結果であると考えられる。よって、サイトカイニン類の高感度プロファイリングにより五十嵐が確認した *AtIPT3* 遺伝子の著しい発現量の増加 (発表論文 2 参照) はサイトカイニン合成を意味していたといえる。また、主脈とそれ以外の葉身部分でのプロファイリング結果の傾向は類似していた。*AtIPT3* 遺伝子は主脈で高発現していたことから、遺伝子の発現部位と生合成の場が異なる、もしくは主脈で生合成された後に葉全体に輸送されたのではないかと考えられる。また、ZOG は主脈部分よりもそれ以外の葉身部分において約 3 倍内生量が多かった。本結果は葉の部位によってホルモン類の分布に偏りがあることを示唆するものである。このことから、今後、植物ホルモン類の生産部位や蓄積部位とその移動に関する知見を明らかにしていくことで植物ホルモン研究は大きく発展すると考えられる。サイトカイニンの内生量に差が見られたことを手がかりに、最終的にサイトカイニン合成酵素遺伝子破壊株 (*atipt3-2*) およびサイトカイニン受容体遺伝子破壊株 (*ahk3-3*) を用いた解析を行った。その結果、両破壊株は EOL 処理を伴っても *GDH3* 遺伝子の発現量変化に差がなくなった。したがって、一連の実験を通して一過的な改変処理後の葉で窒素代謝に関わるアミノ酸や遺伝子発現変化の一部がサイトカイニンによって制御されていることを証明した。

一方、アスタキサンチン増産タバコ ZW-2 と WT の葉におけるホルモンプロファイリングを行った結果、著しい内生量の変化を観測した (図 3-4)。ABA 量の減少は上流のア

スタキサンチンなどのカロテノイドが高蓄積していることから合理的に説明できる。しかしながら、サイトカイニンとジベレリン量の増加は予想外の結果であった。植物ホルモン類の内生量が変動する際には、何らかの生理学的意義があると考えられるため、この結果は代謝上でのクロストークが起こっていることを示唆するものと考えられる。すなわち、植物が人為的な代謝改変時においてもホルモンを中心とした精巧な代謝制御機構が働けば恒常性を維持できることを示した一例であると考えられる。現在のところ、ホルモン類のクロストークを示す知見はあまりにも少なく²⁴⁻²⁶、今回の結果からだけでは代謝改変戦略への有用な知見を提示することはできない。しかしながら、人為的な一部の代謝改変により植物ホルモンネットワークが変化することは明らかであった。今後、遺伝子組換え体や欠損体のリソースを用いて、植物ホルモン類の網羅的プロファイリング情報が蓄積していけば、様々なクロストークの生理的機能や代謝調節を理解することにつながると考えられる。そして将来的には、網羅的ホルモンプロファイリングがより合理的な代謝改変戦略の有用な情報源として使用されることが期待される。

第四章 高空間分解能を有したファイトアレキシン定量分析への応用

4-1. 緒言

第一章で述べたように、従来の部位特異的代謝解析は技術的限界から器官毎の分析が主であり、構成する細胞の応答をその「平均」として観測してきた。分析系の高感度化が達成できれば高い空間分解能を伴って代謝情報を正確に取得することが可能となる。

植物シングルセル代謝解析の用途としては、病原微生物の接触による防御応答反応の解析が考えられる。植物は移動することができないため、動物のような免疫系による生体防御機構を持たない代わりに独自の様々な防御応答反応によって植物病原菌の感染とそれに続く植物全体の枯死から身を守っている。その中の一つの典型的な抵抗性反応として、病原菌の感染に際しファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性二次代謝産物を *de novo* 合成することが知られており、これまで多くの植物から特有の化合物が同定されてきた⁷⁹。また、イネ科植物のエンバク (*Avena sativa*) においては多糖性エリシター刺激に反応してアベナンスラミドと呼ばれるファイトアレキシンを生合成することが知られている⁸⁰。これまでアベナンスラミド生合成の研究は生化学的アプローチから多くなされてきた⁸¹⁻⁸⁵。しかしながら、これらのファイトアレキシンは、病原微生物が接触した組織や細胞周辺で生合成されていることが想定されているが、実際にどの組織、またはどの細胞でどのように生合成が行われているかの詳細は未だ不明である。また、ファイトアレキシン生合成とその他の防御応答反応である活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) の生産や細胞死 (programmed cell death, PCD) のような一連の過敏感反応 (hypersensitive response, HR) とのメカニズムの関連性を示唆する報告はごくわずかである^{86,87}。このような不明瞭な点を解決できない理由の一つとして、高等植物が異なる器官や組織、あるいは細胞タイプから構成されているのに対して、従来の解析手法が根や葉や茎といった器官毎の分析が主であり時間および空間で平均したグロスの結果しか得ることができなかったためであると考えられる。

一方、近年の科学技術の発展に伴い、組織または細胞レベルで空間分解能の高い発現解析手法は精力的に開発されている^{27,88}。酵素活性染色⁸⁹や酵素組織化学⁹⁰、RNA ハイブリダイゼーション^{91,92}のような *in situ* 法は酵素やタンパク質、mRNA の組織内局在を検出する手法である。しかしながら、タンパク質や RNA といった高分子ではなく、特定の二次代謝物といったような低分子を複数の類縁体の存在する中で選択的に検出することのできる *in situ* 分析用のプローブを開発することは容易ではない。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (laser-capture microdissection, LCM) 法やレーザーマイクロダイセクション (laser microdissection, LMD) 法は均一な細胞集団を顕微鏡下で大量に取得し、組織特異的な遺伝子の発現を調べることができる⁹³⁻⁹⁵。また、LMD 法を用いて、ディラトリス・ピランシー (*Dilatris pillansii*) の分泌腔 (secretory cavity) やオウシュウトウヒ (*Picea abies*) の石細胞 (stone cells) など形態学的に特殊な組織を大量に回収し、極低温核磁気共鳴分光法 (cryogenic proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H NMR) により解析することで二次代謝産物が組織特異的に蓄積している例が報告されている^{96,97}。また、現在顕微鏡とマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を組み合わせた質量顕微鏡法が実用化されており動物癌組織の特異的なバイオマーカー探索に精力的に使用されている⁹⁸。本方法では、組織化学的な知見と代謝物やタンパク質などの空間分布の情報が直接得られ、NMR よりも高感度かつスループットが高いことが有利な点であるが、イオン化サプレッションの影響を大いに受けるため定量性が問題となる。植物においてはオオツツラフジ (*Sinomenium acutum*) の茎組織におけるアルカロイドの空間分布を半定量的に分析した例が報告されている⁹⁹。以上の LMD-¹H NMR 法と質量顕微鏡法は、低分子代謝産物の組織レベルでの空間分布を測定する分析ツールとしては強力であるが、サンプルとして組織切片を使用する必要がある。組織包埋は酵素活性に影響し、生細胞サンプリングと比べて、生体反応に関する情報を精確に得られない可能性があると考えられている¹⁰⁰。また、プロトプラストは生細胞であることには間違いがないが、セルラーゼによって細胞壁を分解することで空間情報を失うだけでなく組織包埋と同様に遺伝子やタンパク質発現が大きく変化すると考

えられている^{101, 102}.

病原微生物やエリシターのような外部刺激に対する生理応答の場合、分析対象の時間変化や消長のタイミングを把握できなければ、その機能を真に理解することは難しい。したがって、分析手段の空間分解能を上げるだけでなく、インタクトな生細胞を適応し、分子の時間的な動態を解析することが必要となる。連続的な一細胞の応答を観察するには内在性の分子を何らかの手段で分光的に追跡する必要がある。以前、我々はラインスキャンレーザー顕微分光解析によりエリシター処理を行ったエンバクの葉肉組織の生細胞においてアベナンスラミドの自家蛍光を検出することを試みた¹⁰³。しかしながら、蛍光スペクトルの情報のみではアベナンスラミドを完全に同定することには至っておらず、蛍光検出法よりも分子の選択性の高い検出法が必要であった。

そこで本章では、生細胞のエリシター応答に関する物質変化を高い空間・時間分解能を伴ってファイトアレキシンの定量分析を実施することを目的とした。生細胞サンプリングは梶山らが以前に構築した手法¹⁰⁴を使用し、取得した細胞内容物中のアベナンスラミド A, B の定量測定は、第二章で構築した高感度ナノフローLC/MS/MS 法により実施することとした。また、高感度ナノフローLC/MS/MS によるファイトアレキシンの定量情報を基に、ラインスキャンレーザー顕微分光法や蛍光プローブ観察を組み合わせることで生体内でのアベナンスラミド生合成過程を多面的な視点で考察することとした。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

アベナンスラミド A (*N*-(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxyanthranilic acid, avenanthramide A), アベナンスラミド B (*N*-(3-methoxy-4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxyanthranilic acid), 内部標準物質となる ¹³C₂ アベナンスラミド A, B ([8',9'-¹³C₂]Avenanthramides A, B) は石原亨 (京都大学大学院, 現・鳥取大学) が合成したものを譲渡して頂いた。ペンタ-*N*-アセチルキトペンタオースは生化学工業 (東京) から、*N*-アセチル-D-グルコサミン

はナカライテスクから購入した。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 (NAD⁺) はオリエンタル酵母 (東京) から購入した。5-(6)-クロロメチル-2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (CM-H₂DCFDA) はMolecular Probes (Eugene, OR, USA) から, ヨウ化プロピヂウム (PI) は和光純薬から購入した。ギ酸は和光純薬のHPLCグレードのものを使用した。

4-2-2. 実験材料

エンバク (*Avena sativa*) の発芽を促進させるために種子を24時間, 4°Cで吸水させた。その後, グロースチャンバーにて20°C, 24時間明期 (光合成光量子束密度, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 条件で栽培した。播種後7日目の第1葉を採取し, その後, 直径1 cmのエンバク葉切片をサンプルとした。エリシター処理は以前の報告⁸⁰と同様に, 表皮組織を剥がし, 露出した葉肉組織を1 mmol/Lのペンタ-*N*-アセチルキトペンタオース水溶液に浸すことで行った。コントロールサンプルとして純水, または1 mmol/Lの*N*-アセチル-*D*-グルコサミン水溶液を用いて同様の処理を行った。処理後0–48時間のものを分析サンプルとした。

4-2-3. キャピラリーLC/MS/MS 分析条件

サンプルを保持・濃縮させるためのプレカラムとして 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$, 粒子径 5 μm , Inertsil ODS-3 C18 カラム (Dionex) を用いた。ローディングポンプの移動相には 0.1%のギ酸水溶液を用いて, 流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。分析系へのサンプル注入量は 5 μL に固定した。サンプルは 5 分間プレカラムに保持・濃縮され, その後, バルブを操作することで流路を切り替え, サンプルをキャピラリーLC カラムに送液した。分離のためのキャピラリーLC カラムは 300 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, 粒子径 3 μm , Inertsil ODS-3 C18 カラム (GL Sciences) を使用した。移動相の溶媒組成は水/アセトニトリル/ギ酸 (95/5/0.1, 体積比), (A 液), アセトニトリル/水/ギ酸 (95/5/0.1, 体積比), (B 液) とした。流速は CAP-200

スプリッター (Dionex) を用いて 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した。グラジエント条件は、B 液 30–90% (15 分間), 90% (5 分間), 3 分後初期状態に戻し 7 分間カラムの平衡化を行った。LC 分離時間の合計は 30 分であった。MRM モードでのキャピラリー LC/MS/MS 分析は、負イオンモードにて実施した。MRM モードでの最適化した MS/MS パラメータは次のように設定した。ターゲットマスは m/z 300, 走査範囲は m/z 50–800, 走査速度は 13,000 u s^{-1} , ネブライザーガス圧力は 9.0 psi, ドライガス流量は 4.0 L/min, ドライガス温度は 250°C, キャピラリー電圧は 2.8 kV, サンプル安定度は 100%, トラップ駆動レベルは 50%, ターゲットイオン数は 10,000, 最大イオン蓄積時間を 100 ms に設定し積算回数は 7, MRM トランジションにおけるフラグメント振幅電圧は 1.0 V に設定した。アベナンスラミド A, B の定量を行うための検量線作成は、以下の濃度に示した混合標準品溶液を使用して行った。0, 2.5, 12.5, 25.0, 125, 250, 1,250 nmol/L (全ての水溶液は 125 nmol/L の $^{13}\text{C}_2$ アベナンスラミド A, B を含む)。検量線作成における分析は各濃度で 3 回ずつ行い、非標識体と重水素標識体との MRM クラマトグラムピークエリアの比率から作成した。

4-2-4. ナノフロー LC/MS/MS 分析条件

ナノフロー LC は、2-2-4.の方法に従いスプレイヤーチップ一体型ナノフローカラム (75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, Nucleodur C18 Gravity, 粒子径 3 μm , ポアサイズ 120-Å, ケムコ, 大阪) を作製し使用した。流速は CAP-75 スプリッター (Dionex) を用いて 350 nL/min に設定した。分析系へのサンプル注入量は 10 μL に固定した。その他の LC 条件は、4-2-3.でのキャピラリー LC 分析時と同じ条件で行った。最適化した MS/MS パラメータは次のように設定した。ターゲットマスは m/z 300, 走査範囲は m/z 50–800, 走査速度は 13,000 u s^{-1} , ドライガス流量は 3.0 L/min, ドライガス温度は 150°C, キャピラリー電圧は 1.5 kV, サンプル安定度は 100%, トラップ駆動レベルは 50%, ターゲットイオン数は 10,000, 最大イオン蓄積時間を 100 ms に設定し積算回数は 4, MRM トランジションにおけるフラグメント振幅電圧は 1.0 V に設定した。アベナンスラミド A, B の定量を行うための検

量線作成は、以下の濃度に示した混合標準品溶液を使用して行った。0, 0.5, 1, 2, 10, 30 nmol/L (全ての水溶液は 10 nmol/L の $^{13}\text{C}_2$ アベナンスラミド A, B を含む)。検量線作成は 4-2-3. で示した同様の方法で行った。

4-2-5. エンバク葉切片サンプルの調製法

エリシター処理, もしくはコントロール処理を施した直径1 cmのエンバク葉切片を2枚ずつ (約12.4 mg FW) 経時的にサンプリングを行い, その後, 直ちに液体窒素で凍結させ, サンプルの抽出時まで -80°C で保存した。2-mLチューブ内で -80°C で保存していた植物試料に対して, ジルコニア製ボール1個を加え, 20 Hzで1分間ボールミル (Retsch) により破砕した。次に, 1 mLの70%メタノールにて抽出した。その後, サーモミキサー (Eppendorf) を用いて 37°C , 1,200 rpmで30分間攪拌した。抽出物を16,000gで3分間遠心分離した後, 新しい2 mLチューブに上清900 μL を移した。上清回収後のサンプルの入ったチューブに再度抽出溶媒800 μL を加え, 前述と同一の条件で攪拌, 遠心分離後, 上清800 μL を回収し1回目の抽出液と混合した。サンプル抽出液は遠心濃縮機 (タイテック) を使用して溶媒を除去した後に1 mLの10%メタノール水溶液で再溶解させた。再溶解させたサンプルはあらかじめ1.5 mLのメタノールで活性化し1.5 mLの純水で平衡化させた30 mg Oasis HLBカートリッジ (Waters) に導入した。アベナンスラミドA, Bは1 mLのアセトニトリル/水/ギ酸 (70/30/0.1, 体積比) 溶液で溶出させ回収した。溶出液は遠心濃縮機で乾燥させた後に, 100 μL の0.1%ギ酸水溶液 (125 nmol/Lの $^{13}\text{C}_2$ アベナンスラミド A, Bを含む) で再調製し, 0.45 μm フィルター (GL Sciences) に通したものをキャピラリー-LC/MS/MS分析系に供した。

4-2-6. 高空間分解能での生細胞サンプリング法

レーザーシングルセルサンプリングは以前に報告した手法¹⁰⁴を一部改良して行った。本サンプリング装置はV2Aミラーセット (励起波長, 380–420 nm; 蛍光波長, 450–nm, ニコン, 東京) と長作動距離対物レンズ (Model CFI Plan EPI SLWD 10, 20, 50 \times , ニコ

ン), カラーCCD カメラ (HV-D28S, 日立国際電気, 東京), マイクロマニピレーター (Model 5171, Eppendorf) を伴った蛍光顕微鏡 (Model Eclips ME600, ニコン) と ArF エキシマーレーザー (波長, 193 nm ; パルス幅, 10 ns) から構成されている. レーザー光は収束レンズで集光させ紫外線を高効率で透過する中空ファイバー¹⁰⁵ (外径, 680 μm ; 外径, 500 μm , 綜研化学, 東京) を介して最終的にマニピレーター先端にセットした先端径 1 μm の石英チップから標的葉肉細胞に照射した. 使用した石英チップは石英ガラスキャピラリー (Q120-90-10, Sutter Instrument) をキャピラリープラー (Sutter Instrument) で微細加工することで作製した. レーザーのパルス照射 (30 nJ/shot) により細胞壁が取り除かれ, 照射と同時に細胞内容物はテーパー状に加工した石英チップの中に吸引された. サンプルングした細胞内容物は CCD カメラ (DP70, オリンパス, 東京) を伴った顕微鏡下 (BX50, オリンパス) で画像を取得して内容量を算出した. その後, 直ちに細胞内容物が入った石英チップの後方から 10 μL の 0.1%ギ酸水溶液 (10 nmol/L の $^{13}\text{C}_2$ アベナンスラミド A, B を含む) を添加し, 続いてフェムトジェットマイクロインジェクター (Eppendorf) を用いて石英チップ内に陽圧をかけることで石英チップ先端からシングルセルサンプルを 0.2 mL PCR チューブに回収した. サンプルはナノフローLC/MS/MS 分析系にて分析を行った. サンプルングから分析までの一連の流れを図 4-1 に示す.

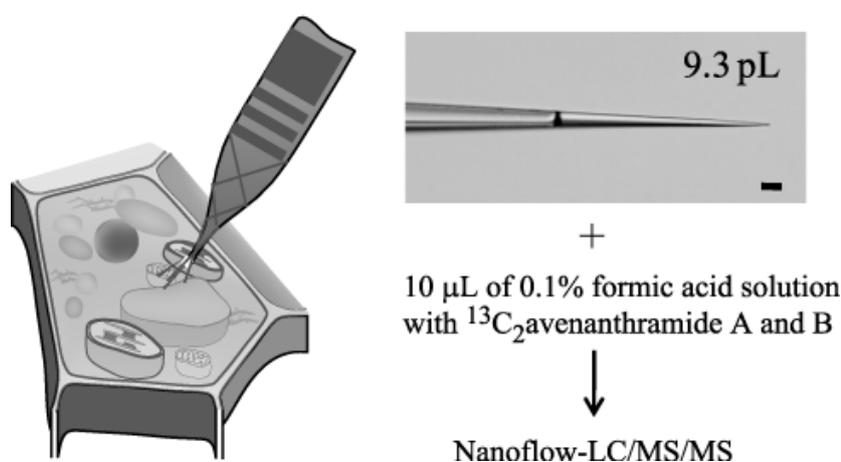


図 4-1. 高空間分解能での生細胞サンプルングから細胞内容物の分析までの手順.
スケールバー, 20 μm .

4-2-7. ラインスキャンレーザー顕微分光解析条件

生体試料のラインスキャンレーザー顕微分光解析は以前の研究で構築した方法¹⁰³を使用した。簡潔に測定条件を記載する。本装置はチタンサファイアレーザー (RegA9000, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) により波長 780 nm, 振動数 200 kHz で発振させた光を BBO (β -BaB₂O₄) 結晶に通過させることで発生した波長 390 nm, パルス幅 150 fs の第 2 高調波を励起光源とした。高速スキャンを実現するためにシリンドリカルレンズにより y 方向にライン上に集光した。集光した光をオイル液浸対物レンズ (60 \times , オリンパス) に通しサンプルの焦点調節を行った。200 ps ゲート付 ICCD (PicoStar HR, LaVision, Göttingen, Germany) により y 方向の 2 次元蛍光スペクトルデータを取得した。以後、この 2 次元データを「y- λ マップ」と呼ぶ。y- λ マップは y 方向が 45 μ m (y) で蛍光波長範囲が 417–682 nm (λ) のデータとなる。イメージングはステージを x 方向に移動させ (ステップ幅, 93.6 nm), x 軸上の全ての位置で y- λ マップを取得することで画像を構築した。以後、取得したイメージング画像を「x-y イメージ」と呼ぶ。x-y イメージは 60 μ m \times 45 μ m のサイズである。

4-2-8. 蛍光顕微鏡観察法

明視野と蛍光像の観察は U-MWU (励起波長, 330-385 nm ; 蛍光波長, 410~ nm), U-MWUBV2 (励起波長, 400-440 nm ; 蛍光波長 475~ nm), U-MWIBA (励起波長, 460-490 nm ; 蛍光波長, 510-550 nm), U-MWIG (励起波長, 520-550 nm ; 蛍光波長, 580~ nm) のミラーセットを伴った蛍光顕微鏡 (BX50, オリンパス), または V2A (励起波長, 380-420 nm ; 蛍光波長, 450~ nm) のミラーセットを伴った蛍光顕微鏡 (Model Eclips ME600, ニコン) のいずれかを使用した。アベナンスラミドとクロロフィルの自家蛍光はミラーセット, U-MWU, U-MWUBV2, V2A (励起波長範囲 330-440 nm) を用いて観測した。CM-H₂DCFDA シグナルは 460-490 nm の励起波長と 510-550 nm の蛍光波長で, PI シグナルは 520-550 nm の励起波長と 580 nm の蛍光波長で観測した。CM-H₂DCFDA と PI は DMSO で溶解し, PBS buffer (pH 7.4) にて 1.7 μ mol/L と 7.5 μ mol/L の終濃度にそれぞれ調整した。

4-3. 結果

4-3-1. エンバク葉切片のファイトアレキシン定量分析

アベナンスラミド類はヒドロキシ桂皮酸とアントラニル酸のアミド化合物であり、また菌類の細胞壁構成成分であるキチン断片、ペンタ-*N*-アセチルキトペンタオースがアベナンスラミド A, B を最も強く誘導するエリシターである⁸⁰⁻⁸²。アベナンスラミド A, B の MS/MS スペクトル、アベナンスラミド A, B, ¹³C₂アベナンスラミド A, B のキャピラリー LC/MS/MS クロマトグラムを図 4-2 に示した。アベナンスラミドのイオン化は、負イオンモードが良好であった。非標識体および、標識体の MRM トランジションを図 4-2 C に示した。また、キャピラリー LC/MS/MS 定量分析系のバリデーション結果を表 4-1 に示した。アベナンスラミド A と B は完全なベースライン分離はできず、一部同時溶出しているが、それぞれの ¹³C₂ 標識体を内標とし MRM モードで測定することで定量分析は可能であった。

約 10 mg FW のエンバク葉切片を用いて葉肉組織表層全体にエリシター処理、またはコントロール処理を施し、経時的にサンプリングを行った。その後、各サンプルを抽出精製し、細胞内のアベナンスラミド A, B をキャピラリー LC/MS/MS 分析系にて定量した結果を図 4-3 に示した。ペンタ-*N*-アセチルキトペンタオース溶液にてエリシター処理を行った結果、処理後 12 時間からアベナンスラミド A, B は検出され、処理後 24 時間にかけて細胞内の生合成量は増加した (図 4-4 A, B)。一方、コントロールである蒸留水、または *N*-アセチル-D-グルコサミン溶液にて処理したサンプルからは、アベナンスラミド A, B は検出されなかった (図 4-4 A, B)。この結果から、ペンタ-*N*-アセチルキトペンタオース溶液は特異的なエリシターとして作用することが確認された。エリシター処理による細胞内のアベナンスラミド A の生成量は、アベナンスラミド B よりも約 3 倍高かった。単位面積あたりの葉肉組織表層の平均葉肉細胞数は、100,000 μm² あたり 127 ± 16 細胞 (平均値 ± 標準偏差, n=3) でありアベナンスラミド A, B のバルク分析の結果から 1 細胞あたりの平均生合成量を算出した (図 4-4 C, D)。処理後 24 時間のサンプルにおいては 1 細胞あたりアベナンスラミド A を 2.4 fmol、アベナンスラミド B を

0.8 fmol 生合成していることが想定された。

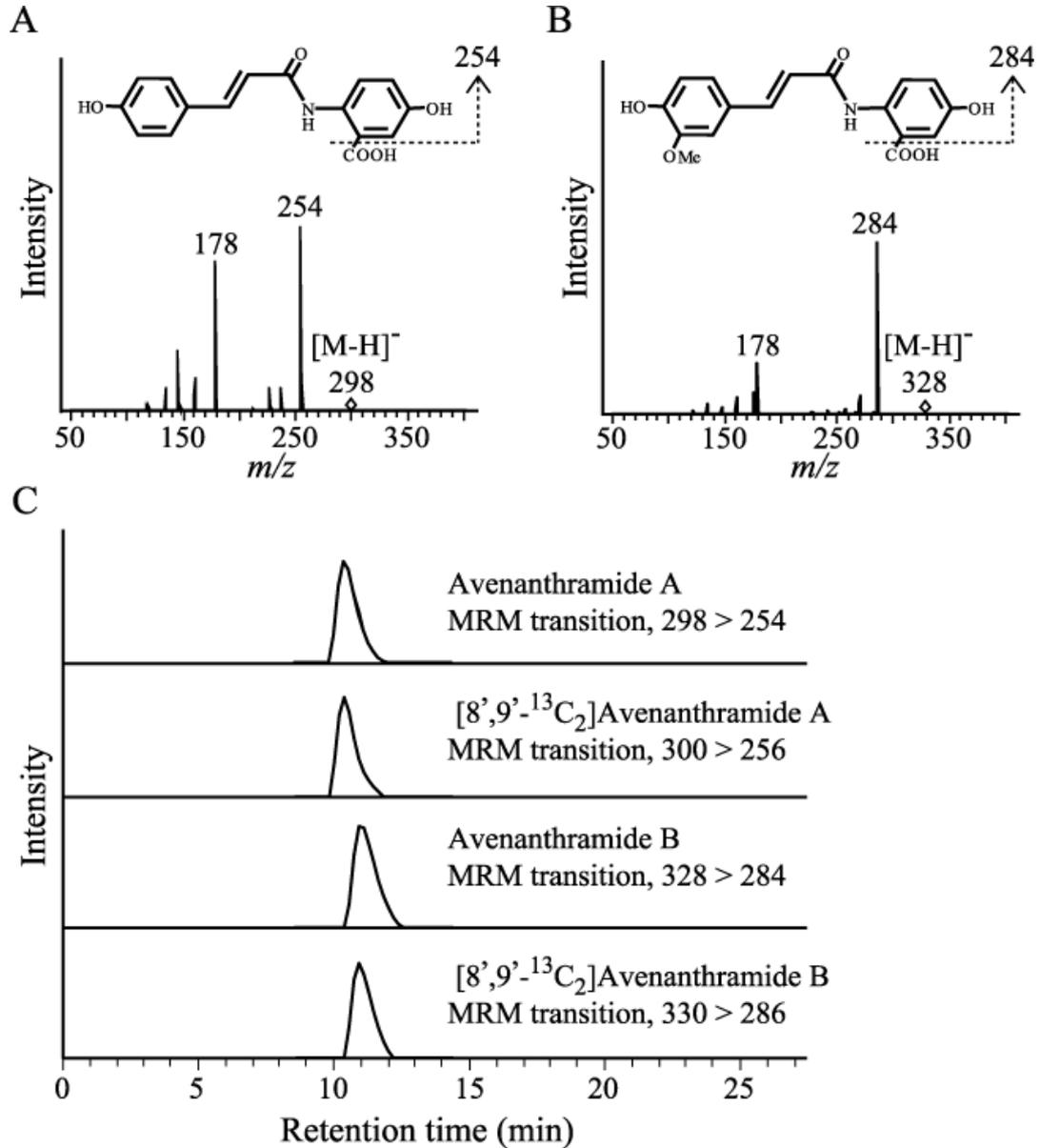


図 4-2. アベナンスラミド A, B のフラグメントパターンとキャピラリー LC/MS/MS クロマトグラム。

(A) アベナンスラミド A の負イオンモードでのプリカーサーイオン (m/z 298) とプロダクトイオン (m/z 254)。 (B) アベナンスラミド B の負イオンモードでのプリカーサーイオン (m/z 328) とプロダクトイオン (m/z 284)。 (C) アベナンスラミド A, B, ¹³C₂ アベナンスラミド A, B のキャピラリー LC/MS/MS クロマトグラム。

表 4-1. キャピラリーLC/MS/MS によるアベナンスラミド A, B のバリデーション

対象化合物	再現性, RSD (n=3) (%)		検量線 R^2	直線範囲 (fmol)	検出限界 (fmol) ^c
	保持時間 ^a	ピークエリア ^b			
[¹² C]/[¹³ C]アベナンスラミド A	0	6.2	0.997	62.5–6250	22.9
[¹² C]/[¹³ C]アベナンスラミド B	0	11.9	0.999	62.5–6250	38.6

^a 相対保持時間 (対象化合物/内部標準物質). ^b 相対ピークエリア (対象化合物/内部標準物質). ^c S/N=3.

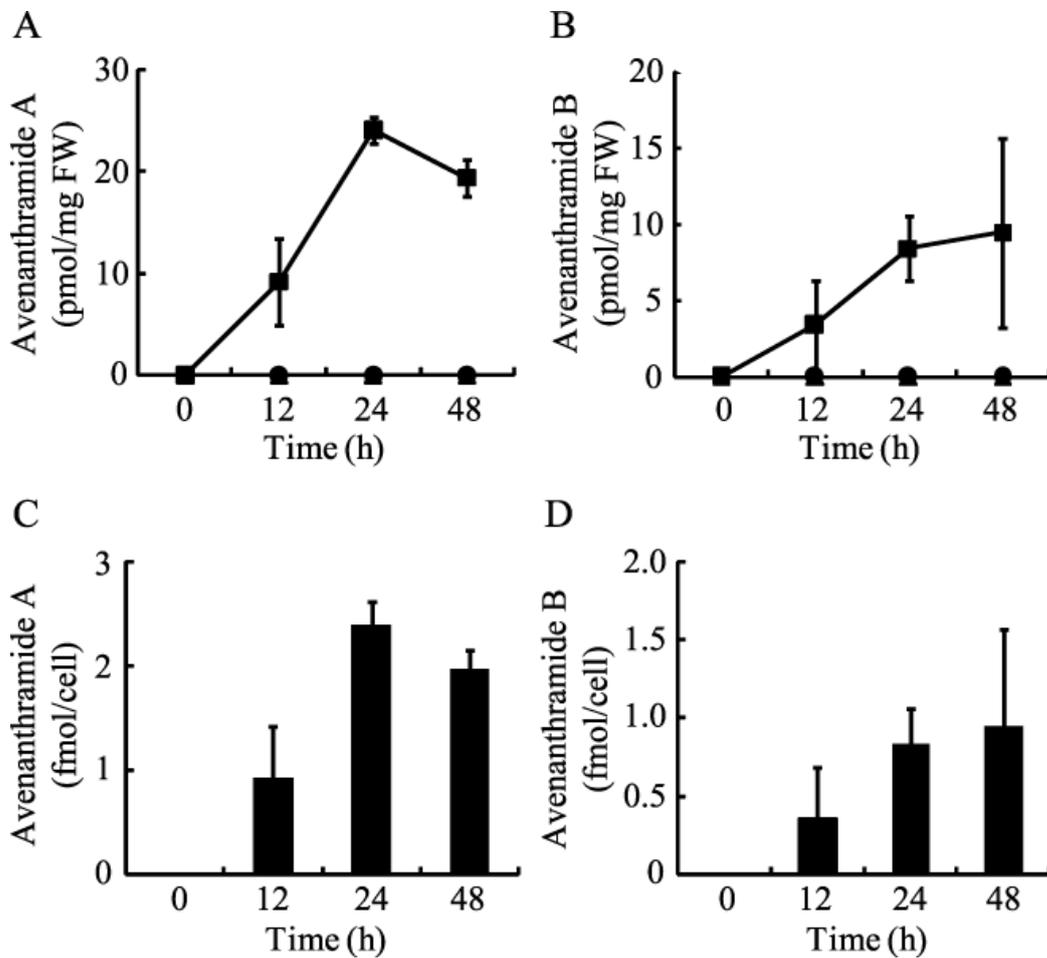


図 4-3. バルク分析に基づく経時的なアベナンスラミド A (A, C), B (B, D) 生成量.

0 時間は処理開始を表す. 1 mmol/L のペンタ-*N*-アセチルキトペンタオース溶液 (■), 1 mmol/L の *N*-アセチル-*D*-グルコサミン (▲), 蒸留水 (●). (A) アベナンスラミド A の内生量の経時変化, (B) アベナンスラミド B. (C) エリシター処理サンプルにおける表層の処理を施した 1 細胞あたりのアベナンスラミド A 平均生合成量を算出, (D) アベナンスラミド B. 平均値 ± 標準偏差 (n=3).

4-3-2. 葉肉細胞におけるエリシター応答時の細胞内変化の観測

アベナンスラミド A, B のバルク分析と同様に、経時的に処理を施した葉肉組織表層の蛍光顕微鏡観察を行った(図 4-4). その結果、エリシター処理サンプルにおいてのみ、葉緑体内のクロロフィルの自家蛍光が弱まりクロロフィルとは異なる波長特性を持つ蛍光が観測され、これらの特徴を有した細胞の数が処理時間と共に増加した. さらに、コントロール、エリシター処理サンプルにおいて、経時的に個々の細胞を蛍光特性および細胞内での形態学的な変化の観点から顕微鏡観察を行った結果、3 種の特徴的細胞が観測された (図 4-5). 1 種目はコントロールサンプルやエリシター処理後まもないサンプルにおいて通常観察できる正常細胞でこれらをセルフーズ 0 と定義した (図 4-5 A2). 2 種目はエリシター処理サンプルにおいて、処理後約 12-24 時間で数多く観測される葉緑体が著しく凝集した細胞で、これらをセルフーズ 1 とした (図 4-5 B2). 3 種目はエリシター処理サンプルにおいて、処理後約 24-48 時間で数多く観測されたクロロフィルの自家蛍光が弱まりクロロフィルとは異なる蛍光波長特性を持つ細胞で、これらをセルフーズ 2 と定義した (図 4-5 C2). これらセルフーズ 0-2 の細胞は、明視野では判別がつかず (図 4-5 A1, B1, C1) 蛍光特性と葉緑体の形態変化から分類することがはじめて可能であった. また、エリシター処理を行った同一の空間組織に対して経

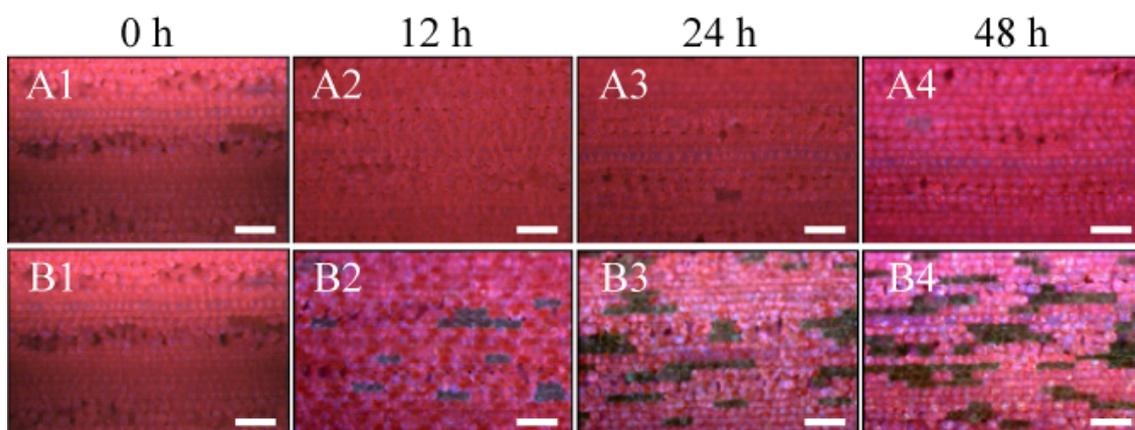


図 4-4. エンバク葉肉組織の経時的な蛍光顕微鏡観察.

(A) コントロール処理 (蒸留水), (B) エリシター処理. クロロフィルの自家蛍光 (赤色). スケールバー, 100 μm .

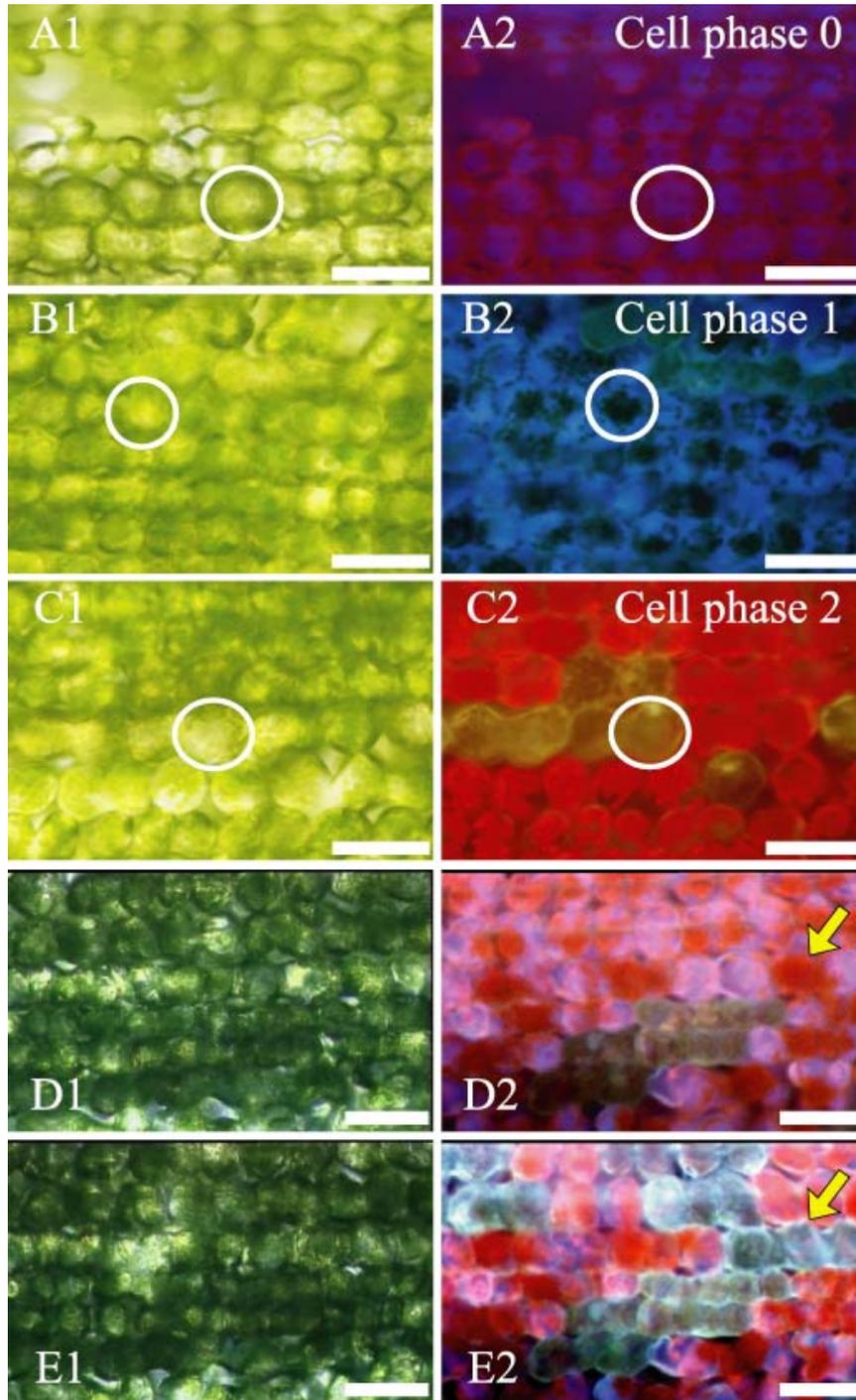


図 4-5. 葉肉細胞のエリシター応答時の特異的な細胞内変化.

(A1-E1) 明視野像, (A2-E2) 蛍光像. (A2, B2) U-MWU のミラーセットを使用, (C2) U-MWUBV2, (D2, E2) V2A. (A) コントロール処理 (蒸留水) 12 時間のサンプル, (B) エリシター処理 12 時間, (C) エリシター処理 24 時間. (D, E) タイムラプス観察, (D) エリシター処理 24 時間, (E) エリシター処理 36 時間. 同じ実験を 3 回繰り返し, 全て類似の結果を得た. スケールバー, 50 μm .

時的に葉肉細胞の変化の観察，タイムラプス測定を行った．エリシター処理 26 時間後の明視野像と蛍光像，および 36 時間後の明視野像，蛍光像を図 4-5 D1, D2, 図 4-5 E1, E2 にそれぞれ示した．処理後 26 時間において主にセルフフェーズ 1 やセルフフェーズ 2 の細胞が観測され，その 10 時間後にはセルフフェーズ 2 を示す細胞が増加した．また，セルフフェーズ 2 は，セルフフェーズ 2 となった細胞の隣接細胞から順に変化する様子が観測された．また，図 4-5 D2, E2 において矢印で示した細胞に着目すると，葉緑体の凝集を示すセルフフェーズ 1 からセルフフェーズ 2 に変化していることが観測され，エンバクの葉肉細胞はエリシター応答に伴い，セルフフェーズ 0 から 1, 2 へと変化することが示された．

4-3-3. 高空間分解能を伴った時期特異的ファイトアレキシン定量分析

各セルフフェーズの細胞内容物を取得するために，高空間分解能での生細胞サンプリングを行った．蛍光顕微鏡下で各セルフフェーズのサンプリング操作から得られたサンプル量は約 10 pL であった (図 4-1)．得られた細胞内容物のばらつきは細胞のサイズが異なることが主な原因であり，細胞のフェーズによる取得した内容物量の差異は見られなかった．バルク分析の結果から算出した 1 細胞あたりの平均生合成量 (図 4-3 C, D) を考慮した結果，各セルフフェーズの細胞内容物に含まれるアベナンスラミド A, B の定量を行うためにはキャピラリー LC/MS/MS 分析系の検出感度では不十分であった．

ナノフロー LC/MS/MS 定量分析系のバリデーション結果を表 4-2 に示した．今回は 0.1% のギ酸を添加した移動相にて負イオンモードのイオン化を行った．理由はアベナンスラミドが 0.05% 酢酸を含む移動相においてはピークのテーリングが起これば十分な LC 分離が達成できなかったためである．しかしながら，アベナンスラミドは比較的疎水性が高く逆相カラムに対して保持が強いため初期溶媒には 30% 以上の有機溶媒が含まれる．よって，0.1% のギ酸添加においても安定な負イオンモードでのイオン化が達成された．また，アベナンスラミド A, B の定量範囲は 5–300 fmol であった．第二章での植物ホルモン類の分析結果と同様に，ナノフロー LC/MS/MS の検出感度はキャピラリー LC/MS/MS よりも約 10 倍向上した．また，数 10 pL のサンプルを直接ナノフロー

LC/MS/MS 分析系に注入することはできないため、 ^{13}C 標識体を含む $10\ \mu\text{L}$ の 0.1% ギ酸溶液に希釈した (図 4-1)。本操作によって、細胞内容物は約 5×10^5 倍希釈されることとなるが、ナノフロー LC/MS/MS 分析系におけるプレカラムによりサンプル中に含まれるアベナンスラミドを保持・濃縮することができた。アベナンスラミドにおいては希釈の操作があっても微量サンプルからの分析を行うことが可能であった。

各セルフフェーズにおけるアベナンスラミド A, B の定量結果を図 4-6 に示した。アベナンスラミド A, B の細胞内濃度はセルフフェーズの進行に伴い増加し、両者に相関関係があることが示された。よって、セルフフェーズ 2 の蛍光 (図 4-5 C2) はアベナンスラミド A, B の自家蛍光である可能性が示唆された。

表 4-2. ナノフロー LC/MS/MS によるアベナンスラミド A, B のバリデーション

対象化合物	再現性, RSD (n=3) (%)		検量線 R^2	直線範囲 (fmol)	検出限界 (fmol) ^c
	保持時間 ^a	ピークエリア ^b			
^{12}C / ^{13}C アベナンスラミド A	1.5	1.0	0.996	5–300	1.8
^{12}C / ^{13}C アベナンスラミド B	2.1	3.1	0.995	5–300	2.1

^a 相対保持時間 (対象化合物/内部標準物質). ^b 相対ピークエリア (対象化合物/内部標準物質). ^c S/N=3.

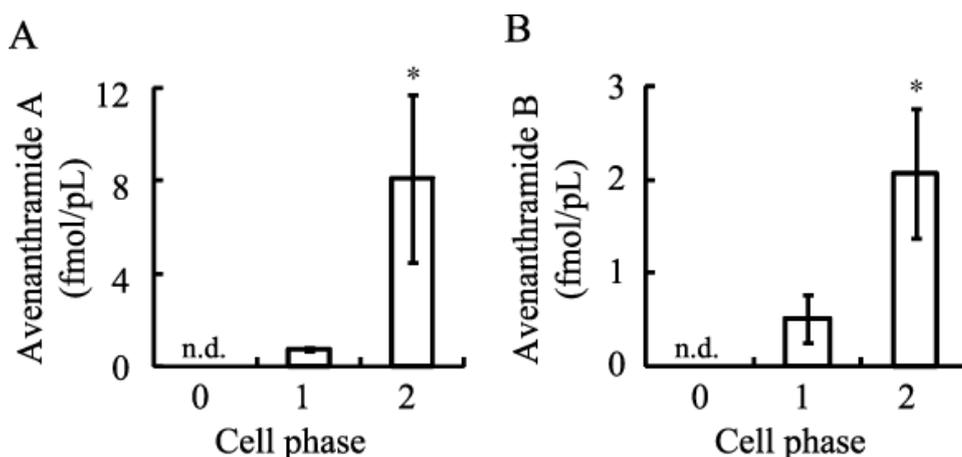


図 4-6. 各セルフフェーズのアベナンスラミド A, B 定量分析結果.

(A, B) 各セルフフェーズのアベナンスラミド A, B 細胞内濃度. 平均値 \pm 標準偏差 (n=4). * はセルフフェーズ 1 に対して危険率 5% で有意差があることを示す. n.d., 検出限界以下を示す.

4-3-4. ファイトアレキシンの細胞内局在解析

高感度・高選択性のナノフローLC/MS/MS定量分析系によって各セルフフェーズとアベナンスラミドA, Bの生成量における時間依存的な関連性が明らかとなった。また、アベナンスラミドは自家蛍光を持つことが標準物質の測定で分かっていたため、次に細胞内のアベナンスラミドの局在を可視化するために、ラインスキャンレーザー顕微分光法を用いて高分解能の細胞内蛍光イメージング解析を行った。

取得した各セルフフェーズのイメージング画像は図 4-7 に示した。x₁ の位置における各セルフフェーズの特徴を現した y-λマップを図 4-7 A2, B2, C2 にそれぞれ示した。セルフフェーズ 0 の y-λマップにおいては、460 nm 付近の「短波長成分」と 650- nm の「長波長成分」の 2 成分であるのに対して、セルフフェーズ 1 と 2 の y-λマップでは、460 nm 付近の短波長成分が消失し、510 nm 付近の「中波長成分」が観測された。短波長、中波長、長波長成分は、図 4-8 に示した蛍光特性と以前の報告¹⁰³ から、ピリジヌクレオチドである NAD(P)H, アベナンスラミド (図 4-8 B のスペクトル波形から主成分はアベナンスラミド A), クロロフィルと帰属できた。次に、これらの 3 成分の蛍光スペクトルの重複を避けた蛍光波長範囲を設定し、各蛍光波長範囲のシグナル強度に基づき各セルフフェーズの x-y イメージを構築した。NAD(P)H の蛍光シグナル (417-467 nm), アベナンスラミド (542-592 nm), クロロフィル (642-692 nm) の x-y イメージを図 4-7 A3-A5, 図 4-7 B3-B5, 図 4-7 C3-C5 にそれぞれ示した。

セルフフェーズ 0 における NAD(P)H の蛍光シグナルは細胞質全体に広がっており、その蛍光強度はクロロフィルのおよそ 45%と比較的強いシグナル強度を示した。また、葉緑体は細胞壁に沿って存在していることも確認された。セルフフェーズ 1 においては、クロロフィルの蛍光シグナルが細胞の中央に集まっていることから葉緑体が凝集していることがはっきりと観測された。また、NAD(P)H のシグナル消失とは対照的にアベナンスラミドの微弱蛍光が検出された。セルフフェーズ 2 の y-λマップにおいては、アベナンスラミドを示す 510 nm 付近のシグナル強度がセルフフェーズ 1 よりも著しく強くなったことからこれまでの結果と矛盾しなかった。さらに、アベナンスラミドを示す x-y イ

メージ (図4-7 C4) とクロロフィルの蛍光シグナルを示す x - y イメージ (図4-7 C5) を比較した結果, アベナンスラミドの蛍光シグナルとクロロフィルの蛍光シグナルの空間位置が一致した. また, 各セルフフェーズにおけるクロロフィル自家蛍光の絶対強度の比率は, セルフフェーズ 0:1:2 = 1.0:1.4:0.6 であった (図 4-7 A5, B5, C5).

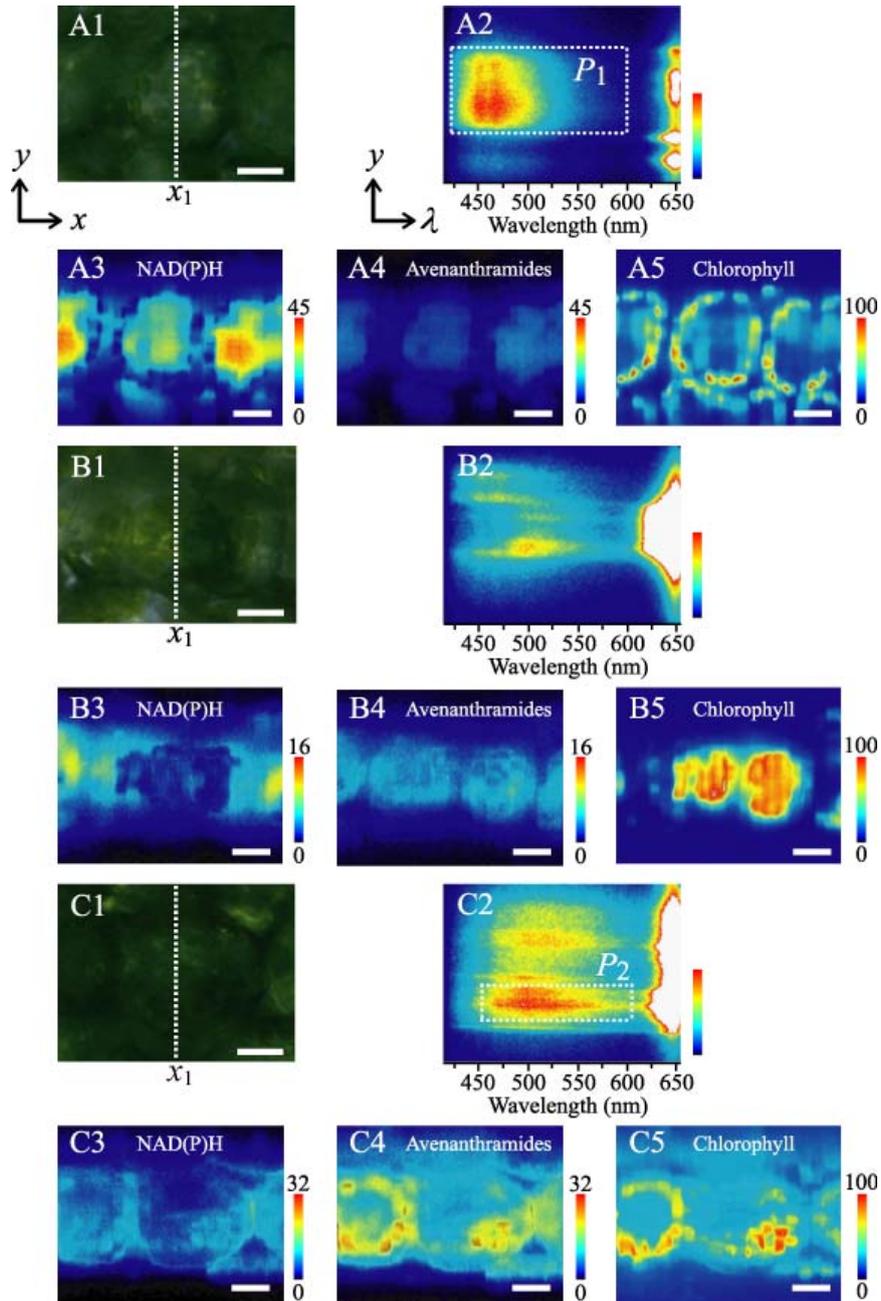


図 4-7. ラインスキャンレーザー顕微分光解析によるアベナンスラミド生成過程の可視化.

図 4-7 の説明

(A) セルフエーズ 0, (B) セルフエーズ 1, (C) セルフエーズ 2. (A1, B1, C1) 各セルフエーズの x - y 明視野像. (A2, B2, C2) x_1 における y - λ マップ (励起波長, 390 nm ; 蛍光波長, 417–682 nm). (A3, B3, C3) 417–467 nm の蛍光波長強度により構築した NAD(P)H の x - y イメージ, (A4, B4, C4) 542–592 nm の蛍光波長強度により構築したアベナンスラミドの x - y イメージ, (A5, B5, C5) 642–692 nm の蛍光波長強度により構築したクロロフィルの x - y イメージ. y - λ マップは 450 nm 付近の短波長成分の強度で標準化したため, 650 nm 以上の長波長シグナルは強度範囲を超えるため白色となる. x - y イメージは成分強度の比較を行うために各セルフエーズでのクロロフィル強度を 100 とした相対値で示している. 同じ実験を 3 回繰り返し, 全て類似の結果を得た. スケールバー, 10 μ m.

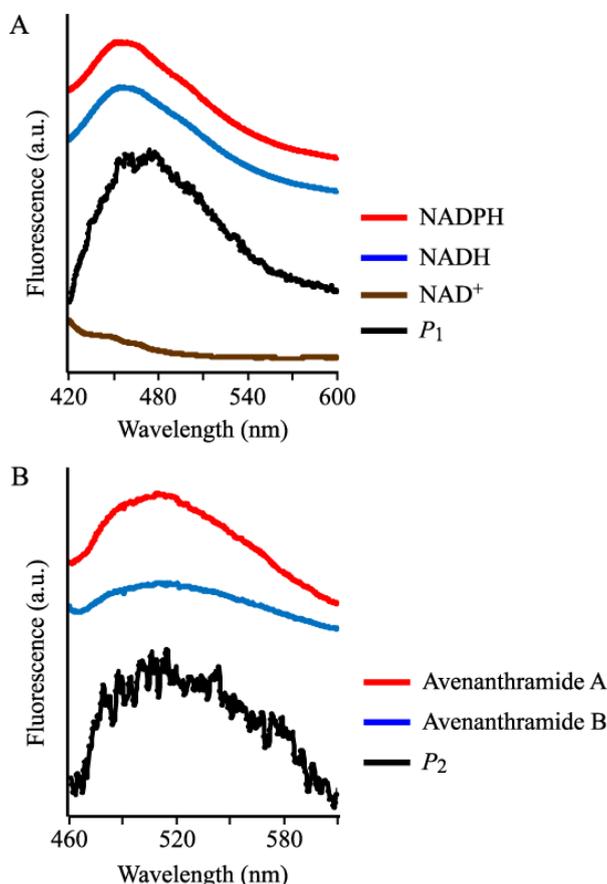


図 4-8. エンバク葉肉細胞から検出された特異的な蛍光シグナルの検証.

(A) 励起光 390 nm での NADPH (赤線), NADH (青線), NAD⁺ (茶線) 標準溶液の蛍光スペクトル. 黒線は P_1 (図 4-7 A2) で示した生体試料から取得したスペクトル. (B) 励起光 390 nm でのアベナンスラミド A (赤線), アベナンスラミド B (青線) 標準溶液の蛍光スペクトル. 黒線は P_2 (図 4-7 C2) で示した生体試料から取得したスペクトル. 波形の比較を行うために各スペクトルは重なり合わないよう垂直方向に移動させた.

4-3-5. ファイトアレキシン生合成と過敏化反応との関連性

近年、ファイトアレキシンの生成と ROS の生成および PCD といった一連の過敏感反応 (HR) の関連性が研究されている⁸⁷。しかしながら、ファイトアレキシンと HR の反応メカニズムの詳細、特に組織中における空間情報は不明である。そこで、ファイトアレキシンの顕著な生成が確認されたセルフフェーズ 2 を対象として、ROS の生成および PCD との関連性を検証した。ROS の検出には、ROS 検出蛍光プローブである、CM-H₂DCFDA を、細胞死判定には PI を用いて 2 重染色により行った (図 4-9)。ROS のシグナルはアベナンスラミドが顕著に生成した細胞によってのみ検出された (図 4-9 C)。一方、PI シグナルは ROS シグナル同様、クロロフィルの分解と共にアベナンスラミドが顕著に生成した細胞によってのみ、そのシグナルが観測された (図 4-9 D)。

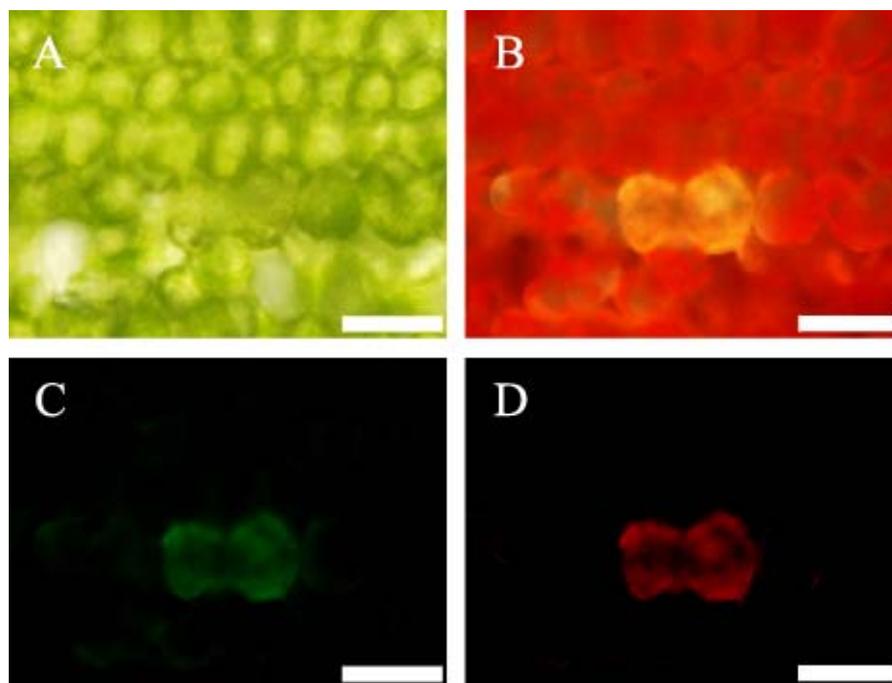


図 4-9. アベナンスラミド生合成と ROS 生成, 細胞死との関連性.

CM-H₂DCFDA と PI による 2 重染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。(A) 明視野像, (B) アベナンスラミドの自家蛍光 (黄) とクロロフィル蛍光 (赤), (C) ROS シグナル (緑), (D) PI シグナル (赤)。同じ実験を 3 回繰り返し, 全て類似の結果を得た。スケールバー, 50 μ m。

4-4. 考察

本章では、高感度・高選択性のナノフローLC/MS/MS分析系の新たな運用法として高空間分解能でのファイトアレキシン定量分析を試みた。

エンバク葉肉細胞はエリシター応答に従い蛍光特性および形態変化を伴うことが観測された (図 4-5)。これらの動的な細胞内の変化に基づき、3種のセルフーズを定義した。また、タイムラプス測定によりそのフェーズは0から2に時系列と共に進行することが観測された (図 4-5 D2, E2)。そこで、セルフーズの変化とファイトアレキシン生合成において相関関係があるのかを検証するために高空間分解能でのアベナンスラミド A, B の定量分析を実施した。その結果、フェーズの進行とアベナンスラミド A, B の生成量の増加に相関関係があることを見出した (図 4-6)。セルフーズ2でのアベナンスラミド A, B の濃度範囲は、それぞれ 4.5–11.7 mmol/L, 1.4–2.8 mmol/L であったため、バルク分析の結果から算出した1細胞あたりの平均生合成量と大きく差が生じた。これは、個々の細胞のエリシター応答能力に差があることを示していると考えられた。すなわち、バルク分析においてエリシター処理時間に伴いアベナンスラミド A, B 生成量が増加するのは、各細胞が処理時間と共に生合成量を増加させるというよりも、時間と共にエリシター応答する細胞数が増加することを反映した結果であると考えられた。

続いて、特定されたファイトアレキシン生成細胞の情報を基にアベナンスラミド、NAD(P)H、クロロフィルの局在解析をラインスキャンレーザー顕微分光法により行い、さらにファイトアレキシン生合成と ROS の生産や PCD のような一連の HR との関連性を検証した。図 4-7 の結果より、セルフーズ0のような正常細胞においては、NAD(P)H が細胞質全体に多く蓄積しており (図 4-7 A3)、代謝が活性化されていることが考えられた。また、葉緑体は細胞壁に沿って存在していることも確認された (図 4-7 A5)。

一方、セルフーズ1においては、クロロフィルの蛍光シグナルが細胞の中央に集まっていることから葉緑体が凝集していることがはっきりと観測された (図 4-7 B5)。葉緑体が凝集する現象は、強い青色光を細胞中央に照射することで、数時間後、照射した位置に葉緑体が凝集することがシロイヌナズナ等の植物で報告されている¹⁰⁶。この現

象の詳細は今だ不明であるが、葉緑体の凝集反応は光合成能を上げるためと考えられており、反対に葉緑体逃避運動（細胞膜に沿って局在する）は葉緑体内で発生した ROS による光損傷を緩和するための防御機構の一つとして考えられている¹⁰⁷。今回得られた結果と類似の現象としては、シロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラスとにおいて PCD を引き起こす引き金となるプロトポルフィリン IX を処理することによって数時間後、細胞膜に沿って位置していた葉緑体が一部細胞質に移動することが観測されている¹⁰⁸。しかしながら、エリシター応答時に今回得られたような著しい葉緑体の凝集反応が起こることを詳細に示した事例はない。一方、セルフフェーズ 1 において観測されたもう一つの興味深い現象は、NAD(P)H のシグナル消失（図 4-7 B3）とは対照的にアベナンスラミドの蛍光が検出されたことである（図 4-7 B2）。図 4-8 に示したように NAD(P)⁺は励起光 390 nm で蛍光をもたないことから NAD(P)H のシグナル消失は酸化反応により NAD(P)⁺に変換されたためであると考えられる。植物は病原菌の感染応答の際に初期段階において ROS の生産が起こり、この ROS の生産は急激な酸素消費を伴うことからオキシダティブバーストと呼ばれている¹⁰⁹。オキシダティブバーストは、主に原形質膜に存在する NADPH オキシダーゼの活性化により起こると考えられており^{110, 111}、NADPH の酸化反応によって NADP⁺と O₂が生成し、O²はさらに H₂O₂へと変換される。よって、NAD(P)H の蛍光シグナルの消失は、エリシター応答により ROS の生産が起こっていることを反映しているのかもしれない。

セルフフェーズ 2 の γ - λ マップ（図 4-7 C2）においては、アベナンスラミドのシグナル強度がセルフフェーズ 1 よりも著しく強くなったことからナノフロー LC/MS/MS での定量結果と一致した（図 4-6）。さらに、アベナンスラミドとクロロフィルの蛍光シグナルの空間位置が一致したことから（図 4-7 C4, C5）、アベナンスラミドは葉緑体で生合成されている、もしくはファイトアレキシン生合成に葉緑体は重要な役割を果たしていると考えられた。また、セルフフェーズ 2 においてはクロロフィル蛍光の絶対強度が低下していたことからアベナンスラミドの生成と共に葉緑体の分解が起こっていると考えられた。植物における PCD が起こる際に、クロロフィルの分解が起こることが知られているた

め¹⁰⁸, アベナンスラミドの生成と PCD の間には深い関係性があることが示唆された。

そこで、ファイトアレキシン生合成と ROS の生成および PCD との関連性を検証した。CM-H₂DCFDA は、ROS に対する選択性は高くないが、主に過酸化水素 (H₂O₂) の生成をモニタリングしていると考えられている¹⁰⁸。H₂O₂ のシグナルはアベナンスラミドが顕著に生成した細胞によってのみ検出された (図 4-9 C)。よって、図 4-7 B3, C3 で示したセルフフェーズ 1, 2 における NAD(P)H のシグナル消失は、NADPH オキシダーゼの活性化により H₂O₂ が生成しオキシタティブバーストを起こしていると考えられた。また、一連の HR における H₂O₂ 生成の役割は、病原菌に対する直接的な攻撃¹¹² やペルオキシダーゼ反応の基質¹¹³ として働くと考えられている。エンバクにおいてもエリシター応答の際にペルオキシダーゼ活性が高くなり、その基質特異性はアベナンスラミド類の中でアベナンスラミド B が最も高いことが分かっている⁸⁵。さらに、アベナンスラミド B と H₂O₂ の存在下でペルオキシダーゼが作用することによって 2 量体化した過酸化物、Bisavenanthramides B-1, 2, 3, 4, 5 を生成し細胞壁強化につながっていると考えられている⁸⁴。続いて細胞死判定蛍光プローブを用いて観測した結果、H₂O₂ シグナル同様に、セルフフェーズ 2 の細胞のみ PI シグナルが観測された (図 4-9 D)。よって、アベナンスラミドの生成と共に細胞は、細胞死を引き起こしていることが観測された。つまり、ファイトアレキシン生合成は、PCD などと同様に過敏感反応の現象の一部であるのかもしれない。以上の結果より、ファイトアレキシンの生成と ROS の生成および細胞死といった一連の過敏感反応は同一の細胞でのみ起こっていることを実験的に示すことができた。さらに、同様に処理を行った細胞においても、エリシター応答に差があることが分かり、またそのレスポンスは経時的に周辺細胞へ広がっていく様子が観測された。これらの結果は植物が、一部の細胞のみが細胞死というリスクを犯すことで効率よく防御応答反応を行うという生存戦略を立てていることを反映しているとも考えられる。

第五章 総括

本論文はナノフローLC/MS/MSによる低分子代謝産物の実用的な高感度定量分析法の開発と本法を用いて従来技術では到達できなかった植物代謝への応用研究についてまとめたものである。

第二章で確立したナノフローLC/MS/MS分析法は、アニオン性代謝物の測定に欠かすことのできない負イオンモードでの安定なイオン化を種々の分析条件を最適化することにより達成した。また、生理活性微量代謝物、植物ホルモン類の網羅的絶対定量分析系における保持時間の精度はRSDs 1.1%以下であり、ピークエリアのばらつきはRSDs 10.7%以下であり高い再現性を示したことからその技術レベルは極めて高い。その上、世界中の様々な研究分野で普及しているITMSを検出器として用いたことにより、fmol以下の高感度化を達成したことからその有用性は高く評価できる。さらに、スプレイヤーチップ一体型ナノフローカラムは400回超の連続分析を達成したことから感度のみならず耐久性にも優れた実用的な分析手法であると考えられる。モデル植物である、シロイヌナズナとタバコの抽出・精製サンプルから網羅的に植物ホルモン類を定量でき、タバコの乾燥種子サンプルにおいては、わずか17粒(1 mg DW)で測定が可能となった。つまり、LC/MS/MS分析系の高感度化によって従来の100分の1程度の出発材料から定量分析ができることを実証した。当該分析法は、遺伝子欠損体や組換え体の少量サンプルに対して適応可能であるために、植物ホルモンネットワークやホルモンの作用機構、代謝研究を前進させる上で有用なツールであると考えられる。

第三章では当該分析法の利点である、高感度化による出発材料の軽減と網羅的ホルモンプロファイリングを生かした応用研究について述べたものである。サイトカイニンの部位特異的精密定量分析においては、EOL処理によりサイトカイニンの増加を確認したことが決めてとなり、一過的な改変処理後の葉で窒素代謝に関わるアミノ酸や遺伝子発現変化の一部がサイトカイニンによって制御されていることを証明した。今後、当該分析手法を駆使して時系列情報と共に少量サンプルからの分析によりホルモン類の生

産部位や蓄積部位とその移動に関する知見を明らかにしていくことでシンクソースバランス制御の研究に大きく貢献できると考えられる。また、遺伝子組換え体の網羅的ホルモンプロファイリング結果より、代謝上でのホルモン類のクロストークが起こることを確認した。今後、様々な代謝改変時の植物ホルモン応答を詳細に解析していくことで実用的な有用物質生産やバイオマス資源の有効活用のために必要なホルモンネットワークを解明し、網羅的ホルモンプロファイリングがより合理的な代謝改変戦略の切り札として使用されることを期待したい。

第四章では高い空間・時間分解能を伴ってファイトアレキシンの定量分析に成功した。ナノフローLC/MS/MS 定量分析結果に基づき、顕微鏡下でアベナンスラミド生成細胞が識別できるようになったことで、分光学的手法や生化学的手法を併用しファイトアレキシン生合成過程の詳細な知見を得た。特に、ファイトアレキシンの生成と ROS の生成および細胞死といった一連の過敏感反応が同一の細胞で起こっていることを示し、またこれらの反応の時系列情報を取得できたことは大きな成果といえる。現状の分析系感度 (100 amol–10 fmol) においては、葉肉細胞中 (直径 25 μm) に 500 $\mu\text{mol/L}$ 以上含まれる代謝物であれば定量分析が可能であると考えられる。本研究では、カラム内径のダウンサイジング、つまり LC 部分の改良に焦点を絞り定量性を伴った分析系の高感度化により達成されたものである。一方、イオン化以降の MS 内部での高感度化のための技術開発は各社精力的に行っており飛躍的に進歩している。両者の現状技術を統合すれば zmol–amol (10^{-21} – 10^{-18} mol) の範囲の検出感度もいずれ達成できると考えられる。したがって、近い将来シングルセルでの定量的メタボロミクスやホルモンプロファイリングが実現可能と考えられる。

本研究で開発した高感度ナノフローLC/MS/MS 定量分析法が様々なバイオサイエンス分野で有用な測定技術と認知され、さらなる技術革新と共に普及していくことを期待する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科、福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します。

また、博士前期課程からの5年間、懇切なるご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科、小林昭雄名誉教授に心から御礼申し上げます。

本論文作成にあたり有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科、福井希一教授、藤山和仁教授に心から厚く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、分析技術や植物細胞工学を一からご指導して頂き、また日頃から貴重なご助言と励ましの言葉を頂きました近畿大学生物理工学部、梶山慎一郎准教授、大阪大学大学院工学研究科、馬場健史准教授、岡澤敦司助教、大阪大学大学院薬学研究科、原田和生助教に心から深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日頃より貴重なご助言を頂きました大阪大学工学研究科、小野比佐好助教に深く感謝いたします。

本研究で使用したラインスキャンレーザー顕微分光解析に関して一から懇切丁寧にご指導を頂きました大阪大学先端科学イノベーションセンター、兼松泰男教授、中村亮介博士(現・東北大学大学院理学研究科、助教)に厚く御礼申し上げます。標準化合物の提供と貴重なご助言を頂きました京都大学大学院農学研究科、石原亨助教(現・鳥取大学農学部、准教授)に深く感謝いたします。植物サンプルの提供と有益なご助言を頂きました味の素(株)ライフサイエンス研究所、五十嵐大亮博士、地球環境産業技術研究機(RITE)、蓮沼誠久博士(現・神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部、講師)に感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、生物資源工学領域、細胞工学領域の諸先輩方、学生諸氏、事務の方々に心から感謝の意を表します。

最後に、これまで常に支えてくれた両親・和泉憲次、道子、兄・充剛、応援し続けてくれた親族の方々、報告を楽しみに待っていた亡祖父・茶谷一雄、亡祖母・和泉千代子、そして多くの友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します。

引用文献

1. Ishihama, Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1067**, 73-83 (2005).
2. Shen, Y., Tolić, N., Masselon, C., Paša-Tolić, L., Camp 2nd, D.G., Hixson, K.K., Zhao, R., Anderson, G.A. & Smith, R.D. Ultrasensitive proteomics using high-efficiency on-line micro-SPE-nanoLC-nanoESI MS and MS/MS. *Anal Chem* **76**, 144-154 (2004).
3. Sreekumar, A., Poisson, L.M., Rajendiran, T.M., Khan, A.P., Cao, Q., Yu, J., Laxman, B., Mehra, R., Lonigro, R. J., Li, Y., Nyati, M.K., Ahsan, A., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Cao, X., Byun, J., Omenn, G.S., Ghosh, D., Pennathur, S., Alexander, D.C., Berger, A., Shuster, J.R., Wei, J.T., Varambally, S., Beecher, C. & Chinnaiyan, A.M. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **457**, 910-914 (2009).
4. Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J. & Rabinowitz, J.D. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **5**, 593-599 (2009).
5. Tong, X.S., Wang, J., Zheng, S., Pivnichny, J.V., Griffin, P.R., Shen, X., Donnelly, M., Vakerich, K., Nunes, C. & Fenyk-Melody, J. Effect of signal interference from dosing excipients on pharmacokinetic screening of drug candidates by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 6305-6313 (2002).
6. Yamashita, M. & Fenn, J.B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J Phys Chem* **88**, 4451-4459 (1984).
7. Fukusaki, E., Harada, K., Bamba, T. & Kobayashi, A. An isotope effect on the comparative quantification of flavonoids by means of methylation-based stable isotope dilution coupled with capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *J Biosci Bioeng* **99**, 75-77 (2005).
8. Böttcher, C., Roepenack-Lahaye, E.V., Willscher, E., Scheel, D. & Clemens, S.

- Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **79**, 1507-1513 (2007).
9. Zaitso, K. Katagi, M., Kamata, T., Kamata, H., Shima, N., Tsuchihashi, H., Hayashi, T., Kuroki, H. & Matoba, R. Determination of a newly encountered designer drug "p-methoxyethylamphetamine" and its metabolites in human urine and blood. *Forensic Sci Int* **177**, 77-84 (2008).
 10. Matsuda, F. Yonekura-Sakakibara, K., Niida, R., Kuromori, T., Shinozaki, K. & Saito, K. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant J* **57**, 555-577 (2009).
 11. Harada, K., Ohyama, Y., Tabushi, T., Kobayashi, A. & Fukusaki, E. Quantitative analysis of anionic metabolites for *Catharanthus roseus* by capillary electrophoresis using sulfonated capillary coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Biosci Bioeng* **105**, 249-260 (2008).
 12. Soga, T. Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M. & Nishioka, T. Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. *Anal Chem* **74**, 6224-6229 (2002).
 13. Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M. & Nishioka, T. Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 2233-2239 (2002).
 14. Yoshida, H., Mizukoshi, T., Hirayama, K. & Miyano, H. Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **55**, 551-560 (2007).
 15. Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E. & Thomas-Oates, J. Hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry analysis of

- carbohydrate-related metabolites from *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**, 1399-1407 (2008).
16. Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C. & Oldiges, M. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1147**, 153-164 (2007).
 17. Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. & Willmitzer, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* **18**, 1157-1161 (2000).
 18. Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. & McCourt, P. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1117-1126 (2000).
 19. Ho, T.-h.D., Gomez-Cadenas, A., Zentella, R. & Casaretto, J. Crosstalk between gibberellin and abscisic acid in cereal aleurone. *J Plant Growth Regul* **22**, 185-194 (2003).
 20. Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. & Ullrich, C.I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot (Lond)* **97**, 883-893 (2006).
 21. Gazzarrini, S. & McCourt, P. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 387-391 (2001).
 22. Rock, C.D. & Sun, X. Crosstalk between ABA and auxin signaling pathways in roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **222**, 98-106 (2005).
 23. Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. & Giraudat, J. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**, 1103-1115 (2000).
 24. Chiwocha, S.D.S., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R.S. & Kermode, A.R. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid,

- auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J* **42**, 35-48 (2005).
25. Schmelz, E.A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H. & Tumlinson 3rd, J. H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10552-10557 (2003).
 26. Nordström, A. Tarkowski, P.Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K. & Sandberg, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8039-8044 (2004).
 27. Lange, B.M. Single-cell genomics. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 236-241 (2005).
 28. Rubin, M.A. Tech.Sight. Understanding disease cell by cell. *Science* **296**, 1329-1330 (2002).
 29. Zhao, X., Wang, W., Wang, J., Yang, J. & Xu, G. Urinary profiling investigation of metabolites with cis-diol structure from cancer patients based on UPLC-MS and HPLC-MS as well as multivariate statistical analysis. *J Sep Sci* **29**, 2444-2451 (2006).
 30. Takeuchi, T. & Ishii, D. Ultra-micro high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **190**, 150-155. (1980).
 31. Hopfgartner, G., Bean, K., Henion, J. & Henry, R. Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration- or a mass-flow-sensitive device? *J Chromatogr* **647**, 51 (1993).
 32. Chervet, J.P., Ursem, M. & Salzman, J.P. Instrumental Requirements for Nanoscale Liquid Chromatography. *Anal Chem* **68**, 1507-1512 (1996).
 33. Emmett, M.R. & Caprioli, R.M. Micro-Electrospray Mass Spectrometry: Ultra-High-Sensitivity Analysis of Peptides and Proteins. *J Am Soc Mass Spectrom* **5**, 605-613. (1994).

34. Oosterkamp, A.J., Gelpi, E. & Abian, J. Quantitative peptide bioanalysis using column-switching nano liquid chromatography/mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **33**, 976-983 (1998).
35. Prinsen, E., Dongen, W.V., Esmans, E.L. & Onckelen, H.A.V. Micro and capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *J Chromatogr A* **826**, 25 (1998).
36. Shen, Y., Zhao, R., Berger, S.J., Anderson, G. A., Rodriguez, N. & Smith, R. D. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. *Anal Chem* **74**, 4235-4249 (2002).
37. Collier, T.S., Hawkrigde, A.M., Georgianna, D.R., Payne, G.A. & Muddiman, D.C. Top-down identification and quantification of stable isotope labeled proteins from *Aspergillus flavus* using online nano-flow reversed-phase liquid chromatography coupled to a LTQ-FTICR mass spectrometer. *Anal Chem* **80**, 4994-5001 (2008).
38. Ishihama, Y., Rappsilber, J., Andersen, J.S. & Mann, M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J Chromatogr A* **979**, 233-239 (2002).
39. Lanckmans, K., Van Eeckhaut, A., Sarre, S., Smolders, I. & Michotte, Y. Capillary and nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of small molecules in microdialysis samples: comparison with microbore dimensions. *J Chromatogr A* **1131**, 166-175 (2006).
40. J. Daie & Wyse, R. Adaptation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the quantitative analysis of abscisic acid. *Anal Biochem* **119** (1982).
41. Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talon, M. & Primo-Millo, E. Leaf Abscission Induced by Ethylene in Water-Stressed Intact Seedlings of Cleopatra Mandarin Requires Previous Abscisic Acid Accumulation in Roots. *Plant Physiol* **112**, 401-408 (1996).

42. Linskens, H.F. & Jackson, J.F. *Modern Methods of Plant Analysis, Immunology in Plant Sciences* **vol.2, Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1986**, p. 1.
43. Ljung, K., Sandberg, G. & Moritz, T. *Methods of plant hormone analysis. In: Davies, P.J. (Ed.), Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004*, p. 671-694.
44. Pan, X. & Wang, X. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 2806-2813 (2009).
45. Barkawi, L.S., Tam, Y.Y., Tillman, J.A., Pederson, B., Calio, J., Al-Amier, H., Emerick, M., Normanly, J. & Cohen, J.D. A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Anal Biochem* **372**, 177-188 (2008).
46. Chiwocha, S.D.S., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Cutler, A. J., Loewen, M., Ross, A. R.S. & Kermode, A. R. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J* **35**, 405-417 (2003).
47. J.S. Kamboj, G. Browning, P.S. Blake, J.D. Quinlan & Baker, D.A. GC-MS-SIM analysis of abscisic acid and indole-3-acetic acid in shoot bark of apple rootstocks. *Plant Growth Regul* **28**, 21-27 (1999).
48. Schmelz, E.A., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., Block, A. & Alborn, H.T. The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J* **39**, 790-808 (2004).
49. Müller, A., Düchting, P. & Weiler, E.W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 44-56 (2002).
50. Pan, X., Welte, R. & Wang, X. Simultaneous quantification of major phytohormones and

- related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 1773-1781 (2008).
51. Kowalczyk, M. & Sandberg, G. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1845-1853 (2001).
 52. Cao, J., Murch, S.J., O'Brien, R. & Saxena, P.K. Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1134**, 333-337 (2006).
 53. Kai, K., Horita, J., Wakasa, K. & Miyagawa, H. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**, 1651-1663 (2007).
 54. Kai, K., Nakamura, S., Wakasa, K. & Miyagawa, H. Facile preparation of deuterium-labeled standards of indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites to quantitatively analyze the disposition of exogenous IAA in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1946-1954 (2007).
 55. Matsuda, F., Miyazawa, H., Wakasa, K. & Miyagawa, H. Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 778-783 (2005).
 56. Lu, Q., Zhang, L., Chen, T., Lu, M., Ping, T. & Chen, G. Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**, 2565-2572 (2008).
 57. Ross, A.R.S., Ambrose, S. J., Cutler, A.J., Feurtado, J.A., Kermode, A.R., Nelson, K., Zhou, R. & Abrams, S.R. Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Anal Biochem* **329**, 324-333 (2004).
 58. Feurtado, J.A., Yang, J., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Abrams, S.R. & Kermode, A.R.

- Disrupting abscisic acid homeostasis in Western white pine (*Pinus Monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *J Plant Growth Regul* **26**, 46 (2007).
59. Zhou, R., Squires, T.M., Ambrose, S.J., Abrams, S.R., Ross, A.R.S. & Cutler, A. J. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1010**, 75-85 (2003).
60. López-Carbonell, M. & Jáuregui, O. A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiol Biochem* **43**, 407-411 (2005).
61. Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P.I., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A. & Kamínek, M. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159 (2006).
62. Novák, O., Hauserová, E., Amakorová, P., Doležal, K. & Strnad, M. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224 (2008).
63. Polanská, L., Vičánková, A., Nováková, M., Malbeck, J., Dobrev, P.I., Brzobohatý, B., Vaňková, R., & Macháčková, I. Altered cytokinin metabolism affects cytokinin, auxin, and abscisic acid contents in leaves and chloroplasts, and chloroplast ultrastructure in transgenic tobacco. *J Exp Bot* **58**, 637-649 (2007).
64. Stirk, W.A. Novák, O., Václavíková, K., Tarkowski, P., Strnad, M. & van Staden, J. Spatial and temporal changes in endogenous cytokinins in developing pea roots. *Planta* **227**, 1279-1289 (2008).
65. Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V. & Gómez-Cadenas, A. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **53**,

- 8437-8442 (2005).
66. Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. & Sakakibara, H. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* **50**, 1201-1214 (2009).
 67. Murashige, T & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-498 (1962).
 68. Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S. & Yoshida, S. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**, 1319-1334 (2002).
 69. Dobrev, P.I. & Kamínek, M. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J Chromatogr A* **950**, 21-29 (2002).
 70. Ma, Z., Ge, L., Lee, A.S.Y., Yong, J.W.H., Tan, S.N. & Ong, E. S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal Chim Acta* **610**, 274-281 (2008).
 71. Jemal, M., Schuster, A. & Whigan, D.B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 1723-1734 (2003).
 72. Liu, R.H., Lin, D.-L., Chang, W.-T., Liu, C., Tsay, W.-I., Li, J.-H. & Kuo, T.-L. Isotopically labeled analogues for drug quantitation. *Anal Chem* **74**, 618A-626A (2002).
 73. Dobrev, P.I., Havlíček, L., Vágner, M., Malbeck, J. & Kamínek, M. Purification and

- determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1075**, 159-166 (2005).
74. Ferreira, F.J. & Kieber, J.J. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 518-525 (2005).
 75. Sakakibara, H., Takei, K. & Hirose, N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci* **11**, 440-448 (2006).
 76. Kakimoto, T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677-685 (2001).
 77. Hasunuma, T., Miyazawa, S., Yoshimura, S., Shinzaki, Y., Tomizawa, K., Shindo, K., Choi, S.K., Misawa, N. & Miyake, C. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J* **55**, 857-868 (2008).
 78. Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S. & Bowles, D.J. N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**, 47822-47832 (2004).
 79. Dixon, R.A. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847 (2001).
 80. Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S. & Iwamura, H. Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitooligosaccharides in oats. *Phytochemistry* **47**, 969-974 (1998).
 81. Ishihara, A., Ohtsu, Y. & Iwamura, H. Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. *Planta* **208**, 512-518 (1999).
 82. Miyagawa, H., Ishihara, A., Kuwahara, Y., Ueno, T. & Mayama, S. Comparative studies of elicitors that induce phytoalexin in oats. *J Pesticide Sci* **21**, 203-207 (1996).
 83. Miyagawa, H., Ishihara, A., Nishimoto, T., Ueno, T. & Mayama, S. Induction of avenanthramides in oat leaves inoculated with crown rust fungus, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 2305-2306 (1995).
 84. Okazaki, Y., Ishizuka, A., Ishihara, A., Nishioka, T. & Iwamura, H. New dimeric

- compounds of avenanthramide phytoalexin in oats. *J Org Chem* **72**, 3830-3839 (2007).
85. Okazaki, Y., Ishizuka, A., Ishihara, A., Nishioka, T. & Iwamura, H. Metabolism of avenanthramide phytoalexins in oats. *Plant J* **39**, 560-572 (2004).
86. Pierce, M.L., Cover, E.C., Richardson, P.E., Scholes, V.E. & Essenberg, M. Adequacy of cellular phytoalexin concentrations in hypersensitively responding cotton leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**, 305-324 (1996).
87. Zhao, J., Fujita, K. & Sakai, K. Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis. *New Phytol* **175**, 215-229 (2007).
88. Kehr, J. High resolution spatial analysis of plant systems. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 197-201 (2001).
89. Sergeeva, L.I. & Vreugdenhil, D. *In situ* staining of activities of enzymes involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. *J Exp Bot* **53**, 361-370 (2002).
90. De Block, M. *In situ* enzyme histochemistry on plastic-embedded plant material. *Methods Cell Biol* **49**, 153-163 (1995).
91. Koltai, H. & Bird, D.M. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections. *Plant Physiol* **123**, 1203-1212 (2000).
92. Medley, C.D., Drake, T.J., Tomasini, J.M., Rogers, R.J. & Tan, W. Simultaneous monitoring of the expression of multiple genes inside of single breast carcinoma cells. *Anal Chem* **77**, 4713-4718 (2005).
93. Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A. & Liotta, L. A. Laser capture microdissection. *Science* **274**, 998-1001 (1996).
94. Casson, S., Spencer, M., Walker, K. & Lindsey, K. Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. *Plant J* **42**, 111-123

- (2005).
95. Inada, N. & Wildermuth, M.C. Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf. *Planta* **221**, 9-16 (2005).
 96. Schneider, B. & Hölscher, D. Laser microdissection and cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy: an alliance for cell type-specific metabolite profiling. *Planta* **225**, 763-770 (2007).
 97. Li, S.H., Schneider, B. & Gershenzon, J. Microchemical analysis of laser-microdissected stone cells of Norway spruce by cryogenic nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta* **225**, 771-779 (2007).
 98. Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., Noda, T. & Setou, M. MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **855**, 98-103 (2007).
 99. Ng, K.M., Liang, Z., Lu, W., Tang, H.-W., Zhao, Z., Che, C.-M. & Cheng, Y.-C. In vivo analysis and spatial profiling of phytochemicals in herbal tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **79**, 2745-2755 (2007).
 100. Roy, S.J., Cuin, T.A. & Leigh, R.A. Nanolitre-scale assays to determine the activities of enzymes in individual plant cells. *Plant J* **34**, 555-564 (2003).
 101. Celis, A., Rasmussen, H.H., Celis, P., Basse, B., Lauridsen, J.B., Ratz, G., Hein, B., Ostergaard, M., Wolf, H., Orntoft, T. & Celis, J. E. Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis* **20**, 355-361 (1999).
 102. Grosset, J., Marty, I., Chartier, Y. & Meyer, Y. Messenger RNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound inducible. *Plant Mol Biol* **15**, 485-496 (1990).

103. Nakamura, R., Izumi, Y., Kajiyama, S., Kobayashi, A. & Kanematsu, Y. Line-scanning microscopy for time-gated and spectrally resolved fluorescence imaging. *J Biol Phys* **34**, 51–62 (2008).
104. Kajiyama, S., Harada, K., Fukusaki, E. & Kobayashi, A. Single cell-based analysis of torenia petal pigments by a combination of ArF excimer laser micro sampling and nano-high performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry. *J Biosci Bioeng* **102**, 575-578 (2006).
105. Matsuura, Y., Miyagi, M. Aluminum-coated hollow glass fibers for ArF-excimer laser light fabricated by metallorganic chemical-vapor deposition. *Appl. Opt.* **38**, 2458–2462 (1999).
106. Wada, M., Kagawa, T. & Sato, Y. Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 455-468 (2003).
107. Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M. & Wada, M. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829-832 (2002).
108. Yao, N. & Greenberg, J.T. *Arabidopsis* ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death. *Plant Cell* **18**, 397-411 (2006).
109. Lamb, C. & Dixon, R.A. The Oxidative Burst In Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275 (1997).
110. Torres, M.A., Dangl, J.L. & Jones, J.D.G. *Arabidopsis* *gp91^{phox}* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 517-522 (2002).
111. Apel, K. & Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399 (2004).
112. Peng, M. & Kuc, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* **82**, 696–699 (1992).

113. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* **42**, 462–468 (2001).

発表論文

本学位論文に關与する論文

1) **Izumi, Y.**, Okazawa, A., Bamba, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E. "Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry." *Anal Chim Acta* **648(2)**: 215-225. (2009)

本論文は separation science 1(11): 41. (2009) にハイライトされた。

2) Igarashi, D., **Izumi, Y.**, Dokiya, Y., Totsuka, K., Fukusaki, E. and Ohsumi, C. "Reproductive organs regulate leaf nitrogen metabolism mediated by cytokinin signal." *Planta* **229(3)**: 633-644. (2009)

3) **Izumi, Y.**, Kajiyama, S., Nakamura, R., Ishihara, A., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kanematsu, Y. and Kobayashi, A. "High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in oats." *Planta* **229(4)**: 931-943. (2009)

その他の論文

4) Nakamura, R., **Izumi, Y.**, Kajiyama, S., Kobayashi, A. and Kanematsu, Y. "Line-Scanning Microscopy for Time-Gated and Spectrally Resolved Fluorescence Imaging." *J Biol Phys* **34**: 51-62. (2008)

5) Kajiyama, S., Shoji, T., Okuda, S., **Izumi, Y.**, Fukusaki, E. and Kobayashi, A. "A novel microsurgery method for intact plant tissue at the single cell level using ArF excimer laser microprojection." *Biotechnol Bioeng* **93(2)**: 325-31. (2006)

学会発表

- 1) 梶山慎一郎, 和泉自泰, 石原亨, 中村亮介, 兼松泰男, 福崎英一郎, 小林昭雄
「励起・蛍光時間マトリクスと1細胞サンプリングによるエンバク感染応答反応の解析」
日本農芸化学会 2006 年度大会, 京都, 2006 年 3 月

- 2) Kajiyama, S., Izumi, Y., Fukusaki, E., Kobayashi, A.
"Shingle cell based metabolite analyses upon defense response of oat by laser micro sampling and nano flow LC-MS"
The 1st International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis at Uppsala, Sweden, June, 2006

- 3) Kajiyama, S., Izumi, Y., Fukusaki, E., Kobayashi, A.
"Shingle-cell based metabolite analyses by laser micro sampling and nano flow LC-MS"
4th International forum on Post-genome Technologies in Hang Zhou, China, September, 2006

- 4) 和泉自泰, 福崎英一郎, 梶山慎一郎, 小林昭雄
「ナノスプレイヤー一体型カラムを用いた低拡散 nano flow LC-ESI-MS による高感度分析系の確立とその応用」
第 41 回植物化学調節学会, 大阪, 2006 年 10 月

- 5) 和泉自泰, 福崎英一郎, 梶山慎一郎, 兼松泰男, 中村亮介, 石原亨, 小林昭雄
「シングルセル代謝分析に基づいた植物感染応答反応の動的解析」
日本農芸化学会 2007 年度大会, 東京, 2007 年 3 月

- 6) 渡辺一平, 今井十芙絵, 蒲和明, 宮坂均, 奥畑博史, 池田和宣, 和泉自泰, 福崎英一郎, 小林昭雄, 馬場健史, 平田收正
「園芸植物 *Portulacaoleracea* におけるビスフェノール A 代謝経路の解析」
2007 年日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007 年 3 月

- 7) Nakamura, R., Izumi, Y., Kajiyama, S., Kobayashi, A., Kanematsu, Y.
"Line-scanning microscopy for time-gated and spectrally-resolved fluorescence imaging"
6th INTERNATIONAL CONFERENCE OF BIOLOGICAL PHYSICS ICBP 2007 in Montevideo, Uruguay, August, 2007

- 8) 蒲和明, 渡辺一平, 今井十芙絵, 宮坂均, 奥畑博史, 池田和宣, 福田和宏, 大田秀和, 和泉自泰, 福崎英一郎, 小林昭雄, 馬場健史, 平田收正
「園芸植物 *Portulaca oleracea* を用いた環境ホルモン浄化に関する研究」
第 59 回日本生物工学会大会, 広島, 2007 年 9 月
- 9) 奥村亮平, 岡澤敦司, 畑直樹, 和泉自泰, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 福崎英一郎, 小林昭雄
「リグナン類の高感度微量分析系の確立ならびにレンギョウ中のリグナン含量と光環境の相関解析」
第 42 回植物化学調節学会, 静岡, 2007 年 10 月
- 10) 奥村亮平, 岡澤敦司, 畑直樹, 和泉自泰, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 福崎英一郎, 小林昭雄
「リグナン類の高感度微量分析系の確立ならびにレンギョウ中のリグナンプロファイルと光環境の相関解析」
第 49 回日本植物生理学会年会, 北海道, 2008 年 3 月
- 11) 岡澤敦司, 奥村亮平, 和泉自泰, 畑直樹, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 福崎英一郎, 小林昭雄,
「光質がレンギョウ中のリグナン類生合成に与える影響」
日本農芸化学会 2008 年度大会, 名古屋, 2008 年 3 月
- 12) 和泉自泰, 岡澤敦司, 福崎英一郎, 小林昭雄
「植物ホルモン類の網羅的高感度 LC-ESI-MS/MS 分析」
日本農芸化学会 2008 年度大会, 名古屋, 2008 年 3 月
- 13) Izumi, Y., Okazawa, A., Kobayashi, A., Fukusaki, E.
"Comprehensive plant hormones profiling using high sensitive LC-ESI-MS/MS"
5th International conference on plant metabolomics in Yokohama, July, 2008
- 14) 和泉自泰, 岡澤 敦司, 小林 昭雄, 福崎 英一郎
「植物ホルモン類の網羅的高感度 LC-ESI-MS/MS 分析」
第 60 回日本生物工学会大会, 宮城, 2008 年 8 月
- 15) 瀧村晋, 和泉自泰, 馬場 健史, 福崎 英一郎
「LC-MS を用いた定量的 microRNA 解析手法の開発」
第 60 回日本生物工学会大会, 宮城, 2008 年 8 月

- 15) 和泉自泰, 岡澤 敦司, 小林 昭雄, 福崎 英一郎
「植物ホルモン類の網羅的高感度 LC-ESI-MS/MS 分析」
日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 大阪, 2008 年 9 月
- 16) Takimura, S., Izumi, Y., Bamba, T., Fukusaki, E.
"Development of a Method for the Quantitative MicroRNA Analysis by LC/MS"
4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering in Korea, November, 2008
- 17) 五十嵐大亮, 和泉自泰, 戸塚一彦, 福崎英一郎, 大住千栄子
「サイトカインシグナルを介したソースシンク間での窒素代謝制御の解析」
第 50 回日本植物生理学会年会, 名古屋, 2009 年 3 月
- 18) 堀遂人, 岡澤敦司, 畑直樹, 和泉自泰, 佐竹炎, 馬場健史, 福崎英一郎, 小林昭雄
「キャピラリー LC/MS を用いたシロイヌナズナに含まれるリグナン関連化合物のプロファイリング」
日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009 年 3 月
- 19) 瀧村晋, 和泉自泰, 馬場 健史, 福崎 英一郎
「LC/IT-TOF-MS による定量的 microRNA 解析手法の開発」
日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡, 2009 年 3 月
- 20) 和泉自泰, 岡澤 敦司, 馬場健史, 小林 昭雄, 福崎 英一郎
「ナノフロー液体クロマトグラフィー/イオントラップ型質量分析計による植物ホルモン類の網羅的定量分析」
第 57 回質量分析総合討論会, 大阪, 2009 年 5 月
- 21) Hori, K., Okazawa, A., Hashizume, Y., Hata, N., Izumi, Y., Bamba, T., Ono, E., Satake, H., Fukusaki, E., Kobayashi, A.
"Profiling of lignan related compounds in transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing piperitol/sesamin synthase CYP81Q1 from sesame"
Plant Biology 2009 (Joint annual meeting s of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America), in Hawaii, USA, July, 2009
- 22) 梶山慎一郎, 和泉自泰, 中村亮介, 石原亨, 岡澤敦司, 福崎英一郎, 兼松泰男, 小林昭雄
「エンバク感染応答の 1 細胞分析」シンポジウム (非侵襲シングルセル解析ーライフサイエンスのめざす生物科学ー)
第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月

23) 堀遂人, 岡澤敦司, 橋爪祥輝, 畑直樹, 和泉自泰, 馬場健史, 福崎英一郎, 小埜栄一郎, 佐竹炎, 小林昭雄

「ゴマ由来ピペリトール/セサミン合成酵素 CYP81Q1 を発現させたシロイヌナズナに含まれるリグナン関連化合物のプロファイリング」

第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月

24) 和泉自泰, 瀧村晋, 長澤早紀, 馬場 健史, 福崎 英一郎

「LC-ESI-IT-TOF-MS を用いた定量的 microRNA 解析手法の開発」

第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月

25) Lai, P., Okazawa, A., Izumi, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., Yoshikawa, M., Kobayashi, A.

"Unique peptides were produced in in vitro tryptic digestion of α -casein in the presence of a phenolic compound, gallic acid"

第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月

26) 和泉自泰, 岡澤敦司, 梶山慎一郎, 馬場健史, 小林昭雄, 福崎英一郎

「ナノフロー液体クロマトグラフィー/質量分析計による植物代謝産物の高感度定量分析」

第 4 回メタボロームシンポジウム, 神奈川, 2009 年 11 月