



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

氏 名	和 泉 自 泰
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 7 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	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
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福崎英一郎 (副査) 教 授 福井 希一 教 授 藤山 和仁 教 授 大竹 久夫 教 授 原島 俊 教 授 渡邊 肇 教 授 紀ノ岡正博 教 授 野地 博行

論 文 内 容 の 要 旨

本論文はナノフロー液体クロマトグラフ/質量分析 (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。

第一章は緒論として、植物代謝分析の近年の動向をまとめ、現在、当該研究分野が直面している分析技術における問題点を提示した。

第二章では、ナノフローLC/MS/MSを運用し、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の構築を行った。本分析系はfmol以下の高感度化を達成し、また保持時間の精度は相対標準偏差1.1%以下であり、ピークエリアのばらつきにおいては10.7%以下であったことから高い再現性を示した。さらに、スプレイヤーチッ

プー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った。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。

第三章では、第二章で構築した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を実施した。サイトカイニンの部位特異的精密定量分析においては、シンク器官からのシグナルを遮断することによりソース器官においてサイトカイニンの増加を確認した。この結果が決めてとなり、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。また、タバコ遺伝子組換え体の網羅的ホルモンプロファイリングを行った結果、代謝上でのホルモン類のクロストークが実際に起こることを確認した。

第四章では高感度・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シ定量分析を試みた。その結果、シングルセルでのファイトアレキシシの定量分析に成功し、顕微鏡下でファイトアレキシシ生成細胞が識別できるようになった。続いて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シ生成成過程の詳細な知見を得た。特に、ファイトアレキシシの生成と活性酸素の生成および細胞死といった一連の過敏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であった。

第五章では、以上の研究成果と意義をまとめ、今後の課題と展望について記述した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はナノフロー液体クロマトグラフ/質量分析 (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。主な成果は以下のとおりである。

(1) ナノフローLC/MS/MS を運用し、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の構築を行った。本分析系は fmol 以下の高感度化を達成し、また保持時間の精度は相対標準偏差 1.1%以下であり、ピークエリアのばらつきにおいては 10.7%以下であったことから高い再現性を示した。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った。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。

(2) 上記 (1) で構築した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を実施した。サイトカイニンの部位特異的精密定量分析においては、シンク器官からのシグナルを遮断することによりソース器官においてサイトカイニンの増加を確認した。この結果が決めてとなり、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。また、タバコ遺伝子組換え体の網羅的ホルモンプロファイリングを行った結果、代謝上でのホルモン類のクロストークが実際に起こることを確認した。

(3) 上記 (1) で構築した高感度・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シ定量分析を試みた。その結果、シングルセルでのファイトアレキシシの定量分析に成功し、顕微鏡下でファイトアレキシシ生成細胞が識別できるようになった。続いて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シ生成成過程の詳細な知見を得た。特に、ファイトアレキシシの生成と活性酸素の生成および細胞死といった一連の過敏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するという画期的な成果を得た。

以上のように、本論文では、高感度・高選択性ナノフローLC/MS/MS 分析による生体内微量生理活性成分の解析方法を提示し、それらの特長を精査し、実用性を検証している。よって、本論文は博士論文として価値のあるものと認める。