Osaka University Knowledge Archive

Title	１細胞質量分析法による生きたミトコンドリア単体でのダイレクト代謝解析
Author(s)	江崎, 剛史
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56102
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学位論文

Direct Analysis of Metabolites in a Living Mitochondrion by Live Single-cell Mass Spectrometry

1 細胞質量分析法による生きたミトコンドリア単体でのダイレクト代謝解析

平成 28 年 3 月　博士（理学）　申請

大阪大学大学院　生命機能研究科　生命機能専攻

江崎　剛史

Abstruct

[Introduction]

Mitochondria play important roles in life. Dysfunction of mitochondria is central to the pathogenesis of many diseases, such as, Alzheimer's and Parkinson's disease. Studying and discovering signs of mitochondrial dysfunction can lead to prevention of disease. However, conventional methods can't simultaneously give us important information such as the dynamics of various molecules, the localization of metabolites, and the cell condition. Therefore, by furthering the technological development of single-cell mass spectrometry, I measured the metabolites of live mitochondria.

[Methods and Results]

1. Metabolite analysis of mitochondria in a single cell

Mitochondria of a target cell were directly sucked into a nanospray tip under a fluorescence microscope. Components were measured by high-resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap Velos Pro. About 7,000 ion peaks were detected from a single cell. Composition difference between mitochondria and cytosol was detected by statistical analysis. Telocinobufagin was identified as one of the mitochondrial- specific metabolites.

2. Metabolite tracking in a single mitochondrion with a stable isotope

In order to track the flux of metabolites between mitochondrion and cytosol, I used ^{13}C glucose. A single mitochondrion treated with MitoTracker Green was sucked. Metabolites were measured by high sensitivity mass spectrometer TSQ Vantage. Metabolites in the glycolytic system were substituted from ^{12}C to ^{13}C only in the cytosol. In contrast, metabolites in the TCA cycle were substituted in the cytosol and mitochondria. The flux of metabolites was analyzed at the single-mitochondrial level.

[Conclusion]

This method provides a powerful tool for mitochondrial metabolism analysis, because it enables us to measure mitochondrial metabolites from a single living cell, not a group of cells or dead cells. We will be able to actualize the measurement of specific metabolites of organelles, clarifying the mechanism of disease.

要旨

【序論】

生体は、多くの個性を持った細胞が集まり、有機的に関わり合うことで生命維持を行っている。特に、その細胞の中にある小器官のミトコンドリアは、生体に必要なエネルギー産出、プログラム細胞死、シグナル伝達など、多くの生命現象に関わっていることが明らかになってきている。そして、ミトコンドリアが機能障害を起こし、細胞が生命維持を行えなくなった結果、アルツハイマーやパーキンソン病といった症状になることも報告されている。そのため、ミトコンドリアが機能障害を起こす兆候を発見できれば、病気を未然に防ぐことが可能になると考えられる。

しかし、従来は大量に集めた細胞を磨り潰して分析を行う方法か、蛍光観察で特定の分子の動きを追跡する方法が主流であり、機能障害を起こした、生きたミトコンドリアの代謝物変化を網羅的に分析する方法はなかった。

そこで、私は 1 細胞質量分析法をミトコンドリアの代謝物探索に適用することにより、世界で始めてミトコンドリア単体に含まれる分子の挙動を網羅的に分析し、1 細胞内のミトコンドリア代謝物を計測する技術開発に取り組んだ。

【実験方法及び結果】

1.　1 細胞内ミトコンドリアの代謝物探索

まず、1 つの細胞内のミトコンドリアのメタボロミクスを可能とするため、ミトコンドリアの特異的蛍光プローブである MitoRed を細胞に投与し、蛍光顕微鏡下で蛍光を発している箇所をナノスプレーチップで採取し、高分解能質量分析計 LTQ Orbitrap で分子分析を行った。その結果、ミトコンドリアと細胞質から 7,000 以上のピークが検出された。ここには、TCA サイクルに関与する代謝物や ATP 等が含まれていた。ミトコンドリアと細胞質、そして細胞成分との比較のため測定した溶媒から得られたデータを使い主成分解析を行ったところ、それぞれが異なるクラスターを形成した。このことから、ミトコンドリアと細胞質をそれぞれ選択的にサンプリングでき、更に、成分組成の違いを検出しできたことが示唆された。その中でミトコンドリアに特異的な分子として、ステロイド脂質である Telocinobufagin の検出、そして同定に成功した。

1 つの細胞の状態を観察しながら、その中のミトコンドリアを採取し、成分の網羅的分析に成功した例は今までに無く、世界初の結果を得ることができた。

2.　安定同位体を用いたミトコンドリア単体での代謝追跡

次に、1 つの細胞内において異常な変化をしたミトコンドリア単体の代謝変化と、分子が小器官の間を出入りする様子を追跡するため、安定同位体である ^{13}C Glucose を使って実験を行った。細胞培養培地を ^{13}C Glucose 入りの培地に置換し、3 時間後、そし

て 12 時間後にミトコンドリアと細胞質をそれぞれ採取し、同位体標識された代謝物の質量分析を行った。その結果、細胞質では解糖系の代謝物で ^{12}C から ^{13}C への置き換わりがあったが、ミトコンドリアではあまり置き換わりがなかった。解糖系は細胞質で活発に動いており、代謝の進行が速いことが確認された。対照的に、TCA サイクルの代謝物は、細胞質でもミトコンドリアでも、^{12}C から ^{13}C の代謝物へ置き換わっている様子が観察された。TCA サイクルの代謝物は、細胞質とミトコンドリア間を行き来するためであると考えられた。

以上より、ミトコンドリア単体に含まれる同位体標識分子の代謝追跡に世界で初めて成功した。また、小器官による代謝の速度の違いと、小器官の間での代謝物の出入りを追跡することが、1 細胞で可能であることを示した。

【総括】

本研究では、従来の分析法では不可能だった、1 細胞内ミトコンドリアの網羅的代謝分析に成功し、加えて、細胞質とミトコンドリア間での代謝追跡を可能とした。

この手法は核や液胞といった他の小器官の分子局在、さらに植物組織での分子分布も分析可能である。本手法を用い、あらゆる生体組織内の分子局在や挙動を解析することで、生命現象の解明に近付けることが期待される。

目次

Abstruct 1

要旨 2

１−１　緒言 9

１-１-１　１細胞分析 10

１-１-２　１細胞分析へ質量分析計の適用 15

１−１−３　ミトコンドリア 20

１-１-４　１細胞内のミトコンドリア代謝物分析 22

１-２　１細胞質量分析法の概要 24

１-２-１　細胞の前処理 24

１-２-２　１細胞質量分析法による細胞小器官のサンプリング 24

１-２-３　細胞成分の検出とマススペクトルの解析 25

２−１　緒言 28

２-２　微量分子の定量に向けた検討 30

２-２-１　サンプリング量の見積もり 32

２-２-２　イオン検出量のばらつきの補正 33

２-２-３　結果・考察 36

２-３ 微量分子の検出に向けた検討 48

２-３-１ 検出器の最適化 48

２-３-２ 実験方法 50

２-３-３ 結果・考察 50

２-４ 方法 52

２-４-１ 試薬 52

２-４-２ 細胞培養 53

２-４-３ 細胞の蛍光観察 53

２-４-４ １細胞内ミトコンドリアサンプリング 54

２-４-５ ミトコンドリア成分質量分析 54

２-４-６ データ解析 55

２-５ ミトコンドリア群への１細胞質量分析法の適用 56

２-５-１ １細胞内ミトコンドリア群のサンプリングと解析 56

２-５-２ 検出された代謝物の小器官間での比較 58

２-５-３ ミトコンドリア特異的分子の MS/MS スペクトル取得 66

２-６ 小活 70

３−１ 緒言 72

３-２ ミトコンドリア単体での質量分析における測定系の確立 76

３-２-１　蛍光色素の検討 76

３-２-２　サンプリング 78

３-２-３　高分解能質量分析計での測定 78

３-２-４　高感度質量分析計での測定 79

３-２-５　結果と考察 80

３-３　ミトコンドリア単体における代謝物探索 81

３-３-１　イオン化溶媒の検討 81

３-３-２　実験方法 82

３-３-３　検討結果 83

３-３-４　検出限界の確認 86

３-４　方法 88

３-４-１　試薬 88

３-４-２　細胞培養 89

３-４-３　細胞の蛍光観察 90

３-４-４　１細胞内ミトコンドリアサンプリング 91

３-４-５　ミトコンドリア成分質量分析 92

３-４-６　データ解析 92

３-５　代謝物追跡に向けたミトコンドリア単体のサンプリング 94

３-６　解糖系代謝物の小器官間比較 96

３-７　^{13}C Glucose の代謝追跡 100

３-８　小活 103

総括 106

参考文献 113

謝辞 132

研究業績 134

第１章
序論

１−１　緒言

細胞の生命維持活動を明らかにするためには、生命体の最小単位である細胞の機能やメカニズムを理解することが必要不可欠である。顕微鏡下で細胞を観察してみても、細胞はそれぞれ個性を持っており、大きさ、形、小器官の分布、細胞分裂の状態についても、何ひとつ全く同じ状態のものはない。もし、一つ一つの細胞の中で動いている分子の挙動を解析することが可能となれば、細胞の複雑な表現系や代謝のメカニズムの解明に近付くことが可能となると考えられる。

細胞小器官の中でも、特にミトコンドリアは生命活動に重要な役割を担っている。例として、細胞内で必要とされる Adenocine Triphosphate（ATP）の大部分を産出しており、さらに、脂肪酸の酸化（β−酸化）、モノアミンの酸化、そして、アポトーシスといったプログラムされた細胞死までも制御していることが言われている[1]。さらに、細胞の状態に応じて、ミトコンドリアは常時、結合と乖離を繰り返し、その大きさや形をダイナミックに変えていることも報告されている[2, 3]。

それらのメカニズムを解明するためには、ミトコンドリアの中で起こっている分子の変動や挙動を解析することが大切となってくる。しかし、ミトコンドリアは一つ一つ個

性を持っており、多様性を持っている。ミトコンドリアの状態は、ミトコンドリアを含んでいる細胞に依存するが、この細胞もまた多様性がある。そこで、細胞の個性を考慮した上で、１つの細胞の情報を得るために、現在注目されている、”1 細胞分析法”を適用して研究を進めていくことが望ましい。

１-１-１　１細胞分析

近年では、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスといった分野で、細胞ひとつひとつの個性を分析するために、1 細胞に焦点を当てた研究が進められている。メタボロームは、細胞、器官、組織で見つけられた小さな分子といった代謝物全体として定義されている[4]。その代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスの分野で、最も注目されている分野のひとつとして、ガンがある。

ガン細胞の多様性は、Petel らによって 2014 年に報告された[5]。彼らは、一人の患者から切り取った膠芽細胞腫を一つ一つの細胞にわけ、それらの細胞に 1 細胞 RNA シーケンスを行った。その結果、430 個の細胞の組成パターンがいくつかのグループに分かれていること、すなわち、一人の患者の膠芽細胞腫であっても、同じ細胞が集まった腫瘍ではないことが明らかとなった。RNA レベルでの多様性は、代謝物レベルでも多様性をもっている可能性がある。もし、それらのグループの違いから生まれる代謝物の違いを明らかにすることができ、ガン細胞が生体に及ぼす傷害のメカニズムが明らかにな

れば、ガンの治療や防止に向けて、医療が大きく進歩することが考えられる。それだけでなく、他の臨床の分野においても、大きな発展が期待される。

さらに近年は、同じ遺伝子型の細胞群における、細胞の多様性についても注目されている[6, 7]。1 細胞レベルでの遺伝子や蛋白質の表現系は確率的な要素が多く、様々な技術を駆使して、様々な手法、システムを使って明らかにすることが必要となっている[8, 9]。また、組織や器官での空間的な情報をも含めた細胞の機能を明らかにするためには、細胞間の情報伝達や多様性も考慮することが必要である。しかし、大量の細胞を集めて行う分析法では、多くの細胞の平均の情報しか得ることができず、細胞一つ一つの個性を含んだ情報は覆い隠されてしまう。そのため、1 細胞分析と多細胞分析は切り離して考えるべきである、とも言われている[10]。

様々な細胞のそれぞれの特徴や、器官の中での複雑な役割や係わり合いについて明らかにするためには、1 細胞レベルでの分子の動きを測定することが必要不可欠である。このことは、血統の分かっている *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を使い、1 細胞からの遺伝子発現のプロファイルを解析した実験によって明らかになっている[11]。これらのことからも、1 細胞分析は細胞の多様性や不均一性を解明するためのきわめて重要な手法であることがいえる。

以上のように、1 細胞メタボロミクスは様々な分野で注目されており、発生、システムバイオロジー、幹細胞、加齢、薬物への抵抗性と創薬など、様々な分野で使用される

ようになってきている。化学的・環境的ストレスによる、細胞内での生化学物質の移り変わりを明らかにできると考えられるためである。その他の 1 細胞オミクス計測方法と比較すると、1 細胞メタボロミクスは、細胞内で目まぐるしく変化する分子の動きを捉えることを目指している。しかし、実際に測定を行うことは非常に難しい。これは、代謝物は環境等の変化によって、短時間で大きな変化をすることが原因である[4]。そのため、1 細胞内の代謝物を分析することは非常に困難であり、数ある 1 細胞メタボロミクスの分析法の中でも、目的とする細胞や分子によって分析方法を選択することが非常に重要となってくる。そこで、1 細胞メタボロミクスとして使用されている分析方法を、いくつか紹介する。

まず 1 つ目に、1 細胞中に含まれる分子を分析することができる感度を持つ検出方法として、蛍光検出法があげられる。この方法は、ある分子に特異的に結合して、蛍光を発する蛍光物質を投与し、その蛍光標識された部分を観察するものである。生きた細胞に投与することで、細胞内に存在する分子の局在や、目的とする分子がどのように移動するのかといった、分子の動きを検出、定量することができるという利点がある[12, 13]。自家蛍光を持つ代謝物であれば、蛍光物質を投与することなく分析することが可能である。実際に、An らは自家蛍光を持つカルテノイドを、1 細胞で定量分析する方法を報告している[14]。しかし、そもそも自家蛍光を持つ代謝物は多くはないため、一般的には、測定対象としている分子に蛍光標識をつけて分析することが必要となる。代表的な蛍光

プローブとして、下村らの発見した Green Fluorescence Probe（GFP）が挙げられる[15]。しかし、これらの物質を生きた細胞に導入することは、細胞の状態を変化させてしまう可能も持っている。蛍光プローブの導入により、分子の物性が変化することは十分に考えられ、細胞内の状態が通常と異なってくる可能性がある。さらに、蛍光検出法は、同時に分析することができる分子が限られている。そのため、メタボロミクスのような網羅的に代謝物の分析に適用するには困難な場合が多い。

2 つ目として、電気化学法がある。この方法は非常に高感度での分析が可能であり、細胞内外の代謝物を定量するのに利用可能な検出感度を持つ。蛍光検出法とは違い、標識を行う必要がないため、細胞の自然な状態の分子を検出できるという利点があるが、検出できる分子が酸化還元反応を伴う分子種に限られるという制約もある。そのため、蛍光検出法と同様、標的分子を決定した分析に適している。電気化学法はキャピラリー電気泳動などによる分離を行うことで、より多くの分子を検出することが可能となる。Kennedy らによるアメフラシの神経細胞を使った 1 細胞分析はその一例である[16]。しかし、やはり選択性に乏しく、再現性を得ることにも注意が必要である。

3 つ目として、核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）装置を用いた分析も行われている[17, 18]。NMR の利点として、一度に多くの分子種を分析するという網羅的な分析が可能であること、測定する分子を破壊することなく分析できるということ、全自動へ向けた設備の開発が進められてハイスループットが可能となってきていること、解

析等のソフトウェア開発が進んでいること、再現性が高いことなどが挙げられる[19]。しかし、NMR には感度が乏しいという欠点がある。蛍光検出法、電気化学法、後述の質量分析法と比べて、必要とされるサンプルの量は多い。より高感度を目指すためには、サンプル調整の精度や分析の技術が必要とされる。

最後 4 つ目として、質量分析法（Mass Spectrometry, MS）が 1 細胞レベルの分子を分析する方法として挙げられる。質量分析法の利点として、細胞にプローブを導入する必要がないため、生きた細胞に近い状態での分析が可能である、標的分子を決定しなくても分析できるという網羅性があること、ピコモーラーレベルの濃度であっても検出可能という高感度分析ができること、クロマトグラフィーで分離を行うことにより同定能を高くすることが可能となること、そして自動化の開発によるハイスループットが進んでいることなどが挙げられる[20, 21]。欠点としては、装置自体が非常に高価であり、どこの研究室でも自由に使用できる環境が整っていないこと、極性の低い分子は検出することが難しいこと、データ解析のためのソフトウェアが複雑であるために使用の敷居が高いことなどが挙げられる[22, 23]。

このように、様々な分析方法の開発が進められているが、近年の高分解能化や高感度化などの進歩によって 1 細胞レベルでのメタボロミクスでは、質量分析計が注目されている。

１-１-２　１細胞分析へ質量分析計の適用

質量分析計は、サンプル中の分子を正または負に荷電させるイオン化部と、生成したイオンを質量電荷比（*m/z*）によって分離する質量分離部、そしてイオンを検出するための検出器から構成されている。イオン化部と質量分離部には様々なタイプがあり、それらにどのようなイオン化法を選ぶかによって、そしてどのように組み合わせるかによって、検出に適する分子の性質や分子量、また、分析の感度や精度が異なる。

生体試料の分析として、サンプル分子を分解させることなく検出することができる方法が選ばれることが多い。例として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法[24]、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法[25-27]、大気圧化学イオン化（APCI）法などが挙げられる。MALDI 法は分析に必要となる前処理のステップが少ないため、比較的分析が簡単である。このイオン化法により、Histamine[28]、Nucleotide[29]、Peptides[30] といった代謝物が、1 つの細胞から検出されたという報告がある。

ESI 法では、有機溶媒に溶かしたサンプルを金属でできたキャピラリーを通して流し、3-5kV の電圧をかけることでサンプルを含む分子に電荷をつけてイオン化する。キャピラリーは二層なっており、溶液の外側には液滴の霧化と溶媒の気化を促進するためのネブライザーガスとして、窒素ガスを流す。（Fig.1-1 (A)）

ESI 法をより少量のサンプルでも分析できるように改良されたのが、ナノスプレーイオン化（Nano-ESI）法である[31, 32]。この方法では、先端径が数マイクロメートルのナ

ノスプレーチップにサンプルを溶解させた溶媒が流され、ネブライザーガスを使用せずに高電圧を印加することのみで、電荷を持った霧滴の形成と分子のイオン化を行うことができる。イオン化の原理は ESI 法と変わらないが、形成される液滴が ESI 法と比べて小さいため、脱離が起こりやすく、イオン化効率が高いため、非常に少ないサンプルであっても検出することが可能である。(Fig.1-1 (B))

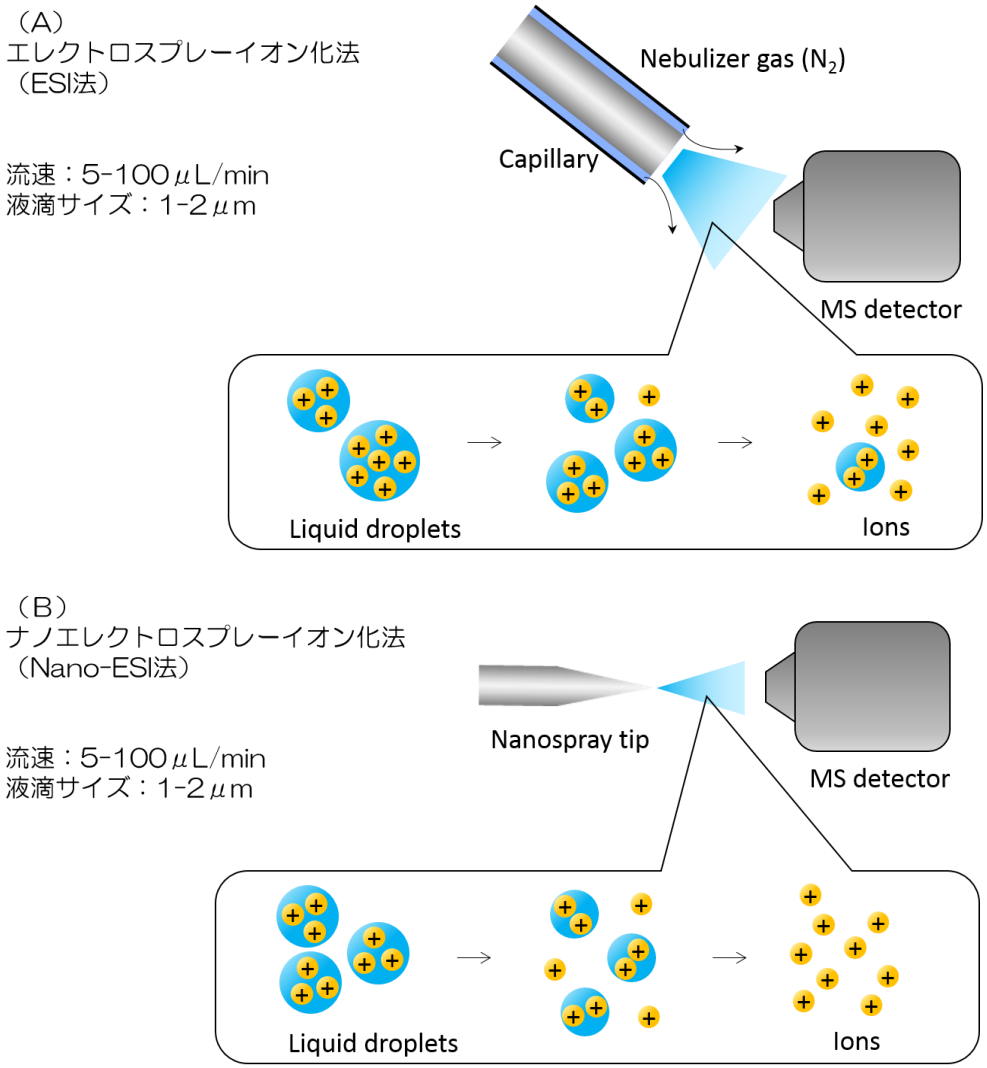


Fig.1-1　（A）は ESI 法によるイオン化、（B）は Nano-ESI によるイオン化

また、質量分離部でどのような装置を選択するかによって、得られる情報は大きく異なってくる。分析したい分子が決定していない、メタボロミクスのような網羅的分析を行いたい場合は、飛行時間型（Time-of –Fright, TOF）MS や、Orbitrap 型[33-35]（Fig. 1-2）などのフーリエ変換型（FT）MS といった、分子一斉検出型の質量分析計が使われる。これらは高分解能質量分析計とも言われており、検出されるイオンの *m/z* 値を小数点以下 2-4 桁まで正確に測定することが可能である。そのため、イオンの精密質量の値や同位体のパターン、あるいは質量フィルター部を結合させることによって、後述の MS/MS スペクトルからサンプル分子の同定を行うことができる。

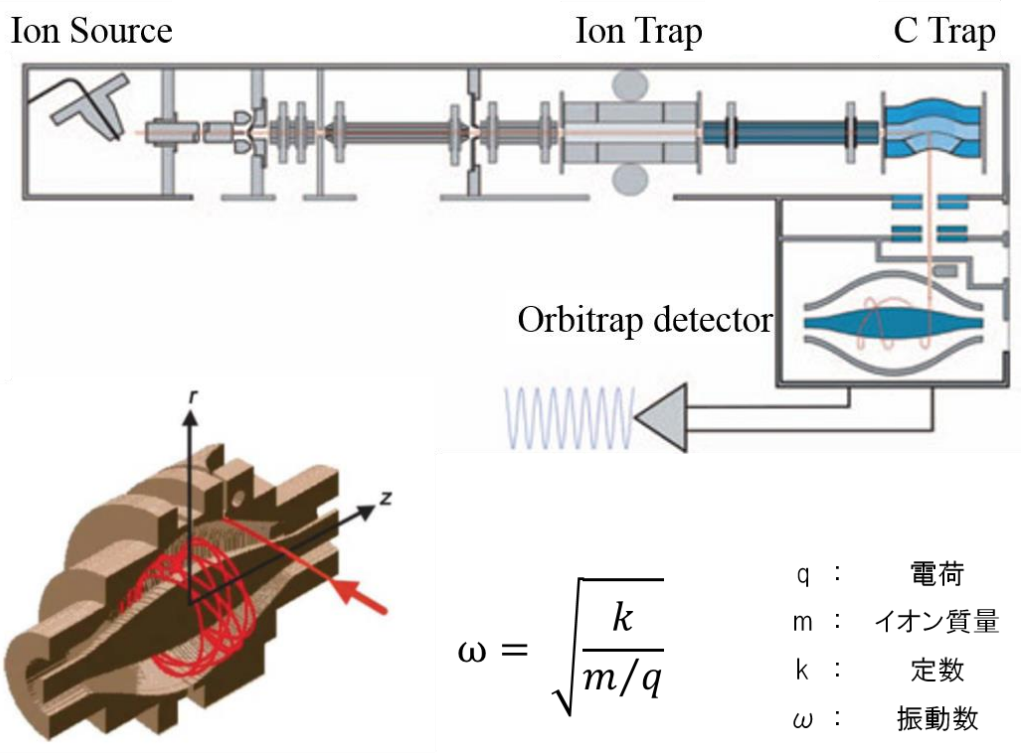


Fig. 1-2　Orbitrap 型 FT/MS [34, 36]

MS/MS とは、特定のイオン（プリカーサーイオン）の質量を選択した後、質量分析計内の衝突室で、不活性ガスと衝突させることによって分子を開裂させ、その壊れた分子（プロダクトイオン）のスペクトルを得ることである。プリカーサーイオンの不安定な結合部位が優先的に開裂するため、得られたプロダクトイオンのパターンから、その分子の構造情報を得ることができる。

質量分析計には、指定した *m/z* のイオンを溜め込むことができるイオントラップ機能を持つ装置や、多段の質量フィルターを持つ装置もある。分析の標的としている分子が決まっている場合には、四重極型やイオントラップ型の質量分析計を用いて測定対象の分子を選択的に測定することで、高感度な分析を行うことができる。（Fig. 1-3）

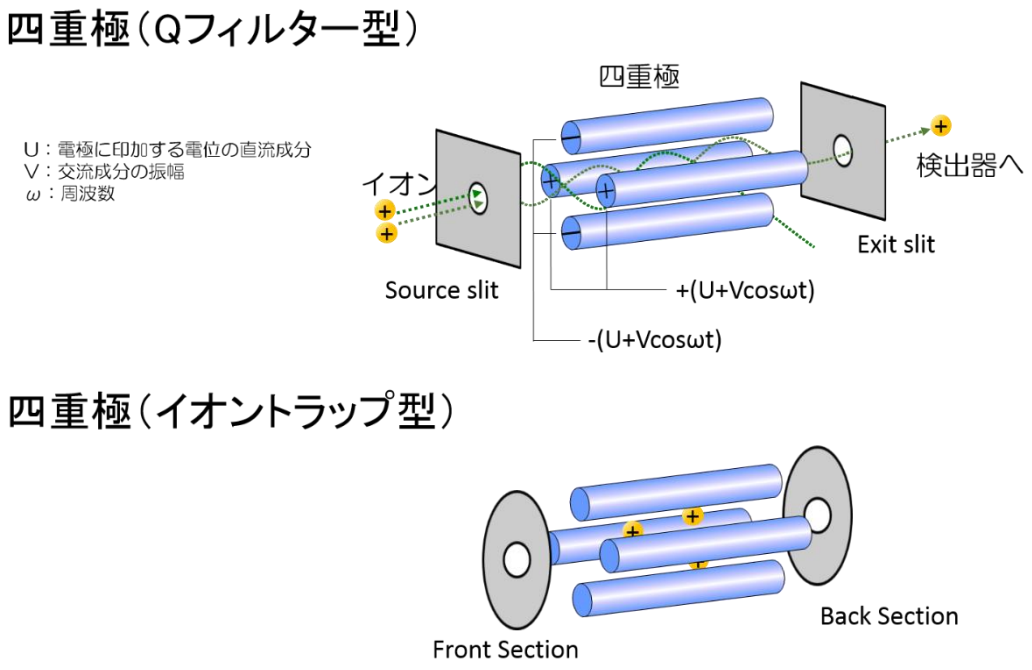


Fig. 1-3　四重極型 MS

このような装置では、MS/MS によって得られるプロダクトイオンを後段で選択し、より高感度で狙った分子のみを選択的に測定することができる、選択的反応モニタリング（Serected reaction monitering, SRM）法がある。（Fig. 1-4）

1 細胞分析は、網羅性や高感度といった利点から、主に質量分析計を用いて行われている[4]。ペプチドを分析するときには MALDI 法、そして低分子を分析するときには ESI 法を組み込んだ機種を使用して分析されることが多い。Lapainis らは、キャピラリー電気泳動法によって分離を行い、ESI 法でイオン化することによって、単離された 1 つの R2 神経細胞からメタボロミクスを行ったと報告している[37]。さらに、レーザーアブレーション ESI（LAESI）法によっても、1 細胞レベルでのメタボロミクスの報告がなされており[38]、1 細胞レベルでのメタボロミクスの研究は世界的にも進んでいる。そして更には、1 細胞の中の小器官の代謝物分析に向けて研究も進んできている[39, 40]。

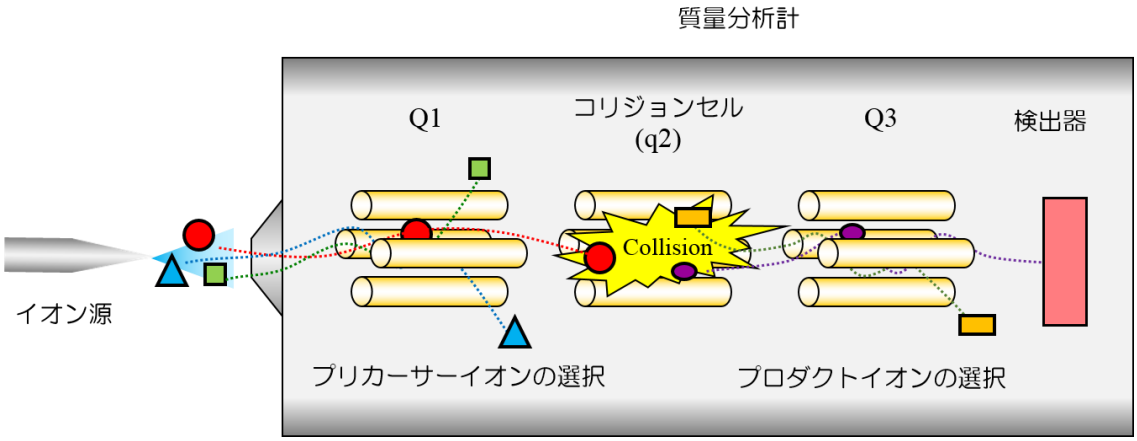


Fig. 1-4　Selected reaction monitering（SRM）法

１−１−３　ミトコンドリア

ミトコンドリアはほとんどの真核生物に存在し、一般的には直径 0.5μm 程度という、非常に小さな小器官であるが、常に分裂と融合を繰り返し、細胞の生命維持に重要な役割を担っている。

また、二重の生体膜に囲まれて、宿主である細胞とは異なる得意的なミトコンドリア DNA（mtDNA）を持っており、外膜と内膜で異なる機能を持っている。ミトコンドリアの外膜は比較的細胞質と近い組成をしており、分子量の小さな分子であれば自由に透過することが可能なチャネルを持っている。内膜はミトコンドリアに特異的な分子が多く取り込まれており、例として呼吸鎖複合体や、内膜に囲まれた内側であるマトリックスへの蛋白質輸送や、ミトコンドリアの分裂や融合に関わる蛋白質がある。このように、脂質もまた重要な役割を持っており、ミトコンドリアの機能を維持するためには無くてはならない存在である[41, 42]。さらに、特に不飽和脂肪酸は、過酸化物による影響に弱く、反応して構造が変化したり、生体に毒性を示す物質に変化することもある。そのため、慢性的な病気や急性的な痛みの原因となり得るので、病理生理学の観点からしても注目されている[43-48]。脂質の過酸化は、ミトコンドリアの膜を構成している脂質の構造も変化させ、膜の流動性を変化させる原因のひとつにもなる[49]。これらのことから、ミトコンドリアの脂質の分類、脂肪酸の炭素数、不飽和結合の数とその場所、そしてそれらの脂質が全体としてどのような割合で存在しているかを分析することための分析方法と

して、より高精度で高感度な方法の開発が望まれている。

その他、これらの mtDNA や膜に存在する特異的な蛋白質や脂質のため、他にもミトコンドリアに特徴的な代謝や機能を持つことができるようになっている。例として、細胞が必要としているエネルギーである、Adenocine tryphospho（ATP）のほとんどを産出したり、細胞質とミトコンドリア間でのカルシウム濃度の調整を行ったり[50]、酸化物を代謝したり、アポトーシスといった細胞のプログラム死の制御にも関わっている[1]。さらに、いくつか特異的な代謝経路も持っている。脂肪酸の酸化や、アミノ酸の酸化、ケトン体、ヘム、ピリミジン、ステロイド、尿素などの生合成に関わる代謝経路も存在する[51]。（Fig. 1-5）

ミトコンドリアの機能は、生体の恒常性機能に大きく関わっている。実際、遺伝的な要因や、外部からの刺激によってミトコンドリアが十分にその機能を働かせることができなくなった場合には、糖尿病やパーキンソン病、心臓病、ガンなど、様々な病気となることがある[52, 53]。

これらの原因を解明、治療に向けて研究を行うためには、ミトコンドリアを標的として代謝物の変化を分析する必要があるが、ミトコンドリアの分析方法としては、蛍光観察で 1 細胞内でのミトコンドリアの動きを観察する方法[3, 54-59]か、Schnaitman と Greenwalt によって報告された[60]、超遠心機を利用した濃度勾配分離法を拡張した手法で大量の細胞からミトコンドリアだけを単離して分子分析を行う方法[61-74]が一般的に

行われている。

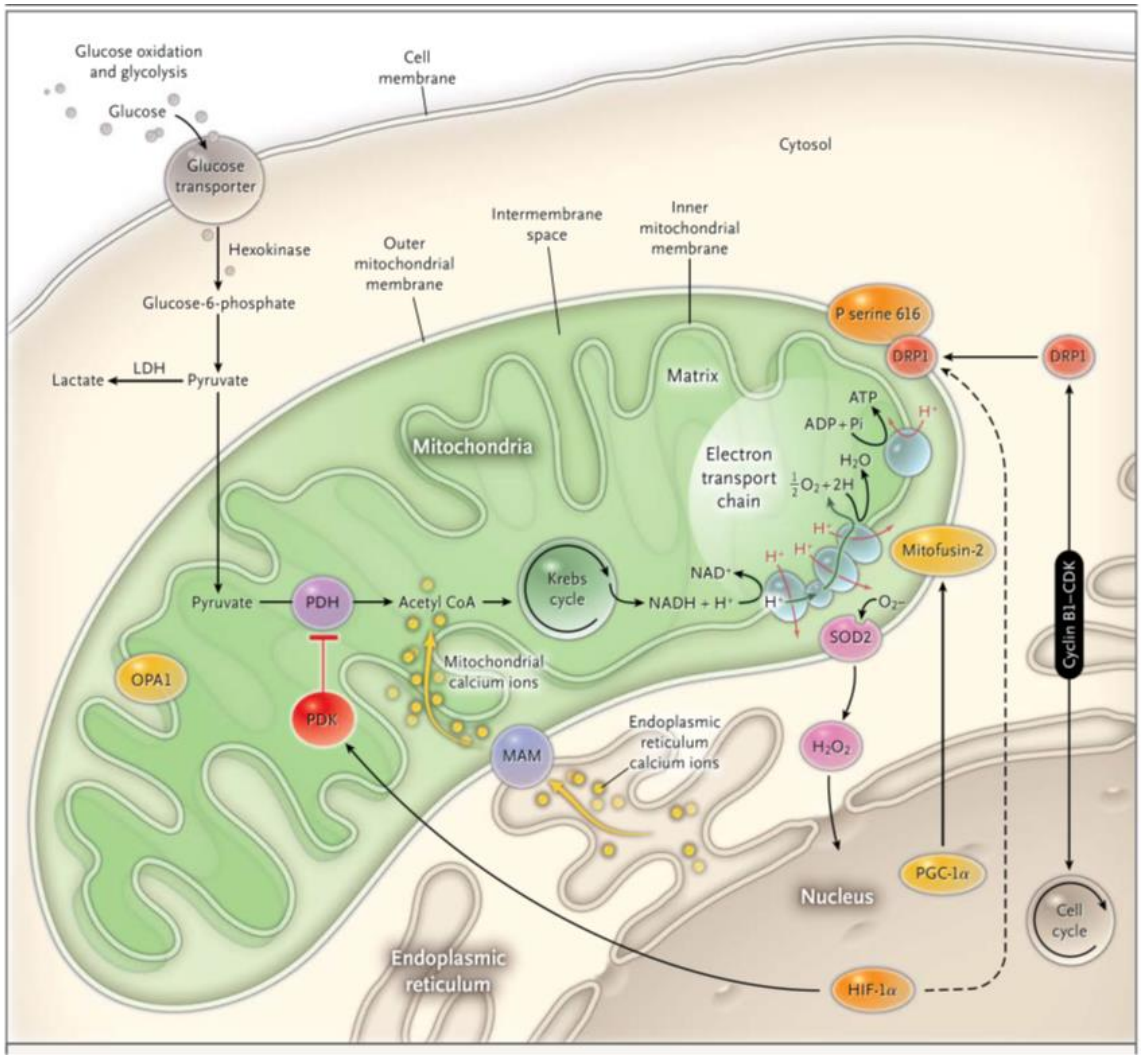


Fig. 1-5　ミトコンドリアに存在する代謝経路[1]

１-１-４　１細胞内のミトコンドリア代謝物分析

メタボロミクスは、細胞内や生体内で代謝される低分子を網羅的に研究することであ

り、標的分子を決定した分析では見つけることのできなかった、新しい病気のバイオマーカーや病気の原因、メカニズムを発見することが期待されている[75-77]。臨床の分野においては、代謝物は蛋白質や RNA と比べて、安定していると考えられている。疫学の研究分野では、メタボロミクスは、依然として、他の技術と組み合わせた研究が進んでいないとも言われていた。しかし、近年では様々な方向への応用も進み[17, 78]、それらを確証へと繋げる研究も、近い将来進んでいくことが期待される。

しかし、1 つの細胞レベルでのメタボロミクスは徐々に報告されてきているが[12, 14-16, 26-28, 37, 38]、1 つの生きた細胞の中にある小器官の情報を得ることは、非常に難しい。特にミトコンドリアについては、未だ報告された例を見つけることができていない。細胞を分析のために有機溶媒で処理した瞬間、または細胞を切り開くためにレーザーを当てた瞬間には、生きた細胞とはかけ離れた状態となっている可能性がある。さらに、代謝物は外部の環境変化や刺激に敏感に反応し、非常に短い時間で異なる分子に代謝されることもある。

そこで、私は 1 細胞質量分析法を使い[79]、生きた細胞からミトコンドリアを直接吸出し、代謝物を分析することとした。この方法は、顕微鏡下で生きた細胞を観察しながら、その細胞の狙った部分をサンプリングし[80, 81]、直接的に、そして素早く質量分析計にて分子分析することが可能である[82-84]。そして、ミトコンドリアメタボロミクスの確立、及びミトコンドリアへの分子が取り込まれる様子をリアルタイムで追跡することを目

指して研究を行った。

１-２　１細胞質量分析法の概要

１-２-１　細胞の前処理

ナノスプレーチップを使って生きたひとつの細胞から細胞成分を補足するために、37℃、5% CO_2 濃度で培養した細胞を、インキュベーターから取り出す。培地はアミノ酸等、様々な成分を含んでいるため、そのままサンプリングを行ったのでは、細胞由来の分子が検出できたのか、培地由来の分子が検出できたのか、判断が難しくなる。そのため、培地を Phosphate buffered saline（－）（PBS（－））で洗い、細胞培養用のバッファーに置換したものを、サンプリングに使用する。そして、そのバッファーを入れた細胞を顕微鏡下に設置し、細胞を観察する。

１-２-２　１細胞質量分析法による細胞小器官のサンプリング

顕微鏡には、ナノスプレーチップを取り付けるアダプター、そして 3 次元マニピュレーターを取り付けておく。そのマニピュレーターを操作し、細胞の狙った場所をサンプリングする。顕微鏡下で細胞を観察しながら、サンプリングする細胞を決定し、狙った箇所にナノスプレーチップを刺し、ナノスプレーチップに繋がったシリンジを引いて、細胞成分を吸引する。（Fig. 1-6）

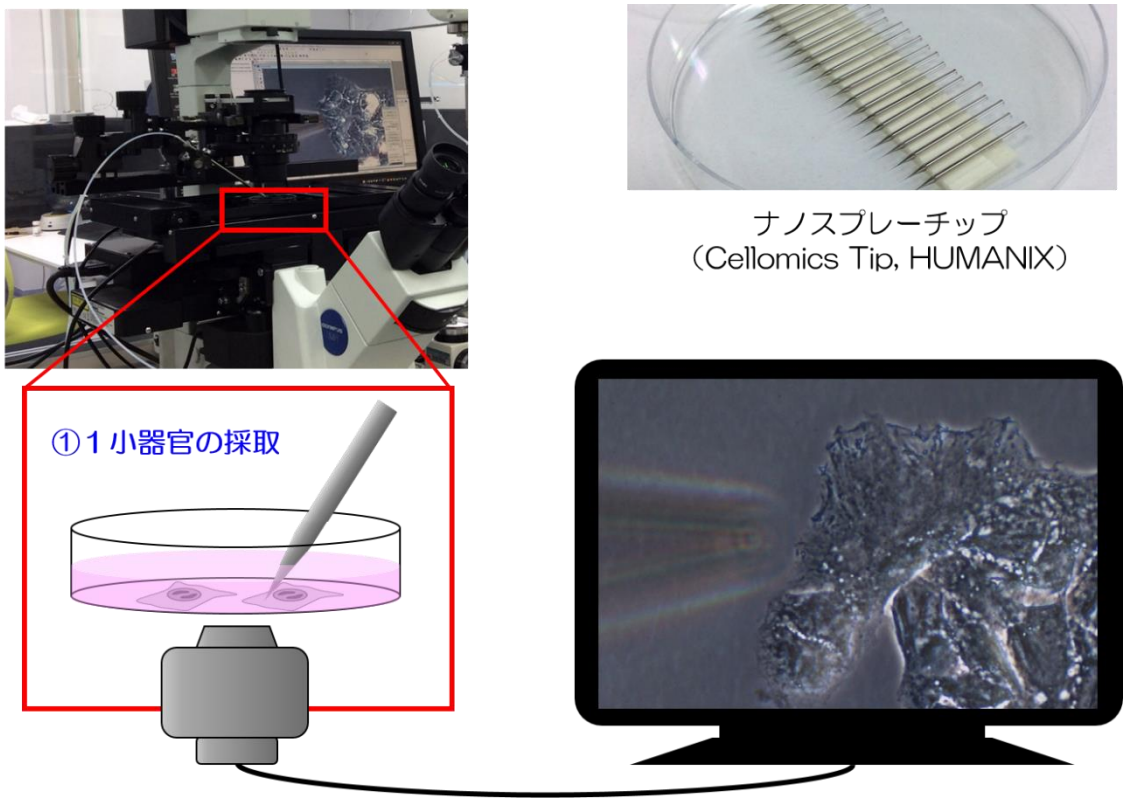


Fig. 1-6　１細胞質量分析法におけるサンプリング

１-２-３　細胞成分の検出とマススペクトルの解析

チップ内に捕捉した細胞成分をイオン化するため、イオン化促進溶媒として有機溶媒を、チップの後ろから添加する。そのチップを質量分析計の入り口に設置し、およそ 1kV の高電圧を印加する。そして、チップ内の分子が質量分析計にイオンとなって取り込まれていく。数百から数千もの分子ピークを得ることができる。（Fig. 1-7）質量分析で得られる分子ピーク（*m/z*, Intensity, Relative Intensity, Noise）を、エクセルでテキスト形式に変換する。分子の推定には、得られたイオンピークの精密質量の値を元に、Kyoto

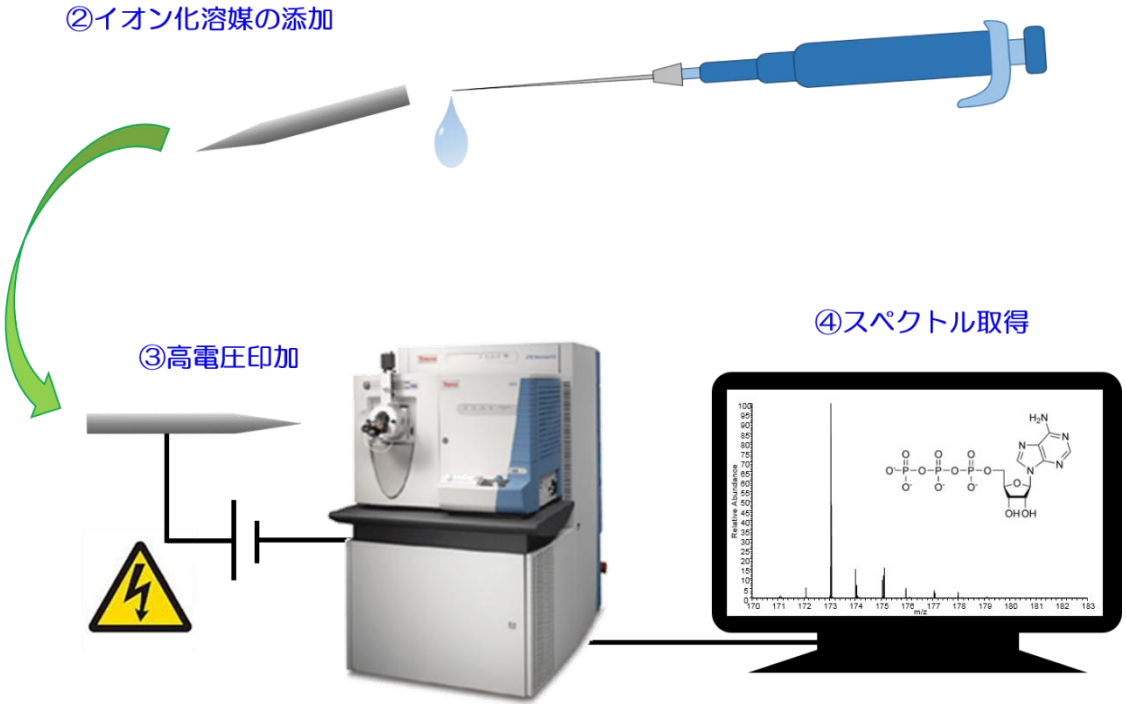


Fig. 1-7　1 細胞質量分析法におけるデータ取得

Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）[85]や LIPID Metabolites and Pathways Strategy（LIPID MAPS）[86]といったデータベースに掲載されている分子の精密質量データと照合を行う。分子の同定を行うためには、測定したサンプルの目的の分子ピークを MS/MS して得られたプロダクトイオンのパターンと、標品を MS/MS して得られたプロダクトイオンのパターンを比較する。もし標品を得ることが出来ない場合には、MassBank データベース[87]や MetFrag ウェブ解析ツール[88]などを使用して、プロダクトイオンのパターン比較を行う。得られた測定データについては、主成分解析（Principal Components Analysis, PCA）や t-検定を駆使し、各グループ間での分子パターンや特異的分子の探索

を行う。これらの解析を駆使していくことにより、細胞内の局在の情報や、細胞の分裂状態、環境変化に対する細胞の応答や、ガンなどの病気となったときの細胞と正常な細胞での分子の違い・変化を発見することができるようになることが期待される。

第 2 章

1 生細胞内ミトコンドリアの代謝物探索

２−１　緒言

生体が生命維持を行うためには、生体の最小単位である細胞の機能や分子挙動のメカニズムを明らかにすることが必要である。その細胞に含まれる小器官であるミトコンドリアは、生命を維持するために重要な役割を担っている。ミトコンドリアは細胞内で常時分裂と融合を繰り返しており、その形は様々である。そのミトコンドリアの状態は、細胞の状態を反映しているとも言われている。この動きと局在変化を観察するための方法としては、蛍光プローブを導入して顕微鏡で動きを観察するという手法が一般的に用いられている[3, 54-59]。ミトコンドリアを特異的に染色するプローブを細胞に導入し、蛍光を発するようになったミトコンドリアを経時的に観察することによって、細胞内でのミトコンドリアの細胞内での局在や分布、そしてその動きを分析することができる。また、蛍光プローブによっては、目的分子の濃度によってその蛍光強度を変化させるものがある。そのようなプローブを用いて観察することで、ミトコンドリア内での分子の量の変化を分析することも可能であるという利点がある。しかし、蛍光プローブは標的とする分子を染色するなどして高感度に検出するため、標的としている分子以外の分子の挙動は捕らえることができないという欠点がある。

メタボロミクスでは、標的となる分子を決定した分析では見つけることのできなかった、病気のバイオマーカーの発見や、病気のメカニズムを解明することが期待されている。ミトコンドリアにおいても、そのダイナミックな挙動の影で動いている分子解明や、ミトコンドリアを原因とした病気のバイオマーカー、病気のメカニズム解明などが望まれている。

従来のミトコンドリアを対象としたメタボロミクスの方法としては、超遠心機を利用した濃度勾配分離法[60]を拡張した方法が使われている。その方法によって単離したミトコンドリアを、ホモジナイズして有機溶媒で抽出したものをサンプルとして分析機器にかける。サンプルは、高圧グラジェント液体クロマトグラフィーで分子の物性によって分離され、その先に接続された NMR や MS で分子検出される[61-74]。

代謝物は体内で酵素によって反応を促進される、反応性の高い分子である。代謝物を検出することで、クエン酸（Tricarboxylic acid, TCA）サイクルやβ-酸化といった、細胞内で重要な代謝パスウェイの最終産物を知ることができる。物理的な刺激や遺伝的な変化によって起こる、代謝の表現系や代謝物の変化を調べることは、システムバイオロジーの領域が得意としている[89]。通常、何分も何十分もかけて測定するような、プロテオームやトランスクリプトームとは違い、メタボロームは数秒単位で変化することのある、非常に変化の大きいものである。メタボロームは非常に反応性が高いため、生物学的な表現系を測定することが困難であり、見た目では分からないような、細胞内部で起こっ

ている変化を見落としてしまう可能性がある[61]。

また、1 細胞レベルでのメタボロミクスを行った報告は近年増えてきているが[4, 37, 38]、依然として 1 つの生きた細胞の中にある小器官のメタボロミクスに成功したという報告はあまりされていない。そこには、代謝物を検出することの難しさがある。代謝物は外部の環境変化や刺激に敏感に反応して、短い時間で代謝され、異なる分子になるものもある。このことが、生体の生きた状態の代謝物を分析することを困難とする原因の 1 つとなっている[4]。さらには、1 細胞以上に微量な 1 細胞内小器官となると、量やばらつきの障害も出てくるため、更に困難な分析となってくる。

そこで、私は 1 細胞質量分析法をミトコンドリアのメタボロミクスに適用することにした。この方法により、ミトコンドリアの中における分子の挙動や生命現象のメカニズムを、より高速で、直接的に分析して、明らかにすることができると考えられる。

生きた細胞の中にあるミトコンドリアを観察するため、1 細胞質量分析法に蛍光観察を適用した。そして、蛍光プローブが蛍光を発している箇所を補足した。そして生きた細胞からミトコンドリアにはどのような代謝物が存在するのか探索した。そして、その分析を行うために必要であると考えられる条件の検討から行った。

２-２　微量分子の定量に向けた検討

細胞内では、膨大な量の低分子が常時動いており、細胞にかかるストレスや物理的・化学

的な外部からの刺激によって、細胞内の状態を一定に保っている。細胞内の状態を保つために、細胞内の低分子は外部の環境変化や刺激に敏感に反応し、非常に短い時間で異なる分子に代謝されることもある。そのため、細胞内の状態を正確に捉えるためには、細胞内分子を定量的に分析することが必要となってくる。

1 細胞質量分析法におけるサンプリングは、シリコンチューブを介してナノスプレーチップをシリンジに接続しており、そのシリンジを引いて吸引している。シリンジを引く力を一定にしている、顕微鏡で観察しながら同程度の量を吸引している、という方法はとっているが、正確にどのくらい吸引できたかを調べる必要がある。この問題については、サンプリングした直後のチップを実体顕微鏡で観察し、チップ内に入っている細胞内成分の容量を計算することで、解決できると考えた。

さらに、細胞成分を吸引するナノスプレーチップはガラスで作られており、チップ内に細胞成分が吸着され、サンプリング量に比例した分子検出ができているかを調べる必要がある。ガラスは表面にシリカゲル由来のヒドロキシル基が出ており、そこに分子が吸着する可能性が考えられるため、このヒドロキシル基を別の物質で覆うことができれば、チップへの分子の吸着を抑えることができると考えた。

そこで、サンプリング直後のチップ内を観察してサンプリング量を見積もること、質量分析で測定する際の補正によってイオン検出量のばらつきを改善することに挑戦した。

２-２-１　サンプリング量の見積もり

ナノスプレーチップを使って生きたひとつの細胞から細胞成分を補足するために、37℃、5% CO_2 濃度で培養した細胞を、インキュベーターから取り出し、培地を PBS（－）で洗い、細胞培養用のバッファーに置換した。そして、そのバッファーを入れた細胞を顕微鏡下に設置し、細胞を観察した。顕微鏡下で細胞を観察しながら、顕微鏡に取り付けた 3 次元マニピュレーターを操作し、サンプリングする細胞の狙った箇所にナノスプレーチップを刺し、ナノスプレーチップに繋がったシリンジを引いて、細胞成分を吸引した。

細胞成分を吸引したナノスプレーチップを、実体顕微鏡（M205FA, Leica）下に設置し、チップ内にある物質の量を観察した。(Fig. 2-1) そして、チップの内側の形を、頂点部分が

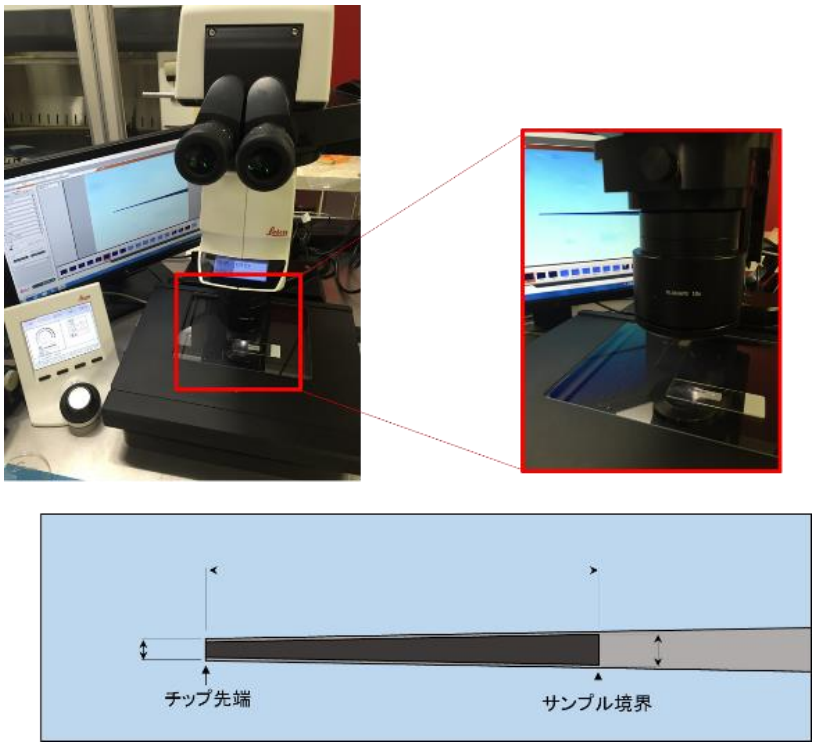


Fig. 2-1　細胞成分をサンプリング後、チップ先端を顕微鏡下で観察している様子

無い円錐と近似し、積分を行うことによってチップ内の細胞成分の量を見積もった。

２-２-２　イオン検出量のばらつきの補正

コーティングについて

まず、チップ内の分子がチップ内でガラスにどのくらい吸着しているか確かめるため、80%メタノールに溶かしてそれぞれ 1μM に調整したアミノ酸 20 種類をサンプルとして 3μL ナノスプレーチップに注入し、m/z の幅をアミノ酸が全て検出されるよう 70-270 に設定し、5 分間測定を行った。(Table. 2-1)

コーティングの検討として、1g/L に調整したポリ-L-リジンを使用することにした。チップ内にポリ-L-リジンを 5μL 入れ、1 時間室温で保管した。その後、ポリ-L-リジンの入ったチップに逆遠心をかけ、チップ内のポリ-L-リジンを全て取り除き、それから全て 1μM に調整したアミノ酸 20 種類をそれぞれ 80%メタノールに溶かしたサンプルを、コーティングしたナノスプレーチップに 3μL 注入し、先ほどの場合と同様に、m/z の幅をアミノ酸が全て検出されるよう 70-270 に設定し、5 分間測定を行った。

そして、各アミノ酸の検出される様子を、時間経過を追いながら観察し、時間経過によるピーク強度の変化を調べた。サンプルを測定している際には、同じチップで同様に測定していたとしても、装置の状態やスプレーの状態によって、スペクトルのピーク強度の増減が生じるため、評価に使用する時点のピーク強度が偶然によって高かったり低かったりすることがある。その偶然のばらつきによる考慮を減らし、スプレー効率の傾向を観察するために、

アミノ酸	組成式	$[M+H]^+$	^{15}N AAmix $[M+H]^+$
Glycine	C2H5NO2	76.03730	77.03434
Alanine	C3H7NO2	90.05495	91.05199
Serine	C3H7NO3	106.04986	107.04690
Proline	C5H9NO2	116.07060	117.06764
Valine	C5H11NO2	118.08625	119.08329
Threonine	C4H9NO3	120.06551	121.06255
Cysteine	C3H7NO2S	122.02702	123.02406
Leucine	C6H13NO2	132.10190	133.09894
Isoleucine	C6H13NO2	132.10190	133.09894
Asparagine	C4H8N2O3	133.06052	135.05459
Aspartic acid	C4H7NO4	134.04478	135.04182
Glutamine	C5H10N2O3	147.07641	149.07048
Lysine	C6H14N2O2	147.11280	149.10687
Glutamic acid	C5H9NO4	148.06043	149.05747
Methionine	C5H11NO2S	150.05832	151.05536
Histidine	C6H9N3O2	156.07675	159.06786
Phenylalanine	C9H11NO2	166.08626	167.08330
Arginine	C6H14N4O2	175.11895	179.10709
Tyrosine	C9H11NO3	182.08116	183.07820
Tryptophan	C11H12N2O2	205.09715	207.09122

Table. 2-1　補正に使用したアミノ酸と、その安定同位体の組成式と *m/z*

線形最小二乗近似の傾きを算出した。線形最小二乗近似の傾きが正であれば、プロットされたグラフは右肩上がりになっており、イオン強度では時間が経過するごとに徐々に分子が検出されていっていることを示している。逆に傾きが負であれば、プロットされたグラフは右肩下がりになっており、イオン強度では時間が経過するごとに徐々に検出される分子が減っていることを示している。傾きが 0 は横軸に平行なグラフを示しており、時間によって分子の検出に変化がないことを示していることになる。そこで、5 分間測定した結果のイオン強度の線形最小二乗近似の傾きを求め、その値が 0 に近いほど 5 分間安定してデータの取得ができていると判断した。また、吸着の減少を確認するため、5 分間で検出されたイオンの総量も確認し、増加率を算出することで、イオンの吸着の増減を調べた。

スプレー効率について

次に、チップから質量分析計に向かって放出されるスプレーのイオン化効率のばらつきを補正するため、内標をイオン化溶媒に添加することにした。

補正の検討として、安定同位体アミノ酸ミックス（"CELL FREE" AMINO ACID MIX (20 AA) (U-15N, 96-98%), NLM-6695-PK, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.）を H2O に 1g/L で溶かしたサンプルを使用することにした。ここで使用したアミノ酸ミックスは、分子内の窒素が全て ^{14}N から ^{15}N に置き換わっており、検討の対象としているアミノ酸とは、分子量が異なっている。しかし、物性は同じものであるため、極性や気化のし易さは同

じであり、イオン化の効率も変わらない。そのため、内標を入れることによる補正を行うためには最適であると判断した。

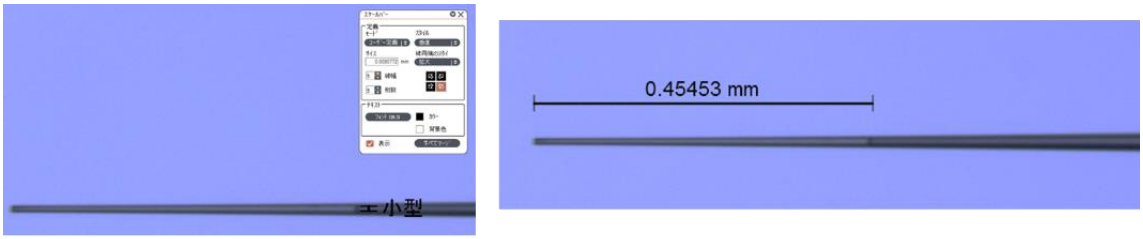
イオン化効率の補正の検討として、80%メタノールに溶かしてそれぞれ 1μM に調整したアミノ酸 20 種類（Table. 1）900μL に、安定同位体アミノ酸ミックスのサンプルを、100μL 添加したものをサンプルとして 3μL ナノスプレーチップに注入し、m/z の幅をアミノ酸が全て検出されるよう 70-270 に設定し、ポジティブイオンモードで 5 分間の測定を 3 回行った。

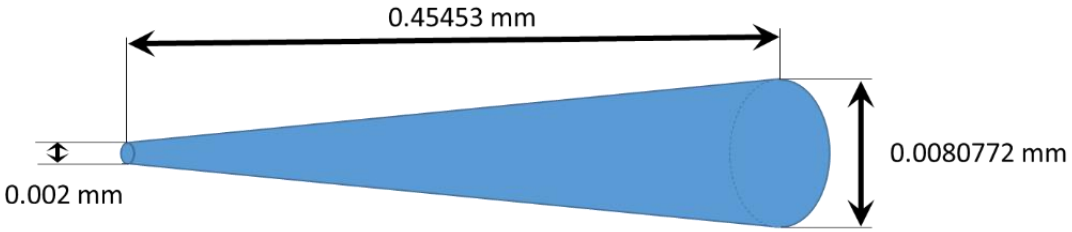
そして、各アミノ酸の検出されたイオン強度のばらつきを、5 回測定したときの補正前の平均値と分散、補正後の平均値と分散を計算することによって比較検討した。

２-２-３　結果・考察

サンプリング量について

サンプリング量は、吸引できたおよその量を計算することが可能であった。検討で試したように、サンプリングを吸引した後に、速やかに吸引量を顕微鏡で観察し、計算することによって、サンプリングした量を大まかには知ることが可能となった。サンプリング量を知ることができるようになったので、この量と、質量分析で得られたピーク強度を使って逆算することで、今後は細胞内・小器官内に含まれる代謝物の濃度を推定することが可能になると考えられる。





$$V = \int_{0}^{1.1668} \pi \left(\frac{0.0080772/2 - 0.002/2}{0.45453} x + 0.002/2 \right)^2 dx = 0.00001\ (\mathrm{mm})^3$$

Fig. 2-2　吸引量の計算

コーティングについて

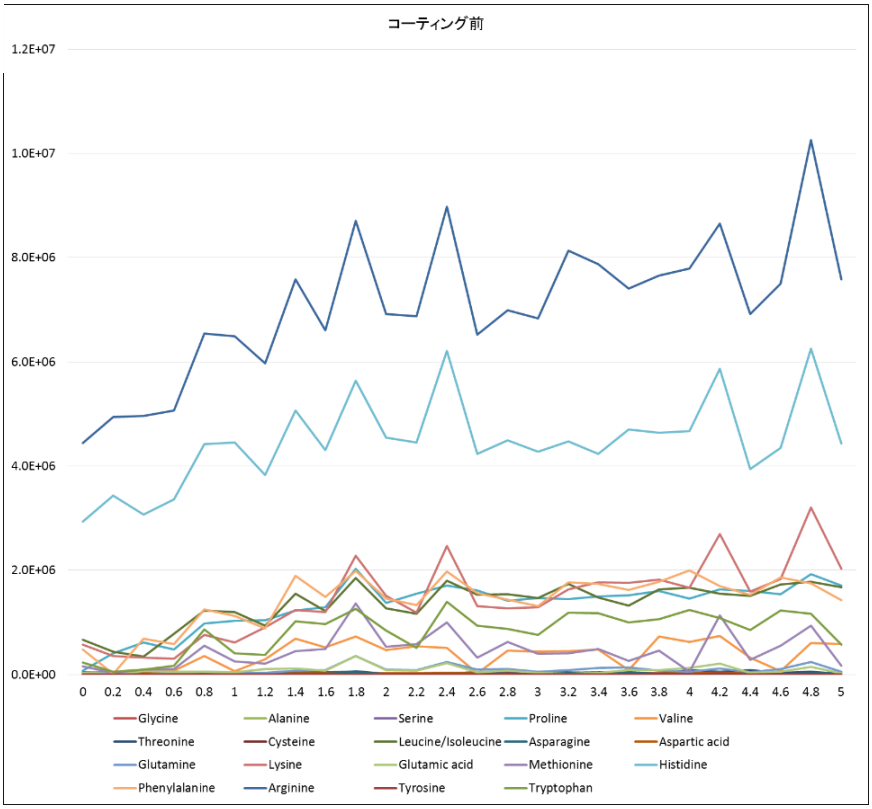
チップへの分子の吸着について、測定した 20 種類のアミノ酸のうち、18 のアミノ酸が検出できた。(Table 5) コーティング前のイオン強度の経時的変化を折れ線グラフにしたものを Fig. 2-3 (A)、コーティング前のイオン強度の経時的変化を折れ線グラフにしたものを Fig. 2-3 (B)として表した。コーティングする前の線形最小二乗近似の傾きを求めたところ、-1068～632028 であった。18 のアミノ酸のうち、15 で傾きが正であり、このうち、線形最小二乗近似の傾きが 50000 以上であったアミノ酸は 9 あった。コーティングした後の線形最小二乗近似の傾きを求めたところ、-26828～35213 であった。18 のアミノ酸のうち、5

つのアミノ酸で傾きが正であり、このうち、線形最小二乗近似の傾きが 50000 以上であったアミノ酸は 1 つもなかった。

アミノ酸	[M+H]+	線形最小二乗近似の傾き			総イオン量		
		コーティング前	コーティング後	Fold Change	コーティング前	コーティング後	増加率 (%)
Glycine	76.0373	0	0	#DIV/0!	0	0	#DIV/0!
Alanine	90.0550	0	224	#DIV/0!	0	11915	#DIV/0!
Serine	106.0499	2717	-2356	0.75201	431869	374637	-13.25
Proline	116.0706	242621	-18759	0.00598	34270939	45604892	33.07
Valine	118.0863	71936	-18157	0.06371	10046313	12233437	21.77
Threonine	120.0655	6427	-1186	0.03404	880245	927966	5.42
Cysteine	122.0270	0	0	#DIV/0!	0	0	#DIV/0!
Leucine / Isoleucine	132.1019	207301	-15258	0.00542	35116011	40348895	14.90
Asparagine	133.0605	-1068	1874	3.07969	770958	996423	29.24
Aspartic acid	134.0448	-2205	-624	0.08006	401778	57973	-85.57
Glutamine	147.0764	13268	13659	1.05976	2480066	4365627	76.03
Lysine	147.1128	381209	-10147	0.00071	37616336	50052318	33.06
Glutamic acid	148.0604	4017	4112	1.04796	2268339	1353557	-40.33
Methionine	150.0583	58779	-2635	0.00201	11932740	6326325	-46.98
Histidine	156.0768	277515	-9873	0.00127	116337061	120042136	3.18
Phenylalanine	166.0863	232174	-23608	0.01034	36672000	40329611	9.97
Arginine	175.1190	632028	35213	0.00310	184205214	181196855	-1.63
Tyrosine	182.0812	2156	-4137	3.68259	135926	293082	115.62
Tryptophan	205.0972	166397	-26828	0.02599	21350397	17804863	-16.61

Table. 2-2　コーティングの前後で検出できたアミノ酸のピーク強度の変化

(A)



(B)

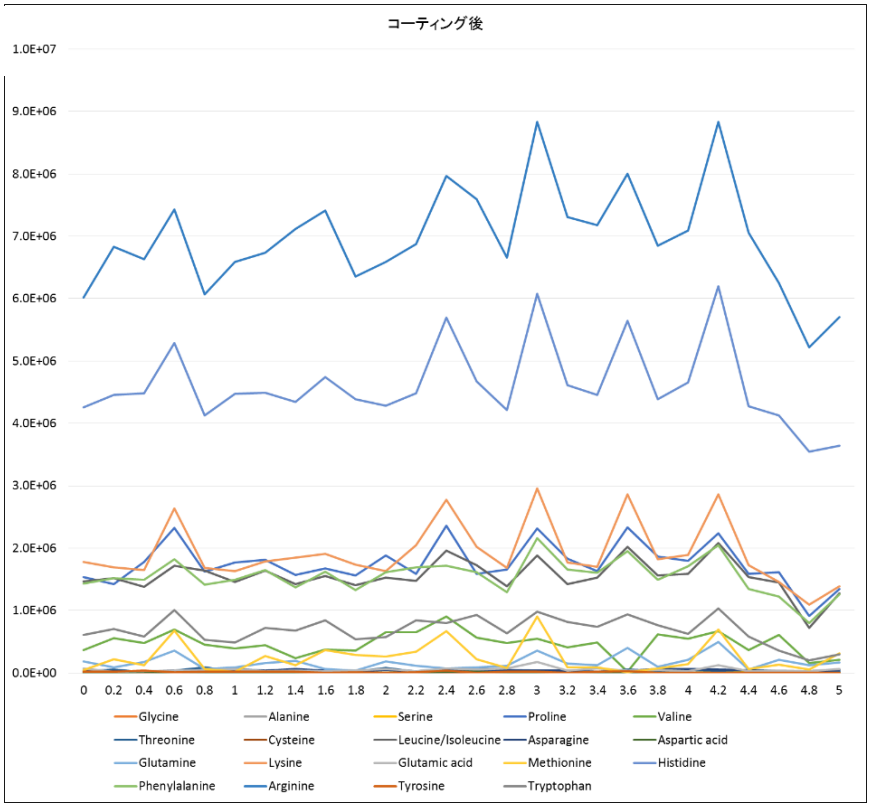


Table. 2-2　コーティング前(A)とコーティング後(B)におけるイオン強度の経時変化

コーティング前のイオン強度の時間変化を追跡した測定結果からは、線形最小二乗近似の傾きが大きなアミノ酸が多く検出された一方で、コーティングを施した後のチップで測定したイオン強度の時間変化を追跡した結果からは、線形最小二乗近似の傾きが大きなアミノ酸は比較的少なくなった。また、18 のアミノ酸のうち、12 でコーティングによるイオン量の増加が確認された。（Table. 2-2 の赤く塗ったセル）

検出できた 18 アミノ酸のうち、コーティング前とコーティング後の各アミノ酸の、線形最小二乗近似の傾きを比較したところ、コーティングをすることによって 14 のアミノ酸で傾きの減少、12 のアミノ酸でイオン量の増加が確認されたことから、コーティングを行うことにより、チップ内への分子の吸着を抑えることが可能であることが示唆された。

スプレー効率について

イオン化効率の補正については、測定した 20 種類のアミノ酸のうち、14 のアミノ酸が検出できた。5 回測定した結果では、補正する前のイオン強度の分散が 3.49×E3～2.51×E6 であり、分散を平均で割った値である CV 値が 56%～102%であった。（Table. 2-3 (A)）安定同位体のアミノ酸ミックスを使って補正を行ったところ、5 回測定した結果のイオン強度の分散が 3.39×e4～6.88×e6 であり、分散を平均で割った値である CV 値が 56%～102%となった。（Table. 2-3 (B)）

アミノ酸	[M+H]+	Data 1	Data 2	Data 3	Data 4	Data 5	平均値	分散	CV 値
Glycine	76.0373	0	0	0	0	0	0	0	
Alanine	90.0550	0	0	0	0	0	0	0	
Serine	106.0499	0	0	0	0	0	0	0	
Proline	116.0704	1270875.1	7572.8	2162772.3	68191.6	2140634.5	1130009.3	9.48E+05	84
Valine	118.0860	397983.5	1097.4	956604.6	9336.3	734748.6	419954.1	3.83E+05	91
Threonine	120.0652	30951.3	70.2	86518.4	679.9	36671.9	30978.3	3.16E+04	102
Cysteine	122.0270	0	0	0	0	0	0	0	
Leucine/ Isoleucine	132.1017	1274550	3205.3	1986239.9	31329.7	1857915.6	1030648.1	8.62E+05	84
Asparagine	133.0606	24213.7	112	41906.8	1301.5	25412.5	18589.3	1.59E+04	85
Aspartic acid	134.0448	0	0	0	0	0	0	0	
Glutamine	147.0763	65697.9	1930.4	211034.9	13084.7	107736.1	79896.8	7.58E+04	95
Lysine	147.1127	1318459.8	104020.5	1320261.5	548707.8	1786418.4	1015573.6	6.05E+05	60
Glutamic acid	148.0604	0	0	0	0	0	0	0	
Methionine	150.0581	404094.5	1634.6	1042698.9	12612.9	607460	413700.2	3.91E+05	94
Histidine	156.0765	4175669	349337.7	3412764.8	1459267.8	4460233	2771454.5	1.60E+06	58
Phenylalanine	166.0860	1334551	3421.7	2439029.3	31457	1929831	1147658.0	9.87E+05	86
Arginine	175.1188	6684620.5	600509.8	5524357	2436238.5	6995109.5	4448167.1	2.51E+06	56
Tyrosine	182.0807	6250.8	0	12709.3	83.1	8291.6	5467.0	4.90E+03	90
Tryptophan	205.0968	756539.6	2874.7	1153814.3	29126	928159.9	574102.9	4.73E+05	82

Table. 2-3 (A)　アミノ酸の実測値（5 回測定）

アミノ酸	[M+H]+	Data 1	Data 2	Data 3	Data 4	Data 5	平均値	分散	CV 値
Glycine	77.0343	0	0	0	0	0	0	0	
Alanine	91.0520	550496.9	553.3	1499965.8	6105.6	897619.1	590948.1	5.68E+05	96
Serine	107.0469	25403.4	24.2	92841.2	448.5	33831.3	30509.7	3.39E+04	111
Proline	117.0676	3399275.3	36732.8	5028883	382901.6	5037485.5	2777055.6	2.18E+06	79
Valine	119.0833	3198969.5	8850.8	4890816.5	110449.7	4354556	2512728.5	2.08E+06	83
Threonine	121.0626	436157.8	686.2	1508122.4	6108.7	682379.8	526691.0	5.56E+05	105
Cysteine	123.0241	0	0	0	0	0	0	0	
Leucine/ Isoleucine	133.0984	11596871	140330.1	16051348	1090682.1	15250543	8825954.8	6.88E+06	78
Asparagine	135.0546	309746.9	1415.2	916772	14196.2	555237.6	359473.6	3.46E+05	96
Aspartic acid	135.0418	0	0	0	0	0	0	0	
Glutamine	149.0705	78826.5	914.7	380227.3	6856.4	114722.5	116309.5	1.39E+05	119
Lysine	149.1069	498052.8	44125.8	979627.1	147991.8	541528.2	442265.1	3.31E+05	75
Glutamic acid	149.0575	0	0	0	0	0	0	0	
Methionine	151.0554	397914.4	1374.4	968030.7	12209.4	587957.5	393497.3	3.65E+05	93
Histidine	159.0679	1460256.4	94752.5	1125246.4	466343.9	1616829.9	952685.8	5.83E+05	61
Phenylalanine	167.0833	3136466	9335.5	5082713.5	134344.7	4178231.5	2508218.2	2.08E+06	83
Arginine	179.1071	9587306	862349.9	8021715.5	3493634	10118011	6416603.3	3.63E+06	57
Tyrosine	183.0782	1016504.9	1771	1940041.6	16863.8	1263100.3	847656.3	7.48E+05	88
Tryptophan	207.0912	2517457.8	10813.9	3259853.5	152827.6	2809965	1750183.6	1.38E+06	79

Table. 2-3 (B)　アミノ酸同位体の実測値（5 回測定）

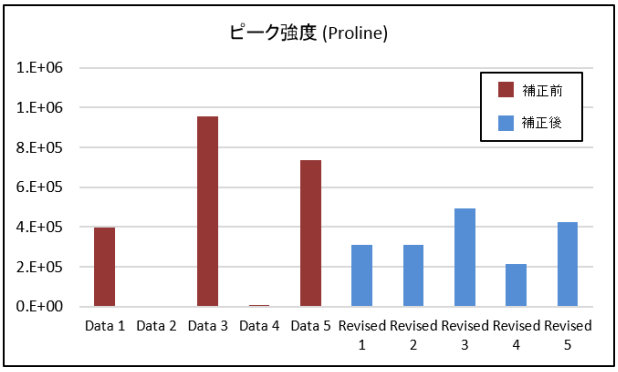
検出できた 14 のアミノ酸を、それぞれの同位体のピーク強度で割り、安定同位体の平均値を掛けることによって、補正を行った。各アミノ酸の安定同位体の平均値と比較し、ピーク強度が高いサンプルはピーク強度を低く換算し、安定同位体の平均値と比べて、ピーク強度が低いサンプルはピーク強度を高く換算することで、ばらつきを補正しつつ、実測値に近い値を算出することができた。（Table. 2-4）5 回測定した結果では、補正した後のイオン強度の分散が 3.11×E3～4.03×E5 であり、分散を平均で割った値である CV 値が 1%～56%まで抑えることができた。補正前のデータの CV 値を、補正後の CV 値で割ることによって、各アミノ酸の CV 値の変化率を求めた。その結果、イオンを検出することができた全てのアミノ酸で、変化率が 1 以上となっており（Table. 2-4 の赤く塗ったセル）、補正を行うことによって、測定の分散を小さく抑えることが可能であり（Fig. 2-4 (A)-(M)）、それによって CV 値を小さく抑えることができたことを表している。

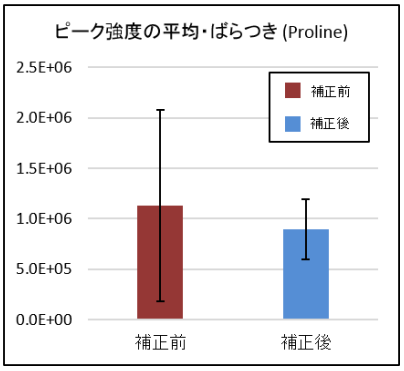
安定同位体を使って補正することによって、スプレー効率によるばらつきを抑えることが可能であった。このように、いくつかのサンプルを測定する際に、予め *m/z* の値が分かっている分子を決まった量だけ入れておき、そのイオンのピーク強度を使って補正を行うことで、チップのロットによるスプレー効率の違いからくるスペクトルのばらつき、測定器の状態によるスペクトルのばらつきを小さく抑えることが可能となることが分かった。測定によるばらつきを抑えることができるようになったので、今後は、細胞内・小器官内に含まれる代謝物の濃度を今まで以上に安定して推定し、細胞内の微細な分子変化を捉えるこ

アミノ酸	Revised 1	Revised 2	Revised 3	Revised 4	Revised 5	平均値	分散	CV 値	変化率
Glycine	0	0	0	0	0	0	0		
Alanine	0	0	0	0	0	0	0		
Serine	0	0	0	0	0	0	0		
Proline	1038248.0	572515.2	1194328.6	494570.6	1180085.0	895949.5	3.02E+05	34	2.49
Valine	312608.3	311550.2	491469.6	212400.6	423975.2	350400.8	9.73E+04	28	3.28
Threonine	37375.9	53881.8	30215.4	58620.9	28305.0	41679.8	1.24E+04	30	3.44
Cysteine	0	0	0	0	0	0	0		
Leucine/ Isoleucine	970013.4	201594.9	1092149.0	253524.4	1075232.5	8825954.8	6.88E+06	78	1.49
Asparagine	28101.0	28449.0	16432.0	32956.3	16452.6	24478.2	6.78E+03	28	3.09
Aspartic acid	0	0	0	0	0	0	0		
Glutamine	96938.1	245461.7	64554.4	221964.1	109226.4	147628.9	7.22E+04	49	1.94
Lysine	1170777.1	1042579.2	596048.9	1639782.3	1458964.8	1181630.5	3.60E+05	30	1.95
Glutamic acid	0	0	0	0	0	0	0		
Methionine	399608.8	467993.8	423849.3	406501.7	406549.6	420900.6	2.49E+04	6	16.0
Histidine	2724248.0	3512404.1	2889405.1	2981112.7	2628106.2	2947055.2	3.08E+05	10	5.52
Phenylalanine	1067234.6	919326.3	1203612.6	587302.8	1158489.5	987193.2	2.22E+05	23	3.82
Arginine	4473890.6	4468294.3	4418955.9	4474531.7	4436133.0	4454361.1	2.27E+04	1	111
Tyrosine	5212.5	0	5553.0	4177.0	5564.4	4101.4	2.11E+03	52	1.74
Tryptophan	525960.4	465257.9	619471.6	333551.3	578103.4	504468.9	9.99E+04	20	4.16

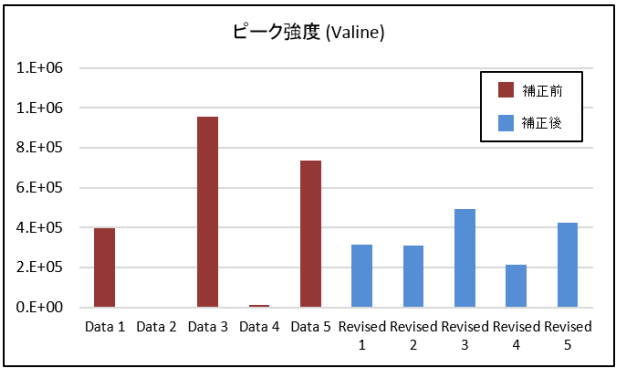
Table. 2-4　アミノ酸同位体を使って補正を行った後のイオン強度

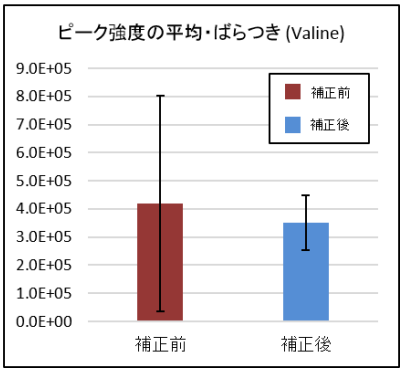
(A)


ピーク強度 (Proline)
1.E+06
1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

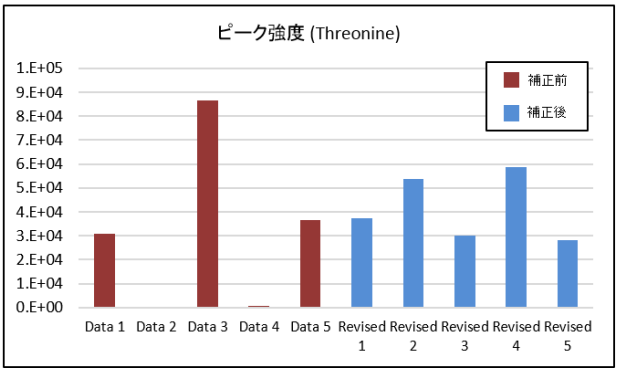

ピーク強度の平均・ばらつき (Proline)
2.5E+06
2.0E+06
1.5E+06
1.0E+06
5.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

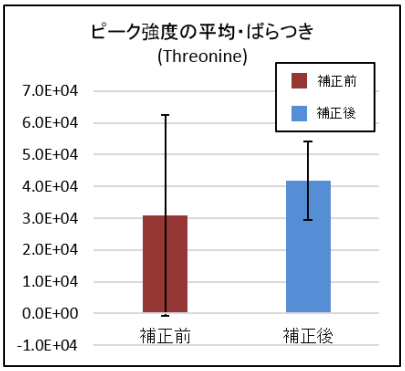
(B)


ピーク強度 (Valine)
1.E+06
1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

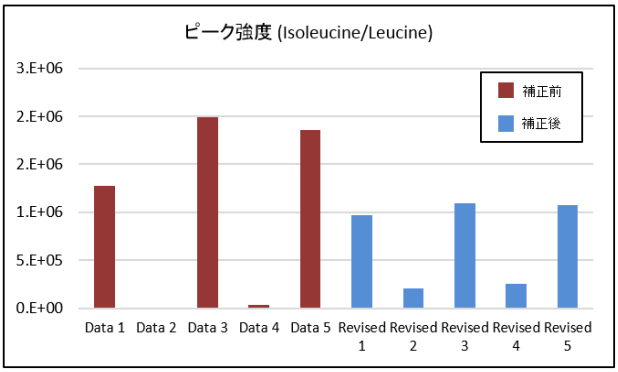

ピーク強度の平均・ばらつき (Valine)
9.0E+05
8.0E+05
7.0E+05
6.0E+05
5.0E+05
4.0E+05
3.0E+05
2.0E+05
1.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

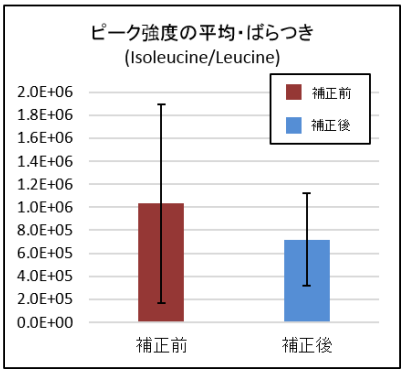
(C)


ピーク強度 (Threonine)
1.E+05
9.E+04
8.E+04
7.E+04
6.E+04
5.E+04
4.E+04
3.E+04
2.E+04
1.E+04
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

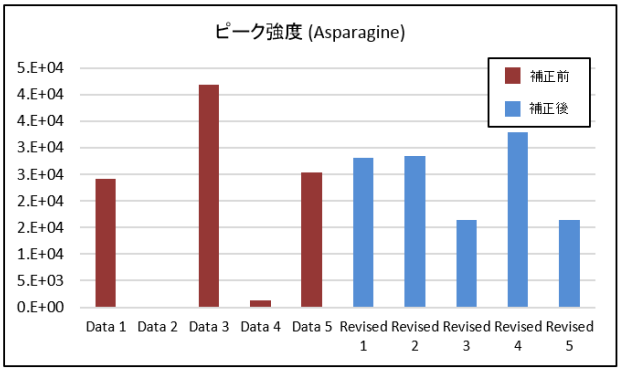

ピーク強度の平均・ばらつき
(Threonine)
7.0E+04
6.0E+04
5.0E+04
4.0E+04
3.0E+04
2.0E+04
1.0E+04
0.0E+00
-1.0E+04
補正前
補正後
補正前
補正後

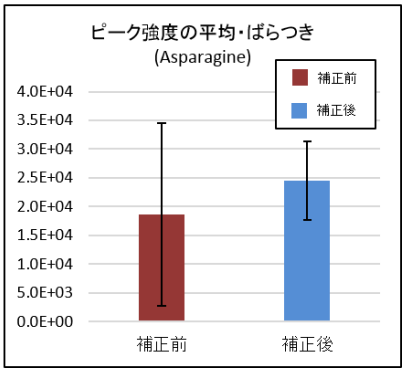
(D)


ピーク強度 (Isoleucine/Leucine)
3.E+06
2.E+06
2.E+06
1.E+06
5.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

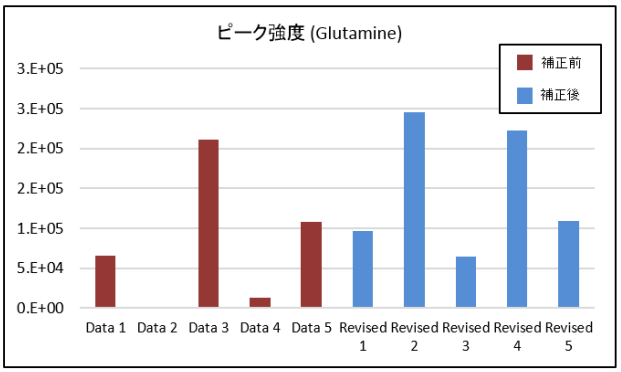

ピーク強度の平均・ばらつき
(Isoleucine/Leucine)
2.0E+06
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

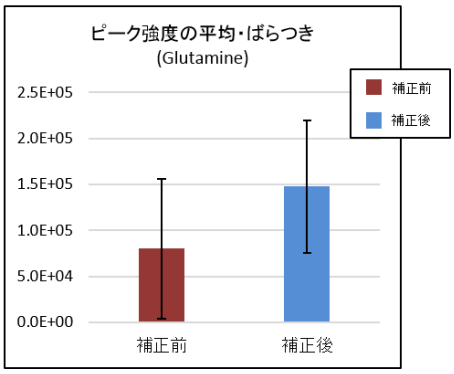
(E)


ピーク強度 (Asparagine)
5.E+04
4.E+04
4.E+04
3.E+04
3.E+04
2.E+04
2.E+04
1.E+04
5.E+03
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

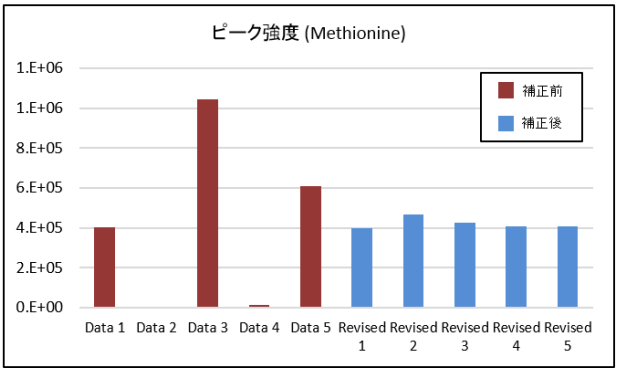

ピーク強度の平均・ばらつき
(Asparagine)
4.0E+04
3.5E+04
3.0E+04
2.5E+04
2.0E+04
1.5E+04
1.0E+04
5.0E+03
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

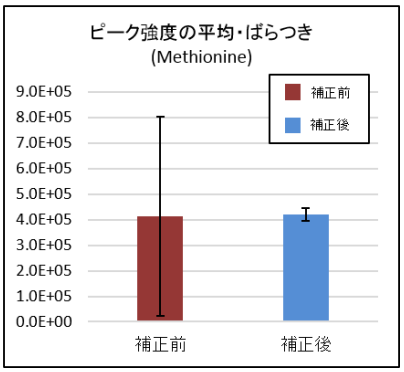
(F)


ピーク強度 (Glutamine)
3.E+05
3.E+05
2.E+05
2.E+05
1.E+05
5.E+04
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

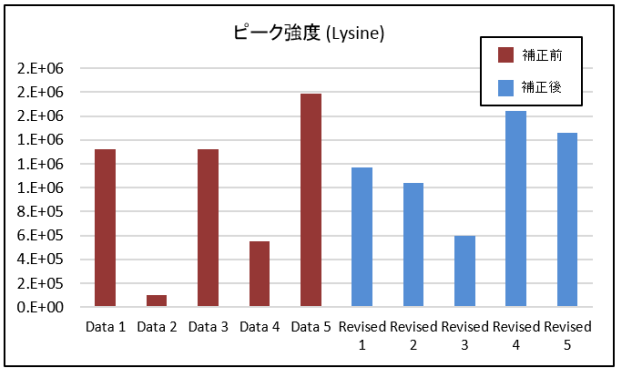

ピーク強度の平均・ばらつき
(Glutamine)
2.5E+05
2.0E+05
1.5E+05
1.0E+05
5.0E+04
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

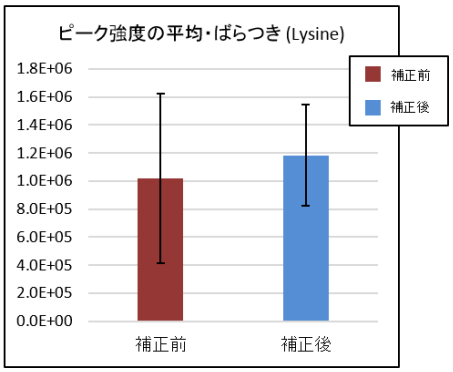
(H)


ピーク強度 (Methionine)
1.E+06
1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

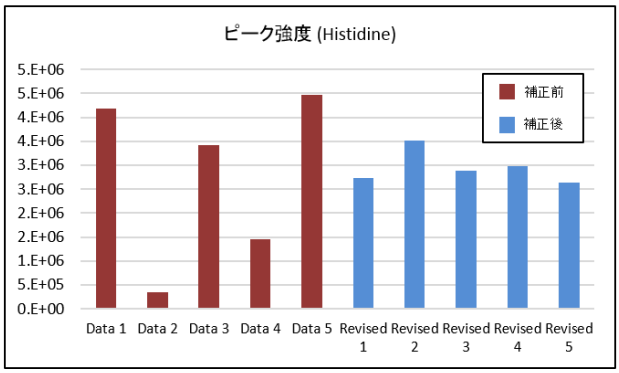

ピーク強度の平均・ばらつき
(Methionine)
9.0E+05
8.0E+05
7.0E+05
6.0E+05
5.0E+05
4.0E+05
3.0E+05
2.0E+05
1.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

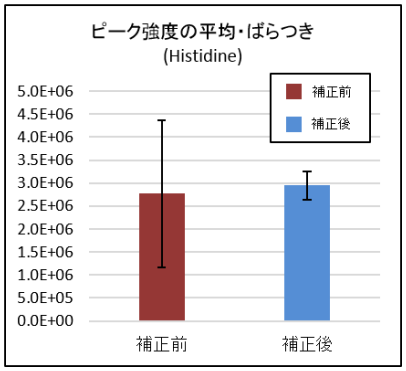
(G)


ピーク強度 (Lysine)
2.E+06
2.E+06
2.E+06
1.E+06
1.E+06
1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

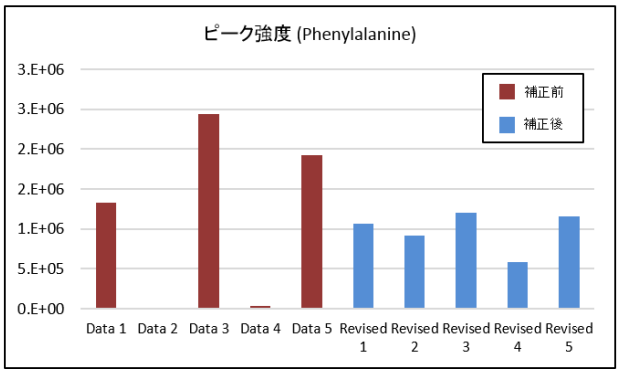

ピーク強度の平均・ばらつき (Lysine)
1.8E+06
1.6E+06
1.4E+06
1.2E+06
1.0E+06
8.0E+05
6.0E+05
4.0E+05
2.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

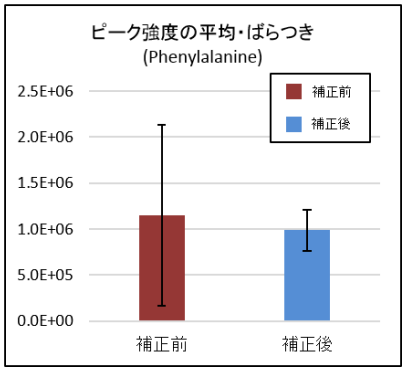
(I)


ピーク強度 (Histidine)
5.E+06
5.E+06
4.E+06
4.E+06
3.E+06
3.E+06
2.E+06
2.E+06
1.E+06
5.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

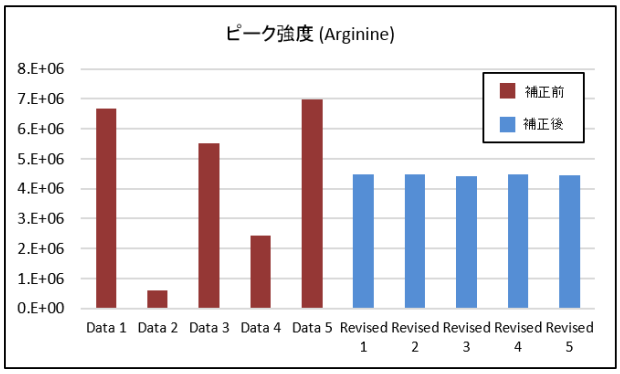

ピーク強度の平均・ばらつき
(Histidine)
5.0E+06
4.5E+06
4.0E+06
3.5E+06
3.0E+06
2.5E+06
2.0E+06
1.5E+06
1.0E+06
5.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

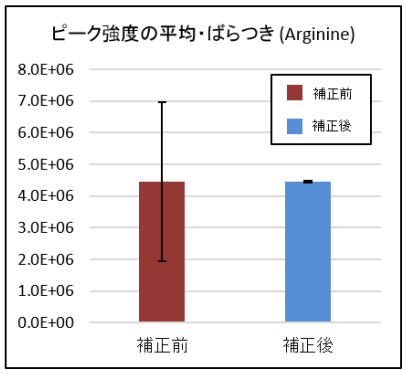
(J)


ピーク強度 (Phenylalanine)
3.E+06
3.E+06
2.E+06
2.E+06
1.E+06
5.E+05
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後

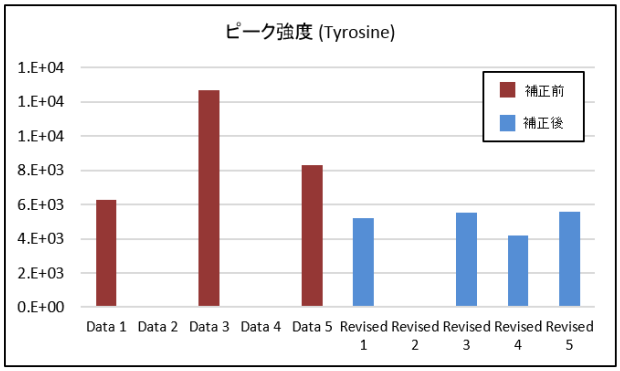

ピーク強度の平均・ばらつき
(Phenylalanine)
2.5E+06
2.0E+06
1.5E+06
1.0E+06
5.0E+05
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

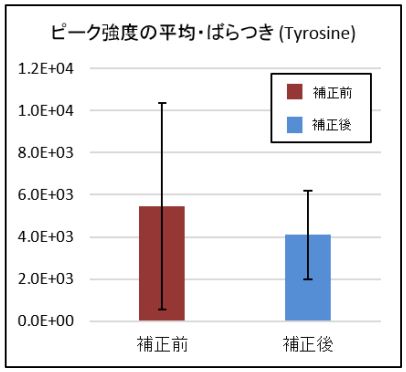
(K)


ピーク強度 (Arginine)
8.E+06
7.E+06
6.E+06
5.E+06
4.E+06
3.E+06
2.E+06
1.E+06
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後


ピーク強度の平均・ばらつき (Arginine)
8.0E+06
7.0E+06
6.0E+06
5.0E+06
4.0E+06
3.0E+06
2.0E+06
1.0E+06
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

(L)


ピーク強度 (Tyrosine)
1.E+04
1.E+04
1.E+04
8.E+03
6.E+03
4.E+03
2.E+03
0.E+00
Data 1
Data 2
Data 3
Data 4
Data 5
Revised 1
Revised 2
Revised 3
Revised 4
Revised 5
補正前
補正後


ピーク強度の平均・ばらつき (Tyrosine)
1.2E+04
1.0E+04
8.0E+03
6.0E+03
4.0E+03
2.0E+03
0.0E+00
補正前
補正後
補正前
補正後

(M)

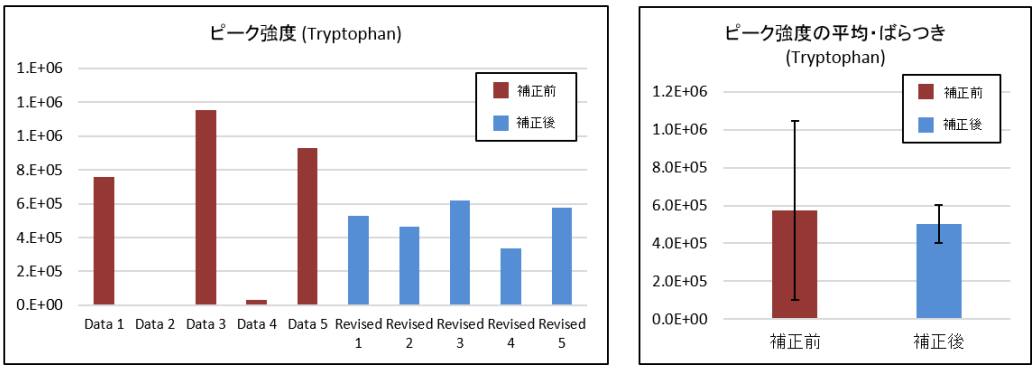


Fig. 2-4　アミノ酸同位体を使って補正を行った後のイオン強度と分散の変化
(A) Proline、(B) Valine、(C) Threonine、(D) Isoleucine / Leucine、
(E) Asparagine、(F) Glutamine、(G) Lysine、(H) Methionine、(I) Histidine、
(J) Phenylalanine、(K) Arginine、(L) Tyrosine、(M) Tryptophan

と、細胞の個体差を捉えることが可能になると考えられる。

２-３　微量分子の検出に向けた検討

２-３-１　検出器の最適化

ミトコンドリアには、細胞質には存在しない特異的な脂質や、TCA サイクル等の特異的な代謝経路が存在していることが知られており、この特異的分子や TCA サイクルの代謝物、その他のミトコンドリア内に存在する代謝物を 1 細胞質量分析法で検出するため、質量分析計の条件の検討を行った。

検討する項目として、Mass Range, Resolution に着目した。これらのパラメーターについては以下に記す。

Mass Range

Orbitrap では、イオントラップに溜め込むイオンの上限値(Automacic Gain Control; AGC)が定められており、そのイオントラップに一定量以上のイオンが溜められることによって、イオンの電荷同士が反発しあい、精密質量値がずれ、正確に *m/z* の値を算出できなくなることを防いでいる。したがって、測定する Mass Range を広くすれば広くするほど、質量分析計に取り込まれたイオン全体に対する一つ一つのピークのイオン数が減ることになる。Orbitrap 検出器はイオンの周期的な運動の誘導電流を感知してフーリエ変換により *m/z* を算出しており、少なくとも 200 個のイオンの集団でないと検出することができないと言われている上に、誘導電流の合成波をフーリエ変換する際に必ず noise が発生してしまう。この noise は測定者がマススペクトルを得るまでの計算の過程で自動的にカットオフされるため、誘導電流が検出されていても強度が低すぎると noise cut off によって最終的なスペクトル上では検出されていないことになる。

Resolution

Resolusion はピークとピークを分ける性能のことであり、LTQ Orbitrap においては Orbitrap 検出器内での円運動の時間によって制御されている。分解能 100,000 の時、1Scan あたりにかかる時間は 1.7 秒であるが、分解能 7,500 の時は 1Scan あたり 0.35 秒程度である。IT 同様、Orbitrap 内でも長い時間保持され続けることによってイオン

が分解・消失する恐れがある。

２-３-２　実験方法

ATP を MeOH 70%, H2O 30%の溶媒で 100 nM に調整し、次のような条件で測定を行った。nano-ESI のイオンソースを取り付けた LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scienticif Inc,. USA)を使用し、ネガティブモードで測定を行った。

●Mass Range Width: ATP である *m/z* = 506 を中心とした質量幅 33, 53, 73, 93, 113

●Resolution: 7,500, 15,000, 30,000, 60,000, 100,000

以上の条件のもと、感度の比較を行った。

２-３-３　結果・考察

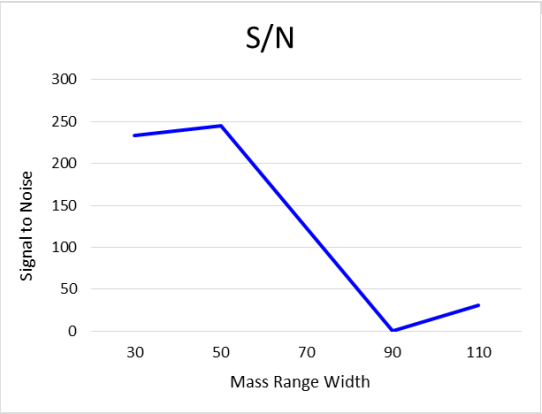
ATP の Signal to Noise (S/N)を見たところ、測定した Mass Range の幅による感度の変化に関しては、夾雑物の影響も絡んでくるため、はっきりした傾向を得ることができなかった。Mass Range を変化させることによって、夾雑物を減らすことができるが、指定した Mass Range 以外のイオンを排出する過程でのロスが発生するためか、一過性のグラフにはなっていない。しかし、Mass Range は質量幅 50 程度まで広げたほうが S/N が高く検出できるという傾向にあることが分かった。（Fig. 2-5）質量幅は狭くするほど S/N は上昇するようにも感じられたが、一度の測定時間が長くなるというデ

メリットがあるため、50 程度を適用することとした。

Resolution は、10000 程度まで高くすることによって S/N が高くなるということ結果が得られた。当初は、Resolution を長くすることで一度のスキャンにかかる時間が長くなり、Orbitrap 検出機内での居住時間が長くなれば Signal が減少し、S/N が下がることを予想していたが、実際には S/N は上昇した。Resolution を上げることで、Signal 自体はあまり減少せず、Noise が減少した。これによって、分解能による他のピークとの分離を行うことによって、Noise が減少することが明らかになった。

この LTQ Orbitrap において、Noise 値よりも低いピークは cut off によって消滅し、検出されていないことになるため、S/N が感度を比較する上で重要である。以上より、測定条件は Mass Range 幅 53、Resolution 100,000 と決定した。

以上の検討結果を、1 細胞内のミトコンドリア分析を行うための条件として適用し、分析を行った。



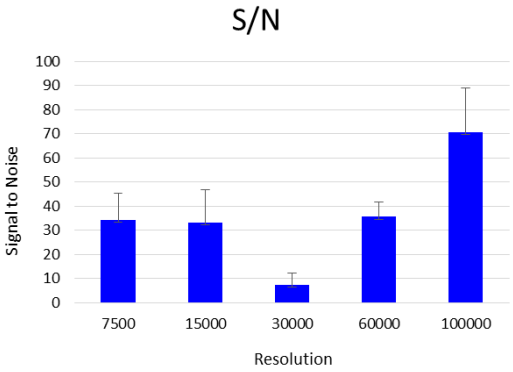


Fig. 2-5 Mass Range と Resolution を検討した結果の S/N

２-４　方法

２-４-１　試薬

ミトコンドリアを特異的に染色する色素として、MitoRed（DOJINDO, Japan）を購入して実験に使用した。この蛍光色素を Dimethyl sulfoxide（DMSO）で最終濃度 1μM となるように希釈し、それをストックとして保管した。

測定については、ミトコンドリア内の代謝物を網羅的に分析することを目指したので、高分解能質量分析計 LTQ-Orbitrap Velos Pro を使用して測定することとした。測定の前には、*m/z* のズレを補正するためのキャリブレーション溶液として、1,3,6 Poly-tyrosine solution （Thermo Fisher Scientific, USA）を使って、キャリブレーションを行った。測定時にイオン化溶媒として使用する Methanol（MeOH）は、より純度の高い、Electronic grade methanol（関東化学, Japan）を使用した。

細胞サンプリング時のバッファーについては、4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid（HEPES）（DOJINDO, Japan）を、pH 7.5、濃度は 1M となるよう調整したものをストックとし、細胞に投与する際には、PBS（－）で最終濃度 25mM となるように希釈したものを使用した。

細胞観察の際は、ディッシュボトムに細胞接着を促進させるためのコラーゲンがコーティングしてあるガラスボトムのディッシュ、D11134（Matsunami Grass Ind., Ltd.）を使用した。

測定時にばらつきが生じる可能性のある、エレクトロスプレーによるイオン化効率を補正するため、Fluorescein（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を、イオン化溶媒に最終濃度で 100nM となるよう調整した。

２-４-２　細胞培養

実験に使用した細胞は、Human hepatocellular carcinoma cell line （HepG2）を使用した。この細胞を、Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (Sigma-Aldrich Inc.）に、Fetal calf serum （FBS, Thermo Fisher）が 10%、抗生物質として Penicillin（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）と Streptomycin G（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）が 100mg/mL となるよう調整した培養培地として使用し、37℃、5% の CO_2 という条件の下で培養した。

２-４-３　細胞の蛍光観察

細胞をサンプリングする 30 分前に、HepG2 細胞が培養してあるディッシュに、ミトコンドリア蛍光色素である MitoRed を、最終濃度 100nM となるように添加した。サンプリングを行う直前に、MitoRed が入った培養培地を捨て、PBS（－）で二度洗い、25mM の HEPES バッファーをディッシュに注入した。その後、細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000（Olympus Corporation）のステージに設置し、559nm の励起波

長のレーザーで細胞観察を行った。

２-４-４　１細胞内ミトコンドリアサンプリング

MitoRed を投与した HepG2 からミトコンドリアが多く含まれている箇所をサンプリングするために、共焦点蛍光顕微鏡下で観察しながら、先端口径が 2μm のナノスプレーチップを使い、蛍光を発している箇所をミトコンドリア群として細胞から直接サンプリングした。ミトコンドリア群から獲られた代謝物のデータと比較するため、蛍光を発していない箇所を細胞質としてサンプリングした。チップ内に捕らえた細胞内成分をイオン化して分子分析を行うため、ナノスプレーチップにイオン化溶媒として 2μL の 70% MeOH を添加し、Nano-ESI のイオン源が装着された高分解能質量分析計 LTQ-Orbitrap Veolos Pro に取り付けた。

ナノスプレーチップの先端が質量分析計の入り口から 3mm のところに設置し、チップに約 0.8 kV の電圧を印加し、Negative ion mode で測定を行った。

２-４-５　ミトコンドリア成分質量分析

質量分析計は測定前に予め、1,3,6-Poly-tyrosine を使って、*m/z* = 180.067, 506.193, 995.383 の 3 点においてネガティブイオンモードで *m/z* のキャリブレーションを行った。データを取得するための *m/z* の幅は、100 から 1000 までとし、アミノ酸のような

分子量の小さな分子から、脂質のような分子量の大きな分子まで、網羅的に分析を出来るように設定した。

２-４-６　データ解析

得られたスペクトルデータは、Xcalibur 2.1（Thermo Fisher Scientific Inc.）で確認し、テキストファイルに変換した後で、そのテキストファイルを Marker View（AB Sciex Inc.）に取り込ませてデータアライメントを行った。質量分析では、一回一回のスキャンで *m/z* が少しずつ異なる値が検出されることがあり、そのズレを考慮した上で分子組成を決定する必要がある。今回使用した高分解能質量分析計である Orbitrap は、測定したサンプルの精密質量は、その分子の精密質量の理論値から±3ppm 以内に抑えて測定が可能であるという仕様の装置である。そのため、細胞内容物をイオン化して得られたピークにおいて、精密質量のズレが±3ppm の範囲内であるものは許容して同じピークであるとみなし、精密質量の値から分子組成を計算した。ミトコンドリア群と細胞質から得られたピークを用いて、分散の等しくない仮定の両側 t-検定、そして PCA 解析を行った。これらの精密質量を KEGG[85], LIPID MAPS[86]に掲載のある代謝物の精密質量に照合し、検出された分子の推定を行った。その中から、ミトコンドリアや細胞質に特異的に検出された分子ピークには MS/MS を行い、構造情報を得ることで、分子の同定を行った。分子同定には、MassBank[87]と MetFrag[88] を使用した。

２-５　ミトコンドリア群への１細胞質量分析法の適用

２-５-１　１細胞内ミトコンドリア群のサンプリングと解析

1 細胞質量分析法により、1 つの生きた細胞からミトコンドリアと細胞質をサンプリングすることが可能となった。ミトコンドリアをサンプリングしたチップを、ネガティブイオンモードで測定した際のスペクトル（Fig. 2-6 (A)）と、細胞質をサンプリングしたチップを測定した際のスペクトル（Fig. 2-6 (B)）で、異なるスペクトルパターンが得られた。

HepG2 細胞をサンプリングして測定し、得られたスペクトルから、5000 以上もの分子ピークが検出された。これらのピークの精密質量を、KEGG[85]と LIPID MAPS[86]に掲載されている精密質量と照合したところ、1700 以上ものピークが代謝物と推定された。例として、アミノ酸、クエン酸やフマル酸などの TCA サイクルの代謝物、脂肪酸、ステロール脂質等の一部があった。

いくつかのアミノ酸や、TCA サイクルの代謝物は、今回は検出することができなかった。しかし、イオン化溶媒の組成をどのように組み合わせるのか、Mass Range の幅の設定、イオンモードといった、質量分析側の最適条件を求めた検討を重ねていくことで、今回検出することができなかった代謝物についても、今後は検出することが可能となることが考えられる。

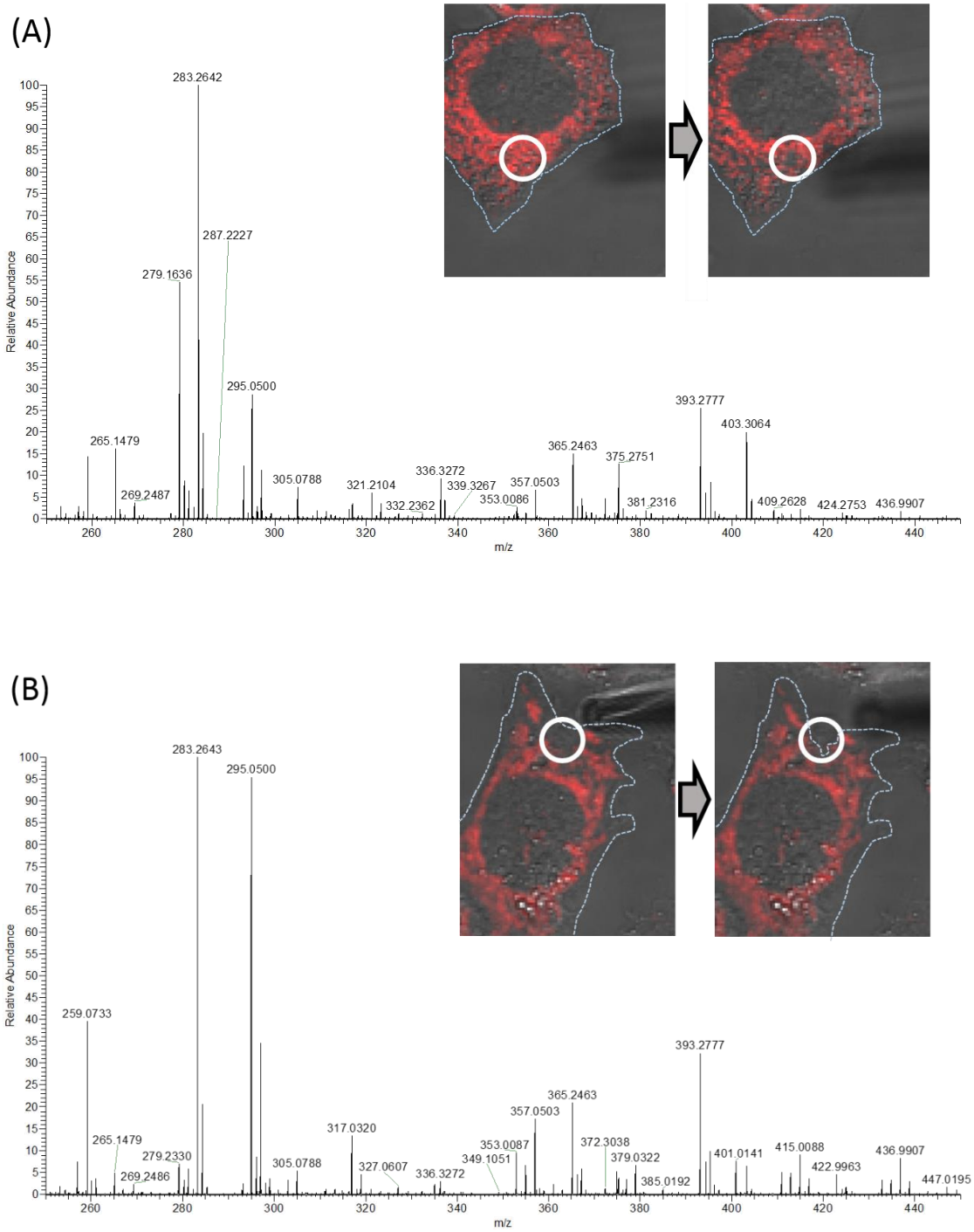


Fig. 2-6　(A)はミトコンドリアをサンプリングしたときの画像とスペクトル、

(B)は細胞質をサンプリングしたときの画像とスペクトル

２-５-２　検出された代謝物の小器官間での比較

得られた各ピークについて、ミトコンドリア群と細胞質群に分けて、各群のピーク強度に対して t-検定を行い、p-Value < 0.05 であったピークをその群に特異的なピークとした。そして、KEGG[85]と LIPID MAPS[86]で代謝物の推定を行うことができたピークのリストを下記リストに掲載した。（Table 2-5, 2-6, Fig. 2-7, 2-8）

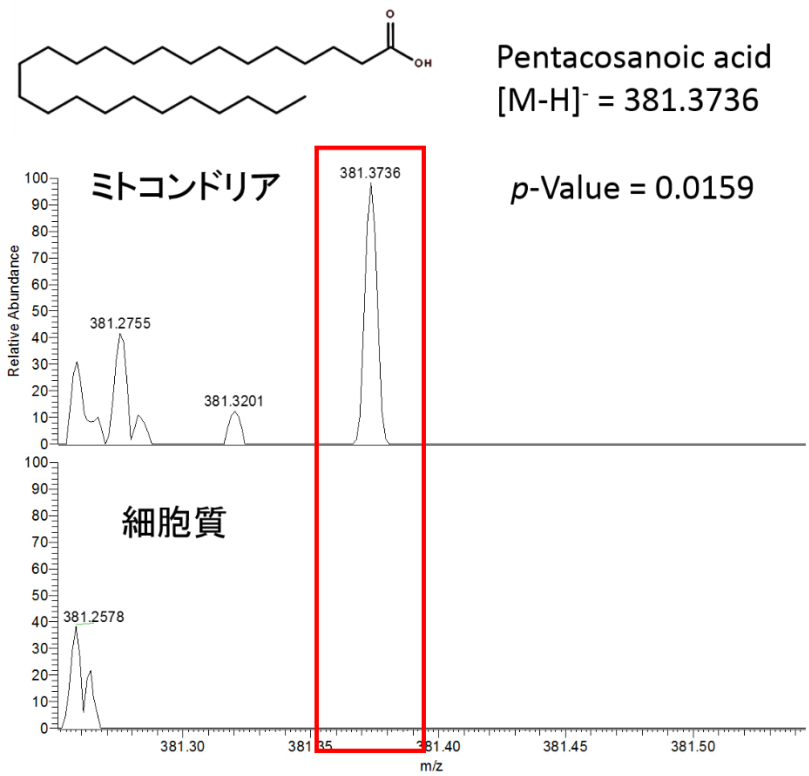
また、ミトコンドリアでのみ検出された分子として Octanoylcarnitine が検出されていた。（p-Value = 0.0101）カルニチンはミトコンドリア膜上に存在し、ミトコンドリア内に脂肪酸を取り込む役割を担っているといわれている。このカルニチンと結合している脂肪酸 Ocatanoic acid が細胞質とミトコンドリアで検出されたか調べたところ、ミトコンドリアに優位に多かったが、ミトコンドリアにも細胞質にも検出されていた。カルニチン代謝物は脂肪酸と結合すると、細胞質外には放出されることなく、直接ミトコンドリア内に入っていき、ミトコンドリアに脂肪酸を受け渡していることが明らかとなった。また、脂肪酸については、ミトコンドリアと細胞質でのピーク強度の差から、細胞質にはあまり溜め込まず、すぐさまミトコンドリアに運ばれていく可能性が示唆され

代謝物候補	m/z	theoretical	Δppm	組成	p-value
N-Nitrosodiethylamine [M-H]-	101.0718	101.0720	-2.26	C4H9N2O	0.0462
N-Methylaniline [M-H]-	106.0660	106.0662	-2.06	C7H8N	0.0053
N-Vinyl-2-pyrrolidone [M-H]-	110.0610	110.0611	-1.21	C6H8NO	0.0005
1-Butanol [M+HCOO]-	119.0712	119.0714	-1.41	C5H11O3	0.0148
1-Phenylethylamine [M-H]-	120.0817	120.0817	0.17	C8H10N	0.0036
N-Methylhexanamide [M-H]-	128.1079	128.1081	-1.43	C7H14NO	0.0121
(-)-Hygroline [M-H]-	142.1236	142.1237	-0.94	C8H16NO	0.0046
Pseudopelletierine [M-H]-	152.1081	152.1081	0.11	C9H14NO	0.0071
3-amino-octanoic acid [M-H]-	158.1186	158.1186	-0.30	C8H16NO2	0.0224
Ephedrine [M-H]-	164.1081	164.1081	0.10	C10H14NO	0.0090
Coniine [M+HCOO]-	172.1343	172.1343	0.01	C9H18NO2	0.0012
Calystegin B2 [M-H]-	174.0771	174.0772	-0.45	C7H12NO4	0.0425
Mexiletine [M-H]-	178.1237	178.1237	-0.19	C11H16NO	0.0037
Tecostanine [M-H]-	182.1550	182.1550	-0.18	C11H20NO	0.0276
n-Decanohydroxamic acid [M-H]-	186.1499	186.1499	-0.26	C10H20NO2	0.0100
Dodecanamide [M-H]-	198.1863	198.1863	-0.17	C12H24NO	0.0424
N-(3S-hydroxydecanoyl)-L-serine [M-H]-	274.1660	274.1660	0.03	C13H24NO5	0.0406
Penbutolol [M-H]-	290.2124	290.2125	-0.51	C18H28NO2	0.0206
Leucocyanidin [M-H]-	305.0673	305.0667	2.04	C15H13O7	0.0009
Lycoflexine [M+HCOO]-	320.1868	320.1867	0.22	C18H26NO4	0.0047
Senecionine [M-H]-	334.1660	334.1660	0.02	C18H24NO5	0.0003
N-(9Z-octadecenoyl)-glycine [M-H]-	338.2698	338.2701	-0.78	C20H36NO3	0.0312
Tridemorph [M+HCOO]-	342.3010	342.3014	-1.06	C20H40NO3	0.0344
N-(6Z,9Z,12Z-octadecatrienoyl)-ethanolamine [M+HCOO]-	366.2648	366.2650	-0.49	C21H36NO4	0.0224
N-(9Z,12Z-octadecadienoyl)-ethanolamine [M+HCOO]-	368.2806	368.2806	-0.08	C21H38NO4	0.0309
pentacosanoic acid [M-H]-	381.3736	381.3738	-0.53	C25H49O2	0.0159
hexacosanoic acid [M-H]-	395.3889	395.3895	-1.40	C26H51O2	0.0424
Telocinobufagin [M-H]-	401.2335	401.2333	0.38	C24H33O5	0.0381
Hexacosanedioic acid [M-H]-	425.3634	425.3636	-0.55	C26H49O4	0.0098
Resibufogenin [M+HCOO]-	429.2272	429.2283	-2.48	C25H33O6	0.0000
Medroxyprogesterone acetate [M+HCOO]-	431.2437	431.2439	-0.49	C25H35O6	0.0064
Telocinobufagin [M+HCOO]-	447.2383	447.2395	-2.66	C18H35N6O5S	0.0218
L-2-Aminoadipate adenylate [M+HCOO]-	535.1190	535.1195	-0.95	C17H24N6O12P	0.0021
1-(1Z-eicosenyl)-glycero-3-phosphoserine [M+HCOO]-	582.3428	582.3413	2.65	C27H53NO10P	0.0401
1-hexadecyl-2-(9Z-heptadecenoyl)-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) [M-H]-	807.5373	807.5393	-2.46	C42H80O12P	0.0457
4-Acetamidobutanoyl-CoA [M-H]-	893.1709	893.1712	-0.38	C27H44N8O18P3S	0.0046

Table 2-5　ミトコンドリアに特異的に検出されたピークのリスト

代謝物候補	m/z	theoretical	Δppm	Composion	p-value
L-Methionine S-oxide [M-H]-	164.0387	164.0387	0.10	C5H10NO3S	0.0020
Cys-Gly [M-H]-	177.0339	177.0339	-0.16	C5H9N2O3S	0.0043
L-Methionine sulfoximine [M-H]-	179.0495	179.0496	-0.44	C5H11N2O3S	0.0024
Chalcone [M-H]-	207.0811	207.0815	-2.10	C15H11O	0.0027
Pyrido[3,4-c]psoralen [M-H]-	236.0348	236.0353	-2.17	C14H6NO3	0.0017
Pirimicarb [M-H]-	237.1350	237.1357	-2.88	C11H17N4O2	0.0075
Agroclavine [M-H]-	237.1396	237.1397	-0.48	C16H17N2	0.0090
Dihydrobiopterin [M-H]-	238.0950	238.0945	1.92	C9H12N5O3	0.0078
5-Methyl-2'-deoxycytidine [M-H]-	240.0991	240.0990	0.55	C10H14N3O4	0.0068
3-Hydroxy-8,9-methylenedioxycoumestan [M-H]-	295.0251	295.0248	0.97	C16H7O6	0.0024
3,3'-Dimethoxybenzidine-4,4'-diisocyanate [M-H]-	295.0720	295.0724	-1.43	C16H11N2O4	0.0009
Sulfamethoxazole [M+HCOO]-	298.0500	298.0503	-1.02	C11H12N3O5S	0.0014
1-Acetylaspidoalbidine [M-H]-	337.1913	337.1921	-2.50	C21H25N2O2	0.0145
Athidathion [M+HCOO]-	374.9906	374.9914	-2.01	C9H16N2O6PS3	0.0263
Enalapril [M-H]-	375.1917	375.1925	-2.23	C20H27N2O5	0.0003
Thifensulfuron-methyl [M-H]-	386.0227	386.0234	-1.89	C12H12N5O6S2	0.0001
1-(6Z,9Z,12Z-octadecatrienoyl)-glycero-3-phosphate [M-H]-	431.2193	431.2204	-2.59	C21H36O7P	0.0145
Eleganin [M-H]-	433.1501	433.1504	-0.71	C22H25O9	0.0000
Fusarin C [M+HCOO]-	476.1937	476.1926	2.30	C24H30NO9	0.0227
Strictosamide [M-H]-	497.1927	497.1929	-0.47	C26H29N2O8	0.0131
Moexipril [M-H]-	497.2305	497.2293	2.38	C27H33N2O7	0.0009
Aurasperone D [M-H]-	555.1307	555.1297	1.85	C31H23O10	0.0092
Asclepin [M-H]-	573.2719	573.2705	2.40	C31H41O10	0.0000
ADP-D-glycero-beta-D-manno-heptose [M-H]-	618.0861	618.0855	0.95	C17H26N5O16P2	0.0081
GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose [M+HCOO]-	632.0632	632.0648	-2.49	C17H24N5O17P2	0.0027
UDP-2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-alpha-D-glucose [M+HCOO]-	635.0993	635.1008	-2.41	C18H29N4O17P2	0.0393
Corilagin [M+HCOO]-	679.0807	679.0788	2.76	C28H23O20	0.0077
GDP-D-glycero-alpha-D-manno-heptose [M+HCOO]-	680.0844	680.0859	-2.22	C18H28N5O19P2	0.0099
5'-Phosphoguanylyl(3'->5')guanosine [M-H]-	707.1000	707.0981	2.66	C20H25N10O15P2	0.0092
1-octadecyl-2-docosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [M-H]-	830.7020	830.7008	1.43	C48H97NO7P	0.0103
Delphinidin 3-glucoside 5-caffoyl-glucoside [M+HCOO]-	834.1845	834.1860	-1.83	C37H38O22	0.0215
1-(1Z-eicosenyl)-2-heneicosanoyl-glycero-3-phosphocholine [M-H]-	842.6994	842.7008	-1.67	C49H97NO7P	0.0052
1-(11Z-docosenoyl)-2-(13Z,16Z-docosadienoyl)-glycero-3-phosphocholine [M-H]-	894.6984	894.6957	2.99	C52H97NO8P	0.0066
1-tricosanoyl-2-octadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [M+HCOO]-	904.7002	904.7012	-1.11	C50H99NO10P	0.0076
1-hexadecanoyl-2-(5Z,9Z-hexacosadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine [M+HCOO]-	914.6842	914.6856	-1.48	C51H97NO10P	0.0489
Bis(5'-adenosyl) pentaphosphate [M-H]-	915.0060	915.0073	-1.41	C20H28N10O22P5	0.0228
N-(hexacosanoyl)-sphinganine-1-phospho-(1'-myo-inositol) [M+HCOO]-	966.7003	966.7016	-1.34	C51H101NO13P	0.0005
1-eicosanoyl-2-hexacosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [M+HCOO]-	974.7823	974.7795	2.92	C55H109NO10P	0.0033
1,2-dieicosanoyl-3-(10Z,13Z,16Z-docosatrienoyl)-sn-glycerol [M-H]-	995.9006	995.9012	-0.62	C65H119O6	0.0000

Table 2-6　細胞質に特異的に検出されたピークのリスト



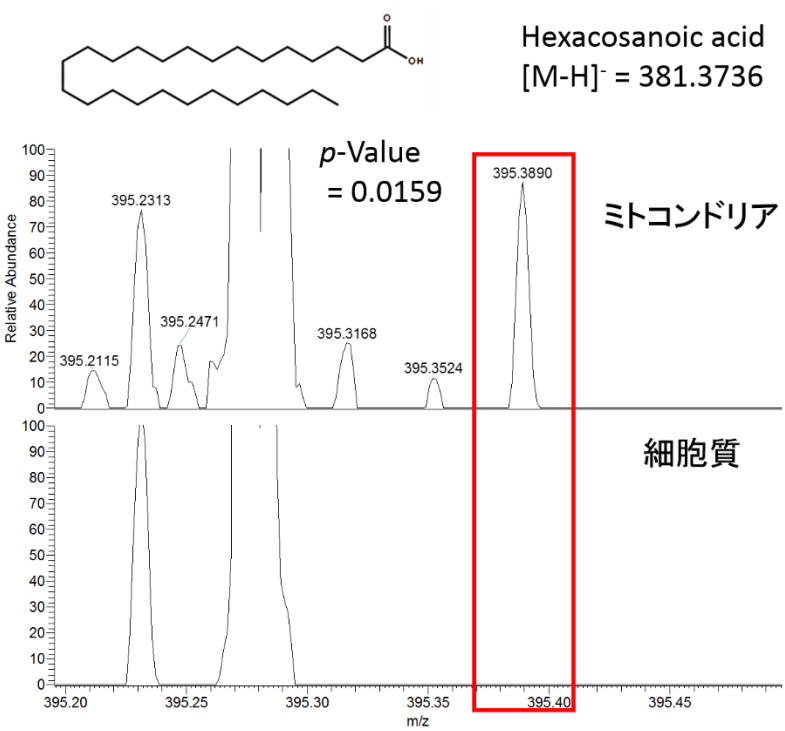


Fig. 2-7　ミトコンドリアに特異的に検出された脂肪酸

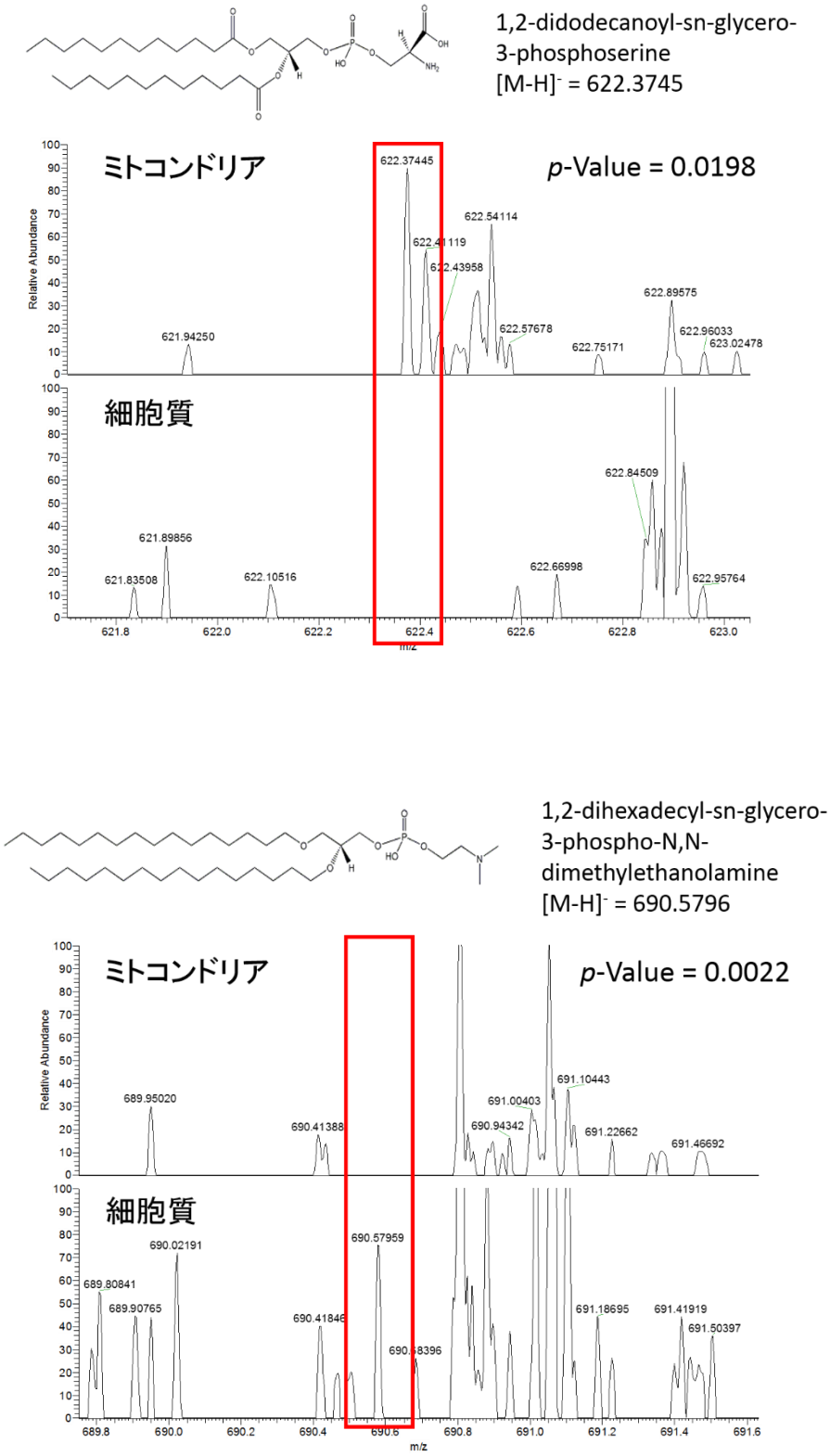


Fig. 2-8　ミトコンドリアに特異的に検出されたグリセロン脂質

た。（Fig. 2-9）

また、得られたピークについて、ミトコンドリア、細胞質での特徴的な分子ピークを探索するため、PCA 解析を行った。全分子ピークから、似たスペクトルパターンを示しているサンプルを、2 次元グラフの近いところにプロットし、異なるスペクトルパタ

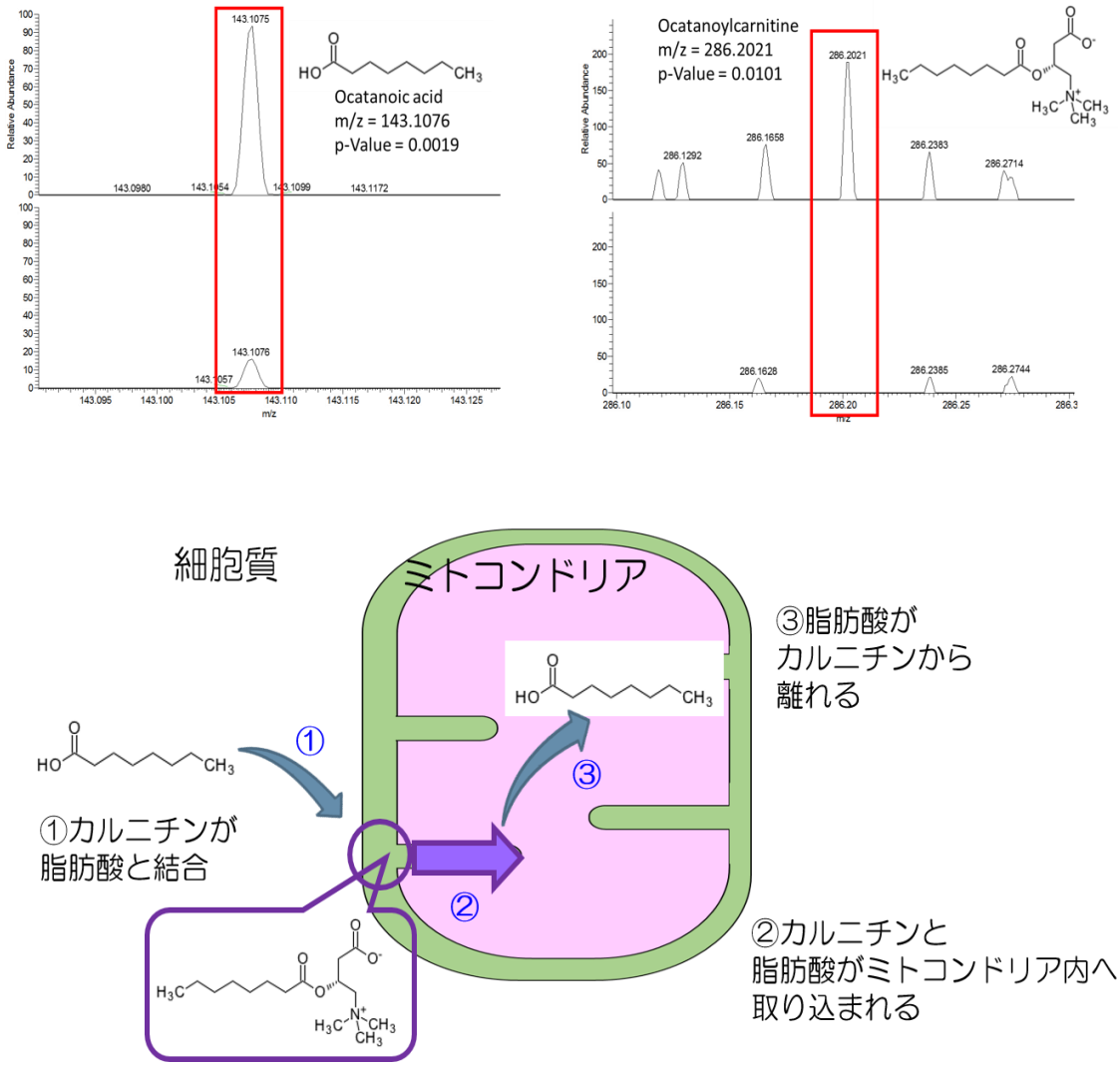
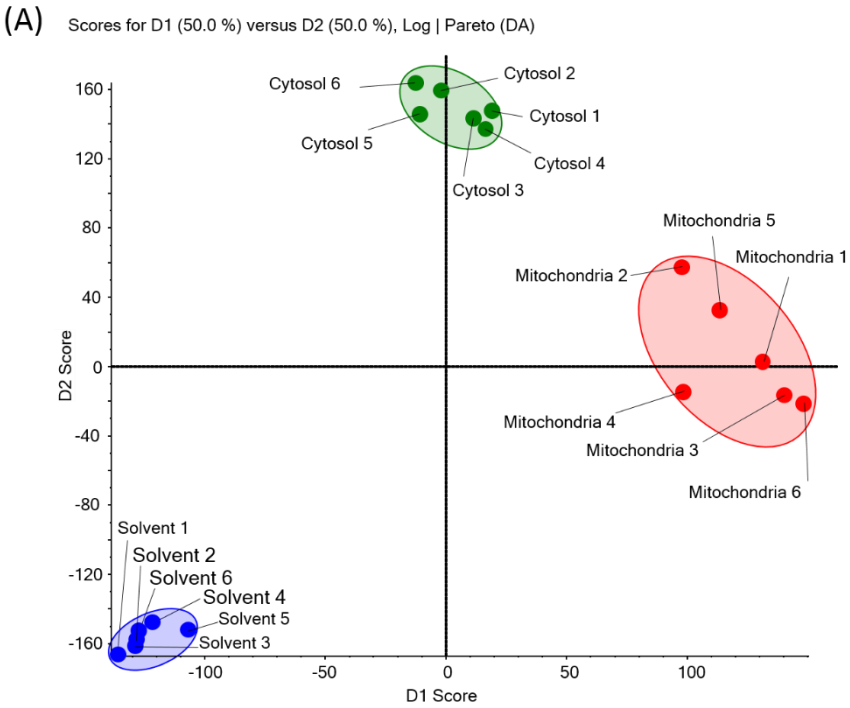


Fig 2-9　脂肪酸がミトコンドリアに取り込まれる様子

ーンとして現れる、分子組成を示すサンプル群を分散させてプロットするスコアプロット（Fig. 2-10 (A)）を確認したところ、ミトコンドリアを測定したデータ（Fig. 2-10 (A)の赤いプロット）と、細胞質を測定したデータ（Fig. 2-10 (A)の緑のプロット）と、ネガティブコントロールとして測定した細胞の含まれていないサンプル、イオン化溶媒（Fig. 2-10 (A)の青いプロット）では、それぞれ異なるグループを形成した。そのことから、各サンプル群は異なる分子組成していることを検出することが出来ていることが示された。この結果は、標的とした細胞内小器官を、ナノスプレーチップで補足、測定することに成功したことを示唆している。

PCA のローディングプロット（Fig. 2-10 (B)）は、サンプルから得られた全ピークを主要な 2 つの成分で構成する 2 次元グラフにプロットして示している。この 2 次元グラフの中心に近いところにプロットされている点は、全サンプルに共通して検出された分子を表しており、中心から離れたところにプロットされた点は、各サンプル群での特徴的な分子ピークを表している。このうち、ミトコンドリアに特徴的であった分子ピーク、*m/z* = 401.23 (Fig. 2-10 (B) の赤い矢印) を選択し、分子同定を行うために、MS/MS での解析を行うこととした。この分子ピークは、サンプル郡の間の分散が等しくないことを仮定した t-検定の結果からも、p-Value が 0.0342 と有意的に差があることが推定され、ミトコンドリアをサンプリングして測定したときのみに検出される、特異性の強いピークであることを確認している。(Fig. 2-11 (A))



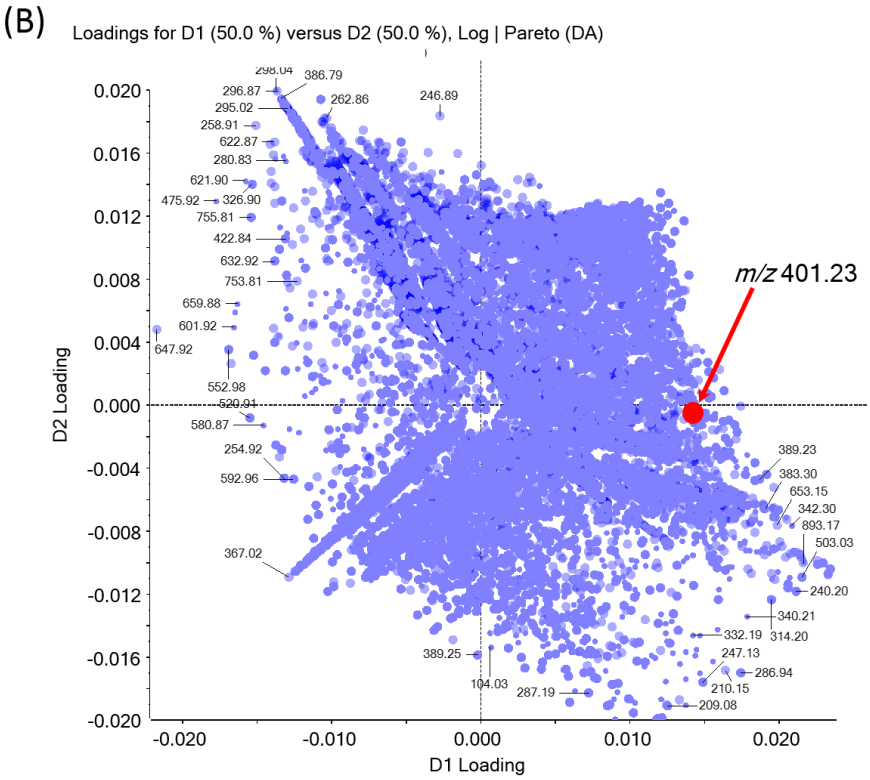


Fig 2-10　(A)はスコアプロット、(B)はローディングプロット

２-５-３　ミトコンドリア特異的分子の MS/MS スペクトル取得

高分解能質量分析計 Orbitrap は、メタボロミクスのような網羅的分析を行うことに向いているが、検出されたピークが、どのような分子のピークであるのか同定することについては、あまり得意ではない。その理由として、精密質量は同じであるが、構造が異なる同位体の存在がある。分子は炭素（精密質量 12.00000）や酸素（精密質量 15.99492）、水素（精密質量 1.00783）や窒素（精密質量 14.00307）など、限られた原子が集まって構成された集合体であるため、それらの合計値が分かれば、分子の組成式までは決定することが可能である。通常、低分子の分析を行うときには、±3ppm 以内という質量精度があれば、分子組成まで決定することには問題はない。しかし、それでも全く同じ分子組成の分子が出てくると、それらは単純にその質量で分けることはできない。より多くの情報を取得することが必要となってくる。そこで、MS/MS によってイオンを壊して得られるイオンの構造情報が、第二の分子情報として重要となってくる。質量分析計内でイオンを壊す方法として、Collision Isolated Detection（CID）モードがあり、Collision Energy　20～40 として MS/MS スペクトルを取得することが多い。得られたプロダクトイオンのパターンを解析することによって、元のプリカーサーイオンの構造情報を得ることができる。このような MS/MS スペクトルを解析するための方法として、MassBank への照合、Met Frag でのフラグメント経路解析、Mass Fronteir

（Thermo Fisher Scientific. Ltd.）を使ったフラグメント経路の解析がある。

これらの代謝物の MS/MS 情報は、小器官ごとの代謝物の違いを検出するために重要な情報である。プロダクトイオンのパターンは、プリカーサーイオンの構造によって異なっており、そのイオンの構造によって特異的なパターンの MS スペクトルを得ることができる。例として、ATP のピーク *m/z* = 506.0 に対して MS/MS を行ったところ、*m/z* = 329.1, *m/z* = 408.1 といったプロダクトイオンが検出されたが、*m/z* = 408.1 は ATP のリン酸基（*m/z* = 98, H_3PO_4）が乖離したイオンである、というように、プリカーサーイオンの構造もある程度は推定することが可能である。また、プロダクトイオンのピーク強度を比較することにより、それぞれの乖離部分の壊れやすさも推定することが可能である。

MS/MS は質量分析計に取り込まれたイオンにエネルギーを与えて崩壊させて、その結果得られたプロダクトイオンのパターンを分析する方法であるが、エネルギーを与える必要があることから、得られるプロダクトイオンは、崩壊前のプリカーサーイオンよりピーク強度が弱くなる。そのため、元のプリカーサーイオンもある程度の強さのピーク強度がなければ、分子同定を行うために十分なフラグメントパターンを得ることができない。ここで MS/MS を行った *m/z* = 401.23 の分子ピークは、MS/MS を行うことが出来るほどの十分なピーク強度であった。

m/z = 401.2 のピークに MS/MS を行うことにより、*m/z* = 327.2, *m/z* = 329.2, *m/z* =

339.1, *m/z* = 355.2 といったプロダクトイオンが検出された。MS/MS で得られたプロダクトイオンの *m/z* と、それらのピーク強度から、元の分子が何であるのかを同定するために、MS/MS のデータを蓄積している MassBank と、分子構造から分子の壊れるパターンを計算する Met Freg を使用した。

その結果、*m/z* = 401.23 の分子は、ステロール脂質の Telocinobufagin（$C_{24}H_{34}O_5$）からプロトンが外れ、ネガティブイオンとなって（[M-H]-）検出された分子であることが分かった。（Fig. 2-11 (B)）ステロール脂質は細胞膜を構成する膜として知られており、この同定された Telocinobufagin はミトコンドリアの膜成分が検出されたものである可能性が考えられた。

m/z = 401.2 のピークに対して MS/MS を行い、Telocinobufagin というステロール脂質がミトコンドリアから優位的に検出されていたことが分かったが、この MS/MS 結果からは、他にも多くのプロダクトイオンが検出されていた。これは、*m/z* = 401.2 の分子は 1 つではなく、いくつかの混合物である可能性が考えられる。これらのプロダクトイオンについて、全てのプリカーサーイオンを決定する必要があるとすれば、そのときは *m/z* = 401.2 の分子で Fig のようなプロダクトを出す可能性のある標品を集め、それらの混合物を作成し、全く同じ Collision Energy で崩壊させて、プロダクトイオンのパターンを比較することで、*m/z* = 401.2 の分子でミトコンドリアに特異的に含まれている分子を同定することが可能となる。

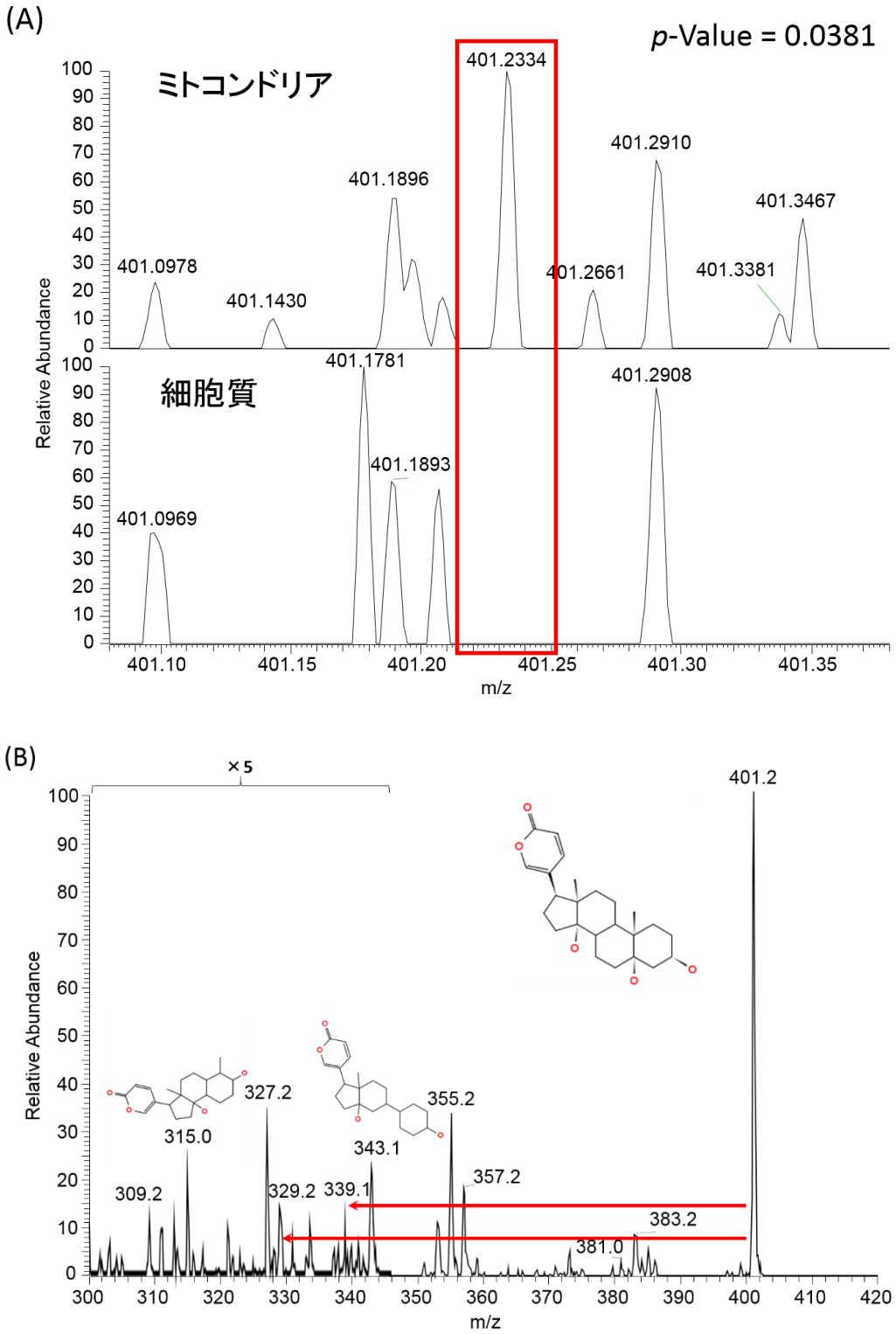


Fig 2-11　(A)は *m/z* = 401.23 のマススペクトル、(B)は MS/MS スペクトル

２-６　小活

まず、1 細胞質量分析法を使うことにより、生きた 1 つの細胞から、ミトコンドリアの集団をサンプリングし、そこに含まれる低分子を検出するため、蛍光観察を組み合わせて分析を行うことを試みた。

そのために、ミトコンドリア特異的蛍光プローブである MitoRed を細胞に投与し、蛍光顕微鏡下で赤く蛍光を発している箇所、ミトコンドリア群をナノスプレーチップで捕捉し、質量分析で分子分析を行おうと試みた。その結果、ミトコンドリアをサンプリングして測定したマススペクトルと、細胞質をサンプリングして測定したマススペクトルでは異なるパターンが得られた。生きた細胞からミトコンドリアを取り出して、成分の網羅的分析に成功した例は今までに無く、世界初の結果を得ることができた。

ミトコンドリア群、細胞質から得られるスペクトルパターンを主成分解析した結果、各小器官におけるマススペクトルがそれぞれ特徴的なピークパターンを持っていることが分かった。そして、そこから代表的な代謝物を抽出し、そのイオン強度を t-検定で比較することで、どこの小器官で特異的に検出される分子なのかを判別することができた。

また、イオン強度の強かったピークについては、MS/MS を行うことで、ミトコンドリアに特異的に含まれる分子がどのような分子であるのか、同定まで行うことが可能で

あった。*m/z* = 401.2 はミトコンドリアに特異的に検出されたステロール脂質の Telocinobufagin であり、ミトコンドリア内の脂質か膜成分を検出できたことを示唆している可能性がある。

この Telocinobufagin は、生薬として使用されていたヒキガエルの油に含まれる成分として知られており薬としての研究が進められていた[90, 91]。また、近年は腎臓病の患者から検出されたという報告もあり[92]、これがミトコンドリアに特異的な分子であれば、ミトコンドリアと腎臓病の関わりも明らかになっていくことが期待される[93-95]。更には、ミトコンドリア由来の薬となる可能性を秘めていることが示唆された。

以上より、本法を用いて 1 生細胞に存在するミトコンドリアの分子成分を検出することを可能とし、また、それらの代謝物がどのような分子なのか、同定まで行うことが可能であることを示した。

第 3 章
安定同位体を用いたミトコンドリア単体の代謝追跡

３−１　緒言

細胞の中では、多種多様な分子が存在し、ライフサイクルや細胞内外からの刺激に応答して、常にダイナミックな変化を起こしている。その細胞中における代謝物の挙動は、薬物反応やアレルギー反応、そしてアポトーシスやエネルギー産出にも大きく関わっている。

細胞が薬物や刺激に対して反応を起こした前と後の代謝物探索を行い、変動があった代謝物を調べることにより、その反応のためにどのような分子がどれくらい動いたのかを分析することは、行われている。

どのような分子が動いたのか、標的が予め決まっている場合には、蛍光プローブを導入して顕微鏡で観察しながらタイムラプス等で分子変化と局在を定量的に、そして高感度で分析することが可能である。標的が決定していなければ、大量の細胞を集めて抽出し、NMR や MS 等で分子分析を行う方法が一般的に使われている。

さらに質量分析を使った、分子変化を追跡する方法として、安定同位体を使った分子の出入りや代謝経路の分析が行われる[96-129]。細胞に投与された同位体標識された代謝物が、その細胞内で代謝されたとき、生成される代謝物も質量が変化している。(Fig. 3-

1）その代謝物の質量変化を追跡することによって、分子の挙動や代謝経路を探索することが可能である。

実際に、D-Fructose の 6 つの C を全て ^{13}C に置換した同位体 Fructose を、ヒト含脂肪細胞に投与し、その代謝物である Glutamate、Palmitate、Lactate 等が同位体標識されて ^{13}C に置き換わった代謝物となっていく様子を分析した例も報告されている[130]。さらには、^{13}C だけでなく、^{15}N を標識元素として採用した研究も報告されている[131]。

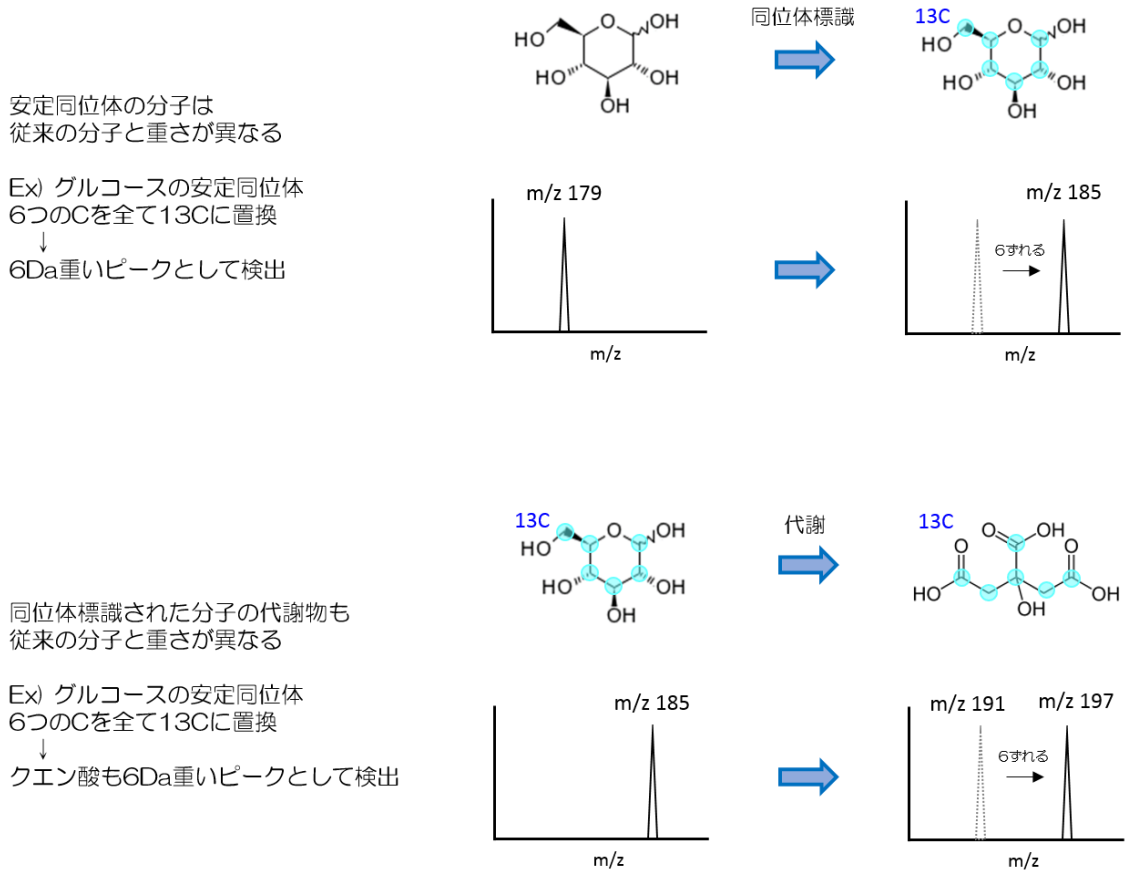


Fig 3-1　安定同位体を使った質量分析

この安定同位体を用いた分析方法では、代謝経路を観察したい分子の全てに安定同位体が存在するわけではないこと、そして、希少な分子では大変高価であることが欠点として挙げられる。さらに、代謝追跡をしたい分子であっても、それを細胞外から投与したところで、細胞内に取り込むかどうかは、その分子の物性に寄るところが大きい。しかし、細胞内に多く含まれる分子が、ただ蓄積されているのか、それとも代謝が進んでいる結果として多く含まれているのかといった判断が可能となる。これは、細胞の刺激応答への分析方法だけでなく、通常の状態でいる細胞の代謝経路や速度についても明らかにすることが可能であることを示唆している。さらに、標識化された分子は、エネルギーを与えて壊して得られた分子も標識化されており、標識化されていない分子とは異なった質量で検出される。そのため、質量分析で MS/MS を行い、プロダクトイオンのパターンを解析するときであっても、質量がシフトしたプロダクトイオンを選ぶため、標識化されていないイオンと区別がつかなくなることはない[132, 133]。以上の利点から、質量分析における安定同位体を用いた代謝経路分析は、非常に有用な分析方法であることが分かる。

そこで、私はミトコンドリア分析の第一歩として、正確にサンプリングできているのか判断するための指標として、蛍光プローブを使用するための検討を行った。そして、蛍光顕微鏡下でミトコンドリアの観察が可能であり、質量分析でも検出されるプローブを決定し、ミトコンドリア単体分析の指標とした。

そして、細胞が生命活動を維持していくために重要な ATP を産出する代謝経路である、解糖系、TCA サイクルの代謝物の動きの分析を試みた。（Fig. 3-2）

これらの代謝物が細胞内で代謝され、小器官の間を出入りしている様子を 1 細胞レベルで追跡するため、安定同位体である ^{13}C Glucose を投与し、ミトコンドリアと細胞質における代謝物が、^{12}C から ^{13}C へ同位体標識されたものに置き換わっている様子を追跡した。

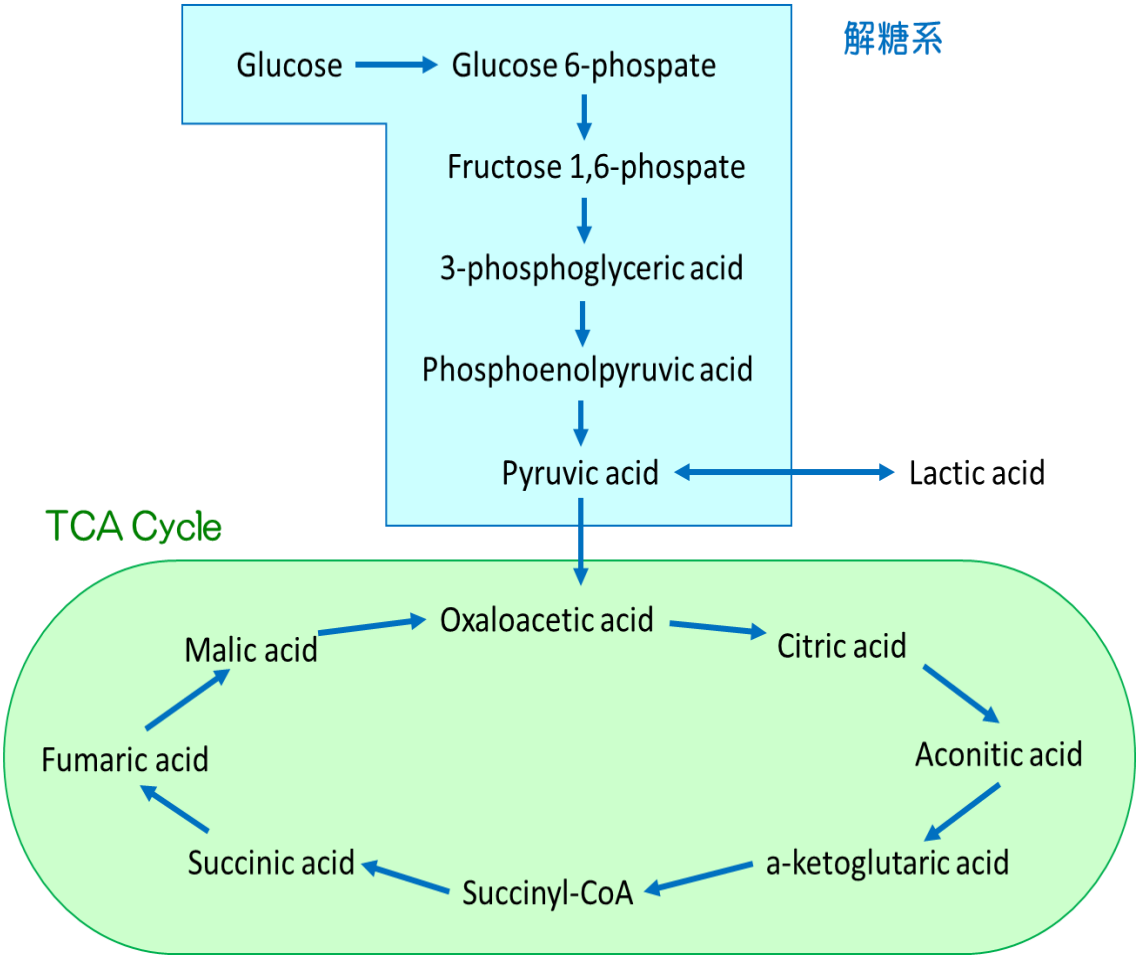


Fig 3-2　安定同位体を使って分析を行う対象代謝物

３-２　ミトコンドリア単体での質量分析における測定系の確立

３-２-１　蛍光色素の検討

ミトコンドリアは非常に小さな小器官であり、常時細胞質の中で蠢いている。このミトコンドリアを確実に採取し、質量分析からも検出できているという確証を得るため、最適な蛍光色素の検討を行った。

ミトコンドリア蛍光色素を検討するため、MitoTracker Red、MitoRed、MitoTracker Green、Rh 123 の 4 つのミトコンドリア特異的蛍光染色プローブを使用した。これらのプローブはすべて DOJINDO より購入したものを使い、DMSO で 1mM となるよう希釈したものをストックとした。

細胞は、ヒト肝臓癌のセルラインである HepG2 を用い、サンプリングを行うことに問題ない程度の蛍光を観察できる、そして質量分析的にも検出することが可能であるプローブを選択することを目指した。

ガラスボトムのディッシュに播種した HepG2 細胞に、これらの蛍光プローブをそれぞれ最終濃度 100nM となるよう投与し、MitoTracker Red は 45 分、MitoRed は 60 分、MitoTracker Green と Rh 123 は 30 分、37℃で 5%の CO_2 環境下で培養した。共焦点レーザー顕微鏡のステージに設置する直前に、PBS（－）で 2 回洗い、25mM の HEPES バッファーで細胞を満たし、各蛍光標識を行った細胞に対し、1 つの細胞に含まれるミトコンドリア単体を吸引した。（Fig. 3-3）

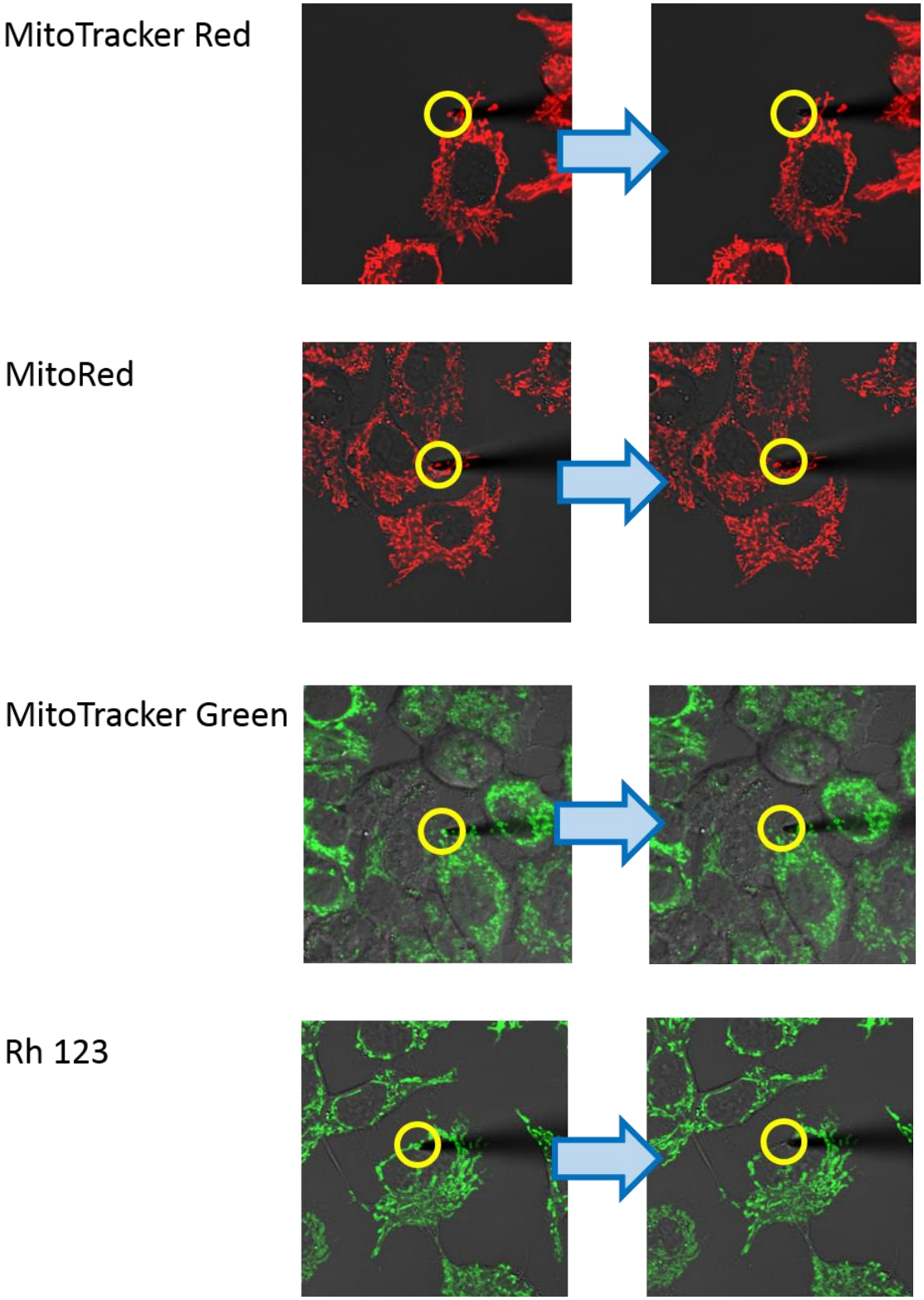


Fig 3-3　蛍光プローブで観察しながらミトコンドリア単体を採取する様子

MitoTracker Red と MitoRed は 559nm の励起波長、MitoTracker Green と Rh 123 は 473nm の励起波長で観察を行った。

３-２-２　サンプリング

顕微鏡下に設置した HepG2 細胞に、ナノスプレーチップを近づけ、標的とした細胞のミトコンドリアに差し込み、ミトコンドリア単体を採取した。そして、そのチップの後ろからイオン化溶媒として 70% MeOH を入れ、Nano-ESI のイオン源を取り付けた質量分析計 LTQ-Orbitrap Velos Pro に設置した。そして、チップ内の細胞成分をイオン化するため、-8kV の電圧を印加して測定を行った。細胞に投与した蛍光プローブは、ポジティブモードで *m/z* = 495.220 (MitoTracker Red), *m/z* = 601.270 (MitoRed), *m/z* = 634.099 (MitoTracker Green), *m/z* = 345.123 (Rh 123)で検出されることは、標品を使って予め確認を行った。ミトコンドリアをサンプリングしたチップで、これらのピークを検出できるのかを調べた。

３-２-３　高分解能質量分析計での測定

高分解能質量分析計 Orbitrap を使用した、1 細胞質量分析法ミトコンドリア蛍光プローブ検出はできなかった。これは、ターゲットとしているミトコンドリアのサイズが非常に小さいこと、そのため、そこに取り込まれるプローブの量も少ないことが原因の

1 つとして挙げられた。そこで、この問題を乗り越えるため、次はより微量分子でも分析することを可能とする、高感度質量分析計 TSQ-Vantage を検出に用いることに決定した。

３-２-４　高感度質量分析計での測定

Orbitrap での測定時と同様に、顕微鏡下で HepG2 細胞を観察しながら、ナノスプレーチップで標的とした細胞からミトコンドリア単体を採取した。そして、そのチップの後ろからイオン化溶媒として 70% MeOH を入れ、Nano-ESI のイオン源を取り付けた質量分析計 TSQ-Vantage に設置した。そして、チップ内の細胞成分をイオン化するため、－8kV の電圧を印加して測定を行った。

Vantage では SRM スキャンで検出を行ったが、各プローブの *m/z* の Q1、Q3 における組み合わせは、標品の測定結果より、MitoTracker Red は Q1 *m/z* 495 → Q3 *m/z* 460、 MitoRed は Q1 *m/z* 601 → Q3 *m/z* 557、MitoTracker Green Q1 *m/z* 634 → Q3 *m/z* 356、Rh 123 は Q1 *m/z* 345 →Q3 *m/z* 268 とした。

各プローブで 2 回ずつミトコンドリアのサンプリングを行い、Q3 スキャンで得られたピークのピーク強度を、ブランクとして測定した 70%MeOH でのピーク強度と比較したところ、MitoTracker Green のみがミトコンドリアをサンプリングしたチップから検出された。他の 3 つのプローブは検出されなかった。また、細胞質をサンプリングし

たチップからは、これらのピークは検出されなかった。(Table. 3-1)

Name	Q1	Q3	blank	MitoTracker Red 1	MitoTracker Red 2	Average	MitoRed 1	MitoRed 2	Average
MitoTracker Red	495	460	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
MitoRed	601	557	1.4	1.1	1.9	1.5	1.4	1.2	1.3
MitoTracker Green	634	356	1.2	1.1	4.2	2.7	1.2	1.2	1.2
Rh123	345	268	4.8	4.3	5.2	4.8	5.4	1.2	3.3
Name	Q1	Q3	blank	MitoTracker Green 1	MitoTracker Green 2	Average	Rh123 1	Rh123 2	Average
MitoTracker Red	495	460	1.2	1.1	1.4	1.3	1.5	0.7	1.1
MitoRed	601	557	1.7	1.9	2.0	2.0	2.4	1.1	1.8
MitoTracker Green	634	356	2.0	5.6	3.5	4.6	1.8	2.5	2.1
Rh123	345	268	4.2	6.9	2.2	4.6	4.6	3.4	4.0

Table. 3-1　ミトコンドリアから得られた蛍光プローブのイオン強度

この結果は、使用した蛍光プローブのイオン化効率や、ミトコンドリアに取り込まれる濃度に依存している可能性が考えられた。プローブによっては、細胞内に取り込まれた際に、細胞外へ放出するのを妨げるためにエステラーゼ等で親水化されたため、もしくはミトコンドリアに結合する際に構造の変化が起こり、分子量も変化して検出できなかったという可能性も考えらえた。

３-２-５　結果と考察

これらの結果により、十分な検討を行った上で高感度質量分析計を用いて検出を行うことで、1 つの生きた細胞から採取したミトコンドリア単体に含まれる代謝物の検出が可能であることが示唆された。

質量分析計を用いたミトコンドリア単体の中に含まれる分子分析に成功したことは、

世界初である。質量分析計を用いているということを生かし、標的とした分子だけでなく、その周辺で挙動する分子についても網羅的に分析できる可能性があることが示唆された。また、蛍光顕微鏡を組み合わせて実験を行うことが可能となったことから、ミトコンドリアが蛍光観察中に何か変化を起こした瞬間の代謝物変化を追跡することが可能となることが考えられる。

３-３　ミトコンドリア単体における代謝物探索

３-３-１　イオン化溶媒の検討

次に、測定時にナノスプレーチップの後ろから入れるイオン化溶媒について検討を行った。ここで入れる溶媒によって、チップに捕捉された細胞成分は抽出されてイオン化されるため、溶媒の選択によっては、十分に標的分子が抽出されず、検出限界を超えるピーク強度で検出することができない。また、溶媒に夾雑物が多く含まれていると、細胞由来の分子が溶媒由来の夾雑物ピークに覆い隠されてしまい、見たい分子を見ることができない可能性がある。そこで、ミトコンドリアがサンプリングできていることを確認するための指標として用いる MitoTracker Green、そして細胞が生命活動を維持するために必要不可欠である ATP を使い、これらの 2 つの分子がより高感度に検出される溶媒の検討を行った。

３-３-２　実験方法

まず、質量分析の分野で一般的にイオン化の溶媒として使用されるものは、水とMeOH の混合物か、水と Acetonitrile（AcCN）であるが、今回は水と MeOH の混合物を使用することとした。その理由として、MeOH は合成方法が確立しているが、AcCN は合成方法が確立しておらず、アクリルニトリルを製造する過程で副産物として生成されるものをろ過するなどして純度を上げたものが使われているため、MeOH に比べて夾雑物が多く含まれている。粘性が低いため、イオン化効率は良く、薬物分析といった標的分子が決定している場合には適している。しかし、今回目指すのは、多くの代謝物の超微量分析であるため、可能な限り夾雑物が含まれていない溶媒を選択することが望まれる。そこで、今回の実験で溶媒として使用するものは MeOH と決定した。

MeOH と水の比率の検討を行った。まず、1μM の MitoTracker Green と ATP が入った溶媒として、50% MeOH から測定し、60%、70%、80%、90%と MeOH の割合を上げていき、そのときのイオンのピーク強度を測定した。

さらに、この 80% MeOH に加える物質についても検討を行った。通常、ポジティブイオンモードで測定を行う際には、ギ酸などのプロトンドナーを 0.1%程度、溶媒に入れ、分子にプロトンが付加されてポジティブイオンで検出されることを促進して測定を行う。また、ネガティブイオンモードで測定する際には、ギ酸アンモニウム等を 1～10mM 程度溶媒に入れ、pH が下がることを抑えることもある。また、脂質等によって

は、プロトンが外れてネガティブイオンとなるより、ギ酸（$HCOO^-$）が付加してネガティブイオンとなり易い分子もある。そのため、標的とする分子によるが、ギ酸やギ酸アンモニウムを水と MeOH の混合物に入れて測定することもある。検討として試したのは、80% MeOH、80% MeOH＋0.1% ギ酸、80% MeOH＋1mM ギ酸アンモニウムの 3 種類で、それぞれ MitoTracker Green と ATP のピーク強度で比較を行った。

標品を測定した結果から、MitoTracker Green はポジティブイオンモード、ATP はネガティブイオンモードで検出されることが確認できていたので、これらのイオンモードでの測定を行った。

３-３-３　検討結果

MeOH の割合を 50%から 90%まで 10%ずつ上げて作成し、測定した結果、MitoTracker Green も ATP も、MeOH が 80%となったところで最も検出感度が高くなった。これは、MeOH の割合を 50%から 80%に増やしていくことで、溶媒の粘性が低くなり、イオン化が効率的に行われ、検出感度が上昇したことが原因であると考えられる。そして、80%から 90%へと増えるときには、MitoTracker Green も ATP も親水性の物質であるため、溶媒中に効率良く溶けることが出来なくなり、溶媒内の濃度が下がったことが原因ではないかと考えられる。この結果から、イオン化溶媒として使用する溶媒は、80% MeOH と決定した。

次に、80% MeOH、80% MeOH＋0.1% ギ酸、80% MeOH＋1mM ギ酸アンモニウムの 3 種類を測定して、イオン強度を比較したところ、MitoTracker Green と ATP 両方の分子で、80% MeOH で測定したときが最も強いイオン強度で検出される傾向にあった。（Fig. 3-7）

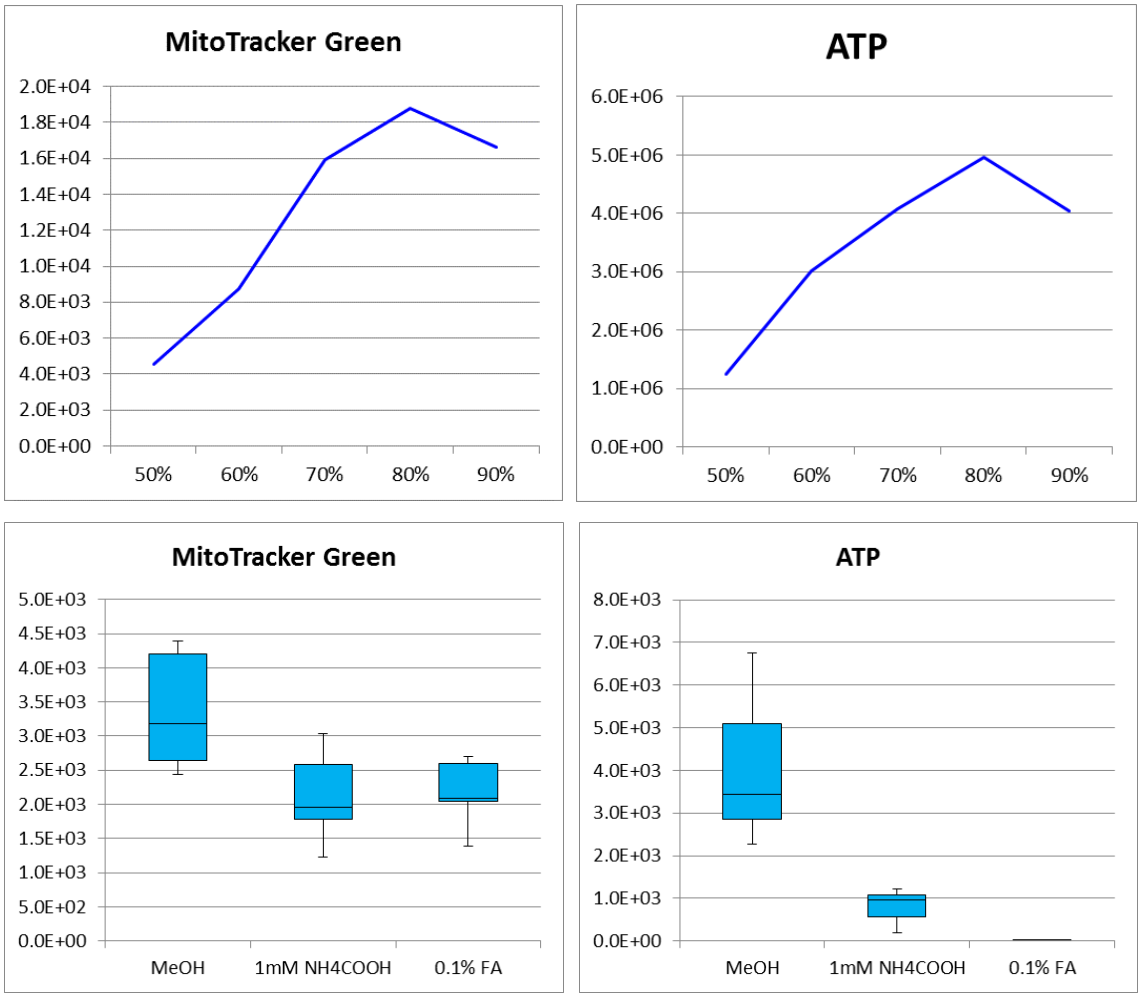


Fig 3-7　溶媒による MitoTracker Green と ATP のイオン強度の変化

MitoTracker Green は、ポジティブイオンモードでの測定であったため、ギ酸を添加した溶媒が最も効率よく検出されると予想していたが、この予想に反して、ギ酸を入れない 80% MeOH だけが効率よく検出された。MitoTracker Green は、カチオン性の物質であり、標品は塩化物として販売されており、溶液中でもプロトンの着脱無しで溶解する。そのため、MitoTracker Green はプロトンが豊富に含まれている環境であるか否かについては、さほど重要ではなく、むしろ夾雑物が少ない溶媒条件で、効率良くイオン化される可能性がある。このことが、MitoTracker Green は 80% MeOH でイオン強度が強く検出された原因であると考えられる。

そして、ATP についてもギ酸もギ酸アンモニウムも入れない 80% MeOH だけが効率よく検出された。ギ酸を入れた溶媒では、ATP はほとんど検出されていなかった。ギ酸を入れることにより、溶媒中に必要以上のプロトンが存在し、ATP が脱プロトンを起こすことを妨げていた可能性がある。また、ギ酸アンモニウムについては、イオン化には適した pH にならず、夾雑物を増やしてしまう結果となり、イオン化が阻害された可能性がある。このことが、ATP は 80% MeOH でイオン強度が強く検出された原因であると考えられる。

以上の検討結果から、ミトコンドリアを正確に捕捉できているか判断するための指標である MitoTracker Green を検出するためのポジティブイオンモードでの測定、そして、ミトコンドリア内代謝物を検出するためのネガティブイオンモードの両方で、80%

MeOH をイオン化溶媒として使用することとした。

３-３-４　検出限界の確認

ミトコンドリア単体の代謝物分析は、Vantage の SRM モードで測定を行ったため、予め目的の分子に応じた Q1 と Q3 の *m/z* の組み合わせを決定した。そして、目的とするイオンが感度よく質量分析に取り込まれるよう、質量分析計の入口の S-Lens の電圧を最適化し、そのプロダクトイオンが感度よく検出されるよう、コリジョンセルにかかるエネルギー（CE）も、予め最適化した条件を作成した。また、それらの分子に含まれる炭素が ^{12}C から ^{13}C に置き換わったときに検出されると考えられるプリカーサーイオンとプロダクトイオンの *m/z* の組み合わせも計算し、SRM のトランジションに追加した。

また、微量分子を測定するため、標的としている分子が検出できているのか、それとも検出限界以下で検出できていないのかを判断するため、検出限界を調べた。（Fig. 3-8）

以上の結果より、AMP、ADP については、1nM 以上であれば検出できることが明らかになった。ATP については、AMP、ADP と比べて検出感度は低かったが、それでも 10nM 以上であれば検出できることが明らかになった。また、検出限界を確認したところ、これら 3 つの代謝物について、検出限界以下と思われるときのピーク強度は、1.1

～1.3 で検出されていた。そのため、細胞成分を測定して、この数値を上回るピーク強度で検出できていたら、測定はできていることが確認できることが分かった。

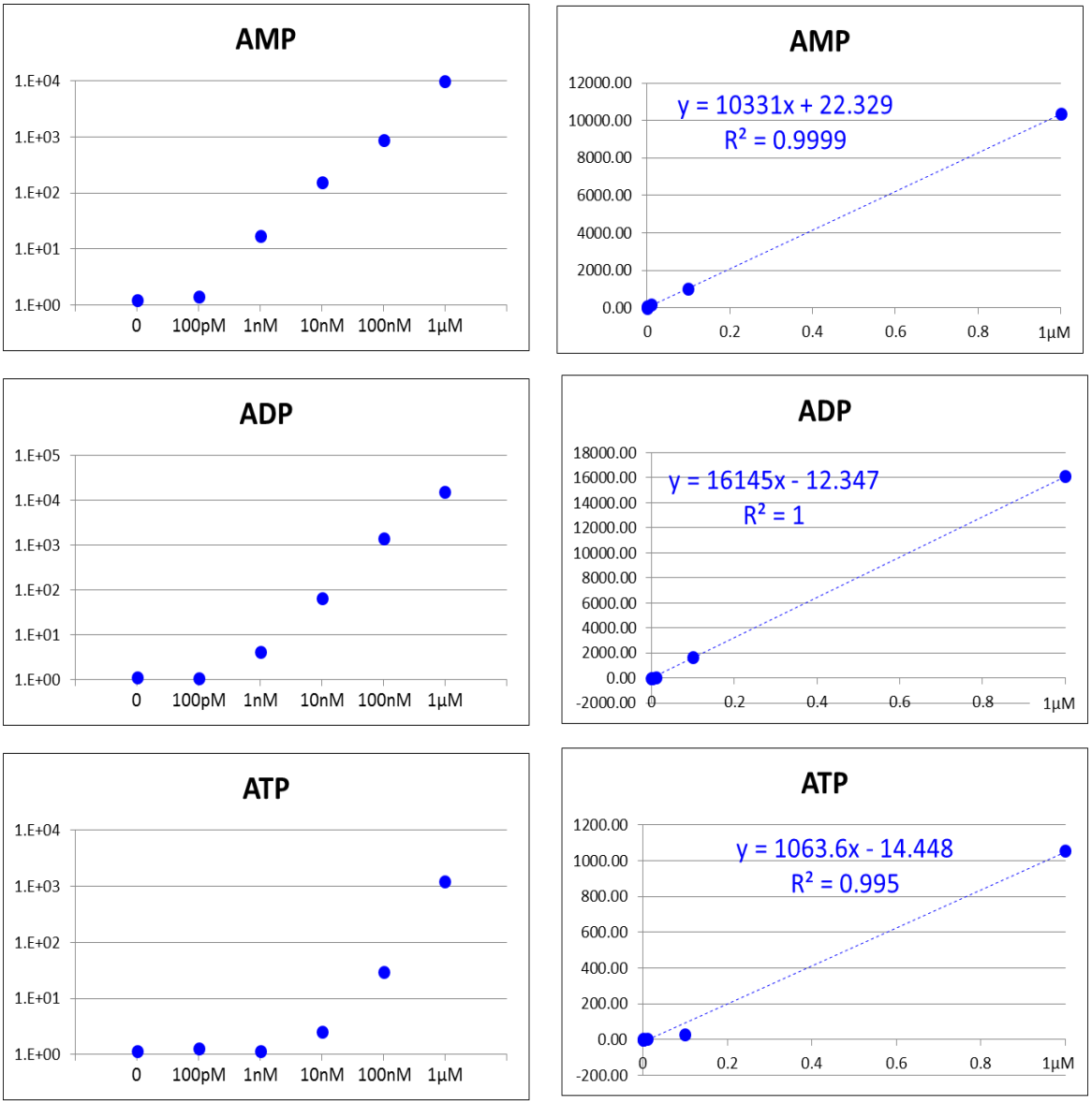


Fig 3-8　AMP、ADP、ATP の検出限界と検量線

以上の検討結果により、ミトコンドリアのマーカー、イオン化溶媒、標的分子の検出限界についてミトコンドリア単体での分析に向けた最適条件や情報を得ることができた。この結果を元に、ミトコンドリア単体を採取し、代謝物分析を行った。

３-４　方法

３-４-１　試薬

ミトコンドリアを特異的に染色する色素として、MitoTracker Green（DOJINDO, Japan）を購入して実験に使用した。この蛍光色素を DMSO で最終濃度 1μM となるように希釈し、それをストックとして保管した。今回は、グルコースから始まる解糖系に関わる分子、そこから繋がる TCA サイクルの代謝物、そしてエネルギーである ATP 等を測定の対象とした。分析の標的とする、Adenosine monophosphate (AMP), Adenosine diphosphate (ADP), ATP, Pyruvic acid, Lactic acid, Fumaric acid, Succinic acid, Oxaloacetic acid, Malic acid, α-Ketoglutaric acid, Aconitic acid, Citric acid, Isocitric acid, Glucose 6-phospate, Fluctose 1,6-phosphate, Glucose, 2-phospho-glycerate, 3-phosphoglyceric acid, Phosphoenolpyruvic acid, Acetyl-CoA, Succinyl-CoA は、SRM の分析を行うための最適条件を検討するため、Sigma-Aldrich 製の試薬を購入し、使用した。そして、同位体標識した分子を使って代謝を追跡するため、D-Glucose の同位体（D-Glucose (U-13C6, 99%), Cambridge Isotope Laboratories, Inc.）

を使用した。これは、Glucose に含まれる 6 つの炭素が全て重さ 12 から 13 に置き換わっており、通常の Glucose とは *m/z* の値で 6 だけ大きな *m/z* で検出される。

測定については、ミトコンドリア内の代謝物をより高感度に分析することを目指したので、高感度質量分析計 TSQ-Vantage を使用して測定することとした。測定時にイオン化溶媒として使用する MeOH は、関東化学製の Electronic grade methanol を使用した。

細胞サンプリング時のバッファーについては、HEPES（DOJINDO, Japan）を、pH 7.5、濃度は 1M となるよう調整したものをストックとし、細胞に投与する際には、PBS（－）で最終濃度 25mM となるように希釈したものを使用した。

細胞観察の際は、ガラスボトムのディッシュで、ディッシュボトムに細胞接着を促進させるためのコラーゲンがコーティングしてある、D11134（Matsunami Grass Ind., Ltd.）を使用した。

測定時にばらつきが生じる可能性のある、エレクトロスプレーによるイオン化効率を補正するため、Fluorescein（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を、イオン化溶媒に最終濃度で 100nM となるよう調整した。

３-４-２　細胞培養

実験に使用した細胞は、Human hepatocellular carcinoma cell line （HepG2）を使

用した。この細胞を、Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (Sigma-Aldrich Inc.) に、Fetal calf serum （FBS, Thermo Fisher）10%、Penicillin（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）と Streptomycin G（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）が 100mg/mL となるよう調整した培養培地として使用し、37℃、5%の CO_2 という条件の下で培養した。

そして、培養培地とは別に、細胞に ^{13}C Glucose を取り込ませるための培地を調整した。Dulbecco's Modified Eagle Medium without Glucose (Sigma-Aldrich Inc.) に、抗生物質の Penicillin（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）と Streptomycin G（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）が 100mg/mL となるよう調整した培地に、培養培地と同じ Glucose 濃度とするため、^{13}C Glucose を最終濃度で 4.875g/L に調整して添加し、^{13}C Glucose 培地として調整した。そして、サンプリングの前 3hrs、12hrs に培養培地をこの ^{13}C Glucose 培地に置き換えたものを準備し、培養時と同様、37℃、5%の CO_2 という条件の下で培養した。

３-４-３　細胞の蛍光観察

細胞をサンプリングする 60 分前に、HepG2 細胞が培養してあるディッシュに、ミトコンドリア蛍光色素である MitoTracker Green を、最終濃度 100nM となるように添加した。サンプリングを行う直前に、MitoTracker Green が入った培養培地を捨て、PBS

（－）で二度洗い、25mM の HEPES バッファーをディッシュに注入した。その後、細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000（Olympus Ltd.）のステージに設置し、473nm の励起波長のレーザーで細胞観察を行った。

３-４-４　１細胞内ミトコンドリアサンプリング

MitoTracker Green を投与した HepG2 から、蛍光を発しているミトコンドリアを一つだけサンプリングするために、60 倍の油浸レンズを装着した共焦点蛍光顕微鏡下で観察しながら、先端口径が 1μm の微細なナノスプレーチップを使い、ミトコンドリアを細胞から直接サンプリングした。ミトコンドリアから獲られた代謝物のデータと比較するため、蛍光を発していない箇所を細胞質としてサンプリングした。チップ内に捕らえた細胞内成分をイオン化して分子分析を行うため、ナノスプレーチップにイオン化溶媒として 2μL の 70% MeOH を添加し、Nano-ESI のイオン源が装着された高感度質量分析計 TSQ-Vantage に取り付けた。

ナノスプレーチップの先端を、質量分析計の入り口から 3mm となるところに設置し、チップに約 0.8kV の電圧を印加してチップ内のサンプルをイオン化し、ネガティブイオンモードで測定を行った。

３-４-５　ミトコンドリア成分質量分析

Vantage では、SRM モードで測定を行うため、予め目的としている分子に応じた Q1 と Q3 の *m/z* の組み合わせを決定した。そして、目的とするイオンのプロダクトイオンが最も感度よく検出されるように予め最適化していた、質量分析計の入口の S-Lens の電圧と、Collision Energy の条件を作成した。また、それらの分子に含まれる炭素が ^{12}C から ^{13}C に置き換わったときに検出されると考えられるプリカーサーイオンとプロダクトイオンの *m/z* の値も計算し、SRM モードの測定リストに追加した。(Table. 3-2 (A), (B))

３-４-６　データ解析

Vantage では、SRM モードで決定したターゲット分子に照準を合わせて測定を行うため、予め標品を測定し、目的の測定に応じた Q1 と Q3 の *m/z* の組み合わせを決定している。Q3 スキャンで選ばれたプロダクトイオンのピーク強度を用いて、小器官における代謝物量の違いや、時間経過における同位体標識物質の推移を確認した。(Table. 3-2 (A), (B))

Compound	Formula	Q1	Q3	S-lens	CE
MitoTracker Green	C34H28N3Cl5O	634	356	247	33

Table. 3-2 (A)　ポジティブイオンモードで測定を行う標的分子

Compound	Formula	Q1	Q3	S-lens	CE
Glucose	C6H12O6	179	59	44	20
13C Glucose	^{13}C6H12O6	185	61	44	20
AMP	C10H14N5O7P	346	79	150	24
13C AMP	^{13}C10H14N5O7P	351	82	150	24
ADP	C10H15N5O10P2	426	134	180	25
13C ADP	^{13}C10H15N5O10P2	431	138	180	25
ATP	C10H16N5O13P3	506	159	162	39
13C ATP	^{13}C10H16N5O13P3	511	163	162	39
Acetyl-CoA	C23H38N7O17P3S	808	408	316	35
13C Acetyl-CoA	^{13}C23H38N7O17P3S	813	408	316	35
Gluctose 6-phosphate	C6H13O9P	259	97	117	19
13C Gluctose 6-phosphate	^{13}C6H13O9P	265	100	117	19
Fructose 1,6-phosphate	C6H14O12P2	339	241	141	15
13C Fructose 1,6-phosphate	^{13}C6H14O12P2	345	247	141	15
2-phospho-glycerate	C3H7O7P	185	97	58	15
13C 2-phospho-glycerate	^{13}C3H7O7P	188	100	58	15
Phosphoenolpyruvic acid	C3H5O6P	167	63	74	73
13C Phosphoenolpyruvic acid	^{13}C3H5O6P	170	66	74	73
Pyruvic acid	C3H4O3	87	43	32	10
13C Pyruvic acid	^{13}C3H4O3	90	45	32	10
Lactic acid	C3H6O3	89	45	32	13
13C Lactic acid	^{13}C3H6O3	92	47	32	13
Citric acid	C6H8O7	191	111	84	14
13C Citric acid	^{13}C6H8O7	197	115	84	14
Aconitic acid	C6H6O6	173	85	55	14
13C Aconitic acid	^{13}C6H6O6	179	89	55	14
α -Ketoglutaric acid	C5H6O5	145	57	47	13
13C α -Ketoglutaric acid	^{13}C5H6O5	150	60	47	13
Fumaric acid	C4H4O4	115	27	39	14
13C Fumaric acid	^{13}C4H4O4	119	29	39	14
Succinic acid	C4H6O4	117	99	45	12
13C Succinic acid	^{13}C4H6O4	121	103	45	12
Succinyl-CoA	C25H40N7O19P3S	866	339	309	51
13C Succinyl-CoA	^{13}C25H40N7O19P3S	872	342	309	51
Malic acid	C4H6O5	133	73	74	18
13C Malic acid	^{13}C4H6O5	137	75	74	18
Oxaloacetic acid	C4H4O5	131	44	47	15
13C Oxaloacetic acid	^{13}C4H4O5	135	46	47	15
内標 Fluorescein	C21H12O5	331	286	128	24

Table. 3-2 (B)　ネガティブイオンモードで測定を行う標的分子

３-５　ミトコンドリア単体の代謝物追跡に向けた１細胞質量分析法の適用

検討をもとに、ミトコンドリア単体の分析を行った。1 細胞質量分析法により、生きた細胞からミトコンドリア単体と細胞質をサンプリングした。（Fig. 3-8 (A), (B)）ミト

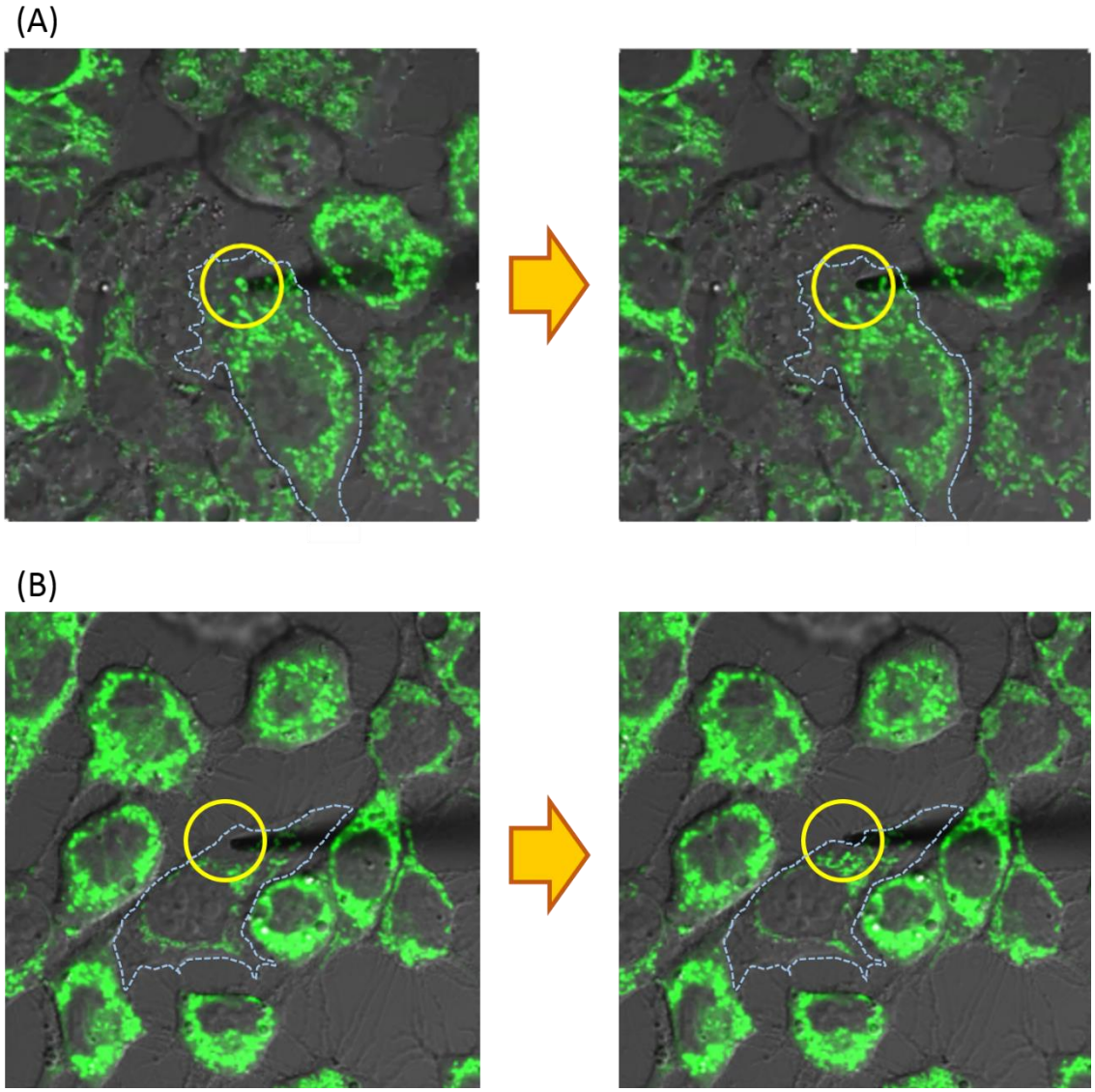


Fig 3-8　ミトコンドリア単体(A)と細胞質(B)をサンプリングする様子

コンドリアをサンプリングしたチップを、ネガティブイオンモードで測定した際のスペクトルと、細胞質をサンプリングしたチップを測定した際のスペクトルで、異なるスペクトルパターンが得られた。スペクトルが得られたデータのうち、MitoTracker Green が検出されていたデータを、ミトコンドリアを確実にサンプリングできたデータとして使用した。（Fig. 3-9）

得られたスペクトルから、目的としていた解糖系と TCA サイクルの代謝物のほとんどを検出できていることが確認できた。解糖系に関する代謝物では、Glucose 6-phosphate と、2-Phosphoglycerate の 2 つの代謝物が検出できていなかった。これは、両代謝物ともリン酸がついた代謝物であり、不安定であるため、質量分析に取り込まれ

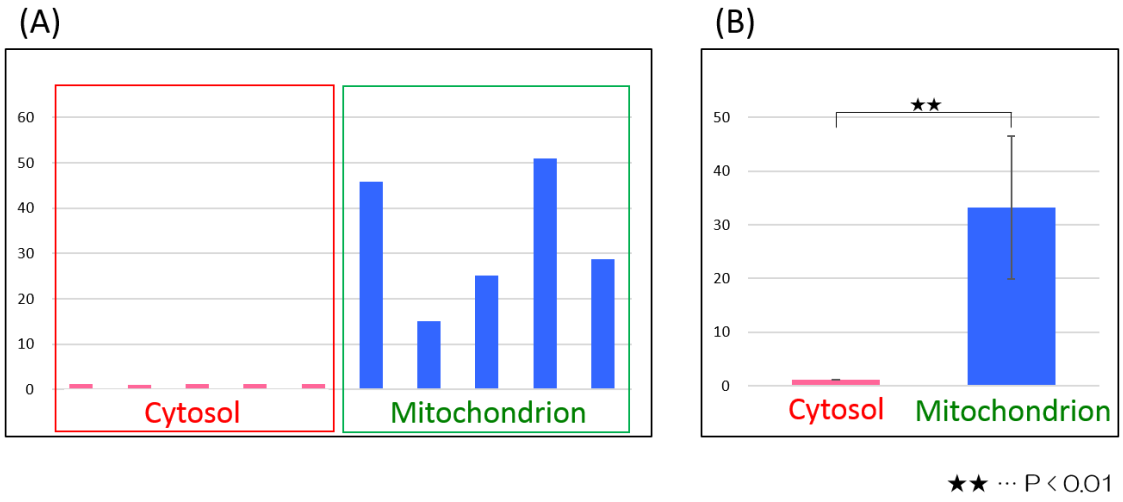


Fig 3-8　ミトコンドリア単体と細胞質を 5 回ずつサンプリングして測定して
検出された MitoTracker Green のピーク強度(A)と、
細胞質とミトコンドリアでのピーク強度の平均値と分散(B)
P 値は分散が等しくない仮定における t-検定の結果

た際にイオンが崩壊して狙った *m/z* で検出できなかったこと、もしくは、細胞内での濃度が低く、質量分析の検出限界に届かなかった可能性が考えられた。

３-５-１　解糖系代謝物の小器官間比較

解糖系の代謝物に関しては、ほとんどの代謝物が検出できた。その結果を示したのが Fig. 3-10 であり、1 つの代謝物につき 2 本あるヒストグラムの左が細胞質をサンプリング、測定して得られたイオンのピーク強度、右がミトコンドリアをサンプリング、測定して得られたイオンのピーク強度示している。ここでは、各代謝物における細胞質とミトコンドリアの間の代謝物量は比較できるが、異なる代謝物間では、分子のイオン化され易さの違いもあり、横軸のピーク強度から増減を議論することはできない。

検出された Glucose、Fructose 1,6-phosphate、3-phosphoglyceric acid、Phosphoenolpyruvic acid、Pyruvic acid、Lactic acid といった全ての代謝物でミトコンドリアより細胞質で強く検出される傾向にあった。その中でも、Pyruvic acid は比較的、細胞質とミトコンドリアで同程度のイオン強度を示していた。（Fig. 3-10）

解糖系から TCA サイクルへの移り変わるときに、解糖系によって生じた Pyruvic acid がミトコンドリアに入り、そこで Oxaloacetic acid に代謝されて TCA サイクルが始まると言われているが、Pyruvic acid は細胞質とミトコンドリアで同程度の濃度で保たれており、濃度輸送によってミトコンドリアに取り込まれる可能性が示唆され

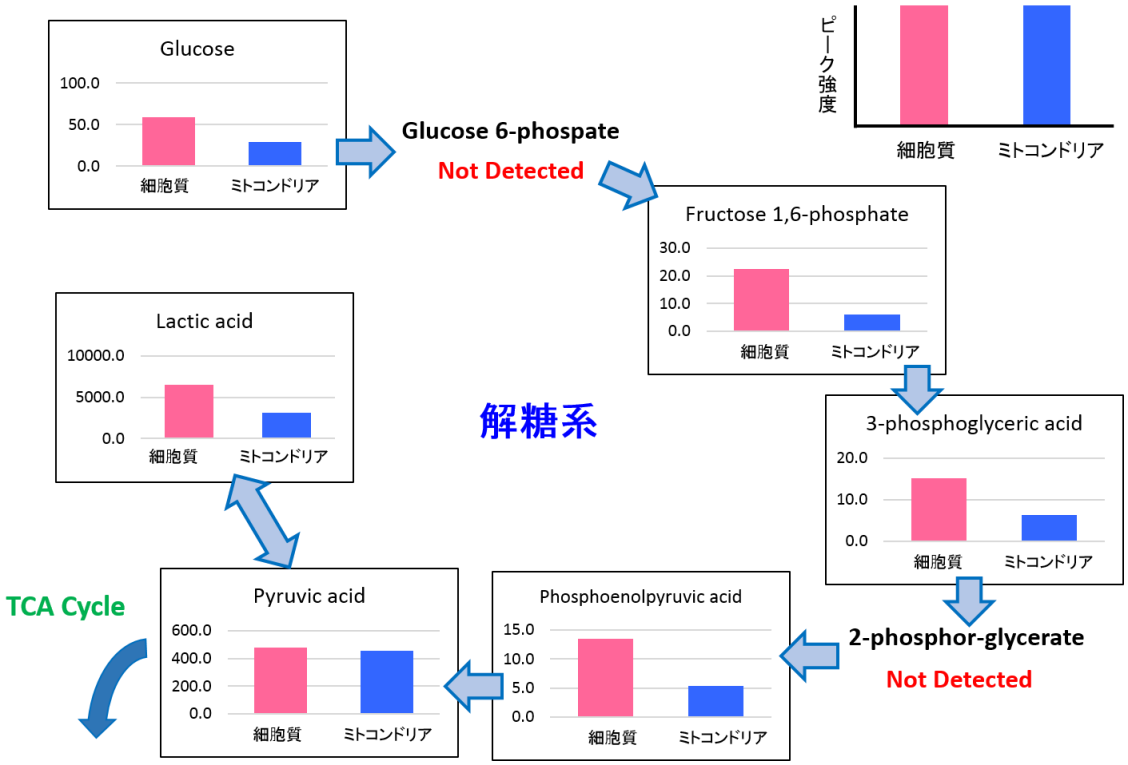


Fig 3-10　解糖系における、細胞質とミトコンドリア間での代謝物比較
縦軸はその分子イオンのピーク強度

た。解糖系は、細胞外から入った Glucose が、細胞質内でエネルギーである ATP 等を

作る、生命維持に欠かせない機構である。そのため、常に細胞質にある程度の蓄積はされており、必要なときにエネルギーを算出できる体制を整えていることが可能性として考えられる。さらに、Lactic acid は、生体が飢餓状態になったときに、糖を産出するための経路である糖新生のスタートとなる代謝物である。そのことからも、細胞質は常に必要なときに必要なエネルギーを産出できるよう準備を整える機構がある可能性が示唆された。

TCA サイクルの代謝物に関しても、ほとんどの代謝物が検出できた。その結果を示したのが Fig. 3-11 で、Fig. 3-10 と同様、1 つの代謝物につき 2 本あるヒストグラムの左が細胞質をサンプリング、測定して得られたイオンのピーク強度、右がミトコンドリアをサンプリング、測定して得られたイオンのピーク強度示している。ここでは、各代謝物における細胞質とミトコンドリアの間の代謝物量は比較できるが、異なる代謝物間では、分子のイオン化され易さの違いもあり、横軸のピーク強度から増減を議論することはできない。

Citric acid、Succinic acid は細胞質で強く検出される傾向にあったが、Aconitic acid、a-Ketoglutaric acid、Malic acid については、ミトコンドリアで強く検出される傾向にあった。その他の、Oxaloacetic acid と Fumaric acid は、細胞質とミトコンドリアの間では検出されたイオンのピーク強度にあまり違いは無いようだった。（Fig. 3-11）

これらの代謝物のうち、Citric acid はトリカルボン酸輸送体の働きによって、ミトコンドリア内から細胞質に放出される。そしてミトコンドリア内の Citric acid の濃度を低く保っておき、Pyruvic acid から Oxaloacetic acid への代謝を進め、TCA サイクルを円滑に回す働きを持っている可能性がある。また、a-Ketoglutaric acid は a-ケトグルタル酸輸送体の働きによって、細胞質からミトコンドリア外に取り込まれる。Succinyl-CoA は、TCA サイクル内で Succinic acid となって TCA サイクルを進めるだけでなく、Heme を合成するための経路にも繋がっていく。Heme 合成経路と TCA サ

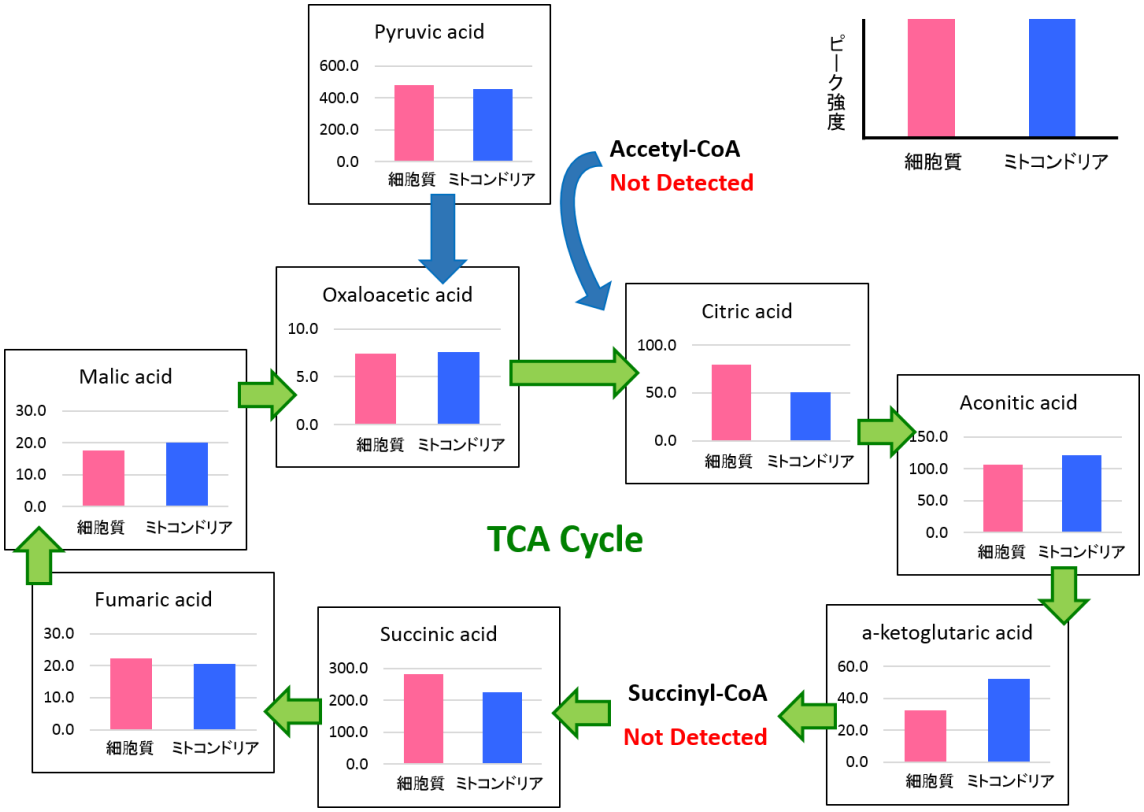


Fig 3-11　TCA サイクルにおける、細胞質とミトコンドリア間での代謝物比較
縦軸はその分子イオンのピーク強度

イクルといった、2 つの重要な代謝経路を動かしているため、Succinyl-CoA が枯渇することのないよう、細胞質からミトコンドリア内へ a-Ketoglutaric acid を取り込む機構が働いている可能性が示唆された。低く保っておき、Pyruvic acid から Oxaloacetic acid への代謝を進め、TCA サイクルを円滑に回す働きを持っている可能性がある。また、a-Ketoglutaric acid は a-ケトグルタル酸輸送体の働きによって、細胞質からミトコンドリア外に取り込まれる。Succinyl-CoA は、TCA サイクル内で Succinic acid となって TCA サイクルを進めるだけでなく、Heme を合成するための経路にも繋がって

いく。Heme 合成経路と TCA サイクルといった、2 つの重要な代謝経路を動かしているため、Succinyl-CoA が枯渇することのないよう、細胞質からミトコンドリア内へ a-Ketoglutaric acid を取り込む機構が働いている可能性が示唆された。

３-５-２　^{13}C Glucose の代謝追跡

解糖系の代謝物に関しては、検出された Glucose、Fructose 1,6-phosphate、3-Phosphoglyceric acid、Phosphoenolpyruvic acid、Pyruvic acid、Lactic acid といった全ての代謝物で、細胞質では ^{12}C から ^{13}C の代謝物に置換されていった様子が確認された。Fig. 3-12 で、1 つの代謝物につき 4 本あるヒストグラムの左 2 本が細胞質の測定データを示している。そのうち、左側は ^{13}C Glucose を投与してから 3 時間後に細胞質をサンプリングして得られたデータ、右側は ^{13}C Glucose を投与してから 12 時間後に細胞質をサンプリングして得られたデータを示している。4 本あるヒストグラムの右 2 本はミトコンドリアの測定データを示している。そのうち、左側は ^{13}C Glucose を投与してから 3 時間後にミトコンドリアをサンプリングして得られたデータ、右側は ^{13}C Glucose を投与してから 12 時間後にミトコンドリアをサンプリングして得られたデータを示している。

これらの検出された代謝物の中でも、Glucose に近い代謝物は、置換が早く進行していくことが確認できたが、Glucose から代謝が進んだ Pyruvic acid となると、置換

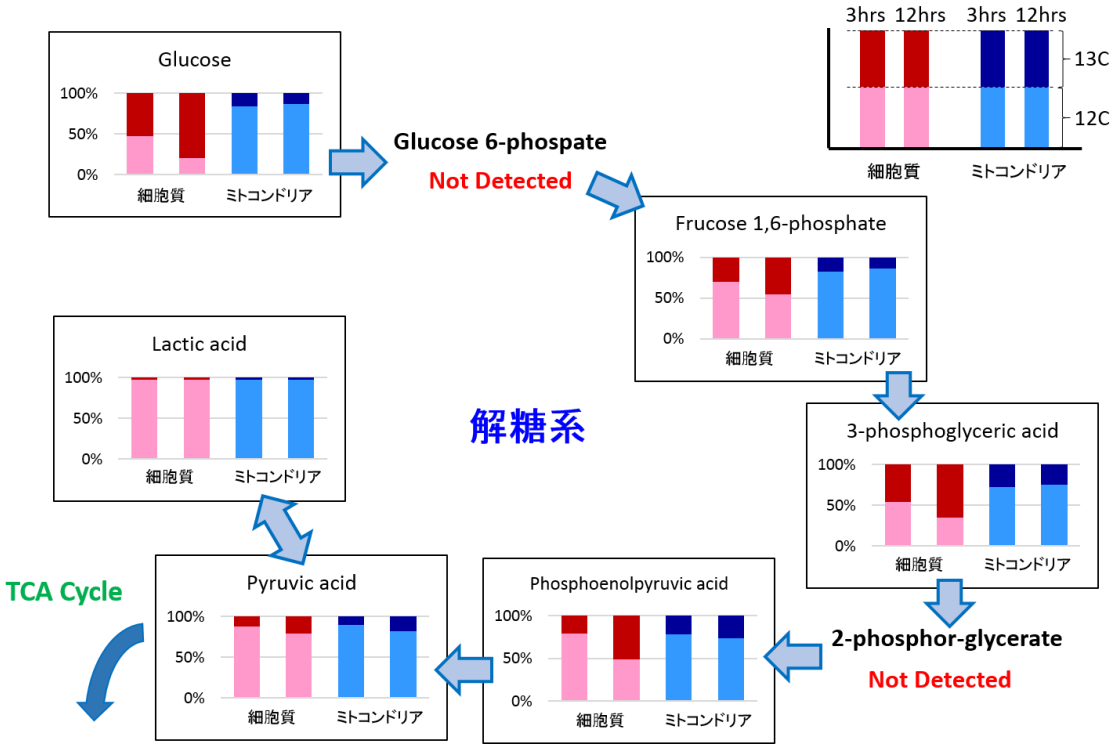


Fig 3-12　解糖系における、細胞質とミトコンドリア間での同位体標識割合の変化
縦軸はその分子イオンの置換割合

される割合が少なくなっていた。ミトコンドリアについては、Glucose、Frucutose-1,6-phosphate、3-Phosphoglyceric acid、Phosphoenolpyruvic acid で、置換された様子はほとんど観察できなかった。(Fig. 3-12)

解糖系は、主に細胞質で行われる代謝経路であり、これらの代謝物はミトコンドリアにあまり取り込まれること無く、細胞質内に蓄積している可能性が示唆された。Pyruvic acid は細胞質と同程度の割合で置換されていたが、これは解糖系によって産出された ^{13}C Pyruvic acid が、細胞質からミトコンドリアへ濃度輸送によって取り込まれている

可能性があるため、細胞質での ^{13}C Pyruvic acid の置換割合がそのままミトコンドリアでの置換割合に反映していることが原因であると考えられる。

TCA サイクルの代謝物に関しては、検出された Citric acid、Aconitic acid、a-Ketoglutaric acid、Succinic acid、Fumaric acid、Malic acid、Oxaloacetic acid の全てで、細胞質とミトコンドリアにおいて、同程度置換されている様子が確認された。

Fig. 3-12 のときと同様、Fig. 3-13 においても、1 つの代謝物につき 4 本あるヒストグラムの左 2 本が細胞質の測定データを示している。そのうち、左側は ^{13}C Glucose

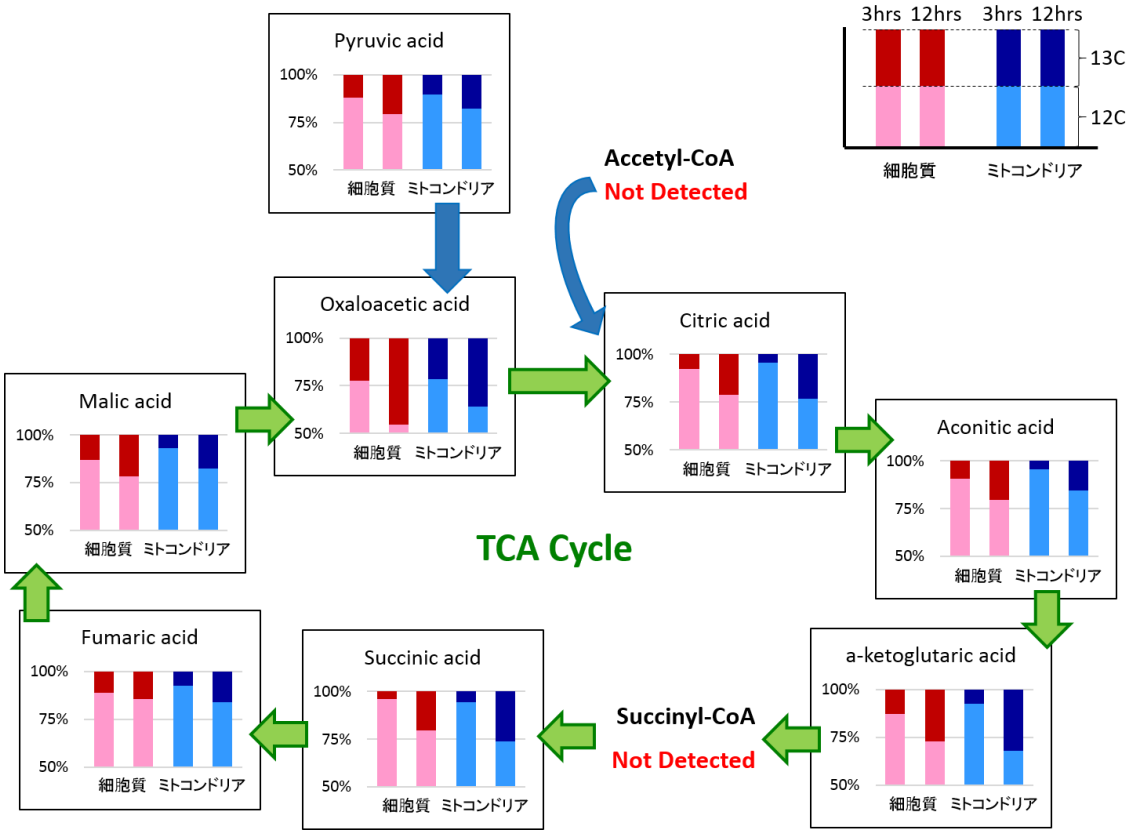


Fig 3-13　TCA サイクルでの、細胞質とミトコンドリア間の同位体標識割合の変化
縦軸はその分子イオンの置換割合

を投与してから 3 時間後に細胞質をサンプリングして得られたデータ、右側は ^{13}C Glucose を投与してから 12 時間後に細胞質をサンプリングして得られたデータを示している。4 本あるヒストグラムの右 2 本はミトコンドリアの測定データを示している。そのうち、左側は ^{13}C Glucose を投与してから 3 時間後にミトコンドリアをサンプリングして得られたデータ、右側は ^{13}C Glucose を投与してから 12 時間後にミトコンドリアをサンプリングして得られたデータを示している。

検出された代謝物のうち、Oxaloacetic acid、Citric acid、a-Ketoglutaric acid については、^{13}C への置換の進行が比較的早いが、その後代謝が進行した Fumaric acid については、あまり置換の進行が進んでいないようだった。(Fig. 3-13)

Fumaric acid は、アミノ酸である Tyrosine と Phenylalanine からの代謝経路が存在しており、TCA サイクル内の Fumaric acid への代謝が何らかの原因によって妨げられた場合に、他の代謝経路から補填する機能が備わっている。そのため、今回の測定結果から検出された、Fumaric acid の置換の進行が比較的遅いことについては、他の代謝経路からの移入が影響している可能性が示唆された。

３-６　小活

まず、1 細胞質量分析法を使うことにより、生きた 1 つの細胞から、ミトコンドリア単体をサンプリングし、そこに含まれる低分子を検出することを試みた。そのために、

ミトコンドリアを正確にサンプリングできていることの確証を得るため、ミトコンドリア特異的蛍光プローブを 4 種類（MitoTracker Red、MitoRed、MitoTracker Green、Rh 123）を細胞に投与し、それぞれの蛍光を発している箇所、ミトコンドリアをナノスプレーチップで捕捉し、高分解能質量分析計 LTQ-Orbitrap Velos Pro で蛍光プローブの分子分析を行おうと試みた。しかしながら、標的としているミトコンドリア単体が小さすぎるからか、その中に取り込まれていると考えられる蛍光プローブは全く検出されなかった。そこで、より高感度な分析を目指し、高感度質量分析計 TSQ-Vantage での分析を試みた。その結果、MitoTracker Green だけで分子ピークが検出された。これにより、ミトコンドリアをサンプリングできたかどうかを確認する方法として、顕微鏡で視覚的に観察することだけでなく、質量分析からもミトコンドリアがサンプリングされ、分析できているという確証を得ることができた。これにより、生きたミトコンドリア単体から低分子を分子分析できることが明らかになった。

さらに、細胞が生命活動を維持していくために重要な、解糖系、TCA サイクルの代謝経路の代謝物が代謝され、小器官の間を出入りしている様子を、1 細胞レベルで追跡するため、安定同位体である ^{13}C Glucose を使って実験を行った。細胞を培養している培地を、^{13}C Glucose のものに置き換え、3 時間後にミトコンドリアと細胞質をサンプリング、そして、12 時間後に同様にミトコンドリアと細胞質をサンプリングした。その結果、細胞質では解糖系の代謝物で ^{12}C から ^{13}C への置き換わりがあったが、ミトコ

ンドリアではあまり置き換わっている様子はなかった。これは、細胞質はミトコンドリアと比較して、解糖系が頻繁に行われる場所であるため、これらの代謝物を蓄積していることが原因だと考えられる。これと対照的に、TCA サイクルの代謝物は、細胞質でもミトコンドリアでも、^{12}C から ^{13}C へ置き換わっている様子が観察された。細胞質でもミトコンドリアでも、同じくらいの推移を表していたことから、この酸化的リン酸化の代謝は主に TCA サイクル内で進むが、代謝物は細胞質とミトコンドリアを、ある程度行き来することができる可能性が示唆された。

以上より、本法に安定同位体を用いた分析を行うことで、1 生細胞に存在するミトコンドリア単体の代謝を追跡することが可能であることを示した。また、小器官によって代謝の速度が異なること、そして、小器官の間での代謝物の出入りを追跡することが可能であることを示した。

総括

生体は、多くの個性を持った細胞が集まり、有機的に関わり合うことで生命維持を行っている。特に、その細胞の中にある小器官のミトコンドリアは、生体が必要とするエネルギー代謝やアポトーシスといった細胞死、シグナル伝達など、多くの生命現象に深く関わっていることが明らかになってきた。一方、このミトコンドリアの機能が異常になり、脳卒中やアルツハイマー病、てんかんやガンといった、疾患の病態にまで深く関与していることも明らかとなってきている。そして、これらの病気への対策として、ミトコンドリアをターゲットとした創薬も進められている。

しかし、顕微鏡で観察しても明らかなように、同じ大きさ、形をした細胞は無く、一つ一つ個性を持っている。病気や薬に対しての反応も、個体によって異なっており、全く同じ反応は示さない。したがって、病気のメカニズム解明や治療薬の開発には、細胞の個性に合わせた研究を行うことが必要となる。ましてや、1 つの細胞内に数十から数千と存在するミトコンドリアは、細胞以上に個性を持っていることが想像できる。そのため、病気のメカニズム解析や治療薬の開発には、1 つの細胞の中にあるミトコンドリアでどのような代謝が行われているのか、そして、外部からの刺激にどのような反応を示すのか、ミトコンドリアの個性に注目して進めていくことが重要である。しかし、今まで 1 つの細胞に含まれるミトコンドリアの代謝物を網羅的に分析する方法がなく、大量細胞での研究のみが進められていた。

そこで、私は 1 細胞質量分析法をミトコンドリアの代謝物探索に適用することにした。この方法により、世界で始めてミトコンドリアの中における分子の挙動や生命現象のメカニズムを、より高速に、直接的に分析し、明らかにすることができるのではと考えた。

まず、第 2 章では、1 つの細胞に含まれるミトコンドリアを対象に、メタボロミクスを試みた。生きた細胞の中にあるミトコンドリアを観察するため、ミトコンドリアの特異的蛍光プローブである MitoRed を細胞に投与し、蛍光顕微鏡下で赤く蛍光を発している箇所をナノスプレーチップで採取し、質量分析で分子分析を行った。その結果、ミトコンドリアをサンプリングして測定したマススペクトルと、細胞質をサンプリングして測定したマススペクトルの全てを PCA によって解析した結果、スコアプロットより各小器官におけるマススペクトルが、それぞれ特徴的なピークパターンを持っていることが分かった。そして、そこから代表的な代謝物を抽出し、そのイオン強度を t-検定で比較することで、どこの小器官で特異的に検出される分子なのかを判別することができた。

また、イオン強度の強かったピークについては、MS/MS を行ってプロダクトイオンのパターンを解析することで、ミトコンドリアに特異的に含まれる分子の同定を行うことが可能であることを示した。m/z = 401.2 はミトコンドリアに特異的に検出されたステロール脂質であり、ミトコンドリア内の脂質か膜成分の検出に成功したものではないかと考えられる。

以上より、本法を用いて 1 生細胞に存在するミトコンドリアの分子成分を検出することが可能となり、また、それらの代謝物がどのような分子なのか、同定まで行うことが可能であることを示した。生きた細胞からミトコンドリアを取り出して、成分の網羅的分析に成功した例は今までに無く、世界初の結果を得ることができた。

次に第 3 章では、ミトコンドリアの個性も考慮した代謝物の情報を得るために、ミトコンドリア単体でにおける分析の系の確立を試みた。ミトコンドリア単体を分析するための第一歩として、正確にミトコンドリアを捕捉できているのか確認を得るための指標として、蛍光プローブを使用するための検討を行った。ミトコンドリア特異的蛍光プローブ 4 種類（MitoTracker Red、MitoRed、MitoTracker Green、Rh 123）を細胞に投与し、共焦点レーザー顕微鏡下で 60 倍の油浸レンズを用いて観察した。蛍光観察を行いながらミトコンドリア単体をナノスプレーチップで採取し、質量分析計 LTQ-Orbitrap Velos Pro で蛍光プローブの分子分析を試みた。しかしながら、標的としているミトコンドリア単体が小さ過ぎるためか、そこに取り込まれていると考えられる蛍光プローブは全く検出することができなかった。そこでこの問題を解決するため、高感度質量分析計 TSQ-Vantage での分析を試みた。その結果、使用した 4 種類の蛍光プローブのうち、MitoTracker Green だけ分子ピークが検出された。このことから、質量分析からも、ミトコンドリアが採取されて分析できているという確証を得ることができた。

そして、その蛍光プローブを指標に使い、細胞が生命活動を維持していくために重要な、解糖系、TCA サイクルの代謝物の小器官間における比較を行った。解糖系の代謝物に関しては、検出された全ての代謝物でミトコンドリアより細胞質で強く検出される傾向にあった。その中でも、Pyruvic acid は細胞質とミトコンドリアで比較的近いイオン強度を示していた。Pyruvic acid は細胞質とミトコンドリアで同程度の濃度で保たれており、濃度輸送によってミトコンドリアに取り込まれる可能性が示唆された。また、Lactic acid は糖新生のスタートとなる代謝物であることから、細胞質は常に必要なときに必要なエネルギーを産出できるよう準備を整える機構がある可能性が示唆された。TCA サイクルの代謝物に関しては、Citric acid、Succinic acid は細胞質で強く検出される傾向にあったが、Aconitic acid、a-Ketoglutaric acid、Malic acid については、ミトコンドリアで強く検出される傾向にあった。今回検出できていなかった Succinyl-CoA は、Succinic acid へと代謝されて TCA サイクルを進めるだけでなく、Heme 合成経路にも繋がっている。TCA サイクルと Heme 合成経路といった、細胞にとって重要な 2 つ代謝経路に関与しているため、Succinyl-CoA が枯渇することのないよう、細胞質からミトコンドリア内へ a-Ketoglutaric acid 取り込む機構が働いている可能性が示唆された。

さらに、それらの代謝物が代謝され、小器官の間を出入りしている様子を、1 細胞レベルで追跡するため、安定同位体である ^{13}C Glucose を使って実験を行った。細胞培養培

地を、^{13}C Glucose の培地に置換し、3 時間後、そして 12 時間後にミトコンドリアと細胞質をそれぞれ採取し、^{13}C Glucose とその代謝物の検出を試みた。その結果、細胞質では解糖系の代謝物で ^{12}C から ^{13}C への置き換わりがあったが、ミトコンドリアではあまり置き換わっていなかった。細胞質はミトコンドリアと比較して、解糖系が頻繁に行われる場所であり、同代謝物を蓄積していることが原因だと考えられる。これと対照的に、TCA サイクルの代謝物は、細胞質でもミトコンドリアでも、^{12}C から ^{13}C の代謝物へと置き換わっている様子が観察された。TCA サイクルの代謝物は、代謝物は細胞質とミトコンドリアを、ある程度行き来することができる可能性があることが考えられる。

以上より、本法に安定同位体を用いた分析を行うことで、1 生細胞に存在するミトコンドリア単体の代謝を追跡することが可能であることを示した。また、小器官によって代謝の速度が異なること、そして、小器官の間での代謝物の出入りを追跡することが可能であることを示した。質量分析計を用いてミトコンドリア単体の中に含まれる同位体標識分子の代謝追跡に世界で初めて成功した。

本研究では、従来の分析法では得ることのできない 1 細胞内のミトコンドリア代謝物情報を得ることを可能とし、ミトコンドリアに特異的な脂質成分を検出し、その分子の同定を行うことに成功した。加えて、解糖系代謝物が細胞質に蓄積される傾向にあること、TCA サイクル代謝物が細胞質とミトコンドリアを出入りしていることを示した。

そして今後は、より生物学的な現象への応用に向けて、ミトコンドリア障害を起こす薬物を投与したときのミトコンドリアと細胞質での代謝物変化、また、神経細胞上で異常に蓄積されたミトコンドリアの変異の原因解明に取り組んでいくことを考えている。

また、蛍光観察を組み合わせた実験が可能となったことから、蛍光観察中に何か変化を起こした瞬間のミトコンドリア、例えば ATP 濃度の急激な変化が起こった際の代謝物の変化や、細胞質との Ca^{2+}のやり取りを行う際のその周辺で動く代謝物変化の追跡が可能となることが考えられる。さらに、採取した瞬間の蛍光強度を使って、質量分析で得られた分子ピークの補正を行うことにより、採取したミトコンドリアの大きさによる分子ピークのばらつきを補正することが可能となると考えられる。さらに、標的分子の濃度に依存する蛍光プローブを使用することで、蛍光強度と質量分析の両方で細胞内の分子濃度を測定することが可能となる。生きた細胞の動きを観察しながら、その分子挙動を正確に分析できることを目指していく。

この手法はミトコンドリアだけに限らず、核や液胞といった他の小器官の代謝物探索や薬物代謝活性の測定、さらに、培養動物細胞だけでなく、植物の組織間での分子分布の分析を行うことが可能である。植物にいたっては、本法によって生きたまま同じ個体で経時的に分析することができるという利点を生かし、生体メカニズムの解明、農作物の環境による育成の違い、品質管理にも応用可能であると考えられる。本手法を用いて、

あらゆる生体組織内における分子の網羅的分析と、蛍光観察を組み合わせた生体組織内の分子分布や挙動を 1 細胞レベルで解析することで、生命現象の分子での解析に大きく貢献できることが期待される。

参考文献

1. J. Lopez and S. W. G. Tait
"Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within"
British Journal of Cancer, **2015**, 112 (6), 957-962

2. A. L. Stephan
"Mitochondrial Dynamics – Mitochondrial Fission and Fusion in Human Disease"
The New England Journal of Medicine, **2013**, 369 (23), 2236-2251

3. K. Okamoto and J. M. Shaw
"Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes"
Annual Reviews of Ganetics, **2005**, 39, 503-536

4. R. Zenobi
"Single-cell Metabolomics: Analytical and Biological Perspectives."
Science, **2013**, 342 (6163), 1243259

5. A. P. Patel, I. Tirosh, J. J. Trombetta, A. K. Shalek, S. M. Gillespie, H. Wakimoto, D. P. Cahill, B. V. Nahed, W. T. Curry, R. L. Martuza, D. N. Louis, O. Rozenblatt-Rosen, M. L. Suva, A. Regev and B. E. Bernstein
"Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma"
Science, **2014**, 344 (6190), 1396-1401

6. J. M. Irish, N. Kotecha and G. P. Nolan
"Innovation - Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics"
Nature Reviews Cancer, **2006**, 6 (2), 146-155

7. T. Graf and M. Stadtfeld
"Heterogeneity of Embryonic and Adult Stem Cells"

Cell Stem Cell, **2008**, 3 (5), 480-483

8. L. Cai, N. Friedman and X. S. Xie
"Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level"
Nature, **2006**, 440 (7082), 358-362

9. N. Rosenfeld, J. W. Young, U. Alon, P. S. Swain and M. B. Elowitz
"Gene regulation at the single-cell level"
Science, **2005**, 307 (5717), 1962-1965

10. N. M. Toriello, E. S. Douglas, N. Thaitrong, S. C. Hsiao, M. B. Francis, C. R. Bertozzi and R. A. Mathies
"Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis"
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2008**, 105 (51), 20173-20178

11. X. Liu, F. Long, H. Peng, S. J. Aerni, M. Jiang, A. Sanchez-Blanco, J. I. Murray, E. Preston, B. Mericle, S. Batzoglou, E. W. Myers and S. K. Kim
"Analysis of Cell Fate from Single-Cell Gene Expression Profiles in *C. elegans*"
Cell, **2009**, 139 (3), 623-633

12. C. D. Whitmore, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, R. L. Schnaar and N. J. Dovichi
"Metabolic cytometry. Glycosphingolipid metabolism in single cells"
Analytical Chemistry, **2007**, 79 (14), 5139-5142

13. A. Boardman, T. Chang, A. Folch and N. J. Dovichi
"Indium-Tin Oxide Coated Microfabricated Device for the Injection of a Single Cell into a Fused Silica Capillary for Chemical Cytometry"
Analytical Chemistry, **2010**, 82 (23), 9959-9961

14. G. H. An, O. S. Suh, H. C. Kwon, K. Kim and E. A. Johnson
"Quantification of carotenoids in cells of Phaffia rhodozyma by autofluorescence"
Biotechnology Letters, **2000**, 22 (12), 1031-1034

15. O. Shimomura, F. H. Johnson and Y. Saiga

"Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea"
Journal of Cellular and Comparative Physiology, **1962**, 59 (3), 223-239

16. T. R. Kennedy, D. M. Oates, R. B. Cooper, B. Nickerson, and W. J. Jorgenson
"Microcolumn Separations and the Analysis of Single Cells"
Science, **1989**, 246 (4926), 57-63

17. S. C. Grant, N. R. Aiken, H. D. Plant, S. Gibbs, T. H. Mareci, A. G. Webb and S. J. Blackband
"NMR spectroscopy of single neurons"
Magnetic Resonance in Medicine, **2000**, 44 (1), 19-22

18. J. B. Aguayo, S. J. Blackband, J. Schoeniger, M. A. Mattingly and M. Hintermann
"Nuclear-magnetic-resonance Imaging of a Single Cell"
Nature, **1986**, 322 (6075), 190-191

19. M. Bictash, T. M. Ebbels, Q. Chan, R. L. Loo, I. K. S. Yap, I. J. Brown, M. de Iorio, M. L. Daviglus, E. Holmes, J. Stamler, J. K. Nicholson and P. Elliott
"Opening up the "Black Box": Metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology"
Journal of Clinical Epidemiology, **2010**, 63 (9), 970-979

20. J. F. Xiao, R. S. Varghese, B. Zhou, M. R. N. Ranjbar, Y. Zhao, T.-H. Tsai, C. Di Poto, J. Wang, D. Goerlitz, Y. Luo, A. K. Cheema, N. Sarhan, H. Soliman, M. G. Tadesse, D. H. Ziada and H. W. Ressom
"LC-MS Based Serum Metabolomics for Identification of Hepatocellular Carcinoma Biomarkers in Egyptian Cohort"
Journal of Proteome Research, **2012**, 11 (12), 5914-5923

21. S. Nishiumi, T. Kobayashi, A. Ikeda, T. Yoshie, M. Kibi, Y. Izumi, T. Okuno, N. Hayashi, S. Kawano, T. Takenawa, T. Azuma and M. Yoshida
"A Novel Serum Metabolomics-Based Diagnostic Approach for Colorectal Cancer"
PLoS One, **2012**, 7, 7

22. D. Rojo, C. Barbas and F. J. Ruperez
"LC-MS metabolomics of polar compounds"
Bioanalysis, **2012**, 4 (10), 1235-1243

23. P. Livengood, R. Maciejewski, W. Chen and D. S. Ebert
"OmicsVis: an interactive tool for visually analyzing metabolomics data"
Bmc Bioinformatics, **2012**, 13

24. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T Yoshida
"Protein and Polymer Analyses up to *m/z* 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry"
Rapid Communications in Mass Spectrometry, **1988**, 2 (8), 151-153

25. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse
"Electrospray Ionization for Mass-spectrometry of Large Biomolecules"
Science, **1989**, 246 (4926), 64-71

26. M. Yamashita and J. B. Fenn
"Electrospray Ion-source - Another Variation on the Free-jet Theme"
Journal of Physical Chemistry, **1984**, 88 (20), 4451-4459

27. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita and J. B. Fenn
"Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers"
Analytical Chemistry, **1985**, 57 (3), 675-679

28. M. Shimizu, N. Ojima, H. Ohnishi, T. Shingaki, Y. Hirakawa and T. Masujima
"Development of the single-cell MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) mass-spectroscopic assay"
Analytical Sciences, **2013**, 19 (1), 49-53

29. A. Amantonico, P. L. Urban, S. R. Fagerer, R. M. Balabin and R. Zenobi
"Single-Cell MALDI-MS as an Analytical Tool for Studying Intrapopulation Metabolic Heterogeneity of Unicellular Organisms"
Analytical Chemistry, **2010**, 82 (17), 7394-7400

30. S. S. Rubakhin, W. T. Greenough and J. V. Sweedler
"Spatial profiling with MALDI MS: Distribution of neuropeptides within single neurons"
Analytical Chemistry, **2010**, 75 (20), 5374-5380

31. M. S. Wilm and M. Mann
"Electrospray and Taylor-cone Theory, Doles Beam of Macromolecules at Last"
International Journal of Mass Spectrometry, **1994**, 36 (2-3), 167-180

32. M. Wilm and M. Mann
"Analytical properties of the nanoelectrospray ion source"
Analytical Chemistry, **1996**, 68 (1), 1-8

33. A. Makarov
"Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis"
Analytical Chemistry, **2000**, 72 (6), 1156-1162

34. Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R. G. Cooks
"The Orbitrap: a new mass spectrometer"
Journal of Mass Spectrometry, **2005**, 40, 430-443

35. R. A. Zubarev and A. Makarov
"Orbitrap Mass Spectrometry"
Analytical Chemistry, **2013**, 85, 5288-5296

36. J. R. Yates, D. Cociorva, L. LiaoR. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R. G. Cooks
"Performance of a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid for Peptide Analysis"
Analytical Chemistry, **2006**, 78 (2), 493-500

37. T. Lapainis, S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler
"Capillary Electrophoresis with Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection for Single-Cell Metabolomics"
Analytical Chemistry, **2009**, 81 (14), 5858-5864

38. B. Shrestha and A. Vertes
"In Situ Metabolic Profiling of Single Cells by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry"
Analytical Chemistry, **2009**, 81 (20), 8265-8271

39. S. S. Rubakhin, E. J. Lanni and J. V. Sweedler
"Progress toward single cell metabolomics"
Current Opinion in Biotechnology, **2012**, 24 (1), 95-104

40. V. Barzanti, M. Battino, A. Baracca, M. Cavazzoni, M. Cocchi, R. Noble, M. Maranesi, E. Turchetto and G. Lenaz
"The Effect of Dietary-lipid Changes on the Fatty-acid Composition and Function of Liver, Heart and Brain Mitochondria in the Rat at Different Ages"
British Journal of Nutrition, **1994**, 71 (2), 193-202

41. G. Lenaz
"Role of Mobility of Redox Components in the Inner Mitochondrial-membrane"
Journal of Membrane Biology, **1988**, 104 (3), 193-209

42. H. Esterbauer, R. J. Schaur and H. Zollner
"Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenel, Malonaldehyde and Related Aldehydes"
Free Radical Biology and Medicine, **1991**, 11 (1), 81-128

43. I. G. Stavrovskaya, S. V. Baranov, X. Guo, S. S. Davies, L. J. Roberts, II and B. S. Kristal
"Reactive gamma-ketoaldehydes formed via the isoprostane pathway disrupt mitochondrial respiration and calcium homeostasis"
Free Radical Biology and Medicine, **2010**, 49 (4), 567-579

44. B. S. Kristal, A. D. Conway, A. M. Brown, J. C. Jain, P. A. Ulluci, S. W. Li and W. J. Burke
"Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria"
Free Radical Biology and Medicine, **2001**, 30 (8), 924-931

45. W. J. Burke, B. S. Kristal, B. P. Yu, S. W. Li and T. S. Lin
"Norepinephrine transmitter metabolite generates free radicals and activates mitochondrial permeability transition: a mechanism for DOPEGAL-induced apoptosis"
Brain Research, **1998**, 787 (2), 328-332

46. J. M. Land, J. A. Morgan-Hughes, I. Hargreaves and S. J. R. Heales
"Mitochondrial disease: A historical, biochemical, and London perspective"
Neurochemical Research, **2004**, 29 (3), 483-491

47. M. McKenzie, D. Liolitsa and M. G. Hanna
"Mitochondrial disease: Mutations and mechanisms"
Neurochemical Research, **2004**, 29 (3), 589-600

48. J. J. Chen and B. P. Yu
"Alterations in Mitochondrial-membrane Fluidity by Lipid-peroxidation Products"
Free Radical Biology and Medicine, **1994**, 17 (5), 411-418

49. S. Collins and T. Meyer
"CELL BIOLOGY A sensor for calcium uptake"
Nature, **2010**, 467 (7313), 283-283

50. Y. Chen, M. Yu, D. P. Jones, J. T. Greenamyre and J. Cai
"Protection against oxidant-induced apoptosis by mitochondrial thioredoxin in SH-SY5Y neuroblastoma cells"
Toxicology and Applied Pharmacology, **2006**, 216 (2), 256-262

51. D. C. Wallace
"A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine"
Annual Review of Genetics, **2005**, 39, 359-407

52. M. S. Remedi, C. G. Nichols and J. C. Koster
"The mitochondria and insulin release: Nnt just a passing relationship"
Cell Metabolism, **2006**, 3 (1), 5-7

53. B. Yan, L. Dong and J. Neuzil
"Mitochondria: An intriguing target for killing tumour-initiating cells."
Mitochondrion, **2015**, 26, 86-93

54. Van Blerkom J1, Sinclair J and Davis P.
"Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy."
Human Reproduction, **1998**, 13 (10), 2857-2868

55. Barritt JA1, Brenner CA, Malter HE and Cohen J.
"Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation."
Human Reproduction, **2001**, 16 (3), 513-516

56. Hawes SM, Sapienza C and Latham KE.
"Ooplasmic donation in humans: the potential for epigenic modifications."
Human Reproduction, **2002**, 17 (4), 850-852

57. M. Kobayashi and K. Sato
"Mitochondrial behavior and localization in reconstituted oocytes derived from germinal vesicle transfer"
Human Cell, **2008**, 21, 7-11

58. U. Sauer, M. Heinemann and N. Zamboni
"Genetics - Getting closer to the whole picture"
Science, **2007**, 316 (5824), 550-551

59. Di Benedetto G, Pendin D, Greotti E, Pizzo P, Pozzan T.
"Ca2+ and cAMP cross-talk in mitochondria."
The Journal of Physiology, **2014**, 592 (2), 305-312

60. Schnaitman.C and Greenawalt.J. W.
"Enzymatic Properties of Inner and Outer Membranes of Rat Liver Mitochondria"
The Journal of Cell Biology, **1968**, 38 (1), 158-175

61. G. Lenaz
"Role of mobility of redox components in the inner mitochondrial membrane."
The Journal of Membrane Biology, **1988**, 104 (3), 193–209

62. H. Esterbauer, R. J. Schaur and H. Zollner
"Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes."
Free Radical Biology and Medicine, **1991**, 11 (1), 81–128.

63. V. Barzanti, M. Battino, A. Baracca, M. Cavazzoni, M. Cocchi, R. Noble, M. Maranesi, E. Turchetto and G. Lenaz
"The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages."
Britich Journal of Nutrition, **1994**, 71 (2), 193–202

64. J. J. Chen and B. P. Yu
"Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products."
Free Radical Biology and Medicine, **1994**, 17 (5), 411–418

65. B. S. Kristal, B. K. Park and B. P. Yu
"4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition."
The Journal of Biological Chemistry, **1996**, 271 (11), 6033–6038

66. Burke WJ, Kristal BS, Yu BP, Li SW and Lin TS.
"Norepinephrine transmitter metabolite generates free radicals and activates mitochondrial permeability transition: a mechanism for DOPEGAL-induced apoptosis."
Brain Research, **1998**, 787 (2), 328–332

67. B. S. Kristal, A. D. Conway, A. M. Brown, J. C. Jain, P. A. Ulluci, S. W. Li and W. J. Burke
"Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria."
Free Radical Biology and Medicine, **2001**, 30 (8), 924–931.

68. J. M. Land, J. A. Morgan-Hughes, I. Hargreaves and S. J. Heales
"Mitochondrial disease: a historical, biochemical, and London perspective."
Neurochemical Research, **2004**, 29 (3), 483–491

69. M. McKenzie, D. Liolitsa and M. G. Hanna
"Mitochondrial disease: mutations and mechanisms."
Neurochemical Research, **2004**, 29 (3), 589–600

70. G. Lenaz, R. Fato, G. Formiggini and M. L. Genova
"The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport."
Mitochondrion, **2007**, 7 (Suppl), S8–33

71. M. A. Kiebish, X. Han and T. N. Seyfried
"Examination of the brain mitochondrial lipidome using shotgun lipidomics."
Lipidomics: Volume1 Methods and Protocols, **2009**, 579, 3–18

72. I. G. Stavrovskaya, S. V. Baranov, X. Guo, S. S. Davies, L. J. Roberts 2nd and B. S. Kristal
"Reactive gammaketoaldehydes formed via the isoprostane pathway disrupt mitochondrial respiration and calcium homeostasis."
Free Radical Biology and Medicine, **2010**, 49(4), 567–579.

73. J. R. Roede, Y. Park, S. Li, F. H. Strobel and D. P. Jones
"Detailed Mitochondrial Phenotyping by High Resolution Metabolomics"
PLoS ONE, **2012**, 7 (3), e33020

74. S. S. Bird, V. R. Marur, I. G. Stavrovskaya and B. S. Kristal
"Qualitative Characterization of the Rat Liver Mitochondrial Lipidome using LC-MS Profiling and High Energy Collisional Dissociation (HCD) All Ion Fragmentation"
Metabolomics, **2013**, 9 (1 Suppl), 67–83.

75. R. H. Barton
"A decade of advances in metabonomics"
Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, **2011**, 7 (2), 129-136

76. L. Fan, W. Zhang, M. Yin, T. Zhang, X. Wu, H. Zhang, M. Sun, Z. Li, Y. Hou, X. Zhou, G. Lou and K. Li
"Identification of metabolic biomarkers to diagnose epithelial ovarian cancer using a UPLC/QTOF/MS platform"
Acta Oncologica, **2012**, 51 (4), 473-479

77. T. Zhang, X. Wu, M. Yin, L. Fan, H. Zhang, F. Zhao, W. Zhang, C. Ke, G. Zhang, Y. Hou, X. Zhou, G. Lou and K. Li
"Discrimination between malignant and benign ovarian tumors by plasma metabolomic profiling using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry"
Clinica Chimica Acta, **2012**, 413 (9-10), 861-868

78. A. Holmes
"Alan Graham MacDiarmid (1927-2007) - Pioneer of conducting polymers, and proud Antipodean. Obituary"
Nature, **2007**, 44 (7134), 390-390

79. T. Masujima
"Live Single-cell Mass Spectrometry"
Analytical Sciences, **2009**, 25 (8), 953-960

80. H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Harada and T. Masujima
"Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification"
Journal of Mass Spectrometry, **2008**, 43 (12), 1692-1700

81. S. Date, H. Mizuno, N. Tsuyama, T. Harada and T. Masujima
"Direct Drug Metabolism Monitoring in a Live Single Hepatic Cell by Video Mass Spectrometry"
Analytical Sciences, **2012**, 28 (3), 201-203

82. H. Mizuno, N. Tsuyama, S. Date, T. Harada and T. Masujima
"Live Single-cell Metabolomics of Tryptophan and Histidine Metabolites in a Rat Basophil Leukemia Cell"

Analytical Sciences, **2008**, 24 (12), 1525-1527

83. Y. Fukano, N. Tsuyama, H. Mizuno, S. Date, M. Takano and T. Masujima
"Drug metabolite heterogeneity in cultured single cells profiled by pico-trapping direct mass spectrometry"
Nanomedicine, **2012**, **7** (9), 1365-1374

84. N. Tsuyama, H. Mizuno and T. Masujima
"Molecular and Functional Analysis of Cellular Phenomena Using Single-Cell Mass Spectrometry"
Biological & Pharmaceutical Bulletin, **2012**, 35 (9), 1425-1431

85. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)
http://www.genome.jp/kegg/kegg_ja.html

86. LIPID Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS)
http://www.lipidmaps.org/

87. MassBank
http://www.massbank.jp/

88. MetFrag
http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/

89. W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre and J. L. Griffin
"Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy"
Chemical Society Reviews, **2011**, 40 (1), 387-426

90. Y. Cao, Y. Song, N. An, S. Zeng, D. Wang, L. Yu, T. Zhu, T. Zhang, J. Cui, C. Zhou and X. Deng
"The effects of telocinobufagin isolated from Chan Su on the activation and cytokine secretion of immunocytes in vitro"
Fundamental and Clinical Pharmacology, **2009**, 23 (4), 457-464

91. D. M. Zhang, J. S. Liu, M. K. Tang, A. Yiu, H. H. Cao, L. Jiang, J. Y. Chan, H.

Y. Tian, K. P. Fung and W. C. Ye
"Bufotalin from Venenum Bufonis inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis."
European Journal of Phamacology, **2012**, 692 (1-3), 19-28

92. Y. Komiyama, H. X. Dong, N Nishimura, H. Masaki, M. Masuda and H. Takahashi
"A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure"
Clinical Biochemistry, **2005**, 38 (1), 36-45

93. N. A. Touza, S. E. Pôças, E. L. Quintas, G. Cunha-Filho, L. M. Santos and N. F. Noël
"Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on Na+/K+-ATPase activity in human kidney membrane preparation"
Life Sciences, **2011**, 88 (1-2), 39-44

94. D. Pavlovic
"The role of cardiotonic steroids in the pathogenesis of cardiomyopathy in chronic kidney disease."
Nephron Clinical Practice, **2014**, 128 (1-2), 11-21

95. S. C. Wu, B. D. Fu, H. Q. Shen, P. F. Yi, L. Y. Zhang, S. Lv, X. Guo, F. Xia, Y. L. Wu and X. B. Wei
"Telocinobufagin enhances the Th1 immune response and protects against Salmonella typhimurium infection."
International Immunopharmacology, **2015**, 25 (2), 353-362

96. B. Christensen and J. Nielsen
"Metabolic network analysis of Penicillium chrysogenum using ^{13}C-labeled glucose."
Biotechnology and Bioengineering, **2000**, 68 (6), 652–659

97. M. Dauner and U. Sauer
"GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing."

Biotechnolgy Progress, **2000**, 16 (4), 642–649

98. F. M. H. Jeffrey, J. S. Roach, C. J. Storey, A. D. Sherry and C. R. Malloy
"^{13}C isotopomer analysis of glutamate by tandem mass spectrometry."
Analytical Biochemistry, **2002**, 300 (2), 192–205

99. W. J. Lee, M. D. Kim, Y. W. Ryu, L. F. Bisson and J. H. Seo
"Kinetic studies on glucose and xylose transport in Saccharomyces cerevisiae."
Applied Microbiology and Biotechnology, **2002**, 60 (1-2), 186–191.

100. C. Birkemeyer, A. Luedemann, C. Wagner, A. Erban and J. Kopka
"Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling."
Trends in Biotechnology, **2005**, 23 (1), 28–33.

101. R. Breitling, A. R. Pitt and M. P. Barrett
"Precision mapping of the metabolome."
Trends in Biotechnology, **2006**, 24 (12), 543–548.

102. M. R. Antoniewicz, D. F. Kraynie, L. A. Laffend, J. Gonzalez-Lergier, J. K. Kelleher and G. Stephanopoulos
"Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol."
Metabolic Engineering, **2007**, 9 (3), 277–292

103. M. R. Antoniewicz, J. K. Kelleher and G. Stephanopoulos
"Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis."
Analytical Chemistry, **2007**, 79 (19), 7554–7559

104. K. Guo, C. Ji and L. Li
"Stable-isotope dimethylation labeling combined with LC-ESI MS for quantification of amine-containing metabolites in biological samples."
Analytical Chemistry, **2007**, 79 (22), 8631–8638.

105. P. Kiefer, C. Nicolas, F. Letisse and J-C. Portais

"Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry."
Analytical Biochemistry, **2007**, 360 (2), 182–188

106. J. Schaub, K. Mauch and M. Reuss
"Metabolic flux analysis in Escherichia coli by integrating isotopic dynamic and isotopic stationary ^{13}C labeling data."
Biotechnology and Bioengineering, **2008**, 99 (5), 1170–1185.

107. U. Hofmann, K. Maier, A. Nicbel, G. Vacun, M. Reuss and K. Mauch
"Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient C-13-labeling experiments: part I. Experimental observations."
Biotechnology and Bioengineering, **2008**, 100 (2), 344–354

108. T. W. M. Fan, A. N. Lane, R. M. Higashi, M. A. Farag, H. Gao, M. Bousamra and D. M. Miller
"Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by ^{13}C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM)."
Molecular Cancer, **2009**, 8 (41), 1-19.

109. T. Kind and O. Fiehn
"Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry."
Bioanalytical Reviews, **2010**, 2 (1-4), 23–60.

110. C. L. Winder, W. B. Dunn and R. Goodacre
"TARDIS-based microbial metabolomics: time and relative differences in systems."
Trends in Microbiology, **2011**, 19 (7), 315–322.

111. J. Castro-Perez, S. F. Previs, D. G. McLaren, V. Shah, K. Herath, G. Bhat, D. G. Johns, S-P Wang, L. Mitnaul, K. Jensen, R. Vreeken, T. Hankemeier, T. P. Roddy and B. K. Hubbard
"In vivo D_2O labeling to quantify static and dynamic changes in cholesterol and cholesterol esters by high resolution LC/MS."
Journal of Lipid Research, **2011**, 52 (1), 159–169.

112. W. B. Dunn, D Broadhurst, P. Begley, E. Zelena, S. Francis-McIntyre, N. Anderson, M. Brown, J. D. Knowles, A. Halsall, J. N. Haselden, A. W. Nicholls, I. D. Wilson, D. B. Kell, R. Goodacre and The Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium
"Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry."
Nature Protocols, **2011**, 6 (7), 387-426

113. M. R. Antoniewicz, J. K. Kelleher and G. Stephanopoulos
"Measuring deuterium enrichment of glucose hydrogen atoms by gas chromatography/mass spectrometry."
Analytical Chemistry, **2011**, 83 (8), 3211–3216

114. J. Choi and M. R. Antoniewicz
"Tandem mass spectrometry: a novel approach for metabolic flux analysis."
Metabolic Engineering, **2011**, 13 (2), 225–233

115. F. A. De Jong and C. Beecher
"Addressing the current bottlenecks of metabolomics: Isotopic Ratio Outlier AnalysisTM, an isotopic-labeling technique for accurate biochemical profiling."
Bioanalysis, **2012**, 4 (18), 2303–2314.

116. B. Kluger, C. Bueschl, M. Lemmens, F. Berthiller, G. Häubl, G. Jaunecker, G. Adam, R. Krska and R. Schuhmacher
"Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat."
Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2012**, 405 (15), 5031–5036.

117. T. W. M. Fan, P. K. Lorkiewicz, K. Sellers, H. N. B. Moseley, R. M. Higashi and A. N. Lane
"Stable isotoperesolved metabolomics and applications for drug development."
Pharmacology & Therapeutics, **2012**, 133 (3), 366–391

118. S. Crown, W. Ahn and M. Antoniewicz
"Rational design of ^{13}C-labeling experiments for metabolic flux analysis in

mammalian cells."
BMC Systems Biology, **2012**, 6 (1), 43.

119. S. Klein and E. Heinzle
"Isotope labeling experiments in metabolomics and fluxomics."
Wiley International Reviews: Systems Biology and Medicine, **2012**, 4 (3), 261–272.

120. G. A. Theodoridis, H. G. Gika, E. J. Want and I. D. Wilson
"Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review."
Analytical Chimica Acta, **2012**, 711, 7–16.

121. J. Choi, M. T. Grossbach and M. R. Antoniewicz
"Measuring complete isotopomer distribution of aspartate using gas chromatography/tandem mass spectrometry."
Analytical Chemistry, **2012**, 84 (10), 4628–4632

122. D. J. Creek, A. Chokkathukalam, A. Jankevics, K. E. V. Burgess, R. Breitling and M. P. Barrett
"Stable isotopeassisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation."
Analytical Chemistry, **2012**, 84 (20), 8442–8447

123. W. B. Dunn, A. Erban, R. J. M. Weber, D. J. Creek, M. Brown, R. Breitling, T. Hankemeier, R. Goodacre, S. Neumann, J. Kopka and M. R. Viant
"Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics."
Metabolomics, **2013**, 9 (1), 44–66.

124. M. L. Reaves, B. D. Young, A. M. Hosios, Y. F. Xu, J. D. Rabinowitz
"Pyrimidine homeostasis is accomplished by directed overflow metabolism."
Nature, **2013**, 500 (7461), 237–241.

125. M. R. Antoniewicz
"Tandem mass spectrometry for measuring stable-isotope labeling."

Current Opinion in Biotechnology, **2013**, 24 (1), 48–53

126. L. J. Jazmin and J. D. Young
"Isotopically nonstationary ^{13}C metabolic flux analysis."
Systems Metabolic Engineering: Methods and Protocols, **2013**, 985, p.367-390.

127. A. Chokkathukalam, D.-H. Kim, M. P. Barrett, R. Breitling and D. J. Creek
"Stable isotope- labeling studies in metabolomics: new insights into structure and dynamics of metabolic networks"
Bioanalysis, **2014**, 6 (4), 511-524

128. J. Zhang, W. S. Ahn, P. A. Gamerio, M. A. Keibler, Z. Zhang and G. Stehanopoulos
"^{13}C isotope-assisted methods for quantifying glutamine metabolism in cancer cells"
Methods in Enzymology, **2014**, 542, 369-389

129. M. R. Antoniewicz
"Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review"
Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, **2015**, 42, 317–325

130. V. Varma, L. G. Boros, G. T. Nolen, C.-W. Chang, M. Wabitsch, R. D. Beger and J. Kaput
"Metabolic fate of fructose in human adipocytes: a targeted C-13 tracer fate association study"
Metabolomics, **2015**, 11 (3), 529-544

131. A. C. Mosier, N. B. Justice, B. P. Bowen, R. Baran, B. C. Thomas, T. R. Northen and J. F. Banfield
"Metabolites Associated with Adaptation of Microorganisms to an Acidophilic, Metal-Rich Environment Identified by Stable-Isotope-Enabled Metabolomics"
mBio, **2013**, 4, 2

132. C. Birkemeyer, A. Luedemann, C. Wagner, A. Erban and J. Kopka
"Metabolome analysis: the potential of in vivo labeling with stable isotopes for metabolite profiling"

Trends in Biotechnology, **2005**, 23 (1), 28-33

133. P. Giavalisco, K. Koehl, J. Hummel, B. Seiwert and L. Willmitzer
"C-13 Isotope-Labeled Metabolomes Allowing for Improved Compound Annotation and Relative Quantification in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Metabolomic Research"
Analytical Chemistry, **2009**, 81 (15), 6546-6551

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻、理化学研究所　生命システム研究センター　一細胞質量分析研究チーム　升島努チームリーダーに心より感謝致します。

本論文作成にあたり、審査委員として多くのご助言をいただきました、柳田敏雄特任教授、高島成二教授、石島秋彦教授、岡本浩二准教授には深く感謝致します。

実験に際し、数々の御指導、御助言を賜りました理化学研究所　生命システム研究センター　スタッフに深く御礼申し上げます。

また、多くの時間を共にし、支えとなってくださった、本研究室に関わる全ての皆様に出会えたことを心より嬉しく思い、深く感謝いたします。

最後に、本大学院において 3 年半の長きにわたって勉学、研究の機会を与えてくれ、経済面、精神面と学生生活を支え、暖かく見守り続けてくれた家族に心から感謝致します。

2016 年　3 月　江崎　剛史

研究業績

原著論文

1. Tsuyoshi Esaki and Tsutomu Masujima
   "Fluorescence Probing Live Single-cell Mass Spectrometry for Direct Metabolism Analysis in organelle."
   Analytical Sciences, **2015**, 31 (12), 1211-1213

2. Takashi Fujii, Shuichi Matsuda, Mónica Lorenzo Tejedor, Tsuyoshi Esaki, Iwao Sakane, Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, and Tsutomu Masujima
   "Direct Metabolomics for Plant Cells by Live Single-Cell Mass Spectrometry."
   Nature Protocols, **2015**, 10 (9), 1445-1456

3. Takafumi Shimizu, Shinya Miyakawa, Tsuyoshi Esaki, Hajime Mizuno, Tsutomu Masujima, Tomokazu Koshiba and Mitsunori Seo
   "Live Single Cell Plant Hormone Analysis by Video-Mass Spectrometry."
   Plant and Cell Physiology, **2015**, 56 (7), 1287-1296

4. Hideaki Fujita, Tsuyoshi Esaki, Tsutomu Masujima, Akitsu Hotta, Soo Hyeon Kim, Hiroyuki Noji and Tomonobu M. Watanabe
   "Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry."
   RSC Advances, **2015**, 5, 16968-16971

総説

1. 藤田 愛, 江崎 剛史, 伊達 沙智子, 水野 初, 升島 努
   「１細胞レベルの網羅的分子解析 ― メタボロミクス」
   『生体の科学』, 2014, 65 巻 3 号 p271-277

2. 江崎 剛史, 升島 努
   「１細胞質量分析法による植物内のダイレクト分子探索」

『植物の生長調節 Regulation of Plant Growth & Development』, 2013, 48 巻 2 号　p158-162

受賞

1. Hot Article Award Analytical Sciences
   Tsuyoshi Esaki and Tsutomu Masujima
   "Fluorescence Probing Live Single-cell Mass Spectrometry for Direct Analysis of Organelle Metabolism.", 2015, December 10

学会発表

ポスター発表

1. 山本 知奏、塩谷 天、水野 初、江崎 剛史、伊賀 正年、片岡 宏誌、升島 努、丹羽 隆介
   「ショウジョウバエ幼虫発生におけるグルタチオンの役割」
   BMB2015　第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学学会大会　合同大会　2015 年 12 月

2. 田中 麻耶、木原 弘友、清山 結希、江崎 剛史、升島 努、兼目 裕充、浅川 義範、肥塚 崇男、松井 健二
   「ゼニゴケ油細胞はビスビベンジル類とセスキテルペン類を特異的に集積する」
   第 59 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会　2015 年 9 月

3. 清水 崇史, 宮川 慎也, 江崎 剛史, 水野 初, 升島 努, 小柴 共一, 瀬尾 光範
   「一細胞からのアブシシン酸, ジャスモノイルイソロイシンの定量分析」
   第 55 回日本植物生理学会年会　2015 年 3 月

4. Takafumi Shimizu, Shinya Miyakawa, Tsuyoshi Esaki, Hajime Mizuno, Tsutomu Masujima, Tomokazu Koshiba and Mitsunori Seo
   "Live single cell quantitative analysis of abscisic acid and jasmonoyl-isoleucine."
   The 2nd International Syposium on Plant Environmental Sensing　2015 年 3 月

5. 田中 麻耶、木原 弘友、江崎 剛史、升島 努、兼目 裕充、浅川 義範、肥塚 崇男、松井 健二
「ゼニゴケ油細胞はビスビベンジル類とセスキテルペン類を特異的に集積する」
日本農芸化学会中四国支部第 41 回講演会（例会） 2015 年 1 月

6. Maya Tanaka, Tsuyoshi Esaki, Tsutomu Masujima, Takao Koeduka and Kenji Matsui
"Analysis of contents in oil cells of Marchantia polymorpha."
Young Scientist Seminar in Yamaguchi 2014 年 11 月

7. 清水 崇史, 宮川 慎也, 江崎 剛史, 水野 初, 升島 努, 小柴 共一, 瀬尾 光範
「一細胞からの植物ホルモン定量分析法の開発」
植物化学調節学会第 49 回大会 2014 年 10 月

8. 宮川 慎也, 清水 崇史, 江崎 剛史, 水野 初, 升島 努, 小柴 共一, 瀬尾 光範
「ソラマメ葉におけるアブシシン酸の一細胞分析」
植物化学調節学会第 49 回大会 2014 年 10 月

9. 江崎 剛史, 升島 努
「1 細胞質量分析法による細胞内ミトコンドリアのダイレクトメタボロミクス」
日本分析化学会第 63 年会 2014 年 9 月

10. 水野 初, 江崎 剛史, 河合 洋輔, 升島 努
「1 細胞質量分析法によるダイレクトリピドミクス」
日本分析化学会第 63 年会 2014 年 9 月

11. Tsuyoshi Esaki, Sachiko Date, Hajime Mizuno, Ai Fujita, Tsutomu Masujima
"Direct Mitochondrial Metabolites Detection in a HepG2 Cell by Live Single-cell Mass Spectrometry."
62nd American Society for Mass Spectrometry Conference 2014 年 6 月

12. Takashi Fujii, Tsuyoshi Esaki, Sachiko Date, Hajime Mizuno, Tsutomu Masujima
"Spatial Analysis of Phototropic Metabolites in a Plant Cell by Live Single-cell Mass Spectrometry."

62nd American Society for Mass Spectrometry Conference　2014 年 6 月

13. Atsuko Takahashi, Hiromitsu Watanabe, Yuichiro Miyasaka, Tsuyoshi Esaki, Hajime Mizuno, Tsutomu Masujima
"Health Sustaining Components Analysis by LC-MS fermented "MISO"."
62nd American Society for Mass Spectrometry Conference　2014 年 6 月

14. 江崎 剛史, 水野 初, 藤田 愛, 伊達 沙智子, 升島 努
「Live Single-cell MS によるミトコンドリア内代謝物の探索」
第 62 回質量分析討論会　2014 年 5 月

15. 藤田 愛, 江崎 剛史, 水野 初, 升島 努
「Live Single-cell MS によるペプチドの質量分析法」
第 62 回質量分析討論会　2014 年 5 月

16. 人羅 久子, 江崎 剛史, 小川 輝, 水野 初, 高山 順, 升島 努, 大浪 修一
「１細胞質量分析による線虫の受精前後における細胞内メタボローム変化の解析」
第 36 回日本分子生物学会　2013 年 12 月

17. 小川 輝, 江崎 剛史, 人羅 久子, 水野 初, 升島 努, 大浪　修一
「線虫モデルを用いた加齢と長寿命化の高時空間分解能メタボローム解析」
第 36 回日本分子生物学会　2013 年 12 月

18. 江崎 剛史, 山本 祐樹, 水野 初, 伊達 沙智子, 津山 尚宏, 升島 努
「一細胞質量分析法による細胞内小器官の特異的分子の探索と多様性の追究」
第 61 回質量分析討論会　2013 年 9 月

19. Yuki Yamamoto, Tsuyoshi Esaki, Hajime Mizuno, Sachiko Date, Naohiro Tsuyama, Tsutomu Masujima
"Variety and Specificity of Granules in a Cell, Detected by Live Single-Cell Mass Spectrometry."
61st American Society for Mass Spectrometry Conference　2013 年 6 月

20. 山本 祐樹, 江崎 剛史, 水野 初, 伊達 沙智子, 津山 尚弘, 升島 努
「ビデオマススペクトロスコープによる一細胞内顆粒の特異性と多様性の検出
日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会　2013 年 5 月

口頭発表

1. Maya Tanaka, Hirotomo Kihara, Tsuyoshi Esaki, Tsutomu Masujima, Takao Koeduka and Kenji Matsui
   "How and where do thalli of Marchantia polymorpha form and accumulate secondary metabolites?"
   Marchantia Workshop 2014　2014 年 12 月

2. 江崎 剛史, 水野 初, 藤田 愛, 伊達 沙智子, 升島　努
   「Live Single-cell MS による 1 細胞内ミトコンドリアのダイレクト分子探索」
   第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム　2014 年 8 月

3. 水野 初, 江崎 剛史, 河合 洋輔, 升島 努
   「1 細胞質量分析法によるダイレクトリピドミクス」
   第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム　2014 年 8 月

4. Sachiko Date, Hajime Mizuno, Tsuyoshi Esaki, Ai Fujita, Tsutomu Masujima, Haruo Iwabuchi, Makoto Takei, Hideo Takakusa, Takashi Izumi, Setsuko Fujita, Shuichi Matsuda, Motohiko Morihara, Kiyoko Bando, Jiro Deguchi, Yasunori Fukuda and Naoki Tarui
   "Single Cell Drug Discovery."
   62nd American Society for Mass Spectrometry Conference　2014 年 6 月

5. 水野 初, 江崎 剛史, 河合 洋輔, 升島 努
   「Live Single-cell MS によるダイレクト脂質分析」
   第 62 回質量分析討論会　2014 年 5 月

6. 菅原 孝太郎, 渡辺 建宏, 江崎 剛史, 升島 努, 山垣 亮
   「一細胞 Orbitrap-MS 検出と MSn 解裂解析を駆使した植物液胞内二次代謝物の迅速同定法の開発」
   第 62 回質量分析討論会　2014 年 5 月

7. 小川 輝, 江崎 剛史, 人羅 久子, 水野 初, 升島 努, 大浪 修一
   「老化・長寿化の高時空間分解能メタボローム解析」

第 8 回メタボロームシンポジウム　2013 年 10 月

8. 江崎 剛史, 山本 祐樹, 水野 初, 伊達 沙智子, 津山 尚宏, 升島 努
「Live Single-cell MS による細胞内顆粒特異的分子の探索と顆粒の多様性」
第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム　2013 年 8 月