

学会賞受賞研究

細胞膨圧計測に伴うソフトイオン化細胞分子計測の開発

野並 浩*

Hiroshi NONAMI*

Cell Molecular Measurement Techniques by Soft Ionization Mass Spectrometry
together with *in situ* Cell Turgor Determination

Abstract

Prof. Dr. Hiroshi Nonami, professor at the Plant Biophysics/Biochemistry Research Laboratory, Department of Biomechanical Systems, Graduate School of Agriculture & the Division of Proteomics Research, Proteo-Science Center, Ehime University, Matsuyama, Japan, received the JAICABE Award 2018 from the Japan Association of International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering (JAICABE) and simultaneously, the Shin-Norin Co. Award from Mr. Yoshinori Kishida, CEO/President of Shin-Norin Co., Ltd. of Japan, publisher of Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America magazines and other publications, at Toichiro Nakashima Memorial Hall at the University of Tokyo on May 15, 2018.

JAICABE consists of 9 academic societies and the Association of Agricultural Electrification which is a consortium of 127 groups, companies and corporate entities. The total number of the membership of the JAICABE is 14,853 as of April, 2017. JAICABE works in the fields of agricultural engineering, mechanization and technology related programs in education, research, development, consultation and/or technology transfer that have resulted in improved food production, living conditions and/or education in different parts of the world.

The JAICABE Award recognizes Prof. Dr. Nonami's outstanding research contributions in "Cell Molecular Measurement Techniques by Soft Ionization Mass Spectrometry together with *in situ* Cell Turgor Determination." A cell pressure probe was used for turgor determination of an *in situ* individual plant cell, followed by measurements of cell osmotic pressure, water potential, cell volume, elastic modulus, hydraulic conductivity as physiological water status measurements. After checking physiological parameters of the individual cell, cell sap can be sampled with a capillary of the pressure probe from the same cell. Cell solution can be ionized either by the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) method or the electrospray ionization (ESI) method for mass spectrometric analysis, i.e., soft ionization mass spectrometry. Most significantly, this particular ESI technique is referred to as picoliter-pressure probe electrospray ionization mass spectrometry (picoPPESI-MS). By using picoPPESI-MS, *in situ* cell metabolomics analysis can be conducted continuously in real time without destruction of sample plants, and thus, real time cell molecular components can be analyzed qualitatively and quantitatively when plants are subjected to environmental stresses. PicoPPESI-MS has revolutionized single cell research in metabolomics and related physiological research in agricultural engineering, and perhaps beyond.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, picoliter pressure probe electrospray ionization mass spectrometry, plants, single cell, soft ionization, turgor

1. 「日本農業工学会賞 2018」「新農林社賞」受賞

2018年5月15日に東京大学中島董一郎記念ホール（東京大学弥生キャンパス）で開催された2018年度日本農業工学会において、愛媛大学大学院農学研究科植物工場システム学コース環境植物生理学研究室・愛媛大学プロテオサイエンスセンタープロテオミクス研究部門の野並浩教授が日本農業工学会賞及び新農林社賞を受賞した。

日本農業工学会は、農業工学関連10学協会（平成29年4月現在：9学会，1協会）、農業電化協会127団体、総会員数14,853名で構成されている。本会は、農業工学に関する会員相互の協力により、農業工学及びその技術の進歩発達に資することを目的として設立されている。

本会は、農業工学分野の学術や事業等に貢献した団体・個人を表彰することができ、特に優れた業績を上げた個人に日本農業工学会賞を授与することになっている。

野並教授の受賞業績は「細胞膨圧計測に伴うソフトイオン化細胞分子計測の開発」であり、セル・プレッシャープローブを用いることで、生きた植物における細胞膨圧を含む水分状態計測を実施した後、植物体をほとんど破壊することなく計測に使用した細胞から細胞溶液を直接採集し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化もしくはエレクトロスプレーイオン化法を用いることで細胞分子をソフトイオン化し、分子量関連イオンの定性・定量を行うことを可能にした計測法を開発した点が評価されたものがある。この質量分析のソフトイオン化法の中でも特に、picoliter-Pressure Probe Electrospray Ionization (picoPPESI) 質量分析 (MS) 法の開発により、植物細胞代謝物解析をリアルタイムで行うことができ、植物体本体を破壊することなく連続して細胞分子計測が可能となった。picoPPESI-MSの開発により、1細胞メタボロミクス計測における革新的な研究の進展につながり、農業工学分野のみでなく他の科学分野へも大きく貢献したことが評価された。

同時に、野並教授は農業工学分野において特に優れた研究業績をあげ、農業の発展に寄与したことが評価され、新農林社賞を受賞した。新農林社は、「農機新聞」や月刊「機械化農業」等を出版する会社で、農業生産、農家生活の維持に不可欠の農業機械と施設、農業工学分野全般の情報を社会に発信している会社である。

学会総会で開催された受賞式では、日本農業工学会長の大政謙次氏と株式会社新農林社代表取締役社長の岸田義典氏から賞状と盾、記念品が贈呈された。

2. 細胞計測における膨圧計測

2.1. プレッシャープローブ

プレッシャープローブは、細胞膨圧計測のために開発された計測器である（野並，2001；2019）。先端が尖ったキャピラリーに圧力センサーが付属していて、キャピラリー内にはシリコンオイルが充填されている。キャピラリー先端を細胞に突き刺すと、細胞内の細胞溶液は膨圧によって押し出され、キャピラリー内に入ってくるが、キャピラリー内にはシリコンオイルが充填されているため、キャピラリー内に細胞溶液とシリコンオイルの境界にメニスカスが生じる。このメニスカスを元の細胞膜表面に押し返すことによって、釣り合った圧力を細胞膨圧として計測する方法である（野並，2001；2019）。

プレッシャープローブの操作は、キャピラリー内に充填されているシリコンオイルの体積を調整することで行う。シリコンオイルは非圧縮性であり、プレッシャープローブ内は脱気していて、調節用のプランジャーの変位量がそのままシリコンオイルの体積の変化量に対応するように、キャピラリー内に採取する細胞溶液量を正確に調整できるように設計されている。愛媛大学のプレッシャープローブでの調整の精度はフェムトリットルレベルで可能である。

標的細胞への到達は、メニスカスの位置を調整しながら行う。表皮細胞から、プレッシャープローブ・キャピラリー先端がどれほど内部に入ったのかは、3次元電動マニピュレーターの移動距離を見ることで、検知する。標的細胞に入る直前の細胞溶液を利用してメニスカスを顕微鏡下で観察できるように操作し、標的細胞にプローブが入ると、メニスカスがキャピラリー内へ移動を始めるので、標的細胞に入る直前の位置までメニスカスを戻したときの釣り合った圧力が、標的細胞の膨圧になる。この操作を学習することで、プレッシャープローブの基本操作が可能となる。

2.2. 細胞壁・細胞浸透圧・細胞体積計測

細胞膨圧を計測した後、メニスカスをキャピラリー内で数ミクロン移動させ、直後に元の位置に瞬時に戻す操作をすると、チャートレコーダーでパルス状の圧力変化が記録される。この時のキャピラリー内の体積変化 (ΔV) は、細胞を一瞬押し広げて、元に戻す状況になるため、圧力変化 ($\Delta \Psi_p$) と体積変化の比が細胞弾性率に比例する。細胞弾性率 ϵ は、

$$\Delta\Psi_p = \varepsilon \frac{\Delta V}{V_0} \quad (1)$$

で求めることができる。V₀は、計測細胞の体積である(野並, 2001 ; 2019)。

プレッシャープローブのキャピラリー内のメニスカスの位置を動かし、一定の位置に保つように操作すると、細胞体積を一定に保ちながら、その細胞からの水の流出または流入が起こるときの水の透過率を計測することが可能となる。このとき、圧力変化に伴い細胞膜から一様に水が流れ出る、もしくは、流入すると仮定している。プレッシャープローブの圧力変化のハーフタイム (t_{1/2}) を計測することにより、細胞膜水透過率(L_p)が求まる。

$$L_p = (\ln 2 \times V) / (t_{1/2} \times A \times (\varepsilon + \pi)) \quad (2)$$

ただし、V は細胞体積、A は細胞表面積を表し、π は細胞の浸透圧を表す(野並 2001 ; 2019)。

この水透過率を計測する直前の膨圧 (P₀) と膨圧ステップ応答を与えて、細胞体積を維持し続けた後、最終的に到達する膨圧 (P_e) からプレッシャープローブが刺さっている標的細胞体積 (V) を計測することが可能である (野並, 2019)。

$$V = \pi v / (P_0 - P_e) \quad (3)$$

ただし、式3のvは、膨圧ステップ応答に対応したキャピラリー内での細胞溶液の変化体積を示す。式3を変形すると、

$$V/\pi = v/(P_0 - P_e) \quad (4)$$

となり、式4は、細胞体積と細胞の浸透圧の比は、キャピラリー内の体積変化とその時に変化した膨圧の変化の比と等しくなることを表している。例えば、膨圧ステップをキャピラリー内のメニスカスの位置をさらに内側に移動させて実施し、そのメニスカスの位置を維持して細胞体積を維持した場合を想定する。細胞内圧力は、急激に減少した後、徐々に圧力は上昇をはじめ、元の膨圧値の近傍に収束する。この時、細胞内へ水の流入が始まり、その結果として、キャピラリー内に導入された溶質と流入した水により、細胞溶液が少しだけ希釈された、と考える。その希釈による影響が圧力差の (P₀-P_e) に当たり、希釈に関わった水の流入体積がキャピラリー内の溶液操作量vに相当する、

と考えたとき、式4が成り立つ。

2.3. 植物細胞と組織における水分状態計測

細胞の浸透圧 π の計測はピコリッター・浸透圧計を用いて計測することができる。プレッシャープローブで採集した細胞溶液を銀製のサンプルホルダーの中の不揮発性シリコンオイルの真ん中へ浮遊させる。ホルダーをペルチェブロックでできた温度制御容器へ密着させ、ホルダー内の細胞溶液が顕微鏡下で観察できるようにセットする。ペルチェブロックを冷却することにより、細胞溶液を凍結させ、その後、徐々に温度を上げていき、細胞溶液の氷の消失する瞬間の温度を凝固点降下温度として決定する(野並, 2001 ; 2019)。細胞レベルの浸透圧計測とサイクロメーターを用いた浸透ポテンシャル計測を比較し、正確に細胞レベルで浸透圧が計測できることが確認されている(野並, 2001 ; 2019)。これらの計測原理と方法を組み合わせることにより、プレッシャープローブで細胞膨圧、浸透圧、水ポテンシャル、細胞体積、細胞壁弾性率、細胞膜の水透過率を計測できる(野並, 2001 ; 2019)。

Nonami and Boyer (1993) は、プレッシャープローブを使用して、成長しているダイズの茎における成長に伴った水ポテンシャル勾配を直接計測し、細胞拡大が起こっているときは、必ず導管から周りの細胞に水が供給されるための水ポテンシャル勾配が存在し、水ポテンシャル勾配の大きさが細胞伸長速度を制御していることを提唱している。このことを証明するために、Nonami et al. (1997) は、ダイズに水ストレスを与え、水ストレスによる成長阻害を誘導した。成長阻害が起こった直後から、導管近傍の細胞の膨圧が低下することをプレッシャープローブを用いることで検出している(野並, 2001 ; 2019)。このことは、水を供給するはずの導管の水ポテンシャル勾配が、導管の周りの細胞で逆転し、成長している導管の周りの細胞に水が供給されなくなっていることで、成長阻害が起こっていることを突き止めた(野並, 2001 ; 2019)。そこで、根圏部にプレッシャーチャンバーを用いることで、加圧し、導管内に水が流れるようにしたところ、成長の回復が見られた。回復が見られた状態で、プレッシャープローブで導管近傍の細胞の膨圧を計測したところ、膨圧の上昇がみられ、水ポテンシャル勾配が回復していることが確認できた(野並, 2001 ; 2019)。

上記の実験システムでは、プレッシャープローブを操作することにより、細胞レベルで植物体を完全に破壊することなく、ストレス負荷後、経時的变化を水分生理学的に追跡することが可能であることを示している(野並, 2001 ; 2019)。

3. ソフトイオン化

3.1. MALDI

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) は、2002 年の田中耕一氏によるノーベル化学賞の受賞で有名になった。生体高分子をフラグメント化することなくインタクトでイオン化し、質量分析ができるのでソフトイオン化と呼ばれている。MALDI のイオン化はプロトンを受け取るか、失うかによる 1 価のイオン化が起こることが多く、分子量をそのまま計測できるところが大きな特徴である。

一般研究 A (平成 5 年度～平成 6 年度, 研究課題名: 環境ストレスが作物の窒素代謝に及ぼす影響の非破壊・細胞計測による解明) で、窒素代謝物質の分析のために MALDI-TOF-MS (Kratos MALDI III) を導入した。国内における使用において最も早くから使用するようになったものの、その当時レーザーイオン化のマトリックス物質の研究が進んでおらず、未知の物質を同定するためのレーザー脱離イオン化とマトリックス物質の機能が理解されていなかった。そこで、新たにマトリックス物質の検索に取り組み、過去に使用されていない安息香酸関連物質、ピリドインドール類、ベンゾインドール類の 39 有機化合物においてタンパク質の質量範囲 1-70 kDa での 10 種類、スルホン化糖分子 4 種類についてポジティブ、ネガティブモード全てでイオン化に関して実験を行いベータ・カルボリン類がタンパク質および糖分子のレーザーイオン化に有効であることを世界で初めて明らかにした (Nonami et al., 1997; Nonami et al., 1998; Nonami et al., 2001; Tarzi et al., 2009)。植物組織の切片を用いての MALDI マトリックスとして、ナノ粒子を用いての新たな MALDI 法の提案を行った (Gholipour et al., 2010)。

3.2. プレッシャープローブ MALDI-MS

プレッシャープローブで採取した細胞溶液をキャピラリー内に入れた状態で、さらに細胞溶液とほぼ等量の水をキャピラリー内に吸い込み希釈したうえで、MALDI マトリックスを塗布した質量分析計のプローブの上に設置した。ほぼ乾いた状態になったとき、細胞溶液を設置したうえで、マイクロピペットに入れた MALDI マトリックス溶液を滴下して、サンプルを MALDI マトリックスでサンドイッチ状態にして乾燥させ、MALDI 質量分析計内でレーザー照射によりイオン化することで、質量分析を行った (Gholipour et al., 2008; Nonami et al., 2011; Erra-Balsells et al., 2012; Gholipour et al., 2012)。1 細胞から採取してのプレッシャープローブ MALDI-MS 結果は、採取した細胞部位が

含まれる植物組織を直接 MALDI 質量分析することで、同じ結果が得られることから、精度高くプレッシャープローブ MALDI-MS が実施できていることを証明した (Gholipour et al. 2008b)。

3.2. ESI

エレクトロスプレーイオン化 (ESI) は、2002 年にジョン・フェン教授が開発し、田中耕一氏と共にノーベル化学賞を受賞したことで知られている。高分子をフラグメント化することなくイオン化できるため、高分子をイオン化する際に特に有用であり、MALDI と違って多価イオンで検出される。

野並は、山梨大学の平岡賢三と探針エレクトロスプレーイオン化について共同研究を行ってきた (Chen et al., 2009)。平岡は探針エレクトロスプレーを開発し (第 55 回質量分析総合討論会, 2007, 3P-03-A03)、細胞等の生体組織を鋭いステンレス針で刺した後、針先端に付着した分子をイオン化する方法で、ESI を探針を使って特殊化して進化させたものである (Chen et al., 2009)。探針エレクトロスプレーイオン化では、サンプルの前処理なしに直接計測できる特徴がある。例えば、探針エレクトロスプレーを用いれば、試料の調製なしで、バナナの解糖過程の経時変化、オレンジのプロファイルイメージング、マウスの脳や肝臓の直接測定、イクラ、ヒト尿、ヒトの血液など、実試料に対して強いイオンシグナルでマススペクトルが得られることを見出している (Chen et al., 2009)。この成果は、従来のキャピラリーを用いる際の目詰まりなどの問題がなく、また必要とされる試料採取量がナノエレクトロスプレーの報告値、数 10 ナノリットル (nL) の 10^3 分の 1 以下、即ち、ピコリットル (pL) 以下である点で画期的である (Chen et al., 2009)。しかも、一回の試料採取とそれに続くエレクトロスプレーで、数 10 アットモル (amol) 程度の試料が十分強いマススペクトルのシグナルを与えることが明らかとなっている (Chen et al., 2009)。

細胞溶液の直接エレクトロスプレーは、従来のエレクトロスプレー技術では不可能である。探針エレクトロスプレーでは、“探針先端への極薄膜試料採取”と“ 10^8 V/m という極限に近い電場印加”との組み合わせによって、ほとんどあらゆる生体試料を試料調製なしで直接エレクトロスプレーすることが可能となった (Chen et al., 2009; Yu et al., 2009; Yu et al., 2010; Mandal et al., 2011; Yu et al., 2012; Yu et al., 2014; Petroselli et al., 2015; Usmanov et al., 2018)。

細胞膨圧計測と探針エレクトロスプレーとを融合させれば、測定対象となる細胞とその集合体の生理情報

と分子情報の同時計測が実現することになる。

3.4. picoPPESI-MS

野並は、ピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化 (picoPPESI) 質量分析法を発明した (Gholipour et al., 2013; Nakashima et al., 2016)。プレッシャープローブに分子分析の機能を持たせるためには、プレッシャープローブをエレクトロスプレーイオン化質量分析に適したイオン化装置に改良する必要がある。細胞の容積は 10~200 pL が普通であり、大きい植物細胞でも 1000 pL を超えるものは少ない。そのため、質量分析を pL オーダーで実現する必要があり、イオン化効率を高めたうえで、高感度に検出する必要がある。そのために、検出器として Orbitrap-MS を使用し、精密質量を高感度で検出できるシステムを開発した。通常の質量分析計は、純粋物質の分析に使われるため、高感度の精密質量を分析するための質量分析計を使う必要はない。サンプル容量が pL レベルであると、前処理のために分子を精製分離するための装置を付属させることは困難であるため、複数の混合物質を分析するために、高価な精密質量分析計を使用している。

プレッシャープローブのキャピラリー内にチタン線を導入し、キャピラリー内のシリコンオイルのみにイオン液体を混合し、プレッシャープローブ内に採取した細胞溶液に高電圧を印加できるように加工した計測器を用いることで、細胞溶液に含まれる代謝物質を質量分析できるようにしたものが、ピコリッター・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析 (picoPPESI-MS) である (Nakashima et al., 2016)。

この picoPPESI-MS は、質量分析の中でイオン化効率がとても高く、フェムトリットルオーダーのサンプルでもイオン化できる特徴がある (Gholipour et al., 2013)。また、プレッシャープローブの機能をそのまま使用できるため、水分状態計測による水ストレス評価を行うことができる上に、細胞溶液に含まれる代謝分子を定性・定量を行うことが可能である (Gholipour et al., 2013; Nakashima et al., 2016)。

トマトの果実に見えるトライコーム腺細胞を分析することが可能であり、その隣につながっている柄細胞を続けて計測することが可能である (Nakashima et al., 2016)。また、トマト果実の隣り合った細胞であっても、トマト尻腐れ細胞代謝物質の種類と量が異なっていることが示されている (Nakashima et al., 2016; Gholipour et al., 2017)。

4. 高温ストレスに伴う細胞計測と代謝物計測

高温ストレスと水ストレスは、切り離して研究することは現実的ではない。高温になると、空気は乾燥しやすく、急激な蒸散が起こるため、高温ストレスと水ストレスが同時に起こることが作物栽培で起こるのが一般的である。2007年7月14日~15日に台風が九州を24時間以内に通り過ぎたことがあり、フェーン現象が起こった (Wada et al., 2011)。強風による被害もなく、一見すると、被害は起こったように見えず、イネの成長は順調に起こっていた。収穫したときに、玄米にリング状に乳白が入っており、商品価値の低下で、農家は経済的な打撃を受けた (Wada et al., 2011)。農家も農業指導員も被害が出ていることに気づかず、保険申請をしていなかったため、経済的被害が増大した背景がある。この原因を解明するため、次の年の同じ時期に水田の上にビニール温室を設置し、24時間だけ高温が当たるように扇風機と暖房器具を設置した実験区を設けた。2007年の台風時と同じように、高温処理区では生育には障害は出ず、収量はコントロール区の正常米区と同じであったが、乳白米が発生し、2007年と同様の現象を再現できた (Wada et al., 2011)。玄米、植物体の水分状態を計測した結果、玄米細胞で浸透圧調節機能が働き、液胞の発達がみられ、アミロプラストにデンプン粒の蓄積が不均一に起こることが乳白の原因であることが解明された (Wada et al., 2011)。

この高温で誘導される乳白米の生理機構およびイネの多収性について、安定同位体ラベリング、遺伝子発現の機構を含めて、picoPPESI-MS を用いることで明らかにしてきた (Wada et al., 2014; Wada et al., 2017; Hatakeyama et al., 2018; Wada et al., 2019)。プレッシャープローブと電子顕微鏡での組織学的研究を含めての研究では、高温ストレスと水分状態計測を組み合わせることで、いかに浸透圧調節機能がプロテインボディの代謝制御とかが関わっているのか、明確になってきている (Hatakeyama et al., 2018; Wada et al., 2019)。一部が乳白化した部位にある細胞と、透明な正常細胞を一粒の玄米内での複数サンプルで分析できるように picoPPESI-MS が使われるようになり、水ストレスの精度高い解析が可能となった。

5. おわりに

野並は、30年以上もプレッシャープローブを自作し続けてきた。博士学生時代に、プレッシャープローブの発明者の Prof. E. Steudle との研究がスタートである (Nonami et al., 1987)。このプレッシャープローブを用いて、細胞から細胞溶液を採取し、銀製サンプルホルダー中に充填した不揮発性のシリコンオイル中に細胞

溶液を浮遊させ、凝固点降下法を用いて 1 細胞の浸透圧を計測する手法を開発した (Nonami and Schulze, 1989). プレッシャープローブを用いると、植物体を破壊することなく、細胞膨圧の分布、細胞浸透圧の分布、細胞水ポテンシャルの分布が計測できる。さらに、式 1, 2, 3 で示しているように細胞壁弾性率、細胞膜水透過率、計測している標的細胞体積の計測が可能である (野並, 2001 ; 2019)。

本業績は、細胞水分生理学の中心的な計測機器としてのプレッシャープローブと精密質量を計測できる最先端機器の質量分析計が融合した結果として生まれた。植物体をほとんど破壊することなく、水分生理状態を計測しながら、リアルタイムで細胞代謝物計測を行えることが画期的であった。また、picoPPESI で非常に高いイオン化効率を達成し、超微量サンプルでもイオン化して質量分析できるようになった。精密質量を分析できるため、サンプルの前処理が必要なく、多種の分子が異なる濃度で混合している細胞溶液を直接質量分析しても、質量分析結果を細胞溶液内に含まれる分子として一度に同定し、定量できるまで質量分析計が進化した結果といえる。

本業績は、日本学術振興会科学研究費助成事業の基盤研究 S (平成 20 年度～平成 23 年度, 課題名: 細胞膨圧計測—探針エレクトロスプレーによる細胞分子情報計測, 野並浩 (研究代表者)・平岡賢三 (研究分担者)), 基盤研究 S (平成 24 年度～平成 28 年度, 課題名: オンサイト・リアルタイム細胞分子計測によるスピーキング・セル・アプローチ, 野並浩 (研究代表者)・平岡賢三 (研究分担者)) の研究成果によるところが大きく、日本学術振興会からの支援に心から感謝する。

引用文献

Chen, L.C., Yu, Z., Nonami, H., Hashimoto, Y., Hiraoka, K. (2009) Application of probe electrospray ionization for biological sample measurements. *Environmental Control in Biology* 47: 73-86.

Erra-Balsells, R., Gholipour, Y., Nonami, H. (2012) In situ pressure probe sampling of single cell solution from living plants for metabolite analyses with UV-MALDI MS. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science* 2197: 572-577.

Gholipour, Y., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Nonami, H. (2013) Living cell manipulation, manageable sampling, and shotgun picoliter electrospray mass spectrometry for profiling metabolites. *Analytical Biochemistry* 433: 70-78.

Gholipour, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R. (2008a) Application of Pressure Probe and UV-MALDI-TOF MS for Direct Analysis of Plant

Underivatized Carbohydrates in Subpicoliter Single-Cell Cytoplasm Extract. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19: 1841-1848.

Gholipour, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R. (2008b) In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix. *Analytical Biochemistry* 383: 159-167.

Gholipour, Y., Erra-Balsells, R., Nonami, H. (2012) Integrative analysis of physiological phenotype of plant cells by turgor measurement and metabolomics. *Engineering Letters*, 20: 294-230.

Gholipour, Y., Erra-Balsells, R., Nonami, H. (2017) Blossom end rot tomato fruit diagnosis for in situ cell analyses with real time pico-pressure probe ionization mass spectrometry. *Environmental Control in Biology* 55: 41-51.

Gholipour, Y., Giudicessi, S.L., Nonami, H., Erra-Balsells, R. (2010) Diamond, titanium dioxide, titanium silicon oxide, and barium strontium titanium oxide nanoparticles as matrixes for direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of carbohydrates in plant tissues. *Analytical Chemistry* 82: 5518-5526.

Hatakeyama, Y., Masumoto-Kubo, C., Nonami, H., Morita, S., Hiraoka, K., Onda, Y., Nakashima, T., Nakano, H., Wada, H. (2018) Evidence for preservation of vacuolar compartments during foehn-induced chalky ring formation of *Oryza sativa* L. *Planta* 248: 1263-1275.

Mandal, M.K., Chen, L.C., Yu, Z., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K. (2011) Detection of protein from detergent solutions by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry* 46: 967-975.

Nakashima, T., Wada, H., Morita, S., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Nonami, H. (2016) Single-Cell Metabolite Profiling of Stalk and Glandular Cells of Intact Trichomes with Internal Electrode Capillary Pressure Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 88: 3049-3057.

野並浩 (2001) : 植物水分生理学. 養賢堂, 東京, 1-263.

野並浩 (2019) : 植物環境工学の研究展望 (第五回) 水ストレスの計測技術. *植物環境工学* 31 : 73-78

Nonami, H., Boyer, J.S. (1993) Direct demonstration of a growth-induced water potential gradient. *Plant Physiology* 102: 13-19.

Nonami, H., Boyer, J.S., Steudle, E. (1987) Pressure probe and isopiestic psychrometer measure similar turgor. *Plant Physiology* 83: 592-595.

Nonami, H., Fukui, S., Erra-Balsells, R. (1997) β -Carboline alkaloids as matrixes for matrix-assisted ultraviolet laser desorption

- time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: A comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 287-296.
- Nonami, H., Gholipour, Y., Erra-Balsells R. (2011) Direct tissue and cell analysis of tulip bulbs by combining pressure probe and UV-MALDI-MS. *Acta Horticulturae* 923: 53-58.
- Nonami, H., Schulze, E.-D. (1989) Cell water potential, osmotic potential, and turgor in the epidermis and mesophyll of transpiring leaves - Combined measurements with the cell pressure probe and nanoliter osmometer. *Planta* 177: 35-46.
- Nonami, H., Tanaka, K., Fukuyama, Y., Erra-Balsells, R. (1998) β -carboline alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in positive and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12: 285-296.
- Nonami, H., Wu, F., Thummel, R.P., Fukuyama, Y., Yamaoka, H., Erra-Balsells, R. (2001) Evaluation of pyridoindoles, pyridylindoles and pyridylpyridoindoles as matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15: 2354-2373.
- Nonami, H., Wu, Y., Boyer, J.S. (1997) Decreased growth-induced water potential. A primary cause of growth inhibition at low water potentials. *Plant Physiology* 114: 501-509.
- Petroselli, G., Mandal, M.K., Chen, L.C., Hiraoka, K., Nonami, H., Erra-Balsells, R. (2015) In situ analysis of soybeans and nuts by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 50: 676-682.
- Tarzi, O.I., Nonami, H., Erra-Balsells, R. (2009) The effect of temperature on the stability of compounds used as UV-MALDI-MS matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2,4,6-trihydroxyacetophenone, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, nor-harmane and harmane. *Journal of Mass Spectrometry* 44: 260-277.
- Usmanov, D.T., Ashurov, K.B., Ninomiya, S., Hiraoka, K., Wada, H., Nakano, H., Matsumura, M., Sanada-Morimura, S., Nonami, H. (2018) Remote sampling mass spectrometry for dry samples: Sheath-flow probe electrospray ionization (PESI) using a gel-loading tip inserted with an acupuncture needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32: 407-413.
- Wada, H., Hatakeyama, Y., Onda, Y., Nonami, H., Nakashima, T., Erra-Balsells, R., Morita, S., Hiraoka, K., Tanaka, F., Nakano, H. (2019) Multiple strategies for heat adaptation to prevent chalkiness in the rice endosperm. *Journal of Experimental Botany* 70: 1299-1311.
- Wada, H., Masumoto-Kubo, C., Gholipour, Y., Nonami, H., Tanaka, F., Erra-Balsells, R., Tsutsumi, K., Hiraoka, K., Morita, S. (2014) Rice chalky ring formation caused by temporal reduction in starch biosynthesis during osmotic adjustment under Foehn-induced dry wind. *PLoS ONE* 9: no. e110374.
- Wada, H., Masumoto-Kubo, C., Tsutsumi, K., Nonami, H., Tanaka, F., Okada, H., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., Nakashima, T., Hakata, M., Morita, S. (2017) Turgor-responsive starch phosphorylation in *Oryza sativa* stems: A primary event of starch degradation associated with grain-filling ability. *PLoS ONE* 12: no. e0181272.
- Wada, H., Nonami, H., Yabuoshi, Y., Maruyama, A., Tanaka, A., Wakamatsu, K., Sumi, T., Wakiyama, Y., Ohuchida, M., Morita, S. (2011) Increased ring-shaped chalkiness and osmotic adjustment when growing rice grains under foehn-induced dry wind condition. *Crop Science* 51: 1703-1715.
- Yu, Z., Chen, L.C., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2010) Real-time reaction monitoring by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24: 1507-1513.
- Yu, Z., Chen, L.C., Mandal, M.K., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K. (2012) Online electrospray ionization mass spectrometric monitoring of protease-catalyzed reactions in real time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23: 728-735.
- Yu, Z., Chen, L.C., Ninomiya, S., Mandal, M.K., Hiraoka, K., Nonami, H. (2014) Piezoelectric inkjet assisted rapid electrospray ionization mass spectrometric analysis of metabolites in plant single cells via a direct sampling probe. *Analyst* 139: 5734-5739.
- Yu, Z., Chen, L.C., Suzuki, H., Ariyada, O., Erra-Balsells, R., Nonami, H., Hiraoka, K. (2009) Direct Profiling of Phytochemicals in Tulip Tissues and In Vivo Monitoring of the Change of Carbohydrate Content in Tulip Bulbs by Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20: 2304-2311.