

# 研究報告書

## 「超高感度 CE-MS 分析システムによる極微量プロテオーム解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 川井 隆之

### 1. 研究のねらい

本研究の目的は、現在最も高感度なショットガンプロテオミクス分析を実現しているキャピラリー電気泳動 (CE)-質量分析 (MS) をさらに極限まで高感度化することで、一細胞に迫る極微量プロテオミクス解析を実現し、生命科学の発展に貢献することである。単なる高感度な一技術の開発ではなく、サンプリングや前処理を含めた分析プロトコル全体がフレキシブルかつ堅牢となるようデザインすることで、実用性が高く今後の普及が容易な「分析システム」として完成させ、その分析性能を評価することを本研究期間の目標として設定した。

本研究で開発する分析システムを構成する要素技術として、nanoCESI イオン化技術、ナノ還元濃縮技術、並列化技術の 3 つを着想した。まず現存する最高感度のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を超える新たなイオン化技術「nanoCESI」の開発を推進した。ESI ではプローブ先端に溶液および電圧を印加してイオン化を行うが、低流速かつ先端径が狭くスプレー電界が収束する程感度が向上する特性を持つ。従って、nanoCESI 技術では流速を最小化しつつ先端径を最小化することで、理論上最高感度のイオン化効率を得られるプローブデザインを行うこととした。続いて既存の前処理技術を利用できる汎用的な分析プロトコルとして、ナノ還元濃縮法を開発した。キャピラリー内部に試料を  $\mu\text{L}$  オーダーで大量に導入し、その後 nL オーダーまで 1000 倍以上濃縮・分離することで、マイクロピペットを利用したフレキシブルな前処理を維持しつつ、キャピラリーというマイクロ空間を利用した超高感度 CE-MS の分析性能を損なうことなく活用できるシステムを開発した。最後にこれらのプロトコルを並列化しマイクロ流体デバイス上に統合することで、プロテオーム解析システムの迅速化を検討した。

上記のプロテオーム分析システムとしての性能に加え、CE-MS が主に用いられているメタボローム解析などへの応用などについても検討することで、本研究課題で開発した分析システムの有用性を検証し、世界に普及していくことを最終目標として研究を推進した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

要素技術「nanoCESI イオン化技術」の開発においては、熔融石英キャピラリーを用いた nanoCESI エミッター加工法の確立、およびそれを用いた CE-MS 分析システムの構築を行った。内径・壁厚・先端径がそれぞれ  $50 \cdot 10 \cdot 5 \mu\text{m}$  程度のエミッターを用いたところ、従来のシーレス型エミッターより最大で 5 倍程度高い S/N シグナルを得ることに成功した。加工し

たエミッターは連続 200 回以上の測定にも耐え、再現性も時間相対標準偏差 (RSD) 1.3%、面積 RSD8.9% (n = 50) と従来法と比較して遜色ない性能であった。

続いて要素技術「ナノ還元濃縮法」の基盤技術として、汎用的オンライン試料濃縮法 large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS) 法を開発した。LDIS では最大 10 mM 食塩相当の塩を含む試料であっても、分離性能を損なうことなく最大で 2000 倍程度の濃縮が可能であり、前処理で取り除くことのできない数 mM 程度の塩が残っていてもそのまま濃縮が可能であった。本手法を用いることで、150 程度の HeLa 細胞からタンパク質糖鎖を遊離させ、蛍光誘導体化した後、CE で濃縮・サイズ分離して定量的にプロファイルすることに成功した。

最終的に上記の 2 技術を統合した LDIS-nanoCESI-MS 分析システムを開発した。LDIS との結合のためには濃縮中にアウトレット側のキャピラリー末端から泳動液を引き込む必要があったが、インレット側からの吸引圧力補助システムなどを実装してこれを実現した。HepG2 細胞をマイクロマニピュレーターでガラスニードル内部に吸引し、これをマイクロチューブ内で超音波破碎し、トリプシン消化し、その後キャピラリー内部に大量導入して LDIS-nanoCESI-MS 分析したところ、一細胞由来のタンパク質消化物が多数検出された。また同様にアセトニトリルを用いた代謝物抽出を行って分析したところ、全 20 種類のアミノ酸を含む多数の代謝物の検出にも成功した。以上のように、本手法によって 1 細胞プロテオーム・メタボローム解析のポテンシャルを実証することに成功した。さきがけ研究期間終了後も、検出できる試料範囲の拡大・定量性の向上・スループットの向上などを行い、本手法の生命科学分野への応用を推進していく予定である。

## (2) 詳細

### ・nanoCESI イオン化技術の開発

様々な内径・外径の溶融石英キャピラリーを用いて nanoCESI エミッター加工法の検討を行った。その結果、ほぼどのようなサイズのキャピラリーであっても壁厚・先端径を制御してエミッターを加工することができた。CE-MS 分析において将来的にナノ還元濃縮を適用することを考慮し、試料注入可能量と分離性能のバランスに優れた 50  $\mu\text{m}$  内径のキャピラリーを用い、壁厚・先端径がそれぞれ 10 $\cdot$ 5  $\mu\text{m}$  程度のエミッターを選択した

(図 1)。このエミッターを用いた新規イオン源構造を開発した (図 2)。この CE-MS 分析装置を用いて 20 種類の必須アミノおよびペプチドの分析を行ったところ、従来

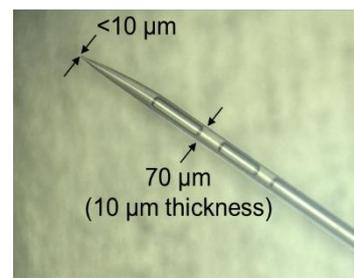


図 1. nanoCESI emitter.

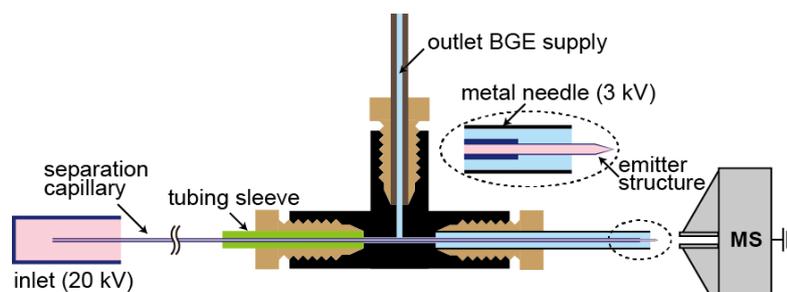


図 2. nanoCESI-MS におけるイオン源構造概略図.

のシーレス型エミッターより最大で 5 倍程度高い S/N シグナルを得ることに成功した。加工したエミッターは、開発当初、洗浄時などにキャピラリー先端部へ頻りにゴミが詰まり、10 回の連続測定にも耐えられないものであった。検討の結果、これらのゴミがインレットバイアルキャップから混入していることが判明したため、ゴミが吸着しにくくキャピラリーに接触しないキャップに交換したところ、連続 200 回以上の測定にも耐えられる程劇的に改善された。検出感度 (S/N = 3) はグルタミンにおいて 800 pM (8 amol), angiotensin II において 200 pM (2 amol) と極めて良好であり、再現性も時間相対標準偏差 (RSD) 1.3%, 面積 RSD 8.9% (n = 50) と従来法と比較しても良好な性能であった (図 3)。

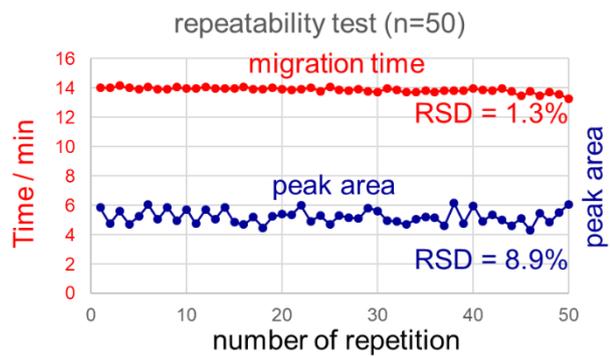


図 3. 連続 50 回測定での時間・面積の再現性.

#### ・ナノ還元濃縮法の開発

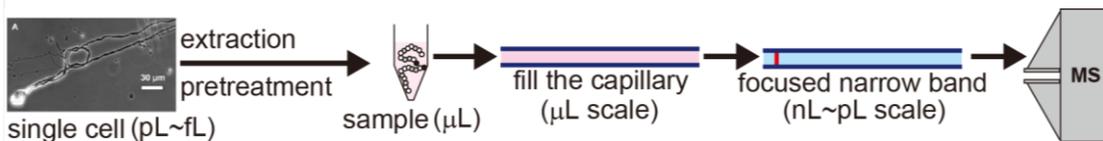


図 4. ナノ還元濃縮法における一般的な分析プロトコル.

ナノ還元濃縮法の一般的な分析プロトコルを図 4 に示す。マイクロマニピュレーターによって一細胞を採取した後、マイクロピペットを利用して細胞の溶解・内容物の抽出・酵素/化学処理・精製などの一般的な試料前処理を行う。得られた試料をキャピラリー内部に  $\mu\text{L}$  オーダーで大量に導入し (全量注入), その後オンライン試料濃縮法を用いてキャピラリー内部で試料を 1000 倍程度濃縮することで nL へダウンスケールする。濃縮された試料は電気泳動によって分離され, nanoCESI によってイオン化され, 最終的に MS で検出される。本手法はオンライン試料濃縮技術を高感度化のためではなく,  $\mu\text{L}$  スケールのフレキシブルな前処理と nL スケールの高分離能・高感度分析を両立するために用いた点で極めて新規な手法である。このナノ還元濃縮法を実現するための基盤技術として, 汎用的オンライン試料濃縮法 large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS) 法を開発した。LDIS は large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump (LVSEP) 法と過渡的等速電気泳動法 (tITP) 法を圧力補助による溶液コントロールにより組み合わせた新規手法であり, LVSEP の濃縮効率・分離性能および tITP の耐塩性能を両立する手法であ

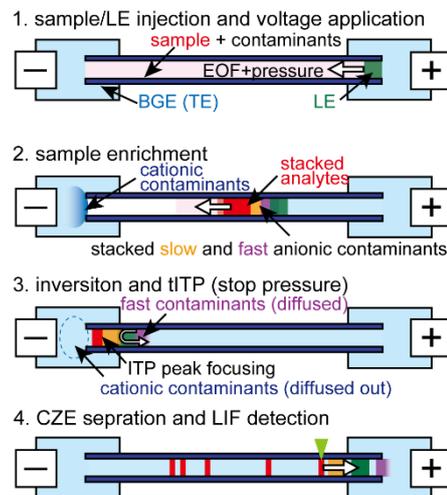


図 5. LDIS 濃縮法プロトコル.

る (図 5)。糖鎖を蛍光誘導体化して分析した例では、最大 10 mM 食塩相当の塩を含む試料であっても、分離性能を損なうことなく最大で 2000 倍程度の濃縮が可能であり、前処理で取り除くことのできない数 mM 程度の塩が残っていてもそのまま濃縮が可能であった。本手法を用いることで、150 程度の HeLa 細胞からタンパク質糖鎖を遊離させ、蛍光誘導体化した後、CE で濃縮・サイズ分離して定量的にプロファイルすることに成功した (図 6)。

・開発技術統合による微量生体試料分析への応用

LDIS および nanoCESI-MS の統合を行った。LDIS では濃縮中にアウトレット側のキャピラリー末端から泳動液を引き込む必要があるが、CE-MS 装置ではアウトレット側末端が開放系でなければ MS 検出が不可能であるため、アウトレット側末端をバイアルに浸漬し、そこへの圧力補助を制御する方式をそのまま適用することは困難であった。そこで圧力補助についてはインレット側に吸引圧力を印加し、アウトレット側末端からの試料導入については、濃縮中のみエミッター先端への電圧を切ってメタル管内部へ格納することで、それぞれ問題を解決した (図 7)。このシステムにおいて泳動液やリーディング液の最適化を行い、一細胞分析への応用を行った。HepG2 細胞をマイクロマニピュレーターでガラスニードル内部に吸引捕捉し、これをマイクロチューブ内で超音波破碎し、トリプシン消化し、その後キャピラリー内部に大量導入して LDIS-nanoCESI-MS 分析したところ、一細胞由来のタンパク質消化物が多数検出された (図 8)。また同様にアセトニトリルを用いた代謝物抽出を行って分析したところ、全 20 種類のアミノ酸を含む多数の代謝物の検出にも成功した (図 9)。以上のように、本手法によって 1 細胞プロテオーム・メタボローム解析のポテンシャルを実証することに成功した。

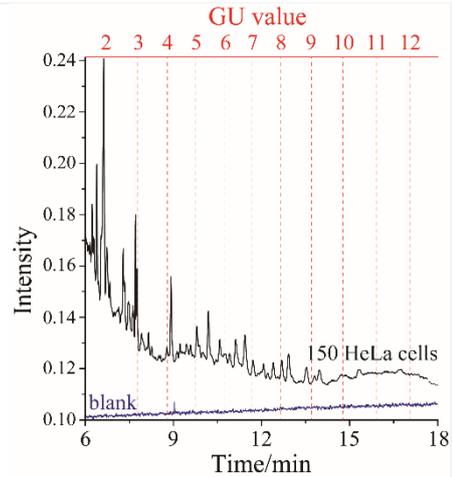


図 6. 150HeLa 細胞由来糖鎖の LDIS-CE 分析.

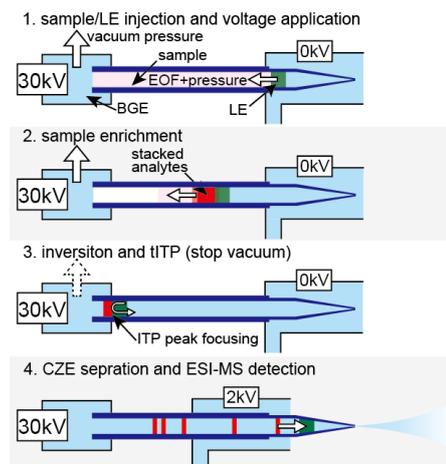


図 7. LDIS-nanoCESI-MS 分析プロトコル.

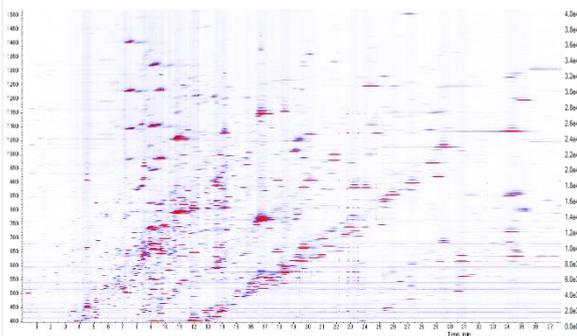


図 8. HepG2 一細胞プロテオーム解析.

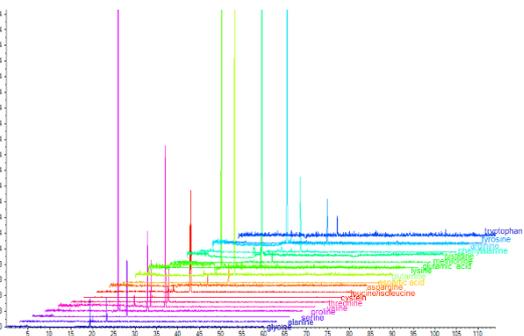


図 9. HepG2 一細胞メタボローム解析.

### 3. 今後の展開

研究目標である一細胞プロテオーム・メタボローム解析の基盤構築は完了したので、今後並列化およびマイクロチップへの統合を始めとした高速・自動分析への展開を進め、生命科学分野へ本格的に応用を進める予定である。特に分析システムの自動化・MSデータ解析の最適化・ハイインパクトなアプリケーションの選択などを進めたい。社会実装としては本分析システムを装置化し、最終的に市販できる体制に繋げたい。また生命科学分野への応用では、組織中のピンポイント領域でのリン酸化など翻訳後修飾の違いを定量化し、複雑な生命システムの解明に貢献したい。また既に実用化が進んでいる一細胞 DNA・RNA 分析システムと組み合わせることにより、最終的に一細胞マルチオミックス解析を基盤とした革新一細胞研究領域が形成され、学術的な貢献だけでなく、微量分析でしか解明できない生命現象を基にした診断・創薬などへの展開が期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

初めての大型資金で研究費の執行に不慣れであり、また研究室の移転などが重なったため、研究初期の推進効率は良いとは言えなかったが、3 年次以降研究体制も安定し、最終的に目標である一細胞プロテオーム・メタボローム解析の基盤構築を完了できたことは大きく評価できる。また開発した CE-MS システムは同一プラットフォームでプロテオーム・メタボロームの両方を解析可能であり、その優れた汎用性は今後の装置化・商品化において大きなアドバンテージになり得ると期待される。一方でこれらの研究成果の論文化・特許化などが遅れているため、今後の研究成果の応用のためにも早期の論文化・特許化が求められるが、並列化およびマイクロチップへの統合を始めとした高速・自動分析装置を実現できれば、日本主導で汎用的一細胞分析装置を世界的に販売することも十分可能だと思われる。また本技術の普及により、これまで見ることのできなかつた組織微小領域での複雑な生命現象が解明されるようになると期待される。これにより試料が限られる初期がんの治療・予防や、血中循環がん細胞を用いたがん診断などの応用が期待される。また既に実用化が進んでいる一細胞 DNA・RNA 分析システムと組み合わせることにより、最終的に一細胞マルチオミックス解析を基盤とした革新一細胞研究領域が形成され、学術的な貢献だけでなく、微量分析でしか解明できない生命現象を基にした診断・創薬などへの展開が期待される。また局所的なリン酸化・糖鎖状態の定量を通じた新規抗体医薬品の創出などの応用も期待される。上記のように、装置化および生命科学研究・医学応用の両面で研究開発を進めることで、極めてハイインパクトな社会実装が可能となると期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

キャピラリー電気泳動(CE)ー質量分析(MS)を nanoCESI イオン化技術とナノ還元濃縮を組み合わせ、極限まで高度化することで、1 細胞レベルのごく微量サンプルでプロテオーム

解析を実現するという難易度の高い先鋭的な課題に取り組みました。溶解石英キャピラリーによる nanoCESI エミッターを用いた「nanoCESI イオン化技術」と「Large-volume dual preconcentration by isotachopheresis and stacking (LDIS)技術」の開発、さらにはこれらの技術を統合して安定した解析できる LDIS-nanoCESI-MS 分析システムを構築し、当初の目標である1細胞由来のプロテオーム解析の基礎となる1細胞メタボローム解析を達成しました。

本手法は高いポテンシャルを有していることが示されましたので、たゆまず努力によって解析システムの完成度を高めてゆくと同時に、研究成果である極微量プロテオーム・メタボローム解析システムを重要な生物学的な課題解決に適用して、このテクノロジーの卓越性を周囲に認知させて下さい

平成 28 年度に「化学とマイクロ・ナノシステム学会 若手優秀賞」、「クロマトグラフィー科学会奨励賞」を、平成 29 年度に「日本分析化学会 奨励賞」を受賞しています。本課題において開発した技術を発展させ、微量解析分野をリードする若手研究者として更に地歩を固めてゆくことを大いに期待します。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. A.V. Patel, T. Kawai, L. Wang, S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler, “Chiral Measurement of Aspartate and Glutamate in Single Neurons by Large-Volume Sample Stacking Capillary Electrophoresis”, *Analytical Chemistry*, **2017**, *89*, 12375–12382.
2. F. Kitagawa, T. Ishiguro, M. Tateyama, I. Nukatsuka, K. Sueyoshi, T. Kawai, K. Otsuka “Combination of large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump with field-amplified sample injection on cross-channel chips”, *Electrophoresis*, **2017**, *38*, 2075–2080.
3. N. Ota, Y. Owa, T. Kawai, Y. Tanaka, “Micro/nanoparticle separation via curved nano-gap device with enhanced size resolution”, *Journal of Chromatography A*, **2016**, *1455*, 172-177.
4. F. Kitagawa, S. Kinami, Y. Takegawa, I. Nukatsuka, K. Sueyoshi, T. Kawai, K. Otsuka, “On-line coupling of sample preconcentration by LVSEP with gel electrophoretic separation on T-channel chips”, *Electrophoresis*, **2017**, *38*, 380–386.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要学会発表

1. 川井 隆之 オンライン試料濃縮法を利用した微量生体試料の CE 分析 第 66 回  
日本電気泳動学会総会 (東京工科大学 蒲田キャンパス, 東京都大田区)  
2015/9/5
2. Takayuki Kawai High performance CE-MS system for single cell analysis  
32nd International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis  
(MSB 2016) (Niagara-on-the-Lake, Canada) 2016/4/4
3. Takayuki Kawai Ultra-sensitive Capillary Electrophoresis for Single Cell Omics  
Research Pittcon 2017, Chicago, USA, 2017/3/8

#### 受賞

1. 化学とマイクロ・ナノシステム学会 若手優秀賞 (受賞タイトル: 簡便かつ高性能なマイクロスケール分析技術の創成)
2. クロマトグラフィー科学会奨励賞 (受賞タイトル: 簡便かつ高性能なマイクロスケール分析システムの開発)
3. 日本分析化学会 奨励賞 (受賞タイトル: オンライン試料濃縮法を駆使した簡便かつ高感度なマイクロスケール電気泳動システムの創出)

#### 著書物

A. V. Patel, T. Kawai, S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler, "Free d-Aspartate in Nonmammalian Animals: Detection, Localization, Metabolism, and Function". In: Yoshimura T., Nishikawa T., Homma H. (eds) D-Amino Acids. Springer (2016)

#### 総説

T. Kawai, "Recent Studies on Online Sample Preconcentration Methods in Capillary Electrophoresis Coupled with Mass Spectrometry" *Chromatography*, **2017**, 38, 1–8.