

研 究 報 告 書

「単一細胞プロテオミクスが拓く細胞証分析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～31 年 3 月

研 究 者: 若林 真樹

1. 研究のねらい

本研究は、試料ロスのない前処理法の開発と、超高感度かつ超高分離な液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)の開発を通じて単一細胞プロテオーム解析手法の確立を目指すものである。真に網羅的な単一細胞プロテオーム解析の実現をかわきりに、特定分子の精密解析手法と網羅的解析手法のリンクが現実のものとなる。つまり、細胞の状態や特性を顕著にあらわす分子によって選別した単一細胞を捕捉後、本手法によって網羅的に解析することで、その細胞の状態をタンパク質発現マップとして記録することができる。細胞の状態、特性、時空間的情報を付与したプロテオーム情報をデータベース化することで、細胞の個性やその変化、創発性を生み出す機序をタンパク質ネットワークの動態として理解可能となる。

以下に、単一細胞プロテオーム解析の実現に向けて必要不可欠な要素技術を記す。

A. LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラム(試料ロスの最小化)

B. 超高分離かつ超高感度な LC-MS システム(検出感度の大幅な向上)

本技術を確立することができれば、項目 A の前処理用キャピラリーカラム内への試料導入方法をアレンジすることで、顕微鏡下の細胞、組織内細胞、FACS により分取した細胞、極微量組織など、様々な試料、装置とリンクすることが可能な汎用的手法となる。蛍光顕微技術をはじめとする既存の超高感度解析手法とプロテオーム情報をリンクさせることで得られるタンパク質ネットワークの動態情報を詳細に理解することで、細胞の個性やその変化、創発性を生み出す機序の理解に大きく近づくことがねらいである。

2. 研究成果

(1)概要

単一細胞プロテオーム解析手法の開発に向けて、試料ロスのない前処理法の開発と、超高感度かつ超高分離な液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)システムの開発を行った。

まず、試料ロスを最小化するために、LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラムの開発を進めた。先端にフリットを形成させたガラスキャピラリーにタンパク質消化用のトリプシンを固定化したビーズと消化後のペプチドを回収するための C18 修飾ビーズを充填し、このキャピラリー内へタンパク質試料を直接導入することで、還元アルキル化や消化を含むすべての前処理を完了させる手法を確立した。本手法を用いて HeLa 細胞 500 個の分析を行ったところ、従来法でのタンパク質同定数 90 に対して 236 タンパク質が同定された。本手法は、抽出物や分泌タンパク質など、タンパク質懸濁液として調製可能な試料に対して極めて有効であるものの、細胞そのものを導入した際には一定の確率で詰まりを生じることがわかった。そこで、より空隙の大きいモノリス型キャピラリーカラムにトリプシン、C18 をそれぞれ修飾

し、同様の前処理を試みたところ、詰まりを概ね回避可能であった。このモノリス型前処理カラムを用いることで、HeLa 細胞 100 個を初期試料量として 383 タンパク質の同定に成功した。

次に、超高分離かつ超高感度な LC-MS システムの構築のため、小内径モノリス型カラムの作製を進めた。小内径カラムを用いて低流量化することによる検出感度向上と、メートル長モノリス型カラムを用いることによる超高分離の達成により、タンパク質同定数の大幅な向上が期待される。一般的なカラムの約 1/4 の内径となる 25・m のキャピラリーで安定して作製可能な手法を確立し、前述の前処理カラムと統合したシステムを用いて微量試料の分析を行ったところ、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片 (1mm 角 x 5・m 厚) 1/20 枚から 4000 以上のタンパク質が同定可能であり、従来法で同定された 700 タンパク質と比較して大幅に向上した。現在、本手法を用いて極微量臨床試料の大規模解析を進めている。

また、キャピラリーカラム内前処理手法をリン酸化ペプチド濃縮へと応用することで、1・g の細胞消化物から 1200 以上のリン酸化ペプチドを同定することに成功した (従来法では 88 ペプチド)。さらに、超高感度 LC-MS システムと組み合わせることで極微量試料の大規模翻訳後修飾解析へと展開する予定である。また、さらなる高感度化を進めることで 1 細胞解析への適用を推進する。

(2) 詳細

研究テーマ①「LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラムの開発」

まず、先端にフリットを形成させたガラスキャピラリーにタンパク質消化用のトリプシンを固定化したビーズと消化後のペプチドを回収するための C18 修飾ビーズを充填したカラムを作製した (図 1)。

このキャピラリー内へタンパク質試料を直接導入し、タンパク質抽出、還元アルキル化、消化を

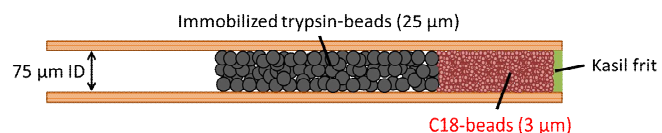


図 1. タンパク質前処理用カラム

含むすべての前処理を完了させる手法を確立した。本手法を適用して HeLa 細胞 500 個の分析を行ったところ、従来法でのタンパク質同定数 90 に対して 236 タンパク質が同定された。さらに、低流量化 (小内径化) した高感度 LC-MS システムと接続するために、粒子径 3・m のトリプシン固定化ビーズを合成し、内径 25・m のキャピラリーに充填することで同様の前処理カラムを作製した。しかしながら、粒子径 3・m のトリプシン固定化ビーズは粘度・背圧ともに非常に高く、細胞試料を導入した際に一定の確率でカラム詰まりを生じることが分かった。そこで、低流量化に向けて、より空隙が大きく背圧も低いモノリス型キャピラリーカラムを用いることとした。シリカモノリスに対してそれぞれトリプシン、C18 で修飾したカラムを直列に接続することで、同様の前処理カラムを構成可能であった (図 2)。



図 2. モノリス型前処理用カラム

このモノリス型前処理カラムを用いることで、詰まりは回避可能となった。さらに、低流量化した高感度 LC-MS システムと接続することで、HeLa 細胞 100 個の分析により 383 タンパク質が

同定可能であった。従来法での同定数は 45 タンパク質であったことから、分析システムとして 8 倍以上の高感度化を達成した。また、本手法の応用として、リン酸化ペプチド濃縮用の TiO_2 粒子を充填したカラムを作製し、キャピラリー内でリン酸化ペプチド濃縮を試み、分析を行ったところ、1・g の細胞消化物から 1200 以上のリン酸化ペプチドを同定可能であった（従来法では 88 ペプチド）。

研究テーマ②「超高分離かつ超高感度な LC-MS システムの開発」

超高分離かつ超高感度な LC-MS 測定系の構築のため、小内径モノリス型カラムの作製を進めた。小内径カラムを用いて低流量化することによる検出感度向上と、メートル長モノリス型カラムを用いることによる超高分離の達成により、タンパク質同定数の大幅な向上が見込まれる。内径 10, 15・ μm のキャピラリーではまれに壊れたモノリス構造や壁面からのはがれが観察されたため、作製プロトコルの改善が必要だが、内径 25・ μm のキャピラリーでは安定して作製可能な手法を確立した。

また、有機溶媒のポストカラムミキシングによるイオン化効率の改善・検出感度の向上を試みた。インフュージョン法により牛血清アルブミン消化物を分析した際には、アセトニトリル濃度を 5% から 40% へ変化させることで、MS での検出感度が 3~10 倍程度改善された。しかしながら、LC-MS システムの場合、ポストカラムでの分離の解消によるピーク幅の増大が見られるため、タンパク質同定数の向上にはつながらないことが明らかとなった。

テーマ①②を統合し、超高感度解析システムとして極微量試料の解析を試みた。最も大きい臨床試料アーカイブを形成しているホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織への適用を鑑み、マウス心・肝臓組織を用いて検討を進めたところ、1mm 角 x 5・ μm 厚の切片 1/20 量から 4000 以上のタンパク質を同定・定量可能であった。現在のところ、哺乳類細胞の 1 細胞プロテオーム解析が可能な分析感度を達成するには至っていないが、極微量試料の解析手法として世界最高レベルのシステムを構築した。本手法を用いて極微量臨床試料の解析、極微量分泌タンパク質の解析などを進めている。

3. 今後の展開

極微量試料の解析手法として大きく展開可能であると考え。その適用範囲は広く、例えば FFPE 薄切切片からマイクロダイセクションにより採取したごく少数の細胞、FACS や MACS によって分取した希少な細胞、分泌タンパク質などが挙げられる。少量であるが均一な試料のプロテオーム解析を進めることで、組織全体や混合試料の解析では埋もれていた新しい知見を導くことが可能となる。また、LC-MS システムの分離能、感度をさらに向上させることで、1 細胞解析へと発展させることが必要不可欠な課題である。

4. 評価

(1) 自己評価

研究の期間全体を通して、継続的に十分な実施体制を整えられなかったことが反省すべき

点である。異動による研究室立ち上げや、大阪北部地震による主要機器の破損、破棄などにうまく対応しきれなかったこともあり、研究費執行を一部予定通り進めることができなかった。

期間全体の研究成果としては、哺乳類細胞の1細胞プロテオーム解析が可能な分析感度を達成するには至らなかったが、極微量試料の解析手法として世界最高レベルのシステムを構築した。1細胞解析の実現に向けて引き続き高感度化を進めなければならないが、現在までに構築したシステムでも分析ニーズは非常に多く、現在進めているアプリケーションにも大きな価値を見出している。特に、これまでは手をつけられなかった稀少臨床試料のプロテオーム解析が実現可能となったことにより、多くの疾患に関して新規診断マーカーや創薬候補の探索に一石を投じることを可能とした。今後、本手法を活用することで、上述のような医療分野への還元を推進するとともに、基礎医学分野でも極微量分析システムとして様々なアプリケーションへと適用範囲を拡大したい。最終的に1細胞解析技術へと発展させるための土台は完成した。

(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)。

細胞1つから採取可能なタンパク質は極めて微量であるため、従来技術では1細胞プロテオームの網羅的解析は困難でした。本研究では、①細胞をキャピラリー内で分解することにより、細胞からタンパク質を効率よく回収する、②カラムを小型化し、回収タンパク質を分離過程で失うことなく測定機器に導入する、③測定機器での検出効率を向上する技術を開発し、従来法と比べて25倍以上の検出感度を達成し、100個程度の細胞を集めることで、十分な種類のタンパク質の同定・定量が可能としました。既に大型の細胞からは1細胞プロテオームを実現しています。近い将来、この技術のさらなる発展によって色々な種類の細胞において、1細胞レベルでのトランスクリプトームとプロテオームの対応づけができるようになり、また、1つ1つの細胞の営みや、個性を解き明かされてゆくことが期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugiyama N, Miyake S, Lin MH, Wakabayashi M, Marusawa H, Nishiumi S, Yoshida M, Ishihama Y. Comparative proteomics of *Helicobacter pylori* strains reveals geographical features rather than genomic variations. *Genes to Cells*. in press
2. Miki T, Awa M, Nishikawa Y, Kiyonaka S, Wakabayashi M, Ishihama Y, Hamachi I. A conditional proteomics approach to identify proteins involved in zinc homeostasis. *Nat Methods*. 2016, **13**, 931-937

(2) 特許出願

なし

(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)

1. 白井 学、錦織 充広、若林 真樹、高橋 篤、大谷 健太郎、土持 裕胤、瀧原 義宏、森崎 隆幸、南野 直人、加齢等のストレスに対する成熟心臓の恒常性維持機構におけるポリコーム遺伝子 Pcgf5 の機能解析、第 41 回分子生物学会年会 (2018)
2. 若林 真樹、微量試料のプロテオーム解析に資する分析手法の開発と応用、第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017)
3. 若林 真樹、極微量試料のプロテオーム解析手法の開発～1 細胞解析プラットフォームの構築を目指して～、日本プロテオーム学会 2016 年大会 (2016)
4. Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama. Single-cell proteome profiling: Innovations in sample preparation. 15th Human Proteome Organization World Congress (HUPO2016) (2016)
5. Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama. Single cell proteome profiling using highly sensitive LC-MS system and In-capillary sample preparation method. 8th Asia Oceania Human Proteome Organization Congress (2016)