

未来社会創造事業 探索加速型

「共通基盤」領域

終了報告書(探索研究期間)

令和2年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：和泉 自泰]

[九州大学 生体防御医学研究所・准教授]

[研究開発課題名：1 細胞定量分子フェノタイプ解析に向けた微量試料

自動前処理装置の開発]

実施期間：令和2年11月1日～令和5年3月31日

§ 1. 研究実施体制

①「和泉」グループ

・研究開発代表者:和泉 自泰 (九州大学 生体防御医学研究所、准教授)

・研究項目

①-1:細胞ピッキング装置を用いたナノウェルプレート内での微量試料調製法の開発

①-1:ナノウェルプレート的设计

①-2:微量試料自動前処理装置の開発

①-4:1 細胞定量メタボローム解析に向けた安定同位体カクテルの開発

①-5:ナノウェルプレート内でのプロテオミクスおよびメタボロミクスの前処理プロトコルの開発

②:Nano-LC/MS/MS システムへの微量試料自動全量導入法の開発

②-1:ナノウェルプレートを設置するためのサンプルトレイの改良

②-2:微量試料全量導入ニードルの開発

③:1 細胞定量分子フェノタイプ解析による細胞多様性評価

③-1:がん細胞の1細胞定量分子フェノタイプ解析

②「松本」グループ

・研究開発代表者:松本 雅記 (新潟大学 医歯学総合研究科・オミクス生物学分野、教授)

・研究項目

①-1:細胞ピッキング装置を用いたナノウェルプレート内での微量試料調製法の開発

①-3:1 細胞定量プロテオーム解析に向けた安定同位体カクテルの開発

①-5:ナノウェルプレート内でのプロテオミクスおよびメタボロミクスの前処理プロトコルの開発

③「平藤」グループ

・研究開発代表者:平藤 衛 (ヨダカ技研株式会社、代表取締役)

・研究項目

①-1:細胞ピッキング装置を用いたナノウェルプレート内での微量試料調製法の開発

①-1:ナノウェルプレート的设计

①-2:微量試料自動前処理装置の開発

②:Nano-LC/MS/MS システムへの微量試料自動全量導入法の開発

②-1:ナノウェルプレートを設置するためのサンプルトレイの改良

②-2:微量試料全量導入ニードルの開発

§ 2. 研究実施の概要

近年の様々な技術革新に伴い、1細胞レベルでの核酸情報の取得が可能となってきている。一方で、タンパク質や代謝物の1細胞解析は未だ発展途上の段階である。本研究では、これまで申請者らが開発してきた1細胞/微量組織試料のプロテオーム・メタボローム解析(分子フェノタイプ解析)システムの課題であった「定量性」および「スループット」を向上させるために、「① 1細胞ピッキング装置を用いたナノウェルプレート内での微量試料調製法の開発」および「② Nano-LC/MS/MS システムへの微量試料自動導入法の開発」を行い、「③ 1細胞定量分子フェノタイプ解析による細胞多様性評価」に取り組んだ。

探索研究期間では、1細胞/微量組織試料からの定量分子フェノタイプ解析を実現可能とするために、サンプル

ロス（タンパク質や代謝物の容器表面への非特異的吸着）を低減させたナノウェルを独自に設計するとともに、1 細胞単離・微量試料自動前処理装置プロトタイプ機の開発を行った。さらに、1 細胞/微量組織試料からのプロテオームおよびメタボローム前処理プロトコルを確立し、超高感度の Nano-LC/MS/MS システムの開発に成功した。また、開発した解析システムのスループットは、従来システムと比べて 4 倍向上し、20 分析/1 日を達成した。以上の結果から、1 細胞/微量組織試料からの高感度定量プロテオーム・メタボローム解析が実施可能な解析プラットフォームの構築に世界に先駆けて成功した。今後、国内の共同研究者らと 1 細胞あるいは微量組織試料を用いた定量分子フェノタイプ解析の応用研究を進めることで、当該システムの実用性を検証する。

【代表的な原著論文情報】

1. 次世代シリカモノリスカラムの開発と評価（研究論文 8）

概要:微量試料に含まれるタンパク質（ペプチド）や疎水性の代謝物の高感度分離分析には内径の狭いカラムを用いた nano-LC 技術が重要となる。本研究では、キャピラリー内でのモノリス型シリカ分離媒体の調製法を改良することで、保持係数を高めたポリオクタデシルメタクリレートモノリスカラム（ODM カラム）の開発に成功した。今後、当該カラムを用いた超微量 Nano-LC と MS の接続を最適化することで、世界最高感度でのメタボロームあるいはプロテオーム測定の実施が期待できる。

Hara T, Baron G V, Hata K, Izumi Y, Bamba T, Desmet G*. Performance of functionalized monolithic silica capillary columns with different mesopore sizes using radical polymerization of octadecyl methacrylate. *J. Chromatogr. A*, 1651, 462282 (2021).

2. メタボロミクスデータの施設間比較検証（研究論文 19）

概要:近年の人工知能技術の発展に伴い、ライフサイエンス分野においても各種オミクスの大規模データの活用が注目されている。しかし、メタボロームデータを用いて統合解析を実施するためには、異なる時期、異なる実験室、異なる分析法で取得したメタボロームデータの定量値を比較可能とする基盤技術の確立が必要となる。本研究では、血漿試料を用いて日本国内の 11 の研究機関でのメタボロミクスデータの統合がどの程度可能であるかを検証した。

Nishiumi S#*, Izumi Y#*, Hirayama A#*, Takahashi M, Nakao M, Hata K, Saigusa D, Hishinuma E, Matsukawa N, M Tokuoka S, Kita Y, Hamano F, Okahashi N, Ikeda K, Nakanishi H, Saito K, Yokota Hirai M, Yoshida M, Oda Y, Matsuda F, Bamba T. Comparative evaluation of plasma metabolomic data from multiple laboratories. *Metabolites*, 12(2), 135 (2022).

3. 超網羅的なメタボローム分析法の開発

概要:代謝物には、親水性から疎水性までの幅広い極性や様々な電荷特性を持つ分子が存在する。これら多様な分子の総体すなわちメタボロームを単一手法で網羅的に測定できることが当該分野の技術課題の一つである。本研究では、Unified-Hydrophilic-Interaction/ Anion-Exchange Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Unified-HILIC/AEX/MS) 法を開発して超網羅的なメタボローム分析法の開発に成功した。

Nakatani K, Izumi Y*, Takahashi M, Bamba T*. Unified-hydrophilic-interaction/anion-exchange liquid chromatography mass spectrometry (unified-HILIC/AEX/MS): A single-run method for comprehensive and simultaneous analysis of polar metabolome. *Anal. Chem.*, 94(48), 16877-16866 (2022).