

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15718

研究課題名（和文）単一分子蛍光ゲル電気泳動法による超高感度・網羅的なタンパク質分析

研究課題名（英文）Ultrasensitive and large-scale protein analysis using single molecule fluorescence gel electrophoresis

研究代表者

金 水縁（KIM, Sooyeon）

京都大学・高等研究院・客員研究員

研究者番号：50758886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1次元電気泳動により分離した様々な種類のタンパク質を、単一分子蛍光顕微鏡により1分子感度でそれぞれ計数化する「単一分子蛍光ゲル電気泳動法」を確立した。今までの性能評価により、従来の染色法より検出感度を3桁以上向上したことを確認している（サブフェムトグラム、アトモラーレベル）。また、本法に基づき、一細胞プロテオーム解析に向けた「一細胞蛍光電気泳動法」を開発した。その結果、泳動パターンのほとんどから少なくとも30個以上のタンパク質バンドを検出した。さらに、得られた泳動パターンを用いて次元削減解析を行い、異なる細胞株を区別することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した「単一分子蛍光ゲル電気泳動法」は、従来の染色法（CBB、銀染色など）では検出不可であったサブフェムトグラム程度の微量タンパク質を検出でき、現存するタンパク質分析法の中、最も高い感度を持っているといえる。また、「一細胞蛍光電気泳動法」は、一細胞プロテオームを調べる従来法である質量分析や抗体染色より安価かつ簡便であり、さらに、バイアスなく試料内の全タンパク質を調べられるといった利点を持っている。今後、質量分析の前段階や、臨床検査などで一細胞プロテオームを手軽に調べたいという場合に良い選択肢になる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established single-molecule fluorescence gel electrophoresis (single-molecule PAGE) that can count various types of proteins separated by 1D electrophoresis with single-molecule sensitivity using a home-built single-molecule fluorescence microscope. Through the performance evaluation so far, we have confirmed that the detection sensitivity is improved by more than 3 orders of magnitude compared to the conventional staining method (sub-femtogram, attomolar level). In addition, based on this method, we developed single-cell fluorescence gel electrophoresis (single-cell PAGE) for single-cell proteomics analysis. As a result, at least 30 or more protein bands were detected from most of the electropherograms. Furthermore, by using the obtained band patterns, we succeeded in distinguishing different cell lines through dimensionality reduction analysis.

研究分野：一分子化学、ケミカルバイオロジ

キーワード：タンパク質分析 電気泳動 単一分子蛍光顕微鏡 一分子計測 一細胞解析

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、体の構成成分から、遺伝物質を折り畳むヒストン、酵素、抗体まで、様々な生命現象に最も直接的に働く生体分子である。このようなタンパク質を組織や細胞から分離および精製し、その組成と活性を検討する分析技術は、生物・医学分野の歴史的発展に欠かせない役割を果たしてきた。特に、電気泳動法は、電荷性物質が外部電場により一定の電極に向けて動く現象を利用し、タンパク質を分子量又は等電点ごとに分離する最も一般的な分析法である。

電気泳動法で分離されたタンパク質を視覚化するためには、Coomassie 色素などによる染色が必要であり、その検出限界は一つのバンドあたり数  $10^{-10}$  グラム(数百ピコグラム)である。つまり、約 3 千種類までタンパク質を分離できる二次元電気泳動の場合、一度の実験に最低  $10^8$  個のヒト細胞(一細胞内のタンパク質の総重量：数  $10^{-15}$  グラム(数フェムトグラム))が必要であることを示唆する。また、発現量が小さいタンパク質はほとんど検出不可能である。

一方、2000 年代前後から急速に発展してきた単一分子蛍光顕微鏡法は、生きている細胞内で発現されたタンパク質の数を単一分子レベルで定量的に分析することを実現させた(Y. Taniguchi et al., *Science* (2010) **329**, 533.)。また、最先端オミックス解析法と免疫染色法を用いた一細胞レベルでのタンパク質プロファイル解析研究が米国と欧州を中心に活発に行われている(E. Lundberg et al., *Science* (2017) **356**, 820; L. Pelkmans et al., *Science* (2018) **361**, eaar7042.)。

これらの先行研究を踏まえ、私は単一分子蛍光計測が可能な単一分子蛍光顕微鏡法と電気泳動法を融合することによって、従来の検出限界および活用範囲を飛躍的に向上できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、超高感度・網羅的なタンパク質分析が実現可能な「単一分子蛍光電気泳動法(Single-molecule fluorescence gel electrophoresis, Single-molecule PAGE)」の完成を目的とする。本法を利用し、微量タンパク質の検出および一細胞内の全タンパク質(一細胞プロテオーム)の解析を試みる。

## 3. 研究の方法

本研究で開発する単一分子蛍光電気泳動法は、0.3 mm の厚みの試料まで観察できる自作光シート顕微鏡(以下、PISA 顕微鏡; 谷口、西村 特許 6086366 号)を用い、電気泳動により分離された蛍光標識タンパク質を単一分子レベルで蛍光検出・集計する(図 1)。単一分子蛍光顕微鏡法と電気泳動法は以下の二つの理由により最適な組み合わせといえる。電気泳動法で使用するポリアクリルアミドゲルやハイドロゲルバッファは、自家蛍光がほとんど発生せず、励起光や色素の蛍光と干渉しない完全透明な基質であるため、単一分子蛍光観察に最適である。本研究グループが独自に開発した光シート顕微鏡(以下、PISA 顕微鏡、図 1)は、シート状の励起光を試料の下面から照射し、ゲルやキャピラリー内部のような厚み( $< 0.3$  mm)のある試料も高速で断層的な観察ができる。つまり、ポリアクリルアミドゲルの中に捕捉されている全てのタンパク質を一つずつ数えることができ、分子感度の検出および絶対定量に近いほどの定量的な解析ができるようになると思った。

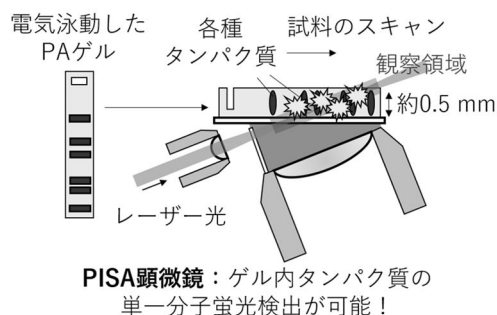


図 1. PISA 顕微鏡による単一分子蛍光電気泳動法の概念図。予め蛍光色素で標識したタンパク質混合物を電気泳動し、ゲル内に捕捉されたタンパク質を高速でスキャンする。

## 4. 研究成果

本研究では、電気泳動法に 3 次元単一分子蛍光イメージングを取り入れた単一分子蛍光電気泳動法を確立し、単一タンパク質ではサブアトモル濃度 ( $< 1$  aM  $\approx$  sub-fg/ml) まで検出することに成功した。さらに、単一分子蛍光電気泳動法に基づき、一細胞プロテオーム解析に利用でき

る「一細胞蛍光電気泳動法 (single-cell PAGE)」を開発した。その結果、得られた一細胞泳動パターンを用いて次元削減解析を行い、異なる細胞株を区別することに成功した。以下に詳細な研究成果を示す。

### (1) 一分子蛍光電気泳動法の確立

赤色蛍光色素(Cy5)を標識した BSA タンパク質を用いて、一分子蛍光電気泳動法の検出限界を調べた。様々な濃度の BSA 試料に対し、SDS-PAGE と一分子イメージングを行った結果、本手法は 100 ゼプトグラムから 100 フェムトグラム ( $10^{-19}$ ~ $10^{-13}$  グラム) の範囲のタンパク質を検出できることを確認した (cf. 100 ゼプトグラム = 1.5 ヨクトモル、つまり 10 分子/レーンに相当する)。このような分子レベル感度での検出は、ポリアクリルアミドゲルが透明であることと、電気泳動により未反応の Cy5 色素が有効に除去されたことで可能になったと考えられる。

続いて、Cy5 を標識した PC3、U2O2、HeLa 細胞(それぞれ前立腺がん細胞、ヒト骨肉腫細胞、子宮頸がん細胞)溶解物を 0.1 細胞レベルまで希釈し、本法を用いて各試料のタンパク質バンドパターンを得た。その結果、数千細胞から得られたゲルイメージと一分子イメージングから再構築された電気泳動パターンが一致することを確認した。0.1 細胞相当という極限に薄い試料にもかかわらず、全ての泳動パターンから数十個のタンパク質バンドを検出できた。したがって、得られたタンパク質バンドパターンは、全タンパク質発現量のプロファイル、つまりプロテオームのデータとして使用できることが示唆された (図 2)。

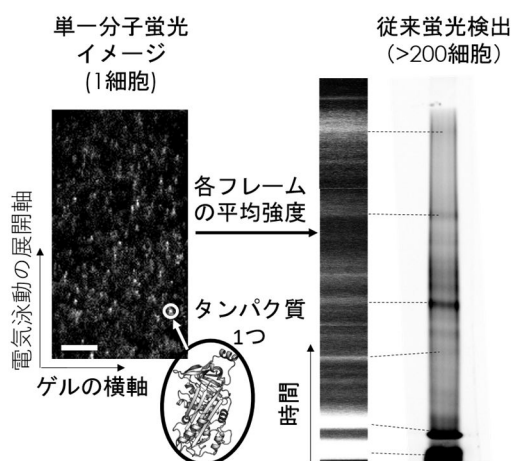


図 2. 一分子蛍光ゲル電気泳動法の原理検証実験の結果。(左)赤色色素(Cy5)で標識した一細胞溶解物を電気泳動し、PISA 顕微鏡による単一分子蛍光観察結果(scale bar: 5  $\mu$ m)。(右)1 細胞試料からの泳動パターンは、200 個以上の細胞溶解物の電気泳動結果とほぼ一致した。

### (2) 一細胞蛍光電気泳動法の開発

一細胞蛍光電気泳動法を実現するため、まず、一細胞の単離・色素修飾・SDS-PAGE が行える試料作製法を開発した。そのために、一細胞ハンドリング装置 (ヨダカ技研、ToPick) により 0.5  $\mu$ L バッファードロップレットごとに個々の細胞を導入し、そのまま細胞溶解と蛍光色素のラベリングを行った。その後、一分子蛍光電気泳動を行い、細胞個々のタンパク質バンドパターンを得ることに成功した (図 3)。本法を使用し、3 個の一細胞試料から得られた電気泳動プロファイルと比較した結果、37 kDa-75kDa の領域で約 25.2% の CV 値が算出された。この数値は同じサンプルで実験を行う際に得られる CV 値より大きく (14%)、細胞間のプロテオームのはらつきを反映していると考えられる。

最後に、本法を用いて得られた泳動パターンを用い、次元削減解析を実施した。その結果、異なる細胞種 (例: U2OS と PC3、心筋細胞への分化前と分化後の中胚葉など) を区別できることがわかった。

以上、本研究で開発した「一分子・一細胞蛍光電気泳動法」は、現存するタンパク質分析法の中、最も高い感度を持っており、一細胞プロテオームを調べる従来法である質量分析や抗体染色より安価かつ簡便で実施できる。さらに、バイアスなく試料内の全タンパク質を調べられるといった利点を持っている。今後、質量分析の前段階や、臨床検査などで一細胞プロテオームを手軽に調べたいという場合に良い選択肢として期待できる。

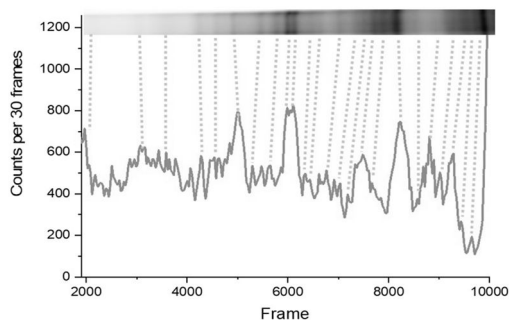


図 3. 1000 個の細胞のゲルイメージ(上)と、PISA によるシングル分子計測から再構築された一細胞の電気泳動パターン(下)。15~100 kDa の間、約 63 個のタンパク質バンドが検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yaqi Zhang, Sooyeon Kim, Yuichi Taniguchi
2. 発表標題 Structures of DNA origami studied with scattered light imaging
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金水縁、Kamarulzaman L., 谷口雄一
2. 発表標題 一分子蛍光電気泳動による一細胞解析
3. 学会等名 第43回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kim S., Kamarulzaman L., Taniguchi Y.
2. 発表標題 Ultrasensitive Protein Assays via Single-Molecule Imaging
3. 学会等名 Asian Photochemistry Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kim S., Kamarulzaman L., Taniguchi Y.
2. 発表標題 Ultrasensitive Proteome Analysis realized by 3D Single-Molecule Imaging
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金水縁、Kamarulzaman L., 谷口雄一
2. 発表標題 一分子蛍光電気泳動法の開発
3. 学会等名 第41回キャピラリー電気泳動シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金水縁、Kamarulzaman L., 谷口雄一
2. 発表標題 3D Single-Molecule Imaging-Based Bioanalyses towards Single-Cell Proteomics
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金水縁、谷口雄一
2. 発表標題 1分子イメージングによる超高感度タンパク質分析
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金水縁
2. 発表標題 一分子イメージングによるバイオ分析
3. 学会等名 第27回次世代医工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金水縁、谷口雄一、Latiefa Kamarulzaman
2. 発表標題 Ultrasensitive Protein Analysis via Single-Molecule Fluorescence Gel Electrophoresis
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会（千葉）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金水縁、谷口雄一
2. 発表標題 Single Molecule Fluorescence Gel Electrophoresis for Single Cell Proteome Analysis
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会（富山）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sooyeon Kim
2. 発表標題 Single Particle PL Microscopy Provides Valuable Insights of Photogenerated Charge Carriers
3. 学会等名 ICoPP 2019 (Incheon, Korea) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------