

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590041

研究課題名（和文）

アフィニティーナノスプレー針を用いた、分子群特異的一細胞質量分析法の開発

研究課題名（英文）

Development of Molecular Species-Specific Live-Single Cell MS  
with Affinity-modified Nanospray Tips.

研究代表者

津山 尚宏（TSUYAMA NAOHIRO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10335747

研究成果の概要（和文）：

ひとつの細胞に含まれている分子を金属コートしたガラス針で採取し、そのまま質量分析を行い含まれている分子を網羅的に解析する Live Single-cell Mass Spectrometry の選択性および感度を上げることを目的とした。ガラス針の内部を親水性・疎水性処理を行い、極性分子・脂溶性分子の標準液を用いて選択的に内面にトラップさせ、溶媒溶出により質量分析を行って分子の物性に特異的な検出に成功した。培養細胞を用い極性分子・脂溶性分子の検出にも成功した。この内面処理針により 1 細胞内特異的分子検出が可能になった。

研究成果の概要（英文）：

We established Live Single-cell Mass Spectrometry which enables to clarify exhaustive molecular content of single cell recovered by a metal-coated glass tip following direct mass spectrometric analysis. In this study, we aimed to increase sensitivity and kinds of molecules by modifying the inner surface of the glass tips. We made the tips with hydrophilic or hydrophobic treatment which allow selective trapping of polar compounds or lipophilic compounds respectively. We proved treated tips to trap standard compound as well as molecules contained in single cell. Thus, detection of molecules with specific physical property can be detected by Live Single-cell Mass Spectrometry using this tip.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織・細胞内で起こる現象の分子分析は多量の試料の総和として解析されてきた。短時間、限局的な現象の分子代謝の変化は、従来法では多様な細胞集団の中で希釈され変化の本体となる分子を捕らえることができない。我々は独自に開発した nanoESI ガラス針を用い、生細胞の狙った場所・瞬間の質量分析を行うことのできる Live Single-cell MS 法を開発した。先行技術である Single-cell MALDI 法は任意の細胞領域・時間を選べず、また前処理濃縮操作が不可能であるため、感度・網羅性の点で多種の分子を分離同定するには不十分である。我々の方法により、より多くの一細胞内の局所分子の質量スペクトル検出が可能になり、一つの培養皿の中にある細胞間の多様性や、局所での分子分布の相違、がわかった。しかし、細胞のエネルギー代謝など比較的少量に存在する分子の検出は容易であるが、調節に関与する微量分子の一部しか検出できておらず、前処理が不可欠であると考えられた

本研究でもちいているガラス針は、内面が未処理であるため、ガラス特有の陽イオンの付加やケイ酸などの陰イオンが直接むき出しになっている。微量で局所的に存在する分子を検出するため、極性基や疎水基など特定の物性によりアフィニティーをもつ分子を内面に修飾して、細胞内の脂質や極性代謝物を選択的に濃縮し、微量物質の高感度一細胞質量分析を行うことのできる系の開発を目指す。一細胞の分子を前処理濃縮し、質量分析を行うことのできるシステム構築は未だ報告がない。

## 2. 研究の目的

細胞内に含まれる多様な物性をもつ分子の中から特定の分子群を選択的に濃縮するため内面に親水性あるいは疎水性の修飾を行った nanoESI ガラス針を作成する。一細胞内の分子を物性や局在により分離濃縮し、分子の種類と量を制限した前処理濃縮系を検討し一分子種特異的な質量分析法を確立する。この針を用いて微量分子の選択的検出を行い、薬物や細胞分子の代謝を正確に解析できる系を作成する。

## 3. 研究の方法

### (1) 内面修飾 nanoESI ガラス針の開発

nanoESI 法による質量分析は液滴が小さく感度の高い検出が可能であるが、分子組成が複雑になるほど共存物質によるイオン化の抑制がおこり物質の網羅性が下がり分散も大きくなる。予め分子の物性や局在場所による濃縮を行うため、針の内面を ODS や極性基などで修飾する。

### (2) 修飾分子調節による分子選択性の制御

内面修飾分子層の状態を、溶媒の最適化や共存分子の添加により調節した後、細胞内物質を単離・濃縮し質量分析を行う。得られた質量スペクトルから選択的分子検出ができていないか、MS/MS による分子同定・ピーク追跡を行いながら条件の最適化を行う。

### (3) 窒素充填チャンバーによる環境由来イオンピークの抑制

質量スペクトルには分析室内の空気に含まれる環境由来ピークが認められる。環境由来ピークによる微量分子ピークの抑制を防ぎ、イオンの総量が決まっているイオントラップ型質量分析計の感度向上に重要である。ナノスプレーイオン源を設置する窒素充填チャンバーを開発する。

### (4) 微量調節物質の検出・同定・分子追跡

細胞に薬物刺激を与え、分子選択ガラス針を用いて、一細胞質量分析を行う。刺激による調節分子の量的質的変動の検出を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 内面修飾 nanoESI ガラス針の開発 ガラス針の作成条件検討

ガラス針の内面を、0.1M 水酸化ナトリウムで処理し腐食させた後、0.1M 塩酸で中和、純水で洗浄を5回繰り返し乾燥した。内面処理のため、酸性下あるいは塩基性下で、 $C_{18}$  を付加するオクタデシルトリメトキシシラン溶液、 $-SO_3H$  を付加するスルフォニルトリメトキシシラン溶液、あるいは $-N^+(CH_3)_3$  を付加するトリメトキシシリルトリメチルアンモニウム溶液を内部に充填し、高温処理を行った後に、メタノール洗浄・乾燥した。脂肪酸やアミノ酸をガラス針内部に加えて吸着させたのち、中性溶媒で洗浄しさらにイオン化溶媒を加えて質量分析を行い内面処理ガラス針に保持されていることを確認した。官能基付加していない針についても、シラノールによる吸着が確認された。処理条件の最適化は、ピーク強度評価により行い、内面修飾条件を決定した。

### (2) 修飾分子調節による分子選択性の制御 溶媒の pH・イオン強度調節による分子選択性の検討

内面修飾を行ったガラス針を用いて、細胞抽出液を吸い上げ、様々な有機溶媒含量、緩衝液 pH、添加塩濃度の洗浄溶媒を後端よりくわえて遠心洗浄し、イオン化溶媒を加え質量スペクトルを取得した。 $C_{18}$  修飾針は細胞膜や小体膜などに含まれる脂質を、 $-SO_3H$  修飾針はアミン類など陽イオン性分子を、 $-N^+(CH_3)_3$  修飾針は細胞内の有機酸などの陰イオン性分子を、それぞれ未処理の針と比べて高いシグナル強度で検出できた。 $-SO_3H$  修

飾針および-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 修飾針については官能基の修飾効率が低いと考えられた。

官能基を導入していない針については、内面のシラノールによる親水性相互作用が観察され、塩強度や極性溶媒濃度によって容易にシグナル強度が変化した。分子の極性による調節に適していると考えられた。

#### ODS針内疎水層の硬さ調節

脂溶性分子については C<sub>18</sub> による選択的検出効果が顕著であった。C<sub>18</sub> の硬さを調節するため、様々な濃度のコレステロール溶液で処理、洗浄した針を用いて細胞抽出液をトラップさせ、脂質シグナルとの相関を検討したところ、コレステロール濃度と脂質保持量の相関が認められた。

#### (3) 窒素チャンバーによる環境由来イオンピークの抑制

環境物質由来ピークを抑制するため、ナノスプレー用チャンバーを密閉状態にした後、質量分析計の真空ポンプにより吸入される空気量を上回る窒素ガスを導入した。取り付け部を密閉状態とし、活性炭にて狭雑物を除去した窒素ガスを送り込んだ。環境物質由来ピークを測定したところ、窒素導入により顕著に減少した。窒素チャンバーが有効と考えられた。

#### (4) 微量調節物質の検出・同定・分子追跡

開発した内面処理ガラス針を用い、1細胞質量分析を行った。選択性は低かったものの、ピーク強度から勘案した網羅的検出には、シラノール針が適していた。脂質には ODS 針によるシグナル強度が一番高く、1細胞の脂質分子選択的濃縮検出においても有効であると考えられた。刺激によるピーク強度変化などについても、内面処理ガラス針は未処理の針に比べて有効に高い検出シグナルを得ることができ、分子変動の検出にも適していた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Tejedor ML, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. In Situ Molecular Analysis of Plant Tissues by Live Single Cell Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 査読有, in press
2. Fukano Y, Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. Drug metabolite heterogeneity between cultured single cells profiled by pico-trapping direct mass spectrometry. *Nanomedicine*, 査読有, in press
3. Date S, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. Direct drug metabolism monitoring in a live single hepatic cell by video mass spectrometry.

*Analytical Science*, 28, 査読有, 2012, 201-203

4. 津山尚宏, 水野初, 升島努, 質量分析の消化器疾患の診療・研究への応用「MS解析の基本原則」, *分子消化器病*, 9, 査読無, 2012, 68-74
5. 水野初, 津山尚宏, 升島努, 1細胞レベルの代謝解析から代謝再構成へ 実験医学増刊号, 29, 査読無, 2011, 1056-1062
6. Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. Mass spectrometry for cellular and tissue analyses in a very small region. *Anal. Sci.*, 27, 査読有, 2011, 163-170
7. Iqbal MS, Tsuyama N, Obata M, Ishikawa H. A novel signaling pathway associated with Lyn, PI 3-kinase and Akt supports the proliferation of myeloma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392, 査読有, 2010, 415-420
8. Tejedor ML, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. Direct single-cell molecular analysis of plant tissues by video mass spectrometry. *Anal. Sci.*, 25, 査読有, 2009, 1053-1055

[学会発表] (計 69 件)

招待講演(9件中4件を表示)

1. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 一細胞リアルタイム nanoMS 法による細胞分子変動追跡, 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2010 年 7 月 21 日~7 月 23 日, 宮城
2. 津山尚宏, 升島努, 一細胞ビデオマススコープ法によるディファレンシャル分子解析, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28 日~3 月 30 日, 岡山
3. 津山尚宏, 升島努, ナノスプレーからみたマトリックス効果, 第 1 回 LC-MS ワークショップ, 2009 年 10 月 22 日~23 日, 静岡
4. 津山尚宏, 升島努 Live Single-cell Video-Mass Spectrometry for Cell Profiling, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日~15 日, 大阪

国際会議(15件中3件を表示)

1. Naohiro Tsuyama, Hajime Mizuno, Iwao Sakane, Takanori Harada, Tsutomu Masujima, Live Single-cell MS Mediated Monitoring of Molecular Diffusion through Gap Junction in Normal Human Cells., 59th ASMS Conference, 2011 年 6 月 5 日~9 日, Denver, USA
2. Naohiro Tsuyama, Hajime Mizuno, Takanori Harada, Iwao Sakane, Tsutomu Masujima, Quantitative analysis of small molecules in a

fluorescence-labeled apoptotic lymphocyte by the Live Single cell MS., 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2010年5月23日~27日, Salt Lake City, USA

3. Naohiro Tsuyama, Hajime Mizuno, Takanori Harada, Tsutomu Masujima, Embryonic cell metabolite profiling during neuronal differentiation by single cell mass spectrometry., 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2009年5月31日~6月4日, Philadelphia, USA

国内一般発表(45件中9件を表示)

1. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 蛍光標識1細胞ダイレクト質量分析法によるギャップ結合分子拡散解析, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28日~31日, 札幌
2. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 無蛍光分子プローブ1細胞ビデオマススコープ法による細胞分子拡散追跡, 日本分析化学会第60年会, 2011年9月14日~16日, 名古屋
3. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 伊達沙智子, 升島努, Live Single-cell MSによるGap結合の解析, 第59回質量分析総合討論会, 2011年9月12日~14日, 吹田
4. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 坂根巖, 升島努, 蛍光標識1細胞リアルタイムMS分子探索法によるヒトBリンパ球アポトーシス追跡の精緻化, 日本薬学会第131年会, 2010年3月28日~31日, 静岡
5. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 蛍光プローブ標識一細胞ビデオMSによる分子変動追跡の精緻化, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15日-17日, 仙台
6. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 坂根巖, 升島努, 一細胞ダイレクト質量分析による蛍光標識リンパ球のアポトーシス追跡, 第58回質量分析総合討論会, 2010年6月16日~6月18日, つくば
7. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 一細胞ビデオマススコープ法による全能性幹細胞の分化解析, 日本分析化学会第58年会, 2009年9月24日~26日, 札幌
8. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 1生細胞リアルタイム質量分析法を用いた幹細胞分化解析, 第34回日本医用マススペクトル学会年会, 2009年9月10日~11日, 大阪
9. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 升島努, 一細胞ダイレクトMSによる神経細胞分

化追跡, 第22回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2009年7月15日~17日, 岐阜

〔図書〕(計3件)

1. 津山尚宏, パートナー分析化学II 遺伝子解析, 南江堂, 311-315, 2012
2. 升島努, 津山尚宏, 水野初, 1生細胞質量分析手法 試料分析講座 創薬の分析化学, 丸善, 257-262, 2011
3. 升島努, 水野初, 津山尚宏, 原田隆範, Live Single-cell Mass Spectrometry - 1細胞生きたまま, 分子変化をリアルタイムに追跡するビデオマススコープ法-, 薬学分析科学の最前線 じほう, 134-135, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津山 尚宏 (TSUYAMA NAOHIRO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号: 10335747

### (2) 研究分担者

升島 努 (MASUJIMA TSUTOMU)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 10136054

水野 初 (MIZUNO HAJIME)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手  
研究者番号: 30457288

原田 隆範 (TAKANORI HARADA)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・研究員  
研究者番号: 30350325  
(H21)

### (3) 連携研究者

なし