

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02872

研究課題名（和文）超高速一細胞代謝フェノタイピング技術の創生

研究課題名（英文）Development of Ultrahigh-throughput Technology for Single cell Metabolic Phenotyping

研究代表者

三浦 大典（Miura, Daisuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40532627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本申請では、MALDI-MSを用いた単一細胞を対象とした代謝プロファイリング法の確立を目指し、高感度かつ再現性の高いサンプル調製法の最適化を行うために、動物細胞を模倣したW/Oドロップレットを用いた検討を進めた。マトリックスを蒸着法にて供給したのちごく穏和な条件で再結晶化する事で高い再現性かつ高感度なサンプル調製法を確立することに成功した。本条件下では空のドロップレットと複数の代謝物標準物質を含むドロップレットを質量分析によって独立に検出することが可能であり、その検出感度はatto molレベルで十分に検出できるなど、非常に好感度であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したMALDI-MSによる超高速一細胞代謝フェノタイピング技術は、“細胞の個性”を捉える超高感度解析を指向する一細胞メタボミクスに新たなモダリティを与える革新的技術となり得る。特に、創薬における成功率の向上・迅速化・低コスト化による国際競争力の向上、病態マーカー探索・分析に対するスループットの向上への貢献が期待され、医療イノベーションにおけるキーテクノロジーになり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have investigated the use of W/O droplets mimicking animal cells in order to optimize the sample preparation method with high sensitivity and reproducibility, aiming to establish a metabolic profiling method for single cells using MALDI-MS. We succeeded in establishing a sample preparation method with high reproducibility and high sensitivity by providing a matrix by vapor deposition followed by recrystallization under mild conditions. Using these conditions, the droplet containing multiple metabolite standards can be detected independently by mass spectrometry, and the detection sensitivity was found to be very favorable, with detection at the atto mol level being sufficient.

研究分野：生体分子解析

キーワード：代謝 プロファイリング 質量分析 ハイスループット

1. 研究開始当初の背景

今日、日本が直面する経済環境や世界的に進行度が高い少子高齢化率を鑑みて、これらの状況を変革する科学技術イノベーションの創出が強く求められている。特に創薬における成功率の向上・迅速化・低コスト化による国際競争力の向上、病態マーカー探索・分析に対するスループットの向上は、医療イノベーションにおけるキーテクノロジーになると考えられる。メタボロミクスはゲノムの物質的最終表現型である代謝物を対象とするため、疾病マーカー探索や創薬ターゲットの同定、疾病発症メカニズム解明における重要性が強く指摘されている。近年メタボローム解析は技術としても成熟期に入りつつあるが、分析基盤としては GC-MS や LC-MS 等を用いた一斉分析である。これらの手法は高い定量性・再現性・頑健性を持つ一方で、感度的な限界から生体組織や多数の細胞から代謝物を抽出する必要があるため、得られるデータは全体の平均値となり、①“物質的フェノタイプ”とも言える各細胞の代謝プロファイル情報は完全に消失してしまう。また、これらの手法では②サンプル調製が煩雑かつ分析全体のスループットが低く、多検体の解析を行う上では課題が存在する。特に一細胞計測など高感度化が開発要件の最重要項目になる場合、サンプル調製工程の複雑化による目的物質のロスが致命的な問題となる。“細胞の個性”を捉える超高感度解析を指向する一細胞メタボロミクスにはこれまでとは全く異なる切り口でのアプローチが必要であろう。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、MALDI-MS を基盤とした低分子量代謝物分析に対する有用性にいち早く着目し、一連の技術開発を精力的に行ってきた。MALDI-MS はレーザー脱離イオン化法の一つであり、原理上分離技術と組み合わせる事が出来ないが、極めて高感度(sub-atto ~ picomole レベル)な分析技術である。また逆に分離過程を省略することで極めて短時間で測定が終了する。このような特性に着目し、これまでに研究代表者らは数十～数百細胞を用いて高い再現性(RSD10%以内)・定量性(R²>0.99)で運用可能な超高速代謝プロファイリング技術(サンプル調製 1 分、1 検体の分析時間 15 秒、1536 well プレートを一斉分析可能)の開発に成功した(*Anal. Chem.* (2010) 82, 498-504)。また、MALDI 法のイオン化助剤であるマトリックスの開発も精力的に進めており、これまでに基本構造に対し若干の構造的変化を加えることにより、本来イオン化できなかった低分子量化合物を高感度にイオン化可能なマトリックスを開発可能であること、定量的構造機能相関(QSPR)による予測モデルにより単一マトリックスでのイオン化の可否を 90%以上の確率で予測でき、イオン化効率(検出限界値)までも予測できることを明らかとした(特許 5907539、特開 2015-028474、*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2014) 25, 1-5)。

上記の研究代表者の持つオンリーワン技術である「MALDI-MS を中心とした代謝物測定技術」の先鋭化により、1 細胞レベルの表現型・機能・多様性・個性を理解するために必須となる生体物質・分子情報を定量的・網羅的に極限の精度と分解能で解析・制御するための基盤技術・ツールの構築を目指し、“細胞の個性”を高解像度に捉える超高速・高感度分析法を開発し、疾患や薬剤投与などへの応答をフェノタイプとして捉える事が可能な「超高速一細胞代謝フェノタイプング技術」の創生が可能であると考えた。本研究では、研究代表者がこれまでに開発してきた MALDI 法を基盤とした超高感度生体内化合物分析技術を先鋭化し、超高速で細胞の代謝をプロファイリング可能なプラットフォームの創生を目的とする。細胞単位での“物質的フェノタイプ”とも言われるメタボロームをプロファイルとして捉え、疾患や薬剤投与などへの応答をフェノタイプとして捉える事が可能な技術へと昇華させる。具体的には、**単離した培養細胞の超ハイスループット代謝プロファイリング技術**に関する技術開発を統合的に進め、疾患や薬剤投与などへの応答をフェノタイプとして捉える事が可能な技術への応用を目指す。

3. 研究の方法

研究開始当初は実際に培養細胞を用いた検討を進める予定であったが、最適なサンプル調製法に関する膨大な数の実験が必要であったため、コスト削減および明確なポジティブおよびネガティブコント

ロールを容易に準備できるメリットなどを考慮し、微小液滴を擬似培養細胞とした実験系を構築し、最適条件の検討を進めた。

マトリックスとして 9-アミノアクリジンを用いた。導電性基盤上に配列させた微小液滴に対し、蒸着法によって MALDI マトリックスを供給したのち、種々の溶媒条件によって再結晶化を行ったのち質量分析を行った。微小液滴には中央代謝系やアミノ酸、エネルギー物質や補酵素など複数の生体由来代謝物標準品を封入し、検出の可否および検出限界について検討を行った。質量分析には AXIMA-Performance (島津製作所) を用いた。質量分析イメージングによって得られたデータは Biomap にて解析を行った。

4. 研究成果

サンプル調製に関する様々なパラメータの最適化を行うことによって、マトリックスを蒸着法にて供給したのちごく穏和な条件で再結晶化する事で高い再現性かつ高感度なサンプル調製法を確立することに成功した。本条件下では空のドロップレットと複数の代謝物標準物質を含むドロップレットを質量分析によって独立に検出することが可能であった。特に、いくつかの重要代謝物については atto mol レベルで十分に検出できるなど高感度な検出が可能であることが明らかとなった。本手法で実際の培養細胞から複数の代謝物を検出できることを確認しており、細胞単位での“物質的フェノタイプ”とも言われるメタボロームをプロファイルとして捉え、疾患や薬剤投与などへの応答をフェノタイプとして捉える実証研究を進めている。

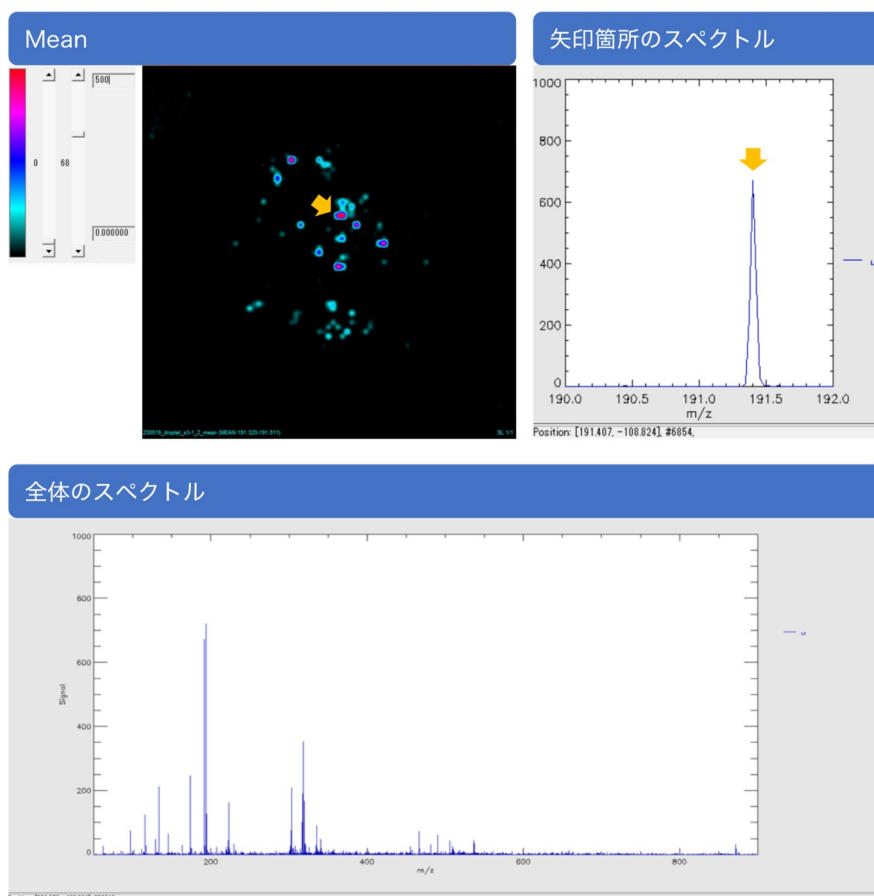


図 1 クエン酸の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dieter M Turlousse, Koji Narita, Takamasa Miura, Mitsuo Sakamoto, Akiko Ohashi, Keita Shiina, Masami Matsuda, Daisuke Miura et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiome	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40168-021-01048-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morikawa-Ichinose Tomomi, Fujimura Yoshinori, Kumazoe Motofumi, Onda Hiroaki, Miura Daisuke, Tachibana Hirofumi	4. 巻 169
2. 論文標題 Inflammatory markers S100A8/A9 and metabolic alteration for evaluating signs of early phase toxicity of anticancer agent treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 113421 ~ 113421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fct.2022.113421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三浦大典	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 実験医学別冊 メタボロミクス実践ガイド	

〔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
研究分担者	藤村 由紀 (Fujimura Yoshinori) (20390304)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------