

平成30年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14653

研究課題名(和文) 透明化生体組織3次元イメージング質量分析法の実現

研究課題名(英文) Development of a method for LC-MS analysis for cleared organs

研究代表者

大出 晃士(ODE, Koji)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：40612122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：透明化組織の局所からプロテオミクス情報を取得する手法の開発を行った。この過程で、透明化手法であるCUBIC法で用いられる透明化試薬が、1) トリプシン消化反応を阻害すること、2) LC-MS装置の送液ラインに付着すること、3) ペプチド回収のための疎水性担体に対して、透明化試薬が強力に付着する問題が明らかとなった。そこで、精製タンパク質や培養細胞を用いた新規透明化試薬のスクリーニング系を立ち上げ、組織の脱脂および屈折率調整が可能であり、かつトリプシン消化の阻害、LC-MSの送液ラインへの付着、さらにペプチドトラップ担体への吸着のすべての問題を回避することができる試薬の一連の組成を見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to acquire local proteomics information from the biological samples subjected to tissue clearing. During the development, we noticed that the reagents used in the tissue-clearing method called CUBIC have following three problems: 1) the reagent(s) inhibits trypsin digestion reaction, 2) it sticks to the capillary of LC-MS system, and 3) it non-specifically binds to the reverse-phase resin used for the desalting peptides. To overcome these problems, we set up a screening system for novel cleansing reagents using purified proteins and cultured cells. We succeeded to find a set of chemicals that can achieve tissue clearing by delipidation and adjust the refractive index, while the chemicals have minimum effect on the protease activity, do not stick to the LC-MS capillaries as well as reverse-phase resin.

研究分野：生化学

キーワード：プロテオミクス 質量分析 組織透明化

1. 研究開始当初の背景

近年、生体組織を光学的に透明化する手法や、透明化された組織を高速撮像する技術革新が進んでいる。一方、蛍光ラベルや免疫染色を用いた顕微鏡観察では、細胞種や状態の評価を既知のマーカーに依存することになる。細胞状態の同定に関しては、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)を基盤としたプロテオミクスは、タンパク質の発現量のみならず、翻訳後修飾の同定・定量を含めて細胞の種類や状態を探索する上で主要な技術として発展してきた。

透明化組織観察と LC-MS 測定を接続することができれば、生体組織の三次元構造と、それを形作る細胞群のタンパク質発現プロファイルを統合することができる。しかしながら、透明化された組織を対象として LC-MS 測定を適用することは、これまであまり検討されてこなかった。その理由の一つとして、組織透明化技術は、サンプル処理過程で多くのタンパク質が失われていると信じられているうえに、大規模プロテオミクスのサンプル調整に於いては、タンパク質の可溶化とプロテアーゼ消化が必須であり、この過程では非特異的なペプチドロスが不可避であることが挙げられる。従って、透明化過程とプロテオミクスサンプル調整過程での二重のサンプルロスを経て、3次元イメージで指定されるマイクロメートルオーダーの局所的な微量サンプルから網羅的プロテオミクスプロファイルを得ることは、困難であることが想定される。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、透明化された組織の性質や、透明化に必要な過程、およびサンプル調整の諸過程を検討することで、透明化組織を LC-MS 測定に供するために適した手法を開発することを目的とする。

顕微鏡観測によって見出された興味ある領域に対して LC-MS 測定のためのサンプル調整を行うためには、顕微鏡測定時の透明化組織をできるだけそのままの状態(理想的には顕微鏡ステージ下で) LC-MS サンプル調整プロセスに移行できることが望ましい。従って、組織が透明化や顕微鏡観察に必要な試薬類に満たされた状態で LC-MS サンプル調整を行うことになる。そこで、細胞サンプルに対する LC-MS サンプル調整に必須の、細胞可溶化、プロテアーゼ処理、脱塩の各ステップに対して反応を阻害しない組織透明化試薬組成の探索が必要となる。

3. 研究の方法

まず、透明化組織が LC-MS 測定に供することができるサンプルか否かを、通常の LC-MS サンプル測定プロトコルに従って処理し、評価した。この場合のサンプル調整は、透明化処理後の組織から、できるだけ透明化処理にともなう試薬の残存が少ない条件で

行い、透明化処理後の組織そのものの性質を評価することを行った。

次に、透明化や顕微鏡観察用の試薬存在下で LC-MS サンプル調整を遂行するために、これらの試薬候補の中から、プロテアーゼ処理を阻害しないものや、脱塩処理を阻害しないものの選抜を行った。脱塩に関しては、特に局所的なサンプル調整に適していると期待される SPME (Solid Phase Micro Extraction) ニードルの検討を行った。具体的には性質が良く理解されている既知のタンパク質として精製 BSA タンパク質を、また、均質な細胞サンプルを並列的に用意するために、96 ウェルプレートに培養した HEK293T 細胞を用いて、これらのタンパク質・細胞に対して透明化試薬候補を加え、タンパク質のプロテアーゼ消化効率や、脱塩のための疎水性担体へのペプチド回収効率を見積もった。

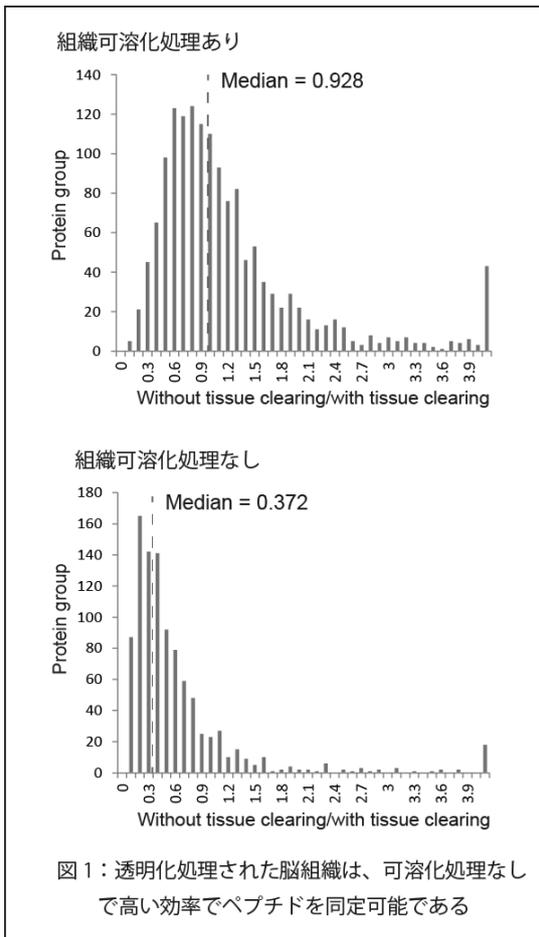
有用な試薬候補については、実際のマウス脳サンプルを透明化処理し、顕微鏡観察を行った。なお、透明化手法については、代表者の所属する研究室で開発された CUBIC 法 (Susaki *et al.*, *Nat. Protoc.* 2017) を基本とした。また、細胞や組織に用いる LC-MS サンプル調整法は PTS 法 (Masuda *et al.*, *J. Proteome Res.* 2008) を基本とした。ペプチド量のサンプル間の相対定量のためには必要に応じて安定同位体を用いたジメチルラベル化法 (Boersema *et al.*, *Nat. Protoc.* 2009) を用いた。

4. 研究成果

組織透明化に必要なステップとして、脱脂と屈折率調整の2つが挙げられる (Tainaka *et al.*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2017)。一方、細胞や組織を LC-MS 解析に供する場合、プロテアーゼ消化を行うためには、細胞の可溶化が必要となる。透明化組織は、脱脂処理によって脂質が顕著に失われているため、プロテアーゼがタンパク質にアクセスすることが容易となり、可溶化処理を必要としない可能性がある。

これを検証するために、透明化処理を施したマウス脳と、施していないマウス脳に対して、通常の LC-MS サンプル調整に必要な組織可溶化処理を行った場合と、行わない場合で、LC-MS 測定によって検出されたペプチドの量比を測定した。その結果、可溶化処理を施した場合は、透明化処理の有りおよび無しに脳サンプルから概ね同量のペプチドが回収されるのに対して、可溶化処理を施さない場合は、透明化処理を施した脳サンプルで高いペプチド回収量を示すことが明らかとなった (図1)。すなわち、LC-MS 測定で検証する限り、透明化処理に伴うタンパク質の損失は顕著には認められないこと、および、可溶化処理は透明化組織サンプルに対しては必須ではないことが示唆された。

そこで、まず、脱脂と屈折率の調整が施された透明化組織サンプルに対して、SPME を



用いて、プロテアーゼ（トリプシン）消化及び消化ペプチドの局所的な回収を試みた。その結果、1) 組織透明化試薬の一部が LC-MS 装置のラインに吸着し、測定妨げとなること、2) プロテアーゼ消化が十分に生じていないこと、さらに 3) SPME に対して組織透明化試薬の一部が吸着し、これがペプチドの回収効率を妨げること、の 3 つの問題点が明らかとなった。

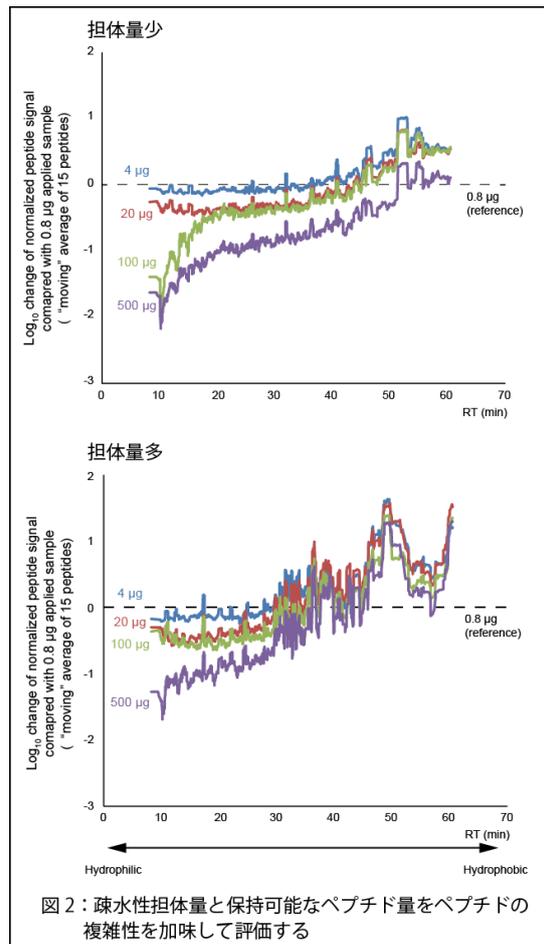
まず、1) については、脱脂のために用いる試薬の一部が、屈折率調整のための溶液置換を経ても組織内に残存し、これが LC-MS 装置の送液ラインに持ち込まれることを見出したため、この試薬を除いた組成で脱脂処理を試みた。その結果、透明化効率の低下は見られるものの、全脳レベルでの顕微鏡観察は可能であるレベルは保たれるプロトコルを整えることに成功した。

次に、2) および 3) の問題の解決に着手した。これらのプロテアーゼ消化やペプチド吸着の障害を引き起こしている主要な化合物は、屈折率調整ステップに添加されているものであったため、屈折率調整の観点から選別された数十種類の透明化試薬候補に対して、これら 2 つの問題を回避できる試薬を探索した。この目的で、消化済 BSA に対して各透明化候補試薬を添加し、親水性の異なる複数の BSA 由来ペプチドを SPME を用いて回収するスクリーニング系を立ち上げた。回収した BSA 由来ペプチドを LC-MS を用いて測定

し、ペプチド回収量を定量するとともに、添加した透明化試薬候補が SPME もしくは LC-MS のラインに吸着し、検出されるか否かを検証した。その結果、添加試薬の吸着が見られず、かつ、SPME とペプチドの相互作用を阻害しない一連の候補化合物を得た。

次に、これらの候補化合物について、プロテアーゼ消化阻害活性を評価した。BSA タンパク質を、候補化合物存在下でトリプシン消化し、消化済みペプチドを SPME によって回収、さらに LC-MS 測定によって定量した。また、より複雑なサンプルに対するプロテアーゼ消化効率を見積もるために、HEK 293T 細胞を 96 ウェルプレートに培養し、この細胞を各種候補化合物の存在下でプロテアーゼ消化した。これらのスクリーニングの結果、プロテアーゼ消化効率に影響を与えず、さらに組織透明化に必要な高い屈折率を有する試薬組成を複数得ることができた。

さらに、屈折率を調整する試薬の中に、一般的にトリプシンによるプロテアーゼ消化を行うバッファー組成よりもむしろ消化効率を上昇させる化合物を予期せずに見出した。おそらく、タンパク質を（トリプシンの酵素活性に影響を与えない範囲で）適当に変性させることで、トリプシンによる切断を促進していると考えられる。



上述の結果によって、従って、LC-MS 測定に相性の良い組織透明化試薬組成を得ること

とに成功した。しかしながら、実際に透明化処理を行った脳サンプルから SPME によって局所的にペプチドの回収を試みたところ、同定されたタンパク質は、PTS 法に従って回収したサンプルの 1 割以下に留まり、局所的な細胞の性質を特徴づけるには不十分であった。この一つの要因として、SPME プローブの疎水性担体のキャパシティが、複雑な脳サンプルに対しては十分ではなかった可能性が考えられる。図 2 に示すように、担体のキャパシティよりもロードされるペプチド量が上昇すると、オーバーロードされたペプチドは均一に失われるのではなく、疎水性担体に吸着しにくいペプチドから優先的に失われる。従って、担体が回収可能なペプチドの複雑性が減少する。なお、図 2 に示すプロット法によって、担体の保持力に対して、サンプルの複雑性を失わずにロードできるペプチド総量を定量的に検討することが可能となり、実際にいくつかのプロジェクトにおいて最適な担体量を効率よく決定するために応用している。LC-MS 測定のサンプル調整の検討に一般的に有用な評価法となることが期待できる。

局所的なサンプルの回収法については、SPME プローブの改良や、局所的な透明化組織の物理的吸引/切除回収を試みたが、現在のところ十分に安定な方法の開発には至っておらず、引き続き検討が必要である。

<引用文献>

- ①Susaki E.A, Tainaka K., Perrin D., Yukinaga H., Kuno A., Ueda H.R.: Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging, *Nature Protocols* 10, 1709-1727 (2015)
- ② Masuda T., Tomita M., Ishihama Y.: Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis, *Journal of proteome research* 7, 731-740 (2008)
- ③ Boersema P.J., Raijmakers R., Lemeer S., Mohammed S., Heck A.J.: Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics, *Nature Protocols* 4, 484-494 (2009)
- ④ Tainaka K., Kuno A., Kubota S.I., Murakami T., Ueda H.R.: Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 32, 713-741 (2016)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①Ode K.L., Ueda H.R.: Design Principles of

Phosphorylation-Dependent Timekeeping in Eukaryotic Circadian Clocks, *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, a028357 (2017) 査読有

DOI: 10.1101/cshperspect.a028357

- ②Ode K.L., Ukai H., Susaki E.A., Narumi R., Matsumoto K., Hara J., Koide N., Abe T., Kanemaki M.T., Kiyonari H., Ueda H.R.: Knockout-rescue embryonic stem cell-derived mouse reveals circadian-period control by quality and quantity of CRY1, *Molecular Cell* 65, 176-190 (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.molcel.2016.11.022.

[学会発表] (計 7 件)

- ①大出晃士、上田泰己: Molecular, organismal and evolutionary tuning of circadian period through the multisite phosphorylation of CRY1, Conbio 2017, 神戸市, 2017
- ②大出晃士、上田泰己: Circadian-period determination by mCRY1 degradation-dependent and -independent mechanisms, 第 24 回 日本時間生物学会学術大会, 京都市, 2017
- ③大出晃士、上田泰己: Flexible time: turning of circadian period through the loop region of CRYPTOCHROME protein, 第 55 回 日本生物物理学会年会, 熊本市, 2017
- ④大出晃士: Information processing governed by dynamics protein phosphorylation, 第 54 回 日本生物物理学会, つくば市, 2016
- ⑤大出晃士: 非専門家のためのプロテオミクス活用戦略, 第 89 回 日本生化学会大会, 仙台市, 2016
- ⑥大出晃士、上田泰己: 哺乳類概日周期長を制御する生化学的基盤, 第 16 回 日本抗加齢医学会総会, 横浜市, 2016
- ⑦大出晃士、上田泰己: Using MS at the bench: the post-translational landscape of circadian clock proteins, 第 64 回 質量分析総合討論会, 吹田市, 2016

[その他]

ホームページ等

<http://sys-pharm.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大出 晃士 (ODE, Koji)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40612122