

令和 2 年 3 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15042

研究課題名(和文)1細胞プロテオミクスシステムの開発と鎌状赤血球症の治療標的候補の探索

研究課題名(英文)Development of single-cell proteomics system for accelerating drug discovery in sickle cell anemia

研究代表者

増田 豪 (Masuda, Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：70383940

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):1細胞プロテオミクスの実現を目指し、本申請課題では油中液滴法を開発した。1細胞プロテオミクスでは、細胞から回収した試料がプラスチック容器などへ吸着損失してしまうことで実現できていない。油中液滴法では、油液中に形成した微小な液滴内にタンパク質試料を格納することで、試料とプラスチック容器への接面積を大幅に縮小できた。油液の組成、液滴に添加するビーズの種類や添加する消化酵素量を最適化することで、回収率を飛躍的に改善した。今後はこの方法を用いることで、赤芽球ぶんかにおけるLRFの機能解明が加速することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一細胞群内における分子レベルの不均一性が報告されている。細胞の個性は、幹細胞から多様な細胞種に分化を促すなど、生命活動には欠かすことができない。一方、細胞の個性は腫瘍細胞に抗がん剤耐性を付与しがんの根治を難しくするなど、人類が生きる上でネガティブな一面も持ち合わせている。タンパク質は生命活動の中心的役割を担う。1細胞プロテオミクスを実現できれば、赤芽球分化様式の解明だけでなく、腫瘍細胞集団内の抗がん剤耐性細胞やがん幹細胞など希少細胞集団に効果的な薬剤の開発、ヒト造血幹細胞の増殖法の開発など幅広い分野に利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文):Single cell protein analysis is a key technology for understanding of tissue and cell heterogeneity. Mass spectrometry based proteomics is possible to comprehensively identify and quantify proteins. However, it is hardly possible to perform single cell proteomics due to low sample recovery by adsorption loss during sample preparation. To reduce the contact area of a sample solution with a plastic tube, we have developed a water droplet in oil (WinO) protocol. The number of identified peptides and signal intensity in WinO were increased 1.7-fold than those in In-solution protocol. In addition, the peptide recovery was improved by optimization of protease amount, organic solvent, beads and component of surfactants in water droplet.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：1細胞 プロテオミクス 油中液滴 高感度分析 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

赤芽球は骨髄に存在する造血幹細胞から分化した細胞であり、将来的には赤血球まで成熟し赤芽球からヘモグロビンの合成が始まる。転写因子 GATA1 や GATA2 をはじめ、赤血球の分化に重要なタンパク質が複数報告されているが、その詳細な制御ネットワークは不明である。申請者は転写因子 LRF が鎌状赤血球症や サラセミアなどの治療に必要な胎児型 グロビンの発現を成人期に抑制していることを発見した(Masuda et al., Science, 2016)。興味深いことに、LRF を欠損させると赤芽球の Basophilic から polychromatophilic への分化効率が劇的に低下してしまい、細胞はアポトーシスに向かう(Maeda et al., Dev.Cell, 2009)。LRF の赤血球分化における機構を明らかにするために、申請者は LRF 欠損時に変動するタンパク質やヒストン修飾をプロテオーム技術を用いた解析を試みたが、LRF の機能は明らかにできなかった。その理由の1つとして、赤芽球の異種性があげられる。予備試験で 100 個の赤芽球について 1 細胞 qPCR を行ったところ、ヘモグロビン遺伝子の発現量は細胞間で最大 156 倍の差が確認された。つまり、現状では分子的に不均一な赤芽球集団から " 平均的 " なプロテオーム情報を取得しているため、細胞個々における LRF の活性および LRF に制御されるタンパク質群を正確に観察できていないこととなる。そこで本申請課題では、赤血球分化における LRF の機能を明らかにすることを目標として、1 細胞プロテオミクス技術を構築する。赤芽球分化における LRF 機能を明らかにできれば、in vitro での高効率な赤血球分化誘導法の確立につながり、近年供給が低下している不安定な輸血インフラの安定化につながるため実施する意義は大いにある。

1 細胞レベルで個性を解析する方法はこれまで、フローサイトメトリーなど様々な技術が報告されている。これらの方法は仮説先行型の実験手段であり、研究者が興味のある分子しか観察できず、しかも分析対象物の種類や数に制限がある。細胞内において、ゲノム、RNA、タンパク質などの多様な分子群は複雑な生命ネットワークを形成している。研究者の予想を超えた複雑な生命現象を理解するには、データ先行型のオミクス研究により膨大な情報を包括的かつ定量的に取得し再構成することが必須だと申請者は考えている。これまで 1 細胞レベルでオミクス解析を実現しているのは、ゲノム配列、遺伝子発現量や ChIP-Seq を用いたヒストンマーカークロマトマチン領域の同定などであり、いずれも分析対象物は定量的に増幅が可能な DNA や mRNA である。一方、タンパク質は生命活動を直接担う重要な分子であるが、1 細胞レベルの網羅的な解析は実現できていない。その主な理由は、タンパク質を増幅することができないこと、測定対象物がタンパク質ではなくペプチドであるため前処理行程が他のオミクス解析に比べて煩雑であり、微量試料の回収率が低いことが挙げられる。

### 2. 研究の目的

赤芽球から赤血球に分化成熟する機構は不明である。転写因子 LRF が欠損すると赤芽球で分化は止まり細胞死に向かうことから、LRF は赤芽球分化に必須な因子であると示唆される。これまで申請者はゲノミクスやプロテオミクスなどを用いた解析を行ってきたが、赤芽球のタンパク質発現パターンの不均一性が問題となり LRF の赤芽球における機能を明らかにできなかった。本申請課題では申請者が独自に開発した油中液滴チャンパー法を基盤として、1 細胞プロテオミクスを構築することを目的とする。当技術を用いることで、赤芽球における LRF の機能解明できる。赤芽球分化機構が詳細に明らかにできれば高効率に赤血球分化誘導が可能となり、赤血球輸血インフラの安定化につながる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 油中液滴における試料回収率の高い最適な油層(有機溶媒)の選抜

油中液滴チャンパー法で試料の回収率を上げるためには、水に不溶性油(有機溶媒)を用いる必要がある。油層が溶けた水滴を LC-MS/MS に導入した場合、油層がペプチドの逆相カラムへの保持を阻害してしまい回収率が激減するためである。予備試験において 12 mM デオキシコール酸ナトリウムと 12 mM ラウロイルサルコシン酸を含む溶液は酢酸エチル中で再現性が高く液滴を形成した。本実施事項では油層の候補をクロロフォルム、ジエチルエーテル、ヘキサンやオクタノールなどの高級アルコールとする。各油層におけるペプチドの回収率は、液滴分配後の試料を LC-MS で定量し評価する。回収率が酢酸エチル使用時よりも低い場合、有機溶媒の液滴に対する容量比率を下げて再評価を行う。

#### 2) 回収率を上昇させるタンパク質吸着ビーズの選抜

油中液滴中において、疎水性タンパク質は油層に拡散してしまい回収率が低下する。回収率を下げないために、疎水性タンパク質を水滴内に保持する必要がある。予備試験において、ポリスチレン基材の磁性体ビーズ(Solulink 社)を油中液滴に添加したところ、水滴特異的に分散し尚かつタンパク質の回収率が上昇することを確認した。

本実施事項では、各種磁性体ビーズ(Dynabeads、Pierce、GE および Solulink 社)や陰イオンおよび陽イオン交換ビーズを対象として、タンパク質の吸着量を比較する。タンパク質吸着量の評価は、一定量のピオチン化ウシアアルブミンをビーズに吸着させ、溶出液およびビーズに残存したアルブミン量をアビジンを用いて正確に定量する。同時にビーズから質量分析を阻害しないポリマー成分が溶出ししないことを確認する。

### 3) 前処理工程における回収率改善

油中液滴における主要な試料損失箇所を明らかにするために、前処理工程における試料損失率を算出する。前処理工程を消化および脱塩の2工程に分けて損失率をもとめる。

### 4) タンパク質の抽出・消化効率の高い界面活性剤の組合わせと濃度

申請者が開発した相間移動可溶化剤(Phase Transfer Surfactant, PTS)を用いることで、抽出および消化効率が従来の尿素法に比べて上昇した。タンパク質の可溶化能および消化効率が高いほど、同一配列のペプチド量は増え同定効率は上がる。本実験項では、様々な濃度および種類のPTS溶液に対して、可溶化能と消化酵素活性を評価し現行のPTS法よりもタンパク質同定効率が高い次世代のPTS法を開発する。タンパク質の可溶化能の評価は、ヒトミクロソーム画分を各PTS混合液に可溶化し、遠心分離した上清中に含まれるタンパク質の濃度をBCA法で定量する。消化酵素の活性は、N-benzoyl-L-lysine p-nitroanilideなどの基質を模した化合物を用い、消化後の吸光度を測定する。現行のPTS法よりもタンパク質の溶解能および消化効率が1.5倍以上に促進することを目標とする。

## 4. 研究成果

### 1) 油中液滴における試料回収率の高い最適な油層(有機溶媒)の選抜

酢酸エチル、クロロホルム、ジエチルエーテル、ヘキサンおよびオクタノールについて、油中液滴における試料の回収率を検討した。クロロホルムおよびオクタノールは試料溶液中への混入が多くLC-MS/MSによる分析ができなかった。残りの有機溶媒について、油中液滴法で同定できたペプチド数を比較したところ、酢酸エチルが最も同定数が多かった。

### 2) 回収率を上昇させるタンパク質吸着ビーズの選択

ビーズへのタンパク質吸着量が増えることで、試料の回収率が改善することが期待される。ビーズはFG beads (COOH, NH<sub>2</sub>)、Magnosphere、Dynabeads、SOURCE 30S および SP Sepharose HP を用いた。FG beads (COOH)、Magnosphere および Dynabeads はカルボキシ基を持つ磁気性のビーズである。またFG beads (NH<sub>2</sub>) はアミノ基を持つ磁気性のビーズであり、SOURCE 30S および SP Sepharose HP はスルホン酸基を持つ非磁気性のビーズである。ビーズへのタンパク質吸着量を評価するために、各ビーズと細胞抽出タンパク質を1晩振盪した後に、吸着したタンパク質の量をSDS-PAGEのバンド強度で評価した。また、ペプチドの回収量に与える効果を評価するために、各ビーズと混合した10 ngのタンパク質を油中液滴消化してLC-MS/MSで測定した。

その結果、カルボン酸ビーズのバンド強度はアミンビーズより3.5倍以上に増加し、スルホン酸ビーズより1.4倍以上に増加した。同様に、カルボン酸ビーズで処理された群における総シグナル強度はアミンビーズより1.2倍以上に増加し、スルホン酸ビーズより1.6倍以上に増加した。特にカルボン酸ビーズであるMagnosphereにおけるシグナル強度は6種のビーズの中で最も大きく、アミノ基およびスルホン酸基をもつビーズより有意に大きかった。

### 3) 前処理工程における回収率改善

油中液滴全工程および脱塩工程の試料回収率は38%および80%であり、消化工程の試料回収率は48%と概算された。以上から油中液滴法においてトリプシン消化までの工程は消化後の工程より試料の回収率が低かったため、優先的にプロトコルを改良する必要がある。

回収率が低い原因は、水層に溶存した酢酸エチルが消化酵素の活性を阻害していることが危惧された。溶液消化および油中液滴消化時における消化酵素の活性を測定したところ、油中液滴消化では、トリプシンの活性は33.6%まで減少していた。そこで、10 ngのタンパク質に対して50 ngの消化酵素を添加して消化したところ、回収率は61.8%まで改善した。

### 4) タンパク質の抽出・消化効率の高い界面活性剤の組合わせと濃度

PTSとして利用可能な5種類の可溶化剤について、全組合せとなる31種類のPTS溶液を調製した。各溶液における消化酵素活性およびタンパク質可溶化能から、デオキシコール酸とウルソデオキシコール酸を混合した可溶化液(SDC/UDC)を選択した。SDC/UDCは、従来用いていたSDCとラウロイルサルコシン酸を混合した可溶化剤(SDC/SLS)よりも可溶化能が1.4倍に上昇し、消化酵素のミス切断が16%減少した。以上のことから、SDC/UDCを用いることで、可溶化能および消化効率が促進し、回収率が改善することが期待された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

T. Masuda, T. Hoshiyama, T. Uemura, M. Hirayama-Kurogi, S. Ogata, A. Furukawa, P.O. Couraud, T. Furihata, S. Ito, S. Ohtsuki: Large-Scale Quantitative Comparison of Plasma Transmembrane Proteins between Two Human Blood-Brain Barrier Model Cell Lines, hCMEC/D3 and HBMEC/cibeta. *Mol Pharm.* 16:2162-2171 (2019) 査読有.  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00114

T. Yamauchi, T. Masuda, MC. Canver, M. Seiler, Y. Semba, M. Shboul, M. Al-Raqad, M.

Maeda, VA. C. Schoonenberg, MA. Cole, C. M. Trevino, Y. Ishikawa, Q. Yao, M. Nakano, F. Arai, SH. Orkin, B. Reversade, S. Buonamici, L. Pinello, K. Akashi, DE. Bauer, T. Maeda: Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identifies leukemia-specific dependence on a pre-mRNA metabolic pathway regulated by the DCPS decapping enzyme. **Cancer Cell**, 33:386-400 (2018) 査読有.  
DOI: 10.1016/j.ccell.2018.01.012

〔学会発表〕(計9件)

古川亜里朱、増田豪、稲森悠真、伊藤慎悟、大槻純男、定量的プロテオミクスのための可溶化剤の開発、第35回日本薬学会九州支部大会(2018).

Takeshi Masuda, Shingo Ito, Sumio Ohtsuki, Nuclear Enrichment toward Large Scale Profiling of Transcription Factors, Mass Spec and Proteomics 2018 (2018).

Arisu Furukawa, Takeshi Masuda, Yuma Inamori, Shingo Ito and Sumio Ohtsuki, Phase Transfer Surfactants-based Sample Preparation toward Unbiased Proteomics. 66th ASMS Annual Conference (2018).

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 質量分析用のペプチド試料の調製方法

発明者: 増田豪

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-139362

出願年: 2018

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。