

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590041  
 研究課題名（和文） モノリス充填ナノスプレー分離によるオンタイム細胞内蛋白質解析法の開発  
 研究課題名（英文） Development of on-time cellular protein analysis method using nanospray tips filled with silica-monolyth.  
 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：

一つの細胞を顕微鏡で観察しながらガラス製のナノスプレーチップを突き刺して内容物を取り出し、質量分析計で分子プロフィールを取得し、変化した分子を捉える方法（Live Single Cell Mass Spectrometry）を開発した。この方法を用いて、様々な種類の細胞、細胞周期の違いや、幹細胞からの分化の過程、投与した薬物の代謝変化などの分子プロフィールの違いを見分けることができ、変化分子の同定も行えることを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：分析科学・生体分子・質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象の分子解析は、現象の観察された時点と検体回収の時点の間に時間のずれがないことが望ましい。しかし、刺激により誘導される現象を解析する際には、現象を顕微鏡で確認し、その後に細胞の集団として検体を回収する、あるいは他の手法で決定した時間軸に沿って検体を回収する手法がとられているため、観察時点と回収時点の時間のずれが生じる。これに加え、刺激誘導される現象は短時間で進行するため検体の同調性が低く、偏差の大きなデータになり易い。即ち、

観察と同時に観察下の一つの細胞を回収し、分子の挙動を分析できる技術が求められている。我々が開発したビデオマススコープ法は、ビデオ顕微鏡観察下で細胞が分泌する低分子をオンタイムで測定する手法である。本法では、顕微鏡で観察を行いながらコンピュータを用いて培養液サンプルを吸い取り、ナノスプレーチップ中にレジンを詰めて作成したカラムを用いて脱塩・濃縮を行い、チップをそのまま質量分析計にかけて解析を行うため、顕微鏡下で観察される現象と質量分析結果の同時性を高いレベルで達成した。我々はこの手法をさらに発展させ、細胞の内

容器を直接回収し、ある現象が観察された瞬間の分子を観察できるのではと考えた。

## 2. 研究の目的

ビデオ顕微鏡観察下の一つの細胞を回収し質量分析を行うことができれば、従来行われてきた多量の細胞を用いた解析手法に比べ、標的とする現象と分子分析結果の同時性を高めることができ、また一般的な非同調の検体の平均値として得られる結果に比べ鋭敏な結果を得ることができると考えられる。一つの細胞を顕微鏡観察下で回収し、質量分析を行う装置の作成を目的とした。一般的な生体試料分析の手順を想定し、前処理を行うことのできる吸入用のガラスカラム、分離検出用のナノスプレーチップ、オンライン分析の各ステップを新規に構築することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞吸入型前処理カラムの開発

顕微鏡観察下で、一つの細胞を直接吸い取り、速やかに細胞破碎・脱塩を行う使い捨てカラムを作成した。吸い取るガラスキャピラリー内に破碎状シリカゲルを詰め、続いて細胞内の低分子を除去するためにゲル過樹脂をバックする。このキャピラリーカラムをポンプで引くことにより、細胞が破碎され、続いて脱塩および低分子の除去が行われた抽出液を回収することが可能となると考えられた。

### (2) モノリス充填ナノスプレーチップの開発

ガラスキャピラリー内にシリカモノリスを形成させ、加熱して引きナノスプレーチップを作成した。これに表面処理 (C18鎖修飾及びエンドキャッピング) を行い、蛋白質の逆層分離に適切なチップとした。あるいは、アミノ基リンカーを用いてチップ内面にプロテアーゼ、抗体等を結合させた。解析の用途に応じて、蛋白質の粗精製、カラム内蛋白質消化あるいはアフィニティ精製の機能をもつナノスプレーチップができると考えられた。

### (3) ナノスプレーチップによる細胞直接吸入

前処理や分離が機能しないことを想定し、ナノスプレーチップを用いた直接吸入、直接分析系の構築も試みた。ナノスプレーチップの作成条件を検討し、形状や口径について検討を行った。またイオン化溶媒についても検討し最適な条件を設定した。設定した条件を用いて、細胞分析を行い様々な用途に使用できることを確認した。

### (4) ナノスプレー分離によるオンタイム解析システムの構築

前処理カラム、ナノスプレーチップをポ

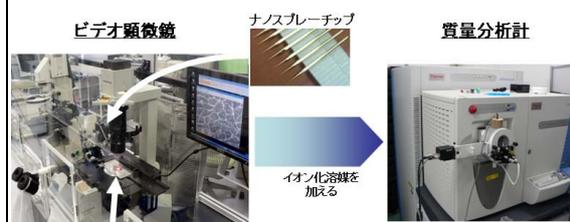
ンプを介して接続し、細胞吸い取り・破碎・脱塩、さらにナノスプレーチップへの導入・洗浄、チップから溶出しイオン化-MSへの導入、の連続したシステム構築を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞吸入型前処理カラムの開発

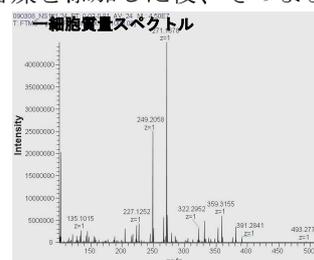
破碎シリカゲル粒子を先端に充填しガラスカラムを封入したガラスキャピラリーを試料採取用カラムとして作成し顕微鏡下で一細胞の回収を試みたが、細胞成分が破碎されること無く先端部に詰まる、また先端径を大きくすると(100  $\mu$ m)培地成分が混入するなど細胞破碎・回収には不適であった。先端を細くした中空のガラス針を用いたところ、培地をほとんど吸い上げることなく細胞内容物を効率よく回収することができた。

### (2) 細胞吸入用ナノスプレーチップの作成と最適化

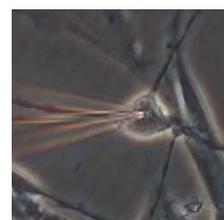


培養皿の中の細胞を画面を見ながらナノスプレーチップで刺し吸引する

予め金コーティングしてあるナノスプレーチップ (先端径1マイクロメートル以下) をマイクロマニピュレーターに取り付けて一つの細胞を刺し内容物を吸い上げた。イオン化溶媒を添加した後、そのまま質量分析装置に取り付け、質量分析を行ったところ、得られた質量スペクトルに細胞由来のピークが観察された。



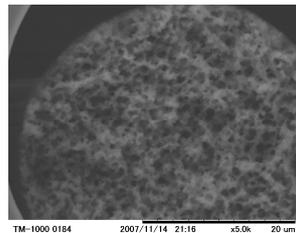
細い先端径のチップでは再現性良く細胞シグナルが得られないため、チップ作成機の設定を変えて多種のチップを作成し、それぞれ細胞を吸い上げて質量スペクトルを取得し、口径および形状を最適化した。また、金コーティングによる導電性処理に重ねてシランによる撥水性処理を



したナノスプレーチップを作成したところ、スムーズに細胞質を吸引でき、安定したスプレーが形成されることがわかった。

### (3) ナノスプレーチップ内でのシリカモノリスの作成

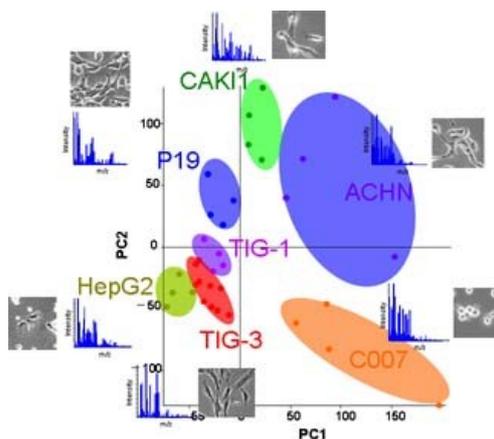
ガラス針の内部にシリカモノリス作成溶液を詰めて重合させた。シリカモノリスの形成は確認できたが、重合後の構造萎縮のためチップの内壁から剥離したため、先端部だけのモノリス構造とした。このチップを用いて細胞吸入を試みたが、非常に詰まり易く安定したシグナルを得ることができなかった。



### (4) 細胞吸入用ナノスプレーを用いた一細胞質量分析による細胞分子解析

最適化したナノスプレーにより得られた一細胞質量スペクトルの特異性を検討するため、それぞれ異なった種類の細胞の内容物を吸い上げて取得したスペクトルを比較した。質量スペクトルからピーク抽出を行い、質量電荷比毎に各スペクトルのピークを整列させ、主成分分析を行ったところ、細胞種ごとに質量スペクトルが集団を形成したことから、この方法で得られた質量スペクトルはある状態の細胞に特徴的な分子プロフィールを含んでいると考えられた。

#### 主成分分析による一細胞質量スペクトルの分類



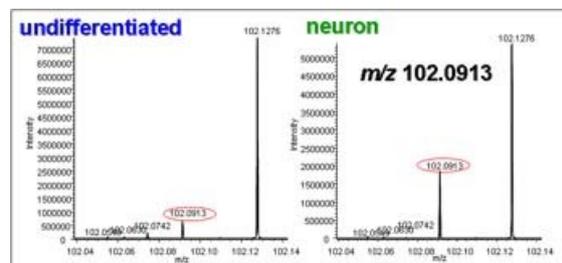
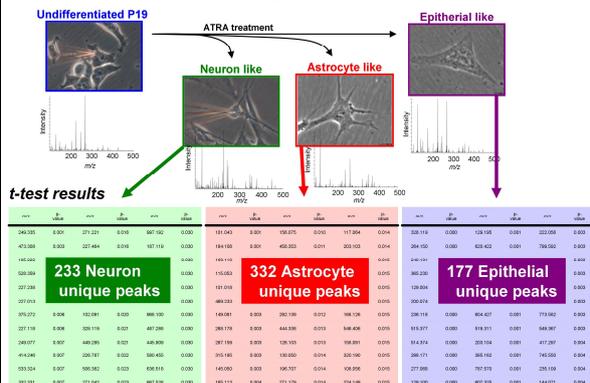
また同様に細胞周期の分布も分類できることが分かった。

この方法が多能性幹細胞の分化を追跡できるか検討するため、レチノイン酸による胚性癌細胞 P19 の分化過程を追跡した。レチノイン酸刺激により、一部が神経幹細胞様の丸い形態に変化し、つづいて時間の経過とともに軸索を伸ばしたニューロン様の形態を持つ細胞、多くの仮足を伸ば

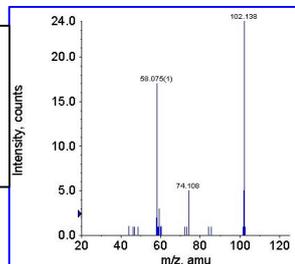
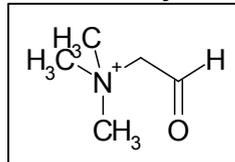
した細胞や平坦な敷石状の細胞などいくつかの異なる形態をもつ細胞に変化した。各々の形態をもつ細胞を標的として1細胞質量分析を行った。

それぞれの形態の細胞に特徴的なピークを抽出するため t 検定を用いて比較したところ、分化および未分化細胞の各々に特徴的な質量ピークが認められた。

ニューロン様細胞特異的なピークのうち



#### Betaine Aldehyde



m/z 102.09, について、MS/MS 結果から

betaine aldehyde であることが分かった。glycine 代謝経路のほかの分子についても精査したところ、betaine aldehyde からはじまり glycine に至る5つの分子について、ニューロン様細胞での増加が認められた。

### (5) オンタイム分離分析系確立の試み

ナノスプレーチップ先端にトラップした細胞内分子をチップ後部よりの送液により分離溶出を試みたが、チップ内に ODS 処理などを施しても、良好な分離条件や高感度化を見出すことができなかった。

以上から、我々は最適化されたナノスプレーチップを用いた一細胞質量分析法が細胞の表現形を特徴付ける分子検出に有効であることを世界ではじめて見出し、**”Live Single Cell Mass Spectrometry”**と名づけ、論文・学会発表を行い、現在様々な実験系へ

の適用を試みている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Mizuno H, Tsuyama N, Date S, Harada T, Masujima T. Live single-cell metabolomics of tryptophan and histidine metabolites in a rat basophil leukemia cell. *Anal Sci.* (査読有) 2008; 24: 1525-1527.
2. Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification. *J Mass Spectrom.* (査読有) 2008; 43: 1692-1700.
3. Tsuyama N, Mizuno H, Tokunaga E, Masujima T. Live single-cell molecular analysis by video-mass spectrometry. *Anal Sci.* (査読有) 2008; 24: 559-561.
4. Takahashi N, Tsuyama N, Sasaki K, et al. Segmental copy-number variation observed in Japanese by array-CGH. *Ann Hum Genet.* (査読有) 2008; 72: 193-204.
5. Kuroda Y, Sakai A, Tsuyama N, et al. Ectopic cyclin D1 overexpression increases chemosensitivity but not cell proliferation in multiple myeloma. *Int J Oncol.* (査読有) 2008; 33: 1201-1213.
6. 津山尚宏, 水野初, 原田隆範, 西垣俊太, 升島努, 前田昌子, 檜山英三 タンデム MS による疾患関連分子マーカーの探索 *臨床化学* (査読無) 2008, 37, 410-417

[学会発表] (計 8 件)

- ①. 津山尚宏, 一細胞ダイレクト MS 法による細胞分化の指標分子探索, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 国立京都国際会館
- ②. 津山尚宏, 一細胞ビデオマススコープ・主成分解析を用いた細胞表現形・分化指標の分子探索, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡大学七隈キャンパス
- ③. 津山尚宏, 一細胞質量分析・主成分解析を用いた分化分子指標探索, 第 21 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2008 年 8 月 6 日, 札幌コンベンションセンター
- ④. 津山尚宏, ビデオマススコープ法の開

発: 1 細胞 MS 主成分解析による細胞分子指標の探索, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 16 日, つくば国際会議場

- ⑤. 津山尚宏, ビデオマススコープ法の開発: 主成分分析によるダイレクト MS 1 細胞分子表現形分析, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, パシフィコ横浜
- ⑥. 堀江洋平, 津山尚宏, ディファレンシャル MS ディスプレイ法によるアポトーシス過程変動分子解析, フィジカル・ファーマフォーラム 2008, 2008 年 3 月 24 日, 星薬科大学
- ⑦. 水野初, ビデオマススコープ法の開発: 1 細胞ダイレクト MS 法による細胞内部位特異的分子の探索, フィジカル・ファーマフォーラム 2008, 2008 年 3 月 24 日, 星薬科大学
- ⑧. 津山尚宏, ビデオマススコープのための高分子量蛋白質動態解析法の開発, 日本分析化学会第 56 年会, 2007 年 9 月 20 日, 徳島大学工学部

[図書] (計 2 件)

1. 升島努, 他 52 名, じほう, 薬品分析科学の最前線, 2009, 185 頁
2. 津山尚宏, 他 15 名, 南江堂, 分析化学 II, 2007, 321 頁

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

#### (3) 連携研究者