

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790038
 研究課題名（和文） ターゲット分子トラッピングによる1細胞ナノ質量分析法の開発
 研究課題名（英文） Development of single-cell nano mass spectrometry by targeted molecular trapping
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：1つの細胞を顕微鏡で観察しながら、その細胞内の顆粒や細胞質などの細胞内小器官に存在する分子をナノスプレーチップに精度良くマイクロサクションし、質量分析による分子検出ができる、高精度ターゲットトラッピング法の開発を行った。この方法により、RBL-2H3細胞内に存在するの顆粒・細胞質内に特異的に存在する分子を同定し、顆粒内にもヒスチジンやヒスタミンの代謝経路が存在することを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：The live-single cell mass spectrometry provided us real time analyses of cell behavior linked with identification of cellular molecules. In this study, we developed that the targeted molecular trapping method for the live single-cell mass spectrometry. This method enabled us to analyze and identify the metabolites and its metabolic pathways even in organelle with its behavior and sub-cellular localities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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・生体分子・質量分析

1. 研究開始当初の背景

これまでの生化学的手法による分子分析では、細胞現象が観察された細胞をその細胞集団ごと回収して行っていた。これでは、すべての細胞が同時に現象を発現しているとは限らないため、分析結果も様々な状態の細胞によって平均化されてしまう。また細胞

収集からホモジナイズなど煩雑で多段階の前処理操作が必要となる。このように、分析までの時間的ロスにより、ターンオーバーの早いシグナル伝達物質のような機能分子は検出することができない。そこで細胞現象の分子動態を正確に追跡するためには、顕微鏡観察による細胞観察と、同時に観察している細胞1個を回収し、直接質量分析による分子

検出が可能な「ビデオマススコープ法」を開発した。本研究ではこれをさらに発展させ、1細胞内において特定部位のみを選択的にトラップし質量分析による分子検出・同定ができれば、細胞内小器官レベルでの分子分析が可能となり、より詳細な細胞現象解明につながる考えた。

2. 研究の目的

詳細な細胞現象の分子メカニズム解明のためには、現象とリンクした細胞内の分子の動きを捉えることが必要となる。そこで本研究では、細胞内の狙った場所（顆粒、液胞などの細胞内小器官）を正確に再現性よくマイクロサククションできる1細胞ターゲット分子トラッピング法の開発と、トラップした分子をそのままナノスプレー・イオン化して質量分析し、分子同定ができるシステムを構築した。さらに検出される分子の網羅性を向上させるために、ナノスプレーチップ内における前処理・簡易分離法の開発を試みた。

3. 研究の方法

<1細胞特定分子分析のためのターゲット分子ラッピング法の開発>

1つの細胞の狙った部位に精度よくマイクロサククションでき、そこに存在する分子を再現性よくトラップできるナノスプレーチップ及びその方法の開発を行った。

(1) 高精度マイクロサククション用ナノスプレーチップの開発

細胞内のどの部位を狙うかにより、その細胞内小器官などの形状や大きさが異なってくるため、それぞれに合わせたナノスプレーの先端口径の最適化を行った。

(2) オンチップ前処理・分離法の開発

本方法による分子検出は、主にアミノ酸やその代謝物などの低分子化合物が主であったが、分子の網羅性向上のため、細胞サンプリング後にチップ内での前処理・簡易分離法について検討した。

(3) ナノチップ電気泳動法の開発

細胞内に存在するイオン性分子を選択的にチップ内にトラップするために、キャピラリー電気泳動の原理を用いたシステムの構築を試みた。またこの時に細胞にあまり負荷がかからないような条件を検討した。

<アレルギーの原因となるマスト細胞脱顆粒反応発現メカニズムの解明>:

上記で構築させた方法を用い、ラットマスト細胞モデル (RBL-2H3) における脱顆粒反

応時の分子動態分析を行なった。

(4) 顆粒・細胞質内分子探索およびMS/MSデータストック作成

RBL-2H3 細胞内の顆粒や細胞質に特異的に存在する分子を調べるため、本研究で開発したターゲット分子トラッピングによってそれぞれの部位をトラップし、質量分析による分子探索・同定を行った。さらにこれらの分子のMS/MSフラグメントパターンを集めたRBL-2H3細胞内分子データストックを作成した。

(5) 脱顆粒反応における顆粒・細胞質成分の経時的変動分析

ラットマスト細胞 RBL-2H3 を顕微鏡観察下でカルシウムイオノフォア A23187 による刺激を与え、脱顆粒反応を引き起こす。このとき刺激前後の顆粒・細胞質内の分子をそれぞれトラップし、変動分子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 高精度マイクロサククション用ナノスプレーチップの開発

マイクロサククションに用いるナノスプレーチップの形状や口径を最適化し、1つの細胞(大きさ約 $10\mu\text{m}$)から顆粒などの特定部位(約 $1\sim 3\mu\text{m}$)を精度良くマイクロサククションできるチップの開発を行った。その結果、RBL-2H3細胞内の顆粒や細胞質のみを選択的にトラップするためにはチップの先端口径 $2\mu\text{m}$ が最適であることを見出した。さらに各サンプルにおける測定結果のばらつきを抑えるためにチップの先端形状のばらつきを厳密に抑えたチップを開発した(図1)。

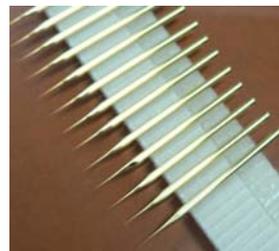


図1 細胞内小器官用ナノスプレーチップ

ここで最適化したナノスプレーチップを用いてラット由来マスト細胞モデル (RBL-2H3) の細胞内に存在する顆粒と細胞質部位を選択的にマイクロサククションし(図2)、それぞれ質量分析を行った。各部位を選択的にトラップされているか確認するために、RBL-2H3にキナクリンを投与して顆粒を選択的に蛍光染色した細胞を用い、キナクリンのプロトン2価体ピーク ($m/z200.6$) をマーカーとして用いた。その結果、顆粒サンプルからはキナクリンのピークが検出されたのに対し、細胞質サンプルからは検出されなかった。これによって本方法により

RBL-2H3 細胞の顆粒・細胞質部位を選択的にマイクロサクションできていることが分かった。

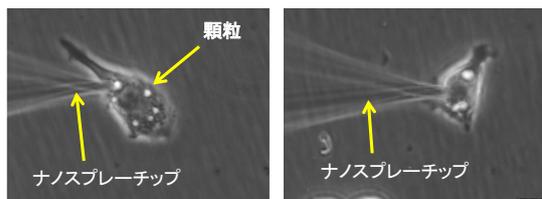


図2 顆粒(左)・細胞質(右)マイクロサクションの瞬間

また、細胞1個丸ごとや核といった、比較的大きい部位をトラップするためには、マイクロサクションの際に細胞成分がチップ先端が詰まってしまい、上手くサンプリングできなかった。そこでチップの先端口径を広げたナノスプレーチップを製作し、1細胞質量分析に用いたところ、細胞丸ごとでも詰まることなくサンプリングすることができるようになった。

(2) オンチップ前処理・分離法の開発

内面処理を施したキャピラリーを作成したが、処理に使用した薬剤のピークが大きく検出された。これにより、1細胞成分などの微量サンプル由来のピークが処理剤ピークに隠れてしまい、検出することができなかった。今後の課題として、処理の際のステップ数を少なくし、使用する試薬の種類・量を減らす方法の検討と、チップの内径が細い先端まで確実に効率よく洗浄する方法の改良が必要である。

・脂質分子の検出

これまでの方法では主にアミノ酸やその代謝物など、分子量が300以下の低分子化合物が検出されていたが、ここではリン脂質検出に向けた条件の検討を行った。

細胞1個を丸ごと吸い取り、チップ内での低調処理により細胞破壊後にメタノールによって脂質成分を抽出し、正イオン検出モードによる質量分析を行ったところ、細胞膜の主要成分であるホスファチジルコリンが検出された(図3)。さらにMS/MS解析によって極性部位のコリン及びホスホコリンが脱離したフラグメントピークを検出できた。その他にホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンが検出された。

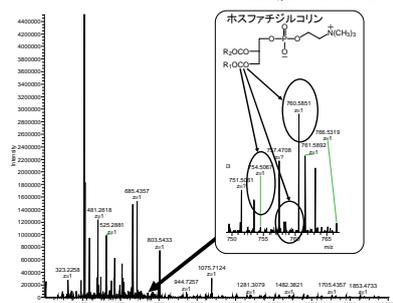


図3 RBL-2H3 1細胞脂質質量分析結果

(3) ナノチップ電気泳動法の開発

細胞内成分をキャピラリー内にトラップするためには高電圧をかける必要があり、経時的に同じ細胞からサンプリングすることはできなかった。さらにトラップする細胞以外の別の細胞にも大きなダメージを与えることが確認された。

また、イオン性分子の分離のために、ナノスプレーチップ内にイオン交換樹脂を加え、検討を行ったところ、1細胞成分のような微量なサンプルの場合にはサンプルの吸着による影響が大きく、細胞成分由来の成分を検出することは出来なかった。

マイクロサクション時の細胞への影響の低減と、より効率的なキャピラリー電気泳動を可能とするために、ナノスプレーチップ先端口径をより細くするなどの最適化が必要と考えられる。

(4) 顆粒・細胞質内分子のMS/MSデータストック作成

顆粒・細胞質各サンプルから細胞内成分とみられるピークが1000本ほど検出できた。その中で、 $m/z112$ のヒスタミンピークは顆粒サンプルのみから検出されたのに対し、 $m/z177$ セロトニンピークは顆粒・細胞質のどちらからも検出された(図4)。さらにそれぞれのサンプル群(顆粒6サンプル、細胞質6サンプル)から検出されたピークについて、t検定による細胞内局在を調べたところ、顆粒特異的ピークは、60本以上、一方で細胞質特異的なピークは40本程見つかった。

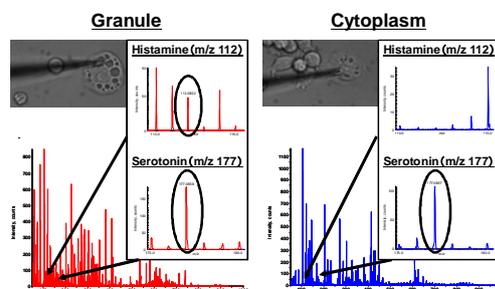


図4 RBL-2H3 1細胞顆粒・細胞質質量スペクトル

さらに今後のRBL-2H3による1細胞質量分析のために、RBL-2H3内に存在する分子(主に代謝物などの低分子化合物)についてMS/MS解析を行い、精密質量とMS/MSフラグメントパターンのデータストックを作成した。またMS/MSができるような感度を稼ぐために、RBL-2H3多細胞抽出液を用いたLC-MS/MSを行った。さらに抽出条件を変えて脂質のみを抽出し、同様にLC-MS/MSによる解析を行い、アミノ酸及び主要なアミノ酸代謝物のほかリン脂質各種についてMS/MSフラグメントの取得及び同定を行った。

(5) 脱顆粒反応における顆粒・細胞質成分の経時的変動分析

RBL-2H3

にカルシウムイオノフォア(A23187)処理し、脱顆粒反応を起こさせた際の変動分子の探索を行った。刺激前の細胞質成分と、刺激後に脱顆粒が観察された細胞の細胞質成分をそれぞれ質量分析し、t 検定を行ったところ、刺激後に増減しているピークがそれぞれ 50 本以上検出された。これら(図5)のピークのうちプロリンやグルタミン酸などのアミノ酸も変動していることがわかった。現在はこれらのピークについて逐次同定を行っている。

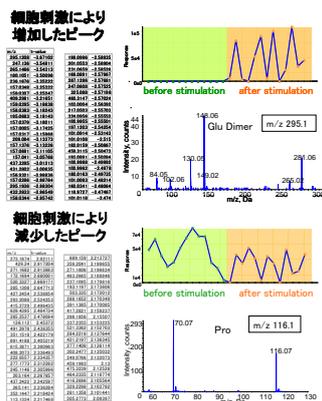


図5 A23187刺激により増減したピーク

(6) 1細胞メタボロミクスの確立

本研究で得られた RBL-2H3 細胞内の分子局在情報を元に、ヒスタミンの生合成経路を調べてみたところ、その前駆体のヒスチジンは顆粒内に多く存在していることから、ヒスチジンからヒスタミンへの生合成は顆粒内で行われていることがわかった。さらに他のヒスチジンやヒスタミン代謝物も顆粒内に局在していることから、これらの代謝経路についても顆粒内に存在していることがわかった。一方でセロトニンについては、その前駆体のトリプトファン・5-OH トリプトファンは細胞質側に存在しているため、セロトニンへの生合成は細胞質側で行われ、その後顆粒内に移行していると考えられる。これらの結果より、1細胞メタボロミクスにより代謝経路の細胞内の局在情報を得ることができるようになった(図6)。

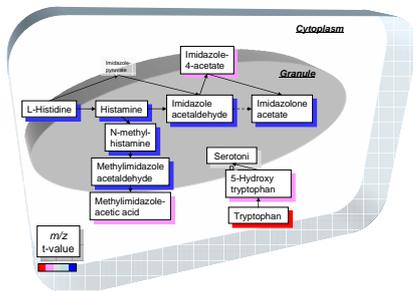


図6 RBL-2H3 1細胞メタボロミクス解析結果

以上の結果から、1細胞内から部位選択的にマイクロサクションし、質量分析による代謝物の検出やその局在情報を得ることができるようになり、「1細胞メタボロミクス」を

確立させることができた。現在は検出される分子の網羅性向上と本方法を用いたさまざまな実験系への適用を試みている。

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5件)

1. Monica T. Lorenzo, Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Takanori Harada, Tsutomu Masujima, “Direct single-cell molecular analysis of plant tissues by video mass spectrometry.”, *Anal. Sci.*, (査読有), 25, 2009, 1053-1055.
2. Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Takanori Harada, Tsutomu Masujima. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification. *J Mass Spectrom.*, (査読有), 43, 2008, 1692-1700.
3. Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Sachiko Date, Takanori Harada, Tsutomu Masujima. Live single-cell metabolomics of tryptophan and histidine metabolites in a rat basophil leukemia cell. *Anal. Sci.*, (査読有), 24, 2008, 1525-1527.
4. Naohiro Tsuyama, Hajime Mizuno, Emi Tokunaga, Tsutomu Masujima. Live single-cell molecular analysis by video-mass spectrometry. *Anal. Sci.*, (査読有), 24, 2008, 559-561.
5. 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*, (査読無し), 37(4), 2008, 410-417.

[学会発表] (計14件)

- ①. 水野 初, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. 1細胞リアルタイムnanoMS分子探索法によるRBL-2H3顆粒内分子動態追跡, 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山大学
- ②. 水野 初. 1細胞ダイレクト質量分析による細胞内小器官メタボロミクス, 8th JST-BIRD Workshop 「MassBankと最新分析科学」, 2010年1月29日, 慶應義塾大学先端生命科学研究所
- ③. 水野 初, 伊達沙智子, 竹島 陽, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. 1細胞薬物代謝

分析, 第 34 回日本医用マススペクトル学会年会, 2009 年 9 月 10 日, 近畿大学本部キャンパス

- ④. 水野 初, 伊達沙智子, 竹島 陽, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. 1 生細胞のダイレクトメタボロミクス, 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, エーザイ川島工園 内藤記念くすり博物館
- ⑤. Hajime Mizuno, Naohiro Tsuyama, Takanori Harada, Tsutomu Masujima, Direct single organelle metabolomics in a live single RBL-2H3 cell by video-mass spectrometry, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, June 3, 2009, Philadelphia, PA, U.S.A.
- ⑥. 水野 初, 伊達沙智子, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. Live Single-cell Metabolomics for Direct Monitoring of Metabolic Pathways, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日, 大阪国際交流センター
- ⑦. 水野 初, 津山尚宏, 星野 彩, 原田隆範, 升島 努. RBL-2H3 一細胞におけるマイクロメタボロミクス解析, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 国立京都国際会館
- ⑧. 水野 初, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. RBL-2H3 細胞におけるインドール類 1 生細胞メタボロミクスの試みフィジカル, ファーマフォーラム 2009, 2009 年 3 月 25 日, 大阪薬科大学
- ⑨. 水野 初, 升島 努. 1 細胞ダイレクト MS によるメタボロミクス, 平成 20 年度広島地区分析技術講演会, 2008 年 2 月 27 日, 広島大学学生会館レセプションホール
- ⑩. 水野 初. ビデオマススコープ法を用いた 1 細胞部位特異的分子解析, 第 3 回明日の質量分析を創る若手討論会, 2008 年 12 月 1 日, 日本化薬(株)伊東保養所
- ⑪. 水野 初, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. 一細胞質量分析による細胞内マイクロメタボロミクス解析, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 11 日, 福岡大学七隈キャンパス
- ⑫. 水野 初, 津山尚宏, 原田隆範, 升島 努. 一細胞質量分析を用いた細胞内部位特異的分子の探索, 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 7 日, 札幌コンベンションセンター
- ⑬. 水野 初, 津山尚宏, 升島 努. ナノスピーレイオン化質量分析法による細胞分子

動態解析, 第 15 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2008 年 5 月 31 日, 静岡県コンベンションアーツセンター

- ⑭. 水野 初, 津山尚宏, 升島 努. ビデオマススコープ法の開発: 1 細胞ダイレクト MS—細胞内小器官, 部位特異性分子探索, 第 69 回分析化学討論会, 2008 年 5 月 16 日, 名古屋国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

1. 升島 努, 津山尚宏, 水野 初, 他 52 名, じほう, 薬品分析科学の最前線, 2009, 185 頁
2. 水野 初, 津山尚宏, 升島 努, 他, メディカルドゥ, メタボロミクス: その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線, 2009, 200 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者
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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし