

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20718

研究課題名（和文）高感度質量分析法の開発に基づく1細胞アミノ酸メタボロミクスへの挑戦

研究課題名（英文）Challenge for the single-cell amino acid metabolomics by developing the highly sensitive mass spectrometric method

研究代表者

古庄 仰（Furusho, Aogu）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：20964943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞1個内の代謝変動を明らかにすべく、誘導体化とナノエレクトロスプレーイオン化-質量分析を組み合わせたアミノ酸の高感度分析法を開発した。細胞1個を採取した微小ガラスキャピラリー内での高効率なアミノ酸誘導体化と、質量分析計での高感度検出を両立する試薬を見出し、単一細胞内アミノ酸の検出に成功した。細胞1個の測定と大量の細胞から調製した抽出液の測定で得られたアミノ酸プロファイルは類似しており、単一細胞レベルでアミノ酸量を評価できることが示された。また、同条件で培養した細胞間で含量が顕著に異なるアミノ酸が認められ、本法を用いることで細胞個々の状態を反映した解析が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、同一の腫瘍組織内でも個々に異なる遺伝子発現や代謝状態を有することが知られている。生命活動の最終産物である代謝物を細胞の個性を考慮しつつ解析することは、病態の詳細な理解や悪性化メカニズムの解明、治療薬の効能評価等に有用である。しかし、単一細胞レベルでの代謝物解析は、感度や選択性の点で技術的課題が存在した。本研究の遂行により、単一細胞内のアミノ酸を高感度に検出して細胞間での差異を捕捉することが可能となった。現在、開発した手法を他の代謝物の分析に展開中であり、将来的に網羅的な代謝物解析を実現することで、がん研究や創薬の推進に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：A sensitive analytical method for the determination of amino acids in a single cancer cell was developed by the combination of derivatization and nano electrospray ionization-mass spectrometry. I found the reagents suitable for the highly efficient derivatization of amino acids in a cell-captured small glass capillary and the sensitive detection in a mass spectrometry, and amino acids in a single cell was successfully detected. The amino acid profile in the cell obtained by the single-cell analysis resembled that obtained by the measurement of an extract from large number of cells. The large differences in amounts of several amino acids were observed between the cells cultured in the same conditions. These results suggested that the developed method enables the amino acid analysis reflected the individual cell condition.

研究分野：分析化学

キーワード：一細胞分析 アミノ酸 メタボロミクス 誘導体化 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、急速な増殖や低酸素下での生存のために正常細胞とは異なる代謝を行うことが知られている。特に、生命活動に必須の化合物であるアミノ酸については、がん細胞で要求量が増加してグルタチオン産生に必要なグルタミンやシステイン等を大量に消費する。近年、がんの悪性化にアミノ酸代謝が関与することが報告され (*Nature* **545**, 500 (2017)、*Nat. Metab.* **2**, 81 (2020) 等)、新たな治療標的の探索を目的としてがん細胞におけるアミノ酸メタボロミクスが注目されている。従来の研究では細胞集団を用いた解析が行われてきたが、短期間で細胞分裂を繰り返し周辺の環境に対して高い応答性を示すがん細胞では、同一の腫瘍組織内でも個々の遺伝子発現や代謝状態が異なる。そのため、単一細胞レベルでのアミノ酸分析に基づく代謝変動や薬物応答の解析が期待された。しかし、代謝物の網羅的な解析に汎用される質量分析では細胞中の超微量アミノ酸を検出することが困難で、一細胞内アミノ酸を高感度に測定可能な分析法の開発が切望されていた。

2. 研究の目的

本研究では、一細胞内アミノ酸の高感度質量分析法を開発し、がん細胞におけるアミノ酸代謝変動を明らかにすることで生体応答・薬剤応答の評価や新たな治療標的の探索に貢献することを目的とした。我々はこれまでに細胞1個内に存在する分子の分析に取り組み、代謝物や投与薬剤の細胞内局在等を明らかにしてきた (*J. Pharm. Biomed. Anal.* **1143318**, 205 (2021))。また、食品試料や生体試料中のアミノ酸について種々の誘導体化試薬を用いる分析法を開発し、微量アミノ酸の精密定量を達成してきた (*Anal. Chem.* **91**, 11569 (2019)、*Chromatography* **41**, 147 (2020) 等)。そこで、細胞1個を捕捉して質量分析に供する手法にアミノ酸の誘導体化を組み合わせることで高感度な一細胞内アミノ酸の分析が実現可能であると考え、新規分析法の開発を行った。

3. 研究の方法

分析法の基盤としてナノエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) ダイレクト質量分析という手法を利用し、これにアミノ酸の誘導体化法を組み合わせた (図1)。この方法では、まず、顕微鏡観察下で導電性の微小ガラスキャピラリーに生細胞1個を採取する。次に、細胞膜の可溶化剤と誘導体化試薬をキャピラリー内に添加して、細胞内アミノ酸の抽出と誘導体化を行う。その後キャピラリーを nanoESI のイオン源として直接質量分析計に接続して測定する。アミノ酸の高感度検出を達成するため、(1) 種々の誘導体化試薬の比較検討と (2) 反応条件および質量分析条件の最適化を行った。さらに、構築した分析法を用いて (3) がん一細胞内アミノ酸の測定を実施した。

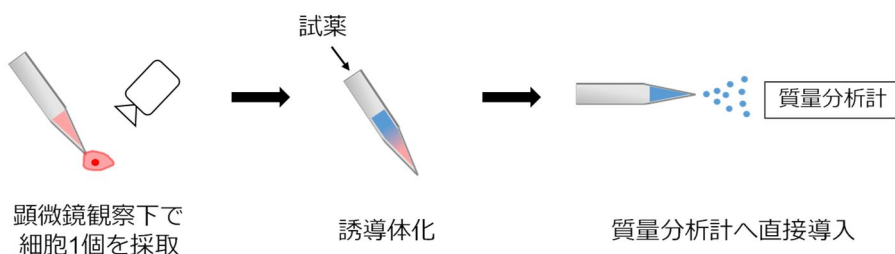


図1 一細胞内アミノ酸高感度質量分析法の概略図

4. 研究成果

(1) 種々の誘導体化試薬の比較検討

生物体内に存在するアミノ酸のうち、ヒトのタンパク質を構成するアミノ酸 20 種をモデルとして誘導体化試薬を比較した。アミノ酸の誘導体化試薬として開発された計 7 種の試薬について、アミノ酸の標準試薬と反応させてガラスキャピラリーに添加し測定した。その結果、いずれの試薬についてもアミノ酸誘導体が質量分析計で検出されたが、その検出強度には数十から数百倍の差が存在した。7 種の試薬のうち、6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate を含む 2 種について特に高い検出強度が得られ、以降の研究に使用する誘導体化試薬として選択した。これらはいずれも質量分析計でのイオン化に適した構造を分子内に有することが知られており、導電性ガラスキャピラリーをイオン源とする本手法でも誘導体が高効率にイオン化され、高感度に検出されることが示された。

(2) 反応条件および質量分析条件の最適化

食品試料や生体試料などの一般的なアミノ酸分析では試料量が比較的豊富であるため、誘導体化反応は容量 1 - 2 mL のポリプロピレン製バイアルで行われる。一方、細胞を採取する導電性ガラスキャピラリーの容量は数十 μ L 程度であり、通常の誘導体化法よりも少ない容量での反応が求められる。また、溶液の混和のために激しい振動を与えることや反応を促進するために加温することが困難であり、反応が十分に進行し、かつ比較的温和な条件の探索が必須であった。使用する溶媒の種類や試薬の濃度、液量、pH、反応温度、反応時間等について詳細に検討した結果、選択した誘導体化試薬 2 種について室温・5 分間で反応が進行する条件を見出した。さらに質量分析計での検出に際して、反応のために添加する塩基の種類と量が検出強度に大きく影響することが明らかとなった。いずれの誘導体化試薬も文献で報告されている反応手順ではホウ酸塩緩衝液が使用されていた。アミノ酸分析で汎用されている液体クロマトグラフィーを用いてアミノ酸を分離する手法では、反応溶液中に含まれる塩基もアミノ酸と分離されて質量分析計に導入されるため、検出には大きく影響しない。しかし、本研究で開発した分析法では反応溶液を直接質量分析計に導入するため、ホウ酸塩緩衝液を使用した反応では共存する塩基の影響を受けて顕著な強度低下が認められた。そこで、反応に使用する塩基として 0.5% トリエチルアミン/アセトニトリル溶液を使用することで、反応の速やかな進行と質量分析計での高感度検出が達成された。

質量分析条件については、アミノ酸誘導体の選択的な検出を目指して質量分析計内で分子を破壊して断片化したイオンを検出するタンデム質量分析の利用を試みた。両試薬から生成される誘導体は、いずれもタンデム質量分析において特徴的なフラグメントイオンを生じることが報告されており、本分析法においても既報と同一のフラグメントイオンを用いた選択的な検出が可能であった。

(3) がん一細胞中アミノ酸の測定

構築した方法を用いてヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を測定し、一細胞分析への適用性を評価した。複数個の細胞について 1 個ずつ採取し測定した結果、各細胞から 8 - 10 種のアミノ酸が検出された。また、ガラスキャピラリー内に一度に採取する細胞の個数を増やして測定した際には、細胞数の増加に伴ってアミノ酸の検出強度が増加する傾向が認められた。さらに、一細胞分析の測定結果と大量の細胞(1.0×10^6 個)から調製した抽出液の測定結果と比較すると、いずれの測定でもグリシンとグルタミン酸が高い強度で検出され、各アミノ酸の存在比率につ

いても類似していた。これらの結果から、一細胞内アミノ酸の検出とその含量評価が可能であることが示された。

HepG2 細胞に加えて、ヒトパーキットリンパ種由来細胞株である Raji 細胞を含む 3 種の細胞株をさらに測定した。全ての細胞種において細胞内のアミノ酸が検出され、様々な細胞試料への適用性が示された。いずれの細胞種についてもアミノ酸のプロファイルは類似しており、特定の細胞種に特徴的なアミノ酸は認められなかった。一方で、同種・同一条件で培養した細胞の間で顕著な含量差を示すアミノ酸が複数存在した(図 2)。これらの含量差は各細胞の代謝状態の差異により生じた可能性があり、本研究で開発した分析法によって細胞の個性を反映した解析が可能であることが示唆された。

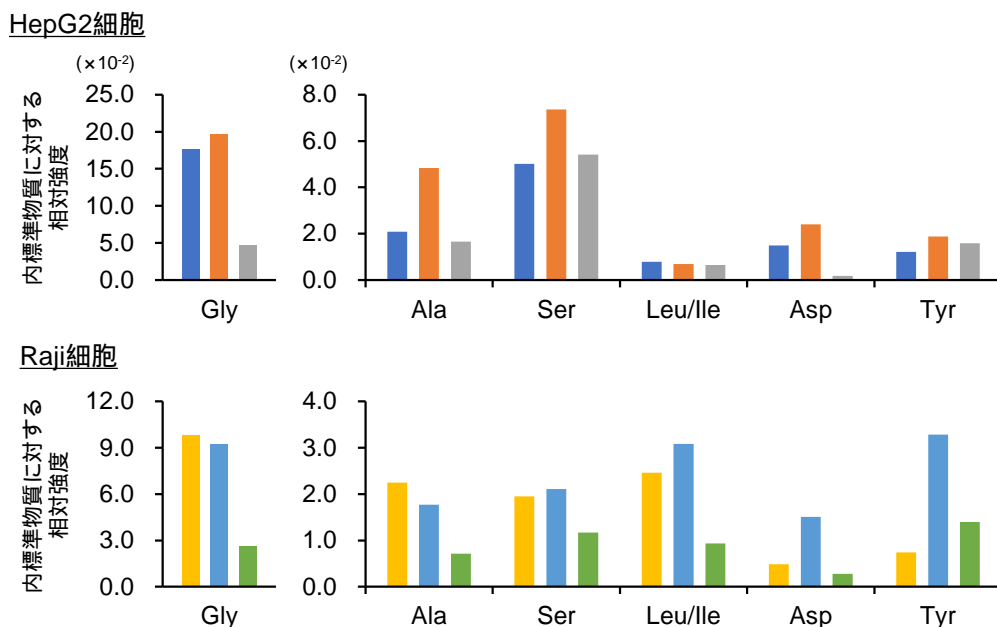


図2 細胞間でのアミノ酸含量の差異
各細胞株について一細胞分析を3回実施。

現在、培養条件の変更や薬剤の投与によるアミノ酸量の変化について、単一細胞レベルでの解析を試みている。これらによって得られる情報、特に細胞間での応答の差異については、特定の細胞が悪性化する現象や耐性を獲得するメカニズムについて新たな知見をもたらすものと考えられる。今後、本研究で開発した分析法をアミノ酸以外の代謝物分析に展開し、代謝物の網羅的な解析によってがん研究の推進に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細島 大輝、山口 侑季乃、西島 公佳、水野 初、古庄 仰、唐川 幸聖、原田 真志、杉山 栄二、岩畑 大悟、轟木 堅一郎
2. 発表標題 1細胞内アミノ酸の高感度質量分析法を用いた細胞間差異の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内 大揮、阪田 晟、加藤 良浩、水野 初、古庄 仰、照井 悠太、高井 浩典、杉山 栄二、轟木 堅一郎
2. 発表標題 1細胞質量分析を用いた細胞内ホスファチジルコリンの薬物誘発性変動の解析
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細島 大輝、山口 侑季乃、西島 公佳、古庄 仰、水野 初、唐川 幸聖、原田 真志、杉山 栄二、岩畑 大悟、轟木 堅一郎
2. 発表標題 誘導体化とnanoESI-MS/MSを組み合わせた単一細胞内アミノ酸の高感度分析法の開発
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北山 美吹、古庄 仰、水野 初、杉山 栄二、轟木 堅一郎
2. 発表標題 微小キャピラリー内誘導体化による一細胞内有機酸の高感度質量分析法の開発
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳澤 拓摩、古庄 仰、杉山 栄二、水野 初、轟木 堅一郎
2. 発表標題 網羅的な1細胞代謝物評価を指向したMS/MS法の開発と実試料への応用
3. 学会等名 第40回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古庄 仰、水野 初、杉山 栄二、轟木 堅一郎
2. 発表標題 1細胞内アミノ酸の誘導体化による高感度質量分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第72年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口 侑季乃、西島 公佳、古庄 仰、水野 初、唐川 幸聖、原田 真志、杉山 栄二、岩畑 大悟、轟木 堅一郎
2. 発表標題 誘導体化による一細胞内アミノ酸の高感度質量分析法の開発と種々の細胞試料への適用
3. 学会等名 第34回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口 侑季乃、西島 公佳、古庄 仰、唐川 幸聖、原田 真志、杉山 栄二、岩畑 大悟、轟木 堅一郎、水野 初
2. 発表標題 キャピラリー内誘導体化による1細胞アミノ酸質量分析の高感度化
3. 学会等名 第43回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古庄 仰、水野 初、杉山栄二、轟木 堅一郎
2. 発表標題 キャピラリー内誘導体化による単一細胞内アミノ酸の高感度質量分析法の開発と一細胞分析への適用
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第13回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口侑季乃、西島公佳、水野 初、古庄 仰、唐川幸聖、原田真志、杉山栄二、岩畑大悟、轟木堅一郎
2. 発表標題 チップ内誘導体化とダイレクトnanoESI-MSを用いた一細胞内アミノ酸の高感度分析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細島大輝、山口侑季乃、西島公佳、古庄 仰、水野 初、唐川幸聖、原田真志、杉山栄二、岩畑大悟、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化による単一細胞内アミノ酸の高感度質量分析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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

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