

1 細胞ショットガンプロテオミクスに資する試料調製法の開発

秦, 康祐

<https://hdl.handle.net/2324/4060016>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

博士論文

1 細胞ショットガンプロテオミクスに資する
試料調製法の開発

2020年3月

九州大学大学院 システム生命科学科
システム生命科学専攻 生命医科学講座
メタボロミクス分野

秦 康祐

目次

略号.....	3
第一章 緒論.....	5
1.1. 1 細胞解析の意義.....	5
1.2. 1 細胞からのタンパク質分析法.....	6
1.3. 1 細胞プロテオミクスの課題.....	7
1.4. 本研究の目的.....	9
第二章 少数細胞を用いたショットガンプロテオーム解析のための試料調製法の 開発.....	11
2.1. 緒言.....	11
2.2. 実験方法.....	13
2.2.1. 試薬および実験材料.....	13
2.2.2. 細胞培養および回収.....	14
2.2.3. 従来法によるプロテオミクス試料調製法.....	14
2.2.4. 固相化トリプシンカラムおよび nano-LC カラムの調製.....	15
2.2.5. In-line sample preparation for efficient cellular proteomics (ISPEC) によるショ ットガンプロテオミクス試料調製法.....	17
2.2.6. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件.....	20
2.2.7. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件 (バルク分析).....	20
2.2.8. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件 (ISPEC).....	21
2.2.9. データ解析.....	22
2.3. 結果と考察.....	22
2.3.1. Nano-LC/MS/MS 分析を使用した ISPEC 法の開発.....	22
2.3.2. サンプル調製法の比較評価.....	25
2.3.3. ISPEC 法による 1, 10, 100 細胞のショットガンプロテオミクス.....	32
2.3.4. 1 細胞由来のタンパク質同定結果に対する妥当性と信頼性評価.....	37

2.4. 小括.....	39
第三章 1 細胞ショットガンプロテオミクスに向けた高感度分析システムの開発....	40
3.1. 緒言.....	40
3.2. 実験方法.....	43
3.2.1. 試薬および実験材料.....	43
3.2.2. 細胞培養および回収.....	43
3.2.3. バルクスケールでのプロテオミクス試料調製法.....	43
3.2.4. ISPEC ver. 2 による試料調製法.....	44
3.2.5. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件.....	47
3.2.6. データ解析.....	48
3.3. 結果と考察.....	48
3.3.1. 半自動細胞サンプリングシステムの開発.....	48
3.3.2. ISPEC ver. 2 の開発.....	50
3.3.3. 活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースの評価.....	52
3.3.4. ISPEC ver. 2 の評価.....	55
3.3.5. 1 細胞由来のタンパク質同定結果に対する妥当性と信頼性評価.....	59
3.3.6. 高感度 1 細胞プロテオーム分析システムの評価.....	61
3.4. 小括.....	64
第四章 総括と展望.....	66
謝辞.....	68
引用文献.....	69
論文目録.....	74
学会発表.....	75
補足資料.....	80
高感度分析システムにより単一 HeLa 細胞から同定したタンパク質.....	80

略号

AFA: adaptive focused acoustics

AGC: automatic gain control

CAN: acetonitrile

CITE-seq: cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing

CSC: cancer stem cell

CTC: circulating tumor cell

CyTOF: cytometry by time of flight mass spectrometry

DDA: data dependent acquisition

DMEM: dulbecco's Modified Eagle's Medium

FA: formic acid

FACS: fluorescence activated cell sorting

FASP: filter-aided sample preparation

FBS: fetal bovine serum

FDR: false discovery rate

GO: gene ontology

HCD: higher energy collisional dissociation

HRMS/MS: high-resolution tandem mass spectrometry

IAA: 2-iodoacetamide

ICP-MS: inductively coupled plasma-mass spectrometry

ISPEC: in-line sample preparation for efficient cellular proteomics

m/z: mass-to-charge ratio

MFC: multiparameter flow cytometry

MI: maximum injection time

nano-LC/MS/MS: nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry

nanoPOTS: nanodroplet processing in one pot for trace samples

NCE: normalized collision energy

NGS: next-generation sequencing

OAD: nanoliter-scale oil-air-droplet

PBS: phosphate buffered salts

PCR: polymerase chain reaction

PEG: polyethylene glycol

PLOT: porous layer open tube

REAP-seq: RNA expression and protein sequencing assay

S/N: signal-to-noise ratio

SDS: sodium dodecyl sulfate

SP3: single-pot solid-phase-enhanced

TCEP: tris (2-carboxyethyl) phosphine

TFA: trifluoroacetic acid

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

第一章 緒論

1.1. 1 細胞解析の意義

生命の最小単位である細胞は特異的な機能を持つ細胞集団に分類することができるが、近年の研究から同一細胞集団であっても多様性を有することが知られている¹。がんにおいては、血液中に存在する循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC)² が転移に、組織中のがん幹細胞 (cancer stem cell, CSC)³ は、治療耐性および薬剤耐性に関連していると考えられている。このような特徴ある細胞は、存在量が僅かであるため、血液や腫瘍組織のバルク分析では CTC や CSC と他のがん細胞との違いを明らかにできない。そのため、単一細胞解析は、がんの転移メカニズムの解明や、新しい治療戦略の開発への応用が期待されている^{4,7}。また現在、国内においては科学技術支援機構が推進する 1 細胞解析に関連するプロジェクトが進行中であり、海外においても Human Cell Atlas Project⁸, Human Biomolecular Atlas Program⁹, Life Time Initiative 等の複数のプロジェクトが進行中であることから、1 細胞研究領域の重要性が伺える。

近年の 1 細胞解析の普及は次世代シーケンシング (next-generation sequencing, NGS) 技術の発展によるものが大きい¹⁰。NGS ベースの技術はポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) による増幅操作とシステムの検出感度およびスループットの向上に成功し、様々な哺乳類細胞タイプの単一細胞ゲノム、エピゲノムおよびトランスクリプトーム分析が可能となった¹¹⁻¹³。その結果、がんに対する新たな知見の獲得に繋がったが¹⁴、がんについてより詳細に理解するためには、プロテオームおよびメタボロームを含めた複数のオミクス間の情報統合が必要である¹⁵。しかし、プロテオームにおいては、PCR による増幅操作が適用できず、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームと比べてより高感度な分析手法が必要であるため、プロテオームの単一細胞分析技術の開発はゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームと比べて遅れているのが現状である。

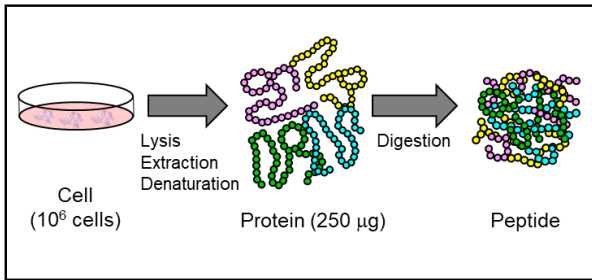
1.2. 1 細胞からのタンパク質分析法

現在、単一細胞レベルでタンパク質を検出するために使用されている方法は、大きくわけて3種類あり、これらの方法は抗体を基盤とした手法である。それぞれの手法の違いは抗体の検出に利用する標識物である。1つ目はマルチパラメータフローサイトメトリー (multiparameter flow cytometry, MFC)¹⁶ と呼ばれる方法であり、抗体の標識に蛍光物質を使用している。レーザーにより蛍光物質を励起し、蛍光強度により目的のタンパク質を検出する。MFCに使用される蛍光色素には波長分布に幅があるため、ある色素の蛍光波長が別の蛍光色素として検出される「蛍光の漏れ込み」の影響により、現在 17 種類¹⁷ が一度の分析で同時測定可能な最大数となっている。2つ目の方法は、マスサイトメトリー (cytometry by time of flight mass cytometry, CyTOF)¹⁸ である。CyTOFは金属安定同位体により標識された抗体を使用し、金属安定同位体の質量 (m/z) を誘導結合プラズマ質量分析 (inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) により検出する。そのため蛍光の漏れ込みの影響がなく MFC と比較して網羅性が高く、一度に測定可能な最大数は約 40 種類¹⁹ となっている。3つ目の方法は RNA expression and protein sequencing assay (REAP-seq)²⁰ と呼ばれる方法である。この方法は DNA バーコードにより抗体を標識するもので、各抗体に特異的な 10 塩基配列の DNA バーコードを使用することにより、100 万種類以上 (4 の 10 乗) のバーコードの作製が可能となる。DNA バーコードは PCR による増幅操作ができるため、理論的には 1 分子の抗体 DNA バーコードタグがあれば検出でき、検出感度の面でもすぐれている。実際に、REAP-seq 法により 1 度に最大 82 種類の細胞表面タンパク質が検出可能となった。以上の抗体を基盤とした3つの方法は血液がんに関する研究や²¹、免疫学研究²²などに広く利用されている。しかし、これら3つの方法による標的タンパク質の検出精度は抗体の品質に強く依存し、また対象となっているタンパク質は表面抗原が中心である。上述の理由により、例えば、がん細胞と正常細胞中の代謝酵素の包括的測定を行うための方法論としては不向きである²³。したがって、発現量の比較的高い細胞内タンパク質を1細胞から包括的に検出する方法論の開発が必要である。

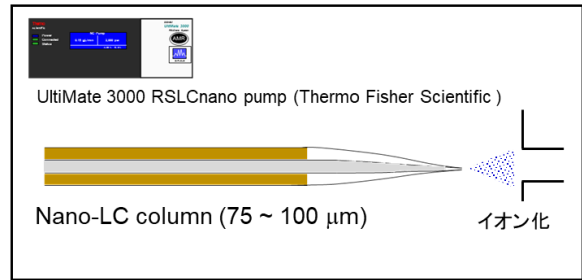
1.3. 1細胞プロテオミクスの課題

ナノフロー液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry, nano-LC/MS/MS) を使用したショットガンプロテオミクスは、タンパク質の網羅的かつ定量的な分析のために開発され、バルクスケールのプロテオミクスにおいて広く利用されている手法である。本手法はタンパク質の消化断片を LC で分離し、MS/MS のフラグメント情報を基に各タンパク質の特異的なペプチド配列を同定し、検索エンジンを活用することでタンパク質の網羅的観測が可能となる。ただし一般的な nano-LC/MS/MS システムを使用し、数千のタンパク質を観測するためには、約 200 ng の消化ペプチド (直径約 20 μm の哺乳類細胞 1000 細胞相当) が必要である²⁴。ショットガンプロテオミクスは大別すると試料調製、nano-LC による分離、質量分析による消化ペプチドの検出および同定の工程からなる (図 1-1)。そのため 1 細胞ショットガンプロテオミクスを可能にするためには、各工程の最適化と高感度化が必要である。各工程の感度向上のためにこれまでにいくつかの技術開発が行われてきた。Nano-LC/MS/MS による分離・検出の工程においては、内径の小さい nano-LC カラムを使用した感度向上が一般的な戦略である。なぜなら MS は濃度依存的な検出器であるため、分析物のカラム内拡散を抑制しカラム内濃度を最大化することが感度向上につながるためである²⁵。具体的には、内径 100 μm 以下のキャピラリーカラムを用いて低流量 (数 100 nL/min) でのクロマト分離を行い、さらにカラム先端で形成される液滴が微小になることで脱溶媒化が促進されイオン化効率が向上することで、高感度分析が達成できる。実際に、カラム内径を 15 μm 以下にダウンサイジングすることで通常のプロテオミクス解析で使用しているカラム内径 75-100 μm と比較して感度が向上することが実験的に示されている²⁶⁻²⁹。

Sample preparation



Chromatography (Nano-LC)



Mass spectrometry

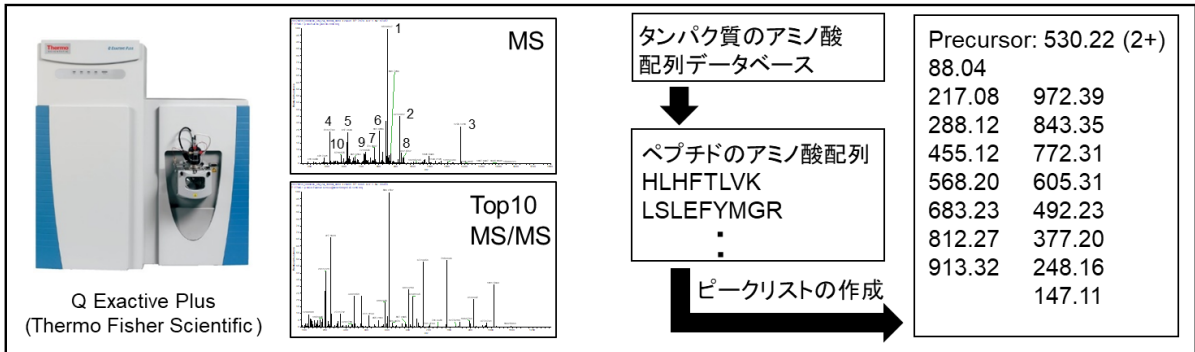


図 1-1. ショットガンプロテオミクスのワークフロー。

MS による検出工程においては、Orbitrap シリーズのような高分解能タンデム質量分析 (high-resolution tandem mass spectrometry, HRMS/MS) の登場や³⁰, より多くのイオンを取り込むためのイオン取り込み口の拡大, イオン透過効率を向上させるイオンオンファンネルの開発^{31,32}, イオン移動度分光法のような新たな分離モードの追加³³ によってショットガンプロテオミクスの網羅性向上に大きく貢献している。これらの技術開発の結果, nano-LC/MS/MS ベースの高感度プロテオーム分析により, 0.5 ng の消化ペプチド (HeLa 細胞 1-2 細胞相当) からでも約 1000 タンパク質の同定が可能となった³⁴。このことから試料調製時の損失を最小限にすることができれば, 高感度 nano-LC/MS/MS 分析により 1 細胞から多くのタンパク質の情報が取得できると考えられる。従来のプロテオームサンプル調製法では, 多数の哺乳動物細胞 (> 1×10⁵ 細胞) を使用し, タンパク質変性, 可溶化, ジスルフィド結合の還元, 遊離システイン残基のアルキル化, 精製, タンパク質の酵素消化, 脱塩処理のような複数のサンプル処理ステップが必要である。これらの多段階の試料調製工程におけるバッファー交換

および、反応容器への試料吸着等の影響により、タンパク質および消化されたペプチドのサンプル損失を引き起こすことが知られている³⁵。特に、測定対象となる細胞数が少なくなればなるほどその影響が顕著になる。そのため1細胞ショットガンプロテオミクスを実現するためには、試料調製中の試料損失をいかに低減するかが鍵となる。

また1細胞ショットガンプロテオミクスとバルクスケールでのショットガンプロテオミクスで異なる点は、不均一な細胞集団から目的の細胞を迅速かつ正確に単離する必要がある点である(図1-2)。このように1細胞ショットガンプロテオミクスを成功させるためには、不均一な細胞集団から目的の細胞を迅速に単離し、試料損失を最小限に抑制した試料調製法の開発が重要であると考えられる。

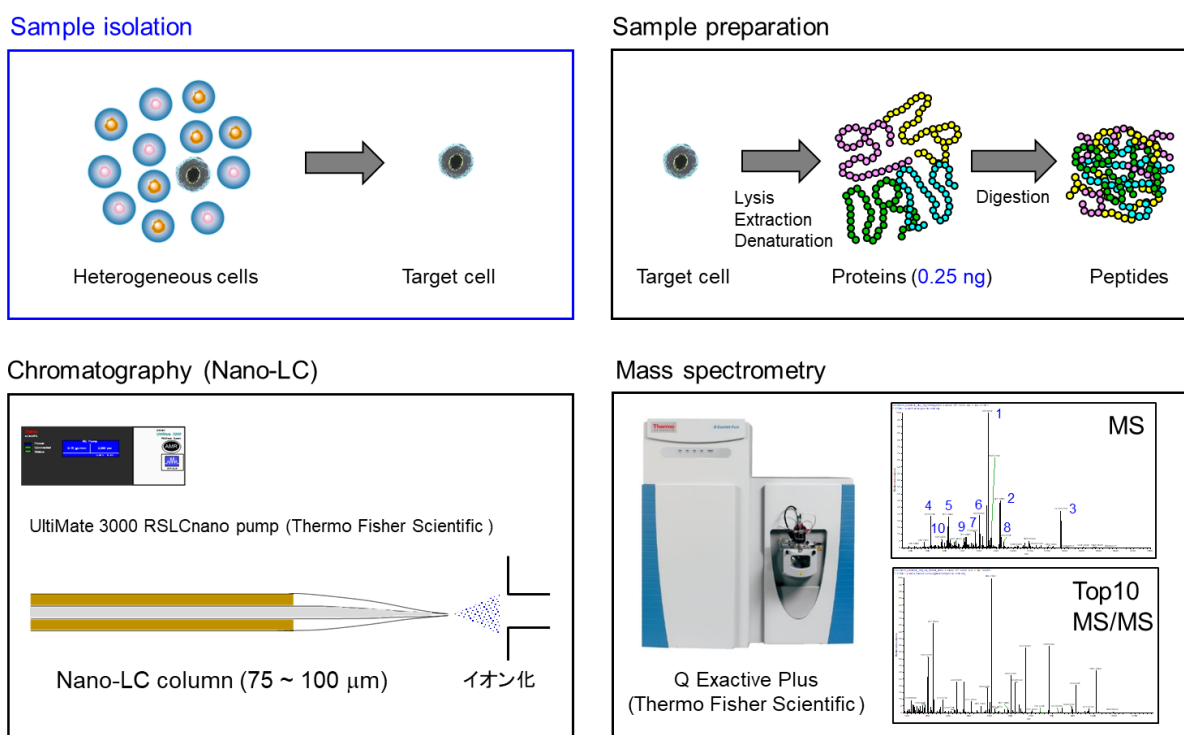


図 1-2. 1細胞ショットガンプロテオミクスのワークフロー。

1.4. 本研究の目的

本研究では1細胞ショットガンプロテオミクスを実現するために、細胞集団の中から観測対象とする細胞を迅速かつ正確に採取し、試料損失を低減したショットガン

ロテオミクス試料調製法の開発に取り組んだ。さらに、より多くのタンパク質を同定するために 1 細胞ショットガンプロテオミクスに資する分析システムの高感度化についても検討した。まず第二章では、ターゲット細胞の回収と試料調製が統合された新たなサンプル調製法を開発し、その性能を子宮頸がん細胞株 (HeLa 細胞) を用いて評価した。第三章では、第二章で提案した単一細胞サンプリングシステムと試料調製法の高度化を図るとともに nano-LC/MS/MS の高感度化を検討することで高感度の 1 細胞プロテオーム分析システムの開発を行った。最終的に HeLa 細胞を用いて、1 細胞からプロテオーム情報を取得することで当該分析システムの実用性を評価した。

第二章 少数細胞を用いたショットガンプロテオーム解析のための試料調製法の開発

2.1. 緒言

1 細胞ショットガンプロテオミクスにおける課題は、サンプル調製時における試料損失およびターゲット細胞の回収とサンプル調製工程の連動性である。第1の課題である試料調製時における試料損失を低減するために、これまで大きく分けて2つの方法論が開発されてきた。最初のアプローチは、単一容器内でサンプル調製を行うことにより、容器の移し替え時に発生する試料吸着や損失を低減する方法である。Wiśniewskiらは限外ろ過フィルターを用いた前処理方法 (filter-aided sample preparation, FASP) を報告している³⁶。FASP法はドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) で可溶化した試料溶液を消化前に尿素溶液に置換できるため、SDSによるタンパク質の強力な可溶化を可能とし、SDS存在下で悪影響をおよぼす酵素消化とそれに続く nano-LC/MS/MS 分析の前に SDS を除去することができる方法である。さらに、少数細胞由来のタンパク質あるいはペプチド (典型的な哺乳動物細胞 1000-10000 細胞相当の総タンパク質 1 µg 以下) の回収率を向上させるために、キャリアー物質としてポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) やデキストランなどを試料に加えることにより、試料吸着を低減させた。その結果、FASP法と nano-LC/MS/MS を使用して、1000個の HeLa 細胞 (総タンパク質, 200 ng) から平均 1500個のタンパク質が同定された。別の単一容器内での調製方法として、常磁性ビーズを使用した方法がある。これは、Hughesらによって報告された single-pot solid-phase-enhanced sample preparation (SP3) と呼ばれる方法である³⁷。SP3法は、親水性相互作用クロマトグラフィーと同様のメカニズムで、タンパク質とペプチドをカルボン酸で被覆された常磁性ビーズの親水性表面に結合させることにより、バッファー交換時の試料損失を回避する手法である。Virant-Klunらは SP3 および nano-LC/MS/MS を使用して、単一のヒ

ト卵母細胞から 450 個のタンパク質を同定した (総タンパク質, 100 ng)³⁸. また単一容器内でサンプル調製を行う別の方法として Li らにより提案された Adaptive Focused Acoustics (AFA) がある. AFA 法は一般的なソニケーターとは異なる波長域および周波数を用い, ディッシュ状のトランスデューサーより発生させた超音波を一極に集中させて照射する. 発生させる超音波を制御することにより, 細胞を再現性よく強力に破碎する方法である. AFA と多孔質層オープンチューブ (PLOT) カラム (カラム内径 10 μm , カラム長 4 m) を使用した nano-LC/MS/MS 分析法によって, 50 個の MCF-7 細胞 (総タンパク質, 5 ng) から 1802 個のタンパク質の同定に成功している³⁹.

微量細胞からの試料損失を低減させた 2 つめのアプローチは, nanodroplet processing in one pot for trace samples (nanoPOTS)⁴⁰ および nanoliter-scale oil-air-droplet (OAD)⁴¹ と呼ばれるナノリットルスケールでの液滴ベースのサンプル調製法である. これらの方法は, サンプル処理量をナノリットルスケール (<550 nL) にまで減らすことにより, 試料と容器との接触面積を最小化することで試料吸着を低減する方法である. この方法を用いることで HeLa 1 細胞からのタンパク質同定に成功したが^{41, 42}, 後述の 3 つの点においてまだ改善する必要がある. 1 つ目は, ターゲット細胞の回収とその後の試料調製が連続して行えない点である. これら 2 つの作業工程の統合はスループットと試料損失の改善につながると考えられる. 2 つ目は, さらなる作業工程の簡略化である. nanoPOTS 及び, OAD はいずれも 6 つのサンプル調製工程からなっているが, さらなる作業工程の簡略化により, 試料損失の改善が可能であると考えられる. 3 つ目はタンパク質のペプチドへの消化効率の改善である. ショットガンプロテオミクスはインタクトなタンパク質を分離・検出するのではなく, タンパク質をペプチドに酵素消化して得られたペプチド断片を分離・検出する手法である. そのため消化効率が悪いと, イオン化効率の悪い長鎖のペプチド断片が生じ, ペプチドの同定数低下とともに, 最終的にタンパク質同定数の減少につながる⁴³. また消化効率が悪いと, 分析毎で同定されるペプチドの種類およびそれらのピーク面積値が異なり再現性および定量性の低下につながる. そのため消化効率の改善は, ショットガンプロテオミクス

の試料調製において重要となる⁴⁴。そこで本章では、上記の試料調製工程における試料損失の低減、およびタンパク質消化効率の向上という2つの課題に取り組むために、固相化トリプシンを用いた微小空間内でのインライン処理による新たなサンプル調製法の開発を行った。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試薬および実験材料

重炭酸アンモニウムと Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS), トリプシン-EDTA 溶液 (0.25%トリプシン, 1 mM EDTA), 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), トリス (2-カルボキシエチル) - ホスフィン塩酸塩 (tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP), トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA), および Poroszyme™ Immobilized Trypsin (ビーズサイズ, 20 μm, ポアサイズ, 500-10000 Å) は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から入手した。ヨードアセトアミド (2-iodoacetamide, IAA), アセトン, LC-MS グレードのアセトニトリル (acetonitrile, ACN), ギ酸 (formic acid, FA), およびホルムアミドは、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から入手した。PlusOne™ 試薬, 尿素, トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris), および SDS は GE Healthcare (Chicago, IL, USA) から購入した。Recombinant trypsin は、Richcore Enzymes Pvt (Kamataka, India) から入手した。Benzonase は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した。Kasil 1 potassium silicate solution は PQ Co. (Valley Forge, PA, USA) から購入した。使用したすべてのフューズドシリカキャピラリーチューブは、Polymicro Technologies Inc. (Phoenix, AZ, USA) から入手した。L-column2 ODS (粒子径, 3 μm, 細孔径, 120Å) は CERI (埼玉) から入手した。

2.2.2. 細胞培養および回収

本実験で使用した HeLa 細胞 (ATCC) は、10% (v/v) FBS および抗生物質を加えた DMEM 10 mL を含む直径 10 cm ディッシュを用いて 37 °C、5% CO₂ の環境下で培養した。培養した HeLa 細胞はセミコンフルエントの状態、トリプシン-EDTA 溶液で処理することにより、ディッシュから剥離した。トリプシン-EDTA 処理した HeLa 細胞を 15 mL ファルコンチューブに集め、240 ×g、4 °C の条件でスイング型ローターにより 5 分間遠心分離後上清を除去した。得られた細胞ペレットを 10 mL の PBS で 3 回洗浄した後、洗浄した細胞ペレットを PBS に再懸濁した。細胞数をセルカウンター (Moxi Z, ASONE Co., 大阪) を使用してカウントした後、指定数の細胞 (1 × 10³ 細胞または 1 × 10⁶ 細胞) を 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに移した。

2.2.3. 従来方法によるプロテオミクス試料調製法

ショットガンプロテオミクスのための従来の試料調製法は以前に報告されている方法²³を参考にし、一部改変することで実施した。この試料調製法 1 は単一チューブ内でタンパク質変性、可溶化、ジスルフィド結合の還元、遊離システイン残基のアルキル化、精製、タンパク質の酵素消化を行う方法であり、以下にその手順を示す。始めに 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに HeLa 細胞 (1 × 10⁶ 細胞) を回収し、Benzonase (250 U)、2% SDS、7 M 尿素を含む 100 μL の 100 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.8) で溶解した。細胞溶解液は Bioruptor (Diagenode, Philadelphia, PA, USA) を使用して超音波処理し (30 秒間、3 回、インターバル 30 秒間)、ヒートブロック上で 90 °C、10 分間インキュベート後、100 μL の水を添加し、再度超音波処理した。次に 5 μL の TCEP (100 mM) を加え、37 °C で 30 分間インキュベートし、その後 5 μL の IAA (500 mM) をサンプルに加え、室温で 30 分間インキュベートした。タンパク質を沈殿させるために、-30 °C に冷却した 600 μL のアセトンにサンプルを加え、-30 °C で 2 時間静置した。サンプルを 19000 ×g、4 °C の条件で 20 分間遠心分離した後、上清を除去し、1 mL の 90%アセトン (-30 °C に冷却された) を加えた。タンパク質をボルテックスで

懸濁した後、Bioruptor を使用して超音波処理した (30 秒間, 3 回, インターバル 30 秒間). サンプルを, 2000 ×g, 4 °C の条件でスイング型ローターにより 15 分間遠心分離することにより, 沈殿物をエッペンチューブの底部分に集め, その後 19000 ×g, 4 °C の条件で 20 分間遠心分離し上清を完全に除去した. ペレットを 100 mM 重炭酸アンモニウム 98 μL に溶解し, 超音波処理を行った. 1 μL のトリプシン溶液 (1 mg/mL) を加え, 37 °C で 3 時間インキュベートした. その後さらに 1 μL のトリプシン溶液 (1 mg/mL) を添加し, 37 °C で一晩インキュベートした. サンプルは, 分析まで-80 °C で保存した.

試料調製法 2 は単一チューブ内でタンパク質変性, 可溶化, タンパク質の酵素消化を行う方法である. 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに回収された HeLa 細胞 (1×10^3 細胞) を Benzonase (250 U), 2 M 尿素を含む 5 μL の 100 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.8) で溶解した. 次に Bioruptor を使用して超音波処理し (30 秒間, 3 回, インターバル 30 秒間), ヒートブロック上で 90 °C, 10 分間インキュベート後, 5 μL の水を添加し, 再度超音波処理を行った. 1 μL のトリプシン溶液 (50 μg/mL) を加え, 37 °C で 3 時間インキュベートした. その後さらに 1 μL のトリプシン溶液 (50 μg/mL) を添加し, 37 °C で一晩インキュベートした. サンプルは, 分析まで-80 °C で保存した.

2.2.4. 固相化トリプシンカラムおよび nano-LC カラムの調製

固相化トリプシンカラムは下記の通り調製した. 固相化トリプシンをフューズドシリカキャピラリー (内径 100 μm または 200 μm, 外径 360 μm, 長さ 12 cm) 内に充填するために, フューズドシリカキャピラリーの片端にフリットを以前に報告されている方法⁴⁵を一部改変して調製した. 200 μL の Kasil 1 potassium silicate solution と 20 μL の Formamide を 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブ内で 2 分間ボルテックスにより混合した液を毛細管現象によりフューズドシリカキャピラリーチューブの先端から約 10 mm の位置まで充填した. その後, 高速昇温電気炉 (SK-2535E-SP, 株式会社モトヤマ, 大阪) にて重合した. 加熱条件は以下の通りである. 内径 100 μm; 24-100 °C,

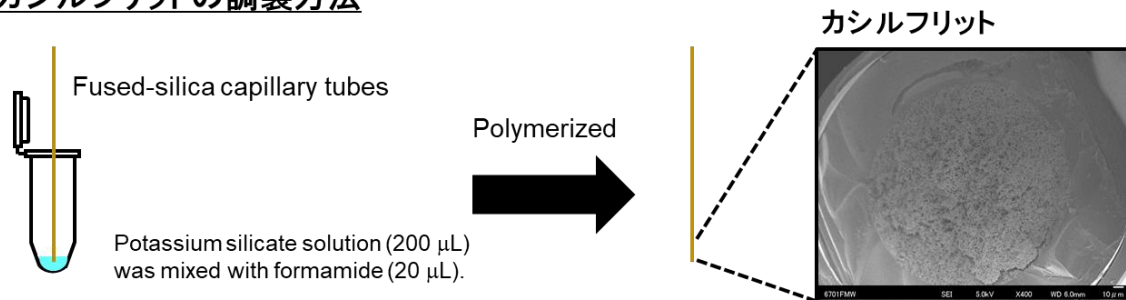
0–6 h; 100–40 °C, 6–7 h, 内径 200 μm ; 24–100 °C, 0–6 h; 100 °C, 6–7 h; 100–40 °C, 7–8 h. フリット部位は固定化トリプシンを充填する前に 2 mm 長にカットすることで調整した.

固相化トリプシンビーズの充填は以前に報告されている方法により行った⁴⁶. 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブ内で 50 μL の Poroszyme™ Immobilized Trypsin と 950 μL の PBS を混合し, 19000 $\times g$, 4 °C の条件で 5 分間遠心分離した後, 上清を除去し, 1 mL の PBS に再懸濁し充填溶液とした. カラム充填器 (日京テクノス, 東京) を用いて, フリットが調製されたキャピラリーチューブ内に窒素ボンベにより 5 MPa 程度の圧力を利用することで, トリプシンビーズを 10 cm の長さまで充填した (図 2-1). キャピラリーを充填器から取り外し, HPLC ポンプ (LC-20AB, 株式会社島津製作所, 京都) に接続して, 水で 10 分間洗浄後, セラミックカッターを用いて使用する長さに調整した.

スプレイヤーチップ一体型 nano-LC カラムは, 以前に報告された方法に従い作製した⁴⁷. 内径 100 μm あるいは 200 μm , 外径 360 μm のフューズドシリカキャピラリーをガスバナーで加熱することでキャピラリー表面のポリイミドコーティングを剥がした. 次に, フューズドシリカキャピラリーのコーティングを剥離させシリカが剥き出しとなった箇所に対して CO₂ レーザーを基盤としたキャピラリープレー (P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) により微細加工処理することで先端径が 7–9 μm のナノフローLC用のスプレイヤーチップを作製した. Double-plunger micro pump (KP-22-01A, 株式会社フロム, 東京) に接続した Nanobaume SP-400 column packer system (Western Fluids Engineering, Wildomar, CA, USA) を用いて上述の通り作製したスプレイヤーチップ内に粒子径 3 μm の C18 担体 (L-column2 ODS) を充填した. 充填剤をメタノールで懸濁させた懸濁液 (1 mg/mL) で満たした 1.5 mL 容のガラスバイアルを, 液体加圧カラムローダーセルにセットし, ポンプの送液によりセル内を加圧することにより粒子の充填を行った. 調製されたカラムの仕様は (1) 内径 100 μm , 外径 360 μm , 長さ 100 mm, 及び (2) 内径 200 μm , 外径 360 μm , 長さ 100 mm, の 2

種類である。

カシルフリットの調製方法



固相化トリプシンカラムの充填方法

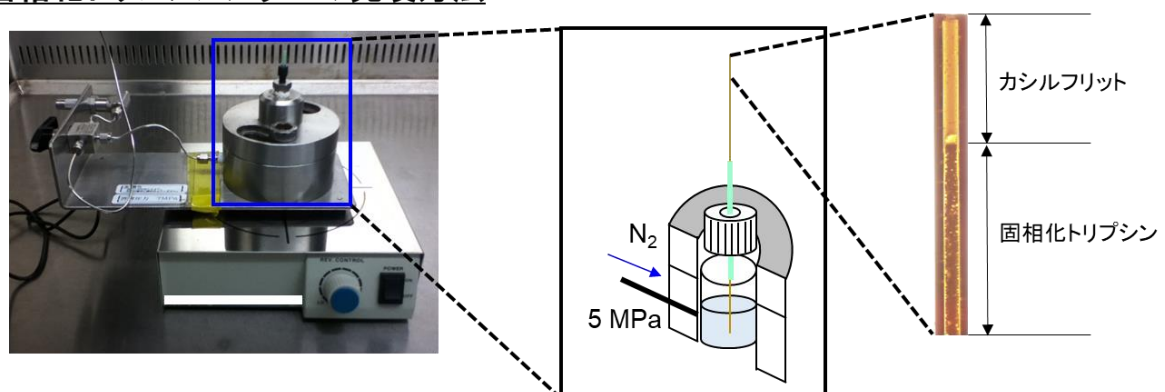


図 2-1. 固相化トリプシンカラムの調製方法。

2.2.5. In-line sample preparation for efficient cellular proteomics (ISPEC) によるショットガンプロテオミクス試料調製法

試料調製法 3 は細胞回収操作からタンパク質変性、可溶化、酵素消化および分析カラムへのロードまでをフューズドシリカキャピラリーを用いてインラインで行う方法である。In-line sample preparation for efficient cellular proteomics (ISPEC) を行うために、細胞サンプリングシステムを作製した。この細胞サンプリングシステムは、倒立顕微鏡 (IX73, Olympus, 東京), カラーCCDカメラ (DP73, Olympus), マイクロマニピュレーター (TransferMan 4r, Eppendorf Inc., Hamburg, Germany), およびナノシリンジポンプ (日京テクノス) を組み合わせて構成した (図 2-2)。ISPEC による作業では、HeLa 細胞を PBS に懸濁し 200 cells/ μ L および 2000 cells/ μ L の細胞懸濁液を調製し、細胞溶解バッファーとして Benzonase (250 U), 2 M 尿素を含む 100 mM Tris-HCl

溶液 (pH 8.8) を用いた. 細胞サンプリングキャピラリー (内径 200 μm , 外径 360 μm , 長さ 12 cm) を, フィンガータイトフィッティングユニオン (F3U3-5, ヨダカ技研株式会社, 神奈川) を介してナノシリンジポンプに接続した. 調製した HeLa 細胞懸濁液 (2 μL) をガラスプレートに滴下し, 同量の細胞溶解バッファーを同じガラスプレートの別の位置に滴下した. 続いて, 細胞サンプリングシステムを使用し, 細胞溶解バッファーと HeLa 細胞懸濁液を次のように細胞サンプリングキャピラリー内に連続して吸引した: (A) エアギャップ; 500 nL, (B) 細胞溶解バッファー; 2 μL , (C) エアギャップ; 500 nL, (D) HeLa 細胞懸濁液; 1 細胞で約 5 nL (200 cells/ μL), 10 細胞で約 50 nL (200 cells/ μL), 100 細胞で 50 nL (2000 cells/ μL), 1000 細胞で 500 nL (2000 cells/ μL), ネガティブコントロールとして, 細胞懸濁液の上清のみを 50 nL, (E) エアギャップ; 500 nL. 細胞サンプリングキャピラリー内に回収された細胞数は, カラー CCD カメラを備えた顕微鏡を使用して決定した. 次に, 細胞サンプリングキャピラリーを固定化トリプシンカラム (内径 200 μm , 外径 360 μm , 長さ 7 cm), および nano-LC カラム (内径 100 μm , 外径 360 μm , 長さ 20 cm) に 2 つの PicoClear ユニオン (New Objective, Woburn, MA, USA) を用いて接続した. ナノシリンジポンプを用いて低流量で超純水を送液することにより, キャピラリー内に回収された細胞と, 溶解バッファーを混合でき, タンパク質を変性させた. その後, 変性したタンパク質が固相化トリプシンと相互作用することにより, タンパク質の消化が行われた. 酵素消化により得られたペプチドを含む溶液は, 最終的に nano-LC カラムに注入した. 細胞溶解液が固相化トリプシンカラムに到達するまでは流量 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液し, 細胞溶解液がトリプシンカラムに到達した後は流量を 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ に変更し 1 時間送液した. サンプルが注入された nano-LC カラムを Dionex Ultimate 3000 nano-RSLC pump (Thermo Fisher Scientific) に接続し, 初期濃度の移動相 (移動相 A: 95%, 移動相 B: 5%) で 250 nL/min の流量で 30 分間送液することにより脱塩を行った. 移動相 A には 0.1% (v/v) の FA を添加した水を使用し, 移動相 B には 0.1% (v/v) の FA を添加したアセトニトリルを使用した.

ISPEC を用いた試料調製法 3 のサンプル損失をさらに改善するために, 使用するキ

キャピラリーの内径および長さの最適化を行い、これを試料調製法 4 とする。先述した細胞サンプリングシステムを使用して、HeLa 細胞懸濁液と細胞溶解バッファーを細胞サンプリングキャピラリー (内径 100 μm , 外径 360 μm , 長さ 12 cm) 内に次のように連続して吸引した : (A) 細胞溶解液; 200 nL, (B) エアギャップ; 50 nL, (C) HeLa 細胞懸濁液; 1 細胞で約 5 nL (200 cells/ μL), 10 細胞で約 50 nL (200 cells/ μL), (D) エアギャップ; 200 nL. 次に細胞サンプリングキャピラリー, 固定化トリプシンカラム (内径 100 μm , 外径 360 μm , 長さ 6 cm), および nano-LC カラム (内径 100 μm , 外径 360 μm , 長さ 10 cm) を 2 つの PicoClear ユニオンを用いて, 連続的に接続した (図 2-3). 他のサンプル調製条件は試料調製法 3 と同じである. また, 分析間でのクロスコンタミネーションを回避するために, 固相化トリプシンカラムと nano-LC カラムを分析毎に新しいものと交換した.

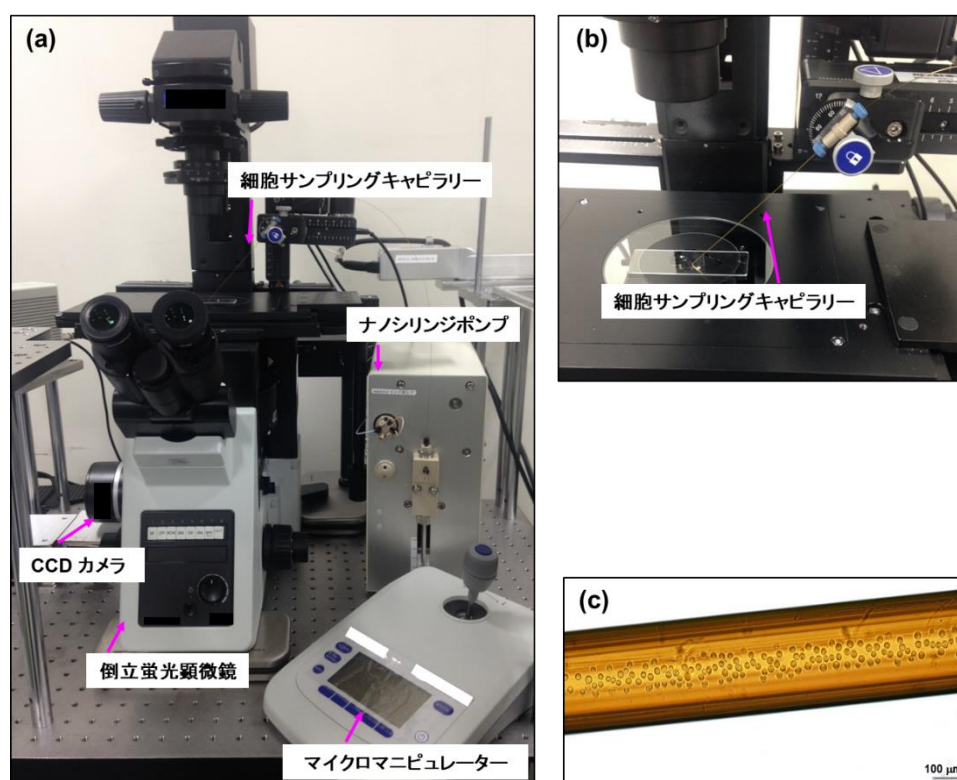


図 2-2. 細胞サンプリングシステム.

(a) 細胞サンプリングシステム. (b) 細胞サンプリングキャピラリー周辺の拡大図.

(c) 細胞回収キャピラリー内での細胞サンプリングの様子.

2.2.6. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件

Nano-LC/HRMS/MS 分析システムは、Dionex Ultimate 3000 nano-RSLC pump, nano-LC interface (AMR Inc, 東京), active background ion reduction device (AMR Inc) と Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) から構成している。Nano-LC システムはバイナリー高圧グラジエント送液ユニット, カラムオーブン (AMR Inc), および HTC-PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) を組み合わせて測定に用いた。Nano-LC システムは Chromeleon software ver. 6.80 (SR15, Build 4546) および Cycle Composer software ver. 1.6.0 (CTC Analytics, AG) により制御し, MS システムは Xcalibur software ver. 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific) により制御した。

2.2.7. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件 (バルク分析)

サンプルのトラップと脱塩のために L-column2 ODS (内径 300 μm , 長さ 5 mm) プレカラムを使用した。プレカラムへのサンプルの注入は 25 μL シリンジを使用して, 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で water/ACN/TFA (98:2:0.1 v/v/v) 溶液を, 脱塩用溶媒として用いて行った。

試料調製法 1 により 1×10^6 個の HeLa 細胞から調製された消化ペプチド試料の場合, 100 μL の試料液を 900 μL の 0.1%FA で希釈した後, 1 μL (1000 細胞相当) を注入した。試料調製法 2 の場合は, 1×10^3 個の HeLa 細胞から調製された消化ペプチドサンプル (12 μL) を全量インジェクションした。次にカラムにトラップされたサンプルはバルブ切り替えによりオンラインで, 分析カラム (内径 100 μm , 長さ 200 mm, L-column2 ODS, 粒子径 3 μm) に注入した。移動相 A には 0.1% (v/v) の FA を添加した超純水を使用し, 移動相 B には 0.1% (v/v) の FA を添加したアセトニトリルを使用した。流量は 250 nL/min に設定し, カラムオーブン温度は 42°C で一定に保った。グラジエント条件は, (1) B 液 5–30% (0-90 分), (2) B 液 30–90% (90-91 分), (3) B 液 90% (91-100 分) で移動相組成の経時的変化を行った後, 初期状態 (B 液 5%) に戻し 19 分間カラムの平衡化を行った。質量分析計を用いたプリカーサーイオンのフルスキャン

の分析条件を以下に示す。分析は正イオンモードで実施し、スプレー印加電圧は 1.7 kV に設定した。キャピラリー温度は 275 °C, ヒーター温度は 350 °C, S レンズレベルは 50 に設定した。質量分解能は 70000 に設定した。C-Trap に溜めるイオン量を制御するパラメータである Automatic gain control (AGC) target は 1000000, Maximum injection time (MI) は 60 ミリ秒に設定した。スキャン幅は m/z 350–1800 に設定した。データ依存の MS/MS スペクトル (data dependent MS/MS, dd-MS/MS) は、MS スペクトル中で強度が高い順に 10 個のプリカーサーイオンに対して、データ依存的に MS/MS スペクトルを取得した。MS/MS スペクトルは HCD (higher energy collisional dissociation) にて選択したプリカーサーイオンを開裂させることで取得した。同一イオンに対する MS/MS スキャンを回避するために、既にスキャンされたイオンは 30 秒間 MS/MS スキャンの対象から除外するように設定した。dd-MS/MS 条件は次の通りである。質量分解能を 17500 に設定した。AGC target を 200000, MI を 240 ミリ秒にそれぞれ設定した。分離ウィンドウを 1.6 Da, NCE (stepped normalized collision energy) を 25 eV, イオン選択下限値を 42000, 除外荷電状態を 1 価および 5 価以上, スキャン幅を m/z 200–2000 にそれぞれ設定した。

2.2.8. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件 (ISPEC)

ISPEC によって調製されたサンプルを注入した nano-LC カラムを nano-LC/MSMS システムに接続した。ISPEC (試料調製法 3) で調製した試料を分析する際のグラジエントはバルク分析と同様の条件で実施した。試料調製法 4 で調製した試料を分析する際のグラジエント条件は次のとおりである：(1) B 液 5–40% (0-40 分), (2) B 液 40–90% (40-41 分), (3) B 液 90% (41-45 分) の条件でグラジエント溶出を行った後、初期状態 (B 液 5%) に戻し 13 分間カラムの平衡化を行った。他の nano-LC/MS/MS 測定条件はバルク分析と同様のパラメータで実施した。

2.2.9. データ解析

HRMS と HRMS/MS スペクトルに基づくペプチドおよびタンパク質の同定のためのデータ解析は、Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。検索エンジンとして MASCOT (ver. 2.6.0, Matrix Science, London, UK) を使用し、データベースは IPIhuman (IPI.HUMAN.v.3.87) を用いた。ペプチド同定の誤同定率 (false discovery rate, FDR) を評価するために、対応するリバーデータベースに対する検索も実施した。データベース検索条件は以下の通りに設定した。プリカーサーイオンの質量誤差は 10 ppm, フラグメントイオンの質量誤差は 0.02 Da に設定した。消化酵素にトリプシンを選択し、ミス切断の許容数は最大 2 箇所とした。Static modification にシステインのカルバミドメチル化, Dynamic modification としてメチオニンの酸化, N 末端アセチル化及びグルタミンのピログルタミン酸への変換を設定した。Mascot スコアが 99% confidence よりも高いペプチドおよび 6 残基以上, MASCOT イオンスコア 25 以上のペプチドが 1 つ以上帰属されたタンパク質をその後の解析に使用した。最後に各データから細胞懸濁液の上清 (ブランク) の分析から同定されたペプチド, タンパク質を細胞内試料で得られた結果から除外した。遺伝子オントロジー (gene ontology, GO) 分析は, IPIhuman データベース (IPI.HUMAN.v.3.87) の情報を iMPAQT-knowledge database¹⁰ を使用して分類した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. Nano-LC/MS/MS 分析を使用した ISPEC 法の開発

第二章での研究目的は, 1 細胞ショットガンプロテオミクスに向けた試料調製プロセス中のサンプル損失の低減 (課題 1), タンパク質消化効率の向上 (課題 2) である。課題 1 の試料調製プロセス中のサンプル損失を低減するために, ターゲット細胞の迅速な回収とそれに続く試料調製プロセスの連動および試料調製プロセスの簡略化を行った。細胞回収と試料調製を連動させるために, フェーズドシリカキャピラリーを基盤としたインラインサンプル調製法を考案した。フェーズドシリカキャピラリーを

使用する利点は、(1) 市販されている内径サイズのラインナップが豊富であるため、ターゲット細胞のサイズおよび試薬量に合わせてキャピラリーの内径変更が容易に実施できること、(2) エッペンチューブを使用した従来のチューブ内での調製法と比較してフューズドシリカキャピラリーはより微少な空間での処理が可能であり、試料の接触面積の減少による試料吸着の低減が期待できること、(3) 安価かつ柔軟な構造を有しているため、操作性に優れていることである。まず細胞の回収と試料調製を連続して行うために、倒立顕微鏡、カラーCCDカメラ、マイクロマニピュレーター、ナノシリンジポンプから構成される細胞サンプリングシステムを開発した (図 2-2)。このシステムでは、細胞回収用のフューズドシリカキャピラリー (以降は細胞サンプリングキャピラリーと呼ぶ) をナノシリンジポンプに接続することにより、ターゲット細胞と変性剤を含んだ細胞溶解液を細胞サンプリングキャピラリー内に吸引することが可能となり、細胞回収、可溶化、タンパク質抽出、変性までの処理を連続して行うことができる。変性剤は脱塩処理時に容易に除去が可能である尿素を使用した。また使用する尿素の濃度はトリプシン活性を阻害しないように 2 M に設定した⁴⁸。次にタンパク質からペプチドへの効率的な消化を行うために、固相化トリプシン粒子充填型カラム (以降は固相化トリプシンカラムと呼ぶ) を使用した (2.2.4 項参照)。従来法で使用されている溶液トリプシンは、自己消化を避けるために低濃度 (酵素:タンパク質 = 1:20~1:100) で使用する必要がある。しかし固相化トリプシンの場合、支持体 (直径 20 μm のポリスチレンビーズ) に結合しているため自己消化が起きにくく、高濃度のトリプシンを用いることにより短時間で効率の良い消化が可能となる⁴⁹。また、Hsieh らは、内径 2.1 mm の汎用カラムに固相化トリプシンビーズを充填したカラムを用いて、cytochrome c (10 μg) の 1000 回連続分析試験を行ったところ、1 分析目と 1000 分析目の間において顕著な消化効率の低下が見られなかったことを報告している⁵⁰。すなわち、固相化トリプシンは耐久性の面でも優れていることが示唆されている。そこで、本研究では固相化トリプシン粒子をフューズドシリカキャピラリー内に充填した固相化トリプシンカラムの作製を行った。さらに、ゼロデッドボリュームで接続が

可能な 2 つの PicoClear ユニオンを介して，細胞サンプリングキャピラリー，固相化トリプシンカラム，および nano-LC カラムを接続し，また超純水を送液することでタンパク質からペプチドへの消化と分析カラムへの試料注入を連続的にインラインで処理できる方法論を考案した (図 2-3)．最終的に，試料が注入された nano-LC カラムを nano-LC/MS/MS 分析システムに接続し，30 分間初期組成の移動相を流すことで脱塩処理を行った．上記に示した考察・検討を踏まえ，細胞サンプリングキャピラリーを備えた細胞サンプリング装置と固相化トリプシンカラムを用いることにより，ターゲット細胞の回収とそれに続く試料調製，高い消化効率，および分析カラムへの試料導入と nano-LC カラム先端でのペプチドの濃縮をインラインで実施できる ISPEC 法を開発した (図 2-3)．

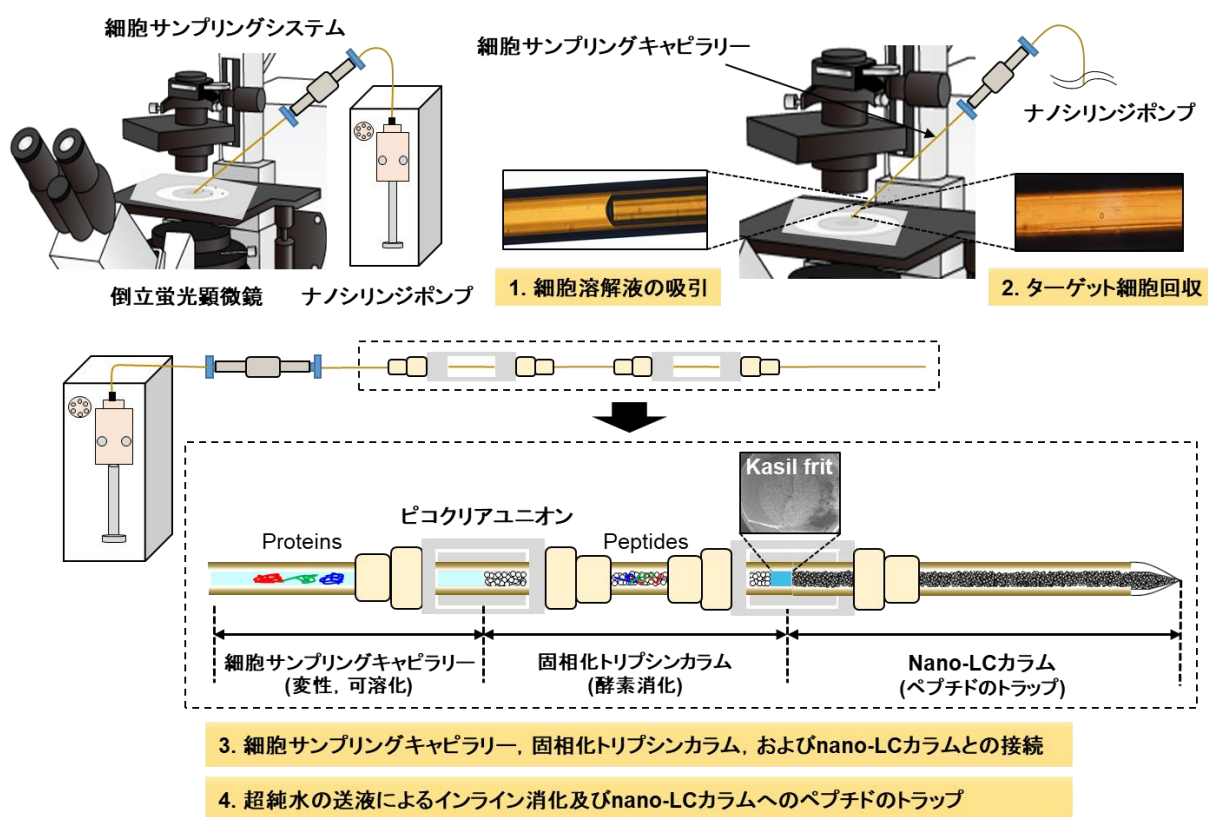


図 2-3. ISPEC の概要およびワークフロー。

2.3.2. サンプル調製法の比較評価

ISPEC 法 (試料調製法 3) の有用性について、従来の調製法である 2 種類のサンプル調製法 (調製法 1 および 2) と比較することにより評価した (図 2-4)。試料調製法 1 は、単一チューブ内での従来法であり、大量の細胞 (1×10^6 個) を出発試料として調製し、最終的に 1000 細胞相当のペプチド消化物を nano-LC/MS/MS 系に導入した (2.2.3 項参照)。また、調製法 1 は、変性剤非存在下で酵素消化を行っているため、一般的に使用される変性剤存在下での方法と比べて消化効率が高い⁵¹。一方で、単一チューブ内での調製過程において試料損失が起こっていると考えられるが、大量の細胞 (1×10^6 細胞) を使用しているため試料損失の割合 (例えば 100 細胞相当のタンパク質あるいはペプチドが吸着により損失) は最小限に抑えられる。さらに、出発試料に対して 0.1%の試料 (1000 細胞相当) を装置に導入するため、結果的に試料損失の影響はごくわずかになると考えられる。以上のことから、試料調製法 1 により得られた結果をポジティブコントロールとして設定した。試料調製法 2 は、1000 細胞を出発試料として使用し、単一チューブを使用した従来法の試料損失を評価するために設定した。また、総タンパク質の量が少なくなるため、アセトン沈殿での精製処理でロスが起こる。そのため、調製法 2 は、バッファー交換での試料損失を最小限に抑えるために調製法 1 での還元アルキル化およびアセトン沈殿による精製工程を省略した。調製法 2 においても、最終的に 1000 細胞相当のペプチド消化物を nano-LC/MS/MS 系に供した。試料調製法 3 は、調製法 2 と同様に 1000 細胞を出発試料として ISPEC 法により実施したものであり、最終的にペプチド消化物全量を nano-LC/MS/MS 分析システムに供した。3 種類のサンプル調製法は、それぞれ 3 回実施し、同定されたペプチド数およびタンパク質数の平均値を基に ISPEC 法の有用性を比較検証した (図 2-4)。

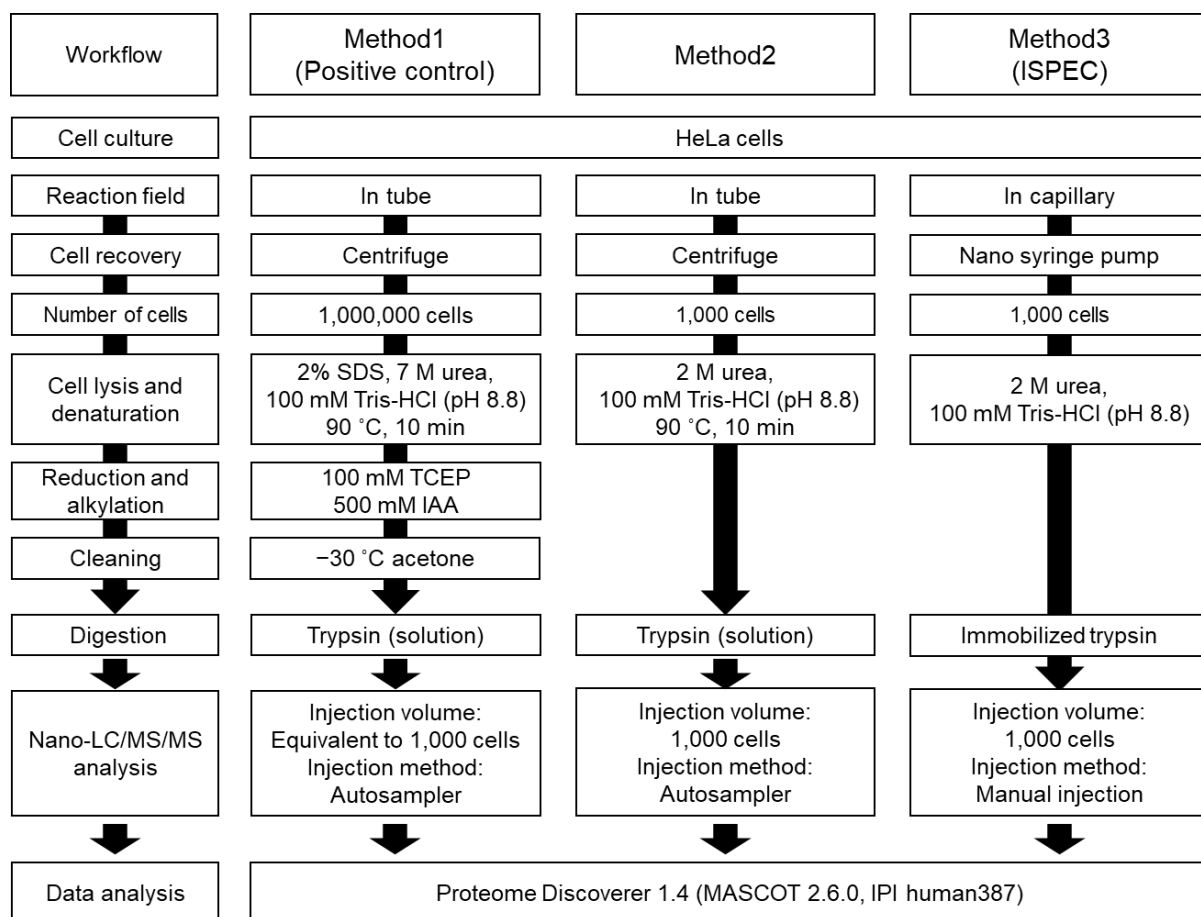


図 2-4. 各サンプル調製法のワークフロー。

調製法 1 による nano-LC/MS/MS 分析の結果, 1000 細胞相当の消化物から 9044 ペプチド, 2010 タンパク質が同定された. これらの結果は, 以前の研究で報告されている HeLa 細胞の 300 ng の消化物 (1500 細胞相当) の分析結果 (同定ペプチド数 10274, 同定タンパク質数 2149) と同等であった⁵². そのため, 調製法 1 の結果がポジティブコントロールとして適当であることが示された. 調製法 2 による 1000 細胞相当の消化物の結果から, 平均 2496 ペプチド, 907 タンパク質が同定された. ISPEC (調製法 3) によって同定されたペプチド数およびタンパク質数は, それぞれ平均 8744 個, 2079 個であった (図 2-5. a, b). 調製法 2 は調製法 1 (ポジティブコントロール) と比較して同定されたペプチド数およびタンパク質数は半分程度に減少した. 調製法 2 で得られた結果は, 以前に報告されている調製法 1 と類似の方法で 1000 細胞を調製し分析した結果⁵³ (同定ペプチド数 513 個, 同定タンパク質数 237 個) より良好な結果であっ

たものの、試料調製工程を簡略化しただけでは、試料損失を完全に回避できなかった。当該評価はあくまでペプチドおよびタンパク質の同定数を基に評価しているため、定量的な評価は難しいが、調製法 2 は試料調製過程で顕著な試料損失が起こっているといえる。一方で、ISPEC 法 (調製法 3) は、1000 細胞試料からペプチド 8774 個およびタンパク質 2079 個が同定され、これらの数は調製法 1 と比べて統計的に有意な差は見られなかった (ペプチド数 $P=0.46$, およびタンパク質数 $P=0.11$, Student's t 検定)。また 3 回の繰り返し試験で少なくとも 1 回同定されたペプチドおよびタンパク質の同定数は、ISPEC の方が調製法 1 に比べてわずかに多かった (図 2-5. a, b)。これらの結果から、ISPEC 法は 1000 細胞を出発試料とした際の試料調製時の試料損失を最小限に低減できる有効な手法であることが示された。

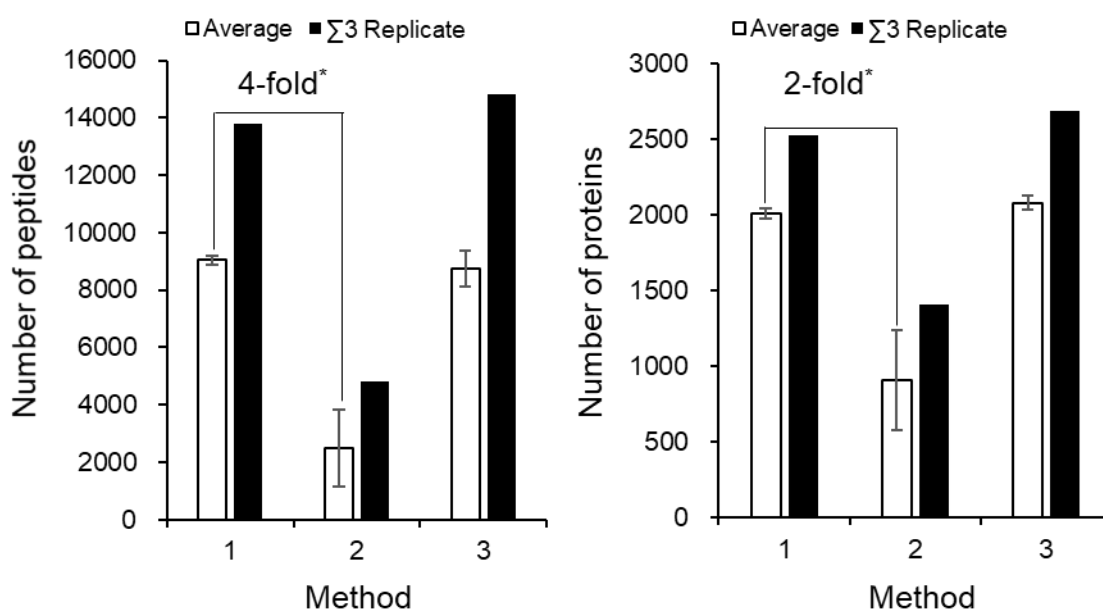


図 2-5. 各サンプル調製法によるショットガンプロテオミクスの結果。

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した ($*p < 0.05$).

調製法 1 および 3 で同定されたペプチドの物理化学的性質の違いを調査するため

に、ペプチド鎖長および疎水性度 (GRAVY 値)⁵⁴ の分布を比較した。本研究に使用している消化酵素であるトリプシンは、リジンおよびアルギニンの C 末端側を切断する。リジンおよびアルギニンはタンパク質中に約 5% 存在するため、トリプシンで消化されると 10~15 残基のペプチドを生じる⁵⁵。調製法 1 および 3 で同定されたペプチドの鎖長は、10~12 残基が最も多いことから、調製法 1 および 3 はともに酵素消化による断片化が問題なく行われていることが示唆された (図 2-6)。GRAVY 値はペプチド鎖中のアミノ酸組成から、そのペプチドが疎水性であるか親水性であるかを判断する指標である。GRAVY 値が 0 より大きいペプチドが疎水性、0 より小さいペプチドが親水性であると判断される。調製法 1 および 3 の GRAVY 値の分布に大きな違いは見られなかった (図 2-7)。これらの結果は、ISPEC 法における固相化トリプシンによる酵素消化が正常に行われたことを示唆している。

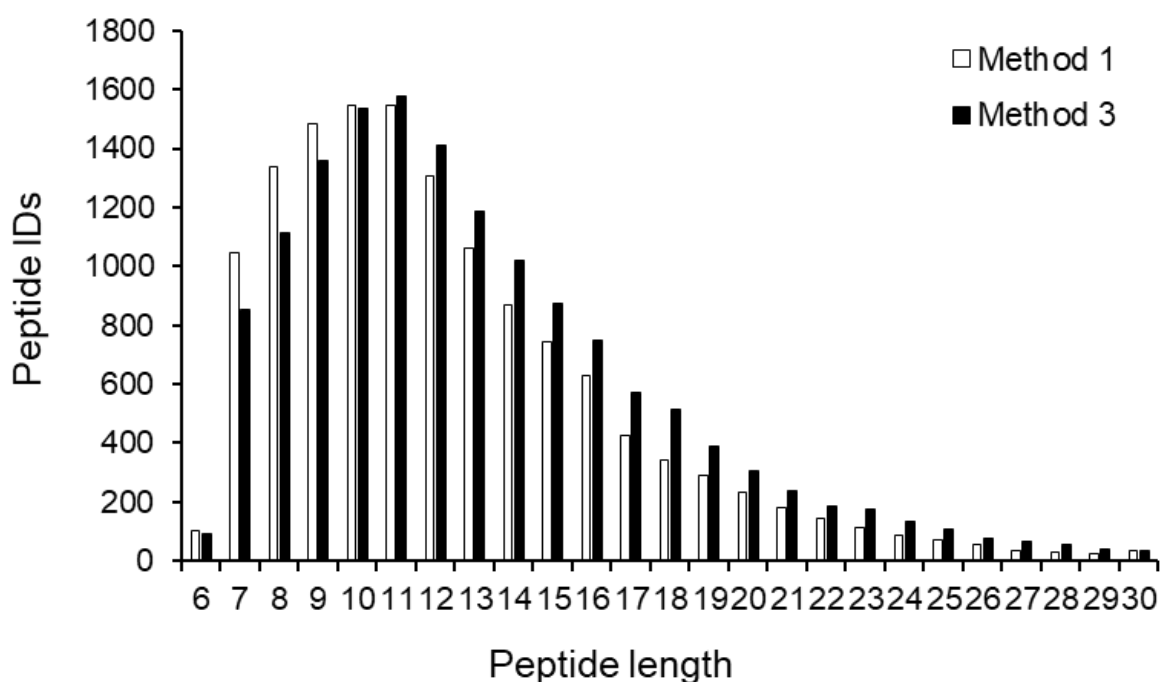


図 2-6. 各サンプル調製法から同定されたペプチド鎖長の分布。

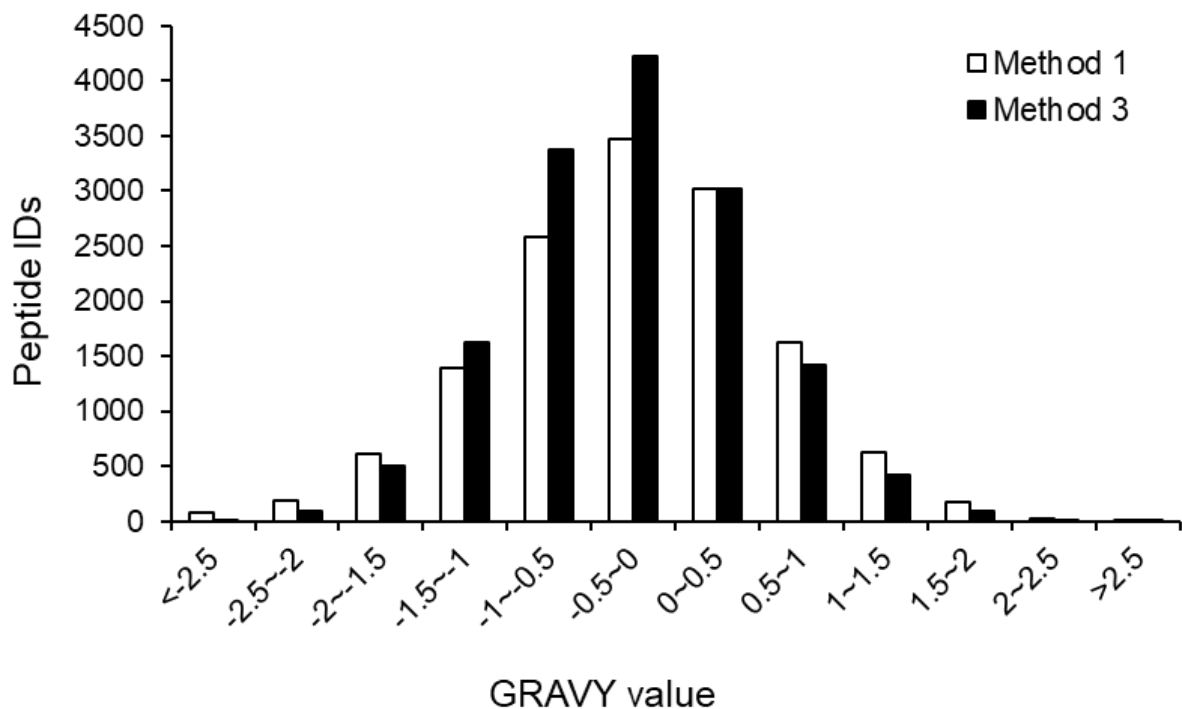


図 2-7. 各サンプル調製法から同定されたペプチドの GRAVY 値の分布.

続いて酵素消化効率について、調製法 1 および 3 により同定されたペプチドのうち、切断ミスのないペプチドの割合を比較することで評価した。その結果、調製法 1 と 3 の間に有意な差 ($P=0.06$, Welch's t 検定) は見られなかった (図 2-8)。ISPEC 法は消化プロセスが 60 分以内にもかかわらず (対して、調製法 1 は一晩)、従来法に匹敵する消化効率であることが示された。

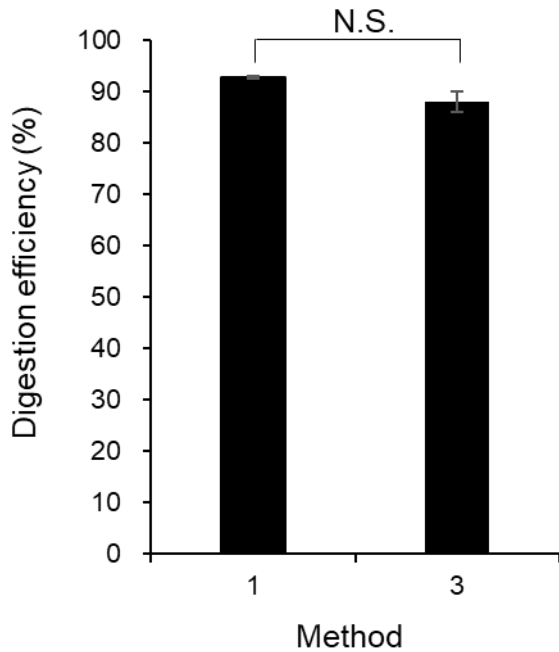


図 2-8. サンプル調製法 1 および 3 を用いて 1000 細胞を調製した際の消化効率.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Welch's t 検定により決定した (N.S., not significant).

次に ISPEC 法の再現性について、3 回の分析で共通で同定されたタンパク質の割合を比較した。調製法 1 および 3 により、3 回の dd-MS/MS に基づくショットガンプロテオミクス分析で共通で同定されたタンパク質数はそれぞれ 1533 個 (61%) および 1510 個 (56%) であり同等の数値を示した (図 2-9. a)。したがって、ISPEC は再現性の観点においても良好であった。

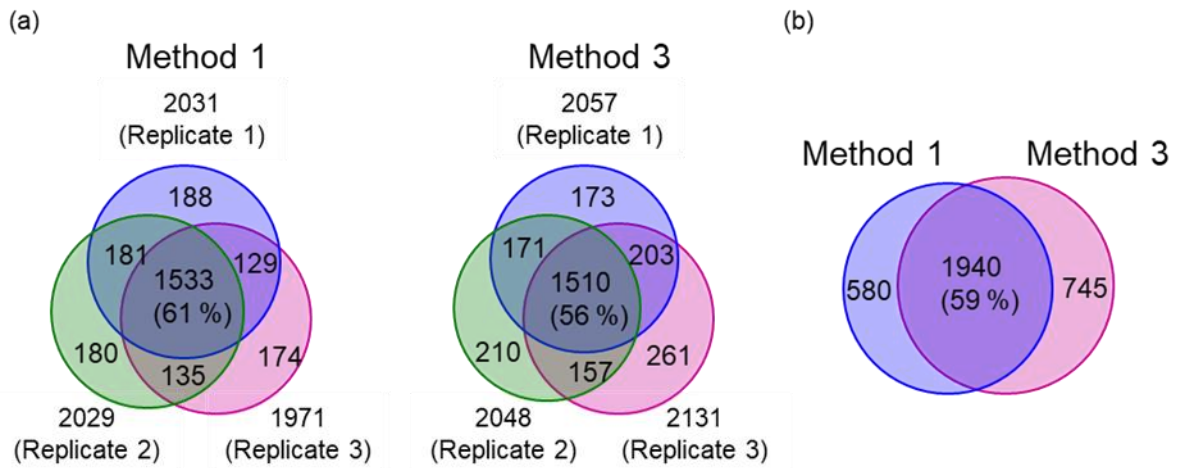


図 2-9. サンプル調製法 1 および 3 により同定されたタンパク質の相関関係.

(a) 調製方法 1 および 3 による 3 回のショットガンプロテオミクスで同定されたタンパク質の相関関係. (b) 調製法 1 および調製法 3 で同定されたタンパク質の相関関係.

ISPEC 法で同定されたタンパク質が従来法で同定されたタンパク質と比べて、網羅性に差がないかについて評価した. 調製法 1 および調製法 3 で、それぞれ 3 回の分析で 1 回以上同定されたタンパク質のうち 1940 個 (59%) が共通で同定された (図 2-9. b). 次にサンプル調製法 1 および 3 で同定されたタンパク質の局在情報および機能情報を得るために GO 解析を行った. 調製法 1 および 3 から同定されたタンパク質を細胞の構成要素および分子機能により分類した際の分布状態は類似しており (図 2-10. a, b), 以前に報告されている内容とも一致していた⁴⁰. 以上の結果から、ISPEC 法は、少数の哺乳動物細胞 (1000 細胞) に対して、サンプル調製時における試料損失を最小限に抑え、高い消化効率を有するサンプル調製法であることが示された.

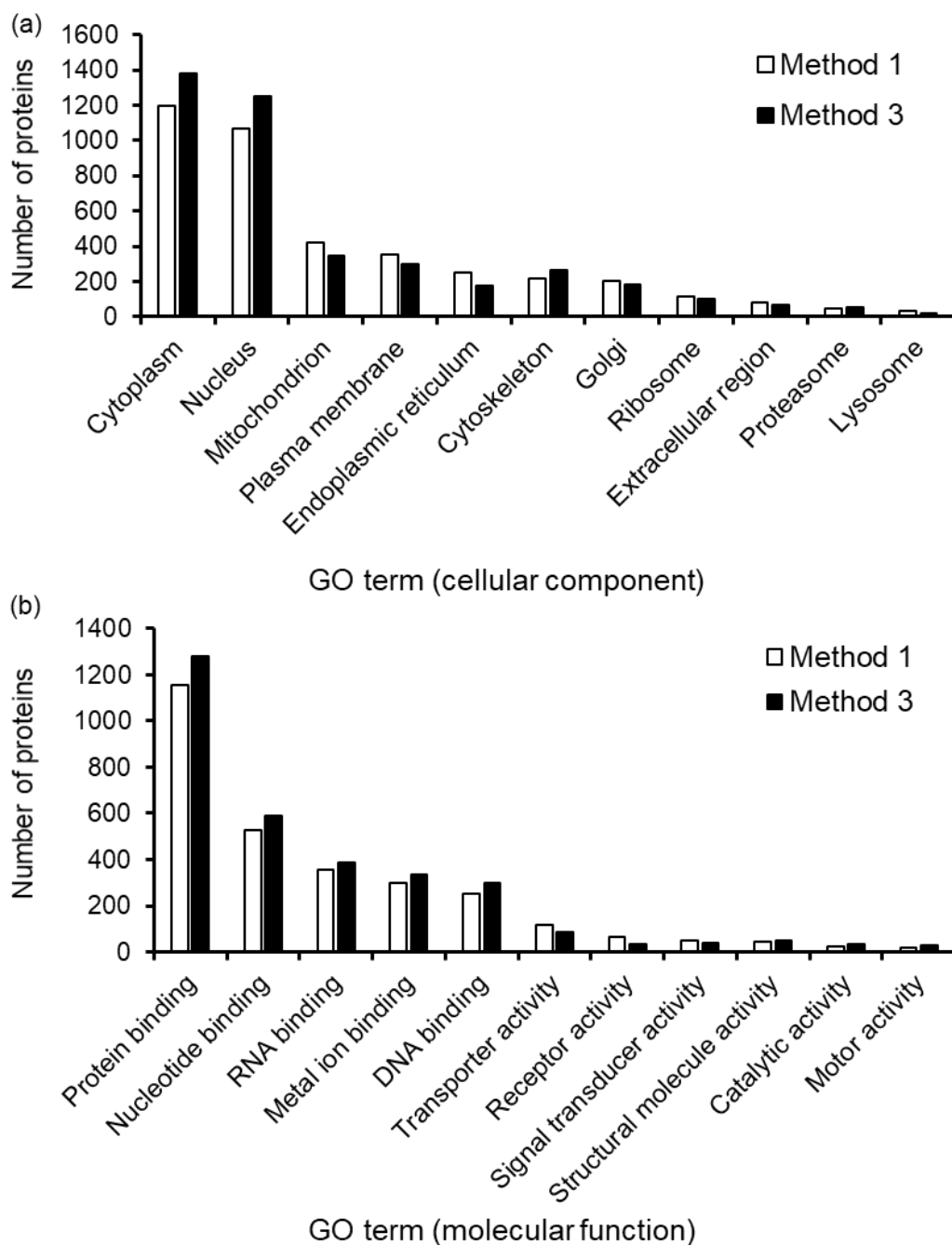


図 2-10. サンプル調製法 1 および 3 から同定されたタンパク質の GO 分析結果.

(a) 細胞の構成要素による分類. (b) 分子機能による分類.

2.3.3. ISPEC 法による 1, 10, 100 細胞のショットガンプロテオミクス

より少数の細胞に対する ISPEC 法の適応性を調査するために, 1, 10, 100 個の HeLa 細胞を出発試料として用いた. ISPEC の適応範囲の評価は, 試行回数 3 回で同定され

たペプチド数およびタンパク質数の平均値を基に行った。また、各細胞数から得られたペプチド、タンパク質の同定結果は、細胞懸濁液の上清 (ブランク) 分析で同定されたペプチドおよびタンパク質を除外したものをを用いた。

100 細胞 (125 ± 28 細胞, mean \pm standard deviation, SD) から 2459 ペプチド, 866 タンパク質, 10 細胞 (12 ± 2 細胞, mean \pm SD) から平均 107 ペプチド, 64 タンパク質, 1 細胞 (1 ± 0 細胞, mean \pm SD) から 30 ペプチド, 22 タンパク質が同定された (図 2-11. a, b). 1 細胞および 10 細胞から同定されたペプチドおよびタンパク質数は, 100 細胞からの結果と比較して著しく減少した。また消化効率についても同様に 100 細胞と比較して 10 細胞の結果はやや下回るものであった (図 2-12). これらの結果から 1000 細胞と同じ方法を 10 細胞以下に適応するには解決すべき問題点があることが判明した。そのため, ISPEC 法を 10 細胞以下の少数細胞を対象としたプロテオミクスに適応させるために, さらなる改善を試みた (試料調製法 4).

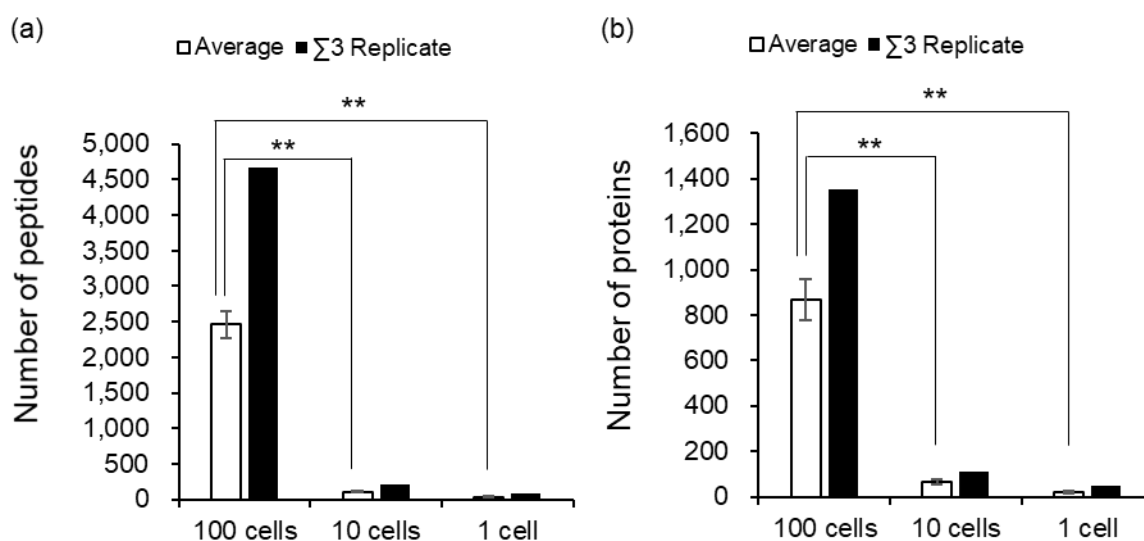


図 2-11. ISPEC (調製法 3) による少数細胞 (1, 10, 100 細胞) のショットガンプロテオミクスの結果。

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Welch's t 検定により決定した (** $p < 0.01$).

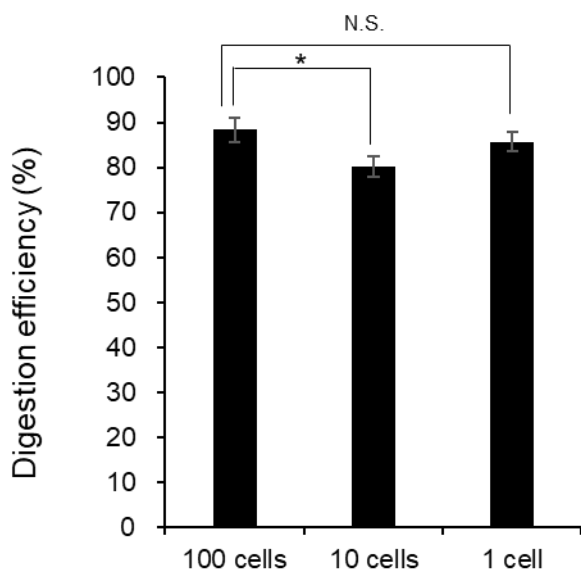


図 2-12. ISPEC (調製法 3) を用いて 1, 10, 100 細胞を調製した際の消化効率.

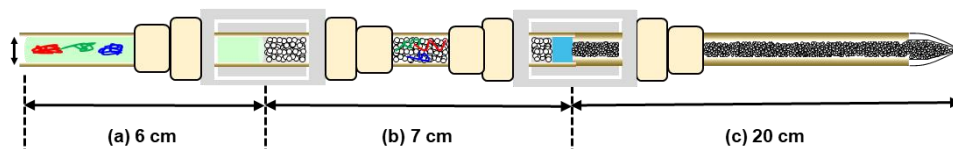
平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定あるいは Welch's t 検定により決定した (N.S., not significant; $*p < 0.05$).

10 細胞以下でもタンパク質の網羅的な分析を可能にするために、次に示す ISPEC 法の 3 点を変更した. 1 点目は細胞溶解バッファー容量の低減である. 消化効率は基質濃度に依存するため⁵⁶, 基質濃度を上げるために, 細胞溶解バッファー容量を $2\ \mu\text{L}$ から $200\ \text{nL}$ に減らした. 2 点目は細胞回収からペプチド断片化までの処理時における試料吸着をさらに低減するために, フェーズドシリカキャピラリーの内径のダウンサイズおよび長さの短縮を行った. 具体的には細胞サンプリングキャピラリーおよび固相化トリプシンカラムの内径を $200\ \mu\text{m}$ から $100\ \mu\text{m}$ にダウンサイジングし, 固相化トリプシンカラムについては長さを $70\ \text{mm}$ から $60\ \text{mm}$ に短縮した. またカラム内吸着を考慮して, nano-LC カラムの長さについても, $20\ \text{cm}$ から $10\ \text{cm}$ に短縮した. これらの変更によって, 少数細胞由来のタンパク質あるいは生成した消化ペプチドがフェーズドシリカ壁面に接触する頻度の抑制が期待でき, 試料損失の向上につながると考えた. 3 点目は, nano-LC で分離されたペプチド断片のピーク形状をよりシャープにし, S/N 比の向上による感度増加を期待した. 具体的な操作としては, 溶出時の nano-LC/MS/MS グラジエント条件を 90 分 (5–30%, 溶媒 B) から 40 分 (5–40%, 溶媒 B)

に変更した⁵⁷。10細胞以下の高感度ショットガンプロテオミクスを達成するために、以上の3つの項目の改変を行った ISPEC 法を試料調製法4と定義した (図 2-13)。

調製法3

(a, b) 内径200 μm
(c) 内径100 μm



調製法4

(a, b, c) 内径100 μm

(a) 細胞サンプリングキャピラリー
(b) 固相化トリプシンカラム
(c) Nano-LCカラム

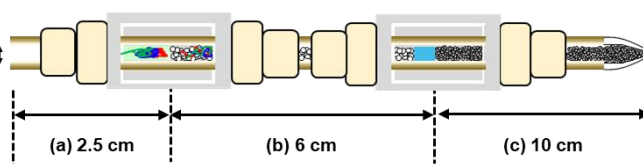


図 2-13. 10細胞以下の少数細胞プロテオミクスに資する ISPEC 法の最適化。

調製法4により、10細胞 (8 ± 1 細胞, mean \pm SD) から平均 559 ペプチド, 229 タンパク質および1細胞 (1 ± 0 細胞, mean 平均 \pm SD) から 58 ペプチド, 33 タンパク質が同定された (図 2-14. a, b). 3回の分析で1回以上同定されたタンパク質数は、10細胞で 351 タンパク質, 1細胞で 60 タンパク質であった (図 2-14. b). 調製法3および4で得られた結果を比較すると、同定されたペプチド数およびタンパク質数は10細胞で4-5倍, 1細胞で約2倍増加した。また、従来の ISPEC を改良した調製法4は酵素消化効率についても向上した (図 2-15)。

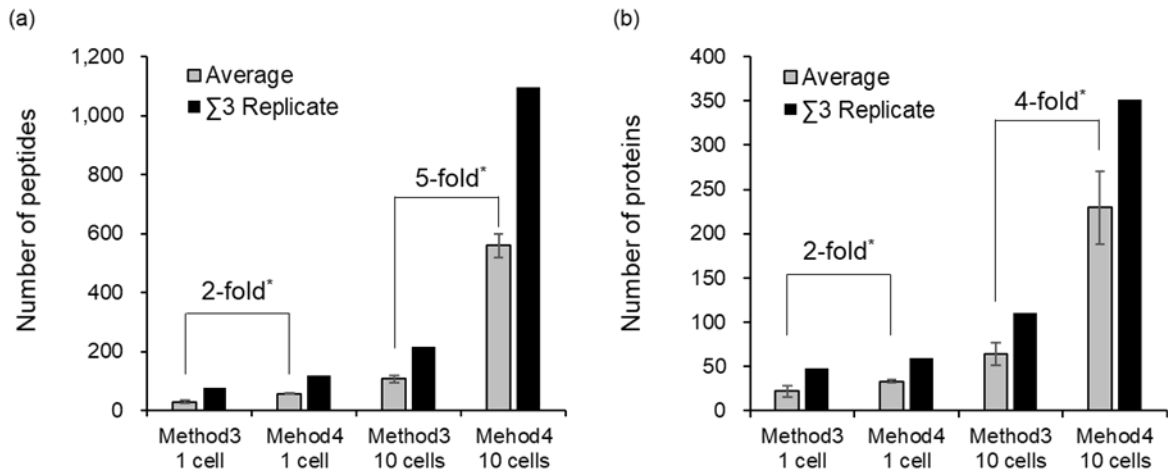


図 2-14. 従来の ISPEC (調製法 3) と最適化した ISPEC (調製法 4) による 1, 10 細胞のショットガンプロテオミクス結果の比較.

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定あるいは Welch's t 検定により決定した ($*p < 0.05$).

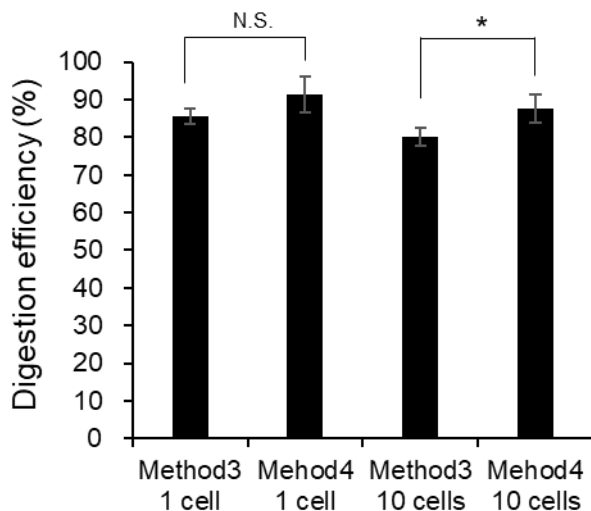


図 2-15. 調製法 3, 4 による 1, 10 細胞の消化効率の比較.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した (N.S., not significant; $*p < 0.05$).

改変した ISPEC (調製法 4) により, 1 個の HeLa 細胞から同定されたタンパク質数 (60 タンパク質) は, 以前に報告された OAD チップベースの方法 (51 タンパク質)⁴¹

よりも多く, nanoPOTS (211 タンパク質) よりは少なかった⁴². 本研究で使用した nano-LC/MS/MS システムは, 内径 100 μm の nano-LC カラムと QExactive plus から構成されている. 一方, nanoPOTS⁴⁰ で使用された nano-LC/MS/MS システムは, 本システムと比べて内径が小さい nano-LC カラム (内径 30 μm) と最新の高分解能タンデム質量分析 (high resolution tandem mass spectrometry, HRMS/MS, Orbitrap Fusion Lumos Tribrid) より構成されている (表 2-1). このように nano-LC/MS/MS システムの性能の違いによってペプチドおよびタンパク質の同定数は大きく異なるため, サンプル調製法のみでの有意性を正確に比較することは難しい. 一方で, 消化効率については, nanoPOTS⁴⁰ では 77%であるのに対して ISPEC 法では 88%であり, ISPEC 法の優位性が示されていると考えられる.

表 2-1. これまでに報告された少数細胞からのショットガンプロテオミクスの結果.

Sample preparation method	Sample	Nano-LC column				Nano-LC conditions			MS information		Number of identified proteins	Reference
		Column type	Particle size (μm)	i.d. (μm)	Length (cm)	Flow rate (nL/min)	Gradient (%)	Time (min)	Type	Resolution		
FASP	1000 HeLa cells (200 ng total protein)	Packed C18 column	3	-	15	300	2-80	230	LTQ-Orbitrap XL	60000	1100	29
SP3	Single human oocyte (100 ng total protein)	Packed C18 column	1.7	75	20	300	3-40	145	Orbitrap Velos Pro	30000	450	30
AFA	50 MCF-7 cells (5 ng total protein)	Poly(styrene-divinylbenzene) PLOT column	-	10	420	20	0-27	240	Q Exactive	70000	1802	32
nanoPOTS	10 HeLa cells (2 ng total protein)	Packed C18 column	3	30	70	60	5-28	150	Orbitrap Fusion Lumos Tribrid	120000	1517	33
nanoPOTS	Single HeLa cells (0.2 ng total protein)	Packed C18 column	3	30	50	60	8-22	60	Orbitrap Fusion Lumos Tribrid	120000	211	35
OAD	Single HeLa cells (0.2 ng total protein)	Packed C18 column	2.5	50	15	200	0-40	360	Orbitrap Elite	60000	51	34

2.3.4. 1 細胞由来のタンパク質同定結果に対する妥当性と信頼性評価

MS は濃度依存の検出器であるため, 細胞数と同定されたペプチドのプリカーサーイオンのピーク面積との間に直線性が確認されるはずである. 1 細胞での 3 回の分析のうち 2 回以上の分析で同定された 33 ペプチド (21 タンパク質) のプリカーサーイオンのピーク面積と細胞数の関係性を調べた. その結果, 33 ペプチドについて相関係数 (R^2) が 0.917 以上と良好な直線性を示した (図 2-16).

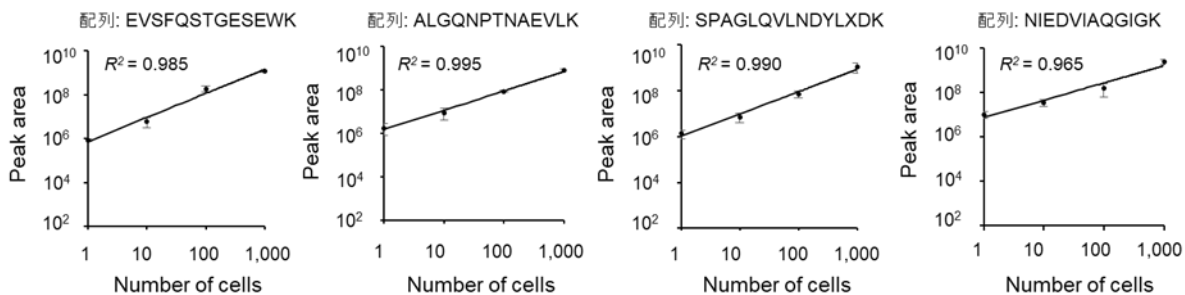


図 2-16. 1, 10, 100, 1000 細胞から共通で同定されたペプチドのプリカーサーイオンの面積値と細胞数の関係.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$).

次に 10 細胞および 1 細胞から同定された 319 タンパク質の細胞内発現レベルの分布を調べた. タンパク質の発現レベルは, Nagaraja ら⁵⁸による intensity based absolute quantification (iBAQ) 値から推定された各タンパク質のコピー数を参考にした. iBAQ 値とは, 各タンパク質由来のペプチドの MS 強度の合計値を, 各タンパク質において, 理論上検出されるペプチド (トリプシン消化で得られる 6–30 残基で切断ミスのないペプチド) の個数で割った値である. ペプチドの MS 強度の合計値をそのまま使用すると, 分子量の大きいタンパク質の方がペプチドの個数が多く, 強度が大きく見積もられてしまうため, 上記のように算出される. 10 細胞および 1 細胞から同定されたタンパク質のダイナミックレンジは, それぞれ 4 桁および 3 桁であると推定された (図 2-17. a). また 1 細胞から同定されたタンパク質は, 細胞骨格タンパク質, リボソームタンパク質, 解糖系酵素など, 細胞内で発現量の多いタンパク質の占める割合が多かった (図 2-17. b). 以上の検証結果から, ISPEC 法で同定されたタンパク質はコンタミネーションやアーティファクトではなく 1 細胞中に含まれるタンパク質であるといえる. しかし, 現時点での ISPEC 法および nano-LC/MS/MS の感度では, 比較的細胞内での発現量の高い 60 種のタンパク質の同定に留まった.

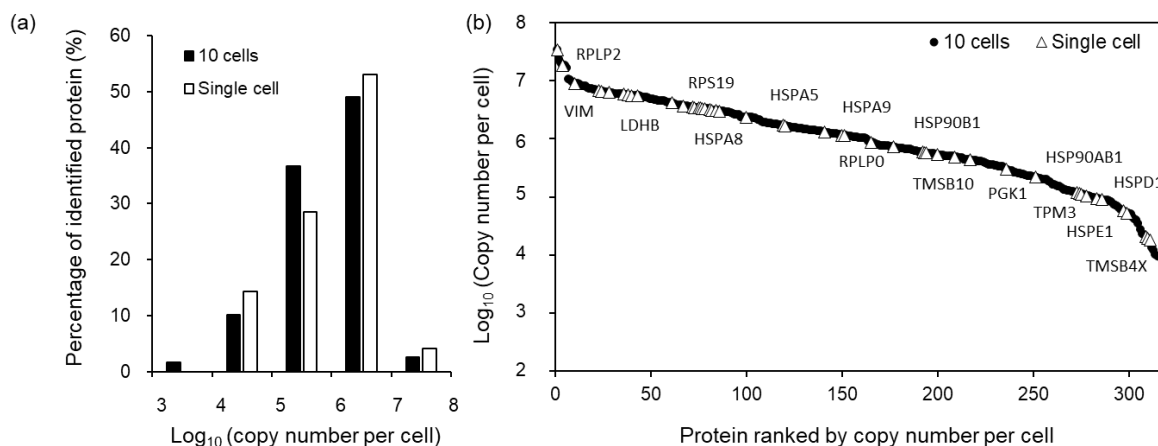


図 2-17. 調製法 4 による 1, 10 細胞から同定されたタンパク質の発現量分布.

(a) 発現量分布比率. (b) 発現量分布.

2.4. 小括

本章では、1 細胞ショットガンプロテオミクスに向けて、試料調製プロセス中のサンプル損失を最小限に抑えるとともにタンパク質の消化効率の高いフューズドシリカキャピラリーを基盤としたインラインサンプル調製法の検討を行った。はじめに、細胞の回収と試料調製プロセスを連続して行うための細胞サンプリングシステムを開発した。次に、開発したサンプリングシステムを使用して、フューズドシリカキャピラリー内で細胞回収、可溶化、タンパク質抽出、変性までの処理を連続して行い、固相化トリプシンカラム、および nano-LC カラムを接続し、送液することでタンパク質からペプチドへの消化と分析カラムへの試料導入、カラム先端での消化ペプチドの濃縮を連続的にインラインで処理できる ISPEC 法を開発した。続いて、ISPEC 法を少数の哺乳動物細胞 (1000 個の HeLa 細胞) に適応することにより ISPEC 法の性能を評価した。ISPEC 法はチューブ内で前処理操作を実施する従来法と比較して、試料吸着を抑制した試料損失の少ない方法であることが示された。さらに、ISPEC 法の改良を行うことで、より少数の細胞 (100, 10, 1 細胞) に対するショットガンプロテオミクスにも対応できることが示唆された。以上の結果から、ISPEC 法は 1 細胞ショットガンプロテオミクスを実現可能にするための試料損失が少なく高い消化効率を有する試料調製法であることが示された。

第三章 1 細胞ショットガンプロテオミクスに向けた高感度分析システムの開発

3.1. 緒言

第二章では、単一細胞の単離、試料調製 (ISPEC), nano-LC/MS/MS 分析をインラインで連動させ、1 細胞ショットガンプロテオミクスに向けた新たな分析システムの開発を行った。しかしながら、現時点でのシングルセル解析システムを用いて 1 細胞から同定されたタンパク質はわずか 60 種であった。細胞の個性および異種性を理解するためには、より多くの 1 細胞試料から網羅的な細胞内タンパク質情報を取得する必要がある⁵⁹。そのため、細胞単離、試料調製、nano-LC/MS/MS 分析の各工程の精度とスループットを向上させ、システム全体の感度を上げる必要がある。

蛍光活性化セルソーティング (fluorescence activated cell sorting, FACS), およびマイクロマニピュレーションは、1 細胞の単離方法として広く利用されている⁶⁰。第二章で開発した細胞サンプリングシステムは、マイクロマニピュレーションを基盤としている。FACS はハイスループットで大量の細胞の処理が可能であるが、細胞の形や大きさなどを詳細に観測しながら細胞を単離することはできない。一方、マイクロマニピュレーション法は、FACS と比べてスループットは劣るものの、顕微鏡観察により細胞の形状およびサイズ、さらには核の形状やサイズといった詳細な形態学的情報を取得しながら、注目すべき単一細胞の迅速なサンプリングが可能である。また、細胞単離の際にフューズドシリカキャピラリーを使用することでキャピラリー内でのサンプル調製 (ISPEC) が可能となる。マイクロマニピュレーションを基盤とした全自動 1 細胞回収装置 (ASONE Cell Picking System)⁶¹ は既に市販されており、個々の細胞を全自動でマルチウェルプレートに回収し NGS 等による 1 細胞 RNA-Seq 解析が報告されている⁶²。しかし、1 細胞ショットガンプロテオミクスの場合、第二章の結果で示したようにチューブあるいはプレート表面のポリエチレンにタンパク質が吸着す

ることで試料損失が起こる。さらに、既製品の場合は ISPEC と連動させるために改良することは現実的に難しい。そこで、本章では第二章で開発した装置を改変し、半自動で操作が可能なスループットと精度の高い新たな細胞サンプリングシステム (半自動細胞サンプリングシステム) の開発を実施した (図 3-1)。

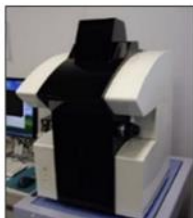
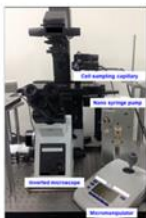

項目	市販装置 (アズワン㈱)	第二章で開発した装置	第三章で開発する装置
装置概観			
ISPECの適応	×	○	○
応用	×	○	○
スループット	◎ (全自動化)	× (マニュアル)	○ (半自動化)

図 3-1. 1 細胞回収システムの比較.

第二章で開発したプロテオーム解析システムを用いて、単一 HeLa 細胞から同定されたタンパク質は発現量の高い 60 種類であり、細胞の個性を理解する上では不十分である。1 細胞ショットガンプロテオミクスのさらなる網羅性向上のためには、分析システム全体の感度向上が必要である。そのためには、第一章でも述べたとおり、使用する nano-LC カラム内径のダウンサイジングによる高感度化²⁶があり、いくつかのグループにおいて 1 細胞分析への有効性が示されている⁴⁰⁻⁴²。また、クロマト分離後から質量分析計へ導入されるまでのイオン化の工程も感度向上に重要な項目である。しかし、1 細胞解析を対象とした nano-LC/MS/MS において、イオン化部の改良はこれまで詳細に検討されていない。第二章で用いてきた高分解能タンデム質量分析計に標準的に付属している nano-ESI イオンソースはオープンソースタイプの装置であった。そのため、実験室中に存在するシロキササン等が、サンプルと一緒に MS へ導入されてしまい、バックグラウンドのイオンが高くなるというデメリットがあった⁶³。1 細胞

3.2. 実験方法

3.2.1. 試薬および実験材料

低接着コート 35 mm ディッシュ (EZZ-BindShut™ SP) は IWAKI (静岡) から入手した。セプタム (Advanced Green non-Stick 11 mm Septa 50/pk) はアジレントテクノロジー (東京) から購入した。先端加工済みの nano-LC カラム用のフューズドシリカキャピラリー (PF360-30-10-N-5) は, New Objective (Woburn, USA) から購入した。L-column2 ODS (粒子径 2 μm , 細孔径 120Å) は CERI (埼玉, 日本) から入手した。なお上記以外に本研究で使用した試薬および供試化学物質は 2.2.1. と同様のものである。

3.2.2. 細胞培養および回収

HeLa 細胞の培養条件および回収操作は 2.2.2. と同様の方法で実施した。

3.2.3. バルクスケールでのプロテオミクス試料調製法

チューブを使用したバルクスケールでの試料調製法は 2.2.3. の方法を一部改変して行った。1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに回収された HeLa 細胞 (1×10^6 細胞) を, 1% SDS, 7 M 尿素を含む 250 μL の 100 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.8) で溶解し, ヒートブロック上で 95 °C, 5 分間インキュベートした。Benzonase 0.5 μL (125 U) を添加し Bioruptor (Diagenode, Philadelphia, PA, USA) を使用して超音波処理した (30 秒間, 3 回, インターバル 30 秒間)。タンパク質定量のために BCA アッセイ (Pierce™ BCA プロテインアッセイキット, Thermo Fisher Scientific) を行った後に, 25 μg のタンパク質を新しい 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し, 合計 100 μL の溶液量になるように細胞溶解バッファーを添加した。次に 2.5 μL の TCEP (100 mM) を加え, 37 °C で 30 分間インキュベートし, その後 2.5 μL の IAA (500 mM) をサンプルに加え, 室温で 30 分間インキュベートした。タンパク質を沈殿させるために, -30 °C に冷却した 300 μL (3 倍量) のアセトンをサンプルに加え, -30 °C で 2 時間静置した。サンプルを 19000 $\times g$, 4 °C の条件で 20 分間遠心分離した後, 上清を除去し, 1 mL の 90%アセトン (-30 °C

に冷却したもの) を加えた。タンパク質をボルテックスで懸濁した後、Bioruptor を使用して超音波処理した (30 秒間, 3 回, インターバル 30 秒間)。サンプルを, 2000 ×g, 4 °C の条件でスイング型ローターにより 15 分間遠心分離することにより, 沈殿物をエッペンチューブの底部分に集め, その後 19000 ×g, 4 °C の条件で 20 分間遠心分離し上清を完全に除去した。ペレットを 100 mM 重炭酸アンモニウム 50 μL (タンパク質濃度, 520 ng/μL) に溶解し, 超音波処理を行った。1 μL のトリプシン溶液 (1 mg/mL) を加え, 37 °C で 3 時間インキュベートした。その後, さらに 1 μL のトリプシン溶液 (1 mg/mL) を添加し, 37 °C で一晩インキュベートした。サンプルは, 分析を行うまで -80 °C で保存した。上記で調製した 500 ng/μL のペプチド消化物を, 0.5% TFA, 0.002% PEG 溶液で低吸着 0.3 mL バイアル (ProteoSave, AMR Inc) 内で 25 倍希釈することにより, 20 ng/μL のペプチド消化物サンプルを調製した。

調製したペプチド消化物は本章で開発した半自動細胞サンプリングシステムを使用して, 細胞サンプリングキャピラリー内 (内径 200 μm, 外径 360 μm, 長さ 7 cm) に 1 細胞相当分 (0.25 ng) の量となるように吸引した。細胞サンプリングキャピラリーと nano-LC カラムは PicoClear ユニオン (New Objectiv) を介して接続し, その後, Dionex Ultimate 3000 nano-RSLC pump (Thermo Fisher Scientific) を使用して 99%移動相 A (0.1% (v/v) の FA を添加した超純水) を 60 nL/min の流量で 25 分間送液することによりペプチド消化物を nano-LC カラムへ注入し, 脱塩および nano-LC カラム先端での濃縮を行った。脱塩, 濃縮操作後に細胞回収キャピラリーを取り除き, グラジエント溶出条件にて nano-LC/HRMS/MS 分析を開始した。

3.2.4. ISPEC ver. 2 による試料調製法

ここでは従来の ISPEC 法よりもスルーputtを向上させた試料調製法 (ISPEC ver. 2) を開発した。第二章で紹介した ISPEC ver. 1 と比べて, ISPEC ver. 2 は酵素消化の工程を固相化トリプシンで実施せず, トリプシン溶液をキャピラリー内に吸引し, 変性したタンパク質試料と混合し反応させることでペプチド消化物を調製する方法

である。ISPEC ver. 2 を実行するために、半自動細胞サンプリングシステムの開発を行った。半自動細胞サンプリングシステムは、倒立顕微鏡 (IX73, Olympus, 東京), カラーCCD カメラ (DP73, Olympus), 振動抑制型超微小液量吸引吐出ポンプ (TOPick ポンプ, ヨダカ技研株式会社, 神奈川), 3 軸ロボット (ヨダカ技研株式会社), マニピュレーター (ヨダカ技研株式会社), およびタッチパネル式制御モニター (ヨダカ技研株式会社) から構成されている (図 3-3)。

HeLa 細胞を PBS に懸濁し 20 cells/ μ L の細胞懸濁液および細胞溶解バッファーとして 2 M 尿素を含む 100 mM 重炭酸アンモニウム溶液を調製した。細胞サンプリングキャピラリーを次の手順に従って作製した。内径 200 μ m, 外径 360 μ m のフューズドシリカキャピラリーを, セラミックカッターを用いて長さ 10 cm にカットし, 端部をピンセットで挟み, 端から 2 cm の部分をハンディトーチ (GB-2001, スタイル株式会社, 東京) で加熱しながら引っ張る事により, キャピラリー先端をテーパ形状に加工した。最後にラッピングフィルムシート (粒度, 5 μ m, 3M, 東京) を使用して先端径が 50 μ m になるように研磨し, 先端を超音波洗浄したのち, 全長 7 cm にカットすることで調整した。キャピラリー先端のチップのサイズは, 顕微鏡下で確認した。細胞サンプリングキャピラリーはテフロンチューブ (内径 0.3 mm, 外径 1.58 mm, Merk) を介して TOPick ポンプに接続した。HeLa 細胞懸濁液 (1 μ L), 細胞溶解バッファー (1 μ L), 2 mg/mL トリプシン溶液 (1 μ L) をそれぞれ低接着コートディッシュ (IWAKI, 静岡) 上に滴下した。半自動細胞サンプリングシステムを使用し, 細胞サンプリングキャピラリー内に細胞溶解バッファー, HeLa 細胞懸濁液 (1 細胞または 3 細胞), トリプシン溶液を以下の手順で連続的に吸引した: (A) エアギャップ; 150 nL, (B) 細胞溶解バッファー; 10 nL, HeLa 細胞; 1 細胞または 3 細胞, (C) 細胞溶解バッファー; 1.6 nL, (D) トリプシン溶液; 1.6 nL。10 細胞をサンプリングする場合は, 細胞溶解バッファーおよびトリプシン溶液をそれぞれ 3.2 nL 吸引した。細胞サンプリングキャピラリー内に回収された細胞数は, カラーCCD カメラを備えた顕微鏡を使用して決定した。次に, 細胞サンプリングキャピラリーの両端をセプタムにより密閉し, カラムオープン

(Cov150-75, AMR Inc) 内で, 50 °C で 30 分間反応した. 反応終了後カラムオープンから細胞サンプリングキャピラリーを取り出し, セプタムを取り除き, テーパー加工した細胞サンプリングキャピラリー先端をカットすることでフラットにした. さらに, テーパー加工していない反対側のキャピラリーについては, その端から 10 mm の位置でカットした. その後, 細胞サンプリングキャピラリーと nano-LC カラムは PicoClear ユニオン (New Objectiv) を介して接続し, Dionex Ultimate 3000 nano-RSLC pump (Thermo Fisher Scientific) を使用して 99%移動相 A (0.1% (v/v) の FA を添加した超純水) を 60 nL/min の流量で 25 分間送液することによりペプチド消化物を nano-LC カラムへ注入し, 脱塩および nano-LC カラム先端でのペプチド消化物の濃縮を行った. 細胞サンプリングキャピラリーを取り除いた後にグラジエント溶出条件にて nano-LC/HRMS/MS 分析を行った.

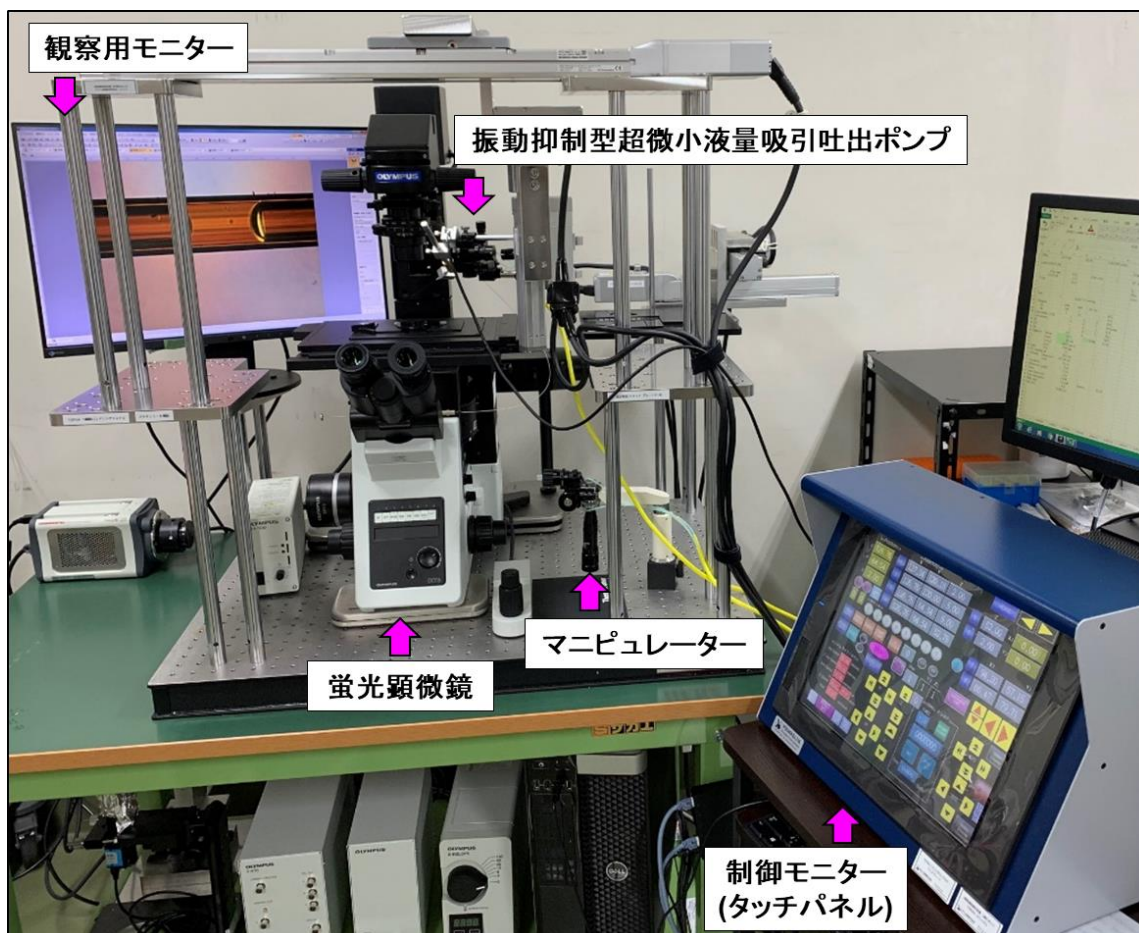


図 3-3. 半自動細胞サンプリングシステム.

3.2.5. Nano-LC/HRMS/MS 分析条件

Nano-LC/HRMS/MS 分析システムは、Dionex Ultimate 3000 nano-RSLC pump, nano-LC interface (AMR Inc), Dream Spray (AMR Inc) と Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して構成した。Nano-LC システムはバイナリー高圧グラジエント送液ユニット, カラムオープン (AMR Inc), および HTC-PAL (CTC Analytics AG) を用いて構成した。Nano-LC システムは Chromeleon software ver. 6.80 (SR15, Build 4546) 及び Cycle Composer software ver. 2.5.1 (CTC Analytics AG) により制御し, MS システムは Xcalibur software ver. 4.1.31.9 (Thermo Fisher Scientific) により制御した。

Nano-LC カラム (内径 30 μm , 長さ 150 mm, L-column2, ODS, 粒子径 2 μm) は 2.2.4 と同様の方法で作製した。移動相 A には 0.1% (v/v) の FA を添加した超純水を使用し, 移動相 B には 0.1% (v/v) の FA を添加した 80%アセトニトリルを使用した。流量を 60 nL/min に, カラムオープン温度を 42°C にそれぞれ設定した。グラジエント条件は, (1) B 液 5–35% (0–60 分), (2) B 液 35–80% (60–61 分), (3) B 液 80% (61–66 分) で移動相組成の経時的変化を行った後, B 液 1%に戻し 13 分間カラムの平衡化を行った。質量分析計を用いたプリカーサーイオンのフルスキャンの分析条件を以下に示す。分析は正イオンモードで実施し, スプレー印加電圧を 2.0 kV に設定した。キャピラリー温度を 275°C, ヒーター温度を 350°C, S レンズレベルを 50 に設定した。質量分解能を 60000 に設定した。C-Trap に溜めるイオン量を制御するパラメータである AGC target を 1000000, MI を 100 ミリ秒にそれぞれ設定した。スキャン幅を m/z 350–1800 に設定した。MS/MS スペクトルは, 強度が高い順に 10 個のプリカーサーイオンに対して dd-MS/MS にて取得した。MS/MS スペクトルは HCD により取得した。同一イオンに対する MS/MS スキャンを回避するために, 既にスキャンされたイオンは 10 秒間 MS/MS スキャンの対象から除外するように設定した。dd-MS/MS 条件は次の通りである。質量分解能を 15000 に設定した。AGC target を 100000, MI を 250 ミリ秒にそれぞれ設定した。分離ウィンドウを 4.0 Da, NCE を 22 eV, イオン選択下限値を 20000, 除外荷電状態を 1 価および 5 価以上, スキャン幅を m/z 200–2000 にそれぞれ設定し

た.

3.2.6. データ解析

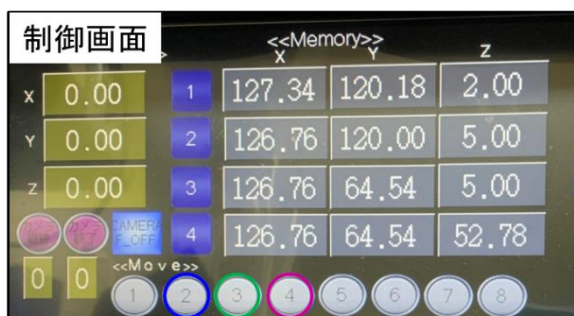
HRMS と HRMS/MS スペクトルに基づくペプチドおよびタンパク質の同定のためのデータ解析は, Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った. 検索エンジンとして MASCOT (ver. 2.6.2, Matrix Science, London, UK) を使用し, データベースは Swiss-Prot human database (version; 2017/10/25) を用いた. ペプチド同定の FDR を評価するために, 対応するリバーデータベースに対する検索も実施した. データベース検索条件は以下の通り設定した. プリカーサーイオンの質量誤差は 10 ppm, フラグメントイオンの質量誤差は 0.02 Da に設定した. 消化酵素にトリプシンを選択し, ミス切断の許容数は最大 2 箇所とした. Dynamic modification としてメチオニンの酸化, N 末端アセチル化及びグルタミンのピログルタミン酸への変換を設定した. Mascot スコアが 99% confidence よりも高いペプチドおよび 7 残基以上, Mascot イオンスコア 25 以上のペプチドが 1 つ以上帰属されたタンパク質をその後の解析に使用した. Feature Mapper node を使用することにより, 複数の分析間で保持時間情報と m/z , 価数をマッチングさせることにより, MS/MS 情報が取得されていないデータセットからもペプチドを同定した. アライメントをする際の保持時間のズレは 10 分, アライメント後における複数ファイル間でのマッピング時の保持時間のズレは 0 分に設定した. 最後に各データからコンタミネーションデータベース (cRAP ver2012.01.01) に登録されているペプチドおよびタンパク質, および細胞懸濁液の上清のみを分析したブランク分析から同定されたペプチドを除外して, 評価を行った.

3.3. 結果と考察

3.3.1. 半自動細胞サンプリングシステムの開発

本章での目的の 1 つは, 第二章で開発した細胞サンプリングシステムの作業性およびスループットの向上である. 第二章のプロトタイプの細胞サンプリングシステムは,

細胞サンプリングキャピラリーの取り付け、その後の細胞回収のための細胞サンプリングキャピラリーの位置調整をマニピュレーターにより全ての操作をマニュアルで行っていた。このプロトタイプのシステムでは、マニピュレーターの稼働範囲が 12 cm 四方であったため、細胞サンプリングキャピラリーの取り付けがしにくく、設置するためには多くの時間を要した。また、マニピュレーターの移動速度が遅いため、キャピラリーの設置位置から細胞回収位置まで移動するのに時間がかかった。一方、新たに考案した半自動細胞サンプリングシステムではこの問題を改善するために、3 軸ロボットアームを追加し、アームの一つに吸引吐出用のポンプを接続することで、細胞サンプリングキャピラリーの稼働範囲が拡大し、移動速度も向上した。また細胞サンプリングキャピラリーの取り付け、細胞回収、キャピラリー内観察の操作を迅速に行うために異なる空間位置を記憶させ、タッチパネル式の制御モニターをワンタッチすることで目的の場所に移動できるように改良した (図 3-4)。さらに、細胞サンプリングキャピラリーの先端をテーパ形状に加工したサンプリングキャピラリーを用いることにより、先端がフラットな場合と比べて、標的細胞とサンプリングチップが近接し、回収精度およびサンプリング速度が向上した。また、より微量試料を吸引可能にするために、1 nL が最少操作液量であったナノシリンジポンプから、400 pL が最少操作液量である振動抑制型超微小液量吸引吐出ポンプ (TOPick ポンプ, ヨダカ技研株式会社) に変更した。この振動抑制型超微小液量吸引吐出ポンプと先端加工した細胞サンプリングキャピラリーの使用により、細胞周辺の余分な細胞懸濁液 (PBS) を吸引しなくてすむようになり、微量な採取量で標的単一細胞の取得が可能となった。この新たな半自動細胞サンプリング装置は、二章で開発したプロトタイプの細胞サンプリング装置と比べて操作性およびスループットが著しく向上した。



ポジション1: 細胞サンプリングキャピラリー
取り付け時 (②)

ポジション2: 細胞回収時 (③)
微調製はマニピュレーター

ポジション3: 細胞サンプリングキャピラリー
取り外し時 (②)

ポジション4: キャピラリー内観察時 (④)

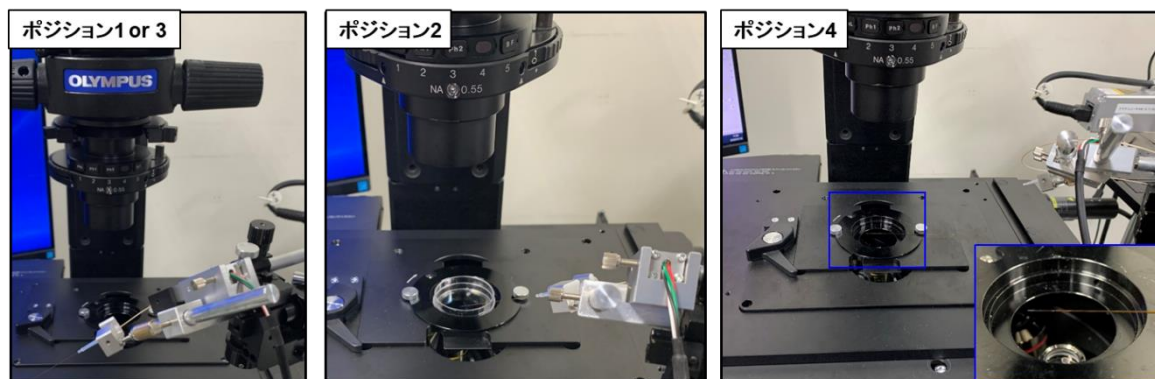


図3-4. 半自動細胞サンプリングシステムの3軸ロボットアームとメモリー機能による各処理工程の空間位置情報の設定.

3.3.2. ISPEC ver. 2 の開発

細胞サンプリングシステムによる回収時の半自動化に続いて、試料調製法 (ISPEC) におけるスループットの向上についても検討した。第二章で考案した ISPEC 法は細胞サンプリングキャピラリー、固相化トリプシンカラム、および nano-LC カラムの3つのキャピラリーを2つの PicoClear ユニオンを用いてゼロデッドボリュームで接続していた。しかし、常時2箇所の接続箇所を安定に接続するためには、十分な経験に基づく熟練した技術が必要である。そのため、接続箇所を2箇所から1箇所に変更することで、細胞前処理のスループットおよび成功確率の向上につながることを示唆された。そこで、接続箇所を1箇所に減らすために、内在タンパク質の酵素消化に固相化トリプシンカラムを用いたものから、トリプシン溶液をキャピラリー内に吸引し、変性したタンパク質試料と混合し反応させる方法への改変を行った。一方でこの細胞サンプリングキャピラリー内でのトリプシン溶液によるタンパク質消化法の懸念点は、消化効率の低下である。そのため、消化効率を向上させるために、細胞溶

解バッファー量を第二章で示した ISPEC で使用していた 200 nL から 12 nL に低減し，タンパク質濃度が高い状態でトリプシン溶液による酵素消化を行った．具体的な操作方法としては，半自動細胞サンプリングシステムを使用して細胞サンプリングキャピラリー内に細胞溶解バッファー，ターゲット細胞，細胞溶解バッファー，トリプシン溶液の順に，顕微鏡下で連続的に吸引した．次に，細胞サンプリングキャピラリーを 50 °C のオーブン内で 30 分間反応させることにより，ペプチド消化物を得た (図 3-5)．以上の結果から，細胞溶解からタンパク質の抽出，変性，ペプチドへの酵素消化までの試料調製操作を 1 本の細胞サンプリングキャピラリー内で完結させることができた．このことから，当該 1 細胞試料調製法を ISPEC ver. 2 と命名した．ISPEC ver. 2 は上記の改良と半自動細胞サンプリングシステムの使用により，従来の ISPEC と比較して 1 細胞のサンプル調製にかかる時間を 2 時間から 1 時間に短縮することに成功した．

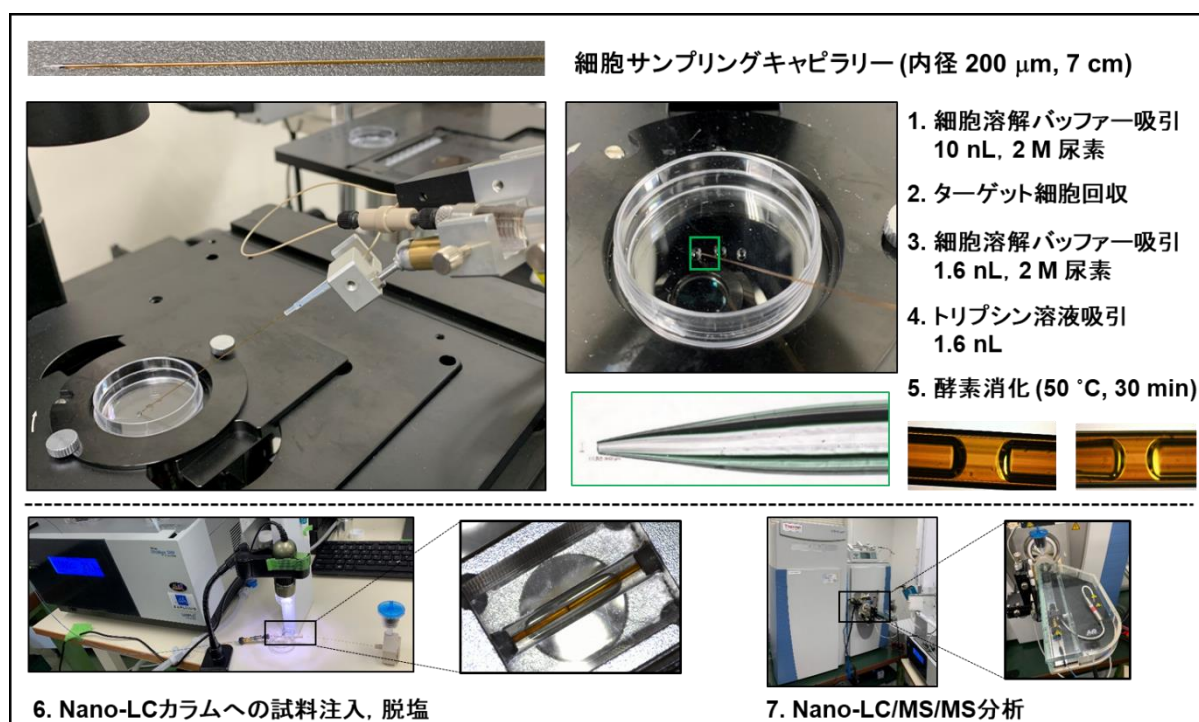
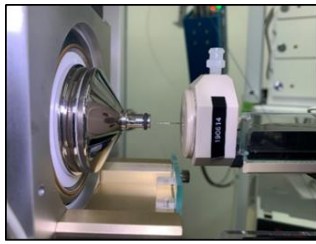


図 3-5. ISPEC ver. 2 のワークフロー.

3.3.3. 活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースの評価

第二章で使用した nano-ESI イオンソースは、オープンソースタイプの装置であった。そのため、実験室中に存在するシロキサン等が、サンプルと一緒に MS へ導入されてしまい、バックグラウンドのイオン強度が高いという問題点があった。このような周囲環境の影響を受けにくくするための手段として、密閉型の nano-ESI イオンソースの使用が考えられた。そこで、国内の AMR 社が開発した活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソース (Dream spray, AMR Inc) の利用を検討した。Dream spray の利点は、(1) 活性炭フィルターを通った純度の高い空気を一定方向から流入することで気流が形成されイオン導入効率が向上すること⁶⁴、(2) 密閉型 nano-ESI イオンソースの空気の流入口に活性炭フィルターを備えることにより、活性炭フィルターによるシロキサン等のバックグラウンドイオンの原因となる物質の除去が期待できることである。

上記の活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースが、少数細胞分析に与える効果を検証するために、3種類の nano-ESI イオンソース条件を用いて比較検討した (図 3-6)。条件 1 では標準的に付属しているオープンソースを使用した (コントロール条件)。条件 2 はイオン導入効率の向上を検証するために、密閉型 nano-ESI イオンソースを使用した。条件 3 はバックグラウンドイオンの低減効果を検証するために、活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを使用した。また、バルクスケールの HeLa 細胞から調製したペプチド消化物 10 ng (50 細胞相当) および 1 ng (5 細胞相当) を 3 種の nano-ESI イオンソースを搭載した nano-LC/MS/MS システムにて評価した。



条件1
(Open source)



条件2
(Closed source)



条件3
(Closed source with charcoal filter)

図 3-6. Nano-ESI イオンソース条件.

各 nano-ESI イオンソース条件の評価は、2種の試料に対して試行回数3回で同定されたペプチド数およびタンパク質数の平均値を基に実施した。各システムへの消化ペプチドの導入量が 10 ng (50 細胞相当) での分析結果は、条件 1 (オープンソース) では 1101 ペプチドおよび 366 タンパク質であり、条件 2 (密閉型 nano-ESI イオンソース) では 1200 ペプチドおよび 400 タンパク質、条件 3 (活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソース) では 1371 ペプチドおよび 449 タンパク質がそれぞれ同定された (図 3-7. a, b)。条件 2 の密閉型 nano-ESI イオンソースは、条件 1 のオープンソースと比較してイオンの導入効率が向上することにより、ペプチドおよびタンパク質の同定数が約 1.1 倍向上した。また、条件 3 の活性炭を備えた密閉型 nano-ESI イオンソースは、バックグラウンドイオンが低減されることで、条件 1 と比べてペプチドおよびタンパク質同定数が約 1.2 倍増加した。

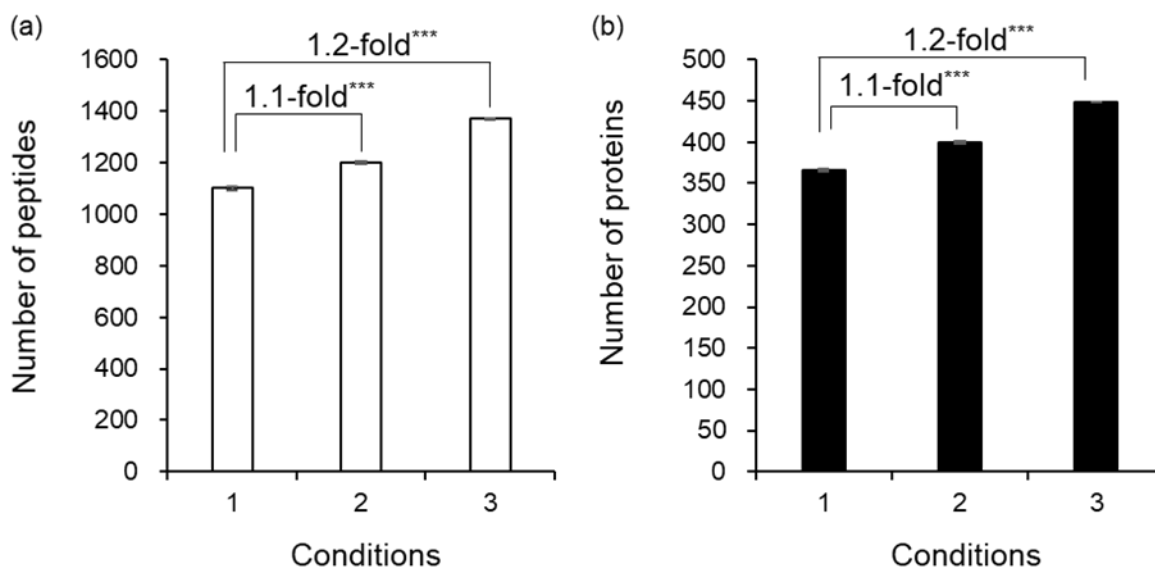


図 3-7. 各 nano-ESI イオンソース条件下における 10 ng の HeLa 細胞消化物 (50 細胞相当) のショットガンプロテオミクス解析結果.

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 ± 標準偏差 ($n=3$). 統計解析は Student's *t* 検定により決定した (***) $p < 0.001$.

続いて, 1 ng のペプチド消化物 (5 細胞相当) の分析結果では, 条件 1 (オープンソース) で 290 ペプチドおよび 117 タンパク質, 条件 2 (密閉型 nano-ESI イオンソース) で 393 ペプチドおよび 162 タンパク質, 条件 3 (活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソース) で 476 ペプチドおよび 188 タンパク質がそれぞれ同定された. 条件 2 の密閉型 nano-ESI イオンソースを使用することにより, 条件 1 のオープンソースと比較して, 同定されたペプチド数およびタンパク質数は約 1.4 倍向上した. また, 条件 3 の活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを使用することで, 条件 1 と比べて同定ペプチド数およびタンパク質数は約 1.6 倍増加した (図 3-8. a, b).

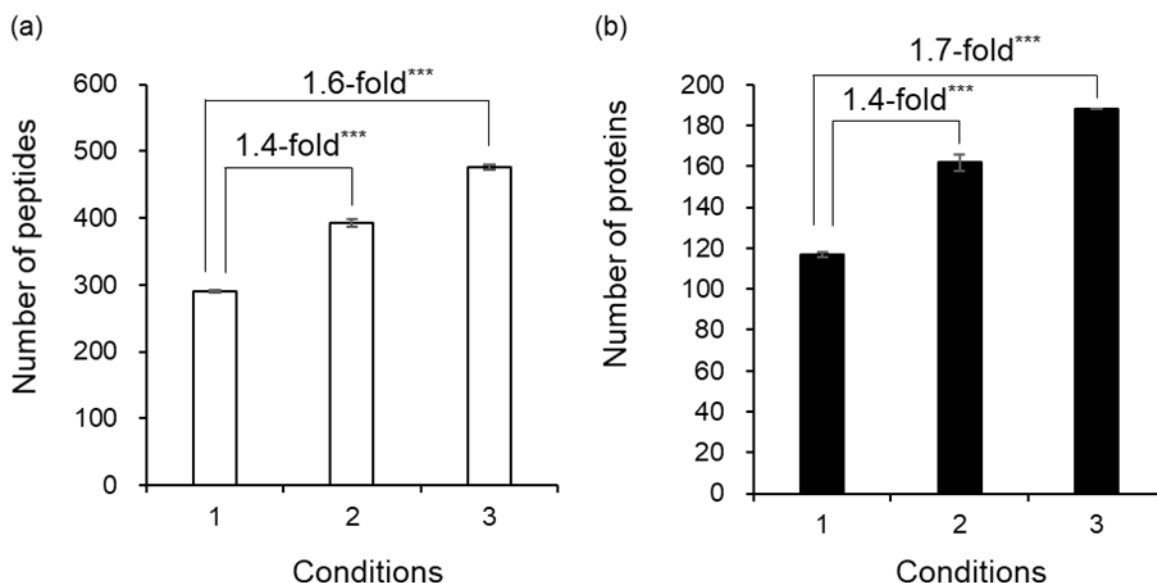


図 3-8. 各 nano-ESI イオンソース条件下における 1 ng の HeLa 細胞消化物 (5 細胞相当) のショットガンプロテオミクス解析結果.

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した ($***p < 0.001$).

上記の結果から, 条件 3 の活性炭を備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを使用することにより, nano-ESI に導入されるペプチド試料量の低下に伴い, その効果が顕著に表れることが示された.

3.3.4. ISPEC ver. 2 の評価

1 細胞ショットガンプロテオミクスのカバレッジを向上させるために, 1) 半自動サンプリングシステムおよび ISPEC ver. 2, 2) 内径 30 μm の nano-LC カラムを用いたカラム内径のダウンサイジング (第二章では内径 100 μm の nano-LC カラムを使用), 3) 活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを統合した高感度 1 細胞解析システムを開発した. そこで, 当該システムを用いた実用性の評価を行った.

高感度分析システムを使用して, ISPEC ver. 2 で調製した HeLa 1 細胞およびバルク

HeLa 細胞 (1×10^6 個) からチューブベースの従来法で調製した 1 細胞相当のペプチド消化物 (ポジティブコントロール) の分析を行った (試行回数 $n = 3$). その結果, ポジティブコントロールから 266 ペプチド, 107 タンパク質, ISPEC ver. 2 で調製した単一 HeLa 細胞から 421 ペプチド, 166 タンパク質が同定された. ポジティブコントロール (1 細胞相当消化断片) と比べて, ISPEC ver. 2 を用いたシングルセル解析の方が, ペプチドおよびタンパク質の同定数は約 1.6 倍向上した (図 3-9. a, b). この理由としては, ポジティブコントロールは, 1 細胞相当のサンプルを調製する際に, 低吸着バイアル内で試料を希釈しているため, バイアル壁面等への試料吸着の影響が考えられた.

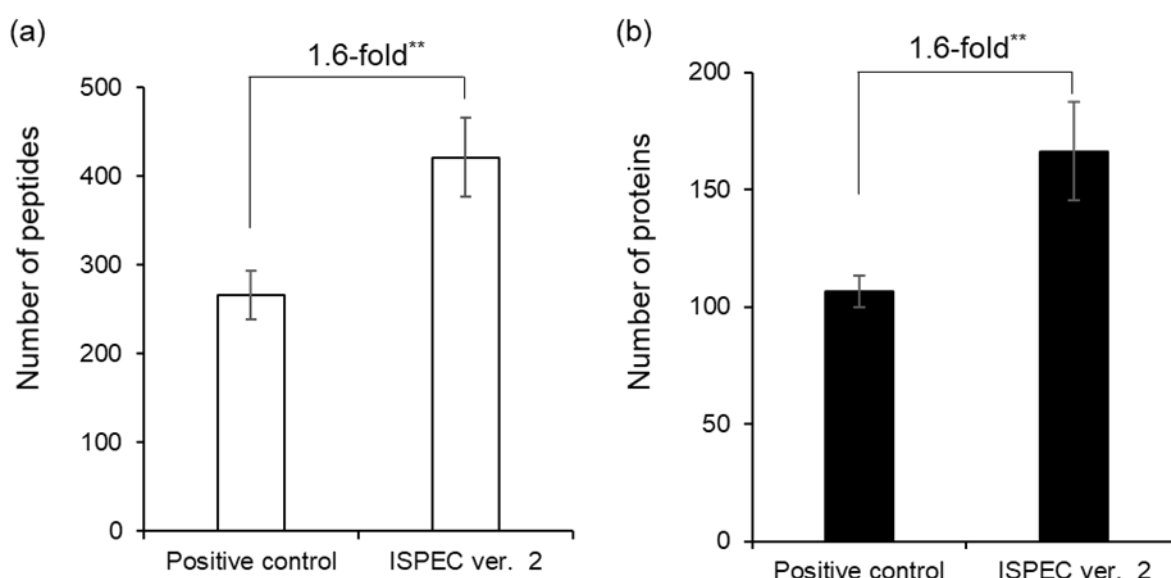


図 3-9. 各サンプル調製法によるショットガンプロテオミクスの結果.

(a) ペプチド同定数. (b) タンパク質同定数. Positive control: 1×10^6 細胞をバルクスケールでの試料調製法で処理したペプチド消化物に対して 1 細胞相当量の試料を nano-LC/MS/MS で分析した結果. 平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した (** $p < 0.01$).

次に ISPEC ver. 2 を駆使した高感度 1 細胞プロテオーム解析で取得したデータを用いて, Feature Mapper node による再解析を行った. これまでのショットガンプロテオ

ミクスによるペプチドの同定は MS/MS が取得できたプリカーサーイオンに対してのみ実施していた。しかし、消化ペプチドの数は 10 万種を超えるため、nano-LC での完全分離は不可能であり、いくつかのペプチドが同時に溶出した場合 dd-MS/MS の取りこぼしが必ず生じる。特にイオン強度の低い複数のペプチドピークが同時溶出した場合、MS/MS が取得できるペプチド種は一定ではなく毎回異なる。つまり、MS/MS スペクトルが取得できていないこと自体がそのペプチドが存在しないことを示すわけではなく、結果的に MS/MS スペクトルが取得できていない場合は欠損値として扱うことになる。これが dd-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスの最大の欠点である。Feature Mapper node 法とは、この問題を解決するためのデータマイニング処理を指す。例えば、同じサンプル群の $n = 3$ (A, B, C) のデータの中で、ペプチド X の MS/MS スペクトルがサンプル A に対してのみ取得できた場合、サンプル B と C のデータは欠損値となる。しかし、実際にはサンプル B と C のペプチド X のプリカーサーイオンが検出されている場合は、プリカーサーイオンの精密質量および nano-LC の保持時間の一致度を指標にペプチド X の同定を行う。そのため、Feature Mapper node 法を使用することでペプチド同定の正確性を担保しつつ欠損値が低減することとなる。この解析方法により、HeLa 1 細胞から 3 回の分析で共通で同定されたタンパク質の数が 90 タンパク質から 108 タンパク質に増加した (図 3-10. a, b)。当該結果から、以降のデータは Feature Mapper node で解析したデータを使用して議論を進めることにする。

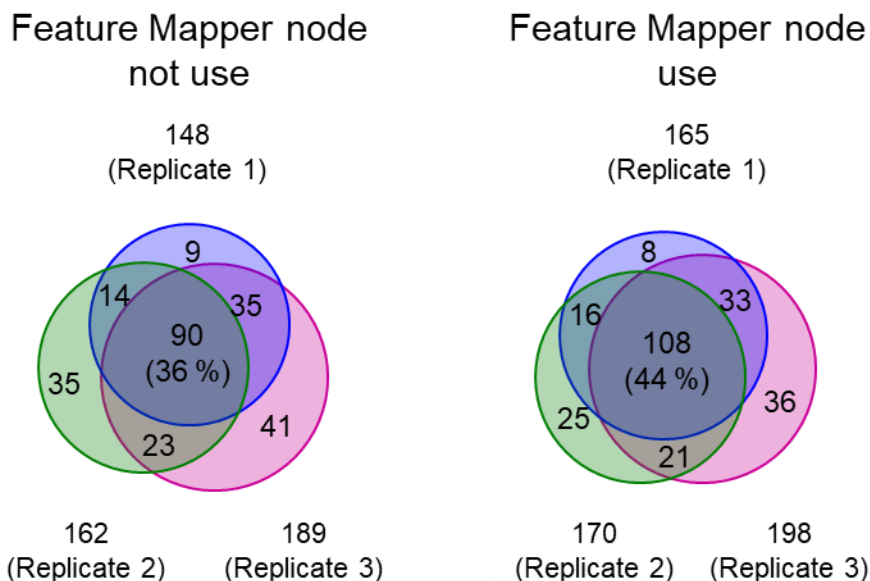


図 3-10. Feature Mapper node 法の 1 細胞プロテオミクスカバレッジへの影響.

次に、ポジティブコントロールと ISPEC ver. 2 の酵素消化効率について、第二章の 2.3.2 項で示した手法同様に、同定されたペプチドのうち切断ミスのないペプチドの割合によって評価した。バルクスケールでの試料調製法および ISPEC ver. 2 の消化効率はそれぞれ、95%および 92%であり、サンプル調製法の違いによる消化効率の有意な差は見られなかった ($P = 0.06$, Student's t 検定)。ISPEC ver. 2 は溶液トリプシンを使用しているにも関わらず、細胞溶解バッファー量を低減することにより、従来法と同等の消化効率を示した (図 3-11)。

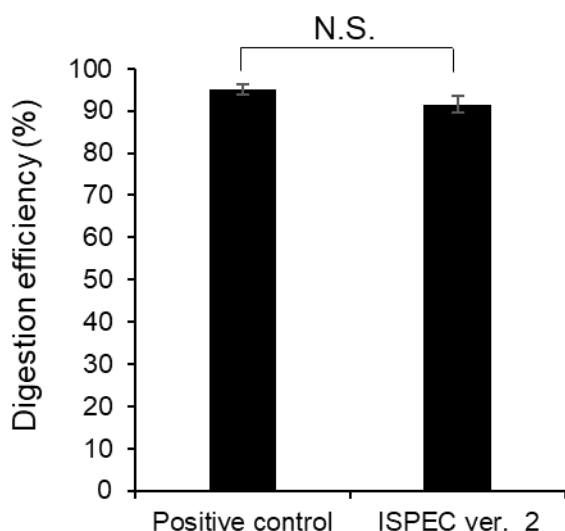


図 3-11. 従来法と ISPEC ver. 2 の消化効率の比較.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した (N.S., not significant).

またポジティブコントロールの結果で3回の分析で1回以上同定されたタンパク質の89%が ISPEC ver. 2 で同定された. すなわち, サンプル調製方法の違いによって同定されるペプチドの種に大きな差は見られなかった (図 3-12). これらの結果から, ISPEC ver. 2 が ISPEC と同様に試料損失を低減し, 高い消化効率を有していることが示された.

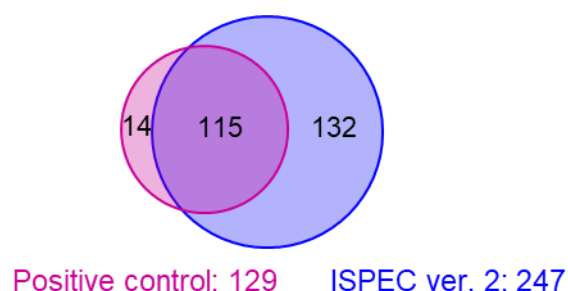


図 3-12. 従来法と ISPEC ver. 2 により同定されたタンパク質の相関関係.

3.3.5. 1 細胞由来のタンパク質同定結果に対する妥当性と信頼性評価

同定されたペプチドが細胞に由来する場合, 細胞数と同定されたペプチドのプリカ

一サーイオンのピーク強度との間に直線性が確認されるはずである。1, 3, 10 個の HeLa 細胞を出発試料として ISPEC ver. 2 により調製し, 高感度 nano-LC/MS/MS 分析システムに供した。各細胞数において, 試行回数 3 回で同定されたペプチド数およびタンパク質数の平均値をもとに解析を行った。細胞懸濁液の上清 (ブランク) 分析から 26 ペプチドと 18 タンパク質が同定された。ブランク分析から同定されたペプチドは各細胞数から得られたプロテオミクスの同定結果から除外した。その結果, 1, 3, 10 細胞で同定されたペプチド数およびタンパク質数の平均値はそれぞれ, 773 および 284, 1114 および 337, 1765 および 498 であった。細胞数の増加とともに, 同定されたペプチド数およびタンパク質数が増加した (図 3-13. a, b)。また, 1 および 3 細胞で同定されたタンパク質の 97%が 10 細胞で同定されたタンパク質に含まれていた (図 3-14)。

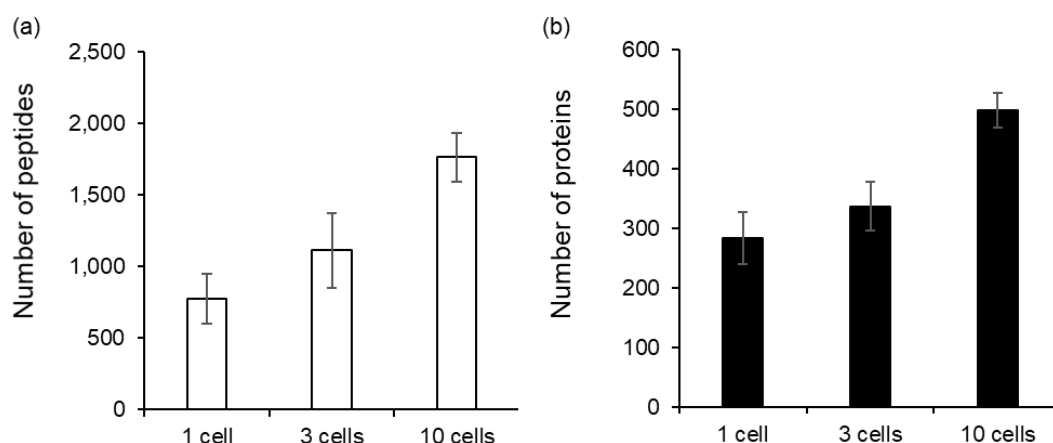


図 3-13. ISPEC ver. 2 による少数細胞 (1, 3, 10) のショットガンプロテオミクスの結果。

(a) 同定されたペプチド数. (b) 同定されたタンパク質数.

平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$).

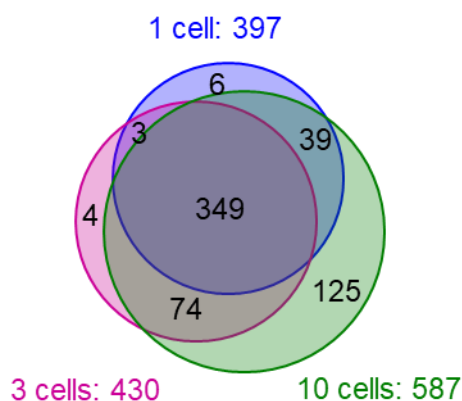


図 3-14. ISPEC ver. 2 による少数細胞 (1, 3, 10) のショットガンプロテオミクスにより同定されたタンパク質の相関関係.

次に 1 細胞での 3 回の分析のうち 2 回以上の分析で同定された 366 ペプチド (164 タンパク質) のピーク強度と細胞数の関係を調査した. その結果, 311 ペプチド (141 タンパク質) について相関係数 (R^2) が 0.94 以上と良好な直線性を示した (図 3-15).

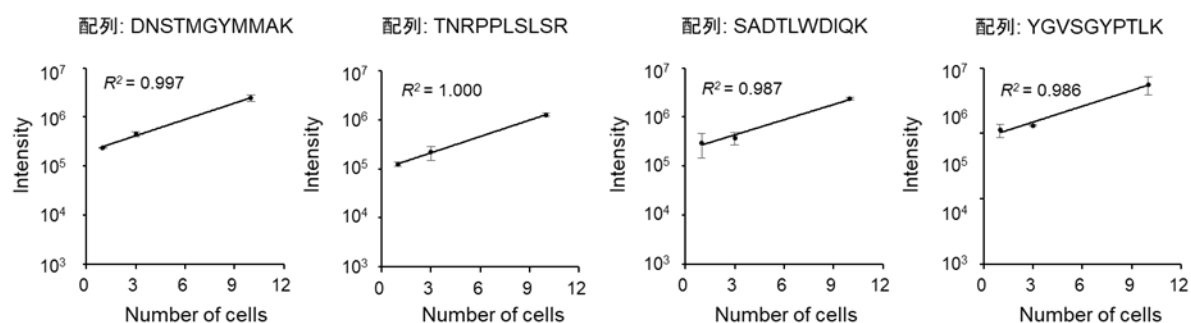


図 3-15. 1, 3, 10 細胞から共通で同定されたペプチドのプリカーサーイオンのピーク強度と細胞数の関係.

平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$).

3.3.6. 高感度 1 細胞プロテオーム分析システムの評価

第二章で使用した従来システムによる 1 細胞および 10 細胞で同定されたペプチド数およびタンパク質数の値を基準に, 第三章で開発した超高感度 1 細胞ショットガ

ンプロテオミクス分析システムの有用性を評価した。その結果、ISPEC ver. 2, 内径 30 μm のカラム, 密閉型 nano-ESI イオンソースを統合した高感度分析システムは第二章で開発した従来分析システムと比べて, 10 細胞から同定されたペプチド数が約 3 倍, タンパク質数が約 2 倍増加した。さらに, 1 細胞から同定されたペプチド数が約 13 倍, タンパク質数が約 9 倍向上したことから (図 3-16), 高感度分析システムの性能向上が明らかとなった。

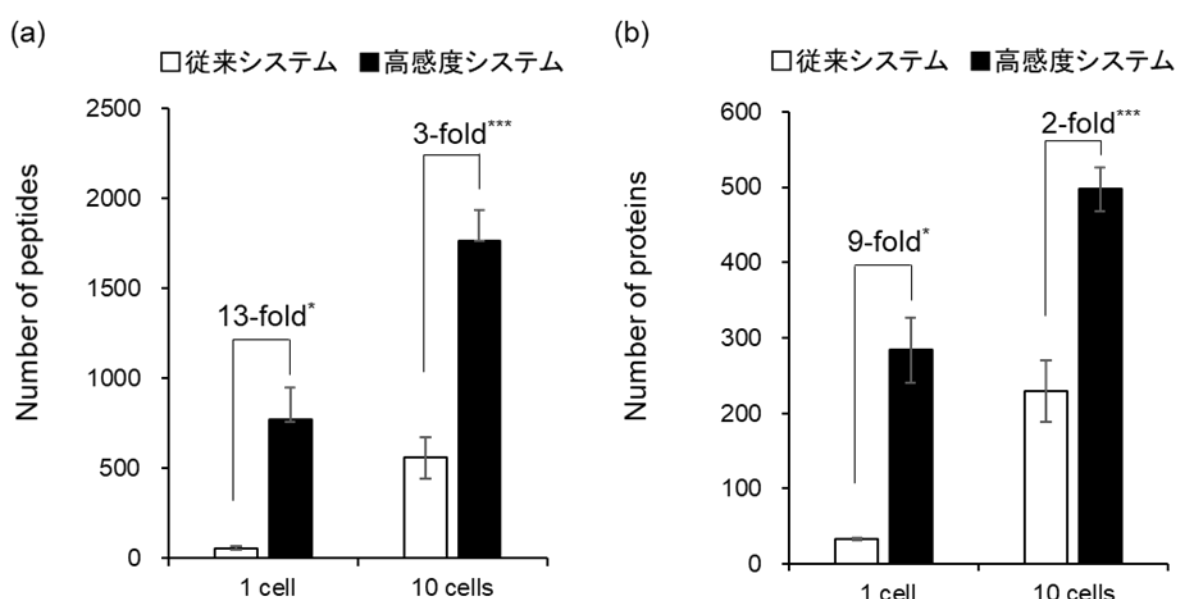


図 3-16. 第二章で開発した従来分析システムと第三章で開発した高感度分析システムによるショットガンプロテオミクスの結果。

(a) ペプチド同定数. (b) タンパク質同定数. 平均値 \pm 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定あるいは Welch's t 検定により決定した (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

また, 代謝酵素に着目した場合, 第二章で開発した分析システムによる HeLa 1 細胞のプロテオーム解析結果では, 発現量の多い解糖系の 2 種類の酵素 (PGK1, LDHB) しか同定できていなかったのに対し, 本章で開発した高感度システムでは解糖系の酵素 11 種類, TCA サイクルの酵素 4 種類, ペントースリン酸経路の酵素 5 種類の同定に成功した (表 3-1). 同定した代謝酵素のうち 1 細胞, 10 細胞から共通で同定された

ペプチドのピーク強度の平均値 ($n = 3$) を比較したところ、その差は約 10 倍となっており、高感度分析システムにより定量的なデータを得ることができた (図 3-17)。

表 3-1. 第二章で開発した従来分析システムと第三章で開発した高感度分析システムにより同定された代謝酵素.

代謝経路	分析システム	Symbol
Glycolysis	共通	PGK1, LDHB
	高感度システム	GPI, PFKP, ALDOA, TPI1, GAPDH, PGAM1, ENO1, PKM, LDHA
Tricarboxylic acid cycle	高感度システム	CS, IDH1, MDH1, MDH2
Pentose phosphate pathway	高感度システム	G6PD, PGD, TKT, TALDO1, PRPS1L1

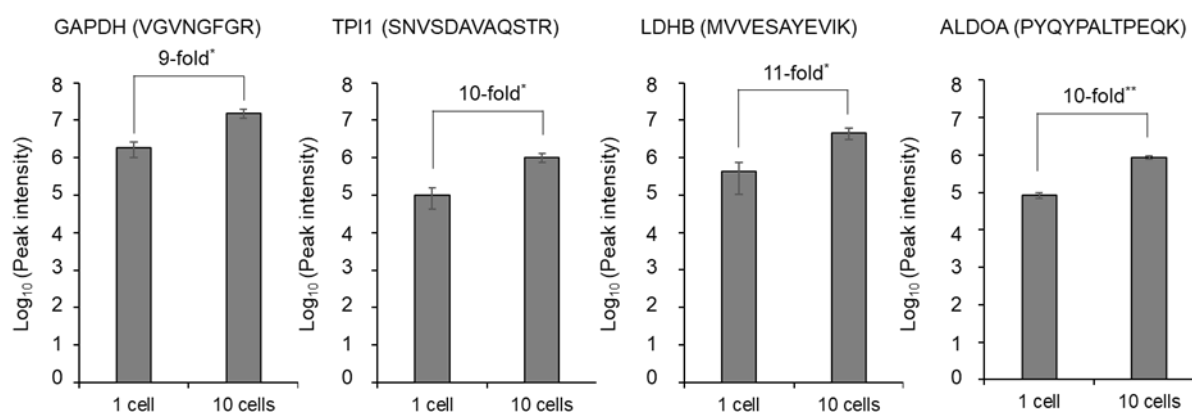


図 3-17. 高感度システムにより同定された代謝酵素のプリカーサーイオンのピーク強度と細胞数の関係.

平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$). 統計解析は Student's t 検定により決定した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.4. 小括

本章では第二章で開発した分析システムの課題である，細胞単離，試料調製，nano-LC/MS/MS 分析の各工程のスループットの向上とシステム全体の高感度化を行った．細胞単離工程における精度とスループットの向上のために，半自動細胞サンプリングシステムを開発した．半自動細胞サンプリングシステムは，3軸ロボットアームを追加し，アームの一つに吸引吐出用のポンプを接続することで，細胞サンプリングキャピラリーの可動範囲が拡大し，移動速度も向上した．また，異なる空間位置を記憶させることにより，制御画面をワンタッチすることで目的の作業場所に迅速に移動可能となった．さらに，細胞サンプリングキャピラリーの先端をテーパ形状にすることにより，細胞サンプリングの精度およびサンプリングの時間短縮につながった．試料調製工程については，キャピラリー同士の接続箇所の低減のために，固相化トリプシンカラムの代わりに，トリプシン溶液をキャピラリー内に吸引し，変性したタンパク質試料と混合し反応させることで，ペプチド消化までを細胞サンプリングキャピラリー内で完結することのできる ISPEC ver. 2 を考案した．実際に，細胞溶解バッファ量を従来の ISPEC と比べて 1/20 以下にすることにより，高い消化効率を得られることが確認できた．この半自動化細胞サンプリングシステムと ISPEC ver. 2 を統合することで，第二章で示したシステムと比較して，サンプル調製時におけるスループットが2倍に向上した．

Nano-LC/MS/MS 工程においては，分析システムの高感度化のために，カラム内径のダウンサイジングと nano-ESI イオンソースを変更した．カラム内径は内径 100 μm から 30 μm に変更した (理論感度上昇 11 倍)．イオン化の工程における高感度化のために，密閉型 nano-ESI イオンソースによるイオン導入効率の向上と活性炭フィルターの使用によるバックグラウンドイオンの除去による S/N 比の改善を行った．その結果，活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースは，5 細胞以下のより少量のサンプルを対象とした試料に対してペプチドおよびタンパク質の同定数の向上に大きく寄与することが示された．最後に半自動細胞サンプリングシステム，ISPEC

ver. 2, 内径 30 μm の nano-LC カラム, 活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを統合した高感度分析システムを構築し, その有用性について HeLa 細胞を用いて評価した. その結果, 分析に使用した細胞数と各ペプチドのシグナル強度に直線性を確認できたことから, 本分析システムが定量的な手法であることが示された. さらに, 1 細胞から 284 個 ($n = 3$) のタンパク質の同定に成功し, 第二章で開発した分析システムの結果 (33 タンパク質) と比較して劇的にタンパク質の同定数が向上したため, 1 細胞ショットガンプロテオミクスに向け, 優位な分析システムの開発モデルを示すことができたと考えられる.

第四章 総括と展望

本研究では 1 細胞ショットガンプロテオミクスのためのフューズドシリカキャピラリーを基盤としたインラインサンプル調製法の開発および高感度ショットガンプロテオミクスに向けた分析システムを開発した。第二章では，試料調製時の試料損失を低減するために，ターゲット細胞の回収とショットガンプロテオミクスのための試料調製が統合された ISPEC (in-line sample preparation for efficient cellular proteomics) を考案した。本調製法は，ターゲット細胞の回収とショットガンプロテオミクスのための試料調製を連動させ，フューズドシリカキャピラリー内で試料調製をナノリッタースケールで実施し，さらに nano-LC カラムへの試料導入までをインライン化することで，試料損失を可能な限り低減させる方法であった。当該システムを用いて少数細胞のショットガンプロテオミクス解析を実施したところ，単一 HeLa 細胞から平均 33 タンパク質 ($n=3$) の同定に成功した。

第三章では，細胞単離，試料調製，nano-LC/MS/MS 分析の各工程のスループットの向上およびシステム全体のさらなる高感度化を検討した。細胞単離工程のスループット向上は，従来の細胞サンプリングシステムを半自動化することにより解決した。半自動細胞サンプリングシステムは，異なる空間位置を記憶させることで，ワンタッチで目的の作業場所に迅速に移動させることができ，結果的に標的細胞の迅速なサンプリングを実現可能にした。さらに，細胞サンプリングキャピラリーの先端をテーパ形状にすることにより，細胞サンプリング精度の向上およびサンプリングの時間短縮につながった。試料調製工程においては，細胞溶解からタンパク質の抽出，変性，ペプチドへの酵素消化までの試料調製操作を 1 本の細胞サンプリングキャピラリー内で完結させることで，キャピラリーの接続箇所を 2 箇所から 1 箇所に変更した。それにより細胞前処理のスループットおよび 1 細胞分析の成功確率の向上につながった。さらに消化効率の改善のために，細胞溶解バッファー量を従来の ISPEC ver. 1 と比べて 1/20 以下にすることにより，高い消化効率を得ることができた。半自動細胞サンプリング

リングシステムと ISPEC ver. 2 の連動により，サンプル調製工程のスループットが 2 倍に向上した．Nano-LC/MS/MS 分析システムの高感度化のために，半自動細胞サンプリングシステム，ISPEC ver. 2，内径 30 μm の nano-LC カラム，活性炭フィルターを備えた密閉型 nano-ESI イオンソースを統合した．この新たな高感度分析システムを用いて，1，3，および 10 個の HeLa 細胞のショットガンプロテオミクスを実施したところ，細胞数と各ペプチドのシグナル強度に直線性を確認できたことから，本分析システムが定量的な手法であることが示された．また単一の HeLa 細胞から 284 個のタンパク質 ($n=3$) の同定に成功し，本システムの有用性が示された．

本研究では試料損失の少ない試料調製法の開発，クロマトグラフィー工程の高感度化，イオン化部における高感度化を統合することで，高感度分析が可能になるという，優位な分析システムの開発モデルを示すことができたと考える．さらなる分析システムの高感度化の手法として，カラム内径の 15 μm 以下へのダウンサイズ⁶⁵が考えられる．しかしカラム内径のさらなるダウンサイジングは，カラムの取り扱いがさらに難しくなることや，流量がさらに微量になることによる送液の安定性など，いくつかの課題が存在する．

本研究で開発した試料調製法の特徴の一つは，顕微鏡下で細胞の詳細な形態学的情報を取得しながら，注目すべき単一細胞を迅速にサンプリング可能な点である．このような形態学的なイメージング情報とプロテオームの発現情報を組み合わせることでタンパク質の分子フェノタイピング解析が可能となり，従来のバルク解析では発見できなかった生命現象に対する重要タンパク質の同定に貢献できると考えられる．また本研究で開発した細胞サンプリングシステムは，プロテオミクスのみならず，メタボロミクスのための試料調製についても適用が可能である．1 細胞からのプロテオーム，メタボローム情報の同時取得が今後の課題である．本研究で開発した高感度 1 細胞プロテオーム分析システムが CTC やがん幹細胞の特徴づけ，がん細胞の異種性に関する知見の取得につながることを期待して結びの言葉とする．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，格別なる御指導と御鞭撻を賜りました九州大学大学院システム生命科学府システム生命科学専攻の馬場健史教授，和泉自泰准教授に謹んで感謝の意を表します．プロテオミクスについての知識および技術的指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科の松本雅記教授に謹んで感謝の意を表します．また，博士論文の主査を快諾して下さいました久保田浩行教授，副査を快諾して下さいました神田大輔教授と大川恭行教授に深く感謝致します．

本研究で構築した細胞サンプリングシステムの開発に協力頂きました，ヨダカ技研株式会社の平藤衛氏，Dream Spray について御教授頂いた AMR 株式会社の確井史彦氏，窒素発生装置のデモに御協力頂きました，PEEK SCIENTIFIC の山本充芳氏，林智也氏，プロテオミクスの解析方法等について御教授頂いた Thermo Fisher Scientific の高原健太郎氏に深く感謝致します．

研究に関する技術や知識等，数多くの御指導および，研究室生活全般において大変お世話になりました九州大学院システム生命科学府システム生命科学専攻生命医科学講座メタボロミクス分野の方々に深く感謝いたします．特にクロマトグラフィーに関する技術や知識等についてご指導頂きました原健士特任准教授，質量分析計の操作方法等の技術的な指導をして頂きました，高橋政友特任助教，中谷航太修士，解析方法等についてご指導頂きました中尾素直博士に心より御礼申し上げます．本論文に直接関与しないテーマも含め共同研究等でお世話になりました大学，民間企業，その他研究機関の方々に感謝致します．

最後に，本研究にあたり，応援してくれた両親・秦孝治，洋子，私にかわり家庭を支えてくれた義母・高宮スズ子，妻・相子，そして私に元気を与えてくれた子・明日香，颯杜に深く感謝します．

引用文献

- (1) Hu, P.; Zhang, W.; Xin, H.; Deng, G. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 116.
- (2) Leung, C. T.; Brugge, J. S. *Cell* **2009**, *139*, 1226-1228.
- (3) Papaccio, F.; Paino, F.; Regad, T.; Papaccio, G.; Desiderio, V.; Tirino, V. *Stem cells translational medicine* **2017**, *6*, 2115-2125.
- (4) Islam, F.; Qiao, B.; Smith, R. A.; Gopalan, V.; Lam, A. K. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *98*, 184–191.
- (5) Gerlinger, M.; Rowan, A. J.; Horswell, S.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; Tarpey, P.; Varela, I.; Phillimore, B.; Begum, S.; McDonald, N. Q.; Butler, A.; Jones, D.; Raine, K.; Latimer, C.; Santos, C. R.; Nohadani, M.; Eklund, A. C.; Spencer-Dene, B.; Clark, G.; Pickering, L.; Stamp, G.; Gore, M.; Szallasi, Z.; Downward, C.; Futreal, P. A.; Swanton, C. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 883–892.
- (6) Irish, J. M.; Kotecha, N.; Nolan, G. P. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 146–155.
- (7) Saunders, N. A.; Simpson, F.; Thompson, E. W.; Hill, M. M.; Endo - Munoz, L.; Leggatt, G.; Minchin, R. F.; Guminski, A. *EMBO Mol Med.* **2012**, *4*, 675–684.
- (8) Regev, A.; Teichmann, S. A.; Lander, E. S.; Amit, I.; Benoist, C.; Birney, E.; Bodenmiller, B.; Campbell, P.; Carninci, P.; Clatworthy, M. *Elife* **2017**, *6*, e27041.
- (9) Consortium, H. *Nature* **2019**, *574*, 187.
- (10) Levy, S. E.; Myers, R. M. *Annual review of genomics and human genetics* **2016**, *17*, 95-115.
- (11) Shapiro, E.; Biezuner, T.; Linnarsson, S. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 618–630.
- (12) Yates, L. R.; Campbell, P. J. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 795–806.
- (13) Harada, A.; Maehara, K.; Handa, T.; Arimura, Y.; Nogami, J.; Hayashi-Takanaka, Y.; Shirahige, K.; Kurumizaka, H.; Kimura, H.; Ohkawa, Y. *Nat. cell biol.* **2019**, *21*, 287-296.
- (14) Sierant, M. C.; Choi, J. *Genomics & informatics* **2018**, *16*.

- (15) Chakraborty, S.; Hosen, M.; Ahmed, M.; Shekhar, H. U. *BioMed research international* **2018**, *2018*.
- (16) Irish, J. M.; Hovland, R.; Krutzik, P. O.; Perez, O. D.; Bruserud, Ø.; Gjertsen, B. T.; Nolan, G. P. *Cell* **2004**, *118*, 217–228.
- (17) Perfetto, S. P.; Chattopadhyay, P. K.; Roederer, M. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 648–655.
- (18) Bendall, S. C.; Simonds, E. F.; Qiu, P.; Amir, E. D.; Krutzik, P. O.; Finck, R.; Bruggner, R. V.; Melamed, R.; Trejo, A.; Ornatsky, O. I.; Balderas, R. S.; Plevritis, S. K.; Sachs, K.; Pe'er, D.; Tanner, S. D.; Nolan, G. P. *Science* **2011**, *332*, 687–696.
- (19) Atkuri, K. R.; Stevens, J. C.; Neubert, H. *Drug Metab Dispos.* **2015**, *43*, 227–233.
- (20) Peterson, V. M.; Zhang, K. X.; Kumar, N.; Wong, J.; Li, L.; Wilson, D. C.; Moore, R.; McClanahan, T. K.; Sadekova, S.; Klappenbach, J. A. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 936.
- (21) Levine, J. H.; Simonds, E. F.; Bendall, S. C.; Davis, K. L.; El-ad, D. A.; Tadmor, M. D.; Litvin, O.; Fienberg, H. G.; Jager, A.; Zunder, E. R. *Cell* **2015**, *162*, 184–197.
- (22) Bendall, S. C.; Simonds, E. F.; Qiu, P.; El-ad, D. A.; Krutzik, P. O.; Finck, R.; Bruggner, R. V.; Melamed, R.; Trejo, A.; Ornatsky, O. I. *Science* **2011**, *332*, 687–696.
- (23) Matsumoto, M.; Matsuzaki, F.; Oshikawa, K.; Goshima, N.; Mori, M.; Kawamura, Y.; Ogawa, K.; Fukuda, E.; Nakatsumi, H.; Natsume, T.; Fukui, K.; Horimoto, K.; Nagashima, T.; Funayama, R.; Nakayama, K.; Nakayama, K. I. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 251–258.
- (24) Yi, L.; Piehowski, P. D.; Shi, T.; Smith, R. D.; Qian, W. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1523*, 40–48.
- (25) Hopfgartner, G.; Bean, K.; Henion, J.; Henry, R. *J. Chromatogr. A* **1993**, *647*, 51–61.
- (26) Smith, R. D.; Shen, Y.; Tang, K. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 269–278.
- (27) Yue, G.; Luo, Q.; Zhang, J.; Wu, S.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 938–946.
- (28) Luo, Q.; Tang, K.; Yang, F.; Elias, A.; Shen, Y.; Moore, R. J.; Zhao, R.; Hixson, K. K.; Rossie, S. S.; Smith, R. D. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1091–1097.
- (29) Shen, Y.; Tolić, N.; Masselon, C.; Paša-Tolić, L.; Camp, D. G.; Hixson, K. K.; Zhao, R.;

- Anderson, G. A.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 144–154.
- (30) Michalski, A.; Damoc, E.; Lange, O.; Denisov, E.; Nolting, D.; Müller, M.; Viner, R.; Schwartz, J.; Remes, P.; Belford, M.; Dunyach, J.; Cox, J.; Horning, S.; Mann, M.; Makarov, A. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, O111. 013698.
- (31) Espadas, G.; Borràs, E.; Chiva, C.; Sabidó, E. *Proteomics* **2017**, *17*. 1600416.
- (32) Kelstrup, C. D.; Bekker-Jensen, D. B.; Arrey, T. N.; Högberg, A.; Harder, A.; Olsen, J. V. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 727–738.
- (33) Meier, F.; Beck, S.; Grassl, N.; Lubeck, M.; Park, M. A.; Raether, O.; Mann, M. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 5378–5387.
- (34) Zhu, Y.; Zhao, R.; Piehowski, P. D.; Moore, R. J.; Lim, S.; Orphan, V. J.; Paša-Tolić, L.; Qian, W.; Smith, R. D.; Kelly, R. T. *Int. J. Mass Spectrom.* **2018**, *427*, 4–10.
- (35) Bark, S. J.; Hook, V. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 4511–4516.
- (36) Wiśniewski, J. R.; Ostasiewicz, P.; Mann, M. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 3040–3049.
- (37) Hughes, C. S.; Foehr, S.; Garfield, D. A.; Furlong, E. E.; Steinmetz, L. M.; Krijgsveld, J. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*, 757.
- (38) Virant-Klun, I.; Leicht, S.; Hughes, C.; Krijgsveld, J. *Mol. Cell. Proteomics* **2016**, *15*, 2616–2627.
- (39) Li, S.; Plouffe, B. D.; Belov, A. M.; Ray, S.; Wang, X.; Murthy, S. K.; Karger, B. L.; Ivanov, A. R. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 1672–1683.
- (40) Zhu, Y.; Piehowski, P. D.; Zhao, R.; Chen, J.; Shen, Y.; Moore, R. J.; Shukla, A. K.; Petyuk, V. A.; Campbell-Thompson, M.; Mathews, C. E.; Smith, R. D.; Qian, W.; Kelly, R. T. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 882.
- (41) Li, Z. Y.; Huang, M.; Wang, X. K.; Zhu, Y.; Li, J. S.; Wong, C. C. L.; Fang, Q. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5430–5438.
- (42) Zhu, Y.; Clair, G.; Chrisler, W. B.; Shen, Y.; Zhao, R.; Shukla, A. K.; Moore, R. J.; Misra, R. S.; Pryhuber, G. S.; Smith, R. D.; Ansong, C.; Kelly, R. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**,

- 57, 12370–12374.
- (43) Vandermarliere, E.; Mueller, M.; Martens, L. *Mass spectrometry reviews* **2013**, *32*, 453-465.
- (44) León, I. R.; Schwämmle, V.; Jensen, O. N.; Sprenger, R. R. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 2992-3005.
- (45) Cortes, H. J.; Pfeiffer, C. D.; Richter, B. E.; Stevens, T. S. J. *High Resolut. Chromatogr.* **1987**, *10*, 446–448.
- (46) Izumi, Y.; Okazawa, A.; Bamba, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648*, 215–225.
- (47) Ishihama, Y.; Rappsilber, J.; Andersen, J. S.; Mann, M. *J. Chromatogr. A* **2002**, *979*, 233–239.
- (48) Glatter, T.; Ludwig, C.; Ahrne, E.; Aebersold, R.; Heck, A. J.; Schmidt, A. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 5145–5156.
- (49) Ma, J.; Zhang, L.; Liang, Z.; Zhang, W.; Zhang, Y. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *632*, 1–8.
- (50) Hsieh, Y. F.; Wang, H.; Elicone, C.; Mark, J.; Martin, S. A.; Regnier, F. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 455-462.
- (51) Kim, S. C.; Chen, Y.; Mirza, S.; Xu, Y.; Lee, J.; Liu, P.; Zhao, Y. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3446–3452.
- (52) Sun, L.; Hebert, A. S.; Yan, X.; Zhao, Y.; Westphall, M. S.; Rush, M. J. P.; Zhu, G.; Champion, M. M.; Coon, J. J.; Dovichi, N. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13931–13933.
- (53) Wang, N.; Xu, M.; Wang, P.; Li, L. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2262-2271.
- (54) Kyte, J.; Doolittle, R. F. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
- (55) Brownridge, P.; Beynon, R. J. *Methods* **2011**, *54*, 351-360.
- (56) Fonslow, B. R.; Stein, B. D.; Webb, K. J.; Xu, T.; Choi, J.; Park, S. K.; Yates III, J. R. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 54.

- (57) Bekker-Jensen, D. B.; Kelstrup, C. D.; Batth, T. S.; Larsen, S. C.; Haldrup, C.; Bramsen, J. B.; Sørensen, K. D.; Høyer, S.; Ørntoft, T. F.; Andersen, C. L.; Nielsen, M. L.; Olsen, J. *V. Cell Syst.* **2017**, *4*, 587–599.
- (58) Nagaraj, N.; Wisniewski, J. R.; Geiger, T.; Cox, J.; Kircher, M.; Kelso, J.; Pääbo, S.; Mann, M. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 548.
- (59) Specht, H.; Slavov, N. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 2565-2571.
- (60) Gross, A.; Schoendube, J.; Zimmermann, S.; Steeb, M.; Zengerle, R.; Koltay, P. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 16897-16919.
- (61) Yoshimoto, N.; Kida, A.; Jie, X.; Kurokawa, M.; Iijima, M.; Niimi, T.; Maturana, A. D.; Nikaido, I.; Ueda, H. R.; Tatematsu, K. *Scientific reports* **2013**, *3*, 1191.
- (62) Kondo, Y.; Hayashi, K.; Kawakami, K.; Miwa, Y.; Hayashi, H.; Yamamoto, M. *BMC cancer* **2017**, *17*, 311..
- (63) Schlosser, A.; Volkmer - Engert, R. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 523-525.
- (64) Wu, R.; Wu, W.-J.; Wang, Z.; Wong, Y.-L. E.; Hung, Y.-L. W.; Wong, H.; Chen, X.; Chan, T.-W. D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, *29*, 2199-2207.
- (65) Hara, T.; Izumi, Y.; Nakao, M.; Hata, K.; Baron, G. V.; Bamba, T.; Desmet, G. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1580*, 63-71.

論文目録

本博士論文に關与する論文

1. **Hata, K.; Izumi, Y.; Hara, T.; Matsumoto, M.; Bamba, T.;** In-line sample processing system with an immobilized trypsin-packed fused-silica capillary tube for proteomic analysis of a small number of mammalian cells. *Anal. Chem.* **2020**, in press.

その他の論文

1. **Hara, T.; Izumi, Y.; Nakao, M.; Hata, K.; Baron, G. V.; Bamba, T.; Desmet, G.,** Silica-based hybrid porous layers to enhance the retention and efficiency of open tubular capillary columns with a 5 μm inner diameter. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1580, 63-71.
2. **Izumi, Y.; Matsuda, F.; Hirayama, A.; Ikeda, K.; Kita, Y.; Horie, K.; Saigusa, D.; Saito, K.; Sawada, Y.; Nakanishi, H.; Okahashi, N.; Takahashi, M.; Nakao, M.; Hata, K.; Hoshi, Y.; Morihara, M.; Tanabe, K.; Bamba, T.; & Oda, Y.;** Inter-Laboratory Comparison of Metabolite Measurements for Metabolomics Data Integration. *Metabolites* **2019**, 9 (11), 257.
3. **Hara, T.; Izumi, Y.; Hata, K.; Baron, G. V.; Bamba, T.; & Desmet, G.;** Performance of small-domain monolithic silica columns in nano-liquid chromatography and comparison with commercial packed bed columns with 2 μm particles. *J. Chromatogr. A* **2019**, 460804.
4. **Nakatani, K.; Izumi, Y.; Hata, K.; Bamba, T.;** An analytical system for single-cell metabolomics of typical mammalian cells based on highly sensitive nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry* **2020**, A0080.

学会発表

国際学会

1. ○ **Soma, Y.; Yamashita, T.; Hata, K.; Takahashi, M.; Sugitate, K.; Serino, T.; Miyagawa, H.; Suzuki, K.; Kawamukai, T.; Shiota, T.; Yamada, K.; Izumi, Y.; Bamba, T.**; “Construction of Novel Calibration-Curve-Locking Database for Metabolomic Analysis by GC/MS”
65th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Indianapolis Indiana, USA, June, 2017
2. ○ **Bamba, T.; Soma, Y.; Yamashita, T.; Takahashi, M.; Hata, K.; Sugitate, K.; Serino, T.; Miyagawa, H.; Suzuki, K.; Yamada, K.; Kawamukai, T.; Shiota, T.; Izumi Y.**; “Calibration-Curve-Locking database for metabolomics by GC/MS”
13th Annual Conference of the Metabolomics Society, Brisbane, Australia, June, 2017
○ **Huebschmann, H. J.; Soma, Y.; Yamashita, T.; Takahashi, M.; Hata, K.; Kawamukai, T.; Shiota, T.; Yamada, K.; Sugitate, K.; Serino, T.; Miyagawa, H.; Suzuki, K.; Izumi, Y.; Bamba, T.**; “Automation of sample preparation for metabolomics analysis using robotic platform”
13th Annual Conference of the Metabolomics Society, Brisbane, Australia, June, 2017
3. ○ **Takahashi, M.; Izumi, Y.; Suzuki, T.; Hata, K.; Nakatani, K.; Takahara, K.; Oshikawa, K.; Matsumoto, M.; Bamba, T.**; “Metabolic profiling and footprinting of hydrophilic metabolites in cancer cells by ion chromatography coupled with high resolution mass spectrometry”
66th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Sandiego CA, USA, June, 2018
4. ○ **Takeda, H.; Izumi, Y.; Nakatani, K.; Hata, K.; Koike, T.; Ying, K.; Matsuda, F.; Matsumoto, M.; Shiomi, M.; Bamba, T.**; “Analysis of lipoprotein metabolism in

atherosclerotic cardiovascular disease based on lipidomics and targeted proteomics combined approach”

66th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Sandiego CA, USA, June, 2018

5. **Hata, K.; Yamashita, T.; Takahashi, M.; Sugitate, K.; Serino, T.; Miyagawa, H.; Suzuki, K.; Yamada, K.; Kawamukai, T.; Shiota, T.; Izumi, Y.; O Bamba, T.;** “Development of GC/MS based quantitative metabolome analysis methodology by Callibration-Curve-Locking database”

14th Annual Conference of the Metabolomics Society, Seattle Wasington, USA, June, 2018

6. O **Soma, Y.; Fujiwara, Y.; Hata, K.; Izumi, Y.; Bamba, T.; Hanai, T.;** “Dynamic metabolic engineering harnessing synthetic biological tools and metabolome analysis”

Metabolic Engineering 12, Munich, Germany, June, 2018

7. O **Izumi, Y.; Hata, K.; Nakatani, K.; Hara, T.; Yamamura, S.; Matsumoto, M.; Bamba, T.;** “A novel mass spectrometry-based analytical system for single-cell proteomics and metabolomics in mammalian cells”

67th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, Georgia, June, 2019

8. O **Hata, K.; Hara, T.; Izumi, Y.; Matsumoto, M.; Bamba, T.;** “System development for single-cell shotgun proteomics using highly sensitive nano-LC/MS/MS”

HPLC2019 Kyoto 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Katsura Kyoto, Japan, December, 2019

9. O **Hara, T.; Hata, K.; Izumi, Y.; Baron, G.V.; Bamba T.; and Desmet, G.;** “Exploring column performance of monolithic silica capillary columns and its application in nano-LC”

HPLC2019 Kyoto 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Katsura Kyoto, Japan, December, 2019

国内学会

1. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 杉立久仁代, 芹野武, 宮川浩美, 鈴木健一, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 和泉自泰, 馬場健史
“GC/MS メタボローム解析に資する calibration-curve-locking データベースの構築”
第 65 回質量分析総合討論会, 茨城, 2017 年 5 月
2. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“メタボロミクスのための次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理システムの構築”
第 65 回質量分析総合討論会, 茨城, 2017 年 5 月
3. ○相馬悠希, 山下俊幸, 秦康祐, 高橋政友, 杉立久仁代, 芹野武, 宮川浩美, 鈴木健一, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 和泉自泰, 馬場健史
“GC/MS によるメタボローム解析に資する新規 calibration-curve-locking Database の構築”
第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月
4. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによるメタボロミクスに資する自動前処理法の構築”
第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月
5. ○和泉自泰, 原健士, 中谷航太, 秦康祐, 山村昌平, 松本雅記, 馬場健史
“1 細胞メタボロミクスに向けた基盤技術開発”
第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月
6. ○中谷航太, 和泉自泰, 秦康祐, 馬場健史
“Nano-LC/MS/MS による 1 細胞メタボローム分析システムの開発”
第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月

7. ○相馬悠希, 山下俊幸, 高橋政友, 秦康祐, 川向孝知, 塩田晃久, 山田佳代子, 宮川浩美, 鈴木健一, 杉立久仁代, 芹野武, 和泉自泰, 馬場健史
“メタボローム解析に資する次世代多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理法の開発”
第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月
8. ○和泉自泰, 高橋政友, 鈴木隆弘, 押川清孝, 秦康祐, 中谷航太, 木村元一, 高原健太郎, 松本雅記, 馬場健史
“イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析による動物培養細胞のメタボローム解析”
第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月
9. ○秦康祐, 和泉自泰, 原健士, 松本雅記, 馬場健史
“1 細胞ショットガンプロテオミクスに資するサンプル調製方法の開発”
第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月
10. ○秦康祐, 和泉自泰, 原健士, 松本雅記, 馬場健史
“1 細胞ショットガンプロテオミクスに資するフューズドシリカキャピラリーを基盤としたインラインサンプル調製法の開発”
日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 合同大会, 大阪, 2018 年 5 月
11. ○中谷航太, 和泉自泰, 秦康祐, 馬場健史
“高感度 nano-LC/MS/MS を基盤とした 1 細胞メタボローム分析システムの開発”
日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 合同大会, 大阪, 2018 年 5 月
12. ○相馬悠希, 篠原玉樹, 藤原由梨, 角田一真, 秦康祐, 和泉自泰, 花井泰三, 馬場健史
“代謝動態制御を介して菌体集団規模を制御する Quorum Sensing 型遺伝子回路の構築とメタボローム解析による機能評価”
第 70 回 日本生物工学会大会, 大阪, 2018 年 9 月
13. ○和泉自泰, 原健士, 中谷航太, 秦康祐, 山村昌平, 向紀雄, 松本雅記, 馬場健史

“シングルセル分子フェノタイプ解析に向けた基盤技術開発”

第 12 回メタボロームシンポジウム，山形，2018 年 10 月

14. ○原健士，和泉自泰，中尾素直，秦康祐，Gino. V. Baron，馬場健史，Gert Desmet

“ハイブリッド型多孔質シリカ層を有する内径 5 μm のオープンチューブラーカラムの性能評価”

第 29 回 クロマトグラフィー科学会議，愛知，2018 年 11 月

15. ○秦康祐，和泉自泰，原健士，松本雅記，馬場健史

“シングルセルプロテオミクスに資する細胞回収前処理装置の開発”

日本プロテオーム学会 2019 年大会（JHUPO 第 17 回大会）/第 70 回 日本電気泳動学会総会，宮崎，2019 年 7 月

補足資料

高感度分析システムにより単一 HeLa 細胞から同定されたタンパク質.

ID	Accession	Description
1	P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACP1 PE=1 SV=3
2	Q562R1	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTBL2 PE=1 SV=2
3	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTC1 PE=1 SV=1
4	O43707	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN4 PE=1 SV=2
5	P23526	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHCY PE=1 SV=4
6	Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHNAK PE=1 SV=2
7	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2
8	Q86V81	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALYREF PE=1 SV=3
9	P04083	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA1 PE=1 SV=2
10	P07355	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2
11	P08133	Annexin A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA6 PE=1 SV=3
12	Q9BZZ5	Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=API5 PE=1 SV=3
13	P61204	ADP-ribosylation factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF3 PE=1 SV=2
14	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGDI1 PE=1 SV=3
15	O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARPC2 PE=1 SV=1
16	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1
17	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3

18	P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1D PE=1 SV=2
19	P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5PO PE=1 SV=1
20	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AZGP1 PE=1 SV=2
21	O95817	BAG family molecular chaperone regulator 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAG3 PE=1 SV=3
22	P80723	Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BASP1 PE=1 SV=2
23	P51572	B-cell receptor-associated protein 31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BCAP31 PE=1 SV=3
24	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1QBP PE=1 SV=1
25	Q9HB71	Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACYBP PE=1 SV=2
26	Q05682	Caldesmon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALD1 PE=1 SV=3
27	P0DP23	Calmodulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM1 PE=1 SV=1
28	P27797	Calreticulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALR PE=1 SV=1
29	P27824	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=2
30	Q14444	Caprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPRIN1 PE=1 SV=2
31	Q9Y2V2	Calcium-regulated heat-stable protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARHSP1 PE=1 SV=2
32	P31944	Caspase-14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CASP14 PE=1 SV=2
33	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBR1 PE=1 SV=3
34	P78371	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT2 PE=1 SV=4
35	P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT3 PE=1 SV=4
36	P50991	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT4 PE=1 SV=4
37	P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=CCT5 PE=1 SV=1
38	P40227	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT6A PE=1 SV=3
39	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT7 PE=1 SV=2
40	P50990	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT8 PE=1 SV=4
41	P16070	CD44 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD44 PE=1 SV=3
42	Q16543	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDC37 PE=1 SV=1
43	P06493	Cyclin-dependent kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDK1 PE=1 SV=3
44	P42771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDKN2A PE=1 SV=2
45	Q15517	Corneodesmosin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDSN PE=1 SV=3
46	P23528	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=3
47	P12277	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKB PE=1 SV=1
48	O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC1 PE=1 SV=4
49	Q00610	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=5
50	P30085	UMP-CMP kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMPK1 PE=1 SV=3
51	P02452	Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL1A1 PE=1 SV=5
52	P08123	Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL1A2 PE=1 SV=7
53	Q14019	Coactosin-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COTL1 PE=1 SV=3
54	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
55	P00450	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CP PE=1 SV=1
56	P31327	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPS1 PE=1 SV=2

57	O75390	Citrate synthase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CS PE=1 SV=2
58	P55060	Exportin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSE1L PE=1 SV=3
59	P01040	Cystatin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTA PE=1 SV=1
60	P04080	Cystatin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTB PE=1 SV=2
61	Q14247	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTTN PE=1 SV=2
62	O60888	Protein CutA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUTA PE=1 SV=2
63	P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DARS PE=1 SV=2
64	P07108	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DBI PE=1 SV=2
65	P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD PE=1 SV=2
66	Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5
67	Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
68	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3
69	P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1
70	Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4
71	Q02413	Desmoglein-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSG1 PE=1 SV=2
72	P15924	Desmoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSP PE=1 SV=3
73	P60981	Destrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSTN PE=1 SV=3
74	Q16610	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECM1 PE=1 SV=2
75	O60869	Endothelial differentiation-related factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EDF1 PE=1 SV=1
76	P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1 PE=1 SV=1
77	P24534	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1B2 PE=1 SV=3

78	P29692	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1D PE=1 SV=5
79	P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1G PE=1 SV=3
80	P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF2 PE=1 SV=4
81	O14602	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF1AY PE=1 SV=4
82	P20042	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF2S2 PE=1 SV=2
83	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1
84	P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4
85	P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4B PE=1 SV=2
86	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4H PE=1 SV=5
87	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF5A PE=1 SV=2
88	P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2
89	O43768	Alpha-endosulfine OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENSA PE=1 SV=1
90	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERP29 PE=1 SV=4
91	P15311	Ezrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EZR PE=1 SV=4
92	P49327	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FASN PE=1 SV=3
93	P62861	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAU PE=1 SV=1
94	Q14314	Fibroleukin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGL2 PE=1 SV=1
95	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP1A PE=1 SV=2
96	Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP4 PE=1 SV=3
97	P21333	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4

98	O75369	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=2
99	P02751	Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FN1 PE=1 SV=5
100	Q16658	Fascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FSCN1 PE=1 SV=3
101	Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUBP1 PE=1 SV=3
102	P35637	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1
103	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=1 SV=4
104	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3
105	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GDI2 PE=1 SV=2
106	O75496	Geminin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GMNN PE=1 SV=1
107	P63244	Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=3
108	Q8NBJ4	Golgi membrane protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLM1 PE=1 SV=1
109	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPI PE=1 SV=4
110	P00390	Glutathione reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSR PE=1 SV=2
111	P0C0S5	Histone H2A.Z OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AZ1 PE=1 SV=2
112	P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHB PE=1 SV=3
113	O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HAT1 PE=1 SV=1
114	P51858	Hepatoma-derived growth factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDGF PE=1 SV=1
115	P16401	Histone H1.5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-5 PE=1 SV=3
116	P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-3 PE=1 SV=2
117	P06899	Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC11 PE=1 SV=3
118	O60814	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC12

		PE=1 SV=3
119	P68431	Histone H3.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C1 PE=1 SV=2
120	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2
121	Q6FI13	Histone H2A type 2-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST2H2AA3 PE=1 SV=3
122	Q8IUE6	Histone H2A type 2-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIST2H2AB PE=1 SV=3
123	P09429	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3
124	O15347	High mobility group protein B3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB3 PE=1 SV=4
125	P05204	Non-histone chromosomal protein HMG-17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGN2 PE=1 SV=3
126	Q9UK76	Jupiter microtubule associated homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JPT1 PE=1 SV=3
127	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5
128	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
129	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2
130	Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPAB PE=1 SV=2
131	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4
132	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPD PE=1 SV=1
133	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3
134	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4
135	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2
136	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1
137	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPL PE=1 SV=2
138	P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens

		OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=3
139	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6
140	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5
141	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4
142	P14625	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1
143	P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
144	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA4 PE=1 SV=4
145	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2
146	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1
147	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2
148	P04792	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=2
149	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2
150	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPE1 PE=1 SV=2
151	Q92598	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPH1 PE=1 SV=1
152	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH1 PE=1 SV=2
153	P05019	Insulin-like growth factor I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF1 PE=1 SV=1
154	P18065	Insulin-like growth factor-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP2 PE=1 SV=2
155	P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP4 PE=1 SV=2
156	P24593	Insulin-like growth factor-binding protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP5 PE=1 SV=1
157	Q16270	Insulin-like growth factor-binding protein 7 OS=Homo sapiens

		OX=9606 GN=IGFBP7 PE=1 SV=1
158	Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=2
159	Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3
160	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH2 PE=1 SV=2
161	P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP1 PE=1 SV=1
162	Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1
163	Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=4
164	P52292	Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA2 PE=1 SV=1
165	Q14974	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNB1 PE=1 SV=2
166	P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=2
167	Q8N1N4	Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT78 PE=1 SV=2
168	Q6KB66	Keratin, type II cytoskeletal 80 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT80 PE=1 SV=2
169	Q14847	LIM and SH3 domain protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LASP1 PE=1 SV=2
170	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2
171	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHB PE=1 SV=2
172	P09382	Galectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS1 PE=1 SV=2
173	P17931	Galectin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3 PE=1 SV=5
174	Q9UHB6	LIM domain and actin-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LIMA1 PE=1 SV=1
175	P02545	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1

176	Q93052	Lipoma-preferred partner OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPP PE=1 SV=1
177	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3
178	Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC59 PE=1 SV=1
179	P58546	Myotrophin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTPN PE=1 SV=2
180	P27816	Microtubule-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=3
181	P43243	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2
182	P33991	DNA replication licensing factor MCM4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM4 PE=1 SV=5
183	Q14566	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM6 PE=1 SV=1
184	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH1 PE=1 SV=4
185	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 PE=1 SV=3
186	P14174	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIF PE=1 SV=4
187	P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPL12 PE=1 SV=2
188	P26038	Moesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSN PE=1 SV=3
189	Q96DR8	Mucin-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MUCL1 PE=1 SV=1
190	P35580	Myosin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH10 PE=1 SV=3
191	P35579	Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4
192	O14950	Myosin regulatory light chain 12B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL12B PE=1 SV=2
193	P60660	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=2
194	E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACA PE=1 SV=1
195	Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAP1L4 PE=1 SV=1

196	P41271	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NBL1 PE=1 SV=2
197	P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3
198	O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA4 PE=1 SV=1
199	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME1 PE=1 SV=1
200	P22392	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME2 PE=1 SV=1
201	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4
202	P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2
203	P07237	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3
204	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PA2G4 PE=1 SV=3
205	P11940	Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=2
206	Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC4 PE=1 SV=1
207	P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP1 PE=1 SV=4
208	Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2
209	Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1
210	P12004	Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNA PE=1 SV=1
211	Q9BUL8	Programmed cell death protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD10 PE=1 SV=1
212	O75340	Programmed cell death protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD6 PE=1 SV=1
213	P30101	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=4
214	P13667	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA4 PE=1 SV=2
215	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=PDIA6 PE=1 SV=1
216	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEBP1 PE=1 SV=3
217	Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFKP PE=1 SV=2
218	P07737	Profilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=2
219	P18669	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2
220	P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGD PE=1 SV=3
221	P00558	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3
222	P35232	Prohibitin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB PE=1 SV=1
223	Q99623	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB2 PE=1 SV=2
224	O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHGDH PE=1 SV=4
225	A2A3N6	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIPSL PE=5 SV=1
226	P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4
227	Q15149	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3
228	P13797	Plastin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLS3 PE=1 SV=4
229	P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POR PE=1 SV=2
230	Q15181	Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPA1 PE=1 SV=2
231	Q03181	Peroxisome proliferator-activated receptor delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPARD PE=1 SV=1
232	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIB PE=1 SV=2
233	P32119	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
234	P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX3 PE=1 SV=3
235	P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=PRDX5 PE=1 SV=4
236	P30041	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3
237	Q92954	Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRG4 PE=1 SV=3
238	P14314	Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCSH PE=1 SV=2
239	P21108	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPS1L1 PE=1 SV=2
240	P25786	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA1 PE=1 SV=1
241	P28066	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA5 PE=1 SV=3
242	P28074	Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB5 PE=1 SV=3
243	P62191	26S proteasome regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMC1 PE=1 SV=1
244	O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD12 PE=1 SV=3
245	Q13200	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD2 PE=1 SV=3
246	P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP1 PE=1 SV=1
247	Q15185	Prostaglandin E synthase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTGES3 PE=1 SV=1
248	P20962	Parathyrosin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTMS PE=1 SV=2
249	P61019	Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2A PE=1 SV=1
250	P51148	Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5C PE=1 SV=2
251	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=3
252	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RANBP1 PE=1 SV=1
253	Q16576	Histone-binding protein RBBP7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBBP7 PE=1 SV=1
254	P98179	RNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM3

		PE=1 SV=1
255	P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3
256	P27635	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10 PE=1 SV=4
257	P62906	60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10A PE=1 SV=2
258	P62913	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2
259	P30050	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL12 PE=1 SV=1
260	P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13 PE=1 SV=4
261	P40429	60S ribosomal protein L13a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13A PE=1 SV=2
262	P50914	60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL14 PE=1 SV=4
263	P61313	60S ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=2
264	P18621	60S ribosomal protein L17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL17 PE=1 SV=3
265	Q07020	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18 PE=1 SV=2
266	Q02543	60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18A PE=1 SV=2
267	P84098	60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL19 PE=1 SV=1
268	P46778	60S ribosomal protein L21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL21 PE=1 SV=2
269	P35268	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=2
270	P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23 PE=1 SV=1
271	P62750	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23A PE=1 SV=1
272	P83731	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL24 PE=1 SV=1
273	P61254	60S ribosomal protein L26 OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=RPL26 PE=1 SV=1
274	P61353	60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL27 PE=1 SV=2
275	P46776	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL27A PE=1 SV=2
276	P46779	60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL28 PE=1 SV=3
277	P47914	60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL29 PE=1 SV=2
278	P39023	60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL3 PE=1 SV=2
279	P62888	60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL30 PE=1 SV=2
280	P62899	60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL31 PE=1 SV=1
281	P62910	60S ribosomal protein L32 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL32 PE=1 SV=2
282	P49207	60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL34 PE=1 SV=3
283	P42766	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL35 PE=1 SV=2
284	Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL36 PE=1 SV=3
285	P61513	60S ribosomal protein L37a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL37A PE=1 SV=2
286	P63173	60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL38 PE=1 SV=2
287	P36578	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL4 PE=1 SV=5
288	P46777	60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL5 PE=1 SV=3
289	Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3
290	P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7 PE=1 SV=1
291	P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7A PE=1 SV=2
292	P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL8

		PE=1 SV=2
293	P32969	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1
294	P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP0 PE=1 SV=1
295	P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP2 PE=1 SV=1
296	P46783	40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS10 PE=1 SV=1
297	P62280	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3
298	P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS12 PE=1 SV=3
299	P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS13 PE=1 SV=2
300	P62263	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=3
301	P62244	40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS15A PE=1 SV=2
302	P62249	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS16 PE=1 SV=2
303	P08708	40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS17 PE=1 SV=2
304	P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS18 PE=1 SV=3
305	P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS19 PE=1 SV=2
306	P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2
307	P60866	40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS20 PE=1 SV=1
308	P62847	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS24 PE=1 SV=1
309	P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS25 PE=1 SV=1
310	P62854	40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS26 PE=1 SV=3
311	P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=RPS28 PE=1 SV=1
312	P62273	40S ribosomal protein S29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS29 PE=1 SV=2
313	P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3 PE=1 SV=2
314	P61247	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3A PE=1 SV=2
315	P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2
316	P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS5 PE=1 SV=4
317	P62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1
318	P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS7 PE=1 SV=1
319	P62241	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS8 PE=1 SV=2
320	P46781	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS9 PE=1 SV=3
321	P08865	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPSA PE=1 SV=4
322	P23921	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRM1 PE=1 SV=1
323	Q9NQC3	Reticulon-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN4 PE=1 SV=2
324	P60903	Protein S100-A10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A10 PE=1 SV=2
325	P31949	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A11 PE=1 SV=2
326	P26447	Protein S100-A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A4 PE=1 SV=1
327	P06703	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A6 PE=1 SV=1
328	Q6UWP8	Suprabasin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SBSN PE=1 SV=2
329	O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC22B PE=1 SV=4
330	Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERBP1 PE=1 SV=2

331	P05155	Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPING1 PE=1 SV=2
332	P50454	Serpin H1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=2
333	Q01105	Protein SET OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SET PE=1 SV=3
334	P31947	14-3-3 protein sigma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFN PE=1 SV=1
335	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2
336	P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHMT2 PE=1 SV=3
337	Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A3 PE=1 SV=2
338	P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A5 PE=1 SV=7
339	P12236	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A6 PE=1 SV=4
340	Q9HBR0	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC38A10 PE=1 SV=2
341	P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC3A2 PE=1 SV=3
342	Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC7A5 PE=1 SV=2
343	Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SND1 PE=1 SV=1
344	P62318	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD3 PE=1 SV=1
345	Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN1 PE=1 SV=2
346	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF1 PE=1 SV=2
347	P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF3 PE=1 SV=1
348	Q08170	Serine/arginine-rich splicing factor 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF4 PE=1 SV=2
349	Q16629	Serine/arginine-rich splicing factor 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF7 PE=1 SV=1
350	Q9BRL6	Serine/arginine-rich splicing factor 8 OS=Homo sapiens OX=9606

		GN=SRSF8 PE=1 SV=1
351	P05455	Lupus La protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSB PE=1 SV=2
352	Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSBP1 PE=1 SV=1
353	P50502	Hsc70-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ST13 PE=1 SV=2
354	Q9Y6E0	Serine/threonine-protein kinase 24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STK24 PE=1 SV=1
355	P16949	Stathmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STMN1 PE=1 SV=3
356	Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRAP PE=1 SV=1
357	P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUB1 PE=1 SV=3
358	P61956	Small ubiquitin-related modifier 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUMO2 PE=1 SV=3
359	P37802	Transgelin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN2 PE=1 SV=3
360	P37837	Transaldolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TALDO1 PE=1 SV=2
361	P26639	Threonine--tRNA ligase 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TARS1 PE=1 SV=3
362	O75347	Tubulin-specific chaperone A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBCA PE=1 SV=3
363	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCP1 PE=1 SV=1
364	P02786	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TFRC PE=1 SV=2
365	P22735	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGM1 PE=1 SV=4
366	P29401	Transketolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKT PE=1 SV=3
367	P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMPO PE=1 SV=2
368	P63313	Thymosin beta-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMSB10 PE=1 SV=2
369	P62328	Thymosin beta-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMSB4X PE=1 SV=2

370	P60174	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP11 PE=1 SV=3
371	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=2
372	P13693	Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPT1 PE=1 SV=1
373	Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAP1 PE=1 SV=3
374	P68363	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1B PE=1 SV=1
375	P68366	Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA4A PE=1 SV=1
376	P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2
377	Q13509	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB3 PE=1 SV=2
378	P68371	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB4B PE=1 SV=1
379	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUFM PE=1 SV=2
380	Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNDC17 PE=1 SV=1
381	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBA1 PE=1 SV=3
382	Q96IX5	ATP synthase membrane subunit DAPIT, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5MD PE=1 SV=1
383	P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VASP PE=1 SV=3
384	P18206	Vinculin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCL PE=1 SV=4
385	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCP PE=1 SV=4
386	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC2 PE=1 SV=2
387	P08670	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4
388	O75083	WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR1 PE=1 SV=4
389	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC5 PE=1 SV=3

390	P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2
391	P67809	Y-box-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YBX1 PE=1 SV=3
392	P31946	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAB PE=1 SV=3
393	P62258	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAE PE=1 SV=1
394	P61981	14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAG PE=1 SV=2
395	P27348	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1
396	P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
397	Q15942	Zyxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZYX PE=1 SV=1