

# 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 :

氏 名 : 秦 康祐

論 文 名 : 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

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

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。がんにおいては、腫瘍内に存在するがん幹細胞などの特定の細胞群が治療耐性及び薬剤耐性を引き起こすとされているため、1細胞単位でのプロテオーム解析はがん悪性化のメカニズム解明や治療法の発見に繋がることが期待されている。現在、タンパク質の網羅的解析は、タンパク質のトリプシン消化物をナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (nano-LC/MS/MS) を用いて測定する、ショットガンプロテオミクスが主流となっている。ショットガンプロテオミクスの工程は、サンプル調製、nano-LC による分離、質量分析計による検出からなり、各工程の最適化と高感度化が1細胞ショットガンプロテオミクス分析を可能にする。また1細胞解析と従来のバルクスケールの解析で大きく異なる点は、不均一な細胞集団から目的の細胞を迅速に単離してくる必要がある点である。これまでに各工程の高感度化の方法が報告されており、ボトルネックであったサンプル調製においても、単一の癌細胞からの実施例がわずかであるが報告されている。しかしそれらの方法においても、細胞の回収と試料調製との連動性や、ペプチドへの消化効率など、いくつかの点でまだ改善の余地が見られた。本研究ではこれらの課題を解決するために、1細胞ショットガンプロテオミクスに資する新たな試料調製法の開発に取り組んだ。

第二章では、緒論で述べた課題解決のために、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を行った。はじめに、細胞形態などを観察しながら標的細胞をキャピラリー内に回収するために、顕微鏡とナノシリンジポンプを組み合わせた、細胞サンプリングシステムを作製した。ナノシリンジポンプに接続された細胞サンプリングキャピラリーにより、細胞の溶解、酵素消化、分析カラムへの導入を連続的に行い、nano-LC/MS/MS 分析までを完全インラインで実施する *in-line sample preparation for efficient cellular proteomics (ISPEC)* 法を開発した。ISPEC を用いて子宮頸がん細胞 (HeLa) の1細胞解析を行った結果、平均 33 タンパク質 ( $n = 3$ ) の同定に成功した。

第三章では、第二章で提案した細胞サンプリングおよびサンプル調製法のさらなる開発と nano-LC/MS/MS の高感度化によって ISPEC の改良を行った。その結果、細胞単離から分析までのスループットが2倍に改善された。さらに、HeLa 細胞の1細胞ショットガンプロテオミクスを実施した結果、平均 284 タンパク質 ( $n = 3$ ) の同定に成功し、以前のシステムと比べて大幅に網羅性が向上した。

本研究では、高い消化効率と低い試料損失を有する1細胞プロテオミクスに資する試料調製法を開発した。今後、様々な細胞種に対して顕微鏡下で判別可能な表現型と1細胞プロテオーム情報の統合解析を行うことでがん細胞の異種性についての理解が深まることを期待する。