

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			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	久保田 浩行
	副 査	九州大学	教授	神田 大輔
	副 査	九州大学	教授	大川 恭行

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、1 細胞ショットガンプロテオミクスを実現するために試料調製時の損失を低減することを目的とした、試料調製法の開発、および高感度 nano-LC/MS/MS 分析システムの開発に取り組んだものである。

試料調製時の損失を低減するための方法として、顕微鏡下での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。当該試料調製法を用いた 1 細胞ショットガンプロテオミクスを実施した結果、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。このことから ISPEC が 1 細胞ショットガンプロテオミクスを可能とする試料調製法であることが示された。

続いて試料調製工程におけるスループットの向上、および 1 細胞から包括的なタンパク質の検出を目的として、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。細胞回収システム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、異なる空間位置情報を記憶し、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可能にした。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、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 (ISPEC ver. 2)。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 ($n = 3$) の同定に成功した。

本研究で開発された試料調製法は、従来の蛍光活性化セルソーティングでの細胞単離と比べて、より詳細な細胞の形態学的情報が取得可能であるという特徴を有しており、試料損失の低減と各工程の高感度化により、単一の HeLa 細胞から包括的なタンパク質の検出を可能とすることで、その有用性を示した。また本研究内容は、申請者を筆頭著者とする論文を国際学術誌に発表している。

以上、本研究は博士 (工学) の学位を得る資格を有するものと認める。