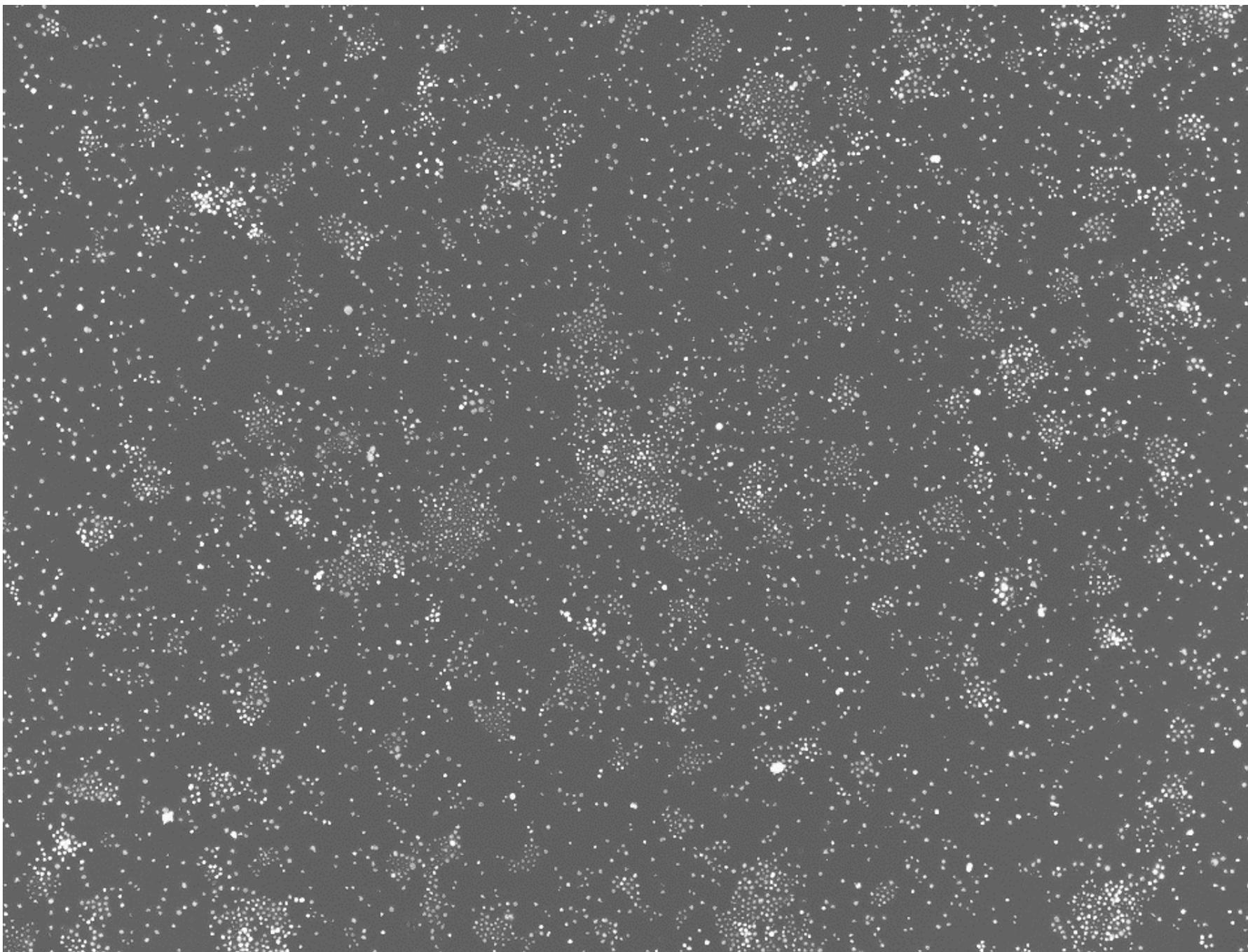


細胞個々のタンパク質発現情報を ハイスループットに取得する技術

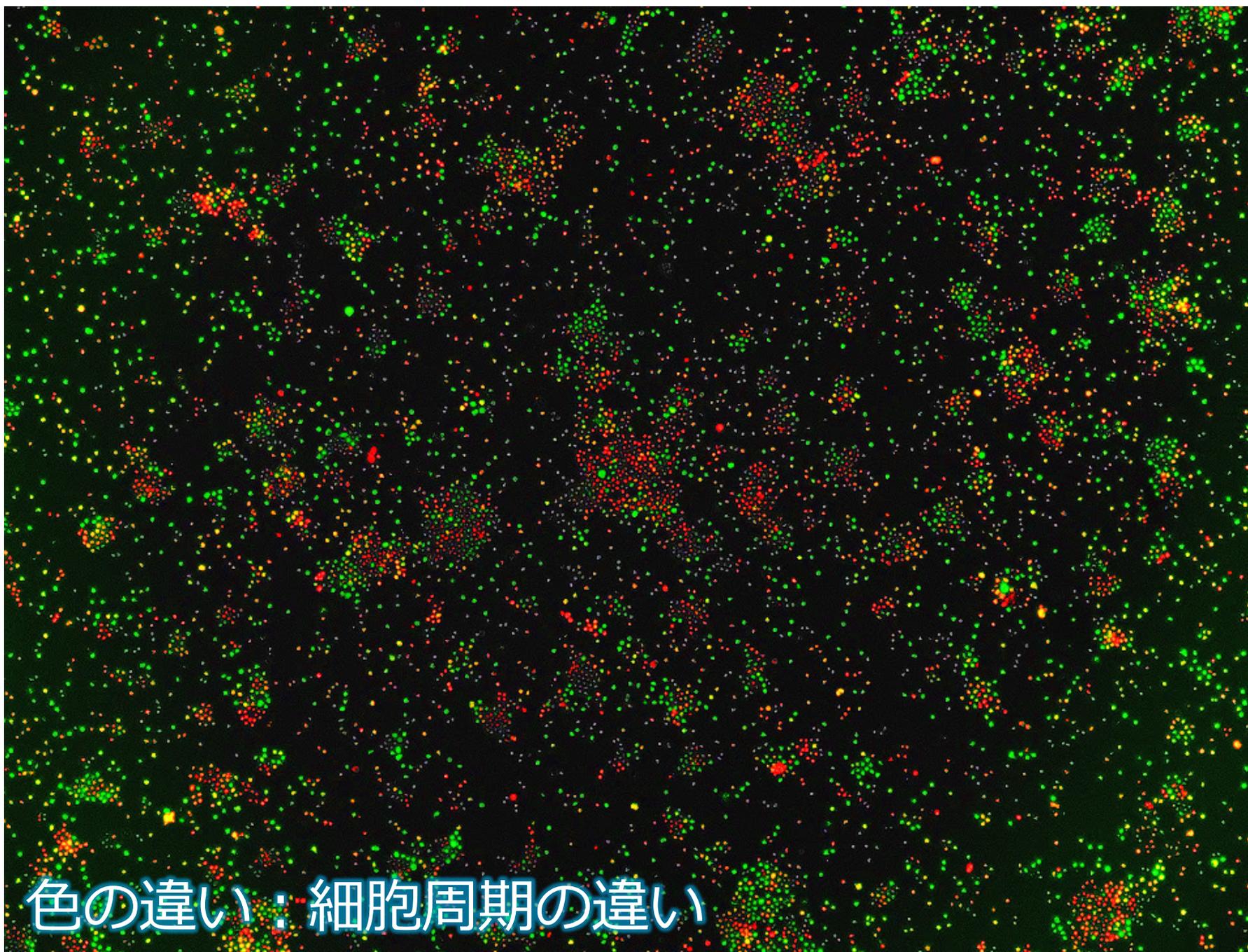
熊本大学 大学院生命科学研究部
助教 増田 豪

2022年12月2日

細胞はどれも同じ？



細胞の中身は個々で違う

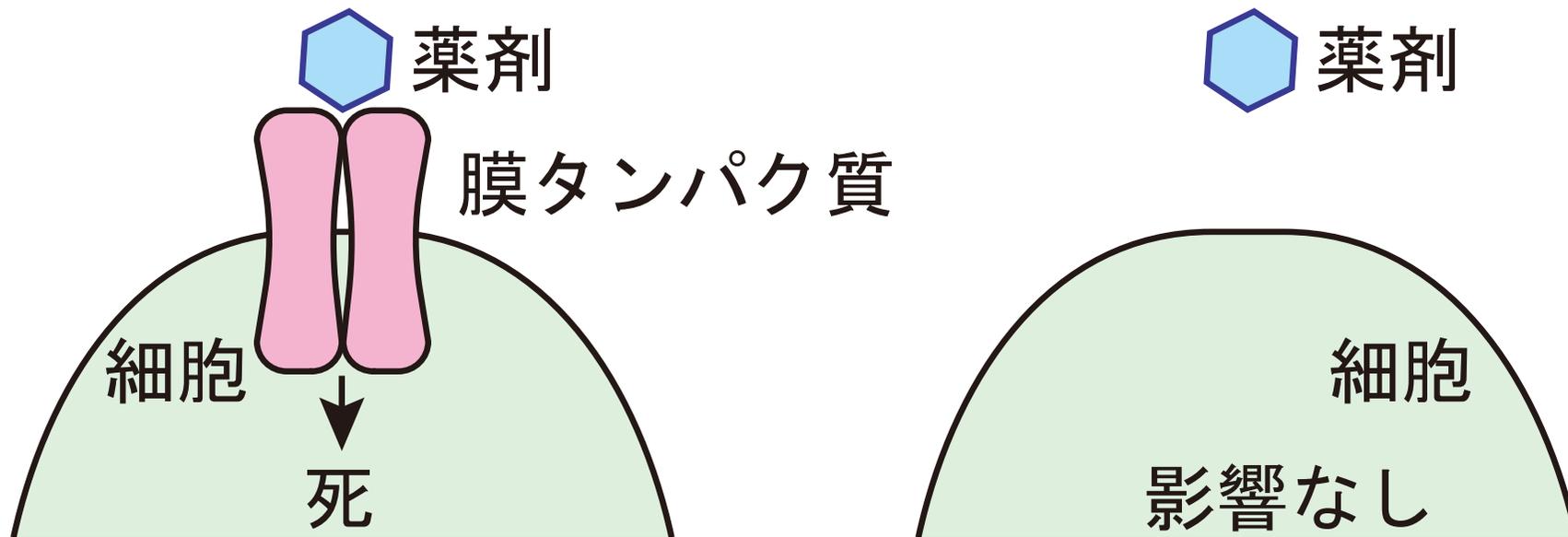


色の違い：細胞周期の違い

細胞の中身が違ふと何が起こる？

(例)

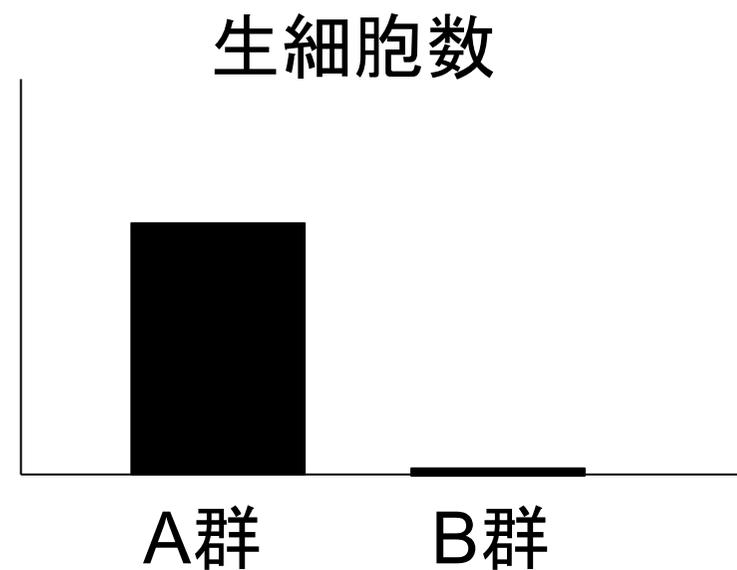
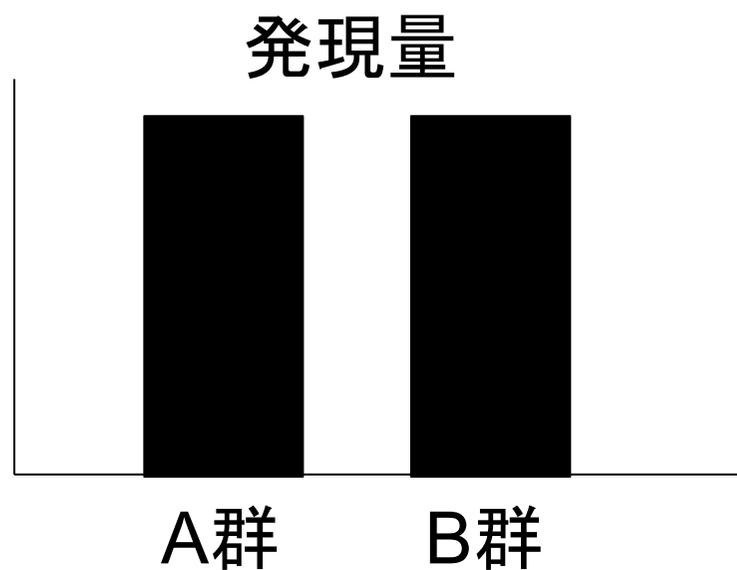
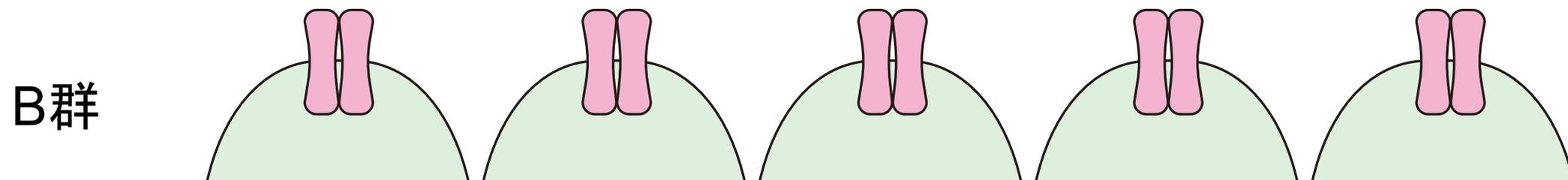
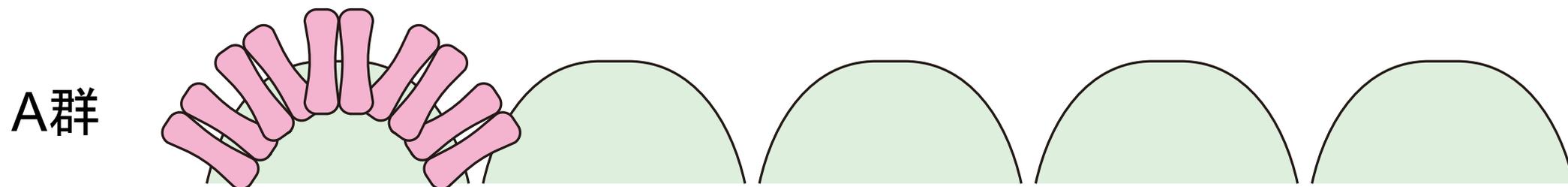
細胞膜タンパク質の発現量が違ふ。



リガンドや薬剤への感受性に差が生まれる。

- 死滅したり、死ななかつたり。 → 抗がん剤耐性
- 分化したり、しななかつたり。 → 細胞の多様性

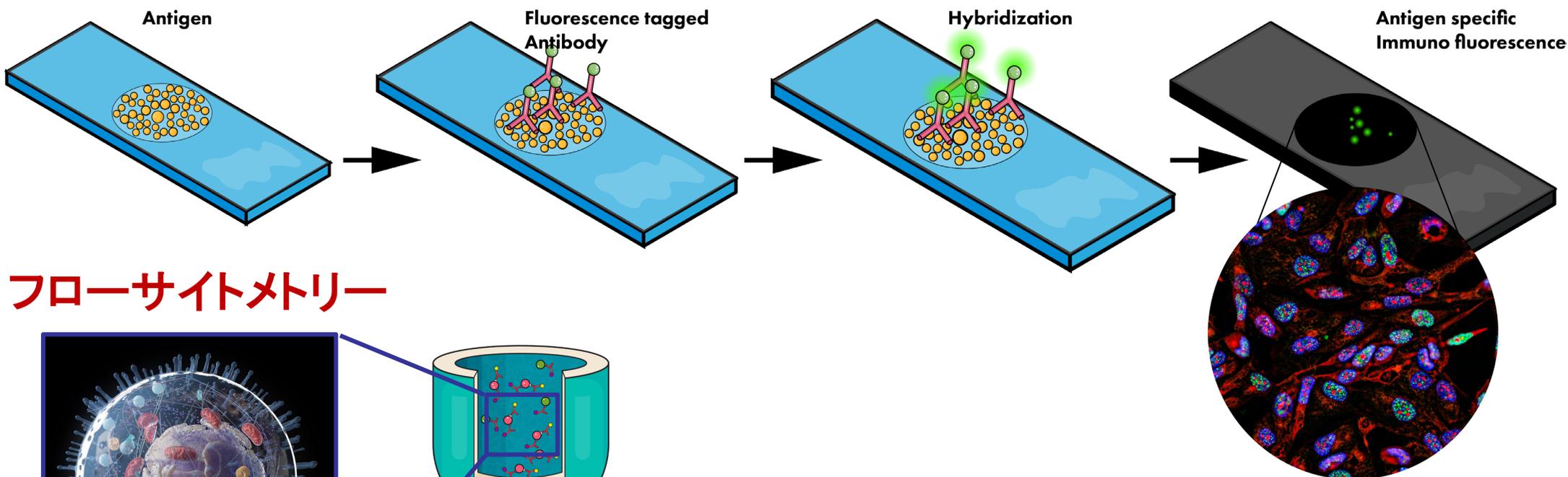
1細胞で見るメリット



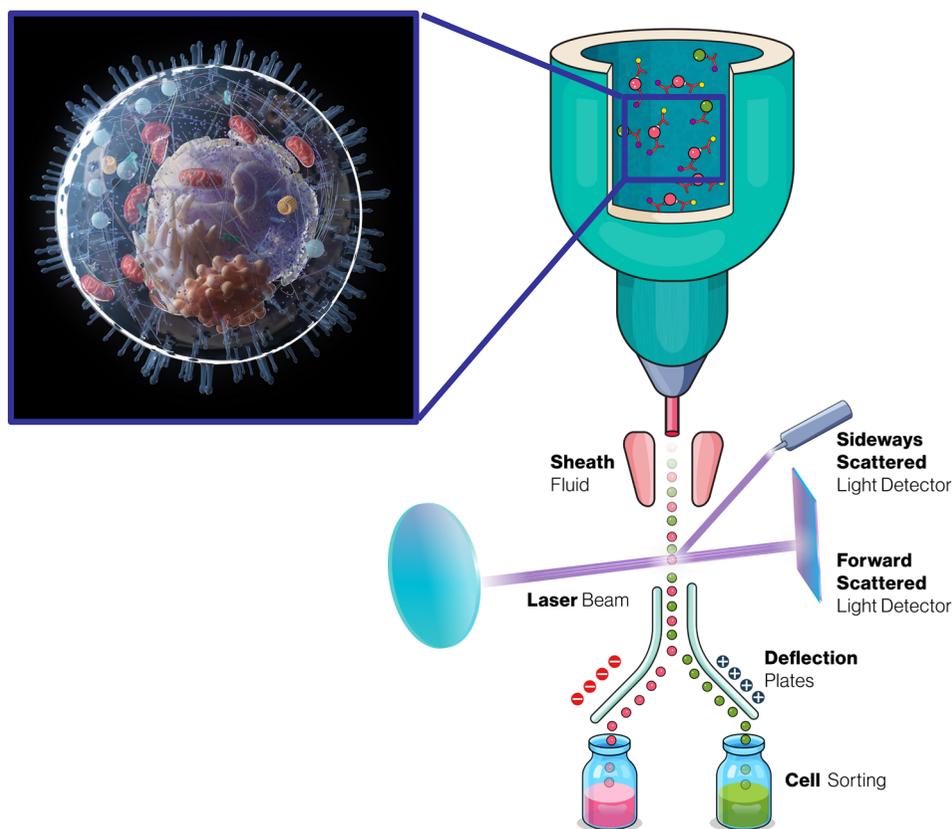
平均化情報だと現象を見誤る可能性がある。

1細胞レベルでタンパク質を観察する従来技術

免疫染色



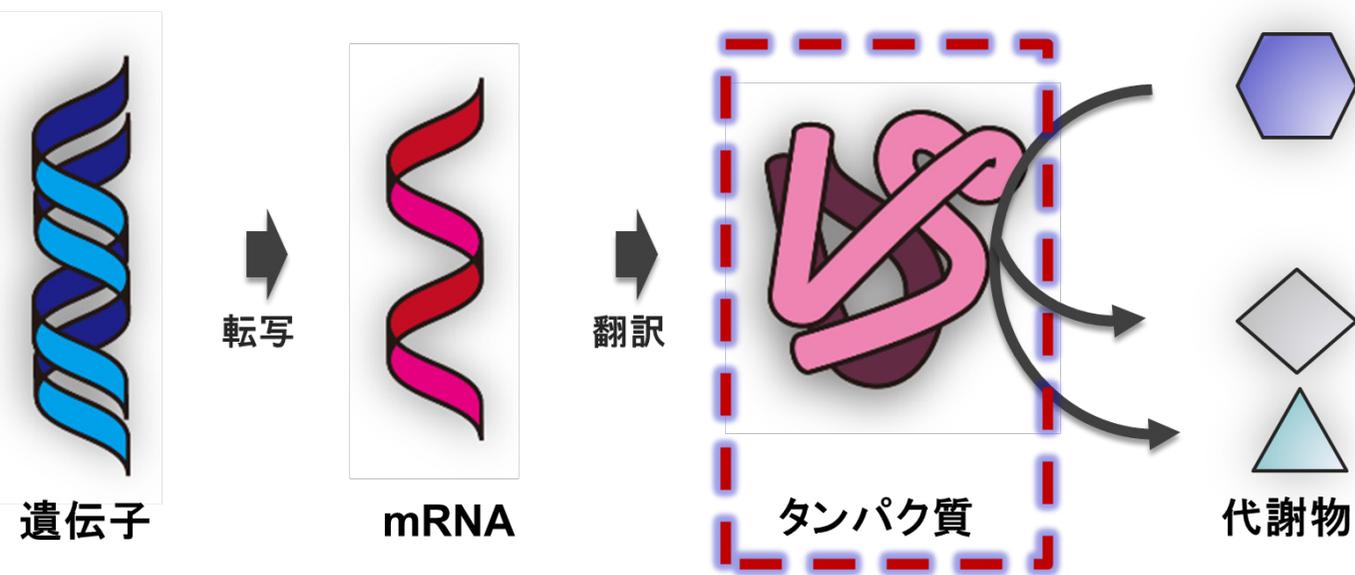
フローサイトメトリー



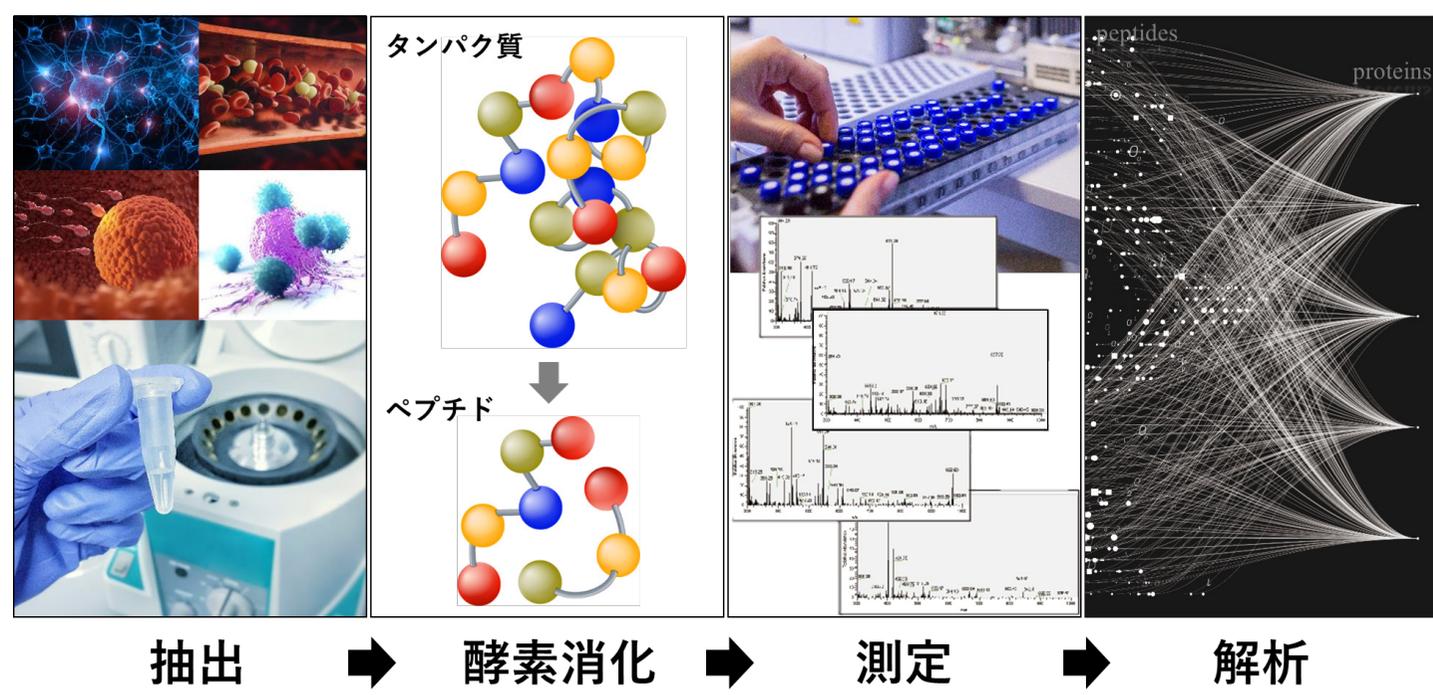
[メリット・デメリット]

1. 興味あるタンパク質を観察できる。
2. 予想外の変化は観察できない。
3. 抗体が必要。
4. 特殊な生物だと適用できない。

プロテオミクス



プロテオミクス:
タンパク質を網羅的に定量する。

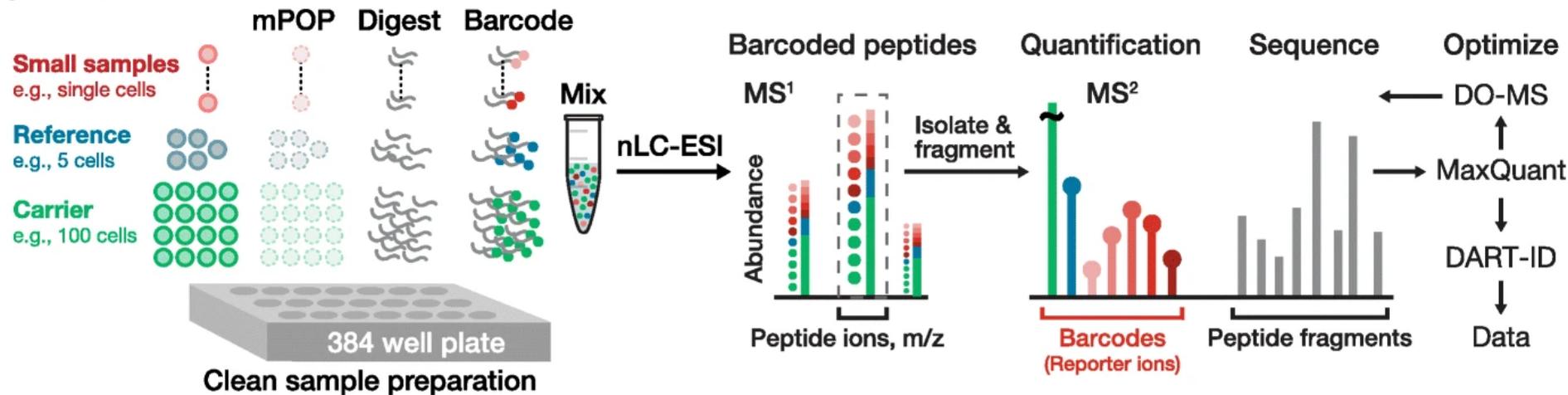


1細胞における課題:
前処理工程で極微量タンパク質が容器に吸着損失する。

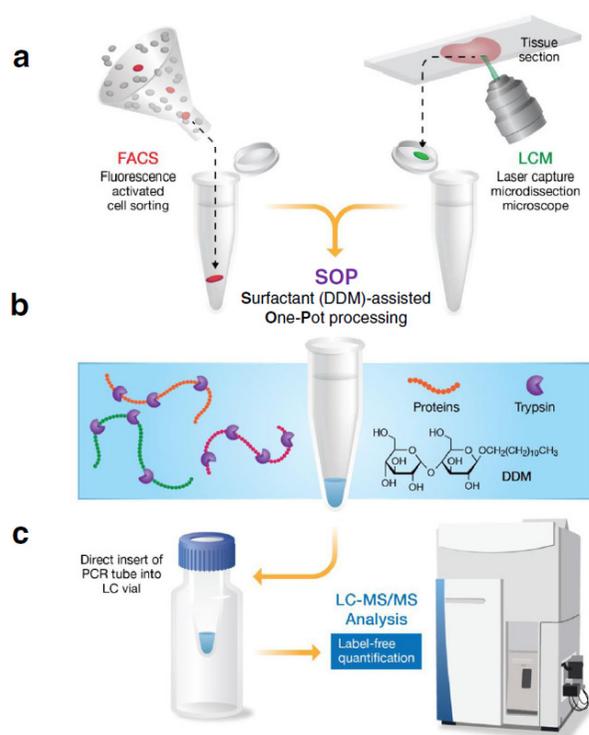
1. **抗体を使わない。**
2. **高い回収率**
3. **スループットが高い**
4. **汎用性が高い**

1細胞プロテオミクスの既存技術

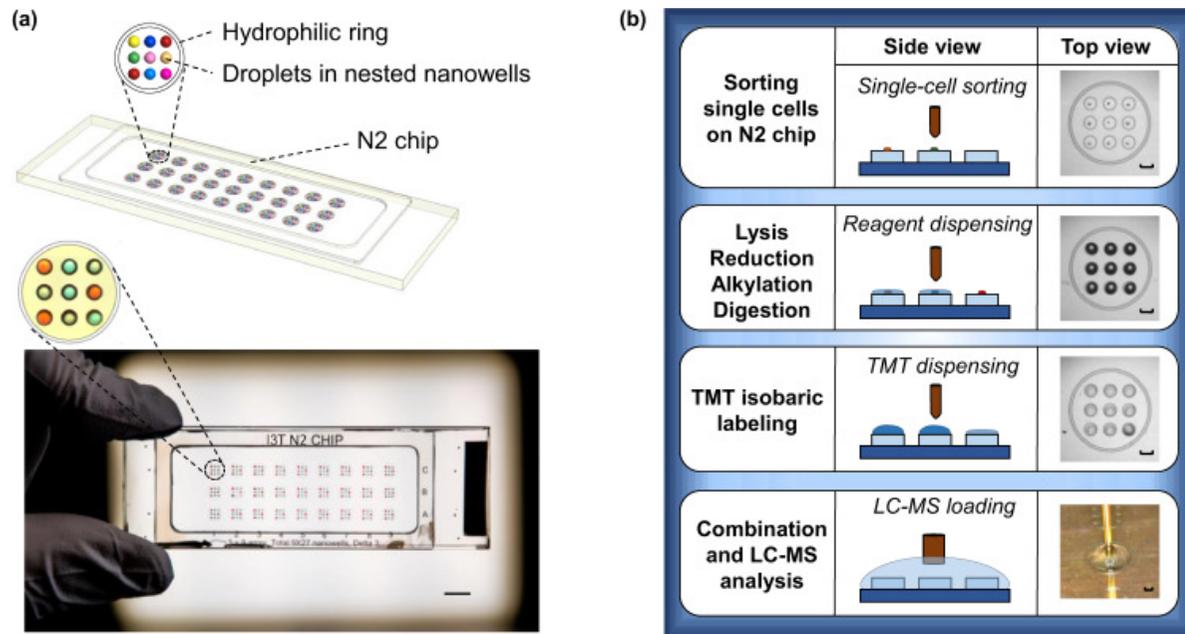
SCoPE2 (Specht H, et al., Genome Biol. 2021)



SOP-MS (Tsai, C.F. et al., Commun Biol., 2021)

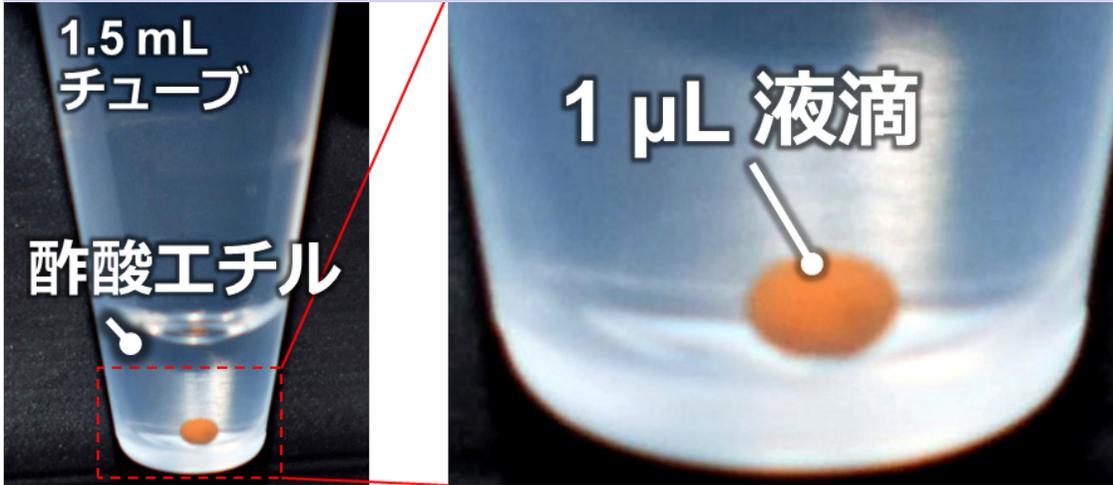


nested nanoPOTS (Woo J, et al., Nat Commun, 2021)



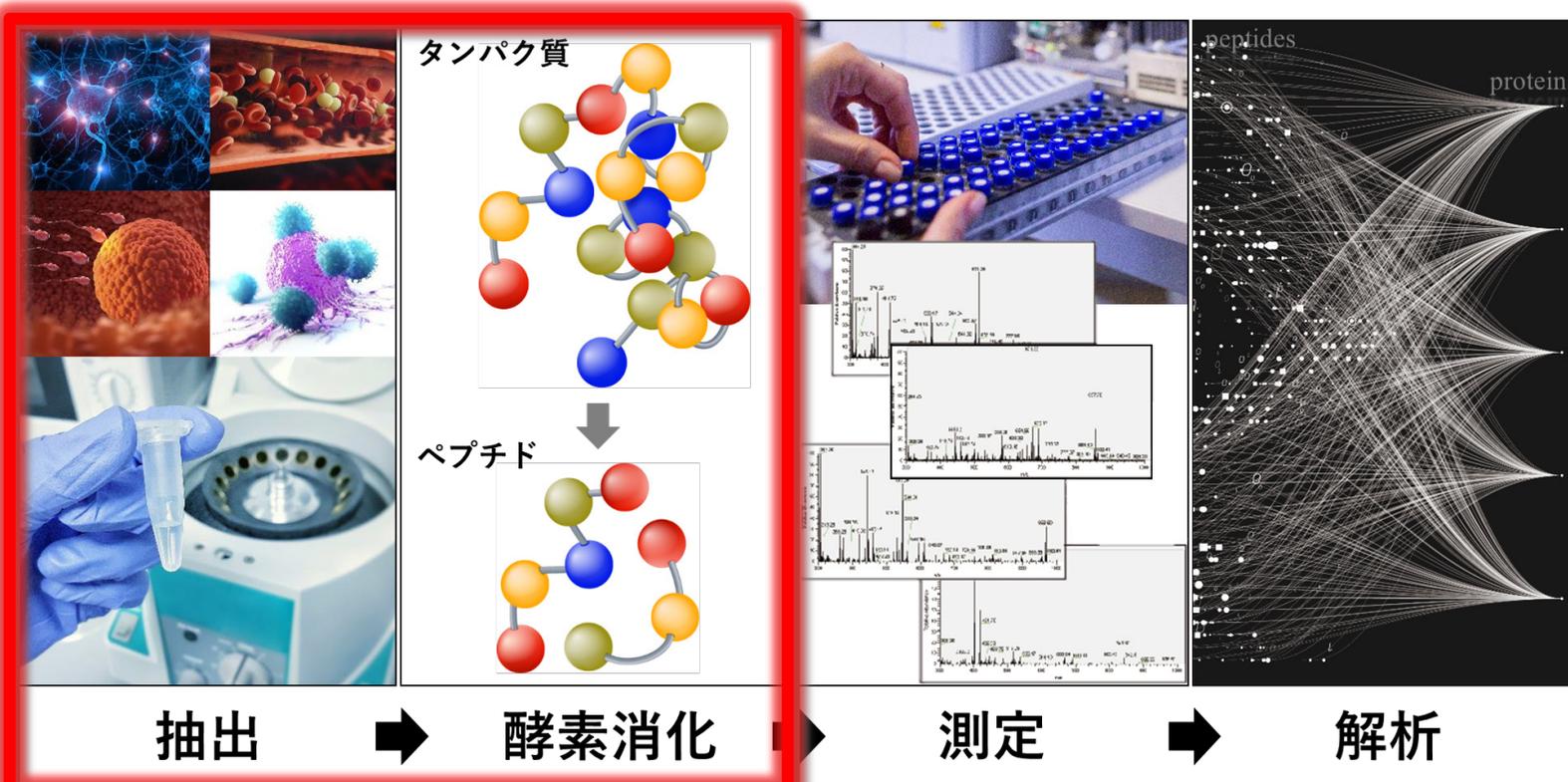
回収率、汎用性、スループット性のいずれかの面で課題が残る

油中液滴法(WinO) (特願2018-139362)



特徴:
試料液滴と容器との接面積が小さくなり、回収率が向上する。

Masuda et.al., *Analytical Chemistry*, 2022



油中液滴法のワークフロー

作業内容	(a) セルソーターで細胞を液滴に添加	(b) 試料非接触で前処理試薬を添加	(c) 安定同位体標識	(d) 試料を混合
模式図				
ビーズの状態				

- セルソーターで細胞を導入できる。
- 液体ハンドリングロボットで前処理を半自動化できる。

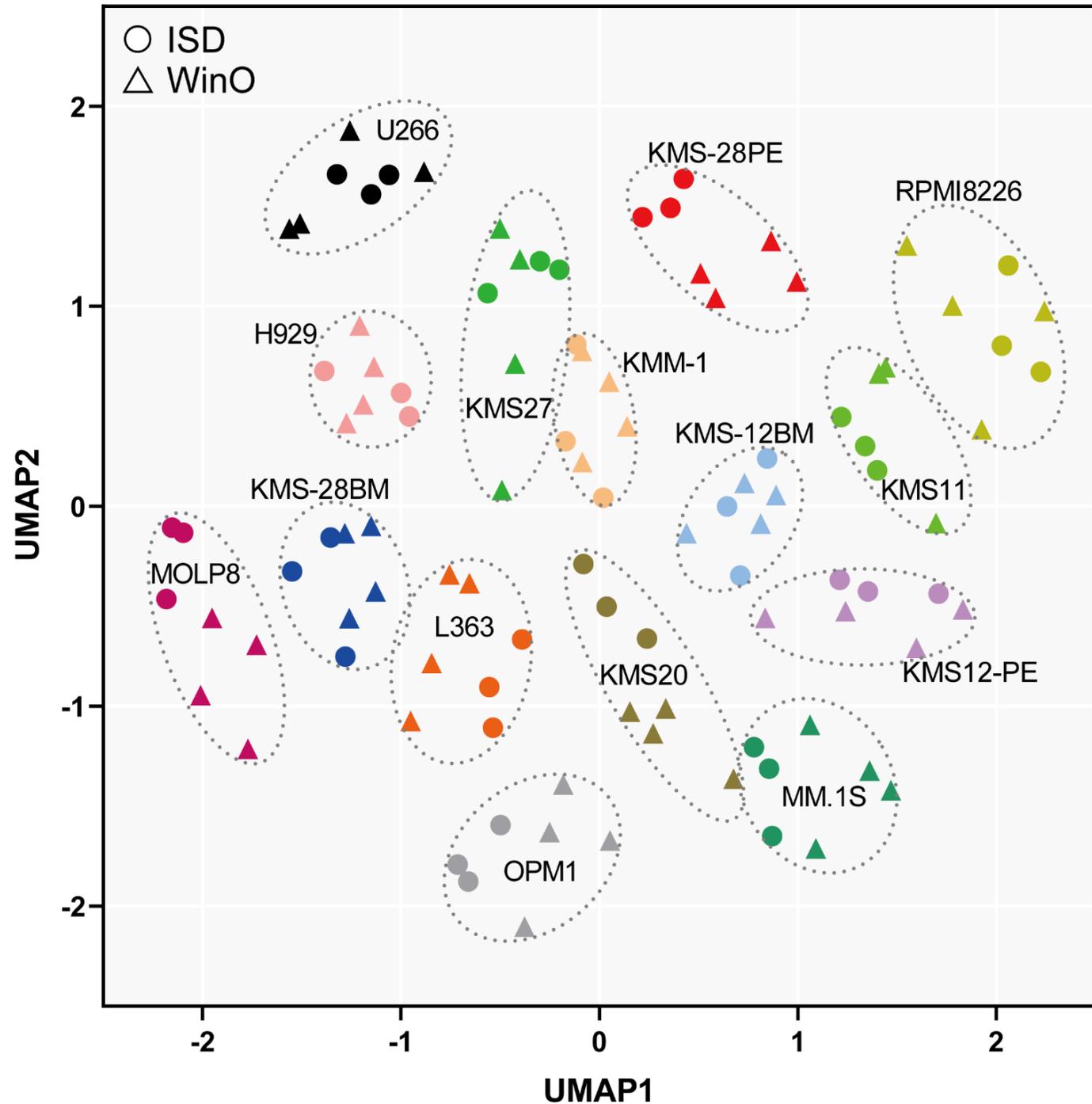
油中液滴法は細胞の分類に使える?

多発性骨髄腫細胞: 15株

細胞数: 100個 (WinO)

10000個 (ISD)

- 同じガン種である15細胞株を分類できた。
- 発現プロファイルはISDと同等。



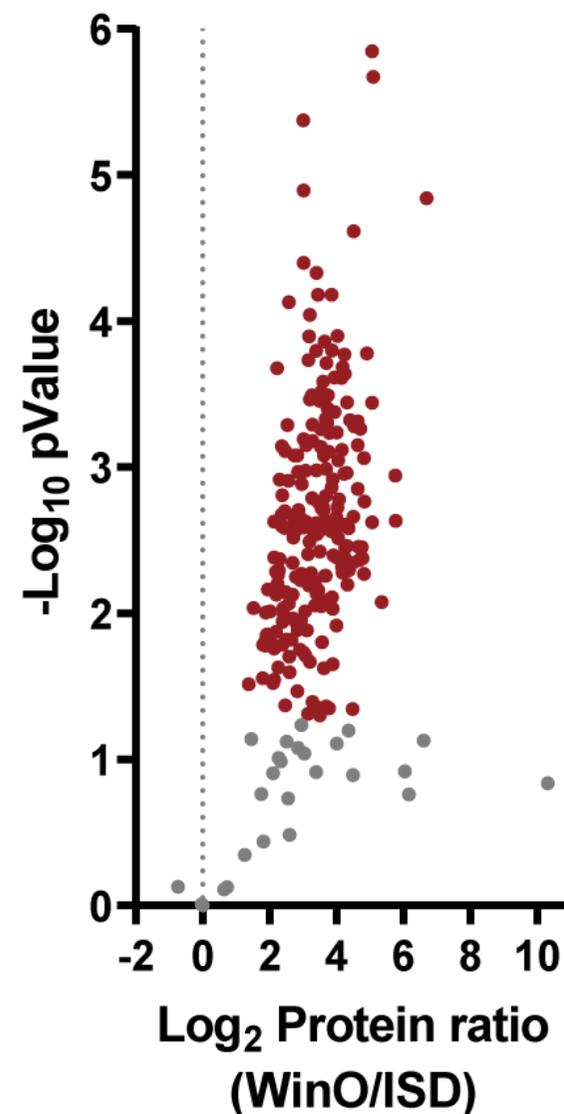
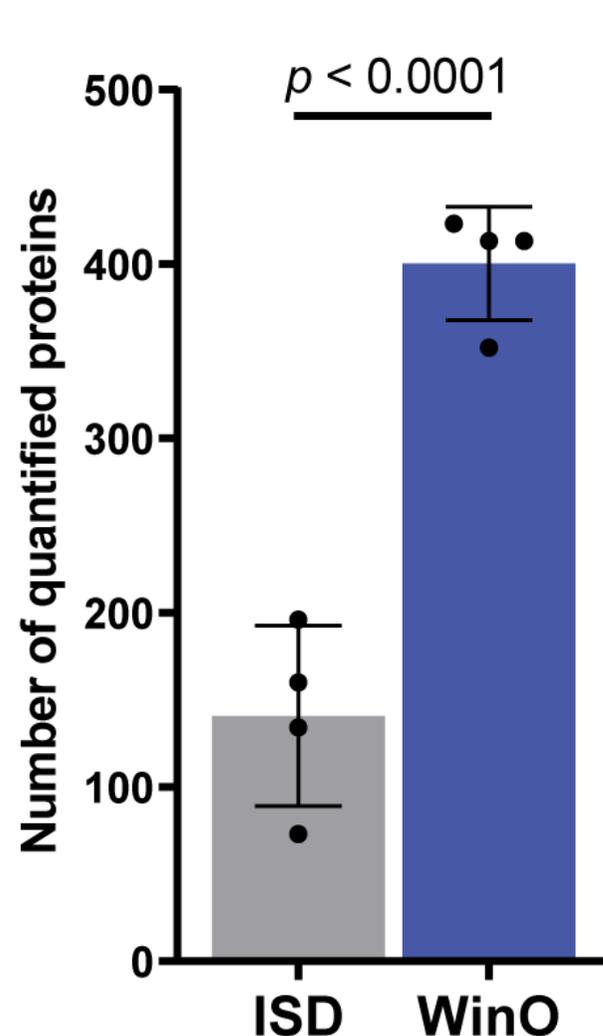
1細胞における効果

サンプル: 1細胞 (n = 4)

前処理方法:

溶液消化法(ISD)

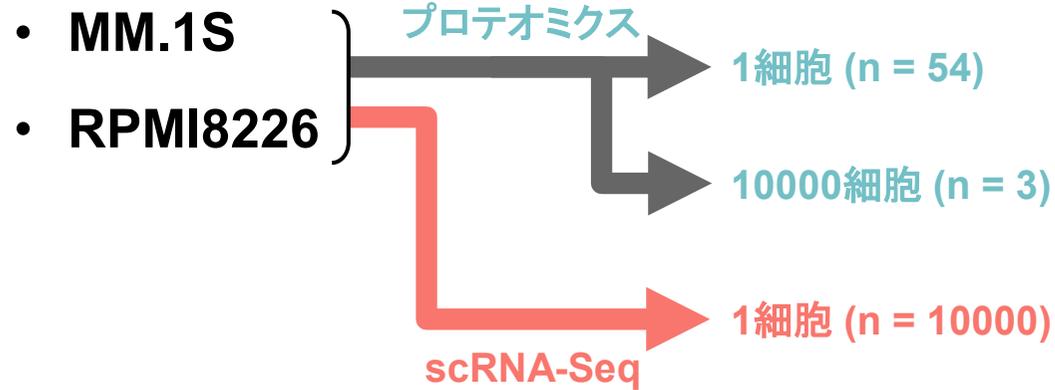
油中液滴法(WinO)



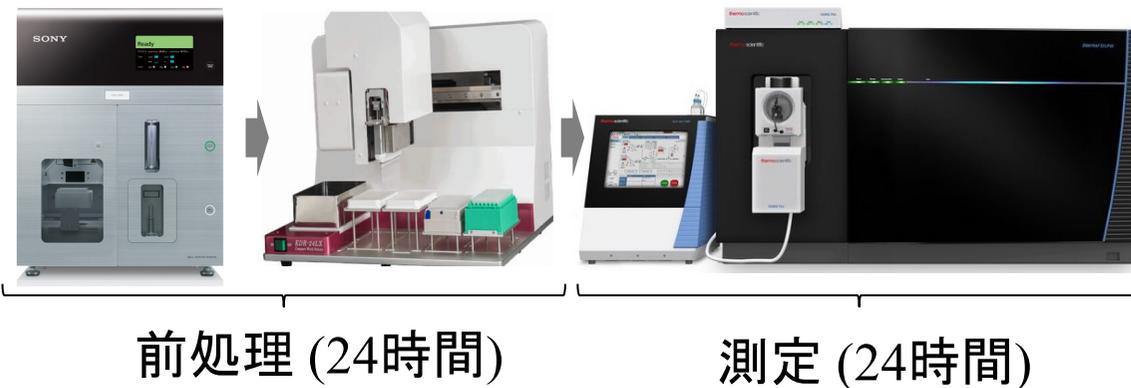
溶液消化法(ISD)に比べて、回収率とタンパク質の定量数が多い。

実施例の紹介

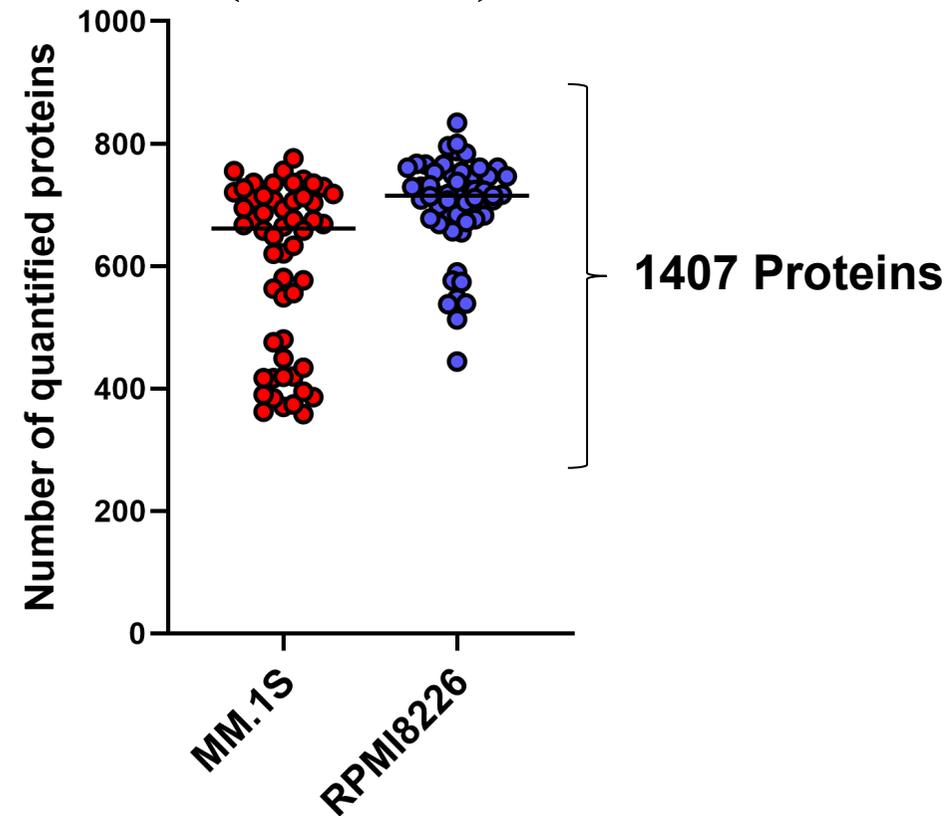
多発性骨髄腫細胞株



1細胞プロテオミクス

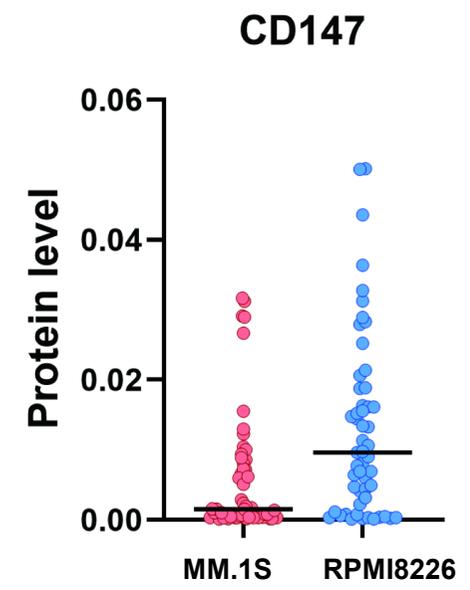
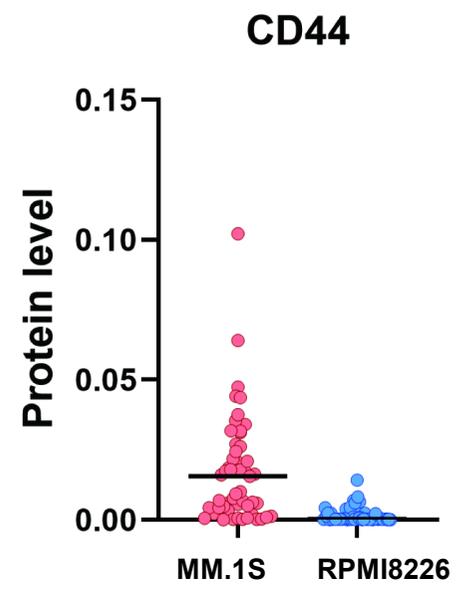
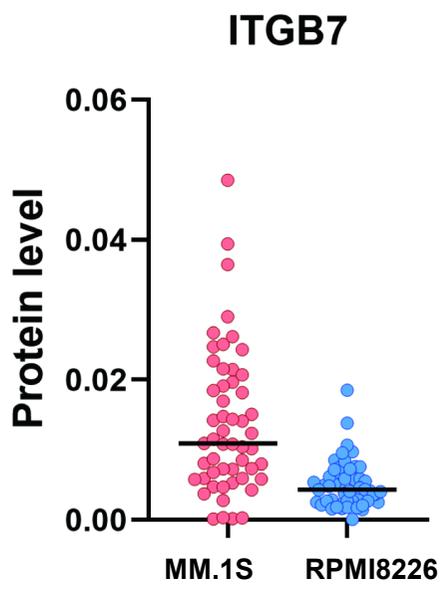


定量数の比較 (タンパク質)

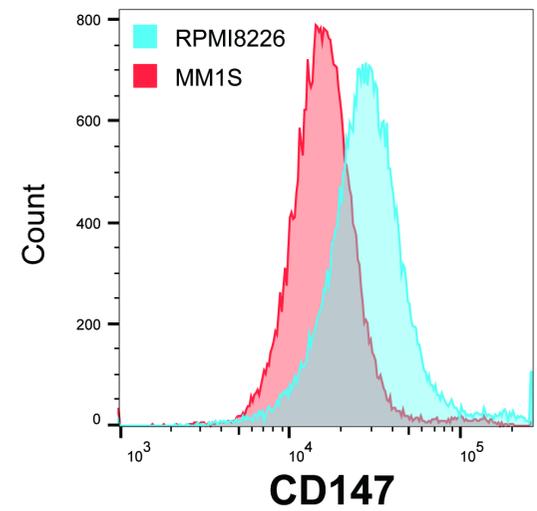
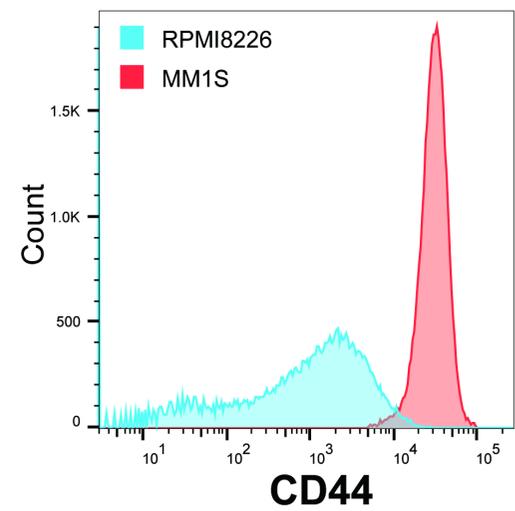
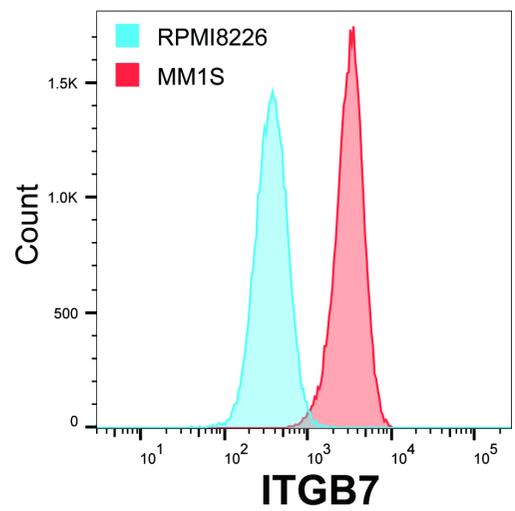


1細胞から約700種類のタンパク質が
定量される。

1細胞プロテオミクス

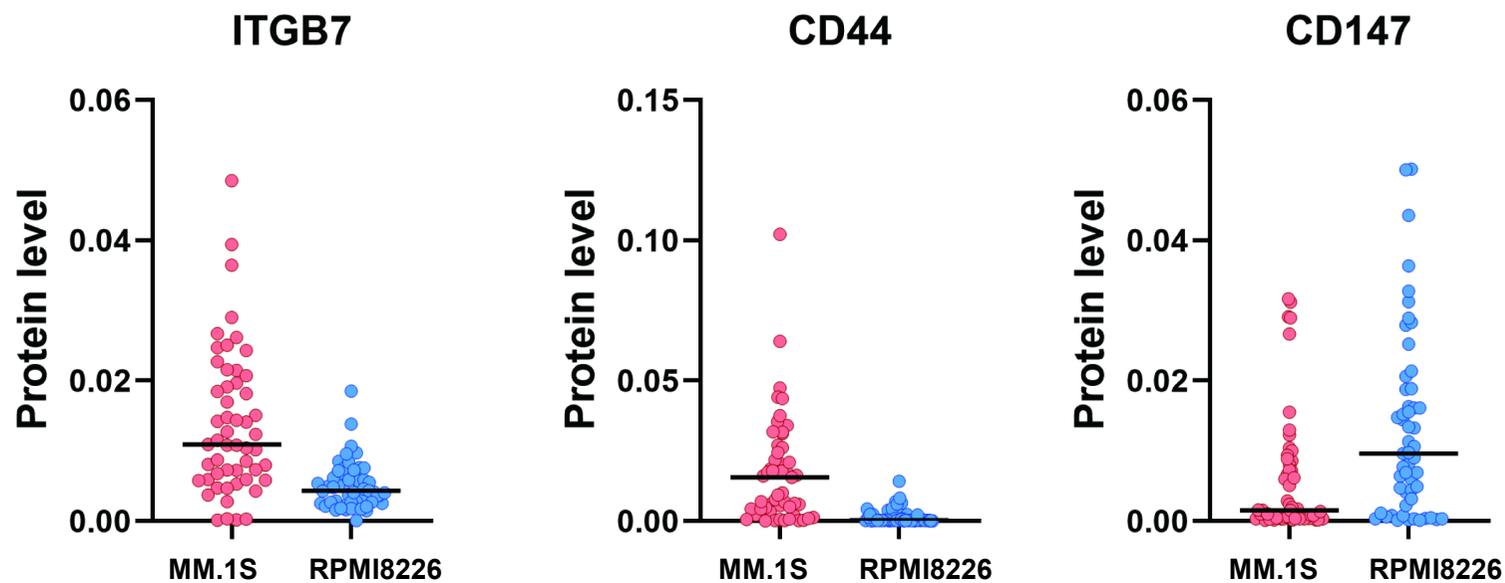


フローサイトメトリー

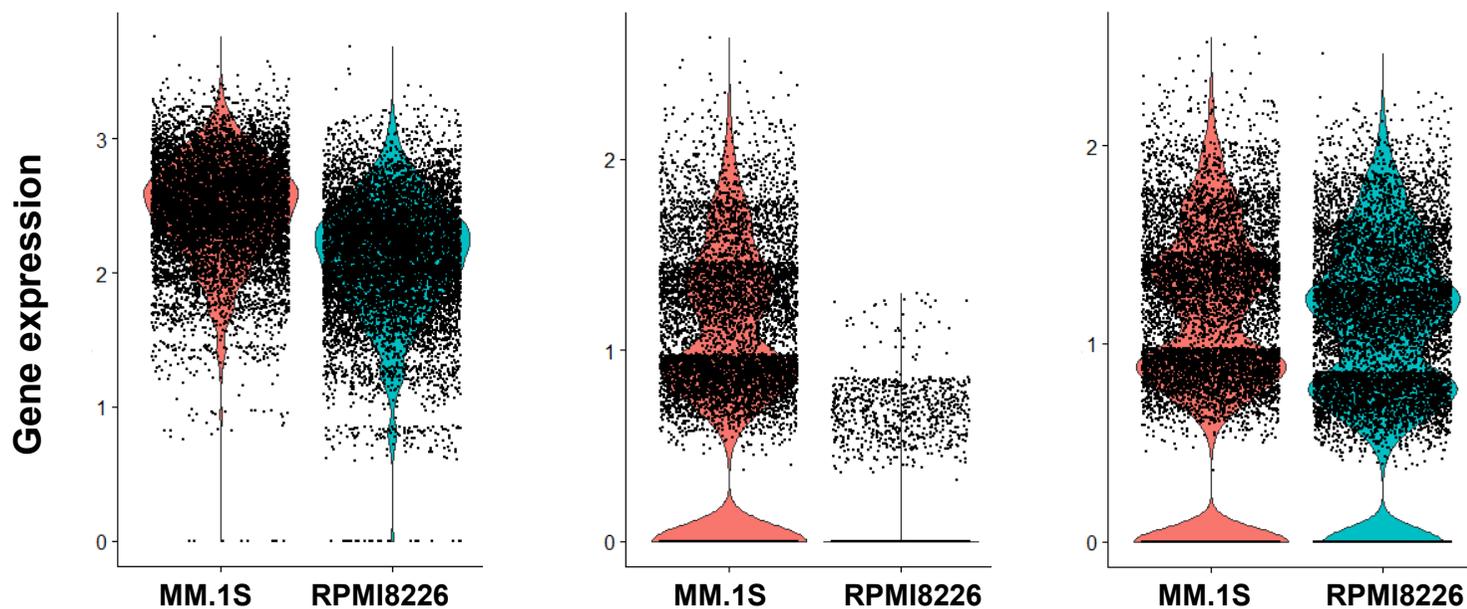


【 定量値の検証 : scRNA-Seqとの比較 】

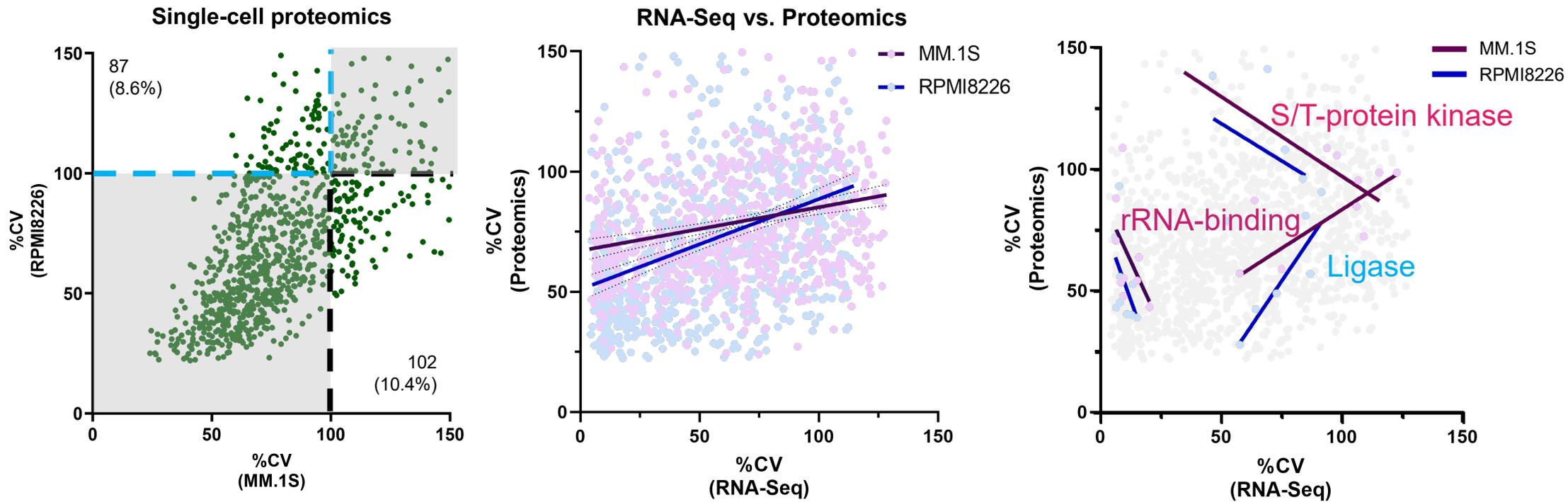
1細胞プロテオミクス



1細胞RNA-Seq



【 不均一性の比較 】



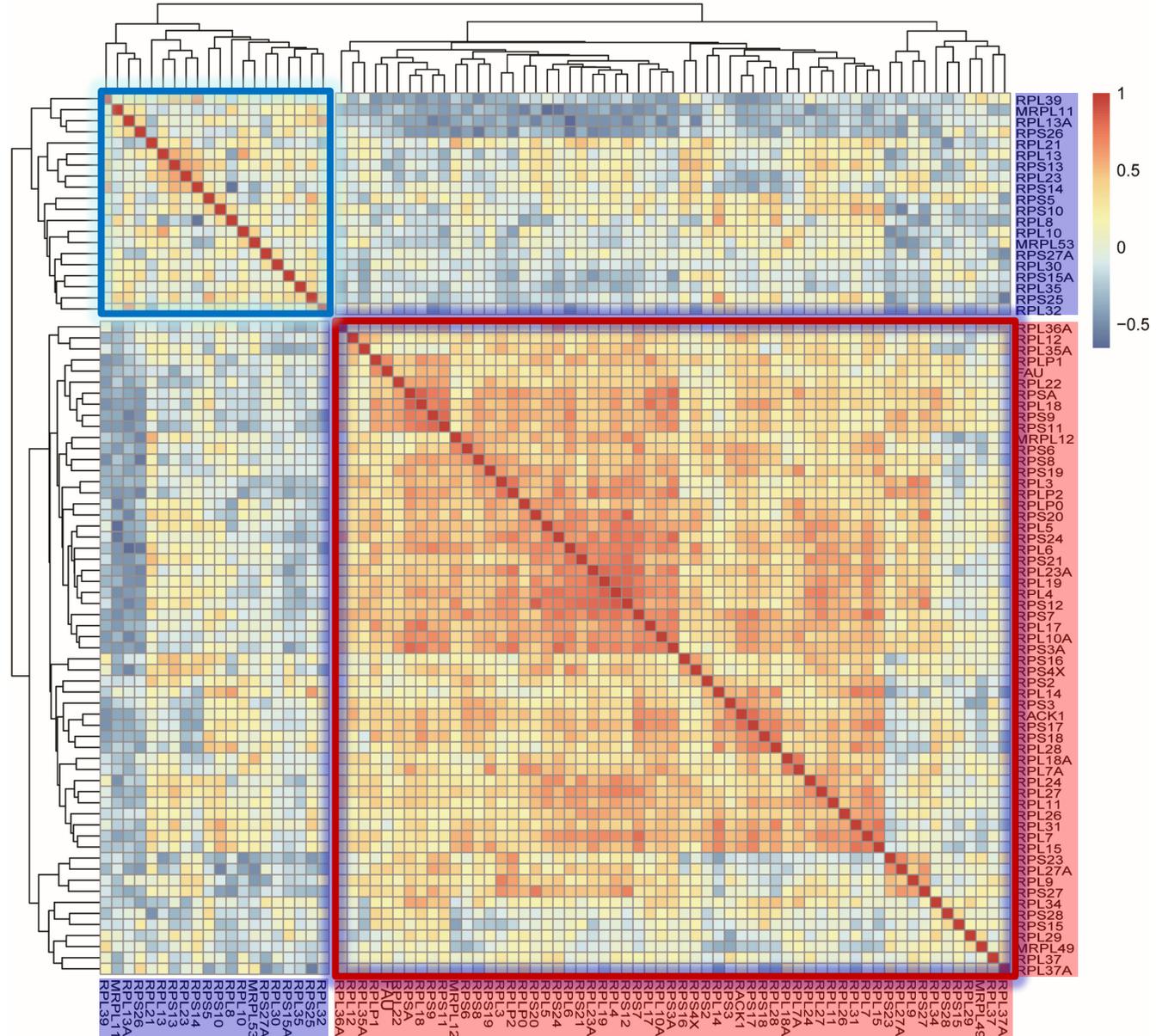
細胞株ごとに不均一性の高いタンパク質がある。
タンパク質とmRNAの不均一性は全体的には似ている。
機能分類によっては参考にできない。

【 共発現解析 : Ribosomal proteins 】

[MM.1S]

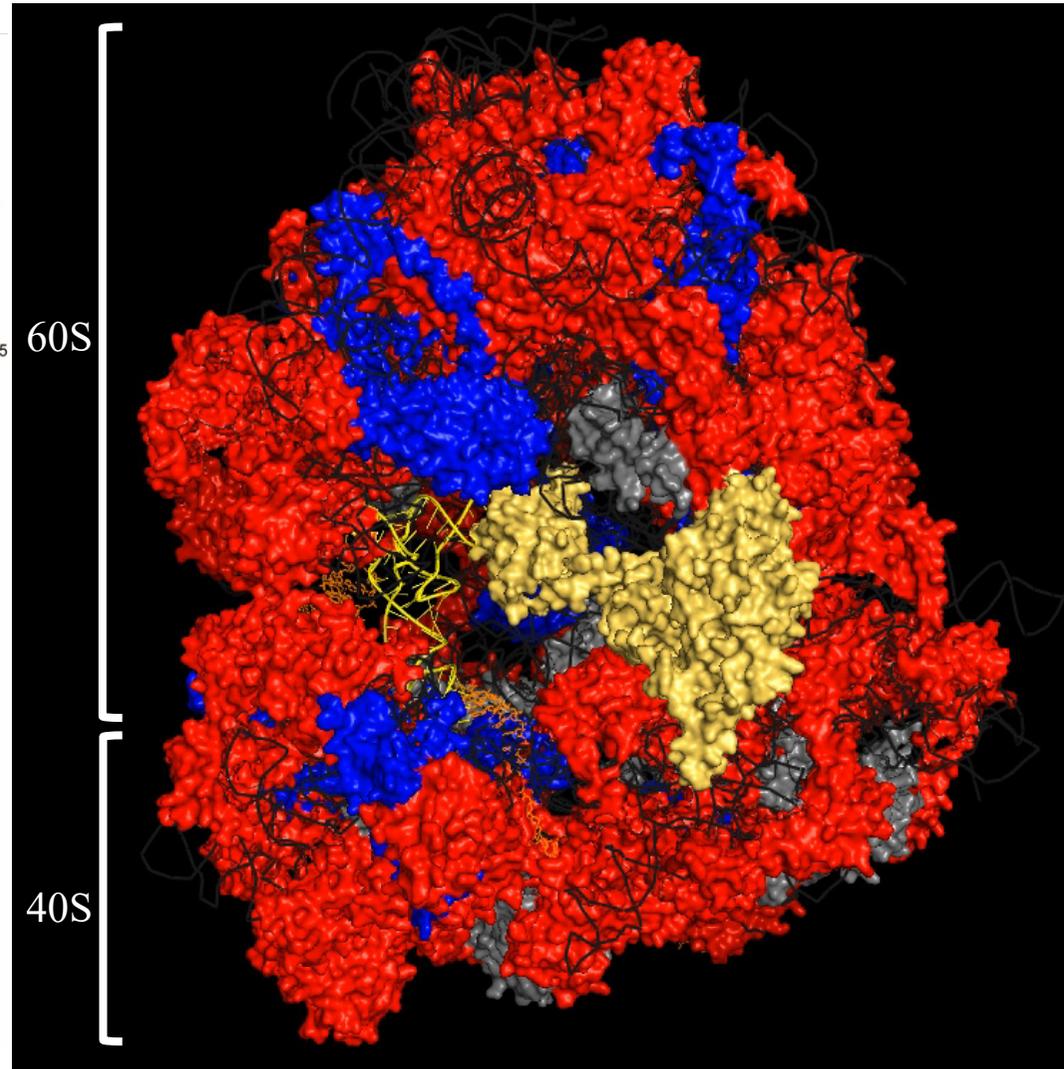
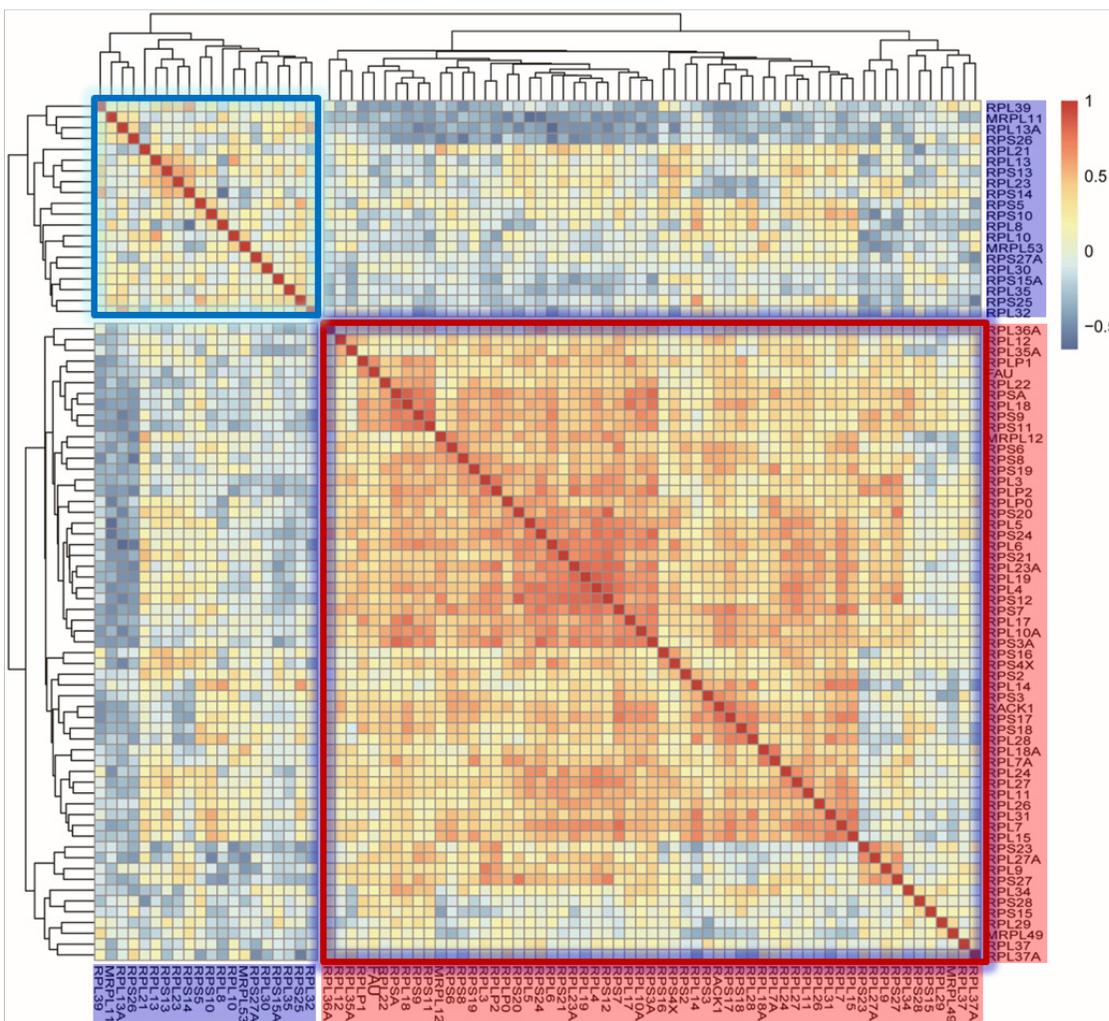
Ribosome

- リボソームは約80種類のタンパク質から構成される。
- 構成するタンパク質の種類には不均一性がある。
- mRNAの指向性が異なる。
- 疾患によって構成因子が変動する。



【 共発現解析 : Ribosomal proteins 】

[MM.1S]



新規機能を付与するリボソーム構成因子の探索に活用。

想定される用途

- 個別化医療につなげる

腫瘍組織内に存在する多様なガン細胞の観察と、それら個々の細胞集団の治療後の経過を可視化。

- 細胞分化を制御する

異なる細胞への分化過程におけるタンパク質変動を連続的に捉えることで、意図的な分化・脱分化誘導標的を探索。

実用化に向けた課題

- スループット性の向上

現在は一度に1000個の1細胞を前処理している。前処理の自動化を進め、10000個の1細胞を前処理できるようにする。

- 定量できるタンパク質の数を増やす

回収率を上げるために、容器との接面積を小さくする容器を開発中。質量分析時の感度を向上させる条件を最適化している。

企業への期待

- 油中の液滴だけを回収する等、液体ハンドリングの自動化を得意とする企業との共同研究を希望。
- 1細胞プロテオミクスのアプリケーションを探しています。
- 1細胞だけでなく、10個や100個など従来のプロテオミクスでは難しかったサンプルをお持ちの方は本方法が有効です。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 質量分析用のペプチド試料の調製方法
- 出願番号 : 特願2018-139362
- 出願人 : 熊本大学
- 発明者 : 増田豪

お問い合わせ先(必須)

熊本大学 熊本創生推進機構

(イノベーション推進部門)

TEL 096-342-3246

FAX 096-342-3300

e-mail liaison@jimu.kumamoto-u.ac.jp