

シングルセルでどこまで分かる？ — 1細胞質量分析の現状と展望 —



水 野 初

1 はじめに

生命現象メカニズムを解明するためには、生命を構成する最小単位である細胞内で起こる分子変化を正確に分析する必要がある。単一細胞分析は、病気のより詳細な解明や治療・診断法開発に貢献することが期待されているが、細胞1個という非常に小さいサイズかつ微量のサンプルを分析することはチャレンジングであり、様々な限界があるのが現状である。

1細胞レベルでのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトームは比較的早い段階から行われている。これらの分析には、核酸の増幅技術やマイクロ流路技術の発展が、1細胞中の微量分子の高感度検出や、大量の細胞を分析することができるハイスループット化に大きく貢献している。マルチオミックス解析の実現には、タンパク質や代謝物などの分析も必要であるが、これらの分子は遺伝子のように増幅することができないので、細胞内に存在しているものをいかにロスすることなく回収し、高感度分析するかが重要である。表1は、ヒトや植物などの様々な種の細胞について、その大きさや細胞内成分の量や濃度をまとめたものである¹⁾。細胞1個といっても、生物や細胞種によってその大きさや含まれる分子の種類や量は様々であり、とくにヒトの細胞は非常に小さく、さらに細胞内に存在する分子の量も非常に少ないことがわかる。しかしながら、低分子代謝物が細胞内に存在す

表1 1細胞の体積と細胞内に存在する各タンパク質と代謝物の物質量の概算

細胞種	体積 (pL)	タンパク質		代謝物	
		物質量 (fmol)	濃度 (mmol/L)	物質量 (fmol)	濃度 (mmol/L)
<i>H. sapiens</i> (ヒト)	1~4	10^{-7} ~0.1	3×10^{-8} ~0.1	0.01 ~30	3×10^{-3} ~30
<i>A. thaliana</i> (植物)	20	≤ 0.5	≤ 0.03	2~ 10000	0.1 ~500
<i>S. cerevisiae</i> (酵母)	0.03	10^{-8} ~ 10^{-3}	3×10^{-7} ~0.03	10^{-5} ~1	3×10^{-4} ~30
<i>E. coli</i> (大腸菌)	10^{-3}	10^{-9} ~ 10^{-3}	10^{-6} ~1	10^{-7} ~0.1	10^{-3} ~100

(引用文献 (2) をもとに作成)

る濃度を計算してみると、アミノ酸など比較的細胞内に多く存在する分子であれば数~数十 mmol/L となり、比較的高濃度で存在していることがわかる。このため、細胞や細胞内成分のみを選択的に採取して測定することができれば、従来の分析法でも十分に検出できることが予想される。

質量分析は高感度かつ網羅的な検出に加え、ダイナミックレンジが広いこと、細胞内に微量しか存在しない分子から比較的少量に存在する分子まで幅広く分析することが可能である。したがって、現在行われている多くの1細胞メタボロミクスや1細胞プロテオミクスにおいて、質量分析は必須の分析法であるとともに、今後の質量分析技術の発展によって、更なる高感度化が期待できる。現在、質量分析を用いた1細胞オミックス解析技術について様々な方法が開発されているが、その特長はサンプリングや前処理、質量分析法など多岐にわたるため、ユーザーは研究目的に合う最適な方法を選択する必要がある。本稿では、様々な1細胞質量分析法の中から代表的ないくつかの方法について解説する。

2 1細胞オミックスで用いられる分析法

2.1 1細胞メタボロミクス

細胞内には、遺伝子やタンパク質の原料となる核酸やアミノ酸や、エネルギー産生に関与するTCA回路上の代謝物やそれらの関連代謝物、糖や脂質などの様々な種類の低分子化合物が存在している。代謝物はRNAやタンパク質に比べ、細胞内で非常にダイナミックに変化するため、正確な代謝物プロファイルを得るためには、細胞のサンプリングから質量分析までを迅速に行う必要がある。

フローサイトメトリーのように、マイクロ流路によって細胞1個ずつに単離し、そのままイオン化する方法は、接着細胞の場合にはいったん剥がして浮遊細胞にする必要がある。この時、細胞にとっては通常とは大きく異なる状態となるため、細胞への影響について確認が必要である。一方、細胞を接着させたまま分析する方法として、接着細胞に対してレーザーを照射して細胞成分を脱離・イオン化させて質量分析する方法や、レーザーの代わりにエレクトロスプレーを細胞表面に噴霧し、スプレー溶媒に抽出されてイオン化した細胞成分を質量分析する、脱離エレクトロスプレーイオン化 (DESI) を用いた方法も開発されている²⁾ (図1A)。これらの方法は、細胞1個を丸ごと質量分析するため、細胞ごとの代謝物プロファイルなどを解析するのに有用である。

細胞内オルガネラなど、細胞内特定部位における代謝物局在解析のための方法として、二次イオン質量分析法 (SIMS) を用いた1細胞イメージング法³⁾ (図1B) や、細胞内成分を口径の小さいキャピラリーで吸引して質量分析する単一生細胞質量分析法⁴⁾ (図1C) がある。SIMSは、一度の照射でイオン化される範囲がナノメートルと、高分解能なイメージング質量スペクトルの取得が可能であることから、細胞内分子をオルガネラレベルで分析することが可能である。しかしながら、これらのイオン化法は真空化で行う必要があるため、生きたままの細胞を分析することはできない。単一生細胞質量分析法は、生きている細胞1個を顕微鏡で観察しながら、ある瞬間の細胞や細胞内小器官を、ナノエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) に用いる金属コーティングを施したガラスキャピラリーを用いて採取し、その中に含まれる代謝物をそのまま質量分析することができる。これにより、細胞の変化を顕微鏡観察しながら、その瞬間

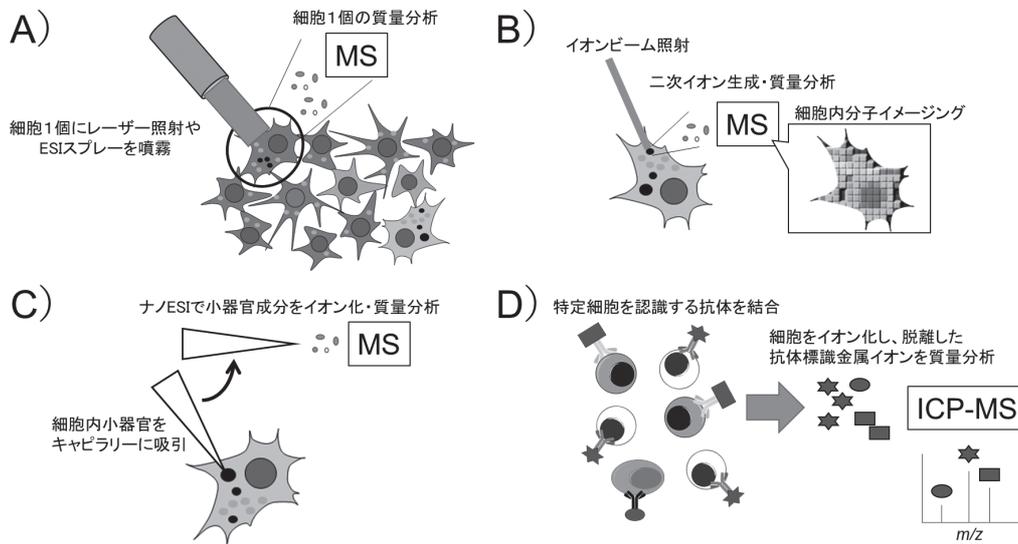


図 1 さまざまな 1 細胞質量分析法による 1 細胞分析イメージ

A) レーザー脱離 1 細胞質量分析法, B) 二次イオン質量分析法による 1 細胞内分子イメージング, C) 単一生細胞質量分析法による細胞内小器官局在分析, D) 金属標識した細胞認識抗体を用いた 1 細胞サイトメトリー.

の細胞内分子を分析することで、細胞現象と関連する分子を検出することができる。これらの方法は、内因性代謝物の局在解析に加え、薬剤やその代謝物の細胞内局在解析にも応用されている。

2・2 1 細胞プロテオミクス

タンパク質は生命の直接的な状態を表す物質であり、生命活動や細胞同定や病気診断の主要なマーカー分子として用いられる。1 細胞プロテオミクスは、従来のボトムアップ型のプロテオミクス手法が用いられており、細胞 1 個丸ごととサンプリングし、細胞膜を溶解して得られたタンパク質のプロテアーゼ処理を行い、得られたペプチド断片を nanoLC-MS や CE-MS など分析して各タンパク質を同定する⁵⁾。しかし、1 細胞中のタンパク質精製から還元化、酵素消化によるペプチド断片化といった実験ステップが多く、時間も要するため、サンプルのロスやスルーポットの点で課題が残る。

最近では、前処理・プロテアーゼ消化などの前処理法の改良や、質量分析装置の技術開発による高速度スキャンに加え、イオンモビリティを利用した⁶⁾ 夾雑イオンとの分離による感度向上によって、1 細胞レベルで検出できるペプチド、タンパク質の数も飛躍的に伸び、細胞 1 個当たり 1000 前後のタンパク質を同定できるようになった。

2・3 1 細胞質量サイトメトリー

1 細胞質量サイトメトリーは、それぞれの抗体標識に質量の異なる金属原子を用い、抗体が結合した細胞をイオン化する際に脱離する金属イオンを、ICP-MS により質量分析する方法である。これにより、プロテオミクスなどの煩雑な前処理を行うことなく、標的タンパク質の有無を簡便かつ高感度に分析できる。したがって、がん細胞など様々な細胞のフェノタイプを簡便かつハイスルーポットで同時分析することができ⁶⁾ (図 1 D)、がん細胞の検出など診断での応用が期待される。さらに、この金属標識抗体による細胞認識法と、細胞の高分解能イメージングを融合させることで、細胞中の標的タンパク質や mRNA をオルガネラレベルでイメージングすることができるようになった⁷⁾。

3 おわりに

本稿では、1 細胞レベルにおけるプロテオミクスとメタボロミクスについて、いくつか代表的な方法について紹介してきたが、現在も世界中の多くの研究者たちが、様々な細胞サンプリング法から前処理、イオン化、質量分析法を新たに開発しており、1 細胞オミクス解析法のますますの進展が期待される状況である。しかし、微量試料を扱う際に、分析感度向上によるコンタミネーションによるミスアノテーションや、サンプリングの際の細胞へのストレスも分析結果に影響することが予想される。正確な分析結果を取得するために、バックグラウンドピーク等の細胞以外のピークを把握し、細胞由来ピークを正確に同定した 1 細胞データベースなどの整備が必要となると考えられる。

文 献

- 1) B. Budnik, E. Levy, G. Harmange, N. Slavov : *Genome Biol.*, **19**, 161 (2018).
- 2) R. Yin, K. E. Burnum-Johnson, X. Sun, S. K. Dey : *J. Laskin, Nat. Protoc.*, **14**, 3445 (2019).
- 3) C.F. Newman, R. Havelund, M.K. Passarelli, P.S. Marshall, I. Francis, A. West, M.R. Alexander, I.S. Gilmore, C.T. Dollery : *Anal. Chem.*, **89**, 11944 (2017).
- 4) K. Yahata, H. Mizuno, E. Sugiyama, K. Todoroki : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 114318 (2021).
- 5) R. T. Kelly : *Mol. Cell Proteomics*, **19**, 1739 (2020).
- 6) M. H. Spitzer, G. P. Nolan : *Cell*, **165**, 780 (2016).
- 7) D. Schulz, V. R. T. Zanutelli, J. R. Fischer, D. Schapiro, S. Engler, X.K. Lun, H. W. Jackson, B. Bodenmiller : *Cell Syst.*, **24**, 25 (2018).



水野 初 (Hajime MIZUNO)

静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1)。広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻博士課程後期中途退学。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》単一細胞質量分析法の開発。《趣味》旅行、散歩。