

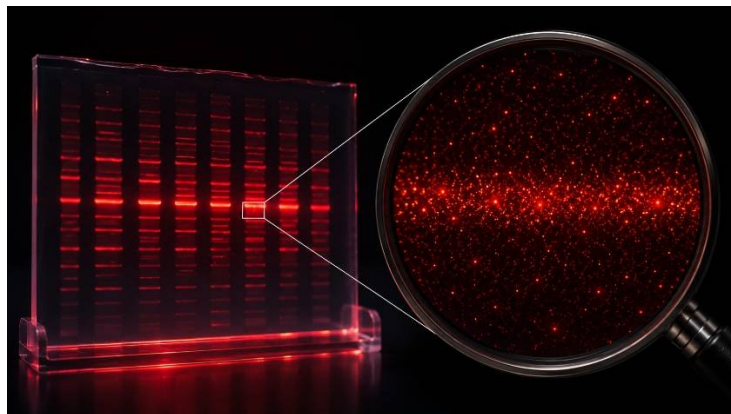
東京大学
京都大学アイセムス（高等研究院 物質－細胞統合システム拠点）
大阪大学
科学技術振興機構（JST）

1 細胞の全タンパク質発現パターンを 分子感度で解析することに成功

——従来法のわずか数十分の一の細胞数で、分化過程の全体像が明らかに——

発表のポイント

- ◆細胞ごとのタンパク質の発現パターンを、1分子感度で取得・解析ができる単一細胞プロテオームプロファイル解析法を開発しました。
- ◆従来のタンパク質検出法であるゲル電気泳動に先端顕微鏡法を組み合わせた新しいタンパク質分析法であり、個々の細胞状態のプロファイルを高感度かつ簡便に捉えることに成功しました。
- ◆基礎生命科学のみならず、疾患研究や創薬、再生医療など幅広い分野において有用な解析基盤となることが期待されます。



分子感度でのゲル電気泳動による1細胞のプロテオームプロファイリング

概要

東京大学大学院薬学系研究科のラティファ ビンティ カマルザマン 特任研究員（研究当時、大阪大学大学院生命機能研究科 大学院生）、金水縁 助教、谷口雄一 教授、京都大学アイセムス（高等研究院物質－細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS））の日高拓也 客員研究員（研究当時）、京都大学農学部の土田美咲 学部生（研究当時）らの研究グループは、伝統的なタンパク質分析法であるゲル電気泳動法（注1）に先端顕微鏡技術である光シート顕微鏡（注2）を導入することで、細胞内に存在するタンパク質全体（プロテオーム）（注3）を、細胞ごとに、分子量別の発現プロファイルとして1分子感度で計測できる Single-cell PAGE-PISA 法を開発しました（図1）。

Single-cell PAGE-PISA 法は、個々のタンパク質を一つひとつ同定する従来型のプロテオーム解析とは異なり、細胞内のタンパク質全体のパターンを各細胞状態のプロファイルとして捉える新しい解析基盤です。本手法を用い、細胞間における総タンパク質量の違いの解析、異なるがん細胞株の識別、さらには iPS 細胞（人工多能性幹細胞）（注 4）から心筋細胞への分化過程の追跡など、多様な 1 細胞レベルでのプロテオーム解析に成功しました。

今後、複雑かつ多段階な分化過程に伴う細胞状態の変化を、全タンパク質の発現パターンの時間的変化として記述・解析できる検査基盤としても有望です。さらに、疾患研究、創薬、再生医療など幅広い分野への応用が期待されます。

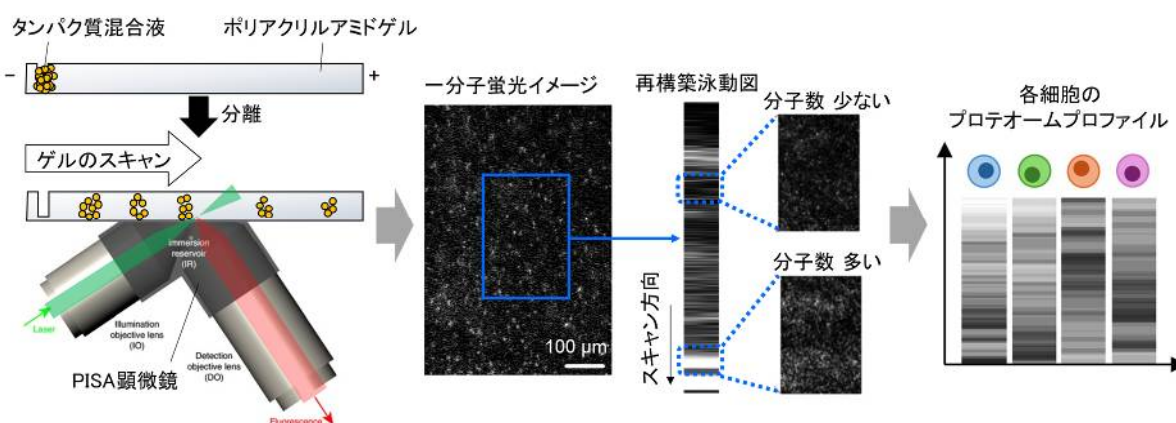


図 1 : Single-cell PAGE-PISA 法 の 概 念 図

個々の細胞を単離し、細胞溶解、蛍光標識およびゲル電気泳動を行った後、PISA 顕微鏡でゲル全体の 1 分子蛍光イメージング（注 5）を行いました。これにより、分子量ごとに分離されたタンパク質分子を蛍光スポットとして一つひとつ検出でき、各細胞のタンパク質バンドパターンを再構築できます。本研究ではこの情報を各細胞のプロテオームプロファイルデータとして扱いました。

発表内容

私たちの体を構成する細胞の一つひとつは、同じゲノム DNA を持ちながらも微妙に異なる状態や機能を持っています。この「細胞の個性」は、がん・発生・薬物応答など多くの生命現象を理解する上で欠かせない情報です。

細胞の状態を最も直接的に反映する分子はタンパク質です。DNA（遺伝子）は細胞機能の設計図、RNA はその読み取り産物ですが、実際に細胞の中で機能するのはタンパク質だからです。近年は、分子数を増幅できる RNA 解析が細胞状態の把握に広く使われています。しかし、RNA の量からタンパク質の量を正確に予測することが難しいことが知られています。一方、細胞 1 個に含まれるタンパク質の量は極めて微量（50～300 ピコグラム。1 ピコグラムは 1 兆分の 1 グラム）で、その全体像を高感度かつ定量的に捉える技術の開発は、生命科学における長年の課題でした。とりわけ、細胞の運命を決定づけるタンパク質群（転写因子やシグナル伝達分子など）の多くは、1 細胞あたり数十～数百分子程度しか存在しない低存在量タンパク質であり、こうした「細胞の機能をつかさどる」分子群を 1 細胞レベルで捉えることは、従来手法では特に困難でした。

今回開発した Single-cell PAGE-PISA 法は、ゲル電気泳動と、本研究室が独自に開発した光シート顕微鏡装置（PISA 顕微鏡）を組み合わせ、全く新しい単一細胞タンパク質分析法です（図 2）。具体的には、電気泳動でプロテオームを分子量別に分離し、PISA 顕微鏡で各タンパク質分子を 1 分子レベルで可視化・計数することにより、細胞ごとに分子量別の発現量分布（プ

ロテオームプロファイル) を取得します。本法の特徴は、従来の単一細胞プロテオーム解析手法と比べてより低存在量のタンパク質まで捉えられる高い感度と、高額な専用装置を必要としない簡便さを併せ持つ点にあります。

本手法を用い、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化過程を 1 細胞レベルで調べました。分化開始後 0 日・16 日・30 日の各時点で個別の細胞のプロテオームプロファイルを取得したところ、分化が進むにつれてタンパク質総量が増加し、細胞間のばらつきも拡大することが確認できました (図 2)。さらに、各細胞のプロテオームプロファイルの類似性をもとにした擬似時間解析 (pseudotime analysis) (注 6) により、未分化細胞から心筋細胞へと至る分化軌跡を解析できました。この解析は、従来の RNA 解析 (単一細胞トランスクリプトーム解析) と比べ、数十分の一という少ない細胞数で実現できた点も注目されます。また、本手法で分化段階ごとに発現が変動する特定の分子量領域のタンパク質群を選定し、他のタンパク質分析法や公開単一細胞データベースとの統合解析により、心筋分化過程において重要なタンパク質候補の絞り込みに成功しました。

iPS 細胞の再生医療への応用に向けて、iPS 細胞由来の移植用細胞は分化効率や成熟度にばらつきがあり、1 細胞単位での品質評価が重要な課題となっています。本手法は、こうした分化細胞の品質評価工程に応用できる基盤としても期待されます。

Single-cell PAGE-PISA 法は、細胞内のタンパク質を分子量ごとに分離し、1 分子感度でプロファイリングできる世界初の手法です。特別な装置を必要とせず、一般的な生化学実験室にあるマイクロピペットや市販のゲル電気泳動装置だけでサンプル調整が可能である点も、本手法の強みです。本手法は、専門的な大型装置を持たない研究機関や企業でも単一細胞プロテオミクスを実施できる普及型の解析プラットフォームであり、不均一な組織・希少細胞集団、発生・疾患進行・治療応答などの動的プロセスの研究や空間プロテオミクス、細胞小器官レベルでの単一細胞プロテオミクスへの展開など、基礎研究から再生医療・創薬に至る幅広い分野で有用な解析基盤となることが期待されます。

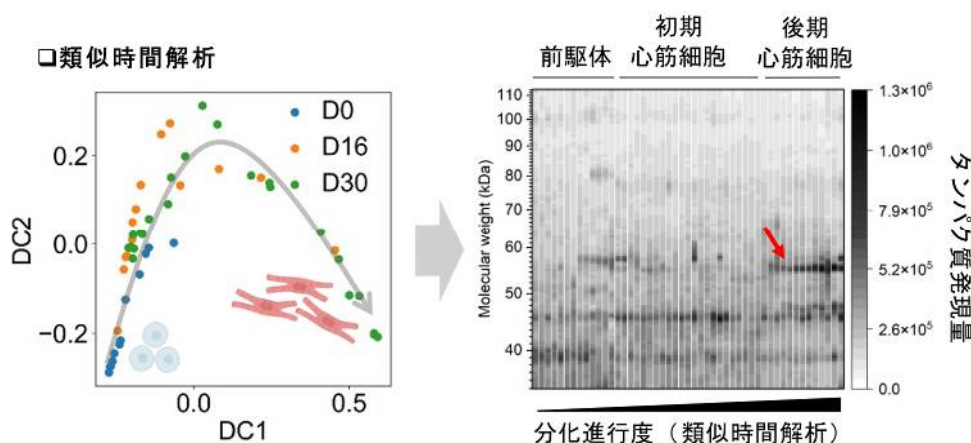


図 2 : Single-cell PAGE-PISA 法による心筋細胞分化過程の類似時間解析

分化開始後 0 日・16 日・30 日 (D0, D16, D30) の各時点で単一細胞プロテオームプロファイルを取得し、類似時間解析を行いました。従来法の数十分の一の細胞数 (全体 : 49 個) で、分化過程における細胞状態の変化を捉えることができ、分化段階ごとに発現が変動する特定の分子量領域を選定することが可能です (右、赤矢印)。

発表者・研究者等情報

東京大学

大学院薬学系研究科

ラティファ ビンティ カマルザマン 特任研究員

研究当時：大阪大学 大学院生命機能研究科 大学院生

京都大学 アイセムス（高等研究院 物質—細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS）） 特別研究学生

金 水縁 助教

兼：京都大学 アイセムス（高等研究院 物質—細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS）） 客員講師

研究当時：京都大学 アイセムス（高等研究院 物質—細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS）） 特定講師

谷口 雄一 教授

兼：大阪大学 大学院生命機能研究科 招へい教授

兼：サントリーSunRiSE フェロー

研究当時：京都大学 アイセムス（高等研究院 物質—細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS）） 教授

京都大学

アイセムス（高等研究院 物質—細胞統合システム拠点（WPI-iCeMS））

日高 拓也 客員研究員（日本学術振興会特別研究員-PD）（研究当時）

現：Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences (IMBA)、Postdoctoral Researcher

農学部

土田 美咲 学部生（研究当時）

論文情報

雑誌名：Nature Communications

題名：Molecular profiling of single-cell proteome via gel electrophoresis and 3D single-molecule imaging

著者名：Latiefia Kamarulzaman, Sooyeon Kim, Takuya Hidaka, Misaki Tsuchida, Yuichi Taniguchi

DOI：10.1038/s41467-026-74840-0

URL：<https://www.nature.com/articles/s41467-026-74840-0>

研究助成

本研究は、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST「社会課題解決を志向した革新的計測・解析システムの創出（研究総括：鷲尾 隆）」研究領域における「物理・情報理論を駆使したゲノム高次分子構造解析技術の開発（JPMJCR2334）」、同事業 さきがけ「計測・解析プロセス革新のための基盤の構築（研究総括：田中 功）」研究領域における「三次元光学イメージングによる材料形成過程の解析基盤の構築（JPMJPR25J4）」、同事業 ACT-X「生命と化学（研究総括：袖岡 幹子）」研究領域における「三次元光散乱顕微鏡による一分子プロテオミクス（JPMJAX1914）」、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 基盤研究(A)（課題番号：JP20H00460）、挑戦的研究（開拓）（課題番号：JP20K20458）、若手研究（課題番号：JP19K15718、

JP22K14800)、サントリーSunRiSE 生命科学研究者支援プログラム、および文部科学省 国費外国人留学生制度の支援により実施されました。

用語解説

(注1) ゲル電気泳動：生命科学では古くから使われているタンパク質分離の基礎技術。混合タンパク質を多孔性ゲルの中で電場にさらすと、小さな分子は速く、大きな分子はゆっくり移動し、分子量ごとに整然と並んで分離される。

(注2) 光シート顕微鏡：照射光を試料内部に薄い平面状で照射することで、組織切片、オルガノイドなど厚みのある試料内部での蛍光観察ができる顕微鏡装置。本研究では、本研究室で独自に開発した、1分子の蛍光撮影が可能な光シート顕微鏡であるPISA顕微鏡を用い、ゲル内に捕捉された蛍光標識タンパク質の分子1個1個を3次元的に撮影および計数を行った。

(注3) プロテオーム：細胞や生物が持つタンパク質の全体集合。「ゲノム」がDNAの全体集合を指すのと同様に、タンパク質の全体集合を意味する。

(注4) iPS細胞（人工多能性幹細胞）：皮膚細胞などの体細胞に特定の遺伝子を導入して多能性を持つよう初期化した幹細胞。さまざまな細胞種へ分化させることができ、再生医療や疾患研究に活用される。

(注5) 1分子蛍光イメージング：蛍光標識された個々の分子を1個ずつ光学的に検出する技術。分子を直接「数える」デジタル計測が可能のため、マイクロモラー以下の希釈試料の高感度定量分析に適している。

(注6) 擬似時間解析 (pseudotime analysis)：細胞間のプロファイル類似性をもとに、細胞状態の連続的な変化を順序付けて再構成する計算解析法。分化や発生過程における細胞の軌跡を把握するために用いられる。

問合せ先

〈研究内容について〉

東京大学大学院薬学系研究科

教授 谷口 雄一 (たにぐち ゆういち)

Tel : 03-5841-4760 E-mail : taniguchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp

〈機関窓口〉

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム

Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

京都大学アイセムス (高等研究院 物質—細胞統合システム拠点 (WPI-iCeMS))

コミュニケーションデザインユニット

遠山 真理 (とおやま まり)

電話 : 075-753-9749 Eメール : cd@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

大阪大学

生命機能研究科庶務係

TEL : 06-6879-4692 FAX : 06-6879-4420

E-mail : seimei-syomu@office.osaka-u.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho@jst.go.jp

<JST 事業について>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ICT グループ

櫻間 宣行 (さくらま のりゆき)

Tel : 03-3512-3526 E-mail : crest@jst.go.jp