

28T-pm03S

MALDI-MS/MS を用いたハイスループットバイオマーカータンパク質定量に向けた Scrambled Internal Standard Peptide 法の開発

○米山 敏広¹, 大槻 純男², 内田 康雄¹, 立川 正憲¹, 寺崎 哲也¹ (¹東北大院薬, ²熊本大院生命科学)

【目的】 Matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS/MS) は liquid chromatography を介さないため非常にスループット性が高いが再現性の低さがタンパク質定量のボトルネックとなっている。そこで本研究では我々が新たに考案した Scrambled Internal Standard (IS) Peptide 法を用いて MALDI-MS/MS による再現性の高い定量技術を開発することを目的とした。

【方法】 Target peptide を Fibrinogen から選択し、IS として Target peptide のアミノ酸順を入れ替えた Scrambled IS peptide を合成した。α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CACA) をマトリックスとして MALDI-LTQ-based MS/MS mode にて測定を行った。

【結果・考察】 MALDI-MS/MS を用いて同一量の Target peptide を 10 回測定した結果、intensity のばらつき(%CV)は 55.1%であったが、Scrambled IS peptide で補正することで 16.2%へ劇的に改善した。そこで Scrambled IS peptide 法を用いて検量線を作成した結果、5-1000 fmol/μL において良好な直線性($r^2=0.99$ 以上)を示した。ペプチドのアミノ酸組成が定量感度に及ぼす影響を解析した結果、芳香族アミノ酸を置換したペプチドが劇的に感度低下した。このことから芳香族アミノ酸を含むことが高感度化に重要であることが明らかとなった。市販血漿をトリプシン消化し、LC-MS/MS および MALDI-MS/MS を用いて Fibrinogen を定量した結果、0.1-5 μL plasma の範囲で 2 つの手法の定量値の差が 20%以内となった。以上から Scrambled IS Peptide 法を用いることで MALDI-MS/MS による再現性の高いバイオマーカータンパク質の定量が実現することが明らかとなった。本手法は 1 測定 1min 以内で測定できる非常にスループット性の高い手法であり、将来的なバイオマーカータンパク質を用いた臨床診断への貢献が期待される。