

25P-am09

LC-MS を用いた細胞内サイクリック ADP リボース高感度定量法の構築

○齋藤 一樹¹, 金光 祥臣¹, 田中 晃佑¹, 鈴木 千登世², 阿部 高明², 塚本 宏樹¹, 松本 洋太郎¹, 富岡 佳久¹ (¹東北大院薬, ²東北大院医工)

【背景・目的】サイクリック ADP リボース (cADPR) は、Ca²⁺を介して種々の細胞機能と密接に関わっており、その挙動を捉えることは疾患メカニズムや薬剤の作用機序を明らかにする上で重要である。しかし細胞内における cADPR は極微量であり、その定量には感度・選択性の高い手法が必須である。そこで本研究は、LC-MS 分離分析条件を検討し、細胞内 cADPR の高感度定量系を構築すること目的とした。【方法・結果】LC には NANOSPACE-SI2 (SHISEIDO) を使い、各種分離モードにおいてそれぞれ性質の異なるカラムを比較検討した。その結果、逆相モードにおける Sunrise C28 (ChromaNik Technologies Inc.) にて、十分な夾雑ピークとの分離および最も良好なピーク形状が得られた。また MS について、複数のデバイス・検出法における感度を比較し、四重極オービトラップハイブリッド型質量分析計 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) の選択イオンモニタリング法で最も良好な感度が得られた。これらの結果をもとに分離分析条件および抽出・前処理法の最適化を行った。また、内部標準物質として当研究グループで合成した重水素標識化 cADPR (cADPR-d₆) を使用した。これらの条件で検量線の作成を行ったところ、0.1 - 50 ng/mL の範囲にて良好な直線性が得られた。また添加回収試験によって良好な真度・精度および日間再現性が確認された。【考察】分離分析条件の最適化を行った結果、本定量法は先行研究の 1,000 倍以上の感度を達成し、10⁶ 個スケールの培養細胞から cADPR を定量することができた。また、合成した cADPR-d₆ は測定で生じる誤差・ばらつきを良好に補正した。今後、本定量系を種々の疾患モデルや薬剤へと応用し、疾患メカニズムや薬の作用機序の詳細な解明への応用が期待される。