

21PO-pm105

誘導体化 LC-MS/MS 法によるアルツハイマー診断を目指した神経作動性ジペプチドの網羅解析の開発

○内田 和希¹, 六車 宜央¹, 筒井 陽仁^{1,2}, 赤津 裕康^{3,4}, 井之上 浩一¹ (立命館大薬,²小野薬品, ³名古屋市立大医, ⁴福祉村病院)

【目的】近年, 神経系作動性アミノ酸やペプチドが注目され, アルツハイマー型認知症 (AD) との関連性が報告されている. また, 生体内で重要な修飾後変化であるアセチル化, リン酸化修飾などの重要と考えられている. その一方で, アミノ酸が縮合したジペプチドは, 生理機能, 化学修飾に加えて, 神経系における存在さえも十分に解明されていない. さらに, N/C 末端の異性化ジペプチドの存在比率や神経系へ及ぼす影響は, 高感度, 高分離な分析技術が望まれる. 先行研究において, 我々は, AD 患者の脳脊髄液 (CSF) を解析し, アミノ酸代謝系の有意な変動が, NMDA 型グルタミン酸受容体に関与していると考えた. また, 本研究に際して構築した NMDA 型グルタミン酸受容体を標的とした Gly/Glu 由来のジペプチドの網羅解析法に加え, アセチル化, リン酸化ペプチドを測定し, AD 患者及び健常人の CSF, 血清を用いた網羅解析を実施し, CSF, 血清間で相関のあるジペプチド分布を把握することを目的とした.

【方法】Gly/Glu 由来のジペプチド, アセチル化, リン酸化ジペプチド計 80 種を対象とした. LC-MS/MS 装: ACQUITY UPLC H-Class/Xevo TQD, カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 150 mm \times 2.1 mm), 移動相: 0.1 % 脂肪酸水溶液 / 0.1 % 脂肪酸アセトニトリル溶液, 流速: 0.3 mL/min, イオン化: ESI positive mode

【結果及び考察】Fmoc 試薬を用いた誘導体化 LC-MS/MS を検討した結果, 25 分以内に構造異性体を含めた 80 種の Gly/Glu, アセチル化, リン酸化ジペプチドを高感度で一斉分析することが達成できた. 安定同位体を用いた内標準法による検量線を作成した結果, 相関係数 0.990 以上の良好な直線性が得られた. 本測定系を用いて, CSF, 血清ジペプチド解析を実施した結果, 実患者から複数のジペプチドを新たに見出した. また, AD 患者及び健常人の比較検討した結果, AD 患者のみに特異的に変動するジペプチドを特定することができ, ジペプチドの臨床診断への有用性に関する知見を得ることが出来た.