

ヌクレオチド類の定量分析

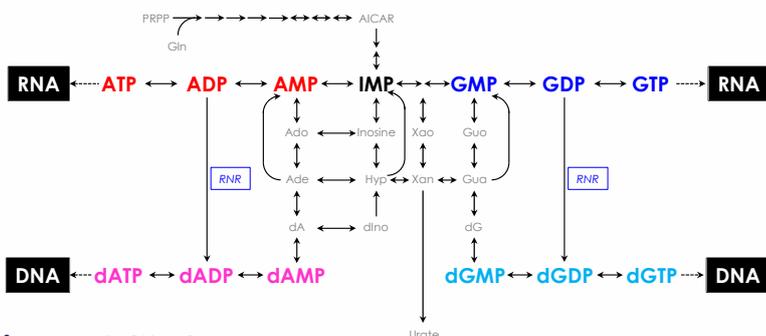
はじめに

がん細胞は活発な増殖を維持するために、細胞構造の材料となるタンパク質、脂質および核酸を大量に合成しており、がん研究の一端として核酸代謝とそのエネルギー状態を定量的に理解することが求められている。本稿では選択的かつ高感度な測定法であるLC-MS法による28種のヌクレオチド代謝物質測定の実例を紹介したい。

1. 解析対象のヌクレオチド類

解析対象となるヌクレオチド類は、プリン代謝、ピリミジン代謝に関わるDNAを構成するデオキシリボヌクレオチド15種とRNAを構成するリボヌクレオチド12種、また、その前駆体の1種とした(図1)。

プリン代謝経路



ピリミジン代謝経路

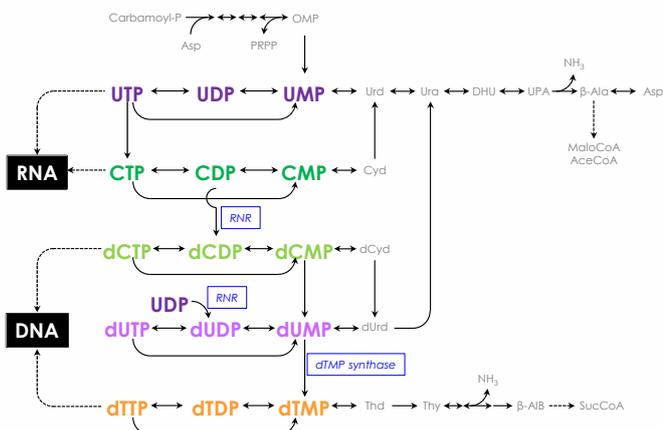


図1 プリン、ピリミジン代謝経路中のヌクレオチド類

太字で示したヌクレオチドを測定対象とし、代謝経路上の関係を図示した。
RNR: ribonucleotide reductase, dTMP synthase: thymidylate synthase

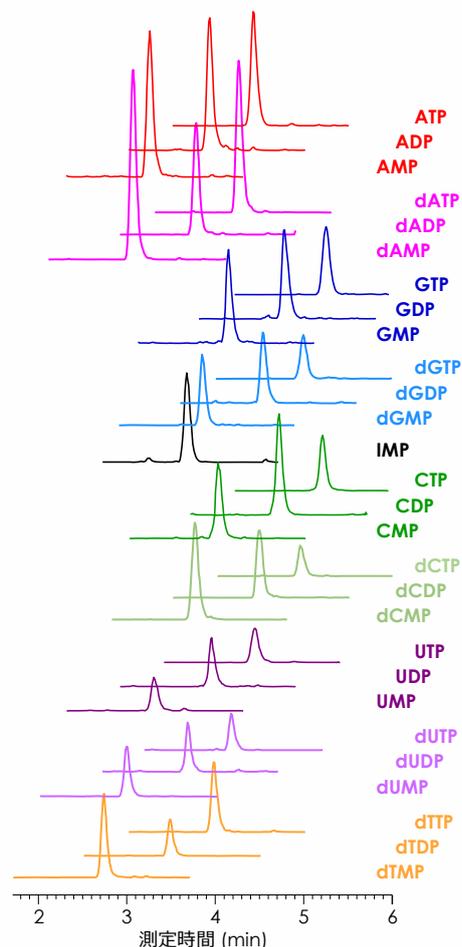


図2 100 nM 標準物質の測定によるクロマトグラム

検出限界は、ウリジル酸類が20~50 nM、その他のヌクレオチド類は1~10 nMとなった

2. 試験方法

1) がん細胞株

慶應義塾大学先端生命科学研究所、齊藤康弘先生より次の2種の乳がん細胞株を提供いただいた。一般的に悪性度が高く転移能が低いとされるMCF-7株(ホルモンレセプター陽性、Her2陰性)、転移能が高く悪性度も高いとされるMDA-MB-231株(ホルモンレセプター陰性、Her2陰性)について、10 cmディッシュでセミコンフルエント状態(MCF-7株: 2.36×10^7 cells、MDA-MB-231株: 1.84×10^7 cells)の細胞を用いた。

2) 試料調製

10 cmディッシュで培養された細胞株をトリプシン処理で剥離し、15 mLコニカルチューブへ回収した。これに5%マニトール溶液を加え、遠心にてペレットを作製し培地およびリンス液を除去した。次に内部標準物質 (Internal Standard: I.S.) のMethioninesulfoneを含んだメタノール溶液を加えることでクエンチングおよび代謝物質の抽出を行った。最後にクロロホルムを加えて液液抽出を行い、上澄みをサンプルバイアルに回収した。

3) 分析メソッド

金属イオンとの配位吸着を起こしやすいリン酸基を持つヌクレオチドを測定するために、移動相にメドロン酸を添加し、Hydrophilic Interaction Chromatography (以下、HILIC) カラムを用いた液体クロマトグラフ-三連四重極型質量分析計 (以下、LC-TripleQ) にすることで、ピーク分離、ピークテーリングの改善された測定法 (表2) を構築した。検量線はヌクレオチド28種混合液を10点 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μ M) 調製し作成した。検出例として100 nM標準溶液を測定した時のクロマトグラムを示す (図2)。

表2 測定条件

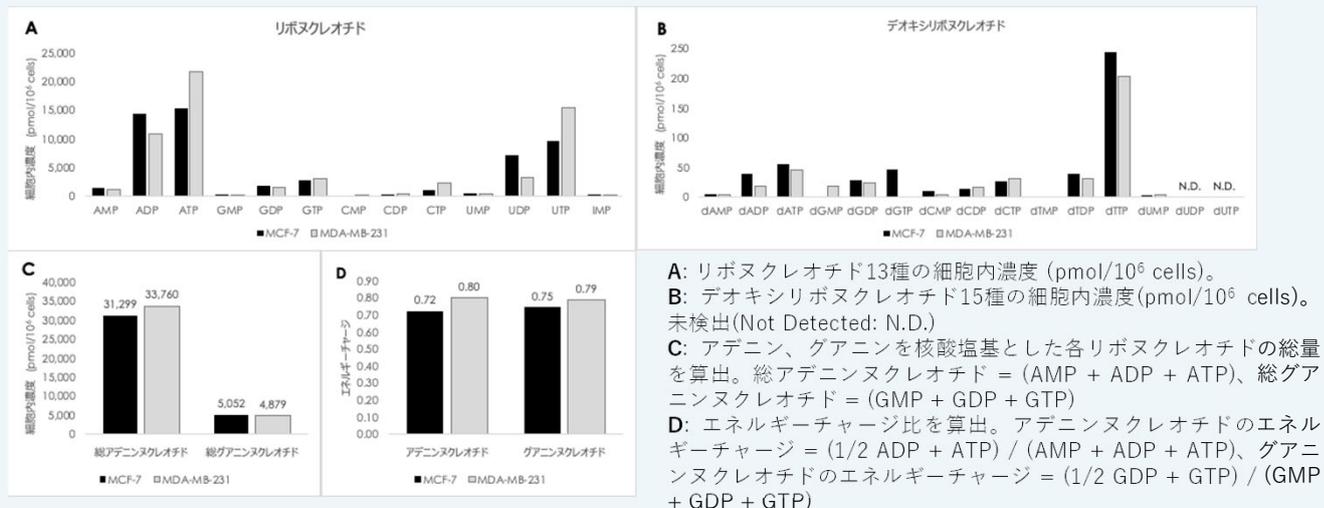
HPLC Condition	Agilent 1290 Infinity HPLC	MS Condition	Agilent 6470B LC/TripleQuad
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 \times 150 mm, 2.7 μ m	イオン源	エレクトロスプレー
移動相A	10 mM 酢酸アンモニウム, pH 9.0 水溶液 + 5 μ M メドロン酸	モード	ポジティブ、ダイナミックMRMモード
移動相B	10 mM 酢酸アンモニウム, pH 9.0 90%アセトリル溶液 + 5 μ M メドロン酸	ネブライザ圧	40 psi
グラジエント	90%B(0分)-80%B(0.5)-68%B(6.5), 平衡化2.5分	ドライガス流量/温度	10 L/分 / 200 $^{\circ}$ C
流速	0.3 mL/分	シースガス流量/温度	12 L/分 / 300 $^{\circ}$ C
カラム温度	40 $^{\circ}$ C	キャピラリー電圧	3500 V
注入量	1 μ L	ノズル電圧	1000 V
測定時間	9分/Run		

MRM: Multiple Reaction Monitoring (多重反応モニタリング)

3. 結果

乳がん細胞株の測定により、dUDPとdUTPを除く26種のヌクレオチドについて定量することができた (図3)。最も高濃度で存在したのは高エネルギー物質のATPで、次いでグリコーゲン代謝に関わるUTPであった (図3A)。デオキシリボヌクレオチドはその前駆体となるリボヌクレオチドの1/100以下の濃度で存在することが示された。デオキシリボヌクレオチドの中でもdTTPは5倍ほど他より高く存在した (図3B)。それぞれのヌクレオチド濃度が得られたことにより、核酸塩基の総量やエネルギーチャージなどの指標により、ヌクレオチド類の合成、分解について、活動エネルギーの変化についての知見が得られるようになった (図3C, D)。

図3 乳がん細胞MCF-7株およびMDA-MB-231株細胞中のヌクレオチド濃度と指標値

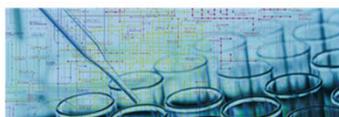


4. 考察

通常の培養条件下における乳がん細胞MCF-7株およびMDA-MB-231株の間では、明確な差はなく、同レベルの濃度でヌクレオチドが細胞内に存在することが示された。この中で特に興味深い点は、dTTPのプロファイルデータである。DNA構成ブロックとなるデオキシリボヌクレオチドは、リボヌクレオチドレダクターゼによるリボースの脱水酸化により生成される。dTTPはさらにチミジル酸シンターゼによる代謝反応を経てdUMPから産生される。この一工程多いdTTPがデオキシリボヌクレオチドの中で最も高濃度でプールされていることは興味深いデータであった。チミジル酸経路は代謝拮抗薬として抗がん剤のターゲットとなるため、dTTPを含め、デオキシリボヌクレオチドのプロファイルデータを解析することは抗がん剤の作用機序および薬剤耐性獲得のメカニズムを知る手がかりになるかもしれない。

おわりに

本測定法によってヌクレオチド類の9割以上を定量することが可能であり、DNA合成、RNA合成のためのヌクレオチドプール量やエネルギーチャージの状態を知ることができた。一方で核酸代謝経路には、de novo経路、salvage経路に関連するヌクレオチドや核酸塩基などの代謝物質が存在し、核酸代謝の全体像を捉えるために、一連の解析のなかで測定できる手法を引き続き開発していく。本測定法が、がん代謝研究の有益な手法として利用されることを期待したい。



インフィニティ・ラボ 株式会社

Head Office / 〒997-0016 山形県鶴岡市日和町9-9
Lab / 〒997-0052 山形県鶴岡市覚岸寺字水上246-2

www.infinity-lab.jp
TEL. 0235-25-7732

