

## はじめに

ヌクレオチドはDNAおよびRNAの構成要素であり、高感度かつ定量的に測定することは、細胞内の動態を知る有用な手段となる。ここでは、親水性相互作用クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry, HILIC-MS/MS)を用いた選択的、高感度な測定法による培養細胞の測定事例を紹介する。

## 1. 解析対象のヌクレオチド

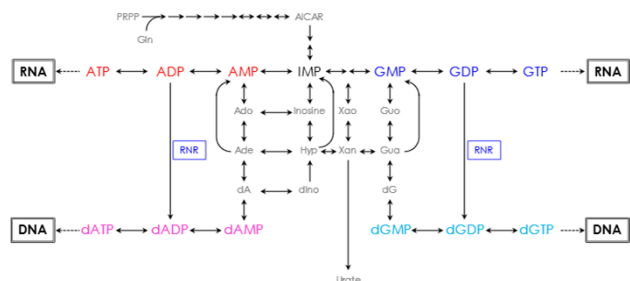
解析対象となるヌクレオチドは、DNAを構成するデオキシリボヌクレオチド15種とRNAを構成するリボヌクレオチド12種、また、その前駆体の1種とした(表1)。

核酸塩基	ヌクレオチド									
	デオキシリボヌクレオチド					リボヌクレオチド				
	A アデニン	T チミン	G グアニン	C シトシン	U ウラシル	A	G	C	U	I イノシン
一リン酸	dAMP	dTMP	dGMP	dCMP	dUMP	AMP	GMP	CMP	UMP	IMP
二リン酸	dADP	dTDP	dGDP	dCDP	dUDP	ADP	GDP	CDP	UDP	-
三リン酸	dATP	dTTP	dGTP	dCTP	dUTP	ATP	GTP	CTP	UTP	-

表1 DNAおよびRNAの構成単位である28種のヌクレオチド

ATP：生体において様々なエネルギー代謝に関与するエネルギーの伝達体  
 GTP：細胞内シグナル伝達やタンパク質合成の駆動、タンパク質の機能の調節  
 CTP：グリセリン脂質合成やタンパク質のグリコシル化などの代謝反応に関与  
 UTP：糖鎖合成においてUDPグルコースを起点にグリコーゲン糖鎖の延長反応を進行

### Purine metabolism



### Pyrimidine metabolism

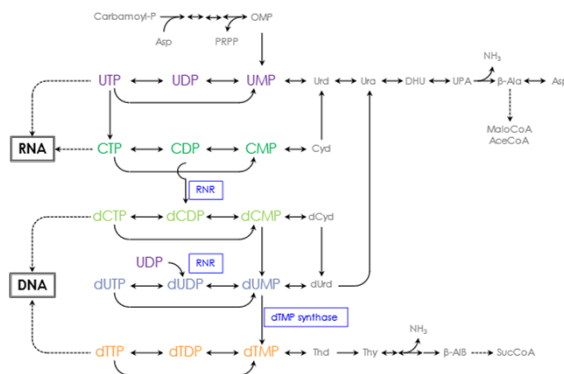


図1 プリン、ピリミジン代謝経路中のヌクレオチドのDNAおよびRNAの関係

## 2. 定量分析の特徴

イオン性であるリン酸基を持つヌクレオチドを測定するために、リン酸基と装置由来の金属イオンとの配位吸着を防ぐためにメドロン酸を移動相に添加した。ATPとdGTPは同一のトランジション ( $m/z506 \rightarrow m/z408$ ) で高感度に測定できるが、実試料中のATPは高濃度で存在するため微量のdGTPのピークに影響をおよぼす。そのため、dGTPは選択的なトランジション ( $m/z506 \rightarrow m/z257$ ) とした。

## 3. 分析メソッドと実施例

### 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。一般的に悪性度が低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、10cmディッシュでセミコンフルエント状態(MCF-7株:  $2.36 \times 10^7$  cells, MDA-MB-231株:  $1.84 \times 10^7$  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、15mLコニカルチューブへ回収した。これに5%マン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酸液を除去した。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

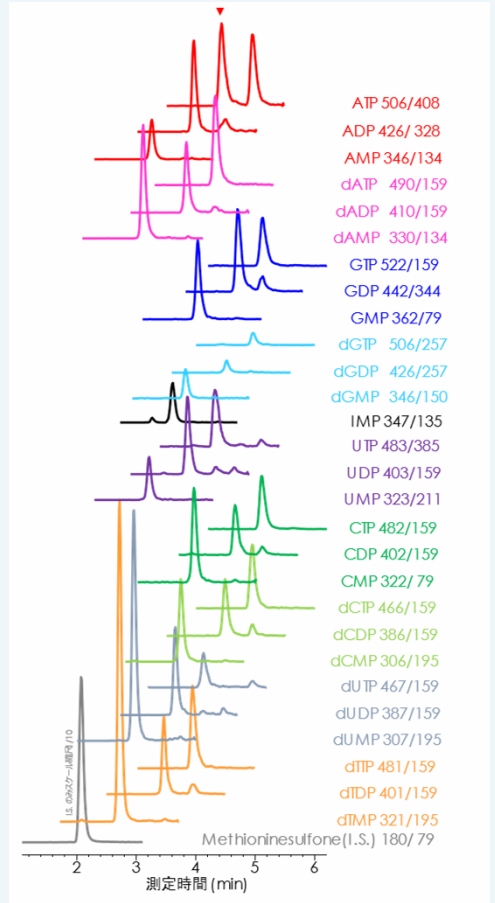
アジレント・テクノロジー社のLC-TripleQを用いて、次の条件（表2）にて測定を行った。検量線はヌクレオチド28種混合液を10点（0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu$ M）調製し定量を行った。ピーク検出例として標準溶液を測定した時のクロマトグラムを示す（図2）。

表2 測定条件

HPLC Condition	Agilent 1290 Infinity HPLC
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 $\mu$ m (P/N 673775-924, アジレントテクノロジー社製)
移動相A	10 mM 酢酸アンモニウム, pH 9.0 水溶液 + 5 $\mu$ M メドロン酸
移動相B	10 mM 酢酸アンモニウム, pH 9.0 90%アセトニトリル溶液 + 5 $\mu$ M メドロン酸
グラジエント	90%B(0分)-80%B(0.5)-68%B(6.5), 平衡化2.5分
流速	0.3 mL/分
カラム温度	40°C
注入量	1 $\mu$ L
測定時間	9分/Run
MS Condition	Agilent 6470B LC/TripleQuad
イオン源	エレクトロスプレー
モード	ネガティブ、ダイナミックMRMモード
ネプライザ圧	40 psi
ドライガス流量/温度	10 L/分 / 200°C
ソースガス流量/温度	12 L/分 / 300°C
キャピラリー電圧	3500 V
MRM トランジション	図2中に示す

図2 ヌクレオチドのクロマトグラム

10  $\mu$ Mのヌクレオチド28種と25  $\mu$ MのMethioninesulfone (I.S.)を測定し、MRMごとにクロマトグラムを描画した。dGTPのピーク感度は低いが、ATPの細胞内濃度がその300倍高く存在するためその影響を避けるために選択性を優先した設定としている。



### 4) 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）。高濃度で存在したのは高エネルギー物質のATP, ADP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の濃度で存在することが示され、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）。

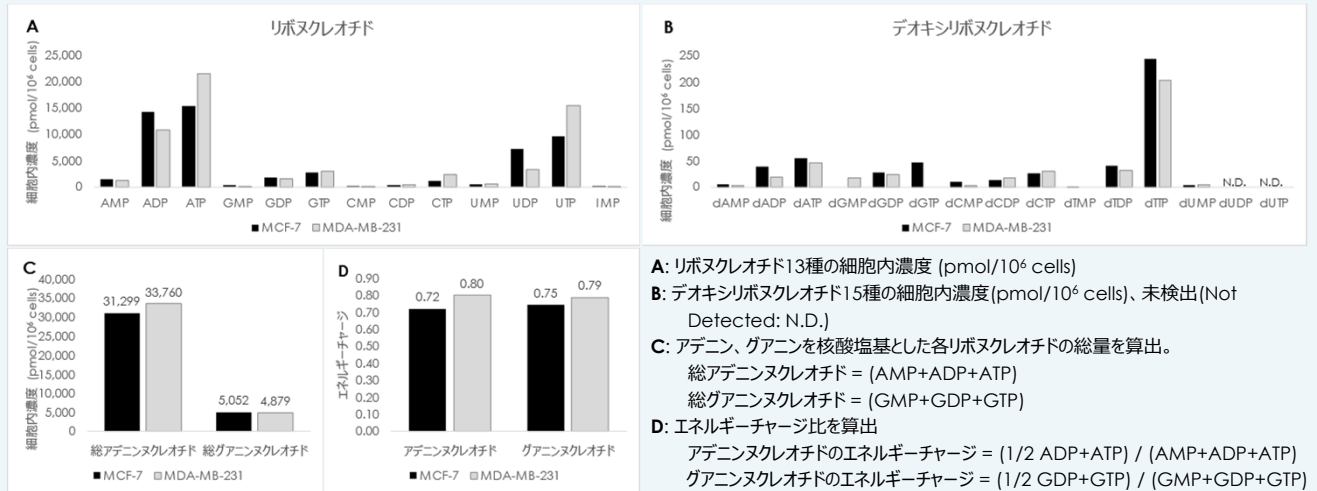


図3 乳がん細胞MCF-7株およびMDA-MB-231株細胞中のヌクレオチド濃度と指標値

### 5) 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（図3A,B）。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トラ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絶対定量が可能であり、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活用されることを期待したい。なお本研究開発は、山形県バイオクラスター形成促進事業の助成を受け実施したものである。



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

