液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法による 赤血球中ホスホリボシルピロリン酸の定量法の開発

篠原 佳彦¹⁾ 野崎 早弥子¹⁾ 長谷川 弘¹⁾
山田 裕一²⁾ 市田 公美¹⁾

背景および目的

ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) は、プリン体の *de novo* 合成経路および *salvage* 経路の両経路に関与する物質であり、プリン体プールの調節に寄与する重要な物質である。これまで報告されている PRPP 定量法のほとんどは、PRPP を基質とする酵素を利用して、放射性同位体標識プリン塩基から生成するプリン体の放射活性を測定し、間接的に PRPP 量を算出する方法である。今回、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) により PRPP を直接測定する方法の開発を行った。

方 法

健常成人男性 8 名およびヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 欠損症患者 (完全欠損症 2 名, 部分欠損症 1 名) の赤血球を測定試料とした。溶血赤血球 20 μ L に Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 180 μ L を加え、沸騰水浴中で 45 sec 加熱した。遠心分離後の上清をメンブランフィルターでろ過し、ろ液 5 μ L を LC-MS/MS (Agilent G6410) に注入した。カラムは Luna アミノカラム、移動相は 0.1% アンモニア水とアセトニトリルのグラジエント法を用いた。PRPP の定量は、エレクトロスプレーイオン化-ネガティブモードで m/z 389 を precursor ion, m/z 291 を product ion として選択反応検出を行った。

結果および考察

アミノカラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィーにより、保持時間約 8 min に PRPP に起因する良好なピークが得られた。赤血球 20 μ L に標品の PRPP を 10 ~ 40 pmol 添加した試料を用いて分析精度を求めた結果、相対誤差は -1.8 ~ 1.7%, 相対標準偏差は 1.1 ~ 4.4% であり、赤血球中 PRPP 濃度の定量に十分な精度を有していることが明らかになった。健常成人男性の赤血球中 PRPP 濃度は 0.8 ± 0.3 nmol/mL であった。HPRT 完全欠損症患者の赤血球中 PRPP 濃度は 40.8 および 33.4 nmol/mL, HPRT 部分欠損症患者では 7.7 nmol/mL と健常成人男性に比べて著しく高値であった。これらの値は、酵素的方法により測定された HPRT 欠損症患者の赤血球 PRPP の報告値とほぼ一致した。さらに、同一試料を繰り返し測定した場合の相対標準偏差は 5% 以内であること、日を変えて試料調製および測定した場合もほぼ同様の PRPP 値を示したことから、本法は高い再現性を有することが明らかになった。

結 語

LC-MS/MS により赤血球中の PRPP を直接測定する方法を開発した。

1) 東京薬科大学薬学部病態生理学 Yoshihiko Shinohara, Sayako Nozaki,
Hiroshi Hasegawa, Kimiyoshi Ichida
2) 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所遺伝学部 Yasukazu Yamada