

質量分析法によるラット脳内ペプチドならびにカテコールアミンの定量と Diethylstilbestrol 投与による下垂体への影響

○前田尚之^{1,2}、田中絵美¹、榎 加奈恵¹、池田有希²、奥村加奈子²、宮庄 拓²、生野聡子²、横田 博²
 1 一般社団法人食肉科学技術研究所 ・ 2 酪農学園大学獣医学部獣医生化学

目的

- ・脳内ペプチドは神経活動を反映する。そこで、カテコールアミンとアミノ酸一斉分析法を開発した。
- ・Diethylstilbestrol (DES) 投与した成雄ラット脳内ペプチドである血管作動性腸管ペプチド Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) とカテコールアミンの変動を測定した。

VIP測定

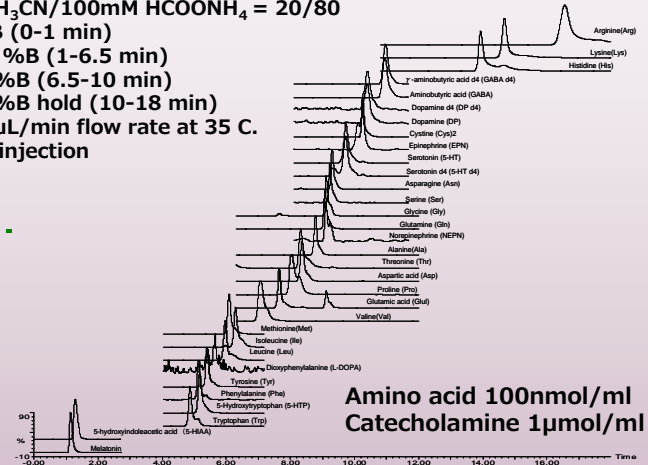
標準試薬 Vasoactive intestinal peptide (VIP) を Trypsin 消化後、EASY-nLC-captive spray-microTOF-QII Bruker Daltonics) で測定。得られたスペクトラムをたんぱく質データベース Mascot で検索



L-column micro (C18 0.07 5x 150 mm, 3- μ m particle size, CERI), and the trapping column was 0.3 x 5 mm, 5- μ m particle size. Flow rate of 300 nL/min. All results were stored and further analyzed using Data analysis 4.0 and biotools 3.2 software.

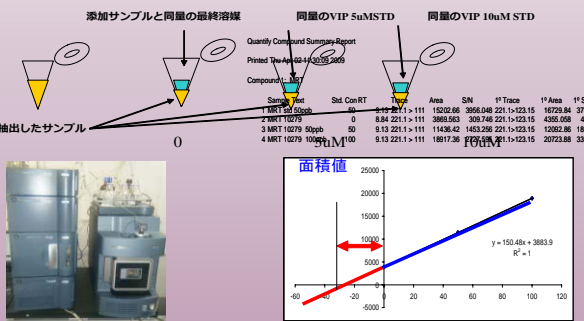
カテコールアミンとアミノ酸の同時分析

The separation was achieved using an **Intrada Amino Acid** (100 x 3 mm 3- μ m particle size, Imtakt)
 (A) CH₃CN / THF / 25mM HCOONH₄ / HCOOH=10 / 80 / 10 / 0.4
 (B) CH₃CN/100mM HCOONH₄ = 20/80
 0 %B (0-1 min)
 0-17 %B (1-6.5 min)
 100 %B (6.5-10 min)
 100 %B hold (10-18 min)
 400 μ L/min flow rate at 35 C.
 5 μ L injection

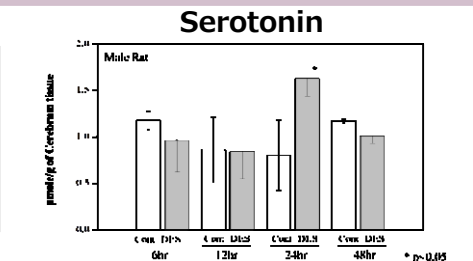
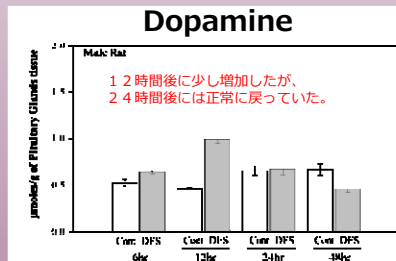


MS/MSで得られたフラグメント情報から四重極型MSを設定する。(MRM法)

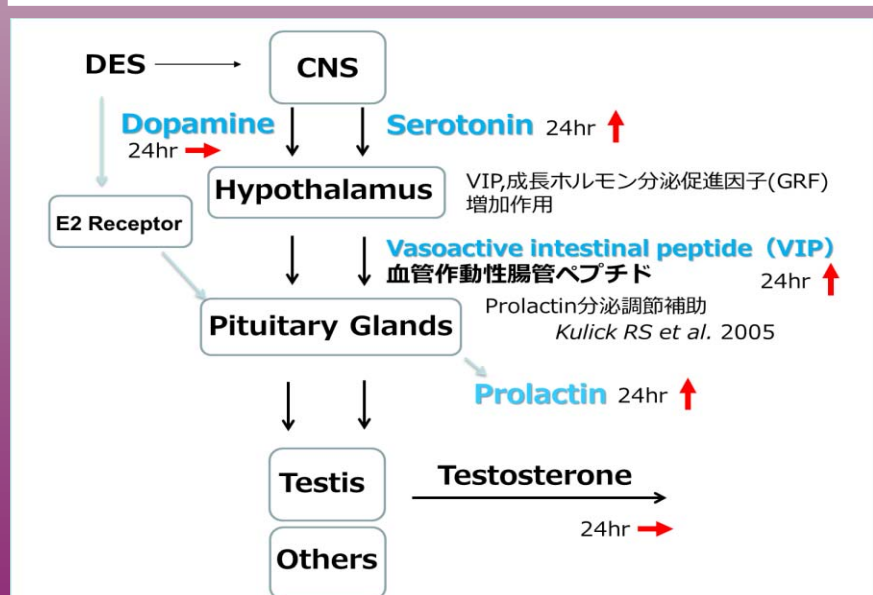
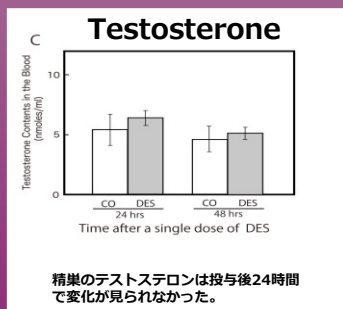
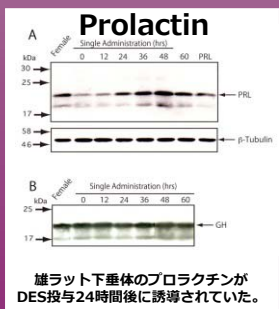
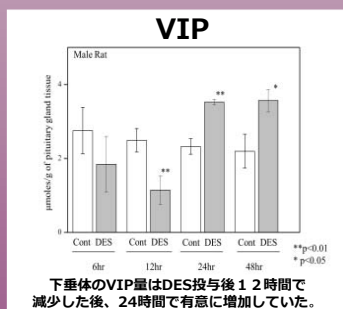
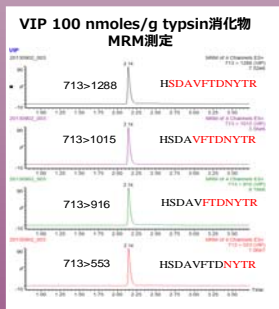
標準添加法による定量



MRM測定に用いたAcquity UPLC H-class -Xevo TQD (Waters) Column; cadenza-CD-C18 50 x2 mm 3 μ m



DES投与による下垂体のドーパミン量には変化は見られなかった。同様に調査したエピネフリンやノルエピネフリン、アミノ酸(20種類、GABAなど)に変化は見られなかった。



まとめ

脳内VIP、カテコールアミンを簡便に測定できた。脳内神経伝達物質やペプチドを正確に測定することにより、DES投与24時間後のプロラクチン誘導は、セロトニン誘導によるVIP上昇に起因する事が判明した。DESによるセロトニン増加メカニズム解明が今後の興味ある課題である。