

## 研究報告書

慶應義塾大学 政策メディア・研究科 1年 福満和

「ジペプチド添加時の細胞増殖率及び代謝物質の解析」

### 1. はじめに

肝臓は代謝に必要な栄養素をつくりだし、全ての生理学システムに影響を及ぼしている重要な臓器である(1)(2)(3)。しかし、ジペプチドを添加した際のがん細胞の代謝への影響は不明である。細胞増殖の変化を理解することにより、どのジペプチドが細胞増殖に影響を与えているのかわかる。そのため、本研究では、ジペプチドを添加した際の HepG2 細胞株の増殖の変化を明らかにする。そして、そのジペプチド処理した際の代謝物質の変化を明らかにしていきたい。そのため今年度は、実際にジペプチドをメタボロームで測定する際にジペプチドの種類を判別するためにジペプチドを LC/MS で測定し、それぞれのピークの種類を行なった。今後の展望としてその手法を用いて肝細胞がんの培養液に含まれているジペプチドの測定を行いたいと考えている。

### 2. 手法

今回実験に用いたジペプチド（濃度はグループ A, グループ B, グループ C は 60 $\mu$ M, グループ D は 20 $\mu$ M のものを用いた。）は事前に技術員さんに調整を行なっていただいたものを用いた。グループ A, グループ B, グループ C のジペプチドは LC/MS で測定が可能なジペプチドを、グループ D のジペプチドは CE/MS で測定可能なジペプチドを示している。グループ A は 83 種類、グループ B は 80 種類、グループ C は 70 種類、グループ D は 128 種類のジペプチドを混合したものである。

今回の測定ではグループ A, グループ B, グループ C, グループ D と mix(グループ A とグループ B とグループ C を 1:1:1 で混ぜたもの)の 5 種を LC/MS の TOF モードと SWATH モードを用いて以下の条件で測定した。

LC/MS 分析条件、SWATH 分析条件

QTOF(SCIEX Triple TOF 5600)	
polarity	Positive
Ion source	AJS ESI
Gas Temp	280°C
Gas Flow	12 L / min
Nebulizer	30 psi
Sheath gas temp	380°C
Sheath gas flow	12 L / min
Capillary voltage	3500 V
Fragmentor	380 V
Cell Accelerator V	7 V

UPLC(Agilent 1290 infinity)	
Column	ACQUITY HSS PFP 1.8 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm (waters)
Column temp	30°C
SolventA	0.1 % Formic acid
SolventB	0.1 % Formic acid with 95/5 Acetonitrile H <sub>2</sub> O
Gradient(%B)	0 min (1)-3(1)-30(50)-30.1(99)-35(99)-35.1(1)-50(1)
Analytical time	32 min
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	1 $\mu$ L

測定後、ファイルを ABF に変換し MS-DIAL(RIKEN Tokyo ver. 4.70)を用いて解析を行なった。

### 3. 結果

#### 3.1. A, B, C, mix の結果

LC/MS で測定可能なグループ A, グループ B, グループ C, mix を TOF モードと SWATH で測定したものを MS-DIAL で解析を行なった。

まず, TOF モードを用いて Mix でそれぞれ固有のピークが出ているかを確認した. Mix に含まれているジペプチド 233 種類の中で 221 種類のジペプチドに置いて固有のピークを持っており, 12 種類のジペプチドにおいてピークが重なっていた. 以下はピークが重なっていないもの(図 1)と重なったものを示す(図 2).

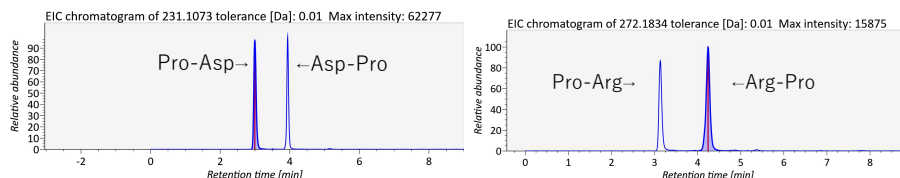


図 1 mix で測定可能だったものの EIC を示す. ( $m/z$  が同じものを示す) 縦軸は相対存在量を, 横軸は RT を示す.

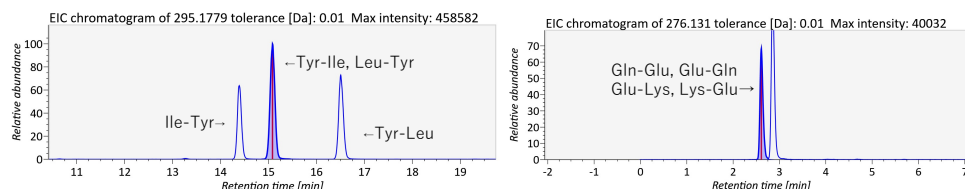


図 2 mix でピークが重なったものの EIC を示す. ( $m/z$  が同じものを示す) 縦軸は相対存在量を, 横軸は RT を示す.

次にピークが重なっていた 12 種類のジペプチドについて, Swath でピークを分離できないか試みた.

Lys-Glu と Gln-Glu, Glu-Gln, Glu-Lys を分離することができた(図 3, 4). 残りのジペプチドは分離することができなかった.

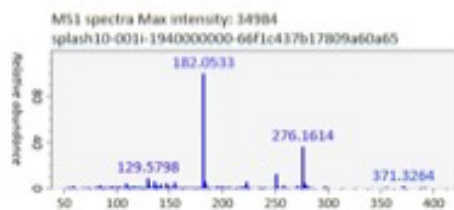


図 3 グループ A における Gln-Glu, Glu-Gln, Glu-Lys の MS1 を示す. 縦軸は相対存在量を, 横軸は RT を示す.

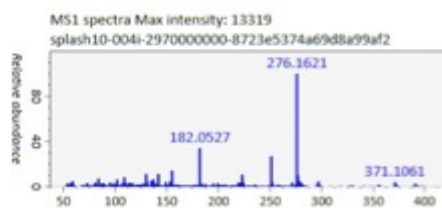


図 4 グループ B における Lys-Glu の MS1 を示す. 縦軸は相対存在量を, 横軸は RT を示す.

### 3.2. Dの結果

CE/MS で測定可能なジペプチドであるグループ D を TOF と SWATH で測定したものを MS-DIAL で解析を行なった。

まず、TOF と SWATH の EIC を見た(図 5)。

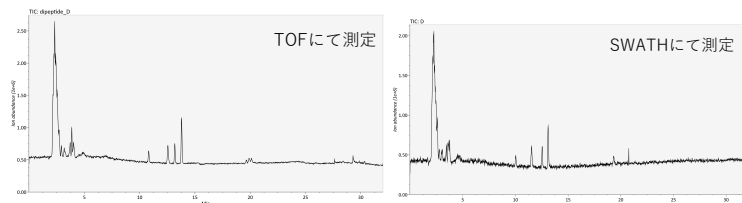


図 5 TIC を示す. 2-3 あたりにピークが多く出ている

次に、RT がわからないため、 $m/z$  の値で RT を調べてみた(添付資料表 2).. ジペプチド 1 つに RT が 複数存在していたことがわかった。

#### 4. 展望

TOF モードを用いて固有のピークがあるかを分けた。多くのピークを分離できたが、12 のピークは分離できなかった。次に SWATH 法の解析を行なった。SWATH を用いて分けることができたジペプチドは Lys-Glu と Gln-Glu, Glu-Gln, Glu-Lys のみだった。他のジペプチドのピークは SWATH の測定に置いてうまく検出されていなかった。これは、LC/MS と SWATH 法の解析の違いにおいて MS1 がうまく読み取れなかった可能性が考えられる。今回グループ D は RT がわからないため、 $m/z$  を参考に RT をまとめた(添付資料表 2)。その結果ジペプチド 1 つに対して 2-4 の RT が対応していた。また、EIC より、ピークが 2-3 のあたりに多く出ていた。これは、測定の段階でうまく分離ができていないのではないかと。

そのため、今後は測定条件を変更してピークの分離を行なって行きたいと考えている。

#### 参考文献

1. Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver Immunology Dimitrios. Comperative Physiol. 2013;3(2):567-98.
2. 木野邦器 木野はるか. L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を利用した塩味増強効果を 発揮するジペプチドの探索とその効率的な合成法 ユニークな酵素で広がる機能性ジペプチドの世界. 化学と生物. 2017;55(3):182-8.
3. Nakao Y. アミノ酸,ジペプチドとアルデヒドとのSchiff塩基の 銅(II)キレート of 構造とアミノ基転移反応. 日本化学雑誌. 1971;92(5):399-405.