

薄層クロマトグラフィーによる細胞内代謝解析

(青山学院大理工) ○西田 光輝・西原 達哉・田邊 一仁

Intracellular metabolites analysis by thin layer chromatography (*Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Koki Nishida, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe.

Analysis of intracellular metabolome provide valuable information of the cells. We have focused on thin-layer chromatography (TLC), and have been conducting research to establish a low cost method for intracellular metabolite analysis. Our analysis method follows the following protocol. A cross-linkable labeling reagent is reacted with the target functional group of the metabolite, followed by secondary expansion by TLC. The metabolite is indirectly quantified by emission of the fluorescent dye on the labeling reagent by a camera.

In this study, we designed and synthesized two types of labeling reagents targeting and detecting glutathione (GSH), glutamine, and glutamate (Glx) related to glutathione biosynthesis. In fact, the amount of intracellular GSH per cell in HCT116 cells was quantified as 9.3 fmol/cell using TLC. For Glx, extracellular Glu and Gln were separated and detected by TLC during cell culture. The quantification is in progress.

Keywords : Thin Layer Chromatography; Metabolite

近年、細胞内代謝物解析が盛んに行われ、疾病診断、創薬へ繋がる有用な知見がもたらされている。我々は、これまでに安価、かつ簡便に化合物を分離可能な薄層クロマトグラフィー (TLC) に着目し、低コストな細胞内代謝物解析手法の確立を目指して研究を進めてきた。我々の代謝物解析法は次のプロトコルに従う。代謝物の標的官能基と架橋可能なラベル化剤を反応させた後、TLC で二次展開する。ラベル化剤上の蛍光色素の発光量をカメラによって定量することで、間接的に代謝物を定量する。

本研究では、グルタチオンの生合成に関連する3つの代謝物 (グルタチオン: GSH、グルタミン、及びグルタミン酸: Glx) の検出・定量を目指し、GSH、Glx を標的とした2種のラベル化剤を設計・合成した。実際に HCT116 細胞において、1細胞当たりの細胞内 GSH 量を TLC を用いて定量したところ、9.3 fmol/cell となった。この結果は、市販の GSH 定量キットでの定量値と同程度の値を示した。さらに、細胞にスルファサラジンを加え、細胞内 GSH 生合成に摂動を与えたところ、細胞内 GSH 量の有意な減少が確認された。また、Glx に関して、細胞培養時の細胞外 (培地中) Glu, Gln を TLC により分離、検出した。現在、定量を試みている。

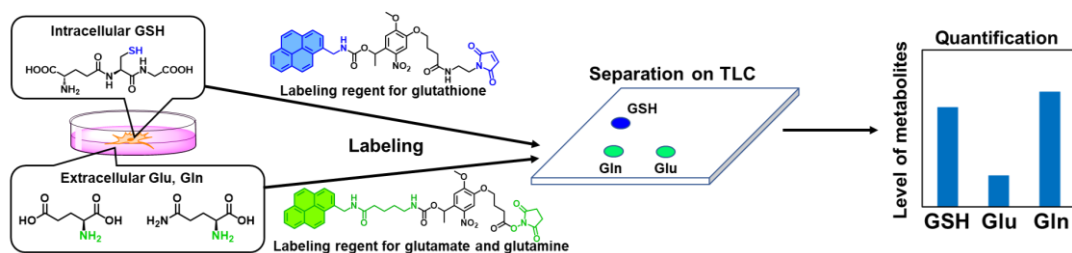


Figure 1. Illustration of intracellular and extracellular metabolites analysis using thin layer chromatography.