

WSTを用いた細胞の代謝解析 Metabolic analysis of cells using WST



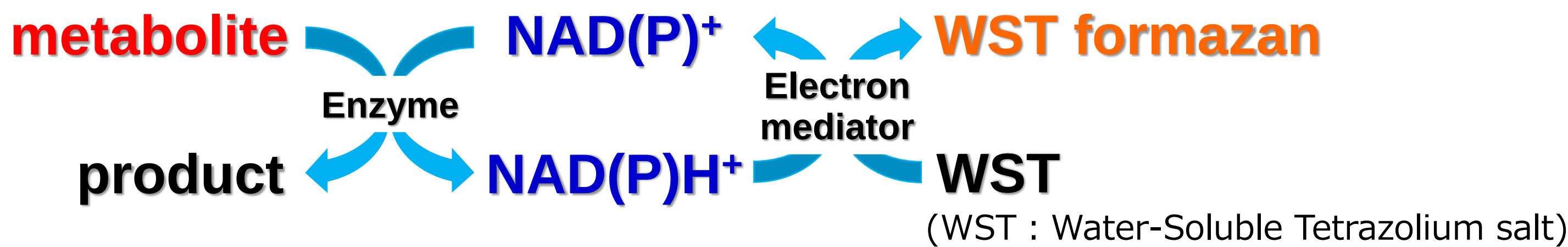
○小松恭佳、江副公俊、石山宗孝 (株式会社同仁化学研究所)

○Yasuka Komatsu, Takatoshi Ezoe and Munetaka Ishiyama (Dojindo Laboratories)

1. 緒言

現在広く利用されているメバローム解析は、測定法の種類として主に、キャピラリー電機泳動質量分析法(CE-MS)やガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)、などが挙げられる。これらの測定法を用い、糖やアミノ酸、有機酸などを対象とした代謝物を解析することにより、生体内における様々な現象に対する代謝経路の解明が進んでいる。しかし、これらの測定法は選択性や感度面でのメリットがある一方で、煩雑な前処理が必要である、高価な装置を必要とするなどのデメリットもある。

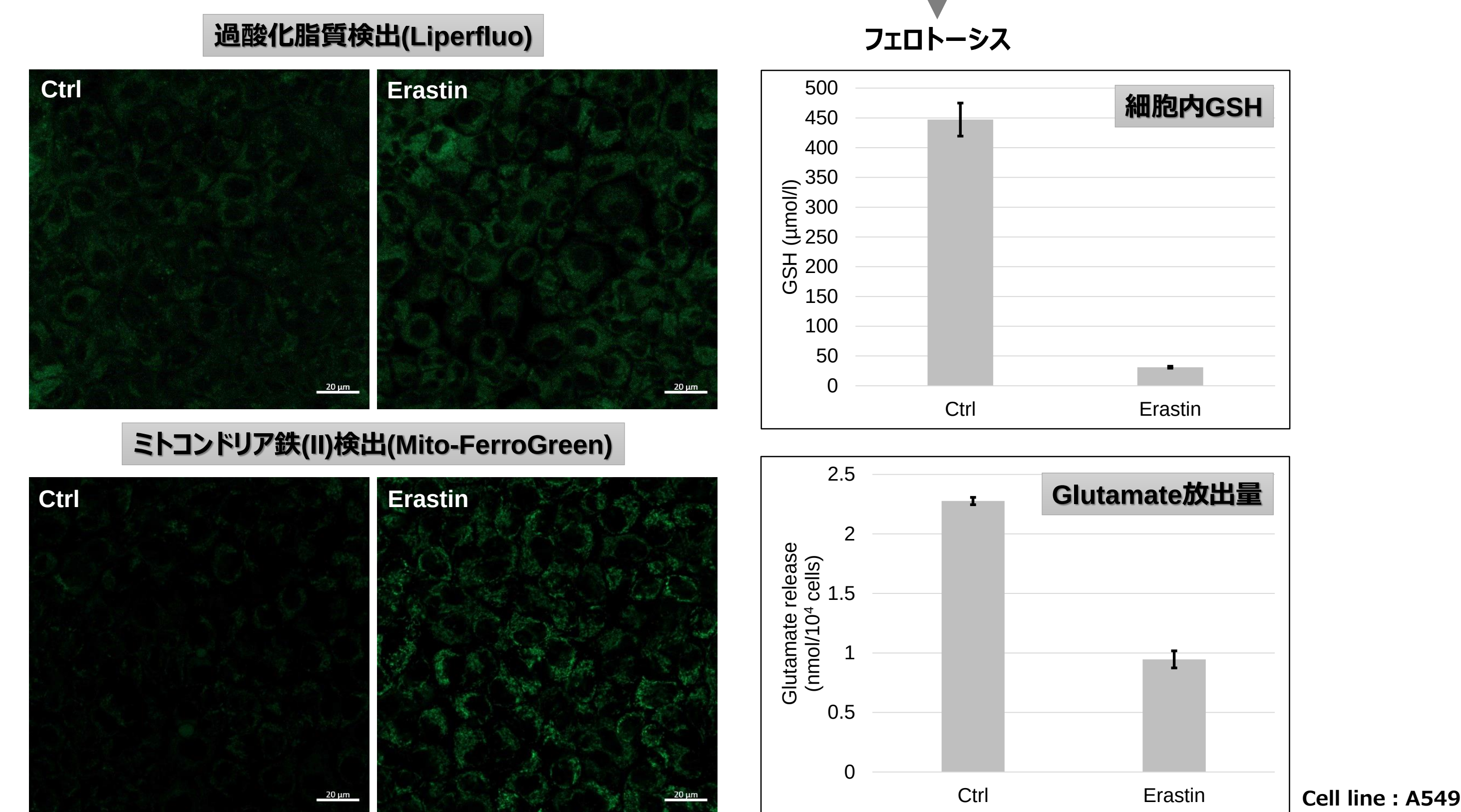
今回我々は、解糖系や電子伝達系、TCA回路といった、細胞内の主要な代謝経路に参与している代謝物やエネルギー代謝基質を比色定量できるアッセイ系を構築し、細胞に様々な刺激を与えた場合の代謝物の変化を観測した。



2. 応用例

① アミノ酸トランスポーター(xCT)阻害 – Erastin刺激 –

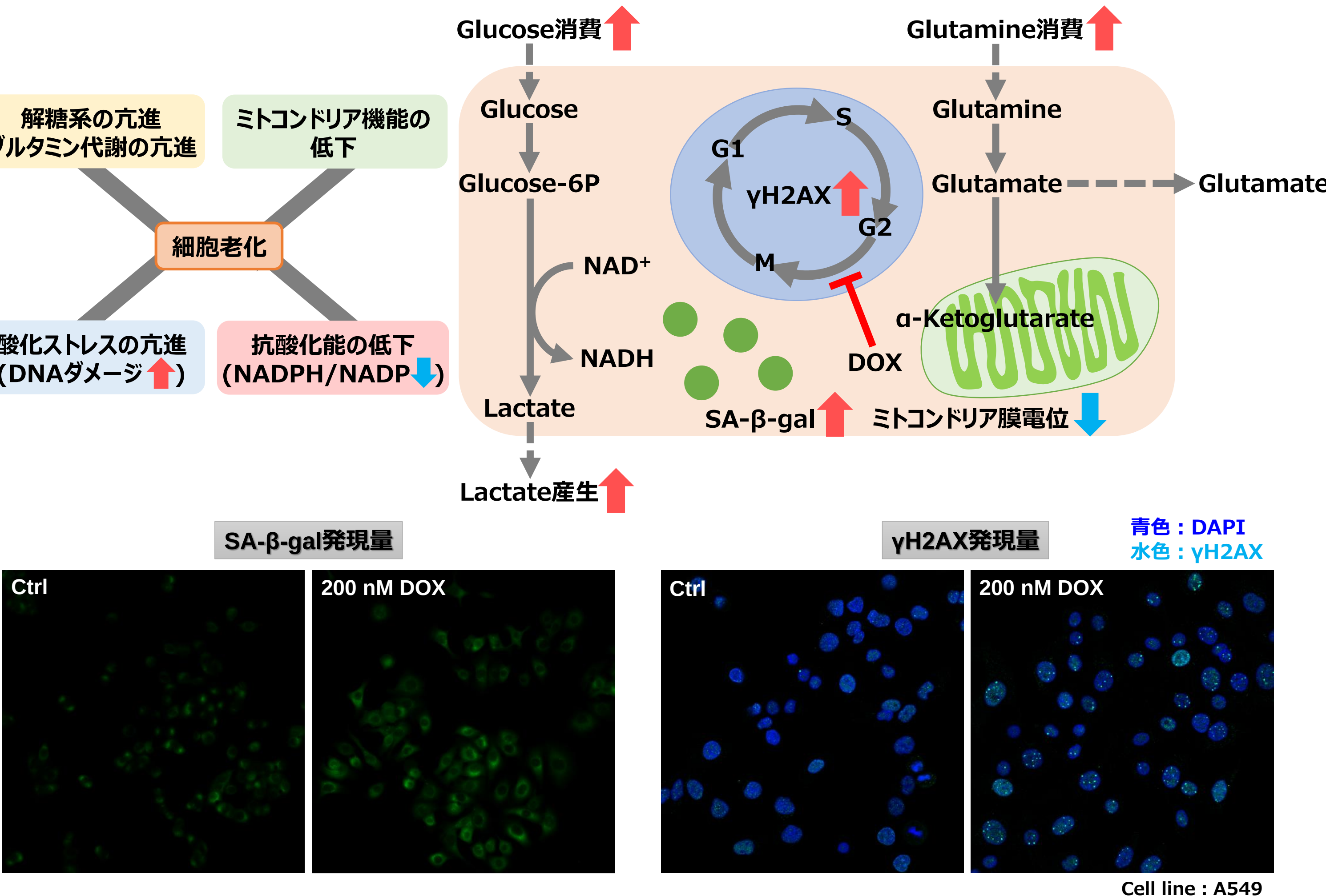
Erastin刺激により、シスチン/グルタミン酸交換輸送体(xCT)を阻害すると、細胞内へのシスチンの取り込みおよび、細胞外へのグルタミン酸の放出が阻害される。シスチンの細胞内取り込みが阻害されることにより、グルタチオンの生成が低下し、さらに、鉄に依存した脂質過酸化によるフェロトーシスが引き起こされる。



xCTが阻害されたA549細胞において、Glutamate放出量および細胞内GSHが減少、ミトコンドリア内鉄(II)および過酸化脂質が増大する結果が得られた。

③ DNA損傷(細胞老化誘導) – Doxorubicin刺激 –

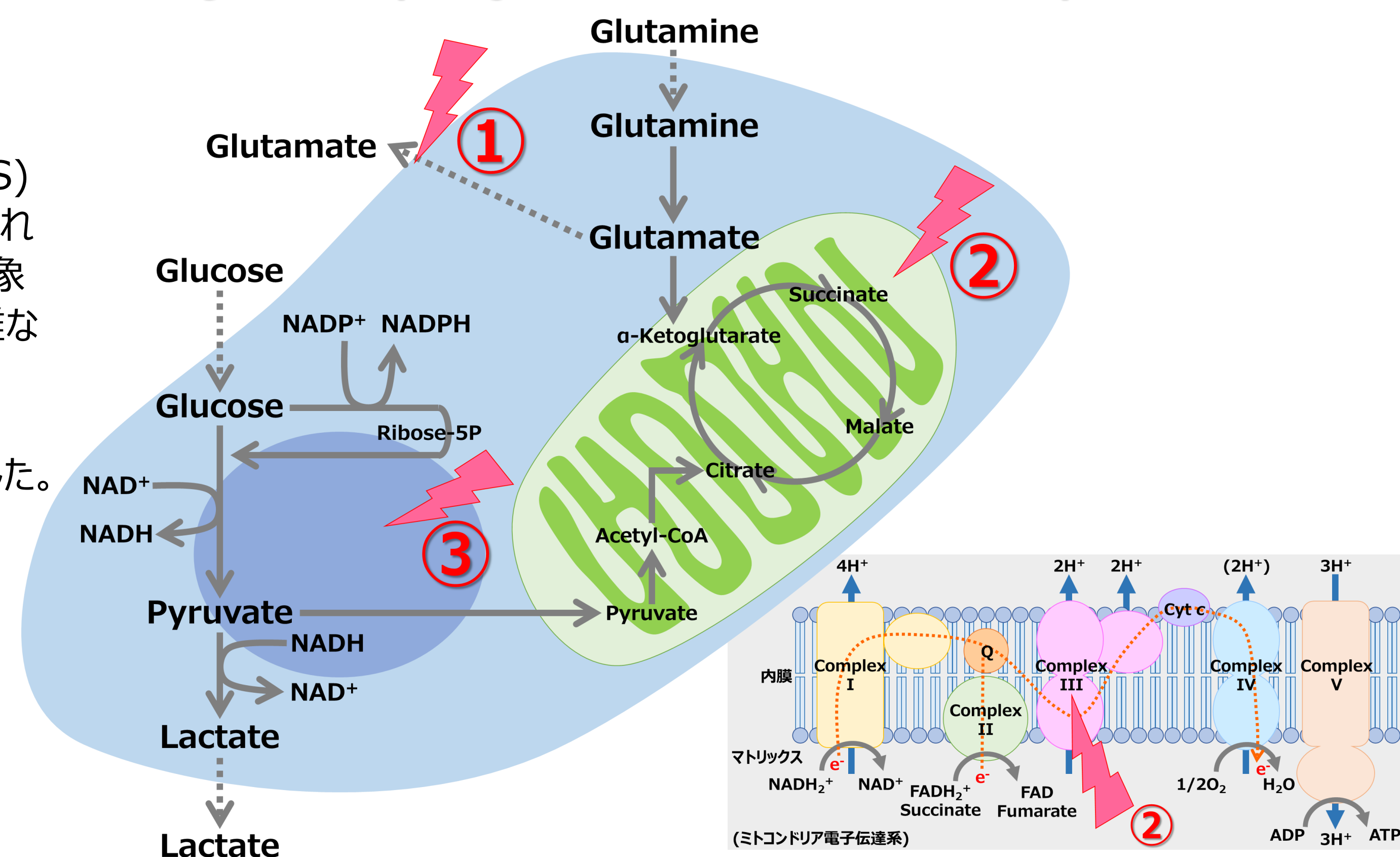
Doxorubicin(DOX)刺激により細胞にDNA損傷を与えると、G2/M期に作用して細胞増殖を停止させ、細胞老化が誘導される。細胞老化に伴い、SA-β-gal発現量の増加やミトコンドリア膜電位の低下だけでなく、解糖系の亢進やグルタミン代謝の亢進といった細胞内代謝の変化が引き起こされる。



DNAが損傷したA549細胞は、G2/M期で細胞増殖が停止し、細胞老化マーカーであるSA-β-galおよびγH2AX発現量が増加、ミトコンドリア膜電位の低下が認められた。また、培地中Glucose消費量およびLactate生成量の増加より解糖系の亢進を、Glutamine消費量の増加よりグルタミン代謝の亢進を確認した。さらに、NADPH/NADP比の減少から、抗酸化能の低下を示す結果が得られた。

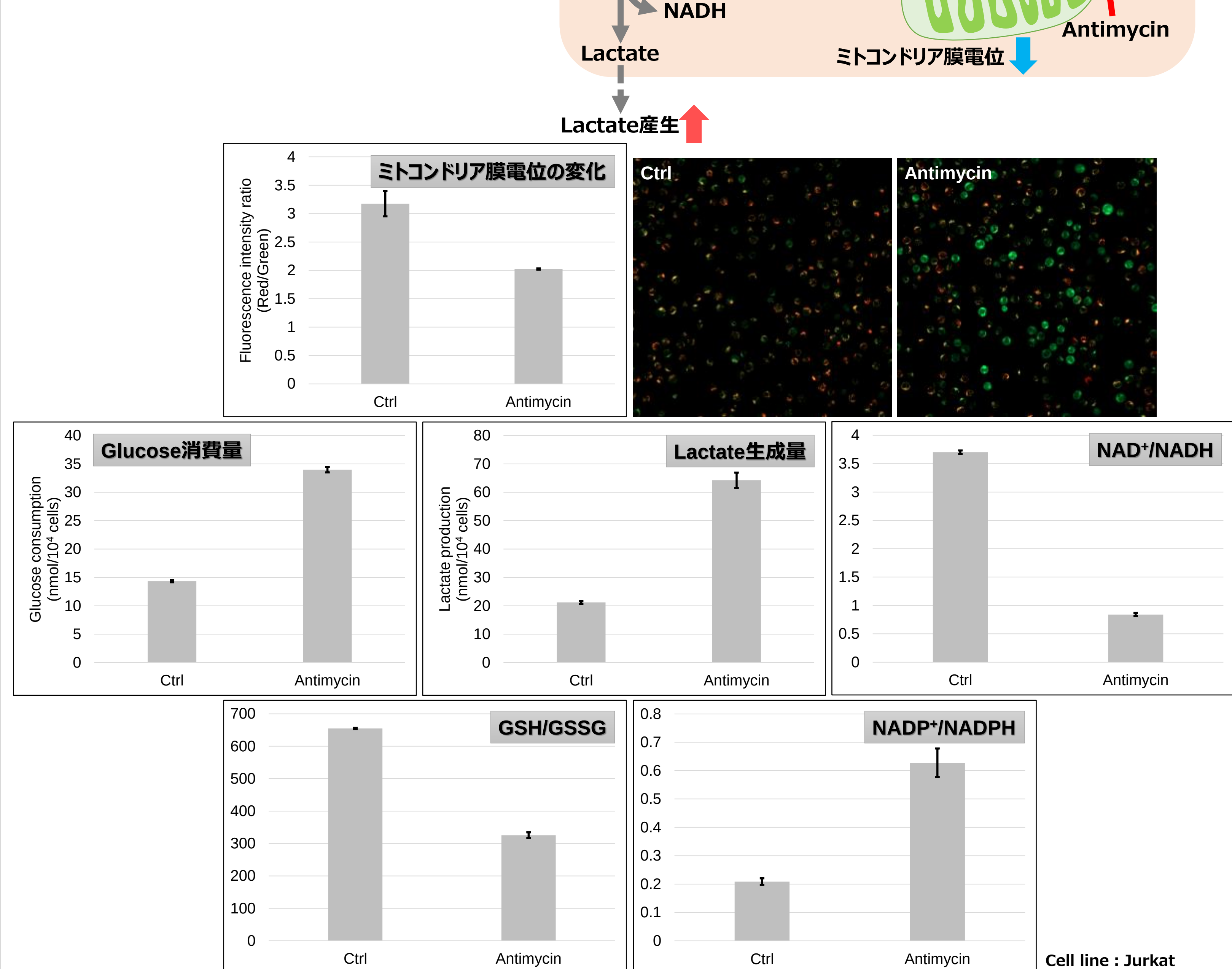
3. 結語

今回構築したアッセイ系においても、細胞の代謝変化を簡便にモニタリングすることが可能であった。今後、さらに詳細な代謝解析が可能となるよう、アミノ酸や脂質、その他代謝物の測定が可能なアッセイ系の構築を目指す。



② ミトコンドリア電子伝達系阻害 – Antimycin刺激 –

Antimycin刺激により、ミトコンドリア電子伝達系を阻害すると、解糖系を強制的に維持しようとし、ピルビン酸から乳酸への代謝がより亢進、NAD/NADH比が低下する。また、電子伝達系の阻害により、ミトコンドリア膜電位の低下、活性酸素種(ROS)の増加に伴うGSHの枯渇を引き起こす。



電子伝達系の阻害によるミトコンドリア膜電位の低下を確認し、また、培地中Glucose消費量およびLactate生成量が増加した結果から、解糖系の亢進を確認した。さらに、細胞内GSHは減少し、グルタチオン合成に必要なNADPHが減少する結果が得られた。

