



Title	The effects of proteins on [Ca ²⁺] measurement : different effects on fluorescent and NMR methods
Author(s)	松田, 伸一
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40076
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	まつ 松 田 しん 伸 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 0 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	The effects of proteins on $[Ca^{2+}]$ measurement : different effects on fluorescent and NMR methods (カルシウム濃度測定に対する共存蛋白質の影響 : 蛍光法と核磁気共鳴法との対比)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西村 恒彦 (副査) 教 授 倉智 嘉久 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Ca イオンは細胞内のセカンドメッセンジャーとして重要な役割を演じている。特に心筋細胞においては収縮性を決定する3要因の1つであるため、心筋における正確なCa濃度測定は極めて重要である。細胞内Ca濃度測定法として広く用いられている蛍光色素法では、共存する蛋白質により色素のCaに対する親和性が変化することが報告されている。一方、NMR感受性のCa指示薬に対する蛋白質の影響は明らかでない。本研究の目的はNMR感受性のCa指示薬である、5-fluoro-1, 2-bis(2-amino-phenoxy) ethane N, N, N', N'-tetraacetic acid (5 F-BAPTA) のCaへの親和性に対する共存蛋白質の影響と、その機序を明らかにすることである。

【方法】

MOPS緩衝液に蛍光指示薬 fura-2 (20 μ M) と NMR 感受性の Ca 指示薬の 5 F-BAPTA (500 μ M) とを混在させ、同一サンプルを蛍光法と NMR 法にて測定し、それぞれの指示薬のCaに対する親和性 (K_d) を求めた。Ca イオン濃度は EGTA-CaEGTA 緩衝系により調整した。共存させる蛋白質としては、心筋細胞内の可溶性蛋白質で最も重量比の大きい aldolase (ALD) と、牛心筋を homogenize し精製し求めた可溶性蛋白質 (BCP) の二種類を用いた。fura-2 のCaに対する解離定数 K_d は次式により算出した。

$$[Ca^{2+}] = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times S_{f2} / S_{b2}$$

R は 340nm および 380nm での紫外線により励起された 510nm における蛍光の強度比、 R_{min} および R_{max} は Ca 濃度ゼロおよび飽和時の R、 S_{f2} および S_{b2} は Ca 濃度ゼロおよび飽和時の 380nm 紫外線に対する 510nm 蛍光強度である。一方、5 F-BAPTA のCaに対する K_d は次の式により算出した。

$$[Ca^{2+}] = K_d \times B / F$$

B および F は、おのおのフッ素 NMR スペクトルにおける 5 F-BAPTA の Ca 結合型および遊離型ピークの面積である。

【成績】

1) fura-2 のCaに対する K_d は ALD 無添加時 164.1 ± 5.6 nM ($n = 8$) であったが、10, 25, 50 mg/ml の ALD の共存により、 K_d はそれぞれ 497.1 ± 1.1 ($n = 4$), 700.1 ± 5.4 ($n = 4$), 757.2 ± 2.1 nM ($n = 4$) と有意に上昇した。また、BCP の添加についても、それぞれ 530.0 ± 4.1 ($n = 4$), 810.9 ± 2.4 ($n = 4$), 928.5 ± 3.3 nM ($n = 4$)

と有意な増加を認めた。一方、5 F-BAPTA の Ca に対する K_d は蛋白質無添加時 $298.4 \pm 3.4 \text{ nM}$ ($n = 8$) であり、ALD10, 25, 50mg/ml 共存時はそれぞれ 335.6 ± 4.2 ($n = 4$), 369.9 ± 2.8 ($n = 4$), $385.1 \pm 2.7 \text{ nM}$ ($n = 4$), 10, 25, 50mg/ml の BCP 添加でそれぞれ 308.8 ± 4.5 ($n = 4$), 311.3 ± 2.5 ($n = 4$), $316.0 \pm 2.9 \text{ nM}$ ($n = 4$) と、fura-2 のような著明な上昇は認めなかった。

2) ALD および BCP の SDS-PAGE およびゲル濾過分析により、ALD は 40kDa の subunit を持つ四量体蛋白質であること、BCP は 12kDa から 120kDa までの成分を持つ heterogenous な蛋白質であることが明らかとなった。このことより、fura-2 および 5 F-BAPTA の Ca に対する K_d の共存蛋白質による変化は、蛋白質の分子量および種類に依存しないことが示された。

3) Sips plot 解析では ALD 添加でも Ca 指示薬と Ca との結合比が 1 対 1 であることに変化は認めなかった。ALD の添加は Ca 濃度ゼロおよび飽和時いずれにおいても fura-2 蛍光スペクトルを高波長側へ移動した。一方、5 F-BAPTA のフッ素 NMR スペクトルは ALD 添加でも著変を示さなかった。

【総括】

1) fura-2 の Ca に対する見かけの K_d は蛋白質共存により大きく変化するが、NMR 指示薬である 5 F-BAPTA の K_d は有意な変化を認めなかった。また、fura-2 の K_d 変化は蛋白質の種類に依存しなかった。

2) 蛋白質共存により fura-2 の Ca に対する K_d が変化する機序として、Ca と蛋白質との相互作用ではなく、Ca 指示薬と蛋白質との直接的な相互作用が示唆された。

3) 5 F-BAPTA を用いたフッ素 NMR 法は、共存する蛋白質の影響を受けにくく、細胞内 Ca 測定法としてより robust な方法と考えられる。また、fura-2 の Ca に対する見かけの K_d は共存蛋白質濃度 25mg/ml 以上ではほぼ一定となり、細胞質の蛋白質濃度も 25mg/ml 以上であることより、fura-2 による細胞内 Ca 測定では K_d に 800nM として求めた値が一つの指標となり得ることが示された。

論文審査の結果の要旨

細胞内カルシウム濃度の測定には、従来より、蛍光色素法、フッ素 NMR 法などがあり、おのおの長所と短所を持っている。蛍光色素法では、細胞質内の共存蛋白質の影響を大きく受けるが、フッ素 NMR 法では、共存蛋白質の影響は不明であった。本研究により、5 F-BAPTA を用いたフッ素 NMR 法は、共存蛋白質の影響を受けにくく、細胞内のカルシウムイオン測定において、robust な方法であることが示された。また、共存蛋白質によりカルシウム指示薬のカルシウムイオンに対する解離定数 (K_d) が変化する機序として、カルシウム指示薬と蛋白質との直接的相互作用が示唆された。今回得られた知見は、細胞内カルシウム濃度測定法としてのフッ素 NMR 法の安定性を証明しており、心臓および他臓器での測定への応用に寄与するところ大と考えられるので博士論文に値すると思われる。