Osaka University Knowledge Archive

Title	The effects of proteins on 〔Ca2+〕 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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	松（まつ）　田（た）　伸（しん）　一（いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　13041　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（5F－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（20μM）とNMR感受性のCa指示薬の5F－BAPTA（500μM）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，5F－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5F－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±5.6nM（n＝8）であったが，10，25，50mg／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±2.1nM（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±3.3nM（n＝4）

と有意な増加を認めた。一方，5F－BAPTAのCaに対するK_dは蛋白質無添加時298.4±3.4nM（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±2.7nM（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±2.9nM（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5F－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，5F－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5F－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）5F－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，5F－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考えられる。