



牛脳のS-100aおよびS-100bのCa²⁺結合の性質

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2012-11-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松田, 禎行 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00003145

牛脳の S-100a および S-100b の Ca^{2+} 結合の性質

松 田 禎 行
北海道教育大学旭川分校化学教室

Ca^{2+} -Binding Properties of Bovine Brain S-100a and S-100b

Sadayuki MATSUDA

Chemistry Laboratory, Asahikawa College, Hokkaido University of Education,
Asahikawa 070

Abstract

The S-100 protein of the bovine brain is a mixture of S-100a and S-100b protein. The measurement of the fluorescence intensity of TNS-labelled S-100 protein reveals two Ca^{2+} binding steps. The effect of Ca^{2+} binding on the difference spectrum of bovine brain S-100a and S-100b proteins were examined at pH 7.0. The S-100a protein exhibited a blue shift of the absorption bands of the aromatic residues, while the S-100b protein exhibited a red shift. The dissociation constant of the Ca^{2+} -S-100a complex and the Ca^{2+} -S-100b complex obtained by the difference spectra were 2×10^{-4} M and 3×10^{-4} M, respectively. This means that these proteins differed rather more in their hydrophobicity properties than in their Ca^{2+} binding affinities. Positive cooperativity in Ca^{2+} binding was found in the S-100a protein.

The effect of Ca^{2+} on the fluorescence intensity of S-100a was examined at pH 7.0 and pH 8.3. At pH 7.0, a very slight increase was observed in the pCa 5 to 4 region, while there was a very slight decrease in the pCa 4 to 3 region. At pH 8.3, a nearly 30% increase was observed in the pCa 5 to 3 region. This means that the H^+ dissociation of the histidine residue of S-100a protein is accompanied by an increase in fluorescence intensity. The value of the dissociation constant 1.6×10^{-4} M thus estimated was in agreement with that obtained by the difference spectra method. The fluorescence of S-100b at pH 7.0, 8.3 and 9.2 was affected a little by the addition of Ca^{2+} as was also the case of S-100a at pH 7.0.

S-100 の Ca^{2+} 結合

S-100 蛋白質は Moore によって発見された分子量 2 万 1 千の酸性蛋白質で、脳のグリア細胞¹⁾に多量に存在する。この蛋白質は、 Ca^{2+} 結合によって構造変化を起こすことが Calissano らによって見出されている²⁾が、生理的役割は不明である。近年 S-100 蛋白質は、主に S-100a, S-100b の二成分の混合物であることが、Isobe らによって解明されている³⁾。その後 S-100a は 2 種のポリペプチド (α 鎖, β 鎖) からなるヘテロダイマーであるのに対し、S-100b は (β 鎖, β 鎖) のホモダイマーであることも見出されている。⁴⁾ Calissano らの測定²⁾は、S-100a, S-100b の混合物で行なわれているから、S-100 蛋白質の Ca^{2+} 結合の詳細を明らかにするには、まず各成分及び各ペプチドについて Ca^{2+} 結合による構造変化を調べることが必要である。本実験では、牛脳より調製した S-100a 及び S-100b の Ca^{2+} 結合に伴うそれぞれの構造変化を、蛍光測定法、および差スペクトル法で調べ、比較した。また最近報告された他の研究者の結果⁵⁾⁶⁾⁷⁾も合わせて検討した。

実 験

S-100 蛋白質は、Endo らの方法⁸⁾で牛脳より調製し、Isobe らの原法³⁾を少し変えて (DEAE Toyo パールカラムクロマトグラフィーで 0.075 M から 0.17 M までの NaCl の直線濃度勾配をかけることにより)、S-100a, S-100b の 2 種の成分に分離した。2-p-Toluidinyl naphthalene-6-sulfonic Acid Potassium Salt (TNS) は、半井化学特製試薬をそのまま使用した。CaCl₂ 水溶液は和光特級 CaCl₂ · 2H₂O と脱イオン水からの蒸留水から調製した。Ethylene Glycol Bis (β -amino ethyl-ether) N, N, N', N'-tetraacetic Acid (EGTA) は、半井化学特級品を 80°C で乾燥してから使用した。Morpholino propane sulfonic Acid (MOP S), Tris (hydroxymethyl) amino methane (Tris), Na₂P₄O₇ は特級品をそのまま使用した。測定は全て 25°C で行なった。

得た S-100 蛋白質は、5 mM EDTA 緩衝液に 4, 5 回透析し Ca^{2+} を除いてから Ca^{2+} 結合の測定に用いた。S-100a, S-100b の差スペクトルの測定には、島津 UV-210 型自記分光光度計を用いた。蛍光スペクトルは日立 MPF-4 型自記蛍光光度計を用いて測定した。TNS を S-100 蛋白質 (S-100a, S-100b の混合物) にラベルする方法は、Calissano²⁾らの方法にならった。ネイティブの S-100a の蛍光測定は、励起を 295 ± 10 nm で行ない、蛍光を 355 ± 5 nm で観測した。S-100b では、励起を 280 ± 10 nm で行ない、蛍光は 345 ± 5 nm で観測した。1 × 10⁻⁵ から 10⁻⁴ M の遊離 Ca^{2+} 濃度は、

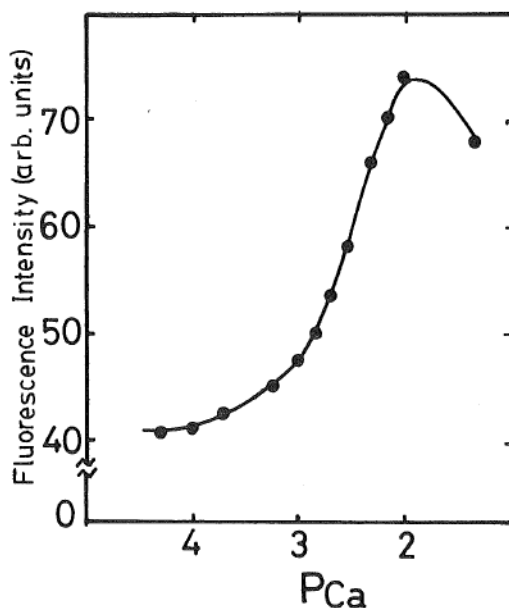


図1 TNSをラベルしたS-100蛋白質の蛍光強度の遊離 Ca^{2+} 濃度依存性、縦軸は 450 nm の蛍光強度である。実験条件: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 10 μ M TNS-S100。

Ca²⁺-EGTA緩衝液を用いるやり方⁹⁾で設定した。

実験結果

1) TNS化 S-100の蛍光強度とCa²⁺濃度との関係:

二成分に分離する前のS-100蛋白にTNSを1モル当り1モルラベルし、450 nmの蛍光強度を遊離Ca²⁺濃度に対しプロットしたのが図1である。蛍光強度の増加は疎水性の増加を示す。pCa 4から3迄のCa²⁺濃度の増加に対し、蛍光は次第に増加し、pCa 3よりもCa²⁺濃度が高くなると蛍光は急激に増大する。これはS-100のCa²⁺結合に正の協同性が存在することを示唆する。即ち、Ca²⁺結合は二段階で起こるようである。またpCa 2以上では減少しているが白濁しやすいことから、これは蛋白の重合によるものであろう。

2) S-100a, S-100bの差スペクトル:

図2(a)は、1 mM Ca²⁺存在下において示されたS-100aの差スペクトルである。Ca²⁺濃度を変えて得られた差スペクトルの286 nmの吸光度差を遊離Ca²⁺濃度に対しプロットしたものが図2(b)である。この場合もpCa 4から3の間に大きな変化が起きており、Ca²⁺結合に正の協同性があることを示唆している。pCa 4よりも低いCa²⁺濃度のときは、誤差が大きく強い結合があるのかどうかはわからなかった。差スペクトルが負であることは、チロシン残基、トリプトファン残基がより親水性の環境に移ったことを示している。またこの曲線より、pK_bは3.7と求められた。

S-100bについて同様に差スペクトル測定したのが図3(a)である。S-100aとは逆に、チロシンのスペクトルが正になっていることは、この残基がより疎水性の環境に移ったことを示す。S-100bを構成しているポリペプチド鎖βは、トリプトファンを含まないので、295 nmの小さな谷は、微量混入したS-100aによるものと思われる。この様にS-100aとS-100bとは差スペクトルの向きが全く異なるが、pK_bは、図3(b)に示すように3.5であり、S-100aのそれと殆んど変わらなかった。即ち、S-100aとS-100bとはCa²⁺結合の強さは、変わらないが、その性質が違っていることが示唆される。このことは、次に述べる蛍光の実験からも支持された。

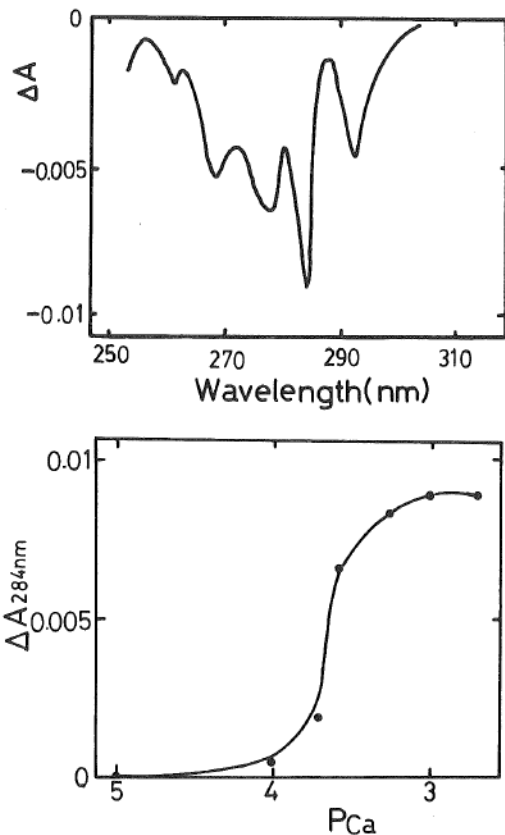


図2 S-100aのCa²⁺結合による差スペクトル、(a)は1 mM Ca²⁺存在下のスペクトル、(b)は286 nmの吸光度差を遊離Ca²⁺濃度に対してプロットしたもの、実験条件: 0.01 M MOPS-NaOH (pH 7.0), 21 μM S-100a.

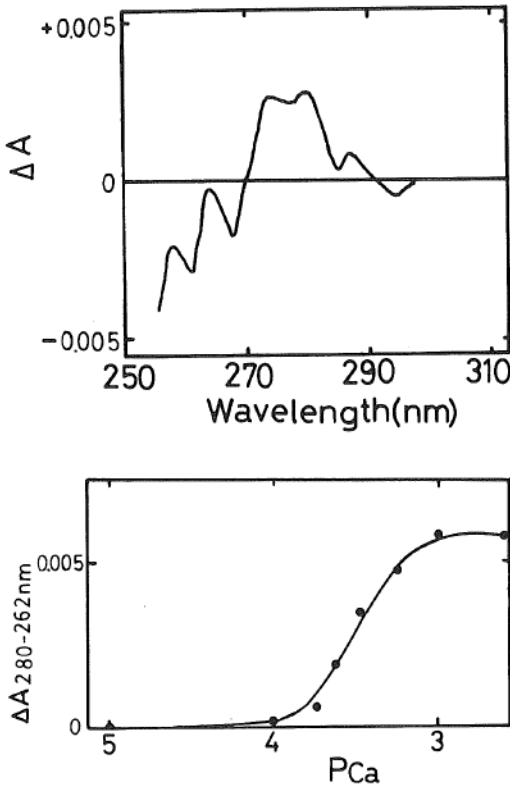


図3 S-100bの Ca^{2+} 結合による差スペクトル, (a)は1 mM Ca^{2+} 存在下のスペクトル, (b)は280 nmと262 nmの吸光度差を遊離 Ca^{2+} 濃度に対しプロットしたもの. 実験条件: 0.01 M MOPS-NaOH (pH 7.0), 18 μM S-100b.

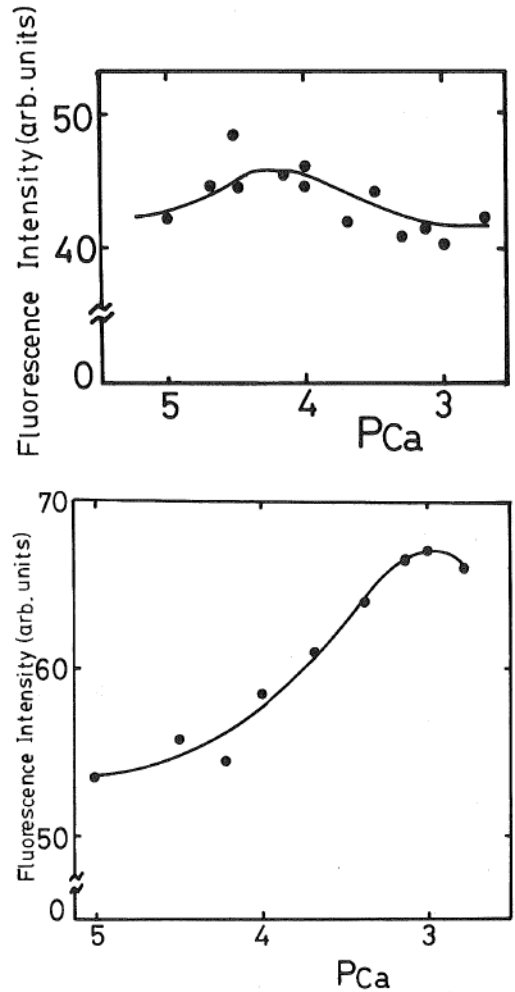


図4 S-100aの蛍光強度の遊離 Ca^{2+} 濃度依存性, (a)は0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), (b)は0.1 M Tris-HCl (pH 8.3)での測定である. 縦軸は355 nmの蛍光強度である. 蛋白濃度は1.8 μM .

3) S-100a, S-100bの蛍光強度の Ca^{2+} 濃度依存性:

図4にS-100a(ポリペプチド α 鎖)のトリプトファンの蛍光強度の遊離 Ca^{2+} 濃度依存性を示す. pH 7.0におけるその関係を示したのが図4(a)である. 測定した Ca^{2+} 濃度の範囲内で蛍光強度に殆んど変化は見られない. わずかにpCa 5からpCa (4.3-4.0)迄増加し, Ca^{2+} 濃度の増加に伴って減少する傾向を示すが, 結論できなかった. pH 8.3におけるS-100aの蛍光強度と Ca^{2+} 濃度依存性は, pH 7.0(図4(a))とは異って, Ca^{2+} 濃度の増加と共に蛍光強度は増大した. pCa 5のときの強度に比べ, pCa 3のときの蛍光強度は, 30%も大きい. この曲線よりS-100aの pK_D 3.8が得られた. pCa 3以上では, 蛍光強度は減少し, 濁りを与えることがある. このことから, ヒスチジン残基のプロトン解離が蛍光の増減を決める因子だと思われる.

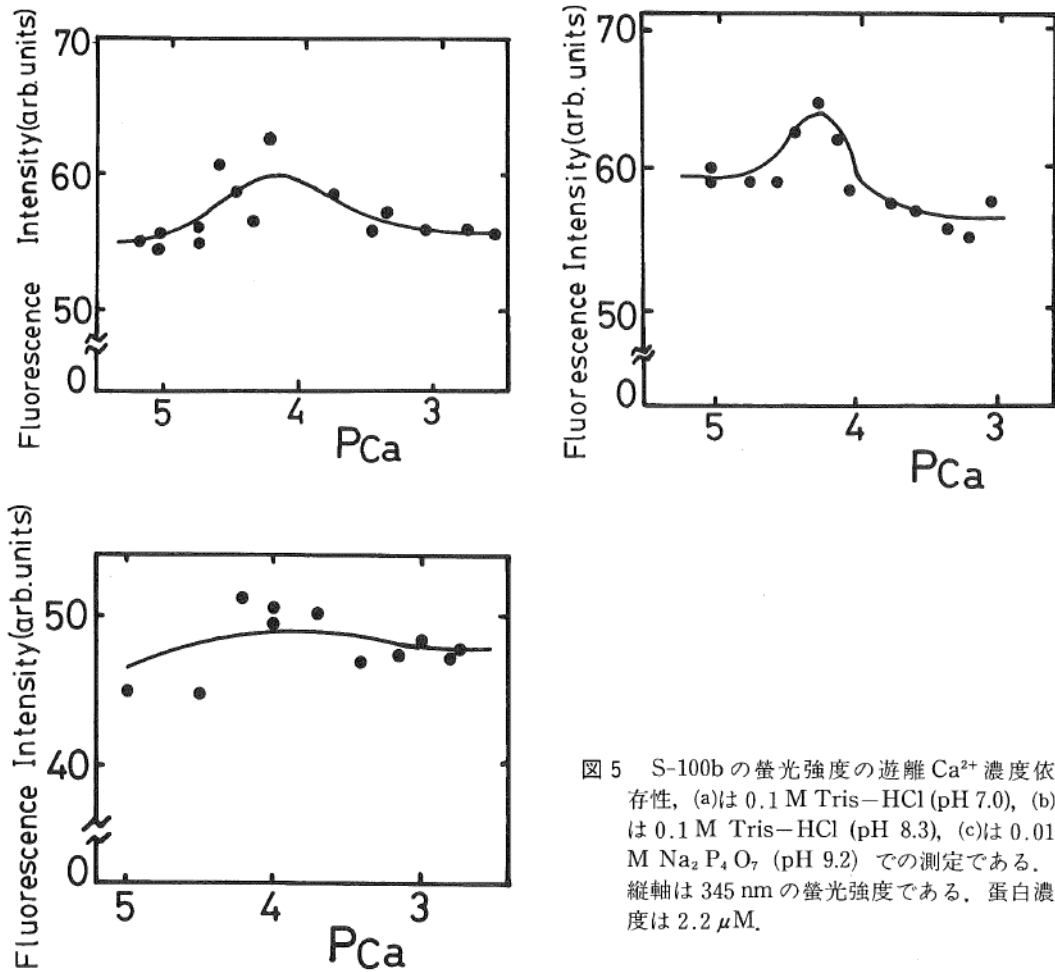


図5 S-100bの蛍光強度の遊離 Ca^{2+} 濃度依存性, (a)は 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), (b)は 0.1 M Tris-HCl (pH 8.3), (c)は 0.01 M $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$ (pH 9.2) での測定である. 縦軸は 345 nm の蛍光強度である. 蛋白濃度は $2.2 \mu\text{M}$.

S-100b のチロシン残基の蛍光強度の遊離 Ca^{2+} 濃度依存性を調べたのが、図 5(a), (b), (c)(pH は各々、7.0, 8.3, 9.2) であるが、pH 7.0 における S-100a の場合と同様にいずれも殆んど変化が認められなかった。特に pH 9.2 の測定では、 Ca^{2+} 結合が二段階で起こるように見えるが、変化巾が小さく、これを明らかにするためには、詳細な Ca^{2+} 結合定数の化学量論的な実験が必要である。図 4 と図 5 の蛍光測定の結果からも、S-100a と S-100b とでは性質にかなりの差のあることが示された。

考 察

S-100 蛋白は脳に見出されている他、最近、皮膚¹⁰⁾ や脂肪組織¹¹⁾ にも存在することが報告されているが、その機能は不明である。同じく脳中に多量に存在するカルモジュリンの機能がかなりはっきりして¹²⁾ いるのとは対照的である。

S-100 蛋白質は S-100a と S-100b の等量混合物であるから³⁾, 各成分の性質を明らかにすることがぜひとも必要である. TNS をラベルした S-100 の蛍光強度変化(図 1)や, ネイティブの S-100a, S-100b の蛍光強度変化(図 3, 図 4) から考えると, Ca^{2+} 結合には, 強い結合と弱い結合の二種がある可能性が強い. Calissano²⁾ らは, 流動透析法を用い, pH 8.3 において Ca^{2+} 解離定数が 7×10^{-5} M と 1×10^{-3} M の二種の Ca^{2+} 結合部位の存在を報告している. Mani らも CD スペクトルの測定から S-100b で, 6×10^{-5} M と 2×10^{-4} M の二種の解離定数を報告し⁵⁾, S-100a についても同様の報告を行なっている.⁶⁾ Baudier らは蛍光の量子収率の測定より, S-100a 及び S-100b について 2×10^{-4} M のただ一種の解離定数を報告しているが, 流動透析の測定では 2×10^{-5} M という値を得ている⁷⁾. この違いは蛋白濃度の違いによるものとは考えにくい. 何故なら差スペクトル測定の結果(図 2, 図 3)でも解離定数の値は, Baudier らの蛍光測定で得た値と一致するからである. 10^{-5} M のオーダーの強い結合は, スペクトル測定では検出しにくいと考えるのが自然である.

S-100 に対して Ca^{2+} 結合数と結合部位に関して若干の報告がある. Calissano ら²⁾ や Perumal ら¹³⁾ は, 1 分子当たり, 10 個の Ca^{2+} を結合することを報告している. しかし, Kretsinger¹⁴⁾ らのいう E F ハンド構造によると, α 鎖と β 鎖内に各 1 個の Ca^{2+} が結合し, S-100—分子当たり 2 個の結合部位しか存在しない.⁴⁾ E F ハンド構造に含まれているグルタミン酸残基とアスパラギン酸残基の和は, α 鎖, β 鎖各々 6 である. E F ハンド構造は強い負の電荷を帯びているから, 2 個以上の Ca^{2+} を結合できるのかも知れぬ. S-100a では, His 残基のプロトン解離が蛋白構造に影響を及ぼすことが示された.(図 4(b)) 各成分及び各ペプチドの Ca^{2+} 結合数を調べることが今後の課題である.

本研究の遂行にあたり有益な助言を賜った本学旭川分校東尚已教授に深く感謝します.

文 献

- 1) B. W. Moore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 739 (1965).
- 2) P. Calissano, S. Alema and P. Fasella, *Biochemistry.*, **13**, 4553 (1974).
- 3) T. Isobe, T. Nakajima and T. Okuyama, *Biochim. Biophys. Acta.*, **494**, 222 (1977).
- 4) T. Isobe and T. Okuyama, *Eur. J. Biochem.*, **115**, 469 (1981).
- 5) R. S. Mani, J. G. Shelling, B. D. Sykes and C. M. Kay, *Biochemistry.*, **22**, 1734 (1983).
- 6) R. S. Mani and C. M. Kay, *Biochemistry.*, **22**, 3902 (1983).
- 7) J. Baudier and D. Gerard, *Biochemistry.*, **22**, 3360 (1983).
- 8) T. Endo, T. Tanaka, T. Isobe, H. Kasai, T. Okuyama and H. Hidaka, *J. Biol. Chem.*, **236**, 12485 (1981).
- 9) S. Matsuda and K. Yagi, *J. Biochem.*, **88**, 1515 (1980).
- 10) D. Cocchia, F. Michetti and R. Donato, *Nature.*, **294**, 85 (1981).
- 11) H. Hidaka, T. Endo, S. Kawamoto, E. Yamada, H. Umekawa, K. Tanabe and K. Hara, *J. Biol. Chem.*, **258**, (1982).
- 12) 日高弘義, 垣内史郎, “カルモジュリン- Ca^{2+} 受容蛋白質”講談社. 東京 (1981) p. 151.
- 13) A. S. Perumal, S. P. Mahadik and M. M. Rapport, *J. Neurochem.*, **27**, 173 (1976).
- 14) R. H. Kretsinger and C. E. Nockolds, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313 (1973).