



カルモジュリンとトルイジンブルーとの相互作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 北海道教育大学 公開日: 2012-11-07 キーワード: 作成者: 松田, 禎行 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00003554

カルモジュリンとトルイジンブルーとの相互作用

松田 禎行

北海道教育大学旭川分校化学教室

The Interaction of Calmodulin with Toluidine Blue

Sadayuki MATSUDA

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

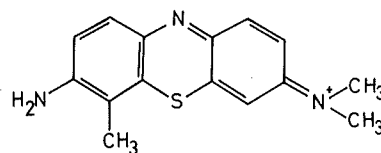
Abstract

“Toluidine Blue” combines with calmodulin to yield several kinds of complexes. The absorption spectra showed a blue shift at low dye/calmodulin ratios, and a red shift at high dye/calmodulin ratios. The absorbance at 633 nm showed four step changes with increasing ratios. The binding of Toluidine Blue to calmodulin competes partially with Ca^{2+} .

序

トルイジンブルーは、負電荷を持つ高分子電解質と結合すると、青から赤へと変色する塩基性色素である(図1)。これは従来、応用化学の分野で正コロイド又は負コロイドを滴定する際の指示薬として用いられてきたが、これと両性電解質である蛋白質との相互作用について調べられた例は少ない¹⁾。そこで本研究では、酸性 Ca^{2+} 結合蛋白質の一つであるカルモジュリンとトルイジンブルーとの相互作用を可視部吸収スペクトルの測定から調べた。その結果、トルイジンブルーはカルモジュリンと少なくとも4種以上の錯体を作ることがわかった。またそれはE Fハンド構造(カルボキシル基の密集部)以外にも結合することが示唆された。

図1 トルイジンブルーの化学構造



実 験

カルモジュリンは牛脳より矢沢らの方法²⁾により調製した。トルイジンブルー、その他の試薬は市販品をそのまま用いた。緩衝液にはN-モルフォリノプロパンスルホン酸(略してMOPS)-KOH (pH=6.80)を用いた。トルイジンブルーの吸収スペクトルの測定には島津 UV-210A 型自記分光光度計, pH の測定には東亜電波の HM-15A 型 pH メーターを用いた。測定は20°Cで行なった。

結果と考察

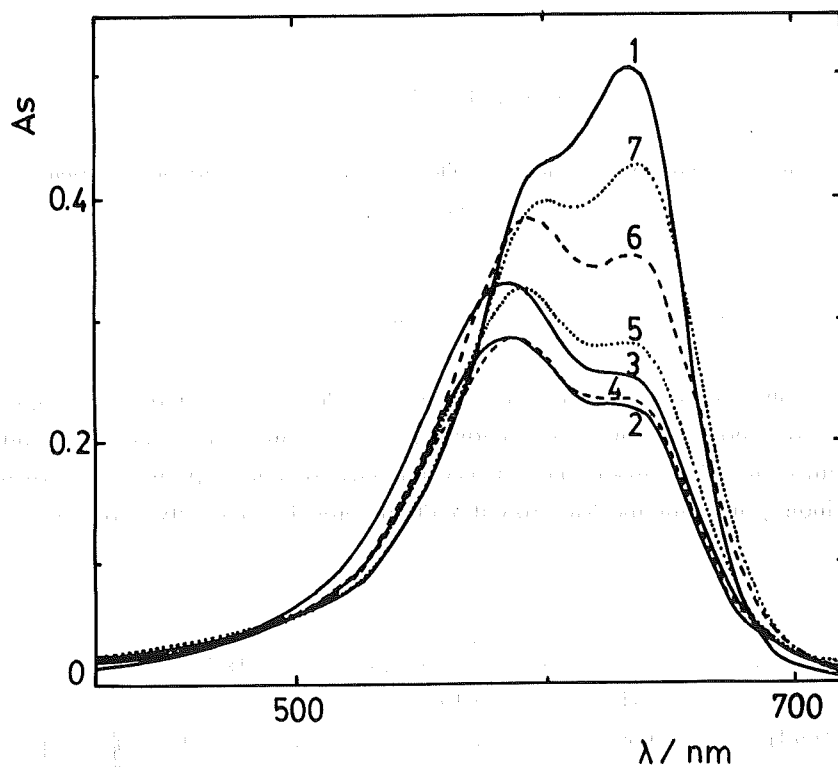


図2 トルイジンブルーの可視部吸収スペクトルに及ぼすカルモジュリンの効果。
 20 μ M トルイジンブルー, 10mM MOPS-KOH (pH6.80), カルモジュリン濃度は1: 0 μ M, 2: 14 μ M, 3: 29 μ M, 4: 58 μ M, 5: 115 μ M, 6: 216 μ M, 7: 422 μ M.

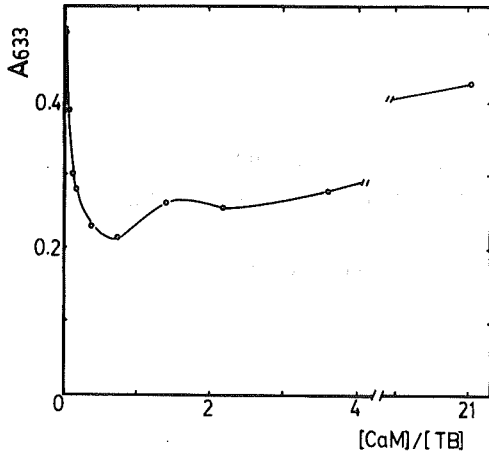


図3 632nmの吸光度のカルモジュリン濃度依存性。トルイジンブルーは、TB、カルモジュリンはCaMと略記する。条件は図2と同じである。

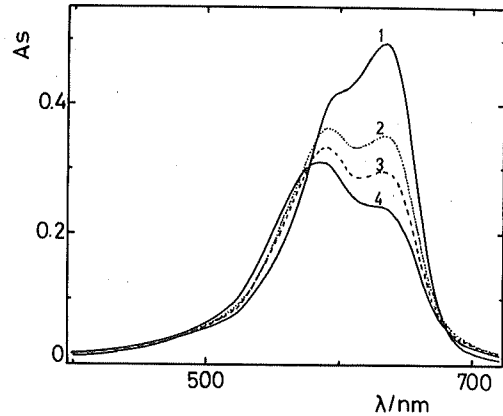


図4 Ca^{2+} -カルモジュリン存在下のトルイジンブルーの吸収スペクトル。1は遊離の $20\mu\text{M}$ のトルイジンブルーのみ、2-4はさらに $29\mu\text{M}$ のカルモジュリンを含むときの吸収曲線。2-4の Ca^{2+} 濃度は各々、 1.0mM 、 0.5mM 、 0mM である。

$20\mu\text{M}$ のトルイジンブルーの溶液にカルモジュリンを加え、可視部吸収スペクトルの変化を測定した(図2)。吸収曲線はカルモジュリン濃度の増加とともにまず短波長側に移動し(曲線(2-5)), さらにカルモジュリン濃度を増加させると逆に長波長側へと移動する(曲線(6,7))。またカルモジュリン濃度を色素の約20倍以上にすると吸収曲線(7)の形は、遊離のトルイジンブルーの吸収曲線(1)にかなり近いものになった。しかも等吸収点は全く認められなかった。溶液の色は、青から青紫、再び青へと変化する。用いたカルモジュリン濃度の範囲内では、沈殿物は全く認められず、吸光係数の大幅なる減少が起きなかったことから、変化はメタクロマジーによるものといえる。633nmの吸光度の減少をカルモジュリンのトルイジンブルーに対するモル比に対しプロットしたのが図3である。633nmの吸光度は、モル比0.8迄急激に減少した後、モル比1.5まで増加した後再び減少し、モル比2.1に小さな極小値を示し、以後は徐々に増加する。この事実から少なくとも4種のトルイジンブルー-カルモジュリン錯体の生成が示唆される。

次にトルイジンブルーの結合位置を調べるために Ca^{2+} をカルモジュリンに結合させておいてから、トルイジンブルーを加えた、その結果を図4に示す。試料溶液のイオン強度は 0.01M 以下であるから、カルモジュリンの4個の Ca^{2+} 結合定数は、約 10^6M^{-1} と推定される³⁾。従って全 Ca^{2+} 濃度が 0.5mM 又は 1.0mM という条件下では、 $29\mu\text{M}$ のカルモジュリンは Ca^{2+} で飽和している。 1mM Ca^{2+} 存在下の吸収曲線(2)は、 Ca^{2+} フリーの吸収曲線(4)と異なるが、遊離状態のトルイジンブルーの吸収曲線(1)とも明らかに異なる。これは、トルイジンブルーがEFハンド構造部以外にも結合することを示唆する。

CadayとSteinerは、塩基性色素ステインズ・オールとカルモジュリンとの相互作用を可視部吸収スペクトルとCDスペクトルの測定から調べているが、非常に複雑なスペクトル変化がみられることから、数種類のステインズ・オール-カルモジュリン錯体の生成を報告している⁴⁾。トルイジンブルー、ステインズ・オール等の塩基性色素は両性電解質であるカルモジュリンとメタクロマジー反応を起こすが、その過程は複雑である。

文 献

- 1) 千手諒一 "コロイド滴定法", 南江堂 (1969) p. 23
- 2) M. Yazawa, M. Sakuma, and K. Yagi, *J. Biochem.*, **87**, 1313 (1980) .
- 3) D. M. Walff, P. G. Poirrer, C. O. Brostrom, and M. A. Brostrom, *J. Biol. Chem.*, **252**, 4108 (1977) .
- 4) C. G. Caday and R. F. Steiner, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5895 (1985) .