

各種組織の細胞質内Ca⁺⁺結合蛋白質とその分布

佐藤英介・西田佳史・森下誠治・山本昌澄・内海耕隼

(生物学教室)

Distribution of Ca⁺⁺-binding Proteins in Cytosol of Various Organs

Eisuke F. SATO, Yoshifumi NISHIDA, Seiji MORISHITA,
Masazumi YAMAMOTO and Kozo UTSUMI

Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi 781-51, Japan

Abstract. The calcium ion (Ca⁺⁺), widely recognized as an important intracellular messenger in mammalian tissues, contributes to many cellular responses.

Some processes regulated by calmodulin or other Ca⁺⁺-binding proteins are thought to play a central role in the intracellular calcium messenger system. In this study, using ⁴⁵Ca-autoradiography, we tried to detect Ca⁺⁺-binding proteins in cytosol of various organs in guinea pig, rat and mouse.

It was detected Ca⁺⁺-binding protein of MW 17kDa (calmodulin) in all organs. In brain and kidney, it was detected many Ca⁺⁺-binding proteins (brain: MW16k, 17k, 26k, 28k, 52kDa. kidney: MW 17k, 24kDa). Distribution of Ca⁺⁺-binding proteins among these animals was not different. It is suggested that Ca⁺⁺-binding proteins are tissue-specific and commonly distributed among these animals.

諸 言

細胞はホルモンのような外的刺激に応答して種々の代謝変化を行う。これは作動物質 (Ligand) が細胞表層の受容体 (receptor) に結合し Ligand-receptor 複合体を形成することに始まる一連の反応による場合が多く、そのなかでも細胞内 Ca⁺⁺ 濃度 ([Ca⁺⁺]_i) の変化はこの応答反応に重要な働きをもつ。一般に [Ca⁺⁺]_i は、ほぼ 5 × 10⁻⁸ M の濃度で維持されているが、この [Ca⁺⁺]_i を変化させる要因には図 1 に示すように多くのものがある。即ち細胞内への Ca⁺⁺ の取り込みは膜電位脱分極に依存した Ca⁺⁺ ゲートの開口、Ligand-receptor 複合体形成による Ca⁺⁺ ゲートの開口による。細胞内からの細胞外への Ca⁺⁺ のくみだしは、

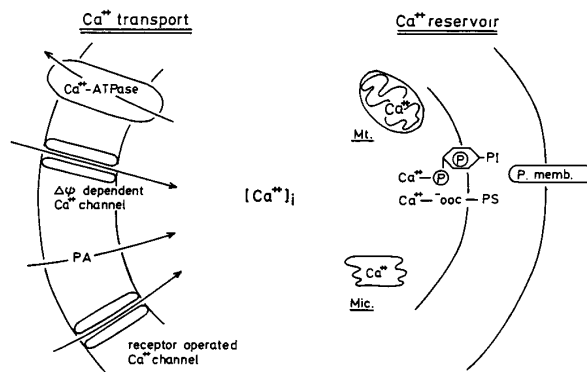


Fig. 1. Factors for the regulation of intracellular Ca⁺⁺ concentration ([Ca⁺⁺]i)

Mic., microsome ; Mt., mitochondria ; PA, phosphatidic acid ; PI, phosphatidylinositol ; P.memb., plasma membrane ; PS, phosphatidylserine

Ca⁺⁺-dependent ATPase による。また細胞内には膜結合 Ca⁺⁺、ミクロソーム内 Ca⁺⁺、ミトコンドリア内 Ca⁺⁺ があり、それらは種々の因子で細胞質に遊離され [Ca⁺⁺]i を変化させる。ここで [Ca⁺⁺]i の変化による代謝調節の一例を示す (図 2)。即ち Ligand-receptor 複合

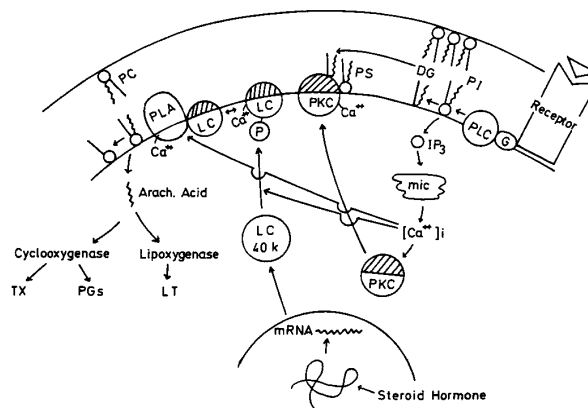


Fig. 2. Schematic representation of transmembrane control by change of [Ca⁺⁺]i

Phosphatidylinositol (PI)-specific phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC), steroid hormone induced lipocortin (LC) and phospholipase A₂ (PLA₂) were regulated by [Ca⁺⁺]i.

Arach. Acid, arachidonic acid; DG, diglyceride; G, GTP binding protein; IP₃, inositol tris phosphate; LT, leukotriene; mic, microsome; PC, phosphatidylcholine; PGs, prostaglandins; PS, phosphatidylserine; TX, thromboxane

体→G T P 結合蛋白質の構造変化→膜結合ホスファチジルイノシトール (P I) 特異的ホスホリパーゼC (P L C) の活性化→ジグリセリド (D G) とイノシトール 3 リン酸 (I P ₃) の形成→ミクロソームよりの Ca⁺⁺ の遊離と [Ca⁺⁺]i の増大→プロテインキナーゼC (P K C) の Ca⁺⁺ 結合に伴う膜への移行→膜上でのホスファチジルセリン (P S) , D G との反応による P K C の活性化→種々の細胞内蛋白質のリン酸化→代謝変化による調節が明らかにされている。この他にも

色々な Transmembrane signal 反応があるが、それらの反応にも $[Ca^{++}]_i$ 関与の大きいことが知られている。³⁾したがってこの $[Ca^{++}]_i$ の変化による代謝調節には Ca^{++} を結合する蛋白質が重要な働きを持つことはいうまでもない。これまでに Ca^{++} を結合する蛋白としてカルモジュリン⁴⁾を始めかなり多くの蛋白質が発見され、それぞれに重要な働きが明らかにされている。⁵⁾中でも最近ではPKC⁶⁾のように Ca^{++} と酸性リン脂質に依存して生物活性を発揮する蛋白が特に注目されるようになった。⁷⁾このような理由から、本研究では生体内の各組織細胞の中で特に細胞質に含まれる Ca^{++} 結合蛋白を検索し、それらの分布は組織特異性が強く、細胞代謝に直接に関係あることを示唆する結果を得たので報告する。

材料と方法

モルモットは Hartley 系, ラットは Wistar 系, マウスは BALB/c 系を用いた。各種組織 (脳, 心臓, 肺臓, 脾臓, 肝臓, 腎臓) は, 採取後よく切り刻み組織中の血液を除いた後, 0.1M NaCl, 20mM HEPES buffer (pH 7.4), 1mM EGTA, 0.1% Leupeptin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (セリンプロテアーゼ阻害剤) 液中で, 0℃にて5分間ホモゲナイズし, 100,000xg 60分間遠心分離し, 得られた上清を標本とした。⁸⁾次にこれらの標本を Laemmli らの方法に従い SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を行なった後, Westernblotting により Durapore 膜に転写し, Towbin らの方法に従って ^{45}Ca とインキュベートした後, 乾燥させオートラジオグラフィーを行い Ca^{++} 結合蛋白を検索した。

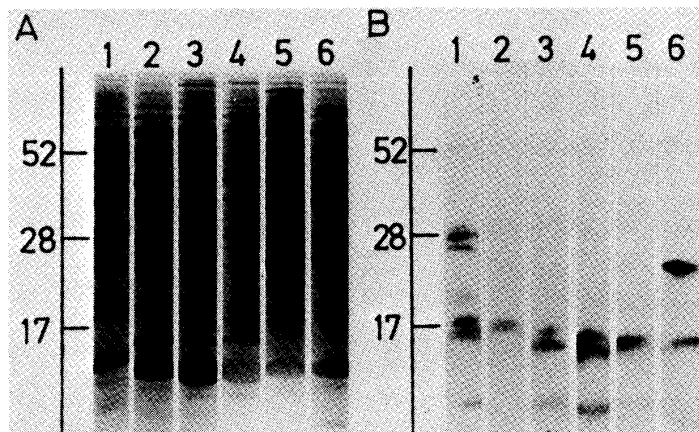


Fig. 3. Autoradiographic detection of Ca^{++} -binding proteins in Cytoplasmic fractions of various organs in guinea pig

The Cytoplasmic fractions of various organs in guinea pig were resolved by SDS-PAGE (15% acrylacid) and either stained with Coomassie Blue (A) or transferred to Durapore filter (B). The filter was incubated with buffer containing ^{45}Ca . After unbound ^{45}Ca was washed off, the Ca^{++} -binding proteins were detected by autoradiography.

A: Coomassie Blue stain

B: ^{45}Ca -autoradiography

1. brain 2. heart 3. lung 4. spleen 5. liver 6. kidney

結果と考察

1. モルモット各組織上清分画中のCa⁺⁺結合蛋白質

モルモットの各組織ホモゲネートの上清の Ca⁺⁺ 結合蛋白質の分布を調べた結果、図3に示されるように、分子量17kDa前後の蛋白質（カルモジュリン）が、各組織に共通して明瞭に検出された。その他に、肺臓と脾臓にカルモジュリンよりわずかに分子量の小さい蛋白質が、また脳と腎臓において数種の Ca⁺⁺ 結合蛋白質が検出された。即ち脳においては、分子量16k, 26k, 28k, 52kDa の蛋白質が、腎臓においては、24kDa の蛋白質が検出された。

2. ラットおよびマウスの各組織上清分画の Ca⁺⁺ 結合蛋白質

ラットおよびマウスの各組織上清分画上清の Ca⁺⁺ 結合蛋白質の分布もモルモットの場合と同様に、脳と腎臓においてモルモットと同様に数種の Ca⁺⁺ 結合蛋白質が検出された（図4, 5）。マウスにおいては、モルモットよりもカルモジュリン近い分子量を持つ多くの Ca⁺⁺ 結合蛋白質が確認された。

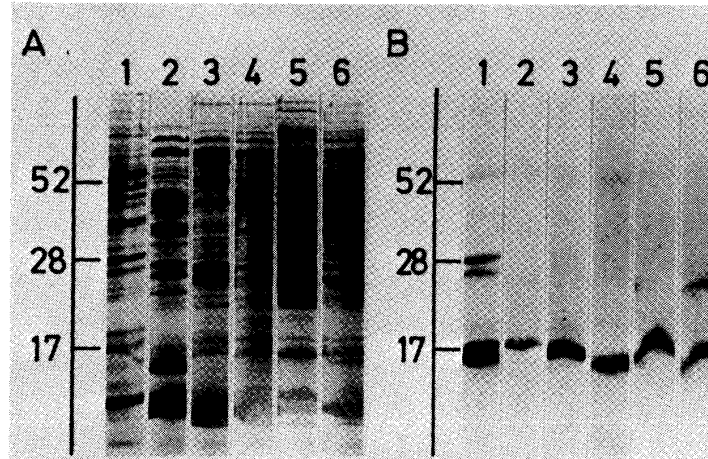


Fig. 4. Autoradiographic detection of Ca⁺⁺-binding proteins in Cytoplasmic fraction of various organs in rat

Experimental conditions were as described in fig. 3 except the used organs.

A: Coomassie Blue stain

B: ⁴⁵Ca-autoradiography

1. brain 2. heart 3. lung 4. spleen 5. liver 6. kidney

3. Ca⁺⁺結合蛋白質の組織特異性

モルモット、ラットおよびマウスの各組織の Ca⁺⁺ 結合蛋白質を比較してみると、これらの組織で種特異的な蛋白質はほとんど認められず、むしろ Ca⁺⁺ 結合蛋白質は種を越えて組織に共通した分布を示すことが明らかにされた。特に脳と腎臓を比較してみると、脳においては分子量16k, 17k, 26k, 28k, 52kDa の蛋白質が、腎臓においては分子量17k, 24kDa の蛋白質が共通して存在することが明らかにされた（図6）。

Ca⁺⁺ を介した情報伝達は Ca⁺⁺ 結合蛋白質に依存するところが多いと考えられ、本実験より脳および腎臓にその蛋白質の多いことから、これらの組織において Ca⁺⁺ による代謝調節機

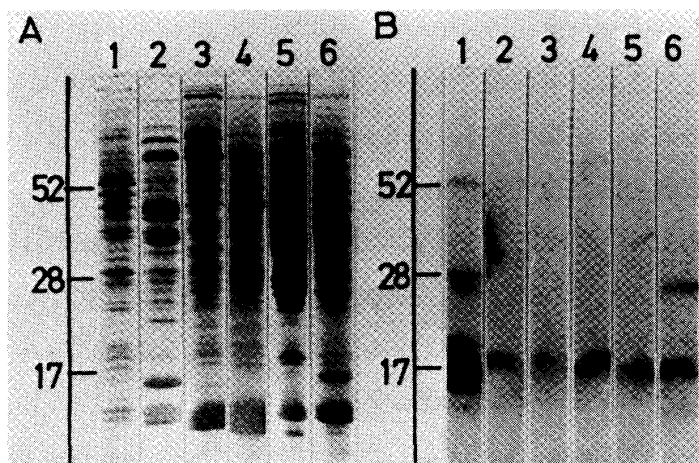


Fig. 5. Autoradiographic detection of Ca^{++} -binding proteins in Cytoplasmic fractions of various organs in mouse

Experimental conditions were as described in fig.3 except the used organs.

A: Coomassie Blue stain

B: ^{45}Ca -autoradiography

1. brain 2. heart 3. lung 4. spleen 5. liver 6. kidney

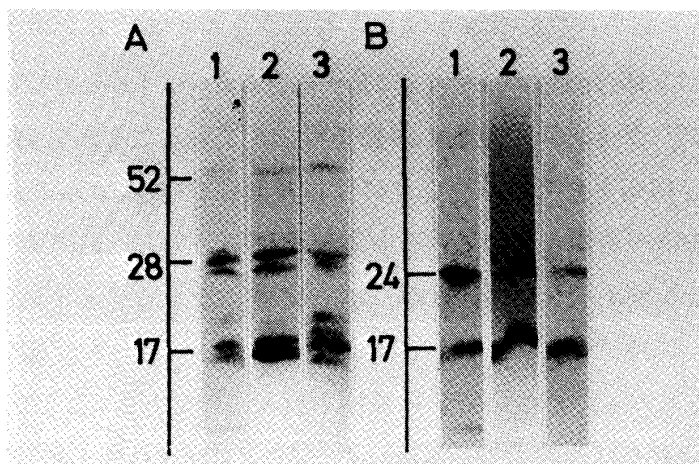


Fig. 6. Comparison of Ca^{++} -binding proteins in Cytoplasmic fractions of brain and kidney of guinea pig, rat and mouse

A: ^{45}Ca -autoradiography of brain

B: ^{45}Ca -autoradiography of kidney

1. guinea pig 2. rat 3. mouse

能が発現であることが示唆される。事実脳は神経系の中枢であり、脳代謝において Ca^{++} の重要性はすでによく認められているところである。また腎臓は種々の物質の排泄、再吸収が盛んに行なわれている臓器であり、 Ca^{++} をはじめイオン結合性蛋白も多く、 Ca^{++} 結合蛋白の役割の重要性が示唆される。また、カルモジュリンが各組織に共通してみられ、 Ca^{++} の結合による活性化調節が細胞に共通して存在することが伺える。

これまでに Ca^{++} 結合蛋白質としてカルモジュリン、トロポニンC、ミオシン軽鎖、バルブア

ルブミン、小腸 Ca⁺⁺ 結合蛋白質、カルシニューリン、カルシメジン、カルデスモン、S-100蛋白質などがあげられてきた。⁵⁾ 本研究で示された Ca⁺⁺ 結合蛋白質の中にこれらの蛋白質と分子量を同じくするものがある。すなわち脳における分子量28,000の蛋白質は小腸 Ca⁺⁺ 結合蛋白質のなかに存在するものと同じ分子量のものである。また、Waisman らが牛脳のホモゲネートの100,000xg上清において検出した Ca⁺⁺ 結合蛋白質の分布と比較すると、これらの三種(モルモット、ラット、マウス)の脳の Ca⁺⁺ 結合蛋白質の分布とほぼ一致している。彼らは、それぞれの蛋白質を同定しており分子量16kDaはカルシニューリンのβサブユニット、20kDaをカルモジュリン、27kDaをカリギユリン、48kDaをC A B-48とした。¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ このことより、我々が脳において検出した蛋白質も Waisman らが同定したのと同じものである可能性はある。しかし、その同異を決定するためには活性を直接計測するか、それらの蛋白質の抗体を作製し Western blotting を行なって同定するか、蛋白質を精製してアミノ酸の sequence を決めて比較しなければならない。脳においてはこれまで本実験で検出された以外に、蛋白質の精製によってそれまで Ca⁺⁺ 結合能を示さなかったものが Ca⁺⁺ 結合能を示すようになることも明らかにされており、かなり多くの Ca⁺⁺ 結合蛋白質があることが示唆されている。¹²⁾ このことは先に述べたように Ca⁺⁺ やその結合蛋白質が脳の代謝に重要な働きをもつことを示唆すると考えられる。

また先にあげた Ca⁺⁺ 結合蛋白質のほとんどは筋肉細胞あるいは上皮系の細胞に発見されている。特に筋肉細胞では Ca⁺⁺ がその収縮運動の調節を行なっていることから詳しく研究され数種の Ca⁺⁺ 結合蛋白質が同定されている。これに反し非筋細胞では、カルモジュリン以外の Ca⁺⁺ 結合蛋白質は、その検出が困難とされている。本実験においても、筋肉系である心臓においてカルモジュリンのみしか検出できなかったが、脳と腎臓にカルモジュリン以外の Ca⁺⁺ 結合蛋白質を数種検出できた。この ⁴⁵Ca オートラジオグラフィ法は SDS で変性した後 Durapore 膜上で ⁴⁵Ca 結合能をもつものについてのみ検出されたものであり、ここで示されたものの他にも Ca⁺⁺ 結合蛋白質の存在は当然予期される。従ってここに示された Ca⁺⁺ 結合蛋白質はその一部であり、特定条件下に検出可能な Ca⁺⁺ 結合能を示す Ca⁺⁺ 結合蛋白質を示すものである。しかし同蛋白質のなかで検出可能な Ca⁺⁺ 結合蛋白質の分布として各細胞の種々の生物活性を考える上でかなり重要な知見と考えられる。

以上、⁴⁵Ca-オートラジオグラフィ法により、各組織細胞質内 Ca⁺⁺ 結合蛋白質を検出し、それらの組織特異性、種共通性を明らかにした。

結 論

細胞質上清蛋白質について SDS-PAGE を行い、Durapore 膜に電気泳動的に転写し、⁴⁵Ca-オートラジオグラフィ法で各細胞質中の Ca⁺⁺ 結合蛋白質を検索し次の結果を得た。

1. この方法により、各組織細胞質内 Ca⁺⁺ 結合蛋白質を検出することができる。
2. Ca⁺⁺ 結合蛋白質は、組織特異的に分布し、調べられた3種(モルモット、ラット、マウ

- ス)の動物においてその結合蛋白の分布や種類は共通している。
3. 各組織には分子量17kDaのカルモジュリンが共通に存在する。
 4. Ca^{++} 結合蛋白質は脳と腎臓に多くそれら臓器の Ca^{++} 依存性代謝調節の大きいことと深く関係していることが示唆される。

文 献

- 1) Nishizuka, Y. *Science* **225**, 1365-1370, 1984
- 2) Berridge, M. J. *Biochem. J.* **220**, 345-360, 1984
- 3) 田中利男, 布木和夫, 日高弘義, 蛋白質核酸 酵素, **31**, 1807-1817, 1986
- 4) Kakiuchi, S., Yamazaki, R. and Nakajima, H. *Proc. Japan Acad.*, **46**, 587, 1970.
- 5) Manalan, A. S. and Klee, C. B. *Adv. Cyclic. Nucl. Prot. Phosph. Res.* **18**, 227-278, 1984
- 6) Nishizuka, Y. *Nature* **308**, 693-698, 1984.
- 7) Geisow, M. J. and Walker, J. H. *TIBS* **11**, 420-423, 1986
- 8) Sato, E. F., Morimoto, Y. M., Matsuno, T. Miyahara, M. and Utsumi, K. *FEBS Lett.* **214**, 181-186, 1987
- 9) Laemmli, U. K. *Nature* **227**, 180-185, 1970.
- 10) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354, 1974.
- 11) Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S. *J. Biochem (Tokyo)* **95**, 511-519. 1984.
- 12) Waisman, D. M., Tokuda, M., Morys, S., Buckland, L. T. and Clark, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 1138-1144, 1985
- 13) Waisman, D. M., Muranyi, J. and Ahmeb, M. *FEBS Lett.* **164**, 80-84, 1983
- 14) Pallen, C. J., and Wang, J. H. *J. Biol. Chem.* **258**, 8550-8553, 1983

(昭和62年8月7日受理)