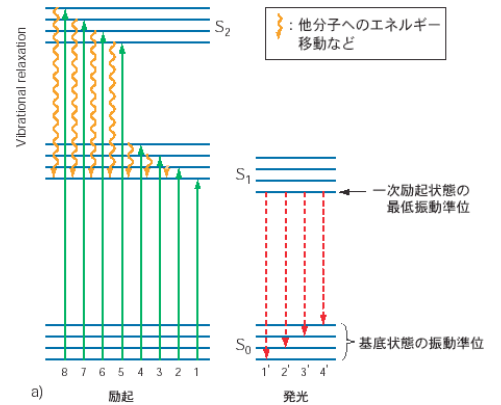


# 血管平滑筋の収縮：実習の背景

## 1. Fura-2 カルシウム蛍光測定法

### (1) 蛍光

- 励起光のエネルギーを吸収して励起状態に移行した蛍光物質が、基底状態に戻る際に放出する光を蛍光という。
- 蛍光の波長は必ず励起光の波長よりも長い。  
励起スペクトラムと蛍光スペクトラムのピーク波長の変化を Stokes shift と呼ぶ。

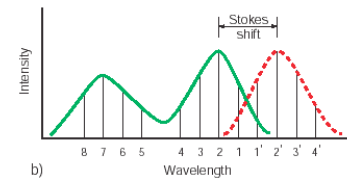


### (2) Ca<sup>2+</sup>指示蛍光色素と Fura-2

<特徴>

Ca<sup>2+</sup>キレート剤 (BAPTA) の構造に蛍光物質としての性質を持つ化学構造を加えた物質。

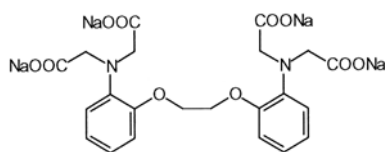
- ① Ca<sup>2+</sup>との結合は可逆的に起こる。  
⇒ Ca<sup>2+</sup>濃度変化の経時的な観察が可能となる。
- ② Ca<sup>2+</sup>濃度に応じて蛍光強度が変化する。  
[Ca<sup>2+</sup>との解離定数 (Kd 値) Fura-2 : 224 nM]。  
⇒ 測定対象の Ca<sup>2+</sup>濃度領域に適した Kd 値を有する蛍光試薬を選択する。
- ③ 蛍光比測定 (Ratiometry)。Fura-2 は、カルシウム濃度に応じて励起スペクトラムのピーク波長が移動する性質を持つ。カルシウム濃度が上昇すると、340nm 励起による蛍光強度 (F340) は増加し、380nm 励起による蛍光強度 (F380) は低下する。  
⇒ F340/F380 の蛍光強度の比を測定することで、蛍光色素の濃度変化、褪色、標本の動きによるアーチファクトを相殺できる。



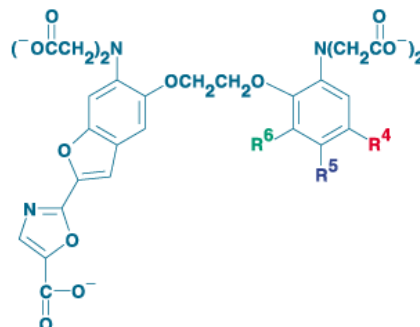
### (3) 細胞内への Fura-2 の導入：AM(アセトキシメチル)法

- Ca<sup>2+</sup>キレート剤として機能する Fura-2 は電解し、マイナス荷電しているために、細胞膜を透過しない。
- カルボキシル基にアセトキシメチル基 (AM 基) をエステル結合させて脂溶性を高めた Fura-2/AM は細胞膜を透過する。
- 細胞内に導入された Fura-2/AM は細胞質でエステラーゼの作用を受け、AM 基が加水分解により除去されて Fura-2 に変換される。Fura-2 になると細胞膜を透過しないので、細胞質に留まる。

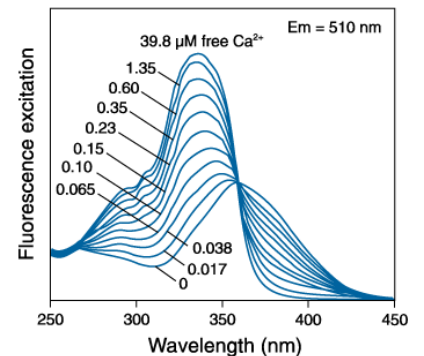
カルシウムキレート剤 BAPTA



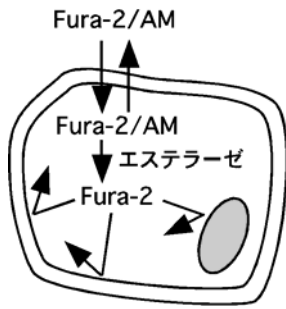
Fura-2 (R4=H; R5=CH<sub>3</sub>; R6=H)



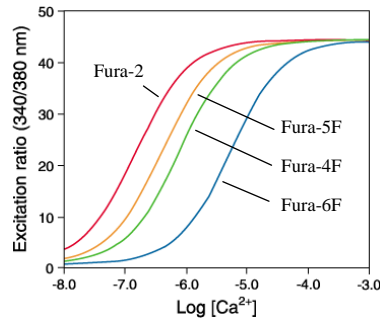
Fura-2 の励起スペクトラム



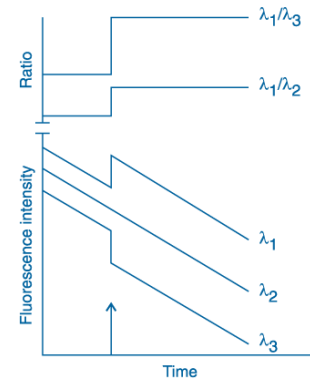
AM 法による Fura-2 負荷



Fura シリーズ : Kd 値

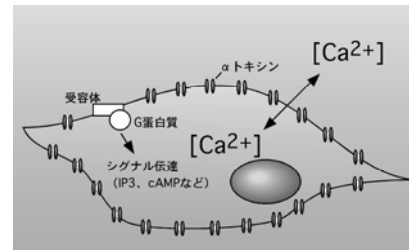
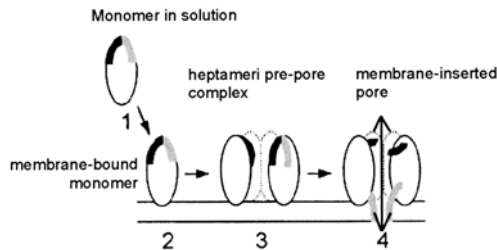


Fura-2 Ratiometry



2. α トキシン脱膜化標本

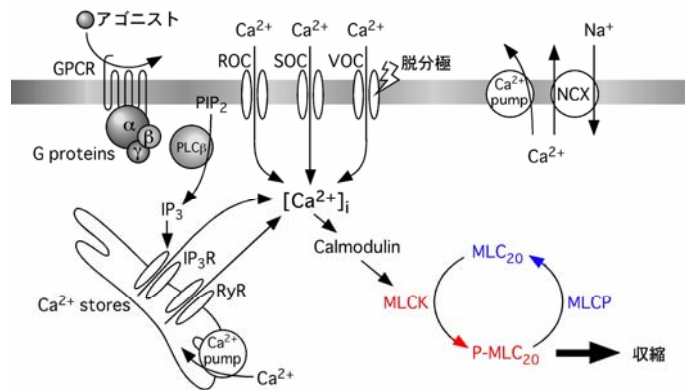
α トキシンは、分子量 33kDa の黄色ブドウ球菌の外毒素（溶血毒）。モノマーで膜に結合し、細胞膜で 7 量体を形成して、細胞膜に孔を形成する。おおよそ分子量 1000 以下の低分子（イオン、ATP、GTP など）は孔を透過できる（多くの蛋白質は透過できない）。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を固定することができる。受容体以下のシグナル伝達系は保存されているのが特徴。



3. 平滑筋収縮調節機序

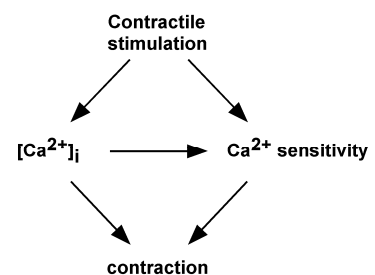
(1)  $Ca^{2+}$  依存性収縮機構

血管平滑筋細胞に収縮刺激を与えると、細胞内貯蔵部からの  $Ca^{2+}$  放出、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入により、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度が上昇する ( $Ca^{2+}$  シグナルの発生)。平滑筋収縮においては、 $Ca^{2+}$  シグナルはカルモジュリンと呼ばれる蛋白質により受容される。 $Ca^{2+}$  と結合したカルモジュリンはミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK: myosin light chain kinase) を活性化し、20 kDa ミオシン軽鎖の Ser19 がリン酸化される。その結果、ミオシン ATPase 活性が上昇し、アクチンとミオシンの相互作用が生じ、平滑筋は収縮する。収縮刺激が止むと、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度が低下し、MLC) の活性が低下する。相対的にミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP: myosin light chain phosphatase) の活性が優位となり、ミオシン軽鎖は脱リン酸化され、平滑筋は弛緩する。つまり、『平滑筋収縮は、 $Ca^{2+}$  依存性に、ミオシンの可逆的リン酸化反応によって調節される。』



(2) 収縮装置の  $Ca^{2+}$  感受性変化

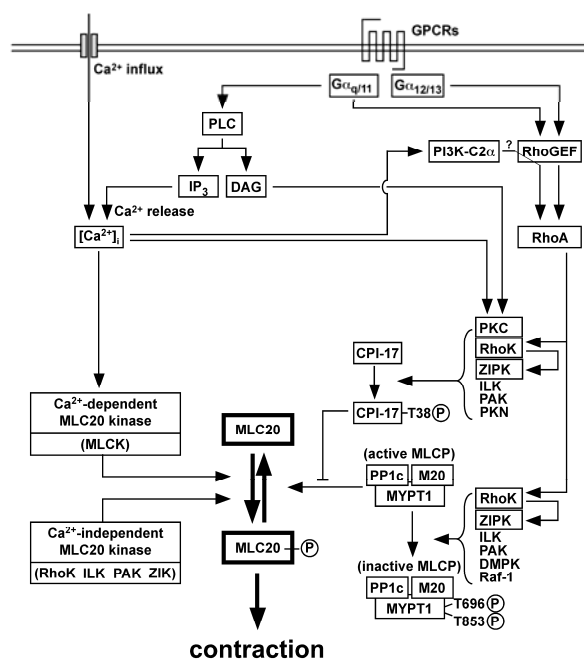
血管平滑筋において細胞質  $Ca^{2+}$  濃度と発生張力の量的関係は収縮刺激の種類によって異なる。例えば、G タンパク質共役型受容体の刺激は、 $Ca^{2+}$  濃度上昇が同じ程度の場合、脱分極刺激と比べてより大きな収縮を



引き起こす。この現象を、平滑筋収縮装置の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の増大 ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization) と呼ぶ。すなわち、『平滑筋の収縮は、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルと収縮装置の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の2重調節を受ける。』

### (3) $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の調節

ミオシン軽鎖リン酸化の程度は、リン酸化酵素 (MLCK) と脱リン酸化酵素 (MLCP) のバランスによって決定される。MLCK は  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによって制御される酵素である。従って、収縮装置の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の調節においては、MLCP の活性調節がより重要な役割を果たす。この酵素活性が低下すれば、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性は増大する。MLCP は、触媒サブユニット PP1c (Type 1 protein phosphatase catalytic subunit) と2つの非触媒サブユニット MYPT1 (myosin phosphatase target subunit-1) と M20 の3つの蛋白質からなる。酵素活性は、(1) MYPT1 のリン酸化による抑制、(2) 1型脱リン酸化酵素阻害蛋白質 (CPI-17: 17-kDa PKC-potentiated inhibitory protein of type 1 protein phosphatase) による抑制を受ける。CPI-17 は、リン酸化されることによって、脱リン酸化酵素阻害蛋白質として機能する。MYPT1 及び CPI-17 のリン酸化には多くの蛋白質リン酸化酵素が関与する。MYPT1 のリン酸化には主に Rho キナーゼが関与し、CPI-17 のリン酸化には主にプロテインキナーゼC (PKC) と Rho キナーゼが関与する。受容体刺激により Rho キナーゼや PKC が活性化されて、MLCP 活性が抑制され、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性は亢進する。



Hirano. *J Pharmacol Sci* 104, 109-115, 2007

### (4) 血管弛緩薬の作用

高血圧治療薬として用いられる  $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬 ( $\text{Ca}^{2+}$ ブロッカー) は、L型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに作用し、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入を阻害する。細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を低下させ、血管を弛緩させると考えられる。収縮装置の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に対する影響は少ない。

血管運動神経には、①交感神経性血管収縮神経 (sympathetic vasoconstrictor)、②交感神経性血管拡張神経 (sympathetic vasodilator)、③副交感神経性血管拡張神経 (parasympathetic vasodilator) が知られている。交感神経性血管収縮神経の末端から放出されたノルアドレナリンは、 $\alpha$ アドレナリン受容体に作用し、細胞質カルシウム濃度を上昇させ、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を亢進させて、血管平滑筋を収縮させる。副交感神経性血管拡張神経から放出されたアセチルコリンは内皮細胞のムスカリン受容体に作用し、内皮細胞から血管物質 (主にNO) を産生させ、血管を拡張させる。交感神経性血管拡張神経は、骨格筋を灌流する血管を支配するものが主である。神経伝達物質は不明である。アセチルコリンが関与すると考えられているが、部位によってはノルアドレナリンが関与することもある。血管平滑筋に  $\beta$ アドレナリン受容体 (血管平滑筋の場合主に  $\beta_2$ ) が多く発現していると交感神経の興奮により  $\beta$ 受容体が活性化され、 $G_{\text{as}}$ を介してアデニル酸シクラーゼが活性化される。その結果、細胞内cAMP濃度が上昇し、主にAキナーゼ (cAMP-dependent protein kinase; PKA) が活性化されて、血管平滑筋は弛緩する。冠動脈や骨格筋の血管は  $\beta$ アドレナリン受容体が多く発現する。

ニトログリセリン、ニトロプルシドなどのニトロ化合物はNOを遊離し、平滑筋弛緩作用を発揮する。NOは平滑筋細胞内に透過し、可溶性分画にあるグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMPを産生させる。cGMPは主にGキナーゼ (cGMP-dependent protein kinase; PKG) を活性化し、血管平滑筋を弛緩させる。この弛緩機序は、NOを介した内皮依存性血管弛緩反応でも作用する。

#### 4. Ca<sup>2+</sup>-EGTA buffer

細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度レベル (μM オーダー以下) の遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度を含む溶液を作製するためには、容器や試料などからの Ca<sup>2+</sup>の混入の影響を除く必要がある。このために、十分に高濃度の Ca<sup>2+</sup>キレート剤を含む溶液に適量の Ca<sup>2+</sup>を加えることにより、設定した遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度を安定に保つことが可能となる。

$$\text{EGTA} + \text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{EGTA} \cdot \text{Ca}^{2+}$$

$$K_a = \frac{[\text{EGTA} \cdot \text{Ca}^{2+}]}{[\text{EGTA}] \cdot [\text{Ca}^{2+}]}$$

Buffer 中の総 EGTA 濃度 (E<sub>T</sub>) は一定 (10 mM) の時、ある遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度 (C<sub>F</sub>) を得るためには、総 Ca<sup>2+</sup>濃度 (C<sub>T</sub>) をいくらに設定すべきかを知りたい。

[EGTA · Ca<sup>2+</sup>]: EGTA と Ca<sup>2+</sup>の錯体濃度(M)  
 [Ca<sup>2+</sup>]: 遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度(M) → [Ca<sup>2+</sup>] = C<sub>F</sub> とする。  
 [Ca<sup>2+</sup>] + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>]: 総 Ca<sup>2+</sup>濃度(M) → [Ca<sup>2+</sup>] + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] = C<sub>T</sub> とする。  
 [EGTA] + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>]: 総 EGTA 濃度(M) → [EGTA] + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] = E<sub>T</sub> とする。

C<sub>T</sub> = C<sub>F</sub> + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] → [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] = C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>  
 E<sub>T</sub> = [EGTA] + [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] → [EGTA] = E<sub>T</sub> - [EGTA · Ca<sup>2+</sup>]  
 → [EGTA] = E<sub>T</sub> - (C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>)

K<sub>a</sub> = [EGTA · Ca<sup>2+</sup>] / [EGTA] · C<sub>F</sub>  
 K<sub>a</sub> = (C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>) / {E<sub>T</sub> - (C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>)} · C<sub>F</sub>  
 K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub> · (E<sub>T</sub> - C<sub>T</sub> + C<sub>F</sub>) = C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>  
 K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub> · E<sub>T</sub> - K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub> · C<sub>T</sub> + K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub><sup>2</sup> = C<sub>T</sub> - C<sub>F</sub>  
 (1 + K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub>) · C<sub>T</sub> = K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub> · E<sub>T</sub> + (1 + K<sub>a</sub> · C<sub>F</sub>) · C<sub>F</sub>

$$C_T = C_F + K_a \cdot C_F \cdot E_T / (1 + K_a \cdot C_F)$$

C<sub>T</sub> = C mM (C x 10<sup>-3</sup> M),      C<sub>F</sub> = F μM (F x 10<sup>-6</sup> M),  
 E<sub>T</sub> = E mM (E x 10<sup>-3</sup> M),      K<sub>a</sub> = 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>

C x 10<sup>-3</sup> = F · 10<sup>-6</sup> + 10<sup>6</sup> · (F · 10<sup>-6</sup>) · E · 10<sup>-3</sup> / (1 + 10<sup>6</sup> · F · 10<sup>-6</sup>)  
 C x 10<sup>-3</sup> = F · 10<sup>-6</sup> + F · E · 10<sup>-3</sup> / (1 + F)

↓

$$C = F \cdot 10^{-3} + FE/(1 + F)$$

緩衝液中の総 EGTA 濃度 (E<sub>T</sub>) を 10 mM (E = 10) とすると、

$$C = F \cdot 10^{-3} + 10F/(1 + F)$$

総 Ca<sup>2+</sup>濃度 = C mM、遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度 = F μM

総 EGTA, 10 mM を含む緩衝液で目的の遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度を得るに必要な総 Ca<sup>2+</sup>濃度

Free [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (F)	Total [Ca <sup>2+</sup> ] for 10 mM EGTA in final solution (C)
1 x 10 <sup>-7</sup> M (pCa 7.0)	0.91 mM
3 x 10 <sup>-7</sup> M (pCa 6.5)	2.31 mM
5 x 10 <sup>-7</sup> M (pCa 6.3)	3.33 mM
1 x 10 <sup>-6</sup> M (pCa 6.0)	5.00 mM
3 x 10 <sup>-6</sup> M (pCa 5.5)	7.50 mM
1 x 10 <sup>-5</sup> M (pCa 5.0)	9.10 mM
1 x 10 <sup>-4</sup> M (pCa 4.0)	10.00 mM

