



Calcium-induced changes in chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor

メタデータ	<p>言語: Japanese</p> <p>出版者: 浜松医科大学</p> <p>公開日: 2014-10-31</p> <p>キーワード (Ja):</p> <p>キーワード (En):</p> <p>作成者: 増井, 真由美</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	http://hdl.handle.net/10271/1626

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 349号	学位授与年月日	平成13年10月 5日
氏 名	増 井 眞由美		
論文題目	<p>Calcium-induced changes in chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor (尿中トリプシンインヒビターのコンドロイチン硫酸鎖におけるカルシウムによる変化)</p>		

博士(医学) 増 井 眞由美

論文題目

Calcium-induced changes in chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor

(尿中トリプシンインヒビターのコンドロイチン硫酸鎖におけるカルシウムによる変化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

尿中トリプシンインヒビター(urinary trypsin inhibitor, UTI)は、プロテアーゼインヒビター以外にいくつかの作用を持つことが知られているが、その1つに平滑筋収縮抑制作用がある。我々は以前、UTIの血管平滑筋収縮抑制作用がカルシウムイオンの細胞内流入抑制によることを見出し、UTIのコンドロイチン硫酸鎖がそれに関わっていることを示唆する実験結果を得た。これに基づき、UTIのコンドロイチン硫酸鎖とカルシウムイオンとの相互作用をさらに明らかにすることを目的として、プロトン核磁気共鳴($^1\text{H-NMR}$)を用いた実験を行った。

[材料ならびに方法]

1) $^1\text{H-NMR}$ による1次元スペクトルの測定

高純度精製 UTI 18.2mg を重水0.57ml に溶解し(1.3mM)、これに塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウムの各溶液を加え、添加された陽イオンが試料中で等モル濃度となるように調製した(10、20、40mM Ca^{2+} または Mg^{2+} 、および20、40、80mM Na^+)。基準物質として3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3- d_4 (98atom%D)を混合した。各試料を $^1\text{H-NMR}$ 測定装置(GSX270WB、6.35Tesla、日本電子社製)を用い、緩和時間(T_1)は inversion recovery 法(共鳴周波数; 270MHz、90度パルス幅; 10.7 μs 、積算回数; 16、プローブ設定温度; 343K)にて測定し1次元スペクトル群を得た。これを経時的に行い(陽イオン投与前、投与後30、60、120、180、240、300分)各陽イオン投与前後におけるコンドロイチン硫酸鎖領域のスペクトルの変化を比較検討した。

2) T_1 値の測定

1)で得られた1次元スペクトルと既知のコンドロイチン硫酸のスペクトルとの比較検討から、その由来するプロトンが同定された4つのシグナルについて T_1 値の測定を行い、陽イオン添加による影響について検討した。各シグナルの化学シフト(ppm)およびその由来するプロトンは以下の通りである。

(Gal; galactose, GalNAc; N-acetylgalactosamine)

4.75ppm; GalNAc(4SO₃)H-4

4.62ppm; コア蛋白への架橋領域内またはその隣接領域の GalH-1および GalNAc(4SO₃)H-4

4.02ppm; GalNAc(4SO₃)H-2および H-3

3.98ppm; GalNAcH-2

3) 生理的ナトリウムイオン濃度下(140 mM)におけるカルシウムイオンの影響

40 mM カルシウムイオン添加前に、あらかじめ試料に140 mM となるようナトリウムイオンを添加しておき1)、2)同様の実験を行った。

〔結果〕

1) 1次元スペクトルの変化

UTIのコンドロイチン硫酸鎖に由来する3.58から4.75ppmの領域のスペクトルは、カルシウムイオン添加により低磁場側へシフトした。特に4.00 ppm 付近のシグナルは濃度依存的に著明に平坦化した。ナトリウムイオン添加では同様の変化は認めず、マグネシウムイオンでは40 mM 添加で変化をみたものの、その程度は20 mM のカルシウムと同等であった。また、4.62 ppm のシグナルは陽イオン添加の有無にかかわらず徐々に平坦化したが、カルシウムイオンにより低濃度でより早く平坦化した。

2) T₁値の変化

T₁値は陽イオン添加の有無にかかわらず経時的に低下した。各測定時間における UTI のみの試料の T₁値との比較で有意差をみた。その結果、ナトリウムおよびマグネシウムイオンでは各濃度において有意な T₁値低下を認めなかった。カルシウムイオンにおいては4.75および4.62 ppm のシグナルでは有意な低下はなかったが、4.02および3.98 ppmのシグナルでは有意な低下を認めた。また、4.62 ppmのシグナルは40 mM カルシウムイオンにより添加30分後には既に平坦化していたため、T₁値の測定が不可能であった。

3) 140 mM ナトリウムイオンの影響

上記カルシウムイオンによるスペクトルの変化(低磁場側へのシフトおよびシグナルの平坦化)や T₁値の低下は140 mM ナトリウムイオン濃度下では認めなくなり、UTI のみの試料の場合とはほぼ同様の結果となった。

〔考察〕

NMR スペクトルのシフトおよび平坦化はその部位に何らかの立体構造変化が生じたことを、さらに T₁値の低下は分子運動がより制限される状態に変化したことを示唆している。今回の結果からは、単に陽イオンの結合による変化ではなくカルシウムイオンによる特異的な化学構造変化が生じていると考えられる。従来、カルシウムイオンが炭水化物中の陰イオンと相互作用してキレート状になったり、それらの分子がクラスターを形成しゲル化することや、ヘパリンや軟骨中のコンドロイチン硫酸など糖鎖とカルシウムイオンとの相互作用についても知られている。今回、UTI という一種のプロテオグリカンにおいてもカルシウムをキレートするコンドロイチン硫酸の特性が保持されていること、さらに T₁値低下から分子運動制限、すなわち分子のクラスター化、ゲル化が生じていることが判明した。他の陽イオンでは同様の反応が生じなかったことより、UTI 分子内よりは UTI 分子間のコンドロイチン硫酸鎖がカルシウムイオンを介して結合していると考えられる。ナトリウムイオンの生理的濃度下でそれらが阻害されることは、循環血液中ではなく炎症などイオンバランスの崩れた局所の場面で UTI が作用することに関係するかもしれない。UTI の細胞内カルシウム流入抑制機構は不明であったが、これらの結果から、UTI が細胞膜上でカルシウムイオンを介してゲル化し、細胞内カルシウム濃度を調節している可能性が示唆された。

〔結論〕

UTI のコンドロイチン硫酸鎖の¹H-NMR 1次元スペクトルは、カルシウムイオンにより3.58から4.75 ppm 領域が低磁場側へシフトし、4.62、4.02、3.98 ppm のシグナルの著明な平坦化を伴っていた。有意な T₁値の低下は4.02、3.98 ppm のシグナルに認めた。同モル濃度のマグネシウム、ナトリウムイオンでは同様の変化を認めず、140 mM ナトリウムイオンはカルシウムイオンの作用を阻害した。

カルシウムイオンは一種のキレート物質として UTI 分子間でコンドロイチン硫酸鎖を結合させ、細胞膜上にゲル状物質を形成するとともに、カルシウムイオンをトラップし細胞低カルシウム濃度調節に関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者らは、尿中トリプシンインヒビター (urinary trypsin inhibitor; UTI) のコンドロイチン硫酸鎖へのカルシウム結合による構造変化を解析するために、プロトン核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) を用いて以下のような実験を行った。

〔はじめに〕

UTI は二つの carbohydrate side chain (O-glycoside & N-glycoside) を有し、その内の一つ (O-glycoside) はコンドロイチン硫酸鎖である。UTI はプロテアーゼインヒビター活性以外に様々な生理的機能を有している。申請者等の教室では、UTI がカルシウムイオンの細胞内流入を抑制して血管平滑筋収縮を抑制すること、更にこれにコンドロイチン硫酸鎖が必須であることを示した。これに基づき、UTI のコンドロイチン硫酸鎖とカルシウムイオンの結合と、それに伴う局所の構造変化を $^1\text{H-NMR}$ を用いて解析した。

〔材料並びに方法〕

1) $^1\text{H-NMR}$ による 1 次元スペクトルの測定

高純度精製 UTI 18.2 mg を重水 0.57 ml に溶解し (1.3 mM)、試料とした。これに塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウムの各溶液を加え、種々濃度の陽イオン (10、20、40 mM Ca^{2+} または Mg^{2+} 、および 20、40、80 mM Na^+) を含む試料を調製した。基準物質として 3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-2, 2, 3, 3- d_4 (98 atom % D) を混合した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定装置 (GSX270WB、6.35 Tesla、日本電子社製) を用い、緩和時間 (T_1) は inversion recovery 法 (共鳴周波数; 270 MHz、90 度パルス幅; 10.7 μs 、積算回数; 16、プローブ温度; 343 K) にて測定し 1 次元スペクトル群を得た。また、経時的 (陽イオン添加前、添加後 30、60、120、180、240 及び 300 分) に各試料を測定し、コンドロイチン硫酸鎖領域のスペクトルの変化を比較検討した。

2) 緩和時間 (T_1 値) の測定

1) で得られた 1 次元スペクトルの既知のコンドロイチン硫酸のスペクトルとの比較検討から、その由来するプロトンが同定された 4 つのシグナルについて T_1 値の測定し、陽イオン添加による影響を検討した。

3) 生理的ナトリウムイオン濃度下 (140 mM) におけるカルシウムイオンの影響

40 mM カルシウムイオン添加前に、あらかじめ試料に 140 mM となるようナトリウムイオンを添加しておき 1)、2) 同様の実験を行った。

〔結果〕

1) 1 次元スペクトルの変化

UTI のコンドロイチン硫酸鎖に由来する 3.58 から 4.75 ppm の領域のスペクトルは、カルシウムイオン添加により低磁場側へシフトした。特に 4.00 ppm 付近 (4.02 ppm : GalNAc(4SO₃)H-2 および H₃、

3.98ppm : GalNAcH-2)のシグナルは濃度依存的に平坦化した。ナトリウムイオンでは同様の変化は認めず、マグネシウムイオンでは40mM 添加で変化を認めたものの、その程度は小さく、20mM のカルシウムイオンによる変化と同程度であった。また、4.62ppm のシグナル(コア蛋白への架橋領域内またはその隣接領域の GalH-1及び GalNAc(4SO₃)H-4)は陽イオン添加の有無に関わらず経時的に平坦化した。低濃度のカルシウムの添加によってより早く平坦化した。

2) T₁値の変化

4.02ppm および3.98ppm の T₁値はカルシウムイオン添加により有意に低下した。しかし、4.75ppm 及び4.62ppm では有意な低下は認められなかった。

3) 140mM ナトリウムイオンの影響

上記カルシウムイオンによるスペクトルの変化(低磁場側へのシフトおよびシグナルの平坦化)や T₁ 値の低下は140mM ナトリウムイオン存在下では認めず、カルシウムイオン非存在時とほぼ同じ結果が得られた。

〔結論〕

申請者らはこれらをまとめて、1)UTI のコンドロイチン硫酸鎖にカルシウムイオンが結合し、同部位の立体構造が変化すること。2)これに伴い同部位の分子運動が制限されること、を示した。これより UTI はコンドロイチン硫酸鎖でカルシウムイオンをキレートし、細胞膜上にゲル状物質を形成し、局所のカルシウム濃度調節に関わっている可能性を示した。しかし約140mM のナトリウムイオンが存在するとこれらの変化は小さく、血漿中ではこれらの反応は起こらず炎症など局所のイオンバランスが崩れた病態でのみ機能するものと考えられた。

審査委員会では、UTI の細胞内カルシウムイオン流入阻害機能に着目し、コンドロイチン硫酸鎖によるカルシウムイオンキレート作用を立体構造の変化から証明しえた点を高く評価した。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) 化学シフト、緩和時間の短縮の意味合い
- 2) 緩和時間、T₁と T₂の意味合いの違い
- 3) 陽イオン非添加時の T₁値の変化の意味合い
- 4) プローベ設定温度の妥当性
- 5) UTI の高次構造の変化に及ぼすカルシウムイオン、マグネシウムイオン及びナトリウムイオンの影響の違い
- 6) 化学シフト、緩和時間の短縮から得られたカルシウムイオンの結合定数はいくらか
- 7) 他の血漿蛋白でのカルシウムイオンによる NMR signal の変化は
- 8) 試料管の中でのカルシウムイオンの分布は一定か
- 9) 一分子の UTI のカルシウムイオンの結合量
- 10) どのような高次構造の変化が考えられるか
- 11) UTI の母蛋白である Inter α trypsin inhibitor (ITI) のカルシウムイオン結合能
- 12) ITI から UTI への変換の機構
- 13) ITI の産生臓器

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野哲盟	
	副査	大橋京一	副査 堀内健太郎