

シリーズ「細胞内 Ca イオン濃度の光学的測定法」

細胞内カルシウムイオン濃度測定のための Ca<sup>2+</sup> 指示薬の基礎

小川 靖 男・呉 林 なごみ

(順天堂大学・医学部・薬理学教室)

筋収縮を始め、伝達物質やホルモンなど生理的活性物質の分泌、種々の酵素活性、膜電位の変化など多くの生物活性が細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度により調節されていることが明らかにされている<sup>2,8)</sup>。その調節機構を明らかにするためには機能変化と細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化とについてその時間経過を定量的に測定することが必須である。既に細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度測定法に関連した総説がいくつか発表されている<sup>9,23,24,38)</sup>。本稿では基本的な重要事項については重複を厭わず述べるとともに、現在使用されている指示薬につき最近明らかとなったその特質、注意すべき点について力点を置いて述べる。併せて光学的測定法にかかわる注意すべき点についても述べる。最近、いわゆる蛍光性 Ca<sup>2+</sup> 指示薬を用いて、蛍光測光法のみならず、吸光度測光法を併用して定量性を改善する方法が開発されているので、その方法についても述べる。

1. Ca<sup>2+</sup> 指示薬を用いる細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度測定法の原理

Ca<sup>2+</sup> 指示薬を用いた Ca<sup>2+</sup> 測定法とは、指示薬 D が Ca<sup>2+</sup> と結合して CaD (今簡単のため 1:1 の stoichiometry を仮定する) となると吸収スペクトルなどの光学的性質が変化することを利用して Ca 量を求める方法である。この場合実験条件、方法により求まる Ca 量は全 Ca 量 (Ca<sub>T</sub>) である場合もあるし、遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度である場合もある。指示薬を用いた従来の化学的 Ca<sup>2+</sup> 測定法は全 Ca 量のほとんどを CaD としてトラップし [CaD] (CaD の濃度) を測定するいわゆる全 Ca 量 (Ca<sub>T</sub>) の測定である。それに対し細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度測定は遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定であり、以下に述べる特殊性がある。即ち

細胞内 Ca<sup>2+</sup> は細胞内 Ca 結合部位 R と式(1)で表される関係にある (R はトロポニン C, カルモジュリン, Ca-ATPase などの Ca 受容蛋白を表わす。実際は Ca<sup>2+</sup> と R との反応ももっと複雑であり、また CaR の形成されたあと連続して起る複数段の可逆的、不可逆的の反応を経て生体反応につながると考えられる。また R は一種類である筈はなく、多種類の生体内 Ca<sup>2+</sup> 結合部位を R と便宜上表記しているに過ぎない)。



$$K_{D(R)} = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{R}] / [\text{CaR}]$$

式(1)が成立している細胞内に指示薬 D を加え



$$K_{D(D)} = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{D}] / [\text{CaD}]$$

式(2)による式(1)の関係への影響が無視できる条件下で [CaD] を測定しなければならない。

結合部位 R のみかけの解離定数 K'<sub>D(R)</sub> は以下のように求められる。

$$[\text{Ca}_T] = [\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaR}] + [\text{CaD}]$$

であるから

$$\begin{aligned} K'_{D(R)} &= \frac{([\text{Ca}_T] - [\text{CaR}]) [\text{R}]}{[\text{CaR}]} \\ &= \frac{[\text{R}]}{[\text{CaR}]} ([\text{Ca}^{2+}] + [\text{CaD}]) \\ &= \frac{[\text{R}]}{[\text{CaR}]} \left[ 1 + \frac{[\text{CaD}]}{[\text{Ca}^{2+}]} \right] \\ &= K_{D(R)} \left( 1 + \frac{[\text{D}]}{K_{D(D)}} \right) \end{aligned}$$

$$K_{D(D)} \gg [\text{Ca}^{2+}] \text{ ならば } [\text{D}] \approx [\text{D}_T]$$

であるから

$$K'_{D(R)} \approx K_{D(R)} \left( 1 + \frac{[\text{D}_T]}{K_{D(D)}} \right)$$

$K_{D(D)} \gg [D_T]$  ならば  $K'_{D(R)} = K_{D(R)}$  となる。この条件は式(2)の平衡が大きく左方に偏っている条件と同じである。またDのみかけの解離定数  $K'_{D(D)}$  は  $K_{D(D)} (1 + [CaR] / [Ca^{2+}])$  となる。即ち  $[Ca^{2+}] \ll K'_{D(D)}$  かつ  $[D_T] \ll K'_{D(D)}$  ならば式(2)の影響は平衡状態では先ず無視できよう。無視できなくなるといわゆる「Ca<sup>2+</sup> 緩衝作用」があることになる。

多方面からの研究により細胞質のイオン環境 (イオン強度は0.15~0.17で K<sup>+</sup> が主なカチオン, pH 中性附近, 遊離 [Mg<sup>2+</sup>] は横紋筋で~1 mM, 平滑筋, 非筋細胞で~0.5 mM<sup>39)</sup>) 下で式(1)の [Ca<sup>2+</sup>] は静止時が~0.1 μM, 活性時 1~10 μM と推定されている<sup>13)</sup>。金属指示薬はキレート剤の一種であり, Mg<sup>2+</sup> に対する親和性が Ca<sup>2+</sup> に対する親和性より高いか等しいものが多く, 中性附近で, mM オーダーの Mg<sup>2+</sup> 存在下に微量の Ca<sup>2+</sup> を測定できるものとしては当初は murexide しか知られていなかった<sup>43)</sup>。後述するように, murexide はかなり良い特性をもった指示薬であるが Ca<sup>2+</sup> 感度が低く, 使用に限界があった。その後 arsenazo III<sup>11)</sup>, antipyrilazo III<sup>48)</sup>, tetramethylmurexide<sup>42)</sup>, purpurate-3, 3'-diacetic acid (PDAA)<sup>18)</sup> などの吸光度測光による Ca<sup>2+</sup> 指示薬や quin 2, azo-1 などを始めとする一連の蛍光測光法にもとづく Ca<sup>2+</sup> 指示薬が開発され<sup>15,51,52)</sup>, 多方面で応用されてきた(図1)。その結果 Ca<sup>2+</sup> 指示薬として具備すべき条件も具体的に明らかになった。それを表1に列挙する。これと関連して, 最近明らかになった Ca<sup>2+</sup> 指示薬の物理化学的性質について表2にまとめた。

## 2. Ca<sup>2+</sup> 指示薬の必要条件について

表1に掲げてある項目について別の観点から以下に論じる。

### (i). Ca<sup>2+</sup> 感度と Ca<sup>2+</sup> 緩衝作用について

Ca<sup>2+</sup> 指示薬としては K<sub>D</sub> が大きく, 且つ [CaD] によるシグナル (差モル吸光係数または蛍光強度) が十分大きいものが望ましい。現在の指示薬の差モル吸光係数は高々 10<sup>4</sup>

表1 Ca<sup>2+</sup> 指示薬の必要条件

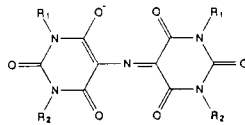
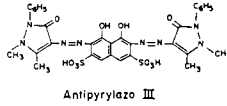
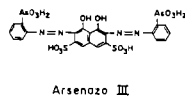
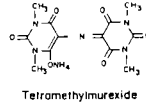
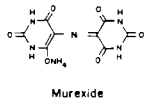
1. イオン強度0.15~0.17, 中性附近, 1 mM Mg <sup>2+</sup> 存在下で20~30ミリ秒以内に起る 0.1~数 μM またはそれ以上の Ca <sup>2+</sup> 濃度変化を忠実に追従できること。
2. いわゆる「Ca <sup>2+</sup> 緩衝作用」のないこと。
3. stoichiometry が単純なこと。1:1 が望ましい。
4. Ca <sup>2+</sup> との会合, 解離が充分速いこと。
5. 蛋白など細胞内高分子への結合が少ないこと。
6. 生体膜に不透過なこと。輸送されないこと。
7. 化学的に安定なこと。 photobleaching, photoisomerization などの変化を受けない。
8. 細胞内要素による光学的干渉を受けない。
9. pH, Mg <sup>2+</sup> の変化に insensitive であること。
10. 生体に対する有害作用がないこと。
11. 純品が得られやすいこと。
12. 水によく溶けること。

M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> のオーダーである。これでは骨格筋の Ca<sup>2+</sup> transient がようやく測定できる程度であり, もう一桁高いものが望まれる。これに対し, 蛍光指示薬は一般にシグナルが大きい。quin 2 に比べ fura-2 などがよく使われる主たる理由は蛍光強度が30倍程強いからである<sup>15)</sup>。

信号強度は指示薬の濃度を増すか K<sub>D</sub> を小さいものにすればよいが, 式(1)の系が式(2)により影響を受ける可能性が出てくる。例えば fura-2 を負荷してその細胞内濃度が 50 μM という記述に接するとカルモジュリン依存性反応は影響を受けることが予想される。なぜならカルモジュリンの細胞内含量は細胞の種類により異なるが, 最大の含有量を示す中枢神経細胞でも 50 μM 程度と推定され, また一方平滑筋では 30 μM 程度である<sup>13)</sup>。カルモジュリンの Ca<sup>2+</sup> 親和性は細胞質内では 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> (K<sub>D</sub> = 10 μM) 程度である。一方 fura-2 の K<sub>D</sub> は細胞質内では ~1 μM と推定される(表2参照)。後述するが fura-2 は蛋白と結合すると Ca<sup>2+</sup> との結合速度定数(k<sub>+</sub>), 解離速度定数(k<sub>-</sub>)いずれもが減少し, 大体カルモジュリンの値に近くなると推定される。以上の理由によりカルモジュリン依存性反応は大きく影響される筈である。

カエル骨格筋では筋小胞体からの Ca 遊離を

A. 吸光法



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, murexide  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, tetramethylmurexide  
 R<sub>1</sub> = H and R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>COOH; pur-  
 purate-3,3'diacetic acid (PDAA)

B. 蛍光法

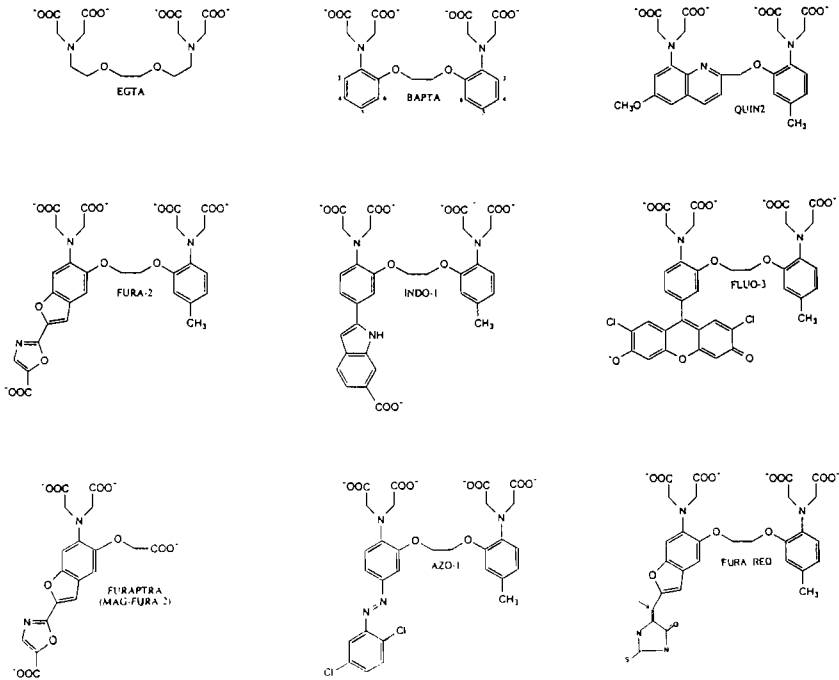


図1 現在使用されている主な Ca<sup>2+</sup> 指示薬の化学構造式。

研究する場合、意識して大量の指示薬存在下に放出された Ca 全量を CaD としてトラップし、[CaD] から放出 Ca 量を推定する方法がとられる (例えば文献45など)。カエル骨格筋筋小胞体は静止時の Ca 透過性は低く、[D] により Ca<sup>2+</sup> 濃度が低下したことによる Ca<sup>2+</sup> 漏出の可能性はないと思われるが、哺乳類骨格筋では静止時の Ca 透過性は高くなり、平滑筋、非筋細胞ではさらに高くなるので、この方法が利用できるか否か疑問である。

(ii). Ca<sup>2+</sup> 変化の時間経過の追跡

例えばカエル骨格筋筋線維の単収縮刺激時にみられる Ca<sup>2+</sup> transient を PDAA で観測した時の CaD の時間経過の半値巾は 10 ms 以下であるのに対し<sup>18,28)</sup>、fura-2 で測定したときのそれは約 60 ms であった<sup>5,27)</sup>。antipyrylazo III<sup>7,27,34)</sup> furaptra<sup>16,29,31)</sup> では時間経過が PDAA とほぼ同様に速いのに対し、arsenazo III<sup>33)</sup>、azo-1<sup>6)</sup>、fura-red<sup>31)</sup>、fluo-3<sup>16)</sup> では fura-2 と同様に著しく遷延している。時間経過が遅いのは指示薬の Ca<sup>2+</sup> の解離速度定数が小さいためである (表 2 参照)。

一般に 2 分子反応の最大の結合速度定数は H<sup>+</sup> と OH<sup>-</sup> との出会いのもので、 $1.4 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であるが、分子の大きさによる拡散定数の減少、溶媒の粘性、反応が起るために必要な立体配置を満足するような衝突でなければならない、電荷による影響などを考慮すると拡散律速反応の速度定数は  $5 \times 10^5 - 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  となる<sup>17)</sup>。表 2 に掲げてある Ca<sup>2+</sup> 指示薬の値はこの範囲に入る。従って高い Ca<sup>2+</sup> 親和性とは解離速度定数が小さいことを意味する。速い時間経過の Ca<sup>2+</sup> transient を忠実に追うためならば解離速度定数も大きいものでなければならない。低親和性の Ca<sup>2+</sup> 指示薬が良いことになる。Ca<sup>2+</sup> 感度という点からは低親和性というのは不利であるが、CaD のシグナルが充分大きければ、その不利を補う。

例えば平滑筋の収縮は遅いと云われるが、カルモジュリンの Ca 結合反応はトロポニン C のそれに匹敵する速さであることを念頭に入れて測定すべきである。

二つ以上の反応系が共存しているときの遷移状態の結果の解釈には慎重な考察が必要であ

表 2 遊離 Ca<sup>2+</sup> 測定に使われる Ca<sup>2+</sup> 指示薬

指示薬	横紋筋細胞内で結合している色素の割合 (%)	Stoichiometry Dye : Ca	K <sub>D</sub> (μM) in cuvette		Rate constant				文献
			蛋白(-)	蛋白(+)	in vitro		in vivo (推定値)		
					k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k (s <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k (s <sup>-1</sup> )	
<b>A. 吸光度測定法</b>									
1. Murexide (purpurate)系									
murexide		1:1	2000-4000		≥ 6 x 10 <sup>7</sup>	≥ 1.6 x 10 <sup>5</sup>			41-43.
tetramethylmurexide	27, 44-50	1:1	2000-3000		murexideと同様				14,28,32,41,42.
PDAA	19, 24-43	1:1	~1000		同上				18,28.
2. arsenazo III	73-90	1:1, 1:2 2:1, 2:2	≥ 20*			85*			7,11,12,33,41,44, 47.
3. antipyrylazo III	68-90	1:1, 1:2 2:1, 2:2	140-200*			~1000*			7,34,41,47,48.
<b>B. 蛍光測光法</b>									
4. azo-1 §	~90	1:1	3.7		4 x 10 <sup>8</sup>	1200		145	6,7,22,51.
5. quin 2		1:1	0.06-0.12						51,52.
6. fura-2 §	60-85	1:1	0.135-0.27	0.69-1.0	2.5-6.5x10 <sup>8</sup>	84-97	0.1-1x10 <sup>8</sup>	12-23	5,15,19,21,22,27, 30,45,52,53, 1,15,20,21,52.
7. indo-1	72	1:1	0.21-0.24	0.4-0.6	5-10x10 <sup>8</sup>	130			1,15,20,21,52.
8. furaptra §	42-51	1:1	44-53						29,46.
9. fura red §	70-84	1:1	0.36	1.0-1.6			1.9x10 <sup>7</sup>	19	10,31.
10. fluo-3 §	78	1:1	0.4-0.5	1.1-2.6			1.3x10 <sup>7</sup>	34	16,35.

§ : 蛍光指示薬であるが、吸光度測光法でも使用されている指示薬

\* : Dye : Ca = 1 : 1 と仮定した時のみかけの値

る。定常状態での Ca<sup>2+</sup> 分布は各反応系の K<sub>D</sub> とその成分の全量で決るが、遷移状態では各成分の速度で決る。例えば Ca<sup>2+</sup> は始めは低親和性だが速度の速い Ca 結合部位に結合し、それから高親和性だが速度が遅い Ca 結合部位へと移動し平衡状態で期待される分布に近付くことが起りうる。従って結果の正しい解釈のためには Ca<sup>2+</sup> transient のほかに Ca<sup>2+</sup> の脱着に伴う R 起源のシグナルも同時に観測することが望まれる。

### (iii). Calibration 溶液の選定—細胞要素への色素結合との関連

#### a). 蛋白を含まない溶液

pH, Mg<sup>2+</sup>, イオン強度の影響について検討することは当然である。しかし温度、主たる 1 価陽イオンの種類についても検討しておく必要がある。これらの影響は予想以上に大きい。特に主たる 1 価陽イオンは K<sup>+</sup> である場合が多いが、実験によっては Cs<sup>+</sup> など異なったイオン種を用いる場合がある。なるべく自分の実験系に近い溶液で検討する必要がある。

#### b). 蛋白を多く含む溶液

多くの指示薬が細胞要素に結合し、吸収スペクトル、蛍光スペクトルが変化することはよく知られている。このモデルとして何が適当かが問題である。Kurebayashi ら<sup>31)</sup> は in vitro で aldolase 55 mg/ml を加えると fura red の吸収スペクトルは red shift することを見出し、この効果はカエル骨格筋の可溶性画分を加えた場合も同様である。しかし fura red を注入した筋細胞の吸収スペクトルは in vitro での蛋白(−)のものに近かったと報告している。構造蛋白にも結合し、可溶性画分による red shift を相殺する blue shift が起ると考えられている。但し二色性がないことから構造蛋白への結合にしても一定の配向性はないようである。また Harkins ら<sup>16)</sup> は同様の実験で in situ での fluo-3 の吸収スペクトルは in vitro の (+ aldolase) の吸収スペクトルに似るが、差吸収スペクトルは (−aldolase) のものに似ること、また二色性吸収があることから筋線維中の配向性

のある構造に一定の配向をもって結合していることを示唆している。in situ での吸収スペクトル、蛍光スペクトルを検討することが望まれる。

指示薬が生体高分子に結合することによる影響のもう一つは Ca<sup>2+</sup> に対する K<sub>D</sub> 値の増加である。その機序は不明である。しかし溶液の粘性の変化<sup>30)</sup> や、蛋白と EGTA との相互作用によるものではない<sup>30,53)</sup>。この K<sub>D</sub> の変化は蛋白の種類にはよらず、in situ の値は in vitro の値の 4 ~ 5 倍になると推定される<sup>30,53)</sup>。indo-1<sup>1,20)</sup>、fura red<sup>31)</sup>、fluo-3<sup>16)</sup> でも同様の結果が報告されている。これらの指示薬を用いたときの Ca シグナル ([CaD]) の時間経過を Ca<sup>2+</sup> transient の時間経過 (PDAA, furaptra, antipyrilazo III などの [CaD] から換算した値) から説明するために computer simulation により各指示薬の k<sub>+</sub>, k<sub>-</sub> を求め、K<sub>D</sub> を算出すると in vitro で求めた蛋白存在下の K<sub>D</sub> に近似した値が得られることから、k<sub>+</sub>, k<sub>-</sub> いずれもが減少していると考えられる(表 2 参照)。表 2 の推定値は fura-2 を負荷したほかの細胞での多くの実験結果を考えても首肯できる値である。しかしあくまでも推定値であり、実測値ではない。

生体高分子への結合が低いのは murexide 系以外では furaptra のみである。しかし furaptra も単収縮時の Δ[Ca<sup>2+</sup>] が PDAA のものより 30%低い<sup>29)</sup>。

#### (iv). stoichiometry

1 : 1 の stoichiometry が望ましい。そうならば K<sub>D</sub> ≫ [Ca<sup>2+</sup>] では吸光度は [Ca<sup>2+</sup>] に比例すると考えられるので解析が容易である。arsenazo III<sup>41,44,47)</sup>、antipyrilazo III<sup>41,47)</sup> のように stoichiometry が複雑なものでは [Ca<sup>2+</sup>]、指示薬の濃度などにより種々の分子種が共存することになり、結果の解析が困難となる場合が多い。

#### (v). 生体膜に対し不透過なこと

tetramethylmurexide はメチル基が 4 つあるため疎水性が高く、筋小胞体内にも入り、小胞体内の高濃度の Ca<sup>2+</sup> とも反応し、シグナルを

出すため見かけ上誤った情報を伝えることになる<sup>41)</sup>。それが cut fiber<sup>32)</sup> や intact fiber<sup>28)</sup> でも認められる。また細胞外へ漏出することも考えられる。fura-2 も細胞外漏出が報告されている<sup>9)</sup>。従って生体膜に不透過性であることも必要な条件である。一方、細胞内注入するためには微小注入法によらなければならず、よく水にとけることが望ましい条件にもなる。

fura-2 などを細胞内に注入するのを容易にするため acetoxymethylester 化した fura-2 AM が利用されている。これは細胞内にはいると加水分解されて fura-2 になると期待される。fura-2 は5つのカルボキシル基を持つのでエステル基も5つあることになる。細胞によっては5つ全部を加水分解できず、一部エステルのままであるものはやはり膜透過性が高く、しかも Ca<sup>2+</sup>-insensitive な蛍光を出すと云われている<sup>36)</sup>。また、小胞体やミトコンドリア内部に入りその Ca シグナルを反映する場合もある。用いる細胞の種類によっては注意が必要である<sup>25)</sup>。

#### (vi). 指示薬の純度

arsenazo III の精製で広く知られるように意外に多くの指示薬が不純物を含んでいる。Kawanishi ら<sup>25)</sup> は Molecular Probe 社の fura-2 AM に不純物混入が lot 毎に異なることを報告しているし、Harkins ら<sup>16)</sup> も lot No. により fluo-3 の F<sub>max</sub>/F<sub>min</sub> が数倍も異なることを報告している。筆者も PDAA の合成をお願いした時、性能特性が文献値になったので、それ以上の精製を止めましたとわざわざ注釈された。合成はしても原材料、副産物などの除去が困難な場合が多い。注意が肝要である。

#### (vii). 光照射による変化

指示薬によっては光照射により photo bleaching<sup>15,37)</sup> や photoisomerization<sup>15,31)</sup> を起し、性質が変化することがある。また生体系への直接、間接の作用を有するものもある (photodynamic action 等)。いろいろな工夫が必要である<sup>37)</sup>。

結論として Ca<sup>2+</sup> 指示薬の選択はどのような

実験材料の何を (Ca<sup>2+</sup> transient か、静止時 Ca<sup>2+</sup> level か等) 求めたいかにより、指示薬の特性を勘案して選択する必要がある。その場合にも指示薬による Ca<sup>2+</sup> 反応系への干渉の程度を評価しなければならない。Ca<sup>2+</sup> 指示薬を加えることは Ca<sup>2+</sup> 結合系を余分に1つ加えることに外ならない。

### 3. 二波長測光に伴う注意点

#### (i). 吸光度測光

Ca<sup>2+</sup> 結合型の指示薬 CaD と非結合型 D との吸収スペクトルが異なる場合、波長 λ<sub>i</sub> での吸光度を A<sub>i</sub> (i=1, 2) とすると

$$A_1 = (1-f) \cdot [D_T] \cdot \eta_1 + f \cdot [D_T] \cdot \epsilon_1 + \theta_1$$

$$A_2 = (1-f) \cdot [D_T] \cdot \eta_2 + f \cdot [D_T] \cdot \epsilon_2 + \theta_2$$

但し  $f = [CaD]/[D_T]$  であり、 $\eta_i$ ,  $\epsilon_i$ ,  $\theta_i$  (i=1, 2) は夫々 λ<sub>1</sub>, λ<sub>2</sub> での D, CaD のモル吸光度係数, intrinsic absorbance や散乱など指示薬以外の影響を示す。λ<sub>1</sub> と λ<sub>2</sub> とが接近していて θ<sub>1</sub> = θ<sub>2</sub> と見做せる場合は

$$\Delta A = A_1 - A_2 = (1-f) \cdot [D_T] \cdot (\eta_1 - \eta_2) + f \cdot [D_T] \cdot (\epsilon_1 - \epsilon_2)$$

λ<sub>1</sub>, λ<sub>2</sub> を η<sub>1</sub> = η<sub>2</sub> となるように選び、K<sub>D</sub> ≫ [Ca<sup>2+</sup>] の場合

$$\Delta A = ([D_T]/K_D) \cdot [Ca^{2+}] \cdot (\epsilon_1 - \epsilon_2) \cdots \cdots (3)$$

即ち波長の選択が大切であるが、適当な一組の波長を選び、その吸光度の差をとれば、濁度変化、運動などによる形態変化があってもその影響を除き、かつ Ca<sup>2+</sup> についての感度を高めることが出来る。これが B. Chance により始められた二波長分光測光法の原理である。λ<sub>1</sub>, λ<sub>2</sub> の切り替えを time sharing に行い、その差を求める。

#### (ii). 蛍光測光

光路長、指示薬の濃度などが蛍光強度に直線的に関係する場合について考える。λ<sub>i</sub> での蛍光強度 F<sub>i</sub> は

$$F_1 = (1-f) \cdot [D_T] \cdot S_{f1} + f \cdot [D_T] \cdot S_{b1} + \theta_1$$

$$F_2 = (1-f) \cdot [D_T] \cdot S_{f2} + f \cdot [D_T] \cdot S_{b2} + \theta_2$$

但し S<sub>fi</sub>, S<sub>bi</sub> は波長 λ<sub>i</sub> での D, CaD 型の蛍光強度を表わし、θ<sub>i</sub> は夫々の波長での盲蛍光など

指示薬に直接的にはよらない蛍光を表わす。fura-2などは  $\theta_i$  は  $F_i$  に比べ無視できる程度なので<sup>15)</sup>

$$F_1/F_2 = \frac{S_{f1} + S_{b2} ([Ca^{2+}]/K_D)}{S_{f2} + S_{b2} ([Ca^{2+}]/K_D)}$$

$F_1/F_2 = R$ ,  $S_{f1}/S_{f2} = R_{min}$ ,  $S_{b1}/S_{b2} = R_{max}$  とすると

$$[Ca^{2+}] = K_D \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \dots\dots\dots(4)$$

となる。  $S_{f2}/S_{b2} = \beta$  すると、式(4)は

$$R = R_{min} + (R_{max} - R_{min}) \frac{[Ca^{2+}]}{K_D \cdot \beta + [Ca^{2+}]} \dots\dots\dots(5)$$

波長  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  で交互に励起させて蛍光強度比をとれば、単離細胞や単層の細胞の運動による蛍光強度の変動が相殺され、安定なシグナルが得られるという。

二波長測光の場合、いくつかのキーポイントがある。その第1は二つの波長を交互に切り替える chopping rate である。装置の時間分解能はこの chopping rate で決まる。mechanical な安定性、信号の shake hand の速度などを考慮に入れて市販の装置で最高速度は 800 Hz である。高速にすると S/N 比も当然低下する。従って実用時間分解能は 10 ms がせいぜいである。形態変化による変動を相殺するためには形態変化速度より chopping rate は充分速いものでなければならない。Gryniewicz ら<sup>15)</sup> は 10~30 Hz の chopping rate ですばらしい効果が得られるというが、やはり細胞の種類によると思われる。フィルターで交換が 2 秒に 1 回と云うような装置ではとても動きの影響を相殺できるとは思えない。  $\lambda_1$  の時が山で  $\lambda_2$  の時が谷のような場合、却って増巾されてしまうであろう。その第2は  $\lambda_1$  と  $\lambda_2$  とが同一光路を通過して試料なり光電子倍增管の管面に当たるように設計されていることが大切である。

R と  $[Ca^{2+}]$  との関係は式(5)をみると  $Ca^{2+}$ -free から充分な  $[Ca^{2+}]$  に増加するに従い、  $R_{min}$  から  $R_{max}$  に変化し、その中点 ( $R_{min} + R_{max}$ )/2 は  $K_D \cdot \beta$  で得られることになる<sup>53)</sup>。用

いる波長により  $\beta$  が異なること、  $\beta$  は装置により決まる値であることに注意すべきである。同一装置であっても  $R$ - $[Ca^{2+}]$  の関係は用いる波長の組合せにより異なる。

#### 4. 吸光度法と蛍光法

吸光度法の利点は、吸収シグナルが測定装置に依らない事である。

吸光度は Lambert-Beer の法則に従う。

$$A = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot l$$

ここで、  $I_0$  は入射光強度、  $I$  は透過光強度を表し、  $\epsilon$  はモル吸光度係数、  $c$  は指示薬の濃度、  $l$  は光路長である。  $l$  さえ解っていれば 10 mm のキュベットで得たスペクトルと in situ のそれとを比較出来る。但し in situ のスペクトルは標本自身による吸収を差し引く必要がある。吸収は蛍光に比べ、温度、溶媒の粘性などの影響が少ない(無いわけではない)ので、濃度など絶対値を求めるのに適する。しかし、充分な吸収シグナル(O.D.にして0.05~0.1)を得るには或る程度の細胞の大きさ ( $l$ ) (直径50~100  $\mu$ m) と指示薬の濃度 ( $c$ ) が必要である。一方、蛍光法は一般的に指示薬によるシグナルが大きいので検出しやすく、ratio 法を用いれば動きによる影響も受けにくい。しかし一般的に蛍光測光は多くの要因による影響を受けやすい<sup>49)</sup>。励起方法と蛍光測光部の幾何学的関係、光源特性、光検出部の分光感度特性などにより、またさらに顕微測光系を用いればレンズ等の光学特性によっても影響を受ける。測定装置ごとにスペクトルが異なるので、  $Ca^{2+}$  濃度のキャリブレーションは同じ測定装置で似た形状の試料で行わなければならない。同一装置でも光学系の劣化による経時的変化も有り得る。また繁用されている蛍光指示薬は紫外光励起のものが多く、対物レンズの光透過性に充分注意すべきである。330 nm より短波長の光に対して透過性はない<sup>40,53)</sup>。さらに溶液の粘性や温度、蛋白との結合により蛍光強度やスペクトルが容易に変わり得る。

蛍光法は相対的な  $Ca^{2+}$  濃度の変化を感度良

く検出できるが、絶対的な Ca<sup>2+</sup> 濃度となるとそのキャリブレーションをどのように得たらよいか議論の多いところである<sup>4,54)</sup>。通常は蛍光強度比のキャリブレーションを、in vitro で細胞内イオン環境を模倣した溶液中で得る方法や、細胞膜を Ca<sup>2+</sup> に対して透過にした細胞標本を用いて得る方法があるが<sup>52)</sup>、細胞内の生きた状態を再現し、かつ Ca<sup>2+</sup> 濃度も正確にコントロール出来ているという保証はない。また、蛍光は自己吸収によって強度が減少するため、CaD 濃度に対する直線範囲が吸収の場合よりずっと狭い。蛍光強度 F と吸収の関係は次のような式で表される<sup>3)</sup>。

$$F = \kappa \cdot I \cdot A \cdot (10^{-B} - 10^{-A}) / (A - B)$$

ここで F は蛍光強度、A は入射光波長の吸光度、B は蛍光波長における吸光度、 $\kappa$  は指示薬の蛍光量子効率と測定装置の集光効率に依存する係数、I は入射光強度である。細胞自体の吸収もなく B もゼロだとした時(通常 fura-2 や fura red を用いた測定ではゼロである)、A が小さければ F は A に比例するが、指示薬の濃度が高く(即ち A が大きく)なると F は濃度に対して直線性を失ってくるので、蛍光のみの測定なら指示薬の濃度は感度の許す限り低い方がよい。

最近、Kurebayashi らは吸光度法と蛍光法の夫々の利点を活かし、fura red を用いた静止時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度測定法を報告した<sup>31)</sup>。fura red は fura-2 と類似の Ca<sup>2+</sup> 親和性をもつが、吸収、蛍光励起スペクトルの波長領域が可視光範囲にあるので、これを用いて単一骨格筋細胞において初めて静止時の Ca<sup>2+</sup> 濃度を Ca 非結合型スペクトル (0Ca) とは異なる吸収スペクトルとして検出できた。in vitro で求めた D, CaD の吸収スペクトルより、骨格筋細胞静止時の fura red の吸収スペクトルを最もよく説明するのは  $f = [CaD] / [D_T] \approx 0.15$  であった。この f と細胞内 fura red の K<sub>D</sub> 推定値(蛋白(+))の in vitro 測定値、及び Ca<sup>2+</sup> transient のフィッティングより求めた k<sub>+</sub>, k<sub>-</sub> から計算した値から静止時 [Ca<sup>2+</sup>] 濃度 (0.17~0.28 μM) が求められる。さらに同様にして活動電位に伴う収

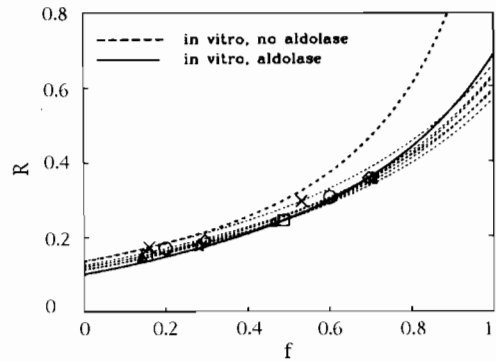


図2 カエル骨格筋で得た fura red の細胞内キャリブレーション。Ca<sup>2+</sup> 結合型色素の割合 (f) と、420 nm と 480 nm の励起による蛍光強度の比 (R) の関係を示す。2点の実測値、即ち静止時及び興奮時 Ca transient のピーク付近における f に対する R 値をファイバーごとに異なるシンボルで表してある。ファイバー毎の2組の (f, R) 値から計算される f と R の関係を点線で示す。実線及び破線はそれぞれ in vitro で得た蛋白 (aldolase) 存在下及び非存在下の f と R の関係を示す。細胞内の f と R の関係は、aldolase 存在下の in vitro で得たものに近かった(文献31)。

縮開始直前の Ca<sup>2+</sup> transient の f も求められる。これと平行して、同一細胞で 420, 480 nm の励起波長における静止時、電気刺激時夫々の蛍光強度を求め R-f (in situ) の関係曲線を得る(図2)。これらの数値はファイバーごとのバラツキが少なく、細胞内のキャリブレーションとして有用であると考えられた。一本の標本中で一、二度、吸収シグナルに基づき蛍光のキャリブレーションを得れば、後はより簡便で感度の良い蛍光シグナルによって、経時的な僅かな変化を検出する事ができる。この方法によれば非侵襲的に蛍光のキャリブレーションを得ることが出来る。fura red 自身には、蛍光シグナルが比較的小さい、蛋白結合による影響が大きい、など改善すべき点はまだ有るが、fura red タイプの良い指示薬が開発されれば、より信頼性の高い Ca 濃度測定が出来、スキンドファイバーや生化学的な標本から得たデータとの対応も容易になり、小胞体その他の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 調節系の機能の検討も楽になる事が期待される。



## 文 献

- 1) Baker, A. J., Brandes, R., Schreur, J. H. M., Camacho, S. A., & Weiner, M.W. (1994) Protein and acidosis alter calcium-binding and fluorescence spectra of the calcium indicator indo-1. *Biophys. J.*, **67**, 1646-1654.
- 2) Baker, P. F. Ed. (1988) Calcium in Drug Actions. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 84, Springer-Verlag, Berlin.
- 3) Baylor, S. M., Chandler, W. K., & Marshall, M. W. (1981) Studies in skeletal muscle using optical probes of membrane potential. In: The Regulation of Muscle Contraction: Excitation-Contraction Coupling, (Grinnell, A. D., & Brazier, M. A. B. eds.), Academic Press, Inc., New York, 97-130.
- 4) Baylor, S. M., Harkins, A. B., & Kurebayashi, N. (1994) Response to Westerblad and Allen. *Biophys. J.*, **66**, 927-928.
- 5) Baylor, S. M., & Hollingworth, S. (1988) Fura-2 calcium transients in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **403**, 151-192.
- 6) Baylor, S. M., Hollingworth, S., Hui, C. S., & Quinta-Ferreira, M. E. (1985) Calcium transients from intact frog skeletal muscle fibres simultaneously injected with Antipyrylazo III and Azo 1. *J. Physiol.*, **365**, 70 P.
- 7) Baylor, S. M., Hollingworth, S., Hui, C. S., & Quinta-Ferreira, M. E. (1986) Properites of the metallochromic dyes Arsenazo III, Antipyrylazo III and Azo 1 in frog skeletal muscle fibres at rest. *J. Physiol.*, **377**, 89-141.
- 8) Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- 9) Blinks, J. R. (1992) Intracellular [Ca<sup>2+</sup>] measurements. In: The Heart and Cardiovascular System. 2nd Ed., (Fozzard, H. A., Haber, E., Jennings, R. B., Katz, A. M., & Morgan, H. E. eds.), Raven Press, Ltd., New York, 1171-1201 (chap. 43).
- 10) DeMarinis, R. M., Katerinopoulos, H. E., & Muirhead, K. A. (1990) New tetracarboxylate compounds as fluorescent intracellular calcium indicators. *Biochem. Meth.*, **112**, 381.
- 11) Dipolo, R., Requena, J., Brinley, F. J., Jr., Mullins, L. J., Scarpa, A., & Tiffert, T. (1967) Ionized calcium concentrations in squid axons. *J. Gen. Physiol.*, **67**, 433-467.
- 12) Dorogi, P. L., Rabl, C., & Neumann, E. (1983) Kinetic scheme for Ca<sup>2+</sup>-arsenazo III interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 1027-1033.
- 13) Ebashi, S., & Ogawa, Y. (1988) Troponin C and calmodulin as calcium receptors: mode of action and sensitivity to drugs. In: Calcium in Drug Actions, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 83, (Baker, P. F. eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 31-56.
- 14) Geier, G. (1968) Die Kinetik der Murexid-Komplexbildung mit Kationen verschiedenen Koordinationscharakters: Eine Untersuchung mittels der Temperatursprung-Relaxations Methode. *Helv. Chimica Acta*, **51**, 94-105.
- 15) Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- 16) Harkins, A. B., Kurebayashi, N., & Baylor, S. M. (1993) Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys. J.*, **65**, 865-881.
- 17) 広海啓太郎 (1978) 酵素反応解析の実際. 講談社サイエンティフィック, 310-315.
- 18) Hirota, A., Chandler, W. K., Southwick, P. L., & Waggoner, A. S. (1989) Calcium signals recorded from two new purpurate indicators inside frog cut twitch fibers. *J. Gen. Physiol.*, **94**, 597-631.
- 19) Hollingworth, S., Harkins, A. B., Kurebayashi, N., Konishi, M., & Baylor, S.M. (1992) Excitation-contraction coupling in intact frog skeletal muscle fibers injected with mmolar concentrations of fura-2. *Biophys. J.*, **63**, 224-234.
- 20) Hove-Madsen, L., & Bers, D. M. (1992) Indo-1 binding to protein in permeabilized ventricular myocytes alters its spectral and Ca binding properties. *Biophys. J.*, **63**, 89-97.
- 21) Jackson, A. P., Timmerman, M. P., Bagshaw, C. R., & Ashley, C. C. (1987) The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett.*, **216**, 35-39.
- 22) Kao, J. P. Y., & Tsien, R. (1988) Ca<sup>2+</sup> binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys. J.*, **53**, 635-639.
- 23) 唐木英明 (1991-1992) 連載 細胞内カルシウムの測定をめぐる. *CLINICAL CALCIUM*, Vols 1 & 2.
- 24) 唐木英明, 工藤佳久, 栗山 熙 (1989) 細胞内カルシウム実験法. *実験医学 臨時増刊*.
- 25) Kawanishi, T., Blank, L. M., Harootunian, A. T., Smith, M. T., & Tsien, R. Y. (1989) Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by hormonal stimulation of individual fura-2 loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12859-12866.
- 26) Kendrick, N. C. (1976) Purification of arsenazo III, a Ca<sup>2+</sup>-sensitive dye. *Anal. Biochem.*, **76**, 487-501.
- 27) Klein, M. G., Simon, B. J., Szucs, G., & Schneider, M. F. (1988) Simultaneous recording of calcium transients in skeletal muscle using high- and low-affinity calcium indicators. *Biophys. J.*, **53**, 971-988.
- 28) Konishi, M., & Baylor, S. M. (1991) Myoplasmic calcium transients monitored with purpurate indicator dyes injected into intact frog skeletal

- muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **97**, 245-270.
- 29) Konishi, M., Hollingworth, S., Harkins, A. B., & Baylor, S. M. (1991) Myoplasmic calcium transients in intact frog skeletal muscle fibers monitored with the fluorescent indicator fura-2. *J. Gen. Physiol.*, **97**, 271-301.
  - 30) Konishi, M., Olson, A., Hollingworth, S., & Baylor, S. M. (1988) Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.*, **54**, 1089-1104.
  - 31) Kurebayashi, N., Harkins, A. B., & Baylor, S. M. (1993) Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, **64**, 1934-1960.
  - 32) Maylie, J., Irving, M., Sizto, N. L., Boyarsky, G., & Chandler, W. K. (1987) Calcium signals recorded from cut frog twitch fibers containing tetramethylmurexide. *J. Gen. Physiol.*, **89**, 145-176.
  - 33) Maylie, J., Irving, M., Sizto, N. L., & Chandler, W. K. (1987) Comparison of arsenazo III optical signals in intact and cut frog twitch fibers. *J. Gen. Physiol.*, **89**, 41-81.
  - 34) Maylie, J., Irving, M., Sizto, N. L., & Chandler, W. K. (1987) Calcium signals recorded from cut frog twitch fibers containing antipyrylazo III. *J. Gen. Physiol.*, **89**, 83-143.
  - 35) Minta, A., Kao, J. P. Y., & Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178.
  - 36) 小川靖男 (1987) 新蛍光性 Ca<sup>2+</sup> 指示薬の問題点あれこれ. *代謝*, **24**, 462.
  - 37) 小川靖男 (1988) 蛍光性 Ca<sup>2+</sup> 指示薬 fura-2 の問題点とその対策. *代謝*, **25**, 400.
  - 38) 小川靖男 (1989) 細胞内カルシウムイオン測定のための Ca<sup>2+</sup> 指示薬 (総論). *生体の科学*, **40**, 452-455.
  - 39) 小川靖男 (1990) 細胞内 Mg<sup>2+</sup> 濃度測定のための新しい試薬. *代謝*, **27**, 82.
  - 40) 小川靖男 (1992) Fura-2 法の問題点. *Clinical Calcium*, **2**, 722-723.
  - 41) Ogawa, Y., Harafuji, H., & Kurebayashi, N. (1980) Comparison of the characteristics of four metallochromic dyes as potential calcium indicators for biological experiments. *J. Biochem.*, **87**, 1293-1303.
  - 42) Ohnishi, S. T. (1978) Characterization of the murexide method: dual-wavelength spectrophotometry of cations under physiological conditions. *Anal. Biochem.*, **85**, 165-179.
  - 43) Ohnishi, T., & Ebashi, S. (1963) Spectrophotometrical measurement of instantaneous calcium binding of the relaxing factor of muscle. *J. Biochem.*, **54**, 506-511.
  - 44) Palade, P., & Vergara, J. (1983) Stoichiometries of arsenazo III-Ca complexes. *Biophys. J.*, **43**, 355-369.
  - 45) Pape, P. C., Jong, D.-S., Chandler, W. K., & Baylor, S. M. (1993) Effect of fura-2 on action potential stimulated calcium release in cut twitch fibers from frog muscle. *J. Gen. Physiol.*, **102**, 295-332.
  - 46) Raju, B., Murphy, E., Levy, L. A., Hall, R. D., & London, R. E. (1989) A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Amer. J. Physiol.*, **256**, C540-C548.
  - 47) Rios, E., & Schneider, M. F. (1981) Stoichiometry of the reactions of calcium with the metallochromic indicator dyes antipyrylazo III and arsenazo III. *Biophys. J.*, **36**, 607-621.
  - 48) Scarpa, A., Brinley, J., Jr., & Dubyak, G. (1978) Antipyrylazo III, a "middle range" Ca<sup>2+</sup> metallochromic indicator. *Biochemistry*, **17**, 1378-1386.
  - 49) 田村善蔵, 太幡利一, 保田和雄 (1974) けい光分析. *講談社サイエンスフィック*, 東京, 49-87.
  - 50) Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., & Dawson, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2466-2470.
  - 51) Tsien, R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396-2404.
  - 52) Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Ann. Rev. Neurosci.*, **12**, 227-253.
  - 53) Uto, A., Arai, H., & Ogawa, Y. (1991) Reassessment of fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. *Cell Calcium*, **12**, 29-37.
  - 54) Westerblad, H., & Allen, D. G. (1994) Methods for calibration of fluorescent calcium indicators in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, **66**, 926-927.