Ca-EGTA 緩衝液における遊離カルシウム イオン濃度を計算するためのプログラム

洲 崎 敏 伸*

1. はじめに

実験溶液中の遊離カルシウムイオン濃度を一定の低い値に保ちたい場合には、EGTAを用いた金属緩衝液(metal ion buffer)が一般的に用いられる。カルシウムイオンとEGTA(あるいはEDTA)との結合は、溶液中のマグネシウムやATPの濃度に影響される。また、それは溶液のpH、温度、イオン強度などにも依存している。

カルシウム濃度の計算には2通りの場合が考えられる。第1は、溶液中の遊離カルシウム濃度をある一定の値に定める目的で、溶液に加えるべきカルシウムの総量(全カルシウム濃度)を計算する場合であり、第2は、全カルシウム濃度のわかっている溶液中に存在する遊離カルシウムイオン濃度を計算する場合である。計算の実際としては、前者の場合は単純な連立一次方程式の解を求めればよいので簡単であるが、後者の場合は多少複雑で、コンピューターを用いた近似計算が必要である。

今回紹介するプログラムはこれらのどちらの場合にも使用できるように設計されたものであり、次のような特徴がある。(1)いろいろなイオン種間の絶対結合定数からカルシウムの濃度が計算される。(2)緩衝液のpH、温度、イオン強度、溶液中のマグネシウム濃度、ATP濃度などの影響が考慮されている。(3)文献によく示されている“見かけの”結合定数を用いた計算も可能である。(4)結合定数の値を変えることにより、EDTAやその他のキレート剤についての計算にも応用できる。

計算の基礎的理論は、Caldwell (1970)²⁾, Martell & Smith (1974)³⁾, Blinks et al. (1982)¹⁾, Thomas (1982)⁴⁾らによって詳しく解説されている。また、遊離カルシウム濃度を計算する際には、Walz (1982)⁵⁾の用いた反復法による近似計算を行った。

2. 見かけの結合定数の計算

いろいろな溶液条件におけるイオン濃度を計算するためには、EGTAに対するカルシウムとマグネシウムの“見かけの”結合定数をまず第一に求めなければならない。一般に、キレート剤(L)と2価金属陽イオン(Me²⁺)との間の見かけの結合定数とは、あたかもキレート剤が単一のイオン種としてふるまうとして、次のように定義される。

$$K_{\text{MeL-total}}^1 = \frac{[\text{metal-chelator complex}]}{[\text{metal ion}] [\text{chelator not bound to metal}]} \quad (1)$$

通常、中性付近においてEGTAは3個(HL³⁻)、あるいは4個(L⁴⁻)の陰電荷を持つイオン種が共存している。それぞれの状態のEGTAについて、見かけの結合定数が次のように定義される。

$$K_{\text{MeHL}}^1 = [\text{MeHL}^-] / [\text{Me}^{2+}] [\text{L}_{\text{total}}] \quad \cdots \cdots (2)$$

$$K_{\text{MeL}}^1 = [\text{MeL}^{2-}] / [\text{Me}^{2+}] [\text{L}_{\text{total}}] \quad \cdots \cdots (3)$$

また、EGTAと金属イオンとの絶対結合定数は次の式で示される。

$$K_{\text{MeHL}} = [\text{MeHL}^-] / [\text{Me}^{2+}] [\text{HL}^{3-}] \quad \cdots \cdots (4)$$

$$K_{\text{MeL}} = [\text{MeL}^{2-}] / [\text{Me}^{2+}] [\text{L}^{4-}] \quad \cdots \cdots (5)$$

ここで、(1)式と(2)、(3)式との関係は、次のようになる。

* Toshinobu SUZAKI, 高知医科大学生理学教室 (〒781-51 高知県南国市岡豊町小蓮)

$$K_{\text{MeL-total}}^1 = \frac{[\text{MeL}^{2-}] + [\text{MeHL}^-]}{[\text{Me}^{2+}][\text{L}_{\text{total}}]} \\ = K_{\text{MeL}}^1 + K_{\text{MeHL}}^1 \quad \dots\dots(6)$$

また、EGTA のそれぞれの荷電状態について、見かけの結合定数と絶対結合定数との関係は、次式で表される

$$K_{\text{MeHL}}/K_{\text{MeHL}}^1 = [\text{L}_{\text{total}}]/[\text{HL}^{3-}] \\ = ([\text{L}^{4-}] + [\text{HL}^{3-}] + [\text{H}_2\text{L}^{2-}] \\ + [\text{H}_3\text{L}^-] + [\text{H}_4\text{L}])/[\text{HL}^{3-}] \\ = [\text{L}^{4-}]/[\text{HL}^{3-}] + 1 + [\text{H}_2\text{L}^{2-}] \\ /[\text{H}_3\text{L}^-] + [\text{H}_3\text{L}^-]/[\text{HL}^{3-}] \\ = 1/K_1[\text{H}^+] + 1 + [\text{H}^+]K_2 \\ + [\text{H}^+]^2K_2K_3 + [\text{H}^+]^3K_2K_3K_4 \quad (7)$$

$$K_{\text{MeL}}/K_{\text{MeL}}^1 = [\text{L}_{\text{total}}]/[\text{L}^{4-}] \\ = [\text{L}^{4-}]/[\text{L}^{4-}] + [\text{HL}^{3-}]/[\text{L}^{4-}] \\ + [\text{H}_2\text{L}^{2-}]/[\text{L}^{4-}] + [\text{H}_3\text{L}^-] \\ /[\text{L}^{4-}] + [\text{H}_4\text{L}]/[\text{L}^{4-}] \\ = 1 + [\text{H}^+]K_1 + [\text{H}^+]^2K_1K_2 \\ + [\text{H}^+]^3K_1K_2K_3 \\ + [\text{H}^+]^4K_1K_2K_3K_4 \quad \dots\dots(8)$$

ここで、 $K_1 \sim K_4$ は、EGTA の各イオン種と水素イオンとの絶対結合定数であり、次の各式で示される。

$$K_1 = [\text{HL}^{3-}]/[\text{H}^+][\text{L}^{4-}],$$

$$K_2 = [\text{H}_2\text{L}^{2-}]/[\text{H}^+][\text{HL}^{3-}],$$

$$K_3 = [\text{H}_3\text{L}^-]/[\text{H}^+][\text{H}_2\text{L}^{2-}],$$

$$K_4 = [\text{H}_4\text{L}]/[\text{H}^+][\text{H}_3\text{L}^-]$$

絶対結合定数の諸値は、実験的に与えられており、それらの文献値と溶液中の水素イオン濃度を(6), (7), (8)式に代入することにより EGTA と 2 価陽イオンに対する見かけの結合定数が得られる。計算に用いた絶対結合定数の文献値と、その出典は、プログラムの中にデータとして入力されており、必要であれば更新することも可能である。

3. pH とイオン強度の効果

pH メーターで実際に測定される値は、水素イオンの活量に関する数値 ($-\text{Log}(a[\text{H}^+])$) であり、厳密な意味においては水素イオン濃度を示してはいない。従って水素イオンの活量係数 (a) がわからなければ正確な水素イオン濃度 $[\text{H}^+]$ を知ることができない。水素イオンの活量係数は溶液のイオン強度に依存していることが知られている。今回の計算では、KCl 溶液中で測定されたイオン強度の水素イオン濃度との関係³⁾ を用いてイオン強度の補正をおこなった。

4. 温度の効果

一般に、化学反応における結合定数は反応が進行する温度に依存している。すなわち、

$$\frac{\Delta H}{2.303 RT^2} = \frac{d \log K}{dT} \quad \dots\dots(9)$$

ここで、 R はガス定数 ($8.314 \text{ J} \cdot \text{deg}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$) であり ΔH は反応エンタルピーである。ここでは上の式を用いて、ある温度における絶対結合定数の値 (文献値) から任意の温度における絶対結合定数を算出した。それぞれのイオン種間の絶対結合定数に対する反応エントロピーの値も、プログラムの中にデータとして表示される。

5. 遊離カルシウム・マグネシウム濃度をこれらの全濃度から求める計算

遊離イオン濃度の計算は、(1)式から導かれる次の4つの連立式を、反復法を用いて解くことによってなされる⁵⁾。

$$K_{\text{CaEGTA}}^1 = \frac{a}{([\text{Ca}_{\text{total}}] - a - d)([\text{EGTA}_{\text{total}}] - a - b)} \quad \dots\dots(10)$$

$$K_{\text{MgEGTA}}^1 = \frac{b}{([\text{Mg}_{\text{total}}] - b - c)([\text{EGTA}_{\text{total}}] - a - b)} \quad \dots\dots(11)$$

$$K_{\text{MgATP}}^1 = \frac{c}{([\text{Mg}_{\text{total}}] - b - c)([\text{ATP}_{\text{total}}] - c - d)} \quad \dots\dots(12)$$

$$K_{\text{CaATP}}^1 = \frac{d}{([\text{Ca}_{\text{total}}] - a - d)([\text{ATP}_{\text{total}}] - c - d)} \quad \dots\dots(13)$$

ここで, $a = [\text{CaEGTA}_{\text{free}}]$, $b = [\text{MgEGTA}_{\text{free}}]$, $c = [\text{MgATP}_{\text{free}}]$, $d = [\text{CaATP}_{\text{free}}]$ である。さらに,

$$[\text{EGTA}_{\text{free}}] = [\text{EGTA}_{\text{total}}] - a - b \quad \dots\dots(14)$$

$$[\text{ATP}_{\text{free}}] = [\text{ATP}_{\text{total}}] - c - d \quad \dots\dots(15)$$

$$[\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] = [\text{Ca}_{\text{total}}] - a - d \quad \dots\dots(16)$$

$$[\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] = [\text{Mg}_{\text{total}}] - b - c \quad \dots\dots(17)$$

計算は, 具体的にはまず(10)式において, $b = 0$ および $d = 0$ として a の値を求める。次に, 得られた a の値を(11)式に代入し, $c = 0$ とした場合の b の値を計算する。(12)式においては, $d = 0$ として, (11)式から得られた b の値から c を計算する。最後に, 得られた a と c の値を(13)式に代入して d を算出する。ここまですが反復法の第一のサイクルである。次のサイクルからは, b , c , d の初期値として, 0 のかわりにひとつ前のサイクルで算出された値を用いる。このような計算のサイクルを繰り返し, 得られた a の値が 10^{-8} 以下の変動を示すようになったところで近似計算を終了する。最終的に得られた $a \sim d$ の値を(14)~(17)式に代入することにより, 遊離イオン濃度が算出される。

6. カルシウム・マグネシウムの全濃度を遊離イオン濃度から求める計算

この計算においては, 次の4つの連立方程式が解かれる。

$$K^1_{\text{CaEGTA}} = \frac{a}{[\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] ([\text{EGTA}_{\text{total}}] - a - b)} \quad \dots\dots(18)$$

$$K^1_{\text{MgEGTA}} = \frac{b}{[\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] ([\text{EGTA}_{\text{total}}] - a - b)} \quad \dots\dots(19)$$

$$K^1_{\text{MgATP}} = \frac{c}{[\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] ([\text{ATP}_{\text{total}}] - c - d)} \quad \dots\dots(20)$$

$$K^1_{\text{CaATP}} = \frac{d}{[\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] ([\text{ATP}_{\text{total}}] - c - d)} \quad \dots\dots(21)$$

前節で述べた(10)~(13)式の解法とは対照的に, (18), (19)式からは a と b が, (20), (21)式からは c と d がそれぞれ直後に導かれる。すなわち,

$$a = \frac{K^1_{\text{CaEGTA}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] [\text{EGTA}_{\text{total}}]}{1 + K^1_{\text{CaEGTA}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] + K^1_{\text{MgEGTA}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}]} \quad \dots\dots(22)$$

$$b = \frac{K^1_{\text{MgEGTA}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] [\text{EGTA}_{\text{total}}]}{1 + K^1_{\text{CaEGTA}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] + K^1_{\text{MgEGTA}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}]} \quad \dots\dots(23)$$

$$c = \frac{K^1_{\text{MgATP}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] [\text{ATP}_{\text{total}}]}{1 + K^1_{\text{MgATP}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] + K^1_{\text{CaEGTA}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}]} \quad \dots\dots(24)$$

$$d = \frac{K^1_{\text{CaATP}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] [\text{ATP}_{\text{total}}]}{1 + K^1_{\text{MgATP}} [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] + K^1_{\text{CaEGTA}} [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}]} \quad \dots\dots(25)$$

これらの値をもとに, カルシウムおよびマグネシウムの全濃度が次の式によって計算される。

$$[\text{Ca}_{\text{total}}] = [\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}] + a + d \quad (\text{from eq.(16)}) \quad \dots\dots(26)$$

$$[\text{Mg}_{\text{total}}] = [\text{Mg}^{2+}_{\text{free}}] + b + c \quad (\text{from eq.(17)}) \quad \dots\dots(27)$$

7. おわりに

以上簡単ですが, 最近作成した $\text{Ca} \cdot \text{EGTA}$ 緩衝液に関する計算プログラムの説明と紹介をおこないました。このプログラムを実際に利用されたい方がおられましたら, ご希望に応じてプログラムのコピーを致します。ご使用の種類のフロッピーディスクを同封の上, 著者までお送りください。なお, このプログラムは NEC PC-9800 シリーズコンピュータ用に BASIC 言語で作成されましたので, 他の機種で使用する場合には若干の手直しが必要です。

文 献

- 1) Blinks, J. R., Wier, W. G., Hess, P. & Pendergast, F. G.: Prog. Biophys. Molec. Biol., 40, 1-114 (1982)

- 4) Thomas, M. V.: Techniques in Calcium Research, Academic Press (1982)
- 5) Walz, B.: J. Cell Biol., 93, 849-859 (1982)

```

5082 FOR I=1 TO 4: READ N5(I): NEXT I: FOR I=1 TO 4:
5083   READ P5(I): NEXT I: FOR I=1 TO 4: READ V5(I): NEXT I
5085 DATA "CALCIUM/EGTA","MAGNESIUM/EGTA","MAGNESIUM/ATP",
      "CALCIUM/ATP","CALCIUM","EGTA","MAGNESIUM",
      "ATP","FREE","TOTAL","FREE","TOTAL"
5086 DD=.000000001#
5090 RETURN
5100
      ' SUBROUTINE FOR HEADLINES OF THE PROGRAM
5105 CLS
5110 PRINT "*****";
      "*****";
      PRINT "a"; TAB(70); "*" : PRINT "a CALCIUM ";
5111 PRINT "CONCENTRATION PROGRAM Ver. 2.0"; TAB(70); "a";
      PRINT "a"; TAB(70); "a" : PRINT "a"; TAB(30);
      "Jan 5, 1987"; TAB(70); "a" : PRINT "a"; TAB(70); "a";
      PRINT "a";
5112 PRINT TAB(30); "TOSHINOBU SUZAKI"; TAB(70); "a"; PRINT "a";
      TAB(30); "DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY ";
      TAB(70); "a" : PRINT "a"; TAB(30); "KOCHI MEDICAL ";
5113 PRINT "a"; SCHOOL "; TAB(70); "a"; PRINT "a";
      TAB(30); "HANKOKU-SHI, KOCHI 781-51, JAPAN "; TAB(70);
      "a"; PRINT "a"; TAB(70) "a"; PRINT "*****";
5114 PRINT "*****";
      "*****" : PRINT: PRINT: PRINT: PRINT "PLEASE ANSWER";
      PRINT "QUESTIONS IN JAPANESE." : PRINT "USE": COLOR 2:
5115 PRINT "HAI"; COLOR 5: PRINT "(WHICH MEANS YES) OR ";
      COLOR 2: PRINT "IEE"; COLOR 5: PRINT "(WHICH MEANS NO).";
      PRINT: PRINT
5120 GOSUB 9000 'WAIT
5130 PRINT : PRINT "*****";
      "*****" : PRINT "a"; TAB(55); "a"
      :PRINT "a PART 1 - CALCULATION OF APPARENT ASSOCIATION";
5131 PRINT "CONSTANTS a" : PRINT "a"; TAB(55); "a" :
      PRINT "a";
      "*****";
      "a" : PRINT :PRINT "CURRENT BEST ESTIMATES FOR ABSO";
5132 PRINT "LUTE BINDING CONSTANTS AND " :
      PRINT "ENTHALPY VALUES ARE AS FLOWS (TABLE 1)" :
      PRINT : K=1
5150 RETURN
5160
      'SUBROUTINE FOR TABLE OF ABSOLUTE ASSOCIATION
      'CONSTANTS
5165 IF K=0 THEN 5210
5170 PRINT TAB(71); "a" : PRINT "No"; TAB(4); "ASSOCIATION";
      TAB(29); "Log(K)"; TAB(37); "TEMP"; TAB(43); "REFEREN";
      "CES"; TAB(63); "ENTHALPY"
5172 PRINT TAB(4); "CONSTANT (K)"; TAB(37); "(oC)";
5173 PRINT TAB(61); "(kcal/mole)"
5175 PRINT "-----";
      "-----"
5180 FOR I=1 TO 12 : PRINT USING "###.1"; I; PRINT AAC(I);
      CONSTANTS(I); TAB(30); PRINT USING "##.##"; TEMP(I);
      TAB(37); PRINT USING "##.0"; TEMP(I);
5185 PRINT TAB(43); REFERENCES(I); TAB(66);
      PRINT USING "##.##"; ENTHALPHY(I); PRINT TAB(71);
      NOTES(I)
5190 NEXT I
5195 PRINT "-----";
      "a"; PRINT TAB(10);
      "a: Martell & Smith, 1973";
      PRINT TAB(40); "a: DATA NOT AVAILABLE"
5200 K=0
5210 RETURN
5250
      ' SUBROUTINE FOR ALTERATION TO THE ABOVE TABLE
5260 COLOR 6: INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE ANYTHING " ; Q$
5280 COLOR 5: GOSUB 5450
5290 IF Q$="IEE" THEN 5410
5295 K=1
5300 INPUT "ENTER NUMBER OF VARIABLE TO BE CHANGED " ; J
5310 INPUT "ENTER NEW ASSOCIATION CONSTANT (Log K) " ; AAC(J)
5320 INPUT "ENTER NEW TEMPERATURE " ; TEMP(J)
5330 INPUT "ENTER NEW REFERENCE " ; REFERENCES(J)
5340 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE THE ENTHALPHY VALUE AS WELL" ;
      Q$
5350 GOSUB 5450
5360 IF Q$="IEE" THEN 5380
5370 INPUT "ENTER NEW ENTHALPHY VALUE " ; ENTHALPHY (J)
5375 NOTES(J)=" "
5380 INPUT "DO YOU WANT TO CHANGE ANYTHING ELSE " ; Q$
5390 GOSUB 5450
5400 IF Q$="HAI" THEN 5300
5410 PRINT
5412 IF K=0 GOTO 5417
5415 PRINT "TABLE 2: ALTERED ASSOCIATION CONSTANTS" : PRINT
5417 RETURN
5450 '
      ' SUBROUTINE FOR "HAI" AND "IEE"
5460 IF Q$="HAI" OR Q$="IEE" GOTO 5495
5461 IF Q$="hai" OR Q$="iee" GOTO 5495
5462 IF Q$="H" OR Q$="h" THEN 5492

```