— 原 著 —

ヒト胎盤における膜結合型カルモジュリンの 精製とその性質

立川 裕理¹⁾・折茂 英生²⁾¹⁾日本医科大学内科学第3教室²⁾日本医科大学生化学第2教室

Purification and characterization of the membrane associated calmodulin from the human placenta

Hironori Tachikawa¹⁾ and Hideo Orimo²⁾¹⁾The Third Department of Internal Medicine, Nippon Medical School²⁾Department of Biochemistry, Nippon Medical School

The protein with the most predominant Ca^{2+} binding activity in membrane fractions of the human placenta was purified to electrophoretical homogeneity. This protein was identified as the membrane bound form of calmodulin based on the immunological cross reactivity and a number of biochemical properties.

The membrane fraction of the human placenta contained 8.3% of the total cellular calmodulin activity. Approximately 2/3 of the membrane associated calmodulin was extracted by incubation with a Ca^{2+} chelating agent, EGTA, suggesting that this form of calmodulin is bound reversibly to membrane proteins in a Ca^{2+} dependent manner. However, the rest of the membrane associated calmodulin could not be extracted by EGTA treatment. The EGTA nonextractable calmodulin appears to be embedded in the membrane matrix.

Key words: calmodulin, Ca^{2+} -binding protein, membrane associated protein, human placenta

緒 言

細胞機能の重要な制御因子の一つであるカルシウムイオンは、すべての細胞において細胞内伝達物質としての役割を担っている。細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($10^{-7} \sim 10^{-8} \text{mol/l}$) は、細胞外液の濃度 (10^{-3}mol/l) に比べて著しく低く維持されているが、外的刺激によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し伝達物質として多くの細胞内反応を活性化し、刺激への細胞の応答を引き起こすことが知られている¹⁾。

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、形質膜や小胞体膜に存在する膜電位、または受容体依存性 Ca^{2+} チャンネル、 Na^{+} - Ca^{2+} 交換輸送系、 Ca^{2+} ポンプの3種類の膜カルシウム輸送系により調節されていると考えられている²⁾。これらの系のうち Ca^{2+} 能動輸送を主に担っているのは膜蛋

白質である Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} ポンプであり、細胞質の Ca^{2+} 結合蛋白質であるカルモジュリンにより、その機能が調節されていると考えられている。カルモジュリンは Ca^{2+} と結合することにより、そのコンフォメーションが変化し、さらに Ca^{2+} -ATPase に結合して、その Ca^{2+} 結合親和性および輸送活性を著しく増大させる³⁻⁵⁾。

Ca^{2+} 結合活性を持つ膜蛋白質としては Ca^{2+} -ATPase 以外にも心筋小胞体におけるホスホランパン^{6,7)} や Schachter らによりラット腸管粘膜より同定された Integral Membrane Ca -binding protein (IMCAL)⁸⁾ 等が知られている。従って細胞内 Ca^{2+} 濃度調節や Ca^{2+} 能動輸送には、 Ca^{2+} -ATPase 以外にも多くの膜や細胞質に存在する Ca^{2+} 結合蛋白質が関与していると考えられている。

今回、著者は Schachter らの方法を用いて、 Ca^{2+} 輸送が盛んに行われているヒト胎盤^{9,10)} の絨毛より膜画分を分離し、主要な Ca^{2+} 結合能を持つ膜蛋白質 (human placental membrane associated Ca^{2+} -

Correspondence to Hironori Tachikawa, The Third Department of Internal Medicine, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

binding protein ; HPM-CaBP) の分離精製を試みその性質を検討した。その結果、ヒト胎盤絨毛の膜画分において主要な Ca^{2+} 結合蛋白質は膜結合型のカルモジュリンであり、しかもその約 28% は Ca^{2+} との結合を介さない Ca^{2+} 非依存性に膜に結合していることを明らかにした。

研究材料および方法

(1) 研究材料

1) ヒト胎盤

正常正常妊娠の分娩直後の新鮮なヒト胎盤を用いた。

2) 試薬

Sephacrose 6 B は Pharmacia Fine Chemical 社, DEAE-cellulose (DE-52) は Whatman 社, hydroxylapatite は BDH Chemical 社, calmodulin, molecular weight markers, avidine-labeled horseradish peroxidase, biotin conjugated anti-sheep IgG, 3,3'-diaminobenzidine (tetrahydrochloride), 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, phosphodiesterase 3', 5'-cyclic nucleotide, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) は Sigma 社, sheep anti-calmodulin antibody は Chemicon 社, TSKgel 4000 SW は東洋曹達工業, gel filtration standards, Chelex 100 (100~200 mesh), Bio-beads SM 2 は Bio-Rad 社, $^{45}\text{CaCl}_2$ は NEN 社, ampholine, pI markers は LKB 社, Emulgen 109 P は花王より各々購入した。

その他の試薬は市販の特級品を用いた。

(2) 方法

1) Ca^{2+} 結合膜蛋白質 (HPM-CaBP) の分離精製

i) Butanol extract の作製

分娩直後の新鮮な胎盤の絨毛を細切し, homogenization buffer (13 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 119 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 0.1 mmol/l PMSF) にて Polytron homogenizer を使用しホモジェナイズした。これを $140,000\times g$, 2 時間遠心分離し顆粒画分を得た。次にこの沈渣を 1.5% Triton X-100 を含む 13 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 中で Potter-Elvehjem homogenizer と Teflon pestle を用いて可溶化後, $10,000\times g$, 30 分遠心分離し上清を得た。この上清に氷冷 1-butanol (終濃度 30%) をを加え, 30 分間振盪し膜脂質を除いた後 $100,000\times g$, 30 分遠心分離し水相を得, これを Butanol extract とした。以上の操作はすべて

4℃にて行った。

ii) Sepharose 6 B によるゲルろ過 (Fig. 1)

35×880 mm のカラムに, Sepharose 6 B ゲルを充填し, 限外濾過にて濃縮した Butanol extract を 0.1% Triton X-100 を含む, 13 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 の eluting buffer を使用し, 0.6 ml/min の流速で 6 ml ずつ集めた。各分画の蛋白質濃度, Ca^{2+} 結合能, アルカリホスファターゼ活性を測定し Ca^{2+} 結合能のピーク分画 (No. 50~70; Sepharose 分画) を集め濃縮した。

iii) DE-52 イオン交換クロマトグラフィー (Fig. 2)

11×280 mm のカラムに DE-52 を 60 g 充填し, Sepharose 分画を負荷した。0.3 ml/min の流速でまず eluting buffer (0.1% Triton X-100, 13 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4) にて溶出し, 次に同 buffer で 0~0.5 mol/l NaCl のグラジエント溶出を行い 3 ml ずつ集めた。各分画をゲルろ過の時と同様に測定し Ca^{2+} 結合能のピーク分画 (No. 60~75; DE 分画) を集め濃縮した。

iv) Hydroxylapatite クロマトグラフィー

11×280 mm のカラムに hydroxylapatite 10 g を 0.001 mol/l リン酸ナトリウム buffer, pH 6.8 にて平衡化し充填した。DE 分画を 0.001 mol/l 同 buffer にて透析後カラムに負荷し 0.3 ml/min の流速で, 順次 0.001 mol/l, 0.01 mol/l, 0.01~0.1 mol/l グラジエント, 0.1 mol/l, 0.2 mol/l リン酸ナトリウム buffer, pH 6.8 にて溶出した。各分画の蛋白質濃度を測定しステップごとに集め濃縮した。各々の分画は溶出 buffer の塩濃度に従って HA (0.001), HA (0.01), HA (0.01~0.1), HA (0.1), HA (0.2) と命名した。

2) Ca^{2+} 結合能の測定

Chelex 100 method¹¹⁾ を用いて測定し, 結果を dpm/ μg protein にて示した。

3) アルカリホスファターゼ活性の測定

p-ニトロフェニルホスファターゼ活性として Brasitus らの方法¹²⁾で測定し, 結果を pmol/min/ μg protein にて示した。

4) 蛋白質濃度の測定

Lowry 法¹³⁾を用いて測定し, Triton を含む溶液については Duley および Grieve の変法¹⁴⁾で測定した。標準としてウシ血清アルブミンを用いた。

5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下 SDS-PAGE)

Laemmli 法¹⁵⁾に従った, 10~20% グラジエントゲルを用い, 3 mmol/l EDTA, 15 mmol/l DTT, 1.5%

SDS を含む試料を 100℃ で 3 分間加熱処理し, 60 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。染色はクマシーブリリアントブルーで行った。

6) In situ Ca^{2+} binding on nitrocellulose¹⁶⁾

SDS-PAGE の各バンドの Ca^{2+} 結合能を検討するためゲルをニトロセルロース膜に転写後, 37 MBq/l $^{45}\text{CaCl}_2$ を含む溶液中で 10 分間 incubation を行った。この膜を蒸留水にて 5 分間洗浄し, 室温にて 3 時間乾燥させた後, Kodak X-OMAT film に 48 時間露光させ autoradiogram を得た。

7) ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー(以下ゲルろ過 HPLC)

サンプルは Bio-beads SM 2 を用いて Triton X-100 を除去後, 0.3 mol/l NaCl, 0.1% Emulgen 109 P を含む 0.2 mmol/l リン酸ナトリウム buffer pH 6.8 に対して透析し用いた。システムは TOYO SODA の HLC-803 D, カラムは TSKgel 4000 SW を用い, 上記 buffer にて流速 1 ml/min で溶出し, 280 nm の吸光度

で蛋白質濃度を測定した。

8) Ca^{2+} 解離定数 (K_d) および Ca^{2+} binding site 数の測定

蛋白質 3 μg をニトロセルロース膜に 96 サンプル・マイクロフィルトレーション装置 (イムノドット AE-6190 アー社) を用いて吸着させ, ^{45}Ca を含む Ca 濃度 1~80 $\mu\text{mol/l}$ 中で incubation 後, 蒸留水で洗浄しニトロセルロース膜に結合した ^{45}Ca の放射能を測定した。その結果を Scatchard の方法で解析し, K_d および Binding site 数を決定した。

実験に用いた器具は 1 mmol/l EGTA で洗浄したものを用い, 溶液自体の Ca^{2+} 濃度は原子吸光計 (Shimadzu AA 650) を用い測定し 1 $\mu\text{mol/l}$ 以下であることを確認した。

9) 精製膜蛋白質のウェスタンブロット分析

10~20% グラジエントゲルを用い Laemmli 法で SDS-PAGE 電気泳動後, Van Eldik らの方法¹⁷⁾ に従い一次抗体に sheep anti-calmodulin antibody, 二次抗

Fig. 1 Gel filtration column chromatography of HPM-CaBP. Butanol extract of membrane fractions from human placenta was applied to a Sepharose 6 B column (35×880 mm) and eluted with 13 mmol/l Tris-HCl containing 0.1% Triton X-100, pH 7.4. The flow rate was 0.6 ml/min and 6 ml fractions were collected.

●; Protein, ○; Ca binding activity, △; p-nitrophenyl phosphatase

体にbiotin conjugated anti-sheep IgGを用いて行った。

10) カルモジュリンの定量法

Dedman らの方法¹⁸⁾に従いカルモジュリンの cAMP ホスホジエステラーゼ (以下 PDE) 活性化能を分光光度計 (Shimadzu UV-300) にて吸光度 265 nm の減少により測定した。

11) Ca 負荷による易動度の変化

Umeki らの方法¹⁹⁾に従い、精製膜蛋白質とカルモジュリンを 3 mmol/l EGTA, または 3 mmol/l CaCl_2 存在下で 40% グリセロールを含む 10% ポリアクリルアミドゲルにて 30 mA, 45 分電気泳動を行った。

12) 等電点電気泳動

Ampholine を用いて pH 2.5~4.2 のポリアクリルアミドゲルを調製し、pI markers (pH 2.4~5.65) を標準とし 2,000 V, 100 mA, 25 W, 3 時間電気泳動を行った。

結 果

1. Ca^{2+} 結合膜蛋白質 (HPM-CaBP) の分離精製

(1) Butanol extract の作製

200 g のヒト胎盤の絨毛より、前述の方法により蛋

白質量 126 mg の Butanol extract を得た。

(2) 各クロマトグラフィーによる分離精製

Fig. 1 に Sepharose 6 B ゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出パターンを示した。2 個の Ca^{2+} 結合能のピークとアルカリホスファターゼ活性のピークを得た。次にこの Ca^{2+} 結合能のピーク分画を集め濃縮し (Sephacrose 分画), DE-52 イオン交換クロマトグラフィーに負荷し、塩濃度勾配にて溶出した (Fig. 2)。その結果、塩濃度 0.35 mol/l 前後に Ca^{2+} 結合能のピークを得、アルカリホスファターゼ活性を持つ蛋白質と完全に分離された。次にこのピーク分画 (No. 60~75) を濃縮し (DE 分画), hydroxylapatite クロマトグラフィーに負荷し、各濃度のリン酸ナトリウム buffer, pH 6.8 にて順次溶出し、各濃度分画の蛋白ピークを濃縮し集めた (HA 分画)。

(3) SDS-PAGE による検計

Fig. 3 に hydroxylapatite クロマトグラフィーにおける各濃度のリン酸ナトリウム buffer にて溶出された蛋白質の SDS-PAGE を示した。その結果、HA (0.01) 分画 (Lane 3) において、単一バンドを示した。この蛋白質のモノマーの分子量は約 19 kDa であっ

Fig. 2 DEAE-cellulose column chromatography of HPM-CaBP. Fractions No. 50~70 from the Sepharose 6 B column (Fig. 1) were applied to DE-52 column (11×280) and eluted with a linear gradient of NaCl (0~0.5 mol/l) in 13 mmol/l Tris-HCl containing 0.1% Triton X-100, pH 7.4. The flow rate was 0.3 ml/min and 3 ml fractions were collected.

●: Protein, ○: Ca binding activity, △: p-nitrophenyl phosphatase

Fig. 3 SDS-PAGE (10~20% gradient gel) of HPM-CaBP separated by hydroxylapatite column chromatography. Fractions No. 60~75 from the DE-52 column (Fig. 2) were applied to a hydroxylapatite column and eluted with the increased concentration of sodium phosphate buffer pH 6.8. Each hydroxylapatite (HA) fraction was analyzed by SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie brilliant blue.

Lane 1; DEAE fraction, Lane 2; HA (0.001), Lane 3; HA (0.01), Lane 4; HA (0.01~0.1), Lane 5; HA (0.1), Lane 6; HA (0.2), Lane 7; bovine brain calmodulin, Lane 8; molecular weight markers.

Numbers in parentheses of the HA fractions (Lanes 2~6) indicate the concentration of sodium phosphate buffer (mol/l) used for elution.

た。また、HA(0.01~0.1)分画(Lane 4)と HA(0.1)分画(Lane 5)でも同分子量にバンドが認められたが、この分画は他にも複数のバンドが認められた。

(4) 各精製段階における蛋白質量と Ca^{2+} 結合能の比較

ヒト胎盤の絨毛 200 g から 5,700 mg の蛋白質を含む homogenate が得られ、先に示した方法に従い精製を進めた結果、1.27 mg の Ca^{2+} 結合膜蛋白質が得られた。また、各段階における Ca^{2+} 結合能を相対的に比較した結果、homogenate の μg 蛋白質当たりの Ca^{2+} 結合能を 1 とすると精製段階では 52.5 倍になった (Table 1)。

Fig. 4 In situ Ca^{2+} binding of the HPM-CaBP on nitrocellulose. Hydroxylapatite fractions were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with ^{45}Ca using the Ca overlay method¹⁶⁾. Lane 1; bovine brain calmodulin, Lane 2; HA (0.01), Lane 3; HA (0.01~0.1), Lane 4; HA (0.1)

2. 精製膜蛋白質の特徴

(1) Ca^{2+} 結合能

ニトロセルロース膜上での in situ Ca^{2+} 結合の結果を Fig. 4 に示した。HA (0.01) 分画の分子量約 19 kDa の単一バンドにカルモジュリンと同様に Ca^{2+} 結合能が認められた。また、複数のバンドを持つ他の分画でもこのバンドにのみ Ca^{2+} 結合能が認められた。

(2) ゲルろ過 HPLC による分子量の測定

SDS-PAGE において単一バンドとして認められた HA (0.01) 分画をゲルろ過 HPLC にて検討した結果、Fig. 5 に示したように単一ピークが認められた。これより精製された膜蛋白質の界面活性剤存在下の非還元状態での見かけの分子量は約 120 kDa であった。

(3) Ca^{2+} 解離定数 (Kd) および Ca^{2+} binding site 数の測定

精製膜蛋白質の分子量を 120 kDa として Scatchard 分析を行った結果、 Ca^{2+} に対して単一の親和性を持ち、Kd が $1.9 \mu\text{mol/l}$ 、binding site 数が $4.4 \text{ mol Ca/mol protein}$ であった。

(4) 免疫学的性質

精製膜蛋白質分画とその他の hydroxylapatite クロマトグラフィー分画に対して抗カルモジュリン抗体を

用いてウェスタンブロット分析を行った。Lane 1 のカルモジュリンと同様に Lane 2 の精製膜蛋白質も抗カルモジュリン抗体と免疫学的交叉反応を示した (Fig. 6)。

(5) Ca^{2+} 負荷による易動度の変化

Fig. 7 に示したポリアクリルアミドゲル電気泳動

で、3 mmol/l EGTA 存在下の易動度に比較し、3 mmol/l CaCl_2 の存在下ではカルモジュリンと同様に精製膜蛋白質の易動度が減少した。

(6) 等電点電気泳動

精製膜蛋白質の等電点は、3.95 であり同時に行った

Fig. 5 Gel permeation HPLC of the HPM-CaBP. Gel permeation HPLC of HA (0.01) fraction on a TSKgel 4000 SW column was performed in 0.2 mmol/l sodium phosphate pH 6.85 containing 0.3 mmol/l NaCl and 0.1% Emulgen 109 P at a flow rate of 1 ml/min and the absorbance was measured at 280 nm.

Fig. 6 Western blot analysis of the HPM-CaBP. Hydroxylapatite fractions were separated by SDS-PAGE (10~20% gradient gel), transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with anti-calmodulin antibody, biotin conjugated antisheep IgG, avidine-labelled horseradish peroxidase, successively. The membrane was finally treated with 3, 3'-diaminobenzidine (tetrahydrochloride) to visualize proteins. Lane 1; bovine brain calmodulin, Lane 2; HA (0.01), Lane 3; HA (0.01~0.1)

Table 1 Protein and activities of each purification step

Fraction	Protein		Calcium binding activity				PDE activity			
	Total mg	% of total	Specific activity dpm/ μ g protein	Purifi- cation	Total activity 10^4 dpm	% of total	Specific activity nmol/min/ μ gprotein	Purifi- cation	Total activity μ mol/min	% of total
Homogenate	5,700	100	10.0	1.0	5,700	100	0.510	1.0	918.0	100
Butanol extract	126	2.2	32.1	3.21	404	7.0	—	—	—	—
DE-52	6.16	0.1	388	38.8	240	4.2	—	—	—	—
Purified protein	1.27	0.022	525	52.5	66.6	1.1	20.8	40.7	19.9	2.1

Ca binding activity was measured by Chelex 100 method⁽¹⁾ and PDE activity was measured by the method of Dedman et al⁽¹⁸⁾.

Fig. 7 Ca^{2+} induced change in the electrophoretic mobility of the HPM-CaBP. Bovine brain calmodulin (Lanes 1 and 3) and the HPM-CaBP (Lanes 2 and 4) were treated with either 3 mmol/l EGTA (Lanes 1 and 2) or 3 mmol/l CaCl_2 (Lanes 3 and 4) and subjected to a 10% polyacrylamide gel containing 40% glycerol.

カルモジュリンの値と同一であった。

(7) PDE 活性化能の測定

PDE 基本比活性は、 $0.169 \text{ nmol/min}/\mu\text{g protein}$ であったが、Table 1 に示すように精製膜蛋白質による PDE 活性化能 (基本活性値を差し引いた値) は、 $20.8 \text{ nmol/min}/\mu\text{g protein}$ であった。従ってカルモジュリンと同様にこの膜蛋白質も PDE 活性化能を持つことがわかった。

以上の特徴および結果よりこの膜蛋白質は、細胞質型カルモジュリンの特徴を持つ膜結合型のカルモジュリンと同定された。

3. 膜結合型カルモジュリンの Ca^{2+} 依存性膜結合

(1) SDS-PAGE と in situ Ca^{2+} 結合実験による検討

胎盤をホモジュナイズする段階で、 2 mmol/l EGTA を加え Ca をキレートすることにより膜結合型カルモジュリンが Ca^{2+} 依存性に膜へ結合しているか否かを検討した。Fig. 8 の SDS-PAGE に示すよう

Fig. 8 Effect of in vitro EGTA treatment on distribution of calmodulin in human placenta cells. Calmodulin was purified from human placenta in the presence (Lanes 1 and 3) or absence (Lanes 2 and 4) of 2 mmol/l EGTA and analyzed by SDS-PAGE.

Lanes 1 and 2; supernatant of placenta homogenate (cytosolic fractions), Lanes 3 and 4; butanol extract of membrane fractions from placenta homogenate, Lane 5; purified membrane protein, Lane 6; bovine brain calmodulin, Lane 7; molecular weight markers

に EGTA 処理した膜分画 (Lane 3) においても未処理の膜分画 (Lane 4) と同様に膜結合型カルモジュリンと同分子量の位置にバンドが認められた。

また、 ^{45}Ca autoradiography にて Ca^{2+} 結合能を検討した結果 EGTA の有無に関わらず、上清分画 (Lane 1, 2), 膜分画とも上記のバンドに Ca^{2+} 結合能が認められ、EGTA 処理によっても膜分画にカルモジュリンが存在することが示された (Fig. 9)。

(2) 膜結合型カルモジュリンの割合

カルモジュリンを PDE 活性化能として定量した結果、Table 2 に示すように EGTA 未処理の場合、膜結合型は全カルモジュリンの 8.3% を占めたが、EGTA 処理により 3.4% に減少した。また、これを反映し上清中の細胞質型は EGTA 処理により増加した。従って、膜結合型カルモジュリンの約 28% は Ca^{2+} 非依存性に膜へ結合していることが示唆された。

Fig. 9 In situ Ca^{2+} binding of calmodulin in human placenta cells on nitrocellulose. Proteins separated on a polyacrylamide gel (Fig. 8) were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with ^{45}Ca . The arrow indicates calmodulin. Lanes 1~6 correspond to those of Fig. 8.

考 察

この研究では Ca^{2+} 能動輸送が盛んに行われていて^{9,10)}, しかも入手しやすい正常妊娠の胎盤絨毛を用い Ca^{2+} 結合能を持つ膜蛋白質の分離精製を試み, その性質を検討した. その結果, Ca^{2+} を介した種々の細胞内反応で重要な調節因子としての役割を持つカルモジュリンが主要な Ca^{2+} 結合膜蛋白質として存在していることが明らかになった.

この実験では, Ca^{2+} 結合能を持つ膜蛋白質 (HPM-CaBP) の精製法として, ラット腸管粘膜の主要な Ca^{2+} 結合膜蛋白質である IMCAL を精製した Schachter ら⁸⁾の方法に準じて行ったが, 胎盤絨毛細胞膜ではカルモジュリンが最も量的に多い Ca^{2+} 結合膜蛋白質であり, IMCAL に相当する Ca^{2+} 結合膜蛋白質は検出できなかった. また, これまで, カルモジュリンはほとんどアフィニティークロマトグラフィーにより精製されているが²⁰⁾, 特にアフィニティークロマトグラフィーを用いなくても Schachter ら⁸⁾の方法で, 均一な膜結合型カルモジュリンが精製できた.

カルモジュリンは, はじめ cAMP 分解酵素である PDE の活性化因子としてほ乳類の脳より同定された^{21,22)}. その後多くの動植物の様々な組織において細胞内 Ca^{2+} 受容蛋白質として同定され, PDE 以外にも

Table 2 Effect of EGTA treatment on distribution of calmodulin

	Specific activity nmol/min/ μg protein	Total activity $\mu\text{mol/min}$	% of total
EGTA(-)			
Supernatant of homogenate	0.727	815.6	91.7
Membrane fraction	0.431	74.4	8.3
EGTA(+)			
Supernatant of homogenate	1.082	1,178.0	96.6
Membrane fraction	0.172	42.5	3.4

Table 3 Comparison of physicochemical properties of cytosolic and membrane bound calmodulin

	Cytosolic calmodulin ²⁰⁾	Membrane bound calmodulin
Molecular weight	19,000	19,000
Isoelectric point	3.9~4.3	3.95
Number of Ca^{2+} -binding sites	4.0	4.4
Dissociation constant	$2.4 \times 10^{-6} \text{mol/l}$	$1.9 \times 10^{-6} \text{mol/l}$
Ca^{2+} induced change in the electrophoretic mobility on a gel	(+)	(+)
Activation of cAMP PDE activity	(+)	(+)

アデニル酸シクラーゼ²³⁾, Ca^{2+} -ATPase^{2~5)}, ホスホリパーゼ A_2 ²⁴⁾, ホスホリラーゼキナーゼ²⁵⁾などの酵素活性を調節することが認められた。現在では多機能性調節蛋白質として動植物から原生生物まで広く分布し、生化学的に極めて保存性の高い制御因子であり、生体の重要な代謝に深く関わっていると考えられている。

Kakiuchi ら²⁶⁾は、ラット、ウシの各臓器、組織では上清および膜画分の両方にカルモジュリン活性が存在することを報告している。また、細胞質型カルモジュリンが前述のアデニル酸シクラーゼ、 Ca^{2+} -ATPase、ホスホリパーゼ A_2 などの膜酵素や膜蛋白質であるスペクトリンなどと結合できることが報告²⁷⁾されている。

これまで詳細に研究されている細胞質型のカルモジュリンと今回著者が、ヒト胎盤から精製した膜結合型カルモジュリンとの生化学的比較を Table 3 に示す。これら2種類のカルモジュリンは免疫学的に交叉するのみならず、生化学的性質もほとんど同一であることがわかる。

Sobue ら²⁹⁾は、ウシの脳における膜画分の Ca^{2+} 非依存性結合カルモジュリンが、上清画分のものと分子量、PDE 活性化能、 Ca^{2+} 負荷による構造変化の点で細胞質型カルモジュリンに一致することを報告しているが、著者の実験では、さらに等電点、 Ca^{2+} 結合数、解離定数においても細胞質型と膜結合型カルモジュリンの性質が一致していることが示された。これらの結果は、両者が同一分子であり、細胞内では細胞質型と膜結合型の2つの形態で存在していることを示唆している。現在までヒト胎盤におけるカルモジュリンの存在¹⁹⁾は、報告されているが、胎盤においてもカルモジュリンが膜蛋白質として存在し、かつそれが最も量的に多い Ca^{2+} 結合膜蛋白質であるということは今回初めて明らかにされた。

Kakiuchi ら²⁶⁾は、膜結合型カルモジュリンは Ca^{2+} 依存性と Ca^{2+} 非依存性の2種類の様式により膜に結合していると報告している。今回、胎盤においても同様のメカニズムでカルモジュリンが膜に結合していると考え検討した結果、 Ca^{2+} 依存性および非依存性膜結合が認められた。 Ca^{2+} 非依存性膜結合様式は、単に Ca^{2+} をキレートしただけでは膜より分離せず、かつ Triton X-100 により可溶化されることから、細胞質型カルモジュリンが膜脂質中に内在していると考えられる。 Ca^{2+} 非依存性の膜結合型カルモジュリンの存在様式は現在まだ解明されていないが、界面活性剤存在下

でゲル濾過 HPLC による非還元状態での見かけの分子量が、約 120 kDa であったことから膜内で会合している可能性が考えられる。

ヒト胎盤のカルモジュリンの細胞内分布および膜結合における Ca^{2+} 依存性および非依存性の割合を検討した結果、全カルモジュリンの 8.3% が膜結合型カルモジュリンとして存在し、このうちの 72% が Ca^{2+} 依存性に、28% が Ca^{2+} 非依存性に膜に結合していることが示された。すなわち、ヒト胎盤では全カルモジュリンの 3.4% が Ca^{2+} 非依存性膜結合型カルモジュリンであった。

Ca^{2+} 非依存性膜結合型カルモジュリンは、ラット大脳、小脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓において各組織、臓器の全カルモジュリンの 27%, 28%, 37%, 26%, 46%, 63% を占めるという報告²⁶⁾があり、これらに比較しヒト胎盤では 3.4% であり、著明に少ないと考えられる。Uenishi ら³⁰⁾や Evain ら³¹⁾によると、増殖速度の盛んな細胞ほど上清分画のカルモジュリンが多く、また増殖に伴いカルモジュリンが膜分画から上清分画へ移行するという。胎盤で Ca^{2+} 非依存性膜結合型カルモジュリンの占める割合が少ないということは胎盤組織では、盛んに細胞増殖が行われてきたことを反映しているものと考えられる。

細胞増殖速度により細胞内カルモジュリンの分布が変化することの分子機構や生理的意義はまだわかっていない。今回、分離精製された膜結合型カルモジュリンが細胞質型とどのように関わり、どのような機能を持っているかは今後の研究課題である。

結 論

ヒト正常胎盤の絨毛を用いて膜分画を分離し、主要な Ca^{2+} 結合能を持つ膜蛋白質の分離精製およびその性質の検討を行い、以下の結果を得た。

1) ヒト正常胎盤の絨毛において主要な Ca^{2+} 結合能を持つ膜蛋白質は、カルモジュリンであった。

2) この膜結合型カルモジュリンは、分子量、等電点、 Ca^{2+} 結合数、 Ca^{2+} 解離定数、 Ca^{2+} 負荷による PAGE 上の易動度の減少、PDE 活性化能の存在においてすべて細胞質型カルモジュリンの特徴と一致した。

3) 膜結合型カルモジュリンは、全カルモジュリン中 8.3% を占め、このうち 72% が Ca^{2+} 依存性結合であり、28% が Ca^{2+} 非依存性結合であった。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲いただきました日本医科

大学生化学第2教室島田 隆教授, 吉野芳夫名誉教授に深謝いたします。また, 胎盤を御提供いただいた日本医科大学付属第二病院産婦人科学教室田口正男先生および御協力下さった教室員各位に感謝すると共に, 本研究を実施する機会と御援助をいただいた日本医科大学内科学第3教室野村武夫教授に深謝致します。

なお, 本論文の一部は, 第44回日本栄養・食糧学会総会(1990年), および第63回日本生化学会大会(1990年)において発表した。

文 献

- 1) Rasmussen, H.: Pathways of amplitude and sensitivity modulation in the calcium messenger system. *Calcium and cell function*, vol. 4 (Cheung, W.Y., ed.), p. 2~61, Academic Press, New York, 1983.
- 2) Somlyo, A.P.: Cellular site of calcium regulation. *Nature*, 309, 516~517, 1984.
- 3) Schatzmann, H.J.: The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and animal cells. *Membrane transport of calcium* (Carafoli, E., ed.), p. 41~108, Academic Press, New York, 1982.
- 4) Penniston, J.T.: Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase as active Ca^{2+} pumps. *Calcium and cell function*, vol. 4 (Cheung, W.Y., ed.), p. 99~149, Academic Press, New York, 1983.
- 5) Carafoli, E. and Zurini, M.: The Ca^{2+} -pumping ATPase of plasma membranes purification, reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 683, 279~301, 1982.
- 6) Tada, M., Kirchberger, M.A. and Katz, A.M.: Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 250, 2640~2647, 1975.
- 7) Tada, M., Inui, M., Yamada, M., Kadoma, M., Kuzuya, T., Abe, H. and Kakiuchi, S.: Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3',5'-monophosphate and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 15, 335~346, 1983.
- 8) Kowarski, S. and Schachter, D.: Intestinal membrane calcium-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 255, 10834~10840, 1980.
- 9) Twardock, A.R. and Austin, M.K.: Calcium transfer in perfused guinea pig placenta. *Am. J. Physiol.*, 219, 540~545, 1970.
- 10) Delivoria-Papadopoulos, M., Battaglia, F.C., Bruns, P.D. and Meschia, G.: Total, protein-bound, and ultrafilterable calcium in maternal and fetal plasmas. *Am. J. Physiol.*, 213, 363~366, 1967.
- 11) Wasserman, R.H. and Taylor, A.N.: Vitamin D_3 -induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*, 152, 791~793, 1966.
- 12) Brasitus, T.A., Schachter, D. and Mamounas, T.G.: Functional interactions of lipids and proteins in rat intestinal microvillus membranes. *Biochemistry*, 18, 4136~4144, 1979.
- 13) Lowey, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275, 1951.
- 14) Dulley, J.R. and Grieve, P.A.: A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal. Biochem.*, 64, 136~141, 1975.
- 15) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680~685, 1970.
- 16) Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S.: Detection of calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem.*, 95, 511~519, 1984.
- 17) Van Eldik, L.J. and Wolchok, S.R.: Conditions for reproducible detection of calmodulin and S100 β in immunoblots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124, 752~759, 1984.
- 18) Dedman, J.R. and Means, A.R.: Characterization of a spectrophotometric assay for cAMP phosphodiesterase. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 3, 139~152, 1977.
- 19) Umeki, S., Nagao, S. and Nozawa, Y.: The purification and identification of calmodulin from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta*, 674, 319~326, 1981.
- 20) Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B.: Ca^{2+} -induced hydrophobic site on calmodulin; Application for purification of calmodulin by Phenyl-Sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104, 830~836, 1982.
- 21) Kakiuchi, S. and Yamazaki, R.: Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1104~1110, 1970.
- 22) Cheung, W.Y.: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 533~538, 1970.
- 23) Brostrom, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B.M. and Wolf, D.J.: Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 64~68, 1975.
- 24) Wong, P.Y.K. and Cheung, W.Y.: Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A_2 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 473~480, 1979.
- 25) Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. and Nairn, A.C.: Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *F.E.B.S. Lett.*, 92, 287~293, 1978.
- 26) Kakiuchi, S., Yasuda, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Kanda, K., Kakiuchi, R. and Sobue, K.: Quantitative determinations of calmodulin in supernatant and particulate fractions of mammalian tissues. *J. Biochem.*, 92, 1041~1048, 1982.
- 27) Sobue, K., Muramoto, Y., Fujita, M. and Kakiuchi, S.: Calmodulin-binding protein of erythrocyte cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100, 1063~1070, 1981.
- 28) Klee, C.B.: Calmodulin; Structure-function relationships. *Calcium and cell function*, vol. 1 (Cheung, W.Y., ed.), p. 59~77, Academic Press, New York, 1980.
- 29) Sobue, K., Yamazaki, R., Yasuda, S. and Kakiuchi, S.: Identity of the particulate form of calmodulin with soluble calmodulin. *F.E.B.S. Lett.*, 129, 215~219, 1981.

- 30) Uenishi, K., Criss, W.E. and Kakiuchi, S.: Calcium-activatable phosphodiesterase and calcium-dependent modulator protein in transplantable hepatoma tissues. *J. Biochem.*, 87, 601~607, 1980.
- 31) Evain, D., Klee, C. and Anderson, W.B.: Chinese hamster ovary cell population density affects intracellular concentrations of calcium-dependent regulator and ability of regulator to inhibit adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3962~3966, 1979.

(受付: 1992年 4 月14日)