

4-1 細胞内カルシウムイオン測定用試薬

Ca^{2+} の情報伝達物質としての働きは、筋収縮の研究から初めて明らかにされた。神経からの刺激が筋細胞に伝わると、筋小胞体から放出された Ca^{2+} がカルシウム受容タンパク質に取り込まれ、急激な構造変化を起こす。これがアクチンとミオシンの反応のきっかけとなって筋収縮がおこる。キレート剤を用いて Ca^{2+} を取り去ると筋肉は弛緩する。その他、代謝調節、生理活性物質の分泌現象などの細胞機能においても Ca^{2+} の重要性が認識され、その細胞内での挙動に着目した研究は大きな広がりを見せている。

Ca^{2+} の作用についての分子論的な理解のためには、細胞内での Ca^{2+} 濃度変化を測定する必要がある。1980年に R. Y. Tsien らは細胞内カルシウムの濃度測定法として、蛍光プローブ Quin 2 を用いる方法を発表した。

BAPTA の分子構造に蛍光性発色団をうまく組み込み、 Mg^{2+} に対する 10^5 倍の選択性を可能とし、更に細胞膜の脂質二分子膜層を透過できる脂溶性のアセトキシメチルエステル体 (Quin 2-AM) を合成した点で彼らの創案は優れていた。

この方法は多くの研究者の関心を集めた。Quin 2 による Ca^{2+} 測定法が普及するに連れて、更に次のような改良が望まれた。

- 1) 励起波長が 339 nm と短波長のため、細胞自身の自己蛍光が無視できない。励起波長としては長波長側が望ましい。
- 2) Quin 2 錯体の蛍光量子収率は Dansyl 基と同程度と言うものの低い。細胞内への担持量を減らすため、発光の強いものが望ましい。

3) Quin 2 は Ca^{2+} と錯形成し蛍光強度の増大を示すが、励起・蛍光波長は変化しない。錯形成によって、波長変化があれば二波長蛍光測光ができる。

4) Quin 2 と Ca^{2+} の親和力は強く、 10^{-7} mol/l 以下のレベルには適するが $\mu\text{mol/l}$ レベルでは飽和傾向にある。やや親和力の低いものが望ましい。

5) Quin 2 と Mg^{2+} の解離定数は $1 \sim 2$ mmol/l で 399 nm での励起には少しの影響しかないが、重金属による消光作用等も考慮すると、より選択的なものが望ましい。

R. Y. Tsien らは、これらの要求を受けていくつかの蛍光プローブを合成した。その中から Quin 2 より蛍光強度が約 30 倍強く、 Ca^{2+} との錯形成により励起波長のシフトがあり、かつ Mg^{2+} 及び重金属に対する Ca^{2+} 選択性の大きな試薬として Fura 2 を見出した。さらに Indo 1, Fluo 3, Rhod 2 が開発された。その後、Fluo 3 のクロロ基 (Cl) をフルオロ基 (F) へと置き換えた Fluo 4 が開発され、アルゴンレーザー励起において蛍光強度が Fluo 3 の約 2 倍と高感度なものとなった。それぞれに細胞膜透過性の AM 体も用意されている。

下図に Fluo 3 のアセトキシメチルエステル体 Fluo 3-AM を用いたときの膜透過の模式図を示した。Fluo 3-AM は細胞内に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて元の Fluo 3 になる。細胞内 Ca^{2+} は Fluo 3 とのキレーションにより蛍光性錯体となるので、蛍光強度変化として Ca^{2+} 濃度を測定できる ($\lambda_{\text{ex}} = 508$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm)。

