

薬学実習 4 生理化学教室

10191043 鈴木健一

実験 1 細胞内情報伝達の可視化と定量

目的

細胞のシグナル応答を定量的に評価する一連のプロセスを習得する。

細胞外のリガンド ($\text{TNF}\alpha$) に応答し細胞質から核に移行する $\text{NF}\kappa\text{B}$ の挙動を可視化・定量する。

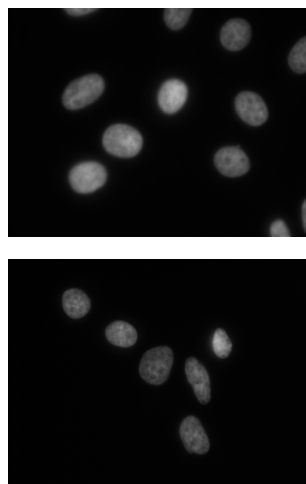
1. 抗体と Hoechst を用いた $\text{NF}\kappa\text{B}$ と核の染色
2. 画像解析ソフト ImageJ を用いた顕微鏡画像の処理と定量

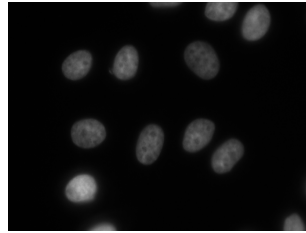
実験方法

実習書に基づき TA の指示にしたがって実験を行った。

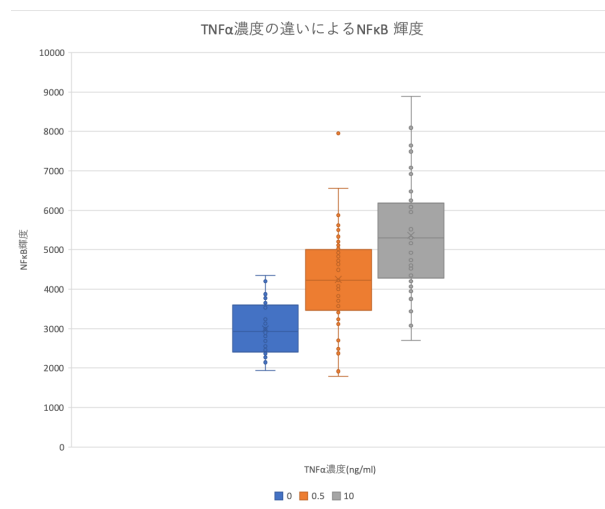
結果・考察

$\text{TNF}\alpha$ を入れなかった時, 0.5ng/ml, 10ng/ml 入れた時の染色された核のグレースケール画像は以下のようになった。





これらの画像をもとに $\text{TNF}\alpha$ の濃度によって $\text{NF}\kappa\text{B}$ の輝度が変化するかどうかを測定する。
 まず濃度に応じて変化する $\text{NF}\kappa\text{B}$ の輝度を箱ひげ図でまとめた。



グラフによると平均値や全体的な輝度も濃度の増加に応じて上昇していると見られる。そこで濃度 0 と 0.5、および 0.5 と 10 の間に有意差があるかを統計的な手法で確かめた。

それぞれの濃度に応じた値の平均、分散、標準偏差は以下の通りである。

濃度	0	0.5	10
平均	2996.888953	4249.949444	5366.179027
分散	390635.796	1441256.756	1993553.633
標準偏差	632.4054461	1214.089202	1431.40844

これをもとに濃度 0 と 0.5、および 0.5 と 10 の間で F 検定を行った。

	0-0.5	0.5-10
F 値	3.690	1.383
有意水準	0.05	0.05
$P(F \leq f)$ 片側	1.90×10^{-5}	0.267

結果より 0-0.5 と 0.5-10 で共に等分散であることが確認されたため、等分散の 2 標本での t 検定を行う。

	0-0.5	0.5-10
t 値	-6.10	-3.87
有意水準	0.05	0.05
P(T≤t) 両側	3.98×10^{-8}	2.61×10^{-4}

結果より、p 値が有意水準を下回っているので 0-0.5 と 0.5-10 の間で共に有意差があることが確認された。したがって NF κ B の核移行の要因として TNF α の濃度変化を想定することは十分な確率で正しいといえる。

実験 2 アイソトープ実習

目的

細胞抽出液の cyclic AMP と放射線のシグナルとの関係を得る

方法

実習書に基づき TA の指示にしたがって実験を行った。

結果・考察

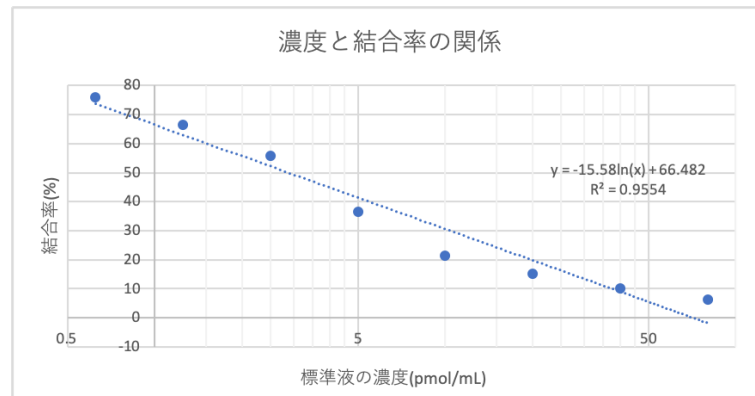
- (1) ImageJ を用いてスポットされた点をグレースケールで評価し、その値を得た。総カウントとブランクのカウントはそれぞれ 400.65, 82.05 となった。よって

$$\frac{B}{T}(\%) = \frac{x - 82.05}{318.60} \times 100$$

となり、CT を加えた各サンプルの濃度ごとに算出した結合率の平均は以下のようになった。

濃度 (μ g/ml)	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40	80
結合率 (%)	76.046	66.561	55.840	36.580	21.267	15.260	10.188	6.2863

- (2) 測定値とともに近似直線を引いたものが以下のグラフである。

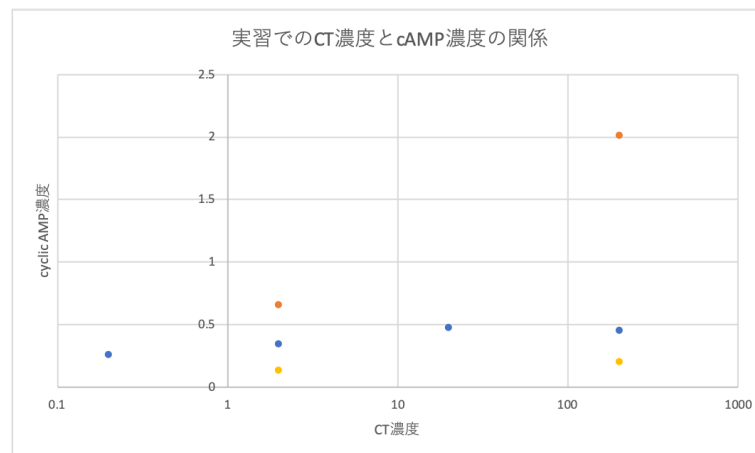


これより、結合率 y は標準液の濃度 x を用いて以下のように表される。

$$y = -15.58 \ln(x) + 66.482$$

- (3) これをもとに、CT 濃度の異なる検体の cAMP 濃度を求め、グラフを作成した。

CT 濃度	PBS	0.2	2	20	200	2	200
cAMP 濃度	0.1256	0.2592	0.3421	0.4763	0.4501	0.1317	0.2012



実習後に配布された PDF に添付されているグラフと見比べると、こちらのグラフは理想的な検量線が引けないようなプロットとなっており、コレラ毒素を出す細胞に不具合があったことが裏付けられる。

- (4) CT 濃度が上昇すると、それに応じて cAMP 濃度も上昇すると思われるが、実習後に配布された PDF に添付されているグラフによると、CT 濃度がある一定の値を超えると cAMP 濃度が頭打ちになることがわかる。これは細胞に対して与えるコレラ毒素が飽和してしまっているからと考えられる。検体 11~14 からわかるように、希釈した CT 濃度をもとに戻した値のプロットからは直線状の検量線が引けることがわかる。
- (5) サクシニル化 cAMP 標準液と結合率の関係は直線となる検量線を引くために片対数を用いた。対数を用いないと、低濃度の領域に点が密集してしまい線をうまく引くことができない。

- (6) 抗体濃度を a 、 $[^{125}\text{I}]$ サクシニル化 cAMP 濃度を b 、サクシニル化 cAMP 濃度を x とおくと、放射性のサクシニル化 cAMP のうち、抗体と結合したものの割合が結合率となるので、 B/T は以下のようなになる。

$$B/T = \frac{a \times \frac{b}{b+x}}{b} = \frac{a}{b+x}$$

課題

1 RI の選択 RI の核種の物理的特性

1-1 RI が放射する放射線の種類

同じ元素で中性子の数が違う同位体の中でも不安定なものは時間とともに放射性崩壊して放射線を発する。これを放射性同位体 (RI) と言う。放射性同位体はアルファ崩壊により原子番号と質量数の異なる核種へ、ベータ崩壊により同質量数で原子番号の異なる核種へと放射性崩壊を起こすほか、ガンマ崩壊という質量数も原子番号も変わらない崩壊の種類もある。

1-2 放射線のエネルギーと測定機器の選択

放射線を測定する機器には様々なものがあり目的や状況に応じて使う必要がある。

- 電離箱式サーベイメータガンマ線によって生じたイオンを中心電極で収集し、その電流を測定することによって線量を評価する。測定範囲は概ね $0.1 \sim 1 \mu\text{Sv/h}$ 以上で使用可能である。正確な線量評価が可能。
- GM 計数管電離箱よりも高い電圧を中心電極と壁材の間に加え、放射線が通ると放電する。この放電によるパルスを計測することで放射線量を測定する。電離箱よりも安価で広く普及しているが、エネルギー特性が悪く正確な線量評価が難しいという欠点がある。
- シンチレーション検出器放射線によって蛍光 (シンチレーション) を発する物質をシンチレーターと呼び、固体のまま、あるいは液体・固体中に溶かし込んで用いられる。シンチレーション検出器は、放射線のエネルギーを蛍光 (シンチレーション) に変換し、さらに光電子増倍管により電気的パルスとして計数する。エネルギーの異なる放射線を放出する核種が混在している場合でも、チャンネルを最適に設定することで、特定の RI を測定することが可能である。

1-3 放射線の物理学的半減期

放射性物質の放射能が半分に減少するまでの時間を放射性物質の「物理学的半減期」という。物理学的半減期は放射性物質に固有の値で、温度、圧力などに依存しない。例えば、ヨウ素 131 の物理学的半減期は約 8 日、セシウム 137 は約 30 年である。また、体内に取り込まれた放射性物質は、「物理学的半減期」に伴い減衰するだけでなく、代謝や排泄などにより体外に排出されることでも減衰する。このような生物学的な過程によって体内の放射性物質が半分に減少する期間を放射性物質の「生物学的半減期」という。放射性物質が体内に取り込まれた場合には、「物理学的半減期」に従った減衰と、「生物学的半減期」に従った減少が同時進行する。両方の半減期を考慮した半減期を実効半減期という。

2 市販品の標識化合物について

比放射量と放射能濃度の違いについて。

- (2-1) 比放射能または質量放射能は、放射性同位体を含む物質の単位質量あたりの放射能の強さのことである。つまり単位時間・単位質量あたりに同一の放射性物質が壊変する回数のことである。放射能の単位は、国際単位系ではベクレル (Bq) を用いるが、そのほかにもキュリー (Ci) やラザフォード (Rd) という単位も存在する。したがって比放射能の次元は、 $M^{-1}T^{-1}$ であり、単位は、Bq/kg、Bq/g、Ci/g などである。比放射能が大きい放射性物質ほど、多くの放射線を出す能力があると言える。
- (2-2) 水や空気あるいは金属など、物質の単位容積あるいは単位重量等の中に含まれている放射能の量を放射能濃度という。単位は、液体および気体の場合 Bq/cm³、固体の場合は Bq/g などを用いる。

RIA の原理

ラジオイムノアッセイは放射免疫分析法とも呼ばれ、微量生体成分の測定法として生物学、医学の分野で広く利用されている。種々の成分が多量に含まれている生体試料中に ng~pg の極微量存在するホルモンのような特定物質の定量に適している。RIA は測定しようとする抗原と放射性核種で標識した抗原とが競合的に抗体と結合することを利用し、結合した複合物質の放射能を測定して微量物質を定量する。ホルモンの他に腫瘍マーカー、特殊蛋白にも適用できる。また、抗原でなく抗体を標識して測定する方法もある。放射性核種としては ^{125}I が最もよく用いられる。

課題 1

コレラは激しい水様性の下痢を伴う致死的な細菌性腸管感染症である。この下痢は菌の産生する毒素によって引き起こされる。コレラ毒素は A サブユニット 1 分子、B サブユニット 5 分子から構成され、A サブユニットは三量体 GTP 結合タンパク質である Gs の α サブユニットを ADP-リボシル化する。この ADP-リボシル化によりアデニル酸シクラーゼが恒常的に活性化され、細胞内 cAMP 濃度が上昇する。B サブユニットは標的細胞表面の GM1 ガングリオシドに結合し、細胞内に A サブユニットを送り込む働きがある。

課題 2

A タンパクは翻訳後、菌自ら分泌するタンパク分解酵素や腸管内のトリプシンによってニックが入り、SS 結合で結ばれた A1,A2 の 2 つのフラグメントとなる。B オリゴマーは、細胞表面のレセプター、GM1 ガングリオシドと強く結合し、コレラ毒素が細胞表面に吸着する役割を担っている。レセプターに結合後、A1-A2 間の SS 結合はグルタチオン等の還元物質により切断され、A1 サブユニットは細胞内に押し込まれる。細胞内に押し込まれた A1 フラグメントは、NAD を認識し、その ADP リボース基を切断し、アデニル酸シクラーゼの活性を制御しているタンパク Gs α 成分に ADP リボシル基を転移する。この ADP リボシル化により、Gs α は GTPase 活性を失い、アデニル酸シクラーゼを不可逆的にさせる。制御

タンパクは、GTP 型と GDP 型をとり、 $GS\alpha$ の不活性化によって GTP 型となり、アデニル酸シクラーゼの持続的な活性化のために cAMP の細胞内濃度が高まる。cAMP 上昇から下痢までのメカニズムは明らかになっていないが、cAMP の上昇によってタンパクカイネースの活性化へと導かれ、いくつかのタンパクリン酸化の過程を経た後、イオン輸送に関するタンパクのリン酸化に起因して、腸管上皮細胞に CL^- が蓄積し、管腔側に対する膜透過性も昂進し、主にクリプト細胞から腸管腔へ CL^- が分泌され、また、絨毛先端部細胞からの Na^+ の能動的吸収の抑制を起こすなどして下痢を起こすと考えられている。

参考資料

- <http://www.microbio.med.saga-u.ac.jp/Lecture/kohashi-sb1/part1/>
- <http://radiation.shotada.com/chapter/03/>
- <https://www.jaea.go.jp/>
- <http://www.jsmp.org/wp-content/uploads/2013/03/m-radiation.pdf>
- <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002wduw-att/2r9852000002we6w.pdf>