

in vitro におけるニッケル刺激したカルシニューリン活性に対するバナジウムの阻害効果

田中佑季^{*1)}，大塚恵美子¹⁾，保坂公平²⁾，田中進¹⁾

(¹⁾ 高崎健康福祉大学健康栄養学科，²⁾ 群馬大学医学部保健学科)

【目的】カルシニューリン (CN) は、Ca²⁺/カルモジュリン (CaM) 依存性セリン/スレオニンホスファターゼの一種であり、ホスホプロテインホスファターゼ 2B として知られており、*in vitro* においてはマンガン (Mn²⁺) やニッケル (Ni²⁺) のような 2 価重金属によって活性化 (刺激) されることが判明している。一方、微量元素の一つであるバナジウムは多様な生理作用を持っており、CN に関しては、Mn²⁺ 刺激した CN 活性に対するオルトバナジン酸、バナジルの効果の検討が *in vitro* で行われている。しかしながら、*in vitro* において CN を最も活性化するのは Ni²⁺ であり、また Mn²⁺ と Ni²⁺ の CN に対する活性化機構も異なっている。したがって、本研究では、いまだ検討されていない Ni²⁺ 刺激した CN 活性に対するオルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジルの効果を調べた。

【方法】CN 活性の測定は基質としてパラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を使用した。すなわち、100 mmol/L HEPES-NaOH (pH7.5)、1 mmol/L CaCl₂、5 mM MgCl₂、3 mmol/L pNPP、0.2 mmol/L NiCl₂ を含む反応溶液にそれぞれ 3U の CN と CaM を添加したものを酵素反応液とした。これに任意の濃度のオルトバナジン酸、メタバナジン酸、バナジルをそれぞれ加え、30°C、60 分間、酵素反応を行った。60 分後、終濃度で 0.8 mol/L の Na₂CO₃ を加え、酵素反応を停止し、酵素反応で生成したパラニトロフェノールを A₄₁₀ で測定することにより、酵素活性を求めた。

【結果と考察】オルトバナジン酸、メタバナジン酸は Ni²⁺ 刺激した CN 活性に対して約 100 μmol/L の濃度までは阻害作用を示し、50%阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ約 25 μmol/L、8 μmol/L であった。しかしながら、100-1,000 μmol/L の高濃度では弱い CN 活性の上昇が見られ、Mn²⁺ 刺激では観察されなかった二相性の作用を示した。バナジルは、20 μmol/L 以下、500-2,000 μmol/L の濃度範囲では阻害作用を認め、それぞれの IC₅₀ は約 6 μmol/L、900 μmol/L であった。一方、20-500 μmol/L の濃度範囲では CN 活性の回復が認められた。Mn²⁺ 刺激でのバナジルは低濃度 (0.5-50 μmol/L) では阻害活性を、高濃度 (500-5,000 μmol/L) では CN 活性が約 3 倍上昇することが報告されている。したがって、Ni²⁺ と Mn²⁺ 刺激の結果は一致しないものの、両刺激の CN 活性に対するバナジルの作用は二相性を示すことが明らかとなった。