

ATP の ^{31}P 核磁気共鳴による Mg^{++} の定量

川崎医科大学 薬理学教室

渡 辺 悟, 齋 藤 泰 一

同 生化学センター

寺 元 弘 子

同 物理学教室

虫 明 基

(昭和62年1月16日受付)

Determination of Mg^{++} Concentration by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance of ATP

Satoru Watanabe, Taiichi Saito

Hiroko Teramoto* and Motoi Mushiaki**

Departments of Pharmacology, Biochemical Center*
and Physics**, Kawasaki Medical School

(Accepted on January 16, 1987)

Mg^{++} の濃度測定のための検量線が ATP (アデノシン三リン酸) の ^{31}P のフーリエ変換核磁気共鳴 (FT-NMR) に基づくケミカルシフト ($\delta_{\alpha\beta}$) およびカップリング定数 ($J_{\alpha\beta}$) から求められた。ATP の ^{31}P のケミカルシフトは Mg^{++} の濃度が 0~5.0 mM の範囲で濃度依存性を示し、使用可能なほぼ直線的な検量線を与えた。 αP のカップリング定数は 1.0~5.0 mM の範囲で濃度依存性を示したが 1.0 mM 以下では不定であり有効な検量線が描けなかった。 Mg^{++} と Ca^{++} が共存する場合、 J は全く不規則な値を示して一定せず、検量線作製に無効であったが、 $\delta_{\alpha\beta}$ は一定の関数になり、一方の濃度あるいは全イオン量が明らかかな場合使用可能であった。

Determination curves were obtained for the measurement of Mg^{++} concentration based on chemical shift ($\delta_{\alpha\beta}$) and the coupling constant ($J_{\alpha\beta}$) of FT-nuclear-magnetic resonance (FT-NMR). The chemical shift of ^{31}P in ATP was dependent on the Mg^{++} concentration and showed a nearly straight line for Mg^{++} determination in the range of 0~5.0 mM concentration. The coupling constant of ^{31}P was dependent on Mg^{++} concentrations in the range of 1.0~5.0 mM, but did not show any dependency at concentrations under 0.5 mM. When Mg^{++} and Ca^{++} coexisted the determination curve founded on the chemical shift could not be used for Mg^{++} determination unless the concentration of one of the ions or amount of total ions in the solution was known. In addition, the coupling constant was not useful for the preparation of the determination curve because of its irregular value.

Key Words ① ^{31}P nuclear magnetic resonance ② Mg^{++} ③ Ca^{++}

はじめに

ATPは Mg^{++} と相互作用する。相互作用したときの ^{31}P の核磁気共鳴(NMR)のケミカルシフトは Mg^{++} 濃度に依存していると報告されている。^{1)~3)}従来、 Mg^{++} の濃度測定は主として溶液状態でのみ測定可能な原子吸光分析が用いられているが、NMRは非破壊的に ^{31}P を測定できるために、 ^{31}P のケミカルシフトを利用して細胞の代謝研究^{4),5)}や赤血球中の Mg^{++} の測定⁶⁾に用いられている。しかし、本実験で直接赤血球中のATPの ^{31}P のNMRの測定を試みたが、ノイズが高く十分な成績が得られなかった。したがって、ここではFT-NMRに基づくATPの ^{31}P の吸収が Mg^{++} と相互作用した時、 αP と βP のケミカルシフトおよび αP のカップリング定数が実際に Mg^{++} 濃度とどのような関係にあるかを標準試料を調製して調べた。高濃度(5mM以上)の Mg^{++} がATPと相互作用したときのATPのケミカルシフトおよびP-Pカップリング定数については報告¹⁾がある。ここでは實際上、生体組織は Mg^{++} の濃度が5mM以下の場合が多いため、この濃度以下の検量線の直線性、温度依存性および実際の試料について Mg^{++} の濃度を測定し、また Ca^{++} の影響についても検討を行ったので報告する。

研究方法

1) 試薬

水は脱イオン後蒸留した純水を用いた。ATPおよび $MgCl_2$ と $CaCl_2$ はSigma社(U.S.A.)および和光純薬工業からそれぞれ購入した。

2) NMRの測定

検量線の作成に用いた試料は5mM ATP, 0.02M bis-tris buffer, 0.15M KCl, 10% D_2O , および各種 Mg^{++} あるいは Ca^{++} 濃度を含み、pHは7.2であった。実際に測定に用いたcoke, 牛乳, 健康人の唾液および尿は D_2O を10%およびATPを5mM含み、pHが7.2になるように1.0HClを用いて調製した。 ^{31}P NMRスペ

クトルはVarian XL-200超伝導フーリエ変換核磁気共鳴装置を用いて81MHzで測定した。測定管は直径7mmの石英製で内容量約3mlであった。スペクトルは D_2O ロックし、データの採取時間2sec, 積算回数600~1200回, 観測パルスの幅18 μ secおよび測定スペクトルの幅4000Hzで採取した。

結果

検量線の検討は、5mMのATPの存在下に Mg^{++} の濃度を0~5mMの範囲で変化させた時のATPの αP および βP の吸収に基づくケミカルシフトとカップリング定数より行った。Figure 1は5mMの Mg^{++} が共存するATPの ^{31}P のスペクトル(B)と、 Mg^{++} 不存のスペクトル(A)を示している。 Mg^{++} 有無のスペクトルを比較すると、 Mg^{++} 共存中のATPスペクトルの αP と βP のケミカルシフトの差($\delta_{\alpha\beta}$)は Mg^{++} 不在のスペクトルの $\delta_{\alpha\beta}$ より小さく、また Mg^{++} 共存のATPの ^{31}P の $J_{\alpha\beta}$ (αP と βP のカップリング定数)は不在より小さかった。このようにATPの αP および βP のケミカルシフトおよびカップリング定数が Mg^{++} の濃度で変化することを再確認したので、この両値が Mg^{++} 測定の検量線として有効か否かを検討した。

カップリング定数に基づく Mg^{++} の検量線

ATPの αP および βP の吸収ピークをFigure 1に示した。 Mg^{++} 有無のATPスペクトルでそれぞれ較べると、 αP のピークは Mg^{++} の有無に関係なく非常に尖端まで鋭く分裂した2重線を与えて、カップリング定数を正確に決定できるが、 βP のピークは Mg^{++} の共存で三重線の分裂を生じ不明確になった。したがって、NMRチャート上から正確に同定できるカップリング定数に基づく検量線がATPの αP のカップリング定数の差 $\Delta J_{\alpha\beta}$ (Mg^{++} が共存しない時の αP のカップリング定数と共存するときの差)と Mg^{++} 濃度の関係から求められた(Fig. 2)。この検量線は Mg^{++} 濃度が0.5~5.0mM(Mg^{++}/ATP が0.1~1.0)の範囲では実用可能な直線性を示した。したがって、

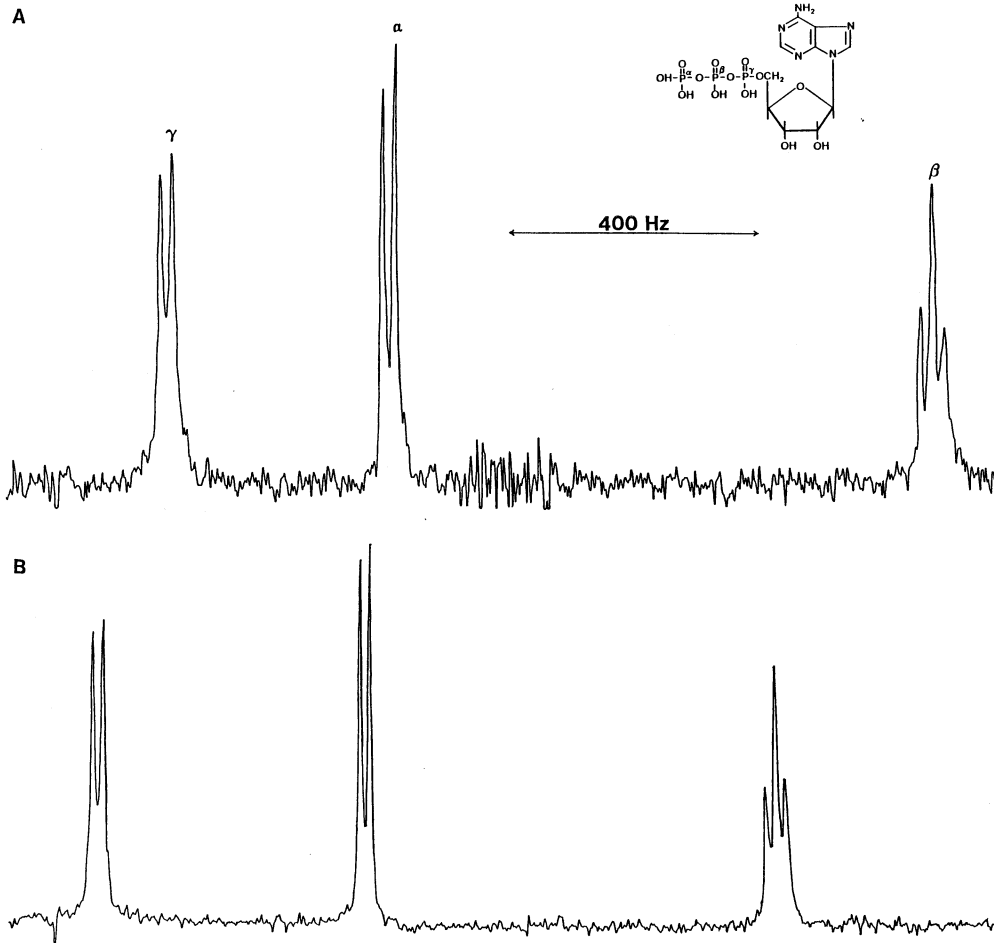


Fig. 1. ^{31}P NMR spectra showing the αP , βP and γP resonances of ATP at 37°C . (A): 5.0 mM ATP in 20 mM tris buffer (pH 7.2) plus 150 mM KCl. (B): Same as (A) plus 5.0 mM Mg^{++} .

Figure 2 の縦軸の $\Delta J_{\alpha\beta}$ が 0.5~4.5 Hz の範囲で Mg^{++} の濃度測定が ATP の ^{31}P の吸収から可能であることが明らかになった。しかし、 $\Delta J_{\alpha\beta}$ は Mg^{++} 濃度が 4.5 mM 以上では一定値になること、0.5 mM 以下では一定しなかったことにより有効な検量線が成立しなかった。次に、測定温度と ΔJ の関係を調べた (Fig. 2)。測定温度を 4° 、 20° 、および 37°C と変化したところ、 $\Delta J_{\alpha\beta}$ は 20°C および 37°C でほとんど差異はなかったが、 4°C ではほぼ一様に約 35% の減少を示した。このことは $\Delta J_{\alpha\beta}$ を検量線として用いるときには測定温度に注意しなくては

ならないことを示した。

カップリング定数に基づく Ca^{++} の検量線

Figure 2 は Ca^{++} が 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 あるいは 5.0 mM の標準溶液の $\Delta J_{\alpha\beta}$ を示した。 $\Delta J_{\alpha\beta}$ は 2.0 mM 以上では Mg^{++} の値と較べてほぼ半分であった。しかし、 Ca^{++} 濃度が 0~5.0 mM の範囲でかなり良い直線性を示し、 Ca^{++} 測定の検量線として利用可能であることが明らかになった。

ケミカルシフトに基づく Mg^{++} の検量線

ATP の αP と βP のケミカルシフトの差 ($\delta_{\alpha\beta}$)

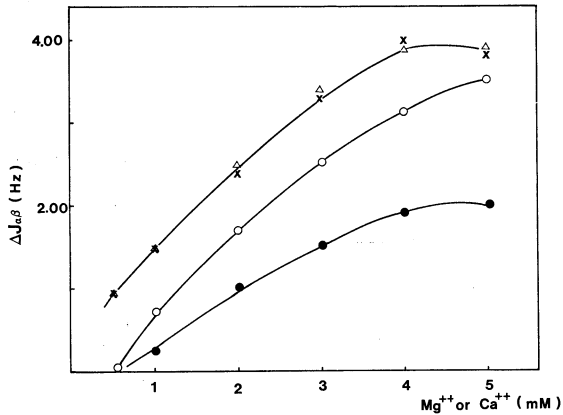


Fig. 2. Plots of the coupling constant difference of ^{31}P NMR in ATP against various concentrations of Mg^{++} and Ca^{++} . $\Delta J_{\alpha\beta}$ (Hz): difference of coupling constant of αP between the absence and presence of various concentrations of Mg^{++} or Ca^{++} , \circ ; 4°C , \triangle ; 20°C , \times ; 37°C for Mg^{++} and \bullet ; Ca^{++} at 37°C .

が Mg^{++} 濃度に依存していることはすでに示した (**Fig. 1**)。したがって、 $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{\text{Mg}^{++}}$ (Mg^{++} 濃度が 0 mM の αP と βP のケミカルシフトの差と、ある Mg^{++} 濃度が共存するときの αP と βP のケミカルシフトの差の差) と Mg^{++} を 0.05~0.5 mM の範囲で変化したときの検量線を **Figure 3** に示した。 $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{\text{Mg}^{++}}$ と Mg^{++} 濃度の関係は良い直線性を示した。また、 Mg^{++} が 0.5~5.0 の範囲の濃度の場合、**Figure 4** で示したごとく曲線が得られたことから、ケミカルシフトに基づく検量線は 0.05~5 mM の Mg^{++} 濃度に使って使用できることが明らかになった。特に直線性が良いのは βP の分裂が 0.5 mM 以下の Mg^{++} 濃度で明瞭になったために、 βP のケミカルシフトが正確に求められた結果であった。さらに、 $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ に対する温度の影響を 4° 、 20° および 37°C で調べた (**Fig. 4**) と、温度依存性はほとんどなく、 ΔJ を用いる検量線よりもこの $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ を用いる方が、測定濃度範囲

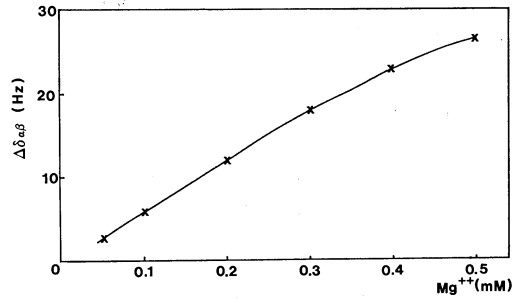


Fig. 3. Plots of the chemical shift difference of ^{31}P NMR in ATP against various concentrations of Mg^{++} . $\Delta\delta_{\alpha\beta}$: subtracted values of the difference of the chemical shift of αP and βP in the presence of various concentrations of Mg^{++} in the ranges of 0.05–0.5 mM from that in the absence of the magnesium ion.

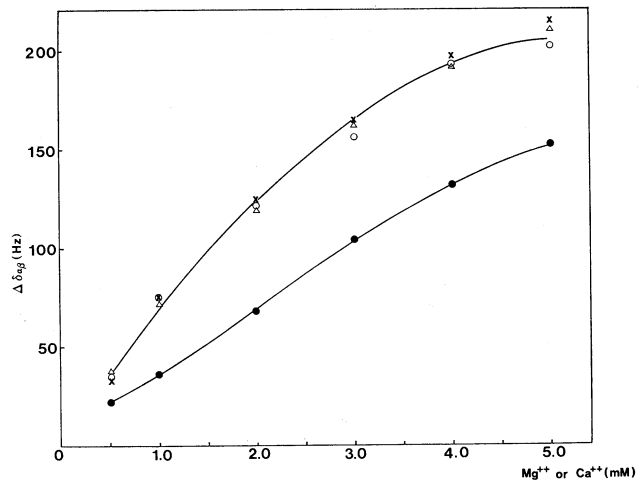


Fig. 4. Plots of the chemical shift difference of ^{31}P NMR in ATP against various concentrations of Mg^{++} or Ca^{++} . $\Delta\delta_{\alpha\beta}$: subtracted values of the difference of the chemical shift of αP and βP in the presence of various concentrations of Mg^{++} or Ca^{++} in the ranges of 0.5–5.0 mM from that in the absence of the ions. Meaning of symbols is the same as in Fig. 2.

と温度非依存性の両面で優れていることがわかった。

ケミカルシフトに基づく Ca^{++} の検量線

Figure 4 は Ca^{++} 濃度が 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 あるいは 5.0 mM の $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{\text{Ca}^{++}}$ を示し

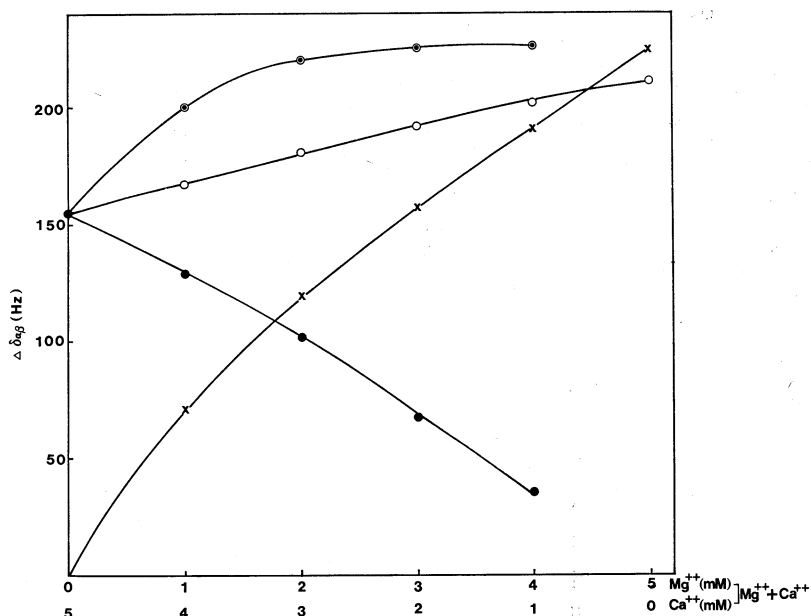


Fig. 5. Plots of calculated and measured chemical shift difference of ^{31}P NMR in ATP against various concentrations of Mg^{++} , Ca^{++} and their 5.0 mM mixture of both ions. ○; found values of $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ in 5.0 mM mixture of Mg^{++} and Ca^{++} , ⊙; additive values of $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ obtained by the respective Mg^{++} and Ca^{++} in Fig. 3 (B), and meaning of × and ● is the same as in Fig. 4.

Table 1. $\Delta J_{\alpha\beta}$ and $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ of 5.0 mM ATP in urine, saliva, bovine milk, and coke.

	$\Delta J_{\alpha\beta}$ Hz	$\Delta\delta_{\alpha\beta}$ Hz
saliva	0.67	27.7
urine	3.18	129.02
milk	3.52	170.04
coke	0	0

た。 Ca^{++} の $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{\text{Ca}^{++}}$ は全測定範囲にわたって Mg^{++} の場合の $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ と較べ約 35% の減少を示したが、ほぼ直線性を示したので Ca^{++} 測定の検量線として充分活用できることが明らかになった。

Mg^{++} と Ca^{++} の共存と $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ および ΔJ

Figure 5 は Mg^{++} および Ca^{++} が 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 および 5.0 mM 単独に存在する ATP の ^{31}P の $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ および Mg^{++} と Ca^{++} が共存し全量を 5 mM としたとき、すなわち (Mg^{++} : 1.0 mM + Ca : 4.0 mM); (Mg^{++} :

2.0 + Ca^{++} : 3.0); (Mg^{++} : 3.0 + Ca^{++} : 2.0); (Mg^{++} : 4.0 + Ca^{++} : 1.0) の割合で存在するときの実測値とそれぞれ単独の実測値を加えた $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ を示している。この図から明らかなように実測値は単純な相加性を示さず常に相加線より小さい値を示した。したがって、 Mg^{++} と Ca^{++} が共存するときの実測 $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{\text{Mg}^{++}+\text{Ca}^{++}}$ から両イオンの全量および各イオン量を求めることは不可能であった。

Mg^{++} と Ca^{++} が共存する αP の $\Delta J_{\alpha\beta}$ は Mg^{++} と Ca^{++} の存在

割合と特別な関連性は認められなかった。

尿、唾液、牛乳および coke の実測結果

尿、唾液、牛乳および coke の 5.0 mM ATP が共存する P の ΔJ および $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ の実測値を Table 1 に示した。coke の ΔJ および $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ はいずれも零を示し、 Mg^{++} と Ca^{++} の不在を示した。牛乳中の Mg^{++} と Ca^{++} の濃度は概算でそれぞれ 2.18 mM と 25.0 mM と圧倒的に Ca^{++} が高く、実測した $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ は 170.04 を示し、 Ca^{++} の高濃度により Mg^{++} の ATP 上での結合が阻害された結果、 Ca^{++} の飽和した値になっていると予想した。一方、一日当たりの成人の尿量を 1600 ml と仮定すると Mg^{++} の尿中濃度⁷⁾ は 1.8~2.7 mM, Ca^{++} は 3.75~5.0 mM となる。尿の実測 $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ は 129.02 であったことから Ca^{++} の濃度は 5 mM 以下であったと思われた。また、唾液の $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ が 27.7 で低値を示したことは文献値^{8),9)} Ca^{++} 1.56 mM, Mg^{++} 0.21 mM から判断して妥当と思われた。

考 察

Mg⁺⁺ の濃度が 0~5.0 mM の範囲で共存する時の 5 mM ATP の αP と βP のケミカルシフトの差 $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Mg^{++}}$ は Mg⁺⁺ 濃度依存性を示した。また、Ca⁺⁺ が 1.0~5.0 mM 共存する際の $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Ca^{++}}$ もほぼ同様の傾向を示した (Figs. 3, 4)。したがって、Mg⁺⁺ および Ca⁺⁺ に対する $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ の関係式を求めるために濃度とケミカルシフトを対数でプロットしたところ非常に良い直線性が得られた (Fig. 6)。この直線は推定一般式 $\Delta\delta_{\alpha\beta} = AM^B$ で表わされる。ここで A と B は未知数、M は 1.0~5.0 mM の金属イオン濃度である。実測結果より、Mg⁺⁺ については $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Mg^{++}} = 70.8 M^{0.27}$ 、Ca⁺⁺ については $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Ca^{++}} = 35.5 M^{0.93}$ が得られた。この式を用いることで、Mg⁺⁺ および Ca⁺⁺ の濃度は実測 $\Delta\delta_{\alpha\beta}$ より容易に求められる。

次に Mg⁺⁺ と Ca⁺⁺ の混在して合計濃度が 5 mM で一定し、この一定量内で両イオン比率が変化する場合ケミカルシフトは次式で表されることが分かった (Fig. 7)。

$$\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Mg^{++}+Ca^{++}} = 68\left(\frac{Mg^{++}}{I}\right)^{0.64} + 143$$

ここで I は全イオン量である。

上式より、実測 $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Mg^{++}+Ca^{++}}$ から Mg⁺⁺ の濃度を求めるためには Mg⁺⁺ と Ca⁺⁺ の全量が明らかでなくてはならない。牛乳や唾液は Ca⁺⁺ の濃度が高いため $\Delta\delta_{\alpha\beta}^{Mg^{++}+Ca^{++}}$ の解釈は非常に注意しなくてはならない。また、Mg⁺⁺ と ATP が相互作用して生じる ³¹P のケミカルシフトは Ca⁺⁺ のみならず Mn⁺⁺、Ni⁺⁺、Co⁺⁺ および Cu⁺⁺ の様な二価のイオンによって影響を受けることが知られており、これらの二価イオン効果^{1),9)} も検討しなくてはならないが、今回は省略した。結果的には、純粋な金属イオン溶液のみがイオン濃度に依存した正確な $\Delta\delta_{\alpha\beta}$

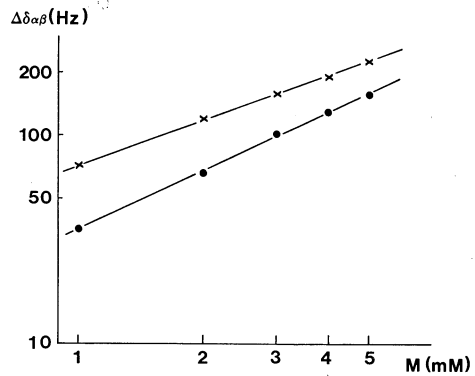


Fig. 6. The lines expressed by logarithms for the determination of free Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ based on the chemical shifts. ×; Mg⁺⁺: $\Delta\delta_{\alpha\beta} = 70.8 M^{0.27}$, ●; Ca⁺⁺: $\Delta\delta_{\alpha\beta} = 35.5 M^{0.93}$.

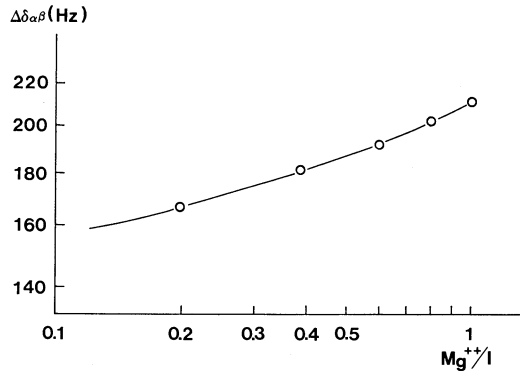


Fig. 7. The line expressed by logarithms for the determination of Mg⁺⁺ in the mixture of Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ based on the chemical shifts: $\Delta\delta_{\alpha\beta} = 68\left(\frac{Mg^{++}}{I}\right)^{0.64} + 143$.

を与えるため精度の高い検量線が描けると思われた。

稿を終わるに臨み、測定試料の調製および原稿の作成に御協力いただいた大月範子嬢、片山純子嬢に感謝致します。

本研究は昭和61年川崎医科大学プロジェクト研究61-901 および 61-602 で行った。

文 献

- 1) Son, T. D., Roux, M. and Ellenberger, M.: Interaction of Mg²⁺ ions with nucleoside triphosphates by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. Nucleic Acids Res. 2: 1101-1110, 1975

- 2) Schliselfeld, L. H., Burt, C. T. and Labotka, R. J.: ^{31}P nuclear magnetic resonance of phosphonic acid analogues of adenosine nucleotides as functions of pH and magnesium ion concentration. *Biochemistry* 21: 317—320, 1982
- 3) Brown, F. F., Campbell, I. D., Henson, R., Hirst, C. W. J. and Richards, R. E.: A study of the interaction of manganese ions with ATP by ^{31}P Fourier-transform nuclear-magnetic resonance. *Eur. J. Biochem.* 38: 54—58, 1973
- 4) Gupta, R. K. and Yushok, W. D.: Noninvasive ^{31}P nMR probes of free Mg^{2+} , MgATP , and MgADP in intact Ehrlich ascites tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2487—2491, 1980
- 5) Cohen, S. M. and Burt, C. T.: ^{31}P nuclear magnetic relaxation studies of phosphocreatine in intact muscle: Determination of intracellular free magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4271—4275, 1977
- 6) Gupta, R. K., Benovic, J. L. and Rose, Z. B.: The determination of the free magnesium level in the human red blood cell by ^{31}P NMR. *J. biol. Chem.* 253: 6172—6176, 1978
- 7) 日本生化学会編：生化学データブック I. 東京化学同人. 1979, p.1601
- 8) Mason, D. K. and Chisholm, D. M.: Salivary glands in health and disease. London, Philadelphia, Toronto, W. B. Saunders. 1975
- 9) Shannon, I. L., Suddick, R. P. and Dowd, F. J., Jr.: Saliva: Composition and secretion (Monograph in oral science Vol. 2). Basel, S. Karger. 1974
- 10) Cohn, M. and Hughes, T. R., Jr.: Nuclear magnetic resonance spectra of adenosine Di- and triphosphate II. Effect of complexing with divalent metal ions. *J. biol. Chem.* 237: 176—181, 1962