



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のthapsigargin感受性Ca依存ATPaseの分離 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	工藤, 智也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11716号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59153
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomonari_Kudo_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 工 藤 智 也

主査 教授 山 崎 裕
審 査 担 当 者 副査 教授 鈴 木 邦 明
副査 教授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の thapsigargin 感受性 Ca 依存 ATPase の分離

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

Ca輸送ATPaseにはP型ATPaseに属し中性に至適pHを示すCa,Mg-ATPaseがあり、形質膜のPMCAと小胞体膜のSERCAに関しては報告が多い。骨形成部位及び骨芽細胞にはCaで活性化されるATPase (Ca依存ATPase) が存在し石灰化との関連が推測されるが報告は少ない。そこで、骨芽細胞様細胞 (E1細胞)に存在するCa依存ATPaseの性質を調べた。

E1細胞を培養し、コンフルエント後4週で回収した。超音波処理により細胞破砕物を作成したのち、遠心分離によりmicrosome分画を得た。さらにドデシル硫酸ナトリウムを添加して可溶化した後、グリセロールの密度勾配遠心にかけてATPase活性のある分画を得た。

細胞破砕物にはCa,Mg-ATPase以外に、pH 9.6 (Ca-P1)とpH 10.8 (Ca-P2)で活性が高いCa依存ATPase及びpH 9.6 (Mg-P1)が主でpH 11.1 (Mg-P2)にわずかな活性を示すMg依存ATPase活性が検出された。Mg-P1の最大活性はCa-P1及びCa-P2の約4.5倍であった。これらの活性はSERCAの特異的阻害剤とされるthapsigarginによって阻害されたが、P型ATPaseを阻害するvanadateによる阻害は認められなかった。また2価金属のキレーターであるEDTA及びEGTAは濃度依存性に両ATPase活性を阻害した。

microsome分画ではCa-P1が顕著に減少した。Ca-P2、Mg-P1とMg-P2は残存したがCa-P2の割合が増加した。グリセロール密度勾配遠心後にはMg-P1が顕著に

減少し、Mg-P2とその約3倍のCa-P2活性が検出された。両活性はthapsigarginによって阻害された。

両活性の石灰化への関与を調べるために、25及び50 μ Mのthapsigargin存在下でのE1細胞の培養を行ったが、3日目以降表層から細胞が剥離して細胞数が減少した。Thapsigarginはアポトーシス誘導作用が強く石灰化の検出まで細胞を培養することはできなかった。E1細胞にはthapsigarginにより阻害されるがP型ではないアルカリ性至適pH のCa依存ATPaseが存在し、その性質の検討が可能な程度まで分離を行うことができた。

以上、論文について概要が説明されたのち、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、①thapsigarginはどのような薬剤か、②培養に用いたthapsigargin濃度が高すぎるのではないか、③microsome分画調整後どの程度のCa / Mg依存ATPaseがmicrosome分画に存在していたか、④Ca依存ATPaseにMgを作用させた意味とMg依存ATPaseにCaを作用させた意味について、⑤細胞に存在する最も多いATPaseは何か、⑥至適pHがなぜアルカリ性にあるのか、等であった。

論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は、これまでSERCAの特異的阻害剤として広く知られていたthapsigarginがCa依存ATPaseも阻害することを明らかにし、他のATPaseからの分離方法を示した点が今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。