



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のthapsigargin感受性Ca依存ATPaseの分離
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11716
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60967
Type	doctoral thesis
File Information	Tomonari_Kudo.pdf



博 士 論 文

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

平成 27 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

工 藤 智 也

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

Separation of thapsigargin-sensitive Ca-dependent ATPase in osteoblastic
cell (MC3T3-E1)

工藤 智也¹⁾, 出山 義昭²⁾, 吉村 善隆²⁾, 鈴木 邦明²⁾, 山崎 裕¹⁾

〒060-8586

札幌市北区北 13 条西 7 丁目

¹⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室（主任：山崎
裕 教授）、²⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座細胞分子薬理学教室
（主任：鈴木 邦明 教授）

連絡先

E-mail: t.kudo@den.hokudai.ac.jp

電話) 011-706-4582

内線) 4582

キーワード：骨芽細胞様細胞 Ca 依存 ATPase thapsigargin

略題：Ca 依存 ATPase の thapsigargin による阻害と分離

本文原稿枚数： 17 枚

表枚数： 0 枚

図枚数： 15 枚

写真枚数： 0 枚

必要別刷数： 50 部

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

工藤 智也 出山 義昭 吉村 善隆 鈴木 邦明 山崎 裕

抄録：骨芽細胞には Ca で活性化される ATPase (Ca-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 (MC3T3-E1) の Ca-ATPase の性質を調べた。E1 細胞を培養後、細胞破砕物を作成したのち、ミクロソーム分画とした。さらにドデシル硫酸ナトリウム(SDS)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-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-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。ミクロソーム分画では Ca-P1 が顕著に減少し、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-P2 とその約 3 倍の Ca-P2 活性が検出された。両活性は thapsigargin により阻害された。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、thapsigargin のアポトーシス誘導作用のため石灰化の検出まで細胞を培養することはできなかった。本研究では thapsigargin により阻害され P 型ではないアルカリ性至適 pH の Ca-ATPase が E1 細胞に存在することを示し、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。

【緒言】

骨の石灰化は、骨芽細胞による骨基質の合成と細胞外への分泌、さらに基質へのカルシウムやリンの沈着により進行する。骨基質へのカルシウムの輸送に関しては、形質膜に存在する Na-Ca exchanger (NCX) や Ca-ATPase を候補とする報告がある。しかし Ca-ATPase に関しては、骨芽細胞の基底膜側に位置することから骨基質への直接的なカルシウム輸送を行うことはできないとの報告がある一方、骨側に位置し、vanadate により石灰化が阻害されることから骨基質への直接的なカルシウム輸送を行っているという報告もあり、いまだ不明な部分が多い。これらの報告で取り扱っている Ca-ATPase は既知の性質から plasma membrane calcium ATPase (PMCA) であると推測される。PMCA は活性の至適 pH が中性であり、ATP の加水分解の過程でリン酸化反応中間体を形成する P 型 ATPase である。P 型 ATPase は vanadate により阻害される。PMCA と比較的類似した性質を示す Ca-ATPase には小胞体での Ca の能動輸送に関与する sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) があり、特異的阻害剤とされる thapsigargin によって阻害される。PMCA と SERCA は低濃度の Ca で活性が飽和するため石灰化部位への Ca 輸送には不適と考えられる。

近年、Nakano¹⁾らによって骨形成部位に、また森²⁾、小畑³⁾らによって骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞にアルカリ側に至適 pH をもつ Ca 依存 ATPase や Mg 依存 ATPase の存在が報告されている。骨形成部位では、同じくアルカリ性に至適 pH を持つアルカリ性ホスファターゼの活性の上昇が認められることから、石灰化における Ca 依存 ATPase との関連性に興味を持たれる。また、この Ca 依存 ATPase は活性発現に数 mM の Ca を必要とすることから、石灰化部位での Ca 輸送という点では PMCA や SERCA より

も適していると考えられる。しかし、これら ATPase の詳細な酵素学的な性質や石灰化の過程における役割に関しては不明な点が多い。

MC3T3-E1 細胞は、骨原性細胞から骨芽細胞へ分化し、培養中に dish 内に硬組織を形成することから、硬組織形成機構の研究に広く用いられる細胞である。そこで、MC3T3-E1 細胞を用いてアルカリ性至適 pH の Ca-ATPase の基本的な性質を調べて精製を進め、存在部位及び Mg-ATPase との相違を明らかにすること、石灰化への関与を調べるために必要となる阻害剤について検討することを目的に本研究を行った。

【材料及び方法】

1. MC3T3-E1 細胞の培養、回収

E1 細胞は理化学研究所細胞開発バンクより購入し、 α -minimum essential medium (α -MEM) と牛胎児血清 (FBS) は Gibco-BRL 社製 (MD、米国) を使用した。E-1 細胞を 5%CO₂-95%空気下 (37°C)、10%FBS を加えた α -MEM 中で通法に従い培養した。コンフルエント後 4 週で回収し、超音波処理を行い細胞破砕物を作成した。

2. ミクロソーム分画の調整

細胞破砕物を 10,500 rpm で 35 分の遠心分離後、上清を回収した。回収した上清をさらに 18,000 rpm で 50 分遠心分離し、得られた沈渣をホモジェナイズ後 sucrose で回収し、microsome 分画とした。

3. Ca-ATPase 及び Mg-ATPase の精製

ミクロソーム濃度を 1mg/ml に調整し、25 mM sucrose、50 mM tris-acetate、1 mM ATP 存在下で、

0.1 mg/ml の sodium dodecyl sulfate (SDS)を添加して 37℃で、30 分間インキュベーションして可溶化した後、グリセロールの密度勾配遠心を行った。遠心操作は 15,000 rpm、14 時間行った。沈殿は上清を回収した後に 0.25 M sucrose に懸濁して回収した。各上清は上層から 14 等分して回収し、0.25 M sucrose を添加してグリセロール濃度を低下させた後、実験に使用した。

4. ATPase 活性の測定

Ca,Mg-ATPase、Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性は ATP の加水分解の結果得られる無機リン量を Ciffllet 法に従って定量することによりそれぞれ計測した。酵素活性測定は 5 μ g の酵素と 0.1 mM EDTA を含む 25 mM sucrose, 0.1 M tris-HCl (pH7.4)または炭酸 buffer に基質として最終濃度 5 mM の ATP を加えた 300 μ l の溶液中で反応をおこなった。反応は ATP 添加により開始し、37℃で 30 分反応後、300 μ l の 12% SDS を添加して停止した。酵素反応の結果生じた無機リンを Chifflet 法⁴⁾にて発色させ、HITACHI U-2000 分光光度計を用い 850 nm で測定し定量した。

5. thapsigargin 存在下での MC3T3-E1 細胞の培養

MC3T3-E1 細胞を、最終濃度が 25 μ M 及び 50 μ M となる DMSO に溶解した thapsigargin を添加した 10% FBS 含有 α -MEM 中で、5% CO₂-95%空気下 (37℃) で通法に従い培養した。

【結果】

1. 細胞破砕物における Ca,Mg-ATPase、Ca 依存 ATPase 及び Mg 依存 ATPase の pH 依存性および各種

阻害剤による影響

細胞破碎物の各 ATPase の pH 依存性を測定した(Fig. 1)。Ca,Mg-ATPase の至適 pH は 7.7~7.9、Ca 依存 ATPase の至適 pH は 9.6 (Ca-P1)と 10.8 (Ca-P2)の 2 相性を示し、Mg 依存 ATPase は 9.6 (Mg-P1)と pH 11.1 (Mg-P2)にわずかな活性を示した。Mg-P1 は Ca-P1 及び P-2 より 4 倍以上高い活性を示した。各 ATPase 活性が Ca あるいは Mg で活性化されていることを確かめるため、2 価金属のキレートである EDTA を添加して至適 pH で活性を測定したところ、Ca-ATPase、Mg-ATPase とも濃度依存的に活性が減少した(Fig. 2a)。Ca-ATPase、Mg-ATPase ともアルカリ側に至適 pH を示すことから、アルカリ性ホスファターゼの示す活性ではないことを確認するため、阻害剤である levamisole を添加し活性を測定した(Fig. 2b)が、有意な活性の減少は認められなかった。PMCA の阻害剤である vanadate 存在下で活性を測定すると、Ca,Mg-ATPase のみ阻害を受け、Ca 依存および Mg 依存 ATPase 活性は影響を受けなかった(Fig. 2c)。また SERCA の特異的阻害剤である thapsigargin 存在下で活性を測定すると Ca,Mg-ATPase は影響を受けず、Ca 依存および Mg 依存 ATPase 活性は各至適 pH において濃度依存性に阻害された(Fig. 2d)。Ca-ATPase では 25 から 100 μ M で約 50%の活性が阻害され、Mg-ATPase では 25 μ M で約 70%の阻害効果が認められた。

2. microsome 分画における Ca 依存 ATPase、Mg 依存 ATPase 活性の pH 依存性および各種阻害剤による影響

microsome 分画の各 ATPase 活性の pH 依存性を測定した(Fig. 3)。PMCA と SERCA は microsome 分

画に存在した。Ca-ATPase は、細胞破砕物では 2 相性であったが Ca-P1 の活性が低下し、その 5 倍の Ca-P2 活性が pH 10.8 で検出された。Mg-ATPase は、Mg-P1 の活性は残ったが、Ca-ATPase 活性との相対的な差は小さくなった。EDTA を添加すると、細胞破砕物での結果と同様にいずれの ATPase も活性が濃度依存性に阻害された(Fig. 4a)。Thapsigargin を添加すると、SERCA 同様に Ca-ATPase、Mg-ATPase とも顕著な阻害効果が認められ、Ca-ATPase は 100 μ M で約 50%、Mg-ATPase は 25 μ M で約 70% 阻害された(Fig. 4b)。一方、vanadate を添加しても Ca-ATPase、Mg-ATPase は阻害されなかった(Fig. 4c)。Ca-ATPase と Mg-ATPase が同一の酵素であるのか否かを確認するために、両 ATPase に対する F1-ATPase の阻害剤である azide の作用を調べた(Fig. 5a)。その結果、Mg-ATPase のみ濃度依存性に活性が阻害され Ca-ATPase は阻害されなかった。次に、Ca-ATPase 活性に対する Mg の作用を調べたところ濃度依存性に活性が減少し 12.5 mM で約 50% の阻害効果が認められた(Fig. 5b)。逆に Mg-ATPase 活性を Ca は濃度依存性に阻害した(Fig. 5c)。

3. グリセロール密度勾配遠心による精製後の Ca 依存 ATPase 及び Mg 依存 ATPase 活性の分布と

thapsigargin による影響

SDS を添加して microsome タンパク質を可溶化したのち、さらにグリセロール密度勾配遠心を行った。上清を上から 14 等分して回収し、各層の Ca 及び Mg 依存 ATPase 活性を測定した(Fig. 6)。上層から 1,2 番目の層に Ca 依存 ATPase 活性が高く認められた。Mg 依存 ATPase 活性も同じ層に多く認められたが、microsome での活性と比較すると全体的に顕著に低下した。Thapsigargin は濃度依存性に Ca-ATPase 活

性を阻害したが(Fig. 7a)、vanadate によつては阻害されなかった(Fig. 7b)。

4. thapsigargin 存在下での骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の培養

コンフルエント後から培養液に最終濃度 25 及び 50 μ M の thapsigargin を添加し、E-1 細胞の培養を行った。thapsigargin 存在下での培養 3 日目以降、表層から細胞が剥離し、石灰化までの培養は行えなかった。

【考察】

1. MC3T3-E1 細胞の細胞破砕物の各種 Ca あるいは Mg 依存 ATPase

本研究で使用した MC3T3-E1 細胞はマウス頭蓋冠から樹立された細胞であり、骨原性細胞から骨芽細胞に分化し、培養中に Dish 内に石灰化組織を形成することから、硬組織形成機構の研究に広く用いられています。小畑らの研究でコンフルエント後 4 週後にもっとも Ca-ATPase の活性が高くなったことから、今回もコンフルエント後 4 週まで培養し、回収を行った。回収した細胞を超音波にて処理後、cell homogenate として使用した。

細胞破砕物の Ca あるいは Mg 依存 ATPase 活性を測定すると、中性 pH には極めて低濃度の Ca で活性化される ATPase が存在した。すでによく知られている PMCA あるいは SERCA⁵⁻⁸⁾と考えられるが、その活性はアルカリ性至適 pH の Ca あるいは Mg 依存 ATPase 活性と比較すると、極めて低かった。

アルカリ性至適 pH の各 ATPase 活性に対する 2 価金属のキレーターである EDTA の効果を測定したところ、Ca-ATPase、Mg-ATPase とも濃度依存的に活性が減少したことから 2 価金属要求性であることが示

された。また、アルカリ側に至適 pH を示すことから、アルカリ性ホスファターゼの示す活性ではないことを確認するため、阻害剤である levamisole を添加し活性を測定したが、有意な活性の減少は認められず両 ATPase はアルカリ性ホスファターゼとは異なる酵素であることが示された。両 ATPase は vanadate で阻害されないことから P 型 ATPase ではなく、予想に反して SERCA の特異的阻害剤とされている thapsigargin により阻害された。そこで、これらの特徴を指標に細胞破砕物から microsome を調整して、ATPase の分布を測定することにした。

2. MC3T3-E1 細胞の microsome の各種 Ca あるいは Mg 依存 ATPase

microsome には予想通り PMCA あるいは SERCA が回収されたが、アルカリ側至適 pH の Ca あるいは Mg 依存 ATPase 活性も回収された。これらの活性は、EDTA に対する反応性から 2 価金属要求性であり、vanadate 存在下でも抑制されないことから P 型 ATPase ではなく、thapsigargin により阻害されることを確認した。

1 つの酵素が Ca と Mg どちらによっても活性化されるため、見かけ上 Ca あるいは Mg 依存 ATPase が存在するように見える可能性もある。そこで、その可能性を検討した。まず、F1-ATPase の阻害剤である azide の作用を見たところ、Mg-ATPase のみ濃度依存性に活性が阻害され Ca-ATPase は阻害されなかったことから、両者は別の酵素であることが示唆された。次に、Ca-ATPase 活性に対する Mg の作用を調べたところ Mg 濃度依存性に活性が減少し、逆に Mg-ATPase 活性を Ca は濃度依存性に阻害した。これらの結果から、Ca-ATPase と Mg-ATPase は異なる酵素であると結論した。

3. グリセロール密度勾配遠心後の Ca あるいは Mg 依存 ATPase 活性の分布

グリセロール密度勾配遠心後 Ca-ATPase は上層から 1,2 番目に高い活性が回収された⁹⁻¹¹⁾。14 番目にも若干の活性が認められたが、これは回収時に上の層から落ちてしまった部分と考えられた。Mg-ATPase 活性も Ca-ATPase と同じフラクションに回収され、完全に分離することはできなかったが、Ca-ATPase は Mg-ATPase 活性の 3 倍以上となり、Mg-ATPase 活性の影響を軽減して、Ca-ATPase の酵素学的な解析を行えるところまで、部分精製を行うことができた。ただし、収量が低いため、多くの酵素量を必要とする場合にはさらに精製法を検討する必要がある¹²⁻¹⁴⁾。Mg-ATPase 活性は SDS による可溶化のステップで失活したものと考えられる。

4. 石灰化における Ca-ATPase の役割を明らかにするために

E-1 細胞は長期培養により石灰化を観察できる細胞である。そこで、今回測定した Ca-ATPase 活性の石灰化における役割を明らかにすることを目的に、活性を阻害する thapsigargin を添加して E-1 細胞の培養を行った¹⁵⁻¹⁸⁾。顕著な Ca-ATPase 活性の阻害効果の認められた 25 および 50 μM となるように medium を調整し、コンフルエント後から培養を行ったが、培養開始 3 日後から細胞が剥離し始め、石灰化まで培養を続けることができなかった。Thapsigargin は小胞体ストレスによるアポトーシスを誘導することが知られており、アポトーシスが原因と推測される^{19,20)}。今回の実験では Ca-ATPase と石灰化との関連を明らかにすることはできなかったが、より低濃度の thapsigargin を使用することにより解決できる可能性がある

る。

【結論】

MC3T3-E1 細胞に存在するアルカリ性至適 pH の Ca-ATPase は Mg-ATPase とは異なることを明らかにした。また、Ca-ATPase を酵素学的な性質を測定できるところまで、部分精製した。さらに、Ca-ATPase は P 型 ATPase ではなく、SERCA の特異的な阻害剤とされる thapsigargin により阻害されること、同時に測定を行った Mg-ATPase も thapsigargin により阻害されることを明らかにした。

【参考文献】

- 1) Nakano Y, Beertsen W, Van Den Bos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y: Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane: tissue non-specific alkaline phosphatases and plasma membrane calcium ATPase. Bone 35: 1077-1085, 2004.
- 2) 森 幸徳, 鈴木邦明, 小畑 真, 出山義昭: 骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性. 北海道歯誌 24 : 213-220, 2003.
- 3) 小畑 真, 出山義昭, 吉村善隆, 福島和昭, 鈴木邦明: 骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)のカルシウム依存 ATPase の部分精製. 北海道歯誌 27 : 104-111, 2006.
- 4) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPase. Anal Biochem 168: 1-4, 1988.

- 5) Fliteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT: Plasma Membrane Ca^{2+} Pump in Rat Brain. *J Biol Chem* 272: 23741-23747, 1997.
- 6) Zaidi A, Michaelis ML: Effect of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Free Radic. Biol Med* 27: 810-821, 1999.
- 7) Francis MJO, Lees RL, Trujillo E, Vasallo PM, Heersche JNM, Mobasheri A: ATPase pump in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Biochem* 3: 88-92, 2002.
- 8) Sudo H, kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S: In vitro differentiation and Calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96: 191-198, 1983.
- 9) Hogeboom GH: Fractionation of cell components of animal tissues. *Methods Enzymol* 1: 16-19, 1955.
- 10) Suzuki K, Post RL: Equilibrium of phosphointermediates of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase: action of sodium ion and Hofmeister effect. *J Gen Physiol* 109: 537-554, 1997.
- 11) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 12) Donna MS, Gay CV: NCX3 Is a Major Functional Isoform of the Sodium–Calcium Exchanger in Osteoblasts. *J Cell Biochem* 103: 1101–1110, 2008.
- 13) Francis MJO, Lees RL, Trujillo E, Vasallo PM, Heersche JNM, Mobasheri A: ATPase pumps in

- osteoclasts and osteoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 459–476, 2002.
- 14) Lytton J, Westlin M, Hanleyll MR: Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. *J Biol Chem* 266 26: 17067-17071, 1991.
- 15) Nakano Y, Addison WN, Kaartinen MT: ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 41: 549–561, 2007.
- 16) Amarjargal N , Mazurek B, Haupt H, Andreeva N , Fuchs J, Gross J: Effects of SERCA and PMCA Inhibitors on the Survival of Rat Cochlear Hair Cells during Ischemia in vitro. *Physiol Res* 57: 631-638, 2008.
- 17) Stains JP, Weber JA, Gay CV: Expression of Na/Ca² Exchanger Isoforms (NCX1 and NCX3) and Plasma Membrane Ca² ATPase During Osteoblast Differentiation. *J Cell Biochem* 84: 625-635 2002.
- 18) Go W, Korzh V: Plasma membrane Ca²⁺ ATPase Atp2b1a regulates bone mineralization in zebrafish. *Bone* 54: 48–57 2013.
- 19) Hamamura K, Yokota H: Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling. *FEBS Lett* 581: 1769–1774 2007.
- 20) Chae HJ, Chae SW, Weon KH, Kang JS, Kim HR: Signal Transduction of Thapsigargin-induced Apoptosis in Osteoblast. *Bone* 25: 453–458 1999.

Figure legends

Fig. 1 Effect of pH on calcium,magnesium-ATPase or calcium- or magnesium dependent ATPase activity of MC3T3-E1 cell homogenate.

ATPase activity was measured with the use of cell homogenate of MC3T3-E1 in the presence of 25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 100 mM tris-HCl or carbonate buffer at various pH values with 0.1 mM CaCl_2 and 2 mM MgCl_2 (◆), 2 mM CaCl_2 (■), 2 mM MgCl_2 (▲).

Fig. 2a: EDTA, 2b: levamisole, 2c: vanadate, 2d: thapsigargin concentration-dependent decrease of ATPase activity of MC3T3-E1 cell homogenate.

ATPase activity was measured as described in Fig.1 legend except that indicated concentrations of EDTA (a), levamisole (b), vanadate (c) and thapsigargin (d) were added and that pH of each ATPase activities were fixed at 9.63(□), 10.8(■) and 9.63(▲).

Fig. 3 Effect of pH on calcium,magnesium-ATPase or calcium- or magnesium dependent ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsomes.

ATPase activity was measured with the use of cell microsomes of MC3T3-E1 in the presence of 25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 100 mM tris-HCl or carbonate buffer at various pH values with 0.1 mM CaCl_2

2, 2 mM MgCl₂, (◇/◆), 2 mM CaCl₂(■), 2 mM MgCl₂(▲).

Fig. 4a :EDTA, 4b: thapsigargin, 4c: vanadate concentration-dependent decrease of ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsomes.

ATPase activity was measured as described in Fig. 3 legend except that indicated concentrations of EDTA (a), thapsigargin (b) and vanadate (c) were added and that pH of each ATPase activities were fixed at 7.72(◆), 11.07(■) and 9.63(▲).

Fig. 5a: The effect of azide on ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsome.

ATPase activity was measured as described in Fig.3 legend except that indicated concentrations of azide were added and that pH of each ATPase activities were fixed at 9.5(■,▲).

5b: Magnesium concentration-dependent decrease of Ca-ATPase activity.

ATPase activity was measured as described in Fig.3 legend except that indicated concentrations of magnesium were added.

5c: Effect of Calcium on Mg-ATPase activity.

ATPase activity was measured as described in Fig.3 legend except that indicated concentrations of calcium were added.

Fig. 6 Distribution of calcium- or magnesium-dependent ATPase activity after SDS treatment and centrifugation by glycerol density gradient.

1mg/ml of microsome was incubated in the presence of 25 mM sucrose ,50 mM tris-acetate,0.1mg/ml SDS and 1 mM ATP at 37°C for 30 minutes, and then centrifuged at15,000 rpm for 24 hours on glycerol density gradient. The supernatant fractions were recovered by centrifugation at 45,000rpm for 1 hour. The sediment was suspended in 25 mM sucrose. Ca-(open bar) or Mg-(solid bar) ATPase activity was measured as described in the legend of Fig. 3.

Fig. 7 The effect of thapsigargin (a) or vanadate (b) on separated Ca-ATPase and Mg-ATPase.

ATPase activity was measured as described in Fig.3 legend except that indicated concentrations of thapsigargin (a) or vanadate (b) were added and that pH of each ATPase activities were fixed at 10.14(■) and 11.23(▲).

Separation of thapsigargin –sensitive Ca-dependent ATPase in osteoblastic cell (MC3T3-E1)

Tomonari Kudo¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾, Yutaka Yamazaki¹⁾

)

¹⁾ Department of Oral Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of

Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Yutaka Yamazaki) ²⁾ Department of

Dental Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental

Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki)

Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

Abstract

ATPase activated by calcium ion (Ca-ATPase) exist and have a possibility concerning bone mineralization. But there is little report about it. Therefore this report studied about the property of Ca-ATPase in osteoblastic cell (MC3T3E-1). Osteoblastic cell was cultured and harvested at 4 weeks after confluence. The cells were homogenized with the ultrasonication and separated into the microsome and cytoplasm by centrifugation . Furthermore they were solubilized by sodium dodecyl sulfate (SDS) and separated into fraction including Ca-ATPase activity on the density gradient of glycerol. In addition to Ca,Mg-ATPase, the cell homogenate detected the high Ca-ATPase activity at pH 9.6 (Ca-p1) and 10.8 (Ca-p2), and Mg-ATPase at pH 9.6 (Mg-P1). The low Mg-ATPase activity at pH 11.1 (Mg-P2) was also detected. The maximum activity of Mg-P1 was 4.5 fold higher than that of Ca-P1

and Ca P2. These activities of ATPase were inhibited by thapsigargin, the specific inhibitor of SERCA, but not by vanadate, the inhibitor of P type ATPase. EGTA and EDTA, chelater of divalent metallic ion, inhibited both ATPase concentration-dependently. In the microsome fraction, the activity of Ca-P1 decreased remarkably. The activity of Ca-P2, Mg-P1 and Mg-P2 remained but the ratio of Ca-P2 increased. Mg-ATPase was inhibited by azide, inhibitor of mitochondrial ATPase, but Ca-ATPase was not inhibited. After the centrifugation of density gradient of glycerol , the activity of Mg-P1 decreased remarkably but activities of Mg-P2 and Ca-P2 were remained. The activity of Ca-P2 was detected three fold higher than that of Mg-P2. Both ATPases were inhibited by thapsigargin. To investigate the role of both ATPases on mineralization, MC3T3-E1 cell was cultured with 25 and 50 μ M thapsigargin. Since 3 days from culture, the surface layer of cell has separated and the number of cell was decreased. As thapsigargin induced cell apoptosis strongly, we could not culture the cell until the mineralization was detected. These results suggested that E-1 cell has Ca-ATPase with optimal pH at alkaline side which is inhibited by thapsigargin but is not P type ATPase. And we could separate Ca-ATPase to the extent for the use in its characterization.

Key word : osteoblastic cell, Ca-dependent ATPase, thapsigargin

Fig. 1

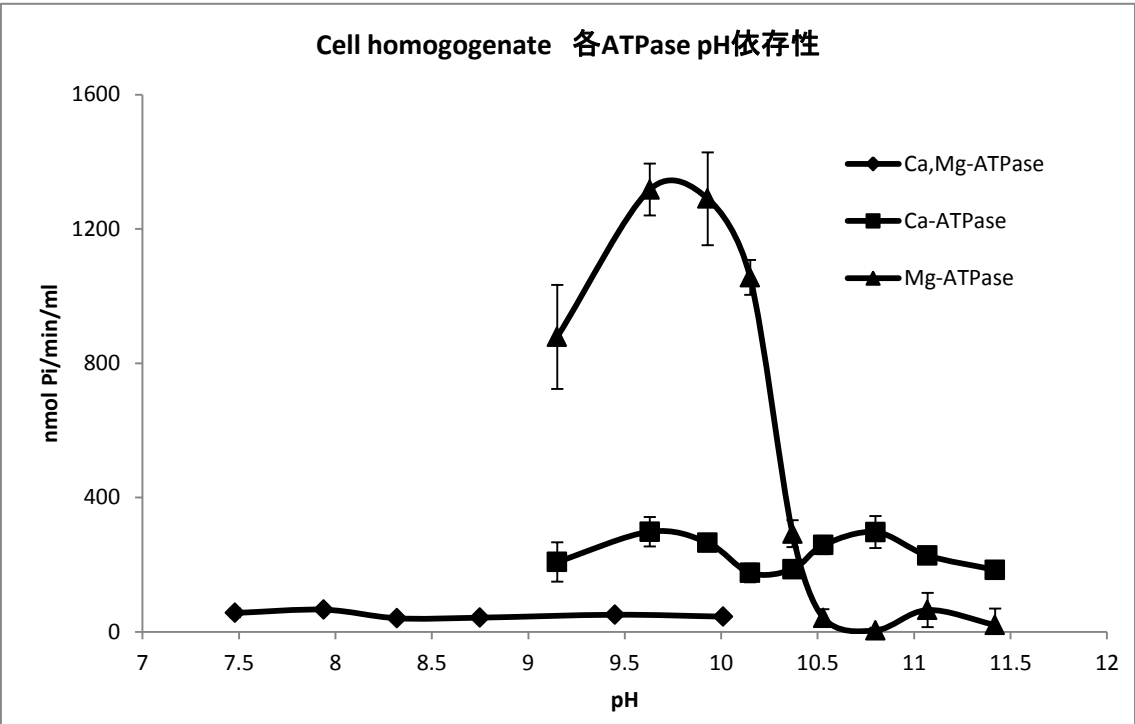


Fig. 2a

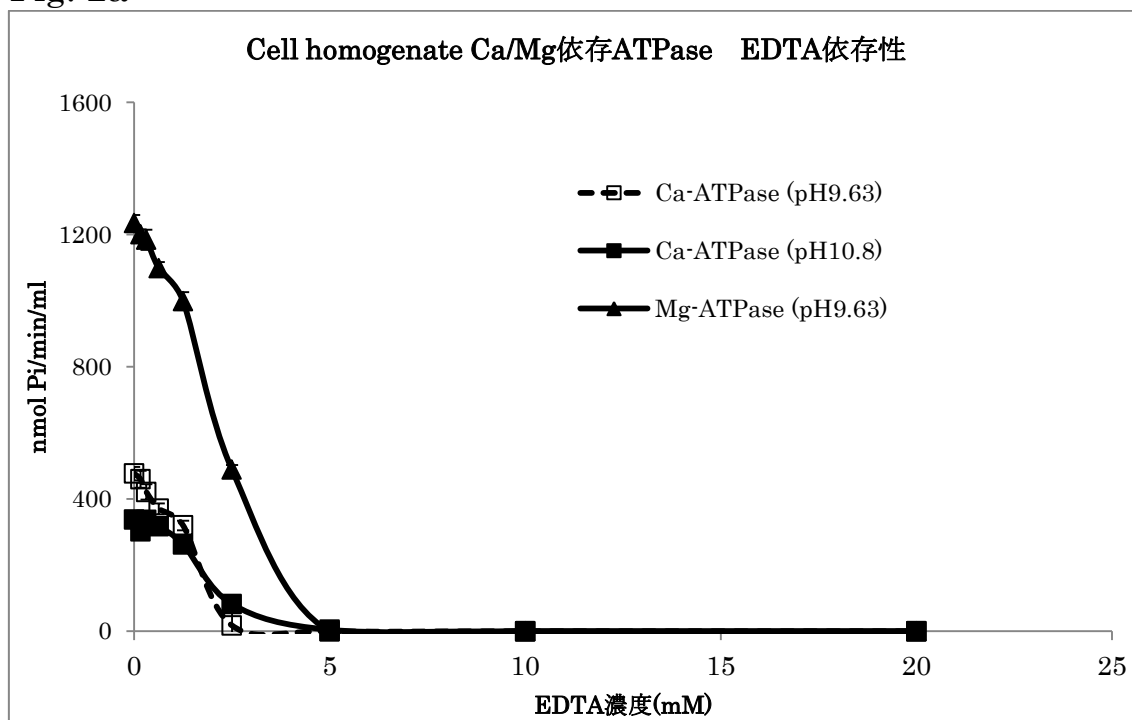


Fig. 2b

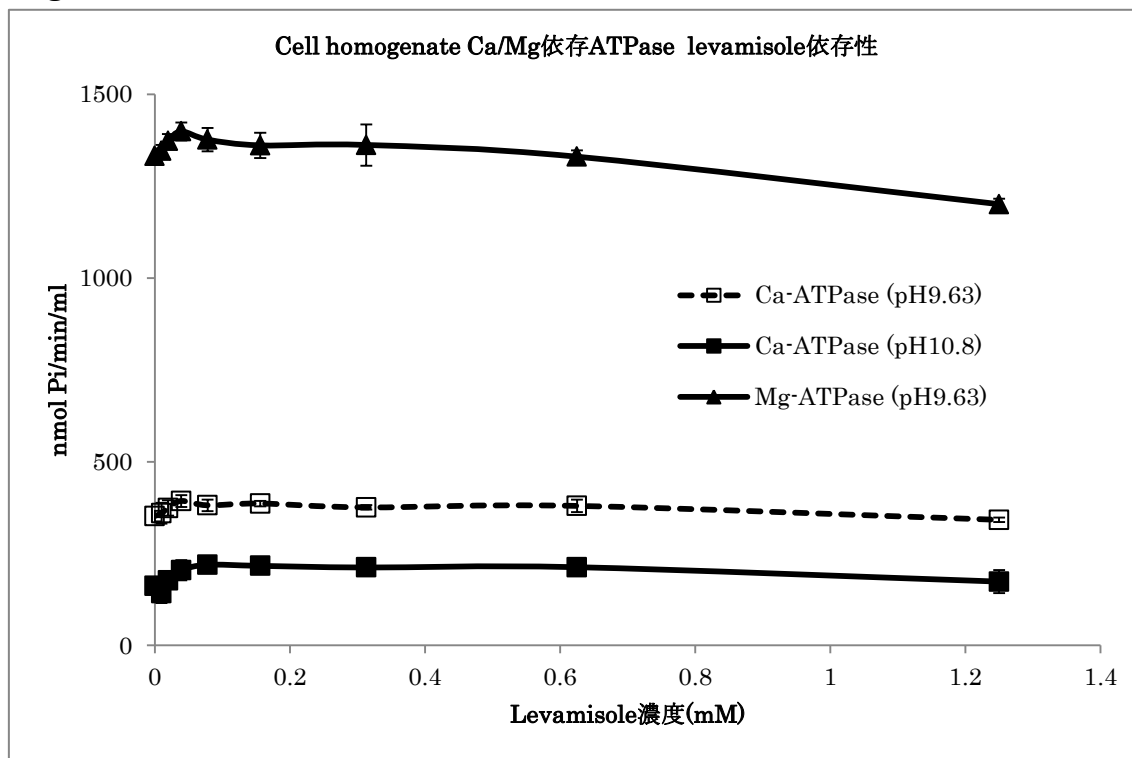


Fig. 2c

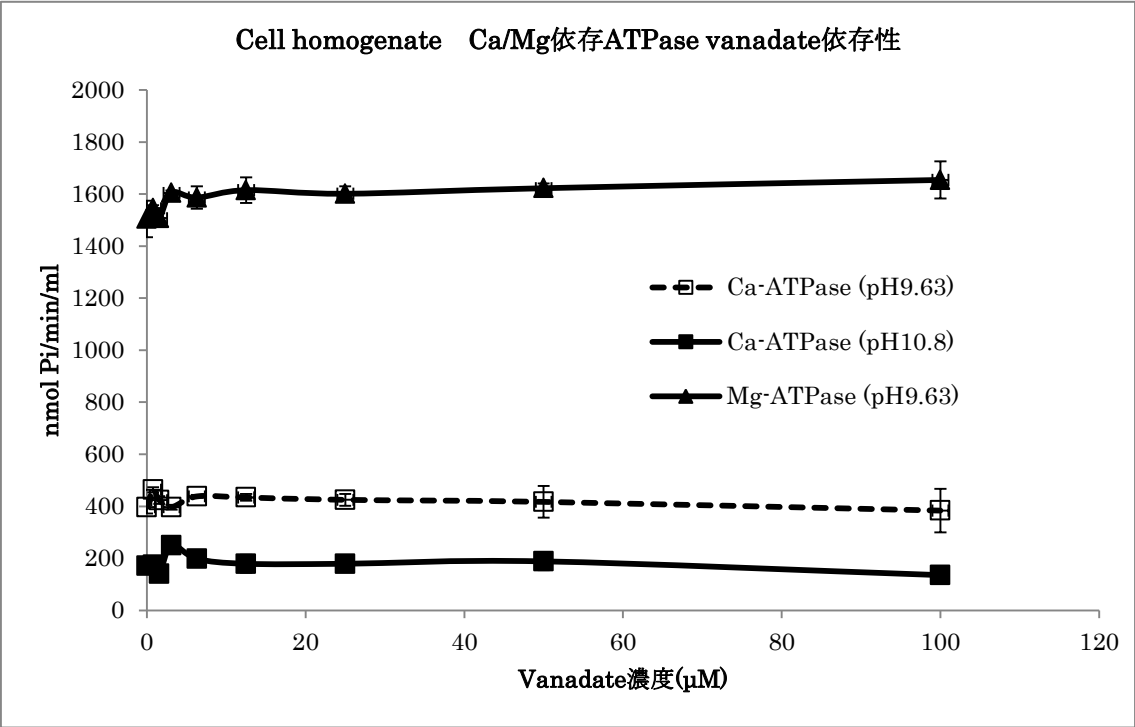


Fig. 2d

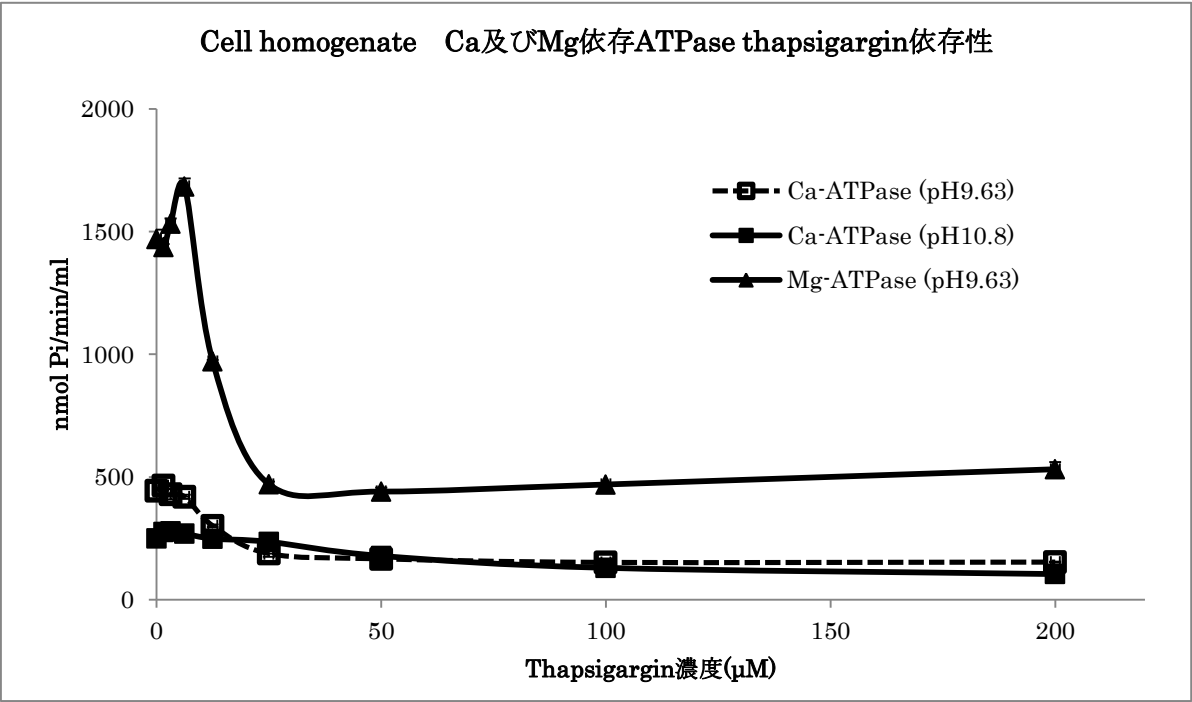


Fig. 3

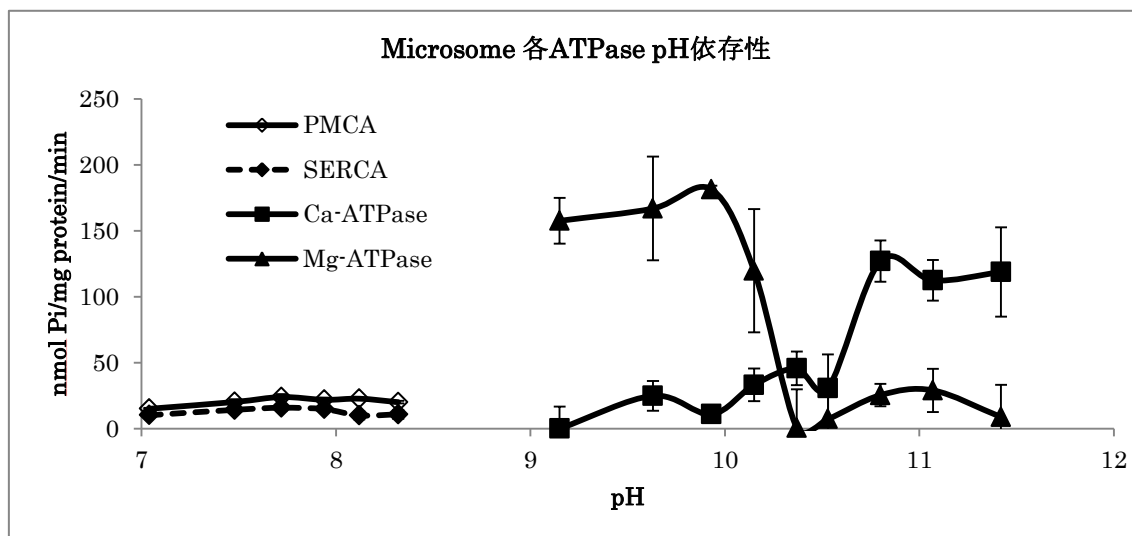


Fig. 4a

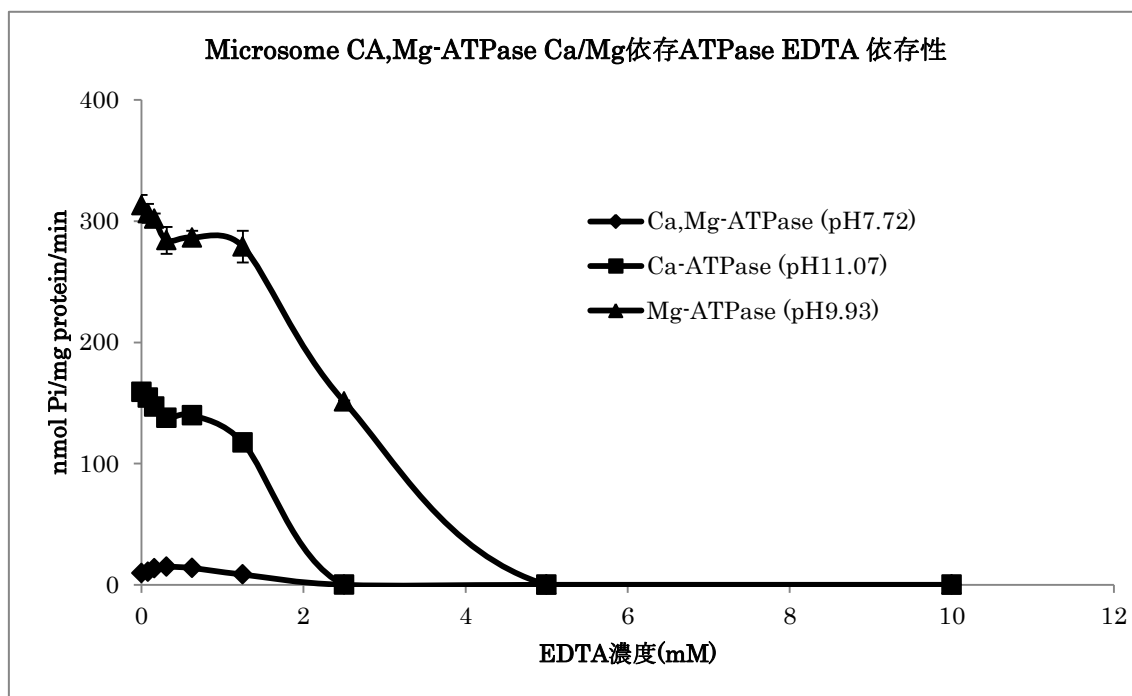


Fig. 4b

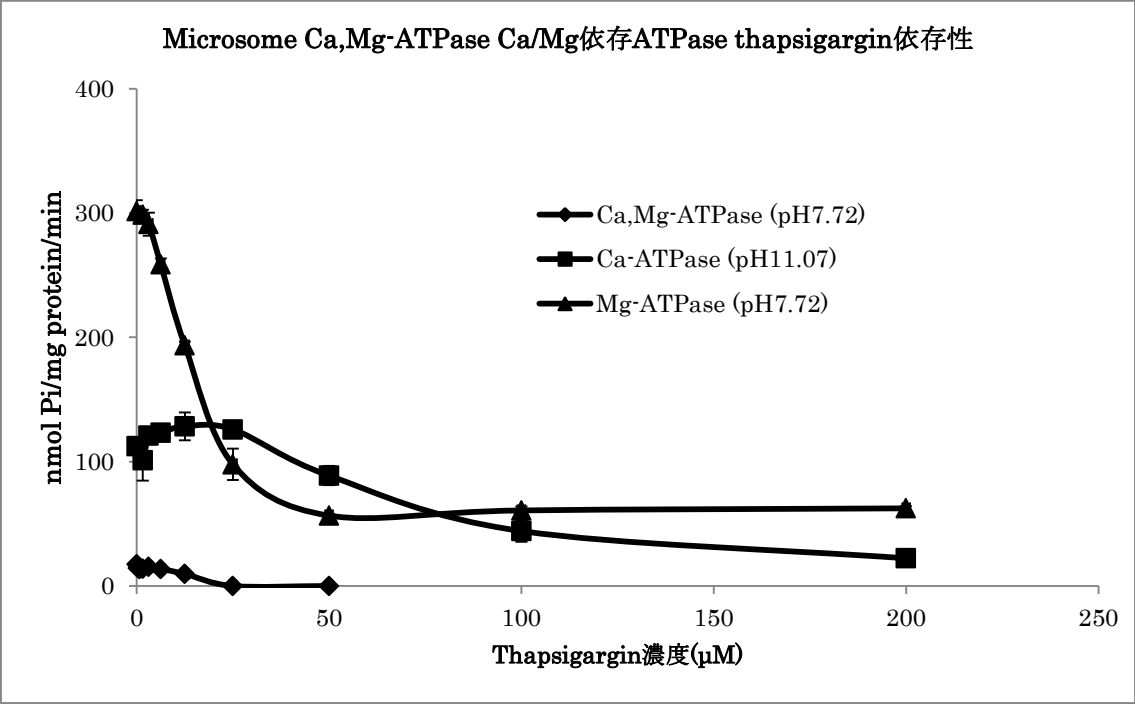


Fig. 4c

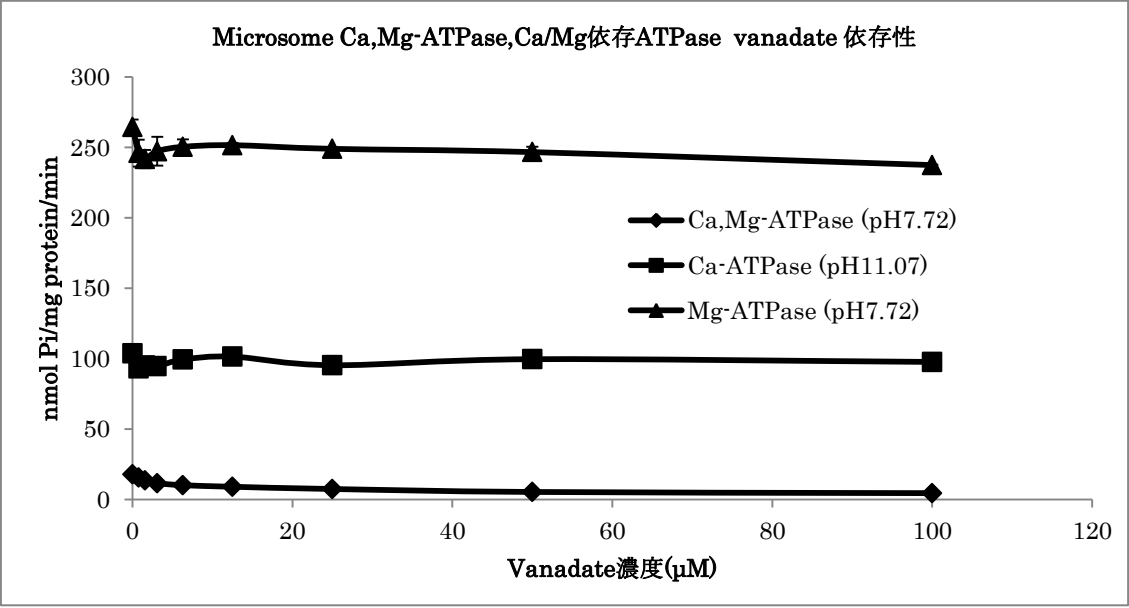


Fig. 5a

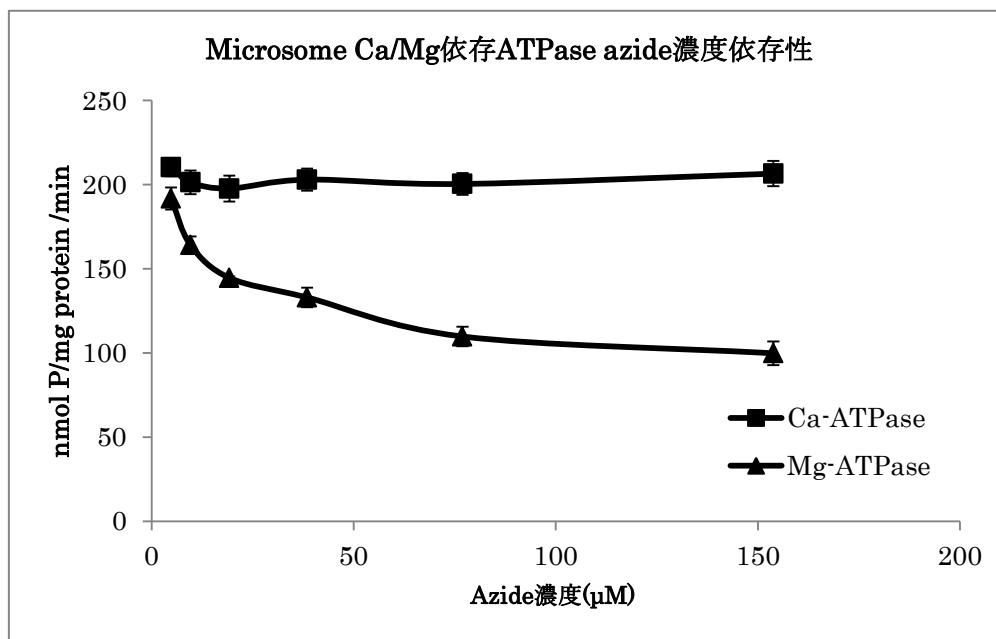


Fig. 5b

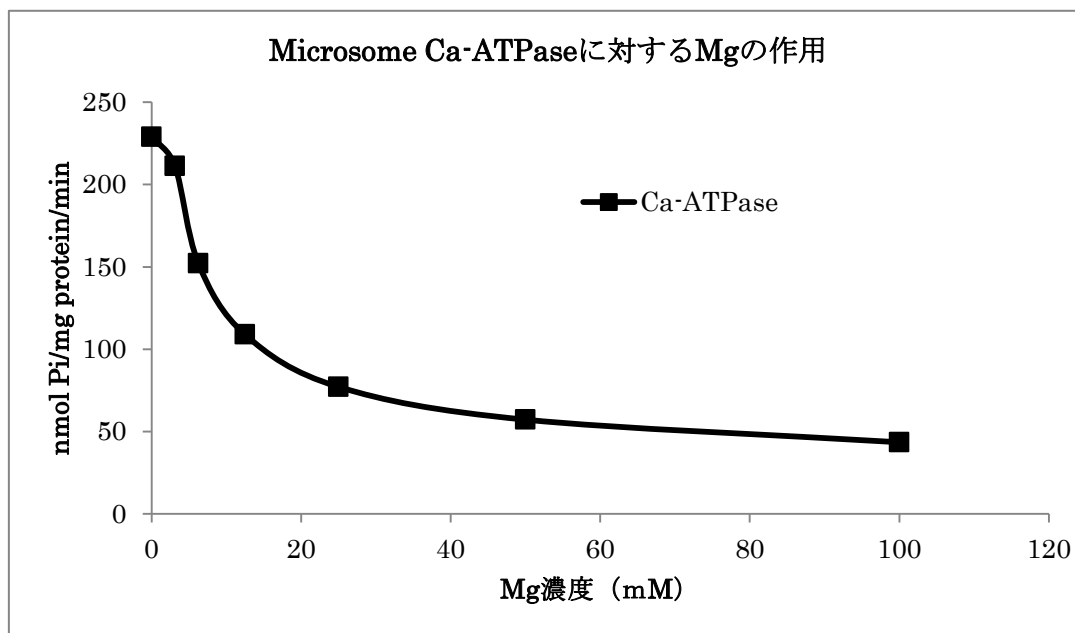


Fig. 5c

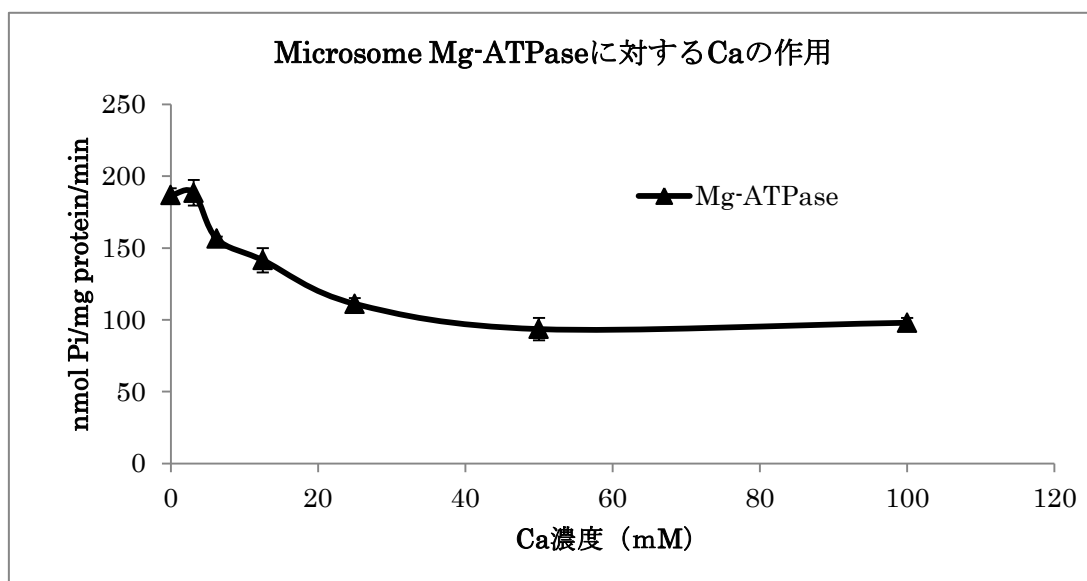


Fig. 6

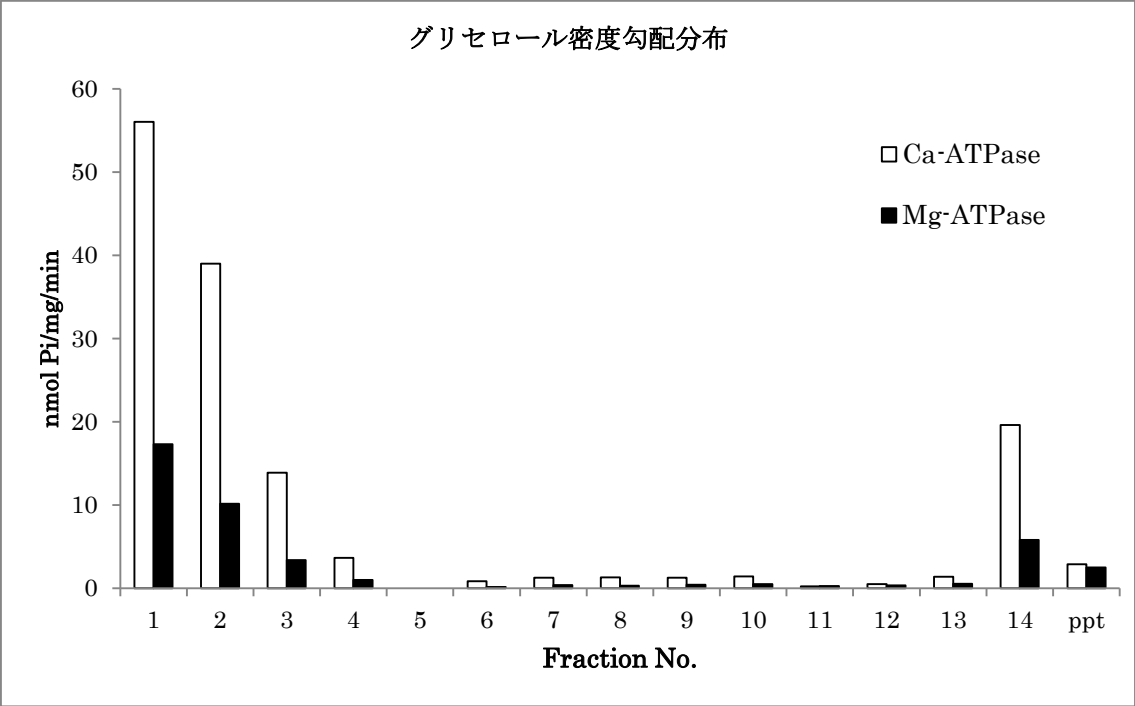


Fig. 7a

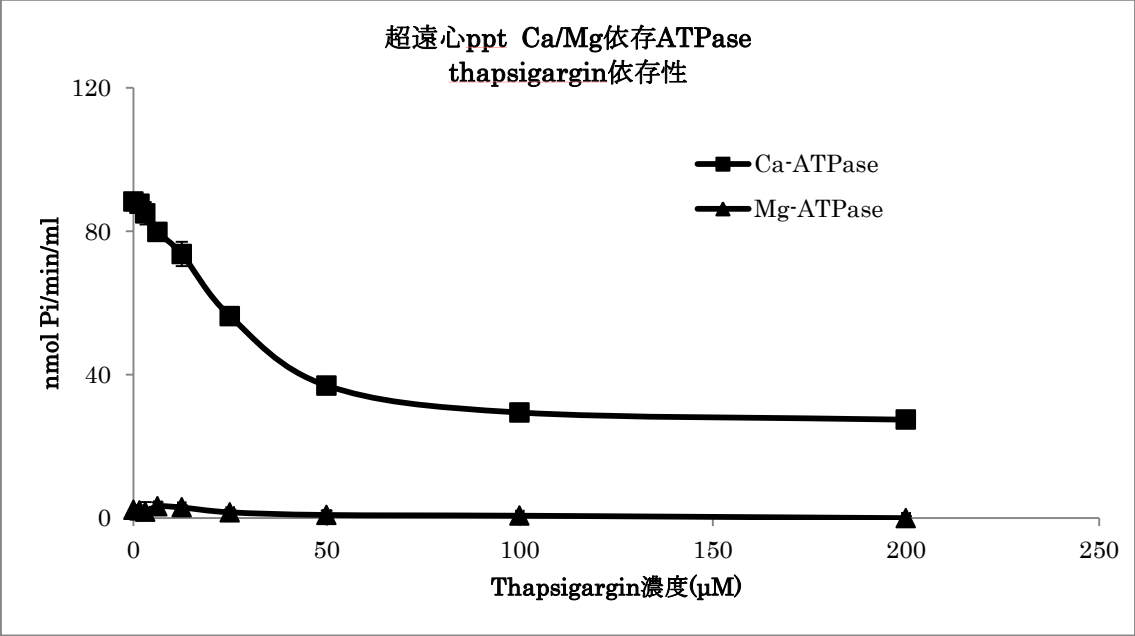


Fig. 7b

