



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のカルモジュリン依存性Ca-ATPase活性の性質
Author(s)	井坂, 一真; 鈴木, 邦明; 南川, 元 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 219-226
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68808
Type	journal article
File Information	38_02_12_Isaka.pdf



原 著

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) のカルモジュリン依存性
Ca-ATPase活性の性質

井坂 一真 鈴木 邦明 南川 元 吉村 善隆

抄 録：形態学的な研究から、硬組織形成部位にアルカリ性至適pHのCa-ATPaseの存在が示唆されているが酵素学的な性質の報告は少ない。そこで骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞が保持するCa-ATPase活性に関して研究を行った。細胞を石灰化時期まで培養後回収し、超音波破碎後に遠心分離操作を行って膜分画を得た。ATP加水分解により生じた無機リン酸をChifflet法で定量してATPase活性を測定し、以下の結果を得た。1. 膜分画にはカルシウム (Ca) あるいはマグネシウム (Mg) により活性化されるATPaseが存在し両酵素ともthapsigarginによって阻害された。Ca存在下のATPase活性はMgによって拮抗されることと、Mg-ATPaseを阻害するazideによって阻害されないことから両酵素は別の酵素と示唆された。2. Ca-ATPase活性はCa濃度依存性に増加して1 mMの遊離Ca濃度で飽和し、50 %活性化濃度は0.3 mMであった。3. 活性はpH依存性に増加し、pH 9.1でpH 7.5のはば3倍の活性を示して最大となりpH 10.0までは同程度の活性を示した。4. 活性はATP加水分解の過程においてリン酸化酵素を形成するP型ATPaseの阻害薬であるvanadateとエタクリン酸によっては阻害されなかった。5. 活性は2価金属イオンのキレーターであるEGTAおよびEDTAにより濃度依存性に阻害されたが、ビスホスホネートによっては阻害されなかった。6. 遊離Ca濃度100 nMでは、Ca-ATPase活性はほぼ検出されないが、カルモジュリンを添加すると濃度に依存して活性は増大し、50 %活性化濃度は約6 μ Mであった。7. カルモジュリン非添加における活性は、カルモジュリン拮抗薬であるW7によって濃度依存性に抑制され、50 %阻害濃度は0.3 mMであった。以上の結果は、E1細胞にはアルカリ性至適pHのP型ではないカルモジュリン依存性Ca-ATPaseが存在することを示唆する。本酵素は、形態学的に存在が示唆されるCa-ATPaseと類似しており、硬組織形成に関与する可能性がある。

キーワード：Ca-ATPase, 骨芽細胞様細胞, カルモジュリン

緒 言

骨形成において、骨芽細胞が骨基質となるコラーゲンやプロテオグリカンを合成し細胞外へ分泌したのち、カルシウムやリンなどの無機質がこれら基質に沈着することにより石灰化が起これ、骨組織が形成される¹⁾。骨芽細胞の細胞内カルシウム濃度は細胞外液に比べると著しく低いいため、骨基質へのカルシウムの輸送は能動輸送により行われる。この過程においてCa-ATPaseが関与すると考えられている^{2, 3)}。

従来知られている形質膜や筋小胞体に存在するCa-ATPaseは、ATP加水分解の過程において生じたリン酸が酵素に結合したリン酸化酵素を形成することから、P型ATPaseと呼ばれる。生体にはP型ATPaseの他にF型

ATPaseやV型ATPase等が存在するが、P型ATPaseであるCa-ATPaseは、形質膜に存在して細胞内から細胞外にCaを輸送するPMCA (plasma membrane calcium ATPase) と、小胞体膜に存在して細胞質のCaを小胞体内に取り込むSERCA (sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase) が知られている。これらのCa-ATPaseは至適pHが中性であり、Caによる50 %活性化濃度は100 μ M以下である^{3, 4)}。また、P型ATPaseであるCa-ATPaseの活性は、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンにより調節を受ける。

Fukushimaら⁵⁾は形態学的研究により、アルカリ性pHで活性を示すCa-ATPaseが骨芽細胞の形質膜や細胞内顆粒に存在することを報告した。また、Nakanoら⁶⁾も、骨芽細胞の形質膜に同様の酵素活性を見だし報告してい

る。一方、森⁷⁾及び小畑⁸⁾らは、マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞(E1細胞)に、アルカリ性に至適pHを示すCaおよびMg依存ATPaseが存在することを、酵素学的研究により報告した。これらの酵素活性は、E1細胞が骨原性細胞から骨芽細胞に分化し、ディッシュ内で分泌した基質を石灰化する過程で活性が増大することから、硬組織形成に関与する可能性があると推測された⁷⁻⁹⁾。さらに、工藤ら¹⁰⁾は、E1細胞に存在するCa-ATPaseが、P型ATPaseであるSERCAの特異的阻害薬であるthapsigarginにより酵素活性が阻害されると報告した。thapsigarginは、小胞体膜のCa-ATPaseを非可逆的に阻害することにより、小胞体へのCa²⁺の取り込みを阻害すると同時に、Ca²⁺の小胞体から細胞質への漏出を引き起こすとされている。最近ではthapsigarginが小胞体ストレスによりアポトーシスの誘導に関与することが知られている¹¹⁾。

上記のように硬組織形成部位のアルカリ性に至適pHのCa-ATPaseについては報告があるものの、P型Ca-ATPaseとの関係をはじめ、未だに不明な点が多い。また、骨芽細胞にはMg-ATPaseも存在するが^{7, 8, 10, 12)}、Ca-ATPaseとMg-ATPaseの関係にも不明な点が多い。そこで、本研究はE1細胞の保持するCa-ATPase活性とMg-ATPase活性の相違を明らかにすることと、Ca-ATPaseの酵素学的な性質を明らかにすることを目的に行った。

材 料 及 び 方 法

1. 細胞培養ならびに細胞回収

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Invitrogen Corp.製(Carlsbad, CA)を使用した。E1細胞は10 % FBSを加えた α -MEM中で5 % CO₂気相下にて、37 °Cで十分に石灰化するまで通法に従って培養後、ラバースクレーパーを用いて細胞を回収した。

2. Ca-およびMg-ATPaseを含むミクロソームの調整

回収した細胞を10秒間3回の超音波処理により破碎してホモジェネートを得た。次にホモジェネートを7,000 rpm, 20分間の遠心分離操作を行って上清と沈殿に分けた。さらにこの上清を18,000 rpm, 50分間の遠心を行って膜分画を得た¹³⁾。

3. ATPase活性の測定

測定条件によって0.25~1 μ lのミクロソーム、0.1 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) を含む25 mM sucroseおよび50 mM tris-acetate buffer (pH 9.43), 1 mMのCaCl₂あるいはMgCl₂を含む250 μ lの反応液に、基質として5 mMとなるATPを50 μ l加えて反応を行った。反応はATPの添加により開始し、37 °Cで60分間反応させ

た後に、300 μ lの12 % sodium dodecyl sulfate (SDS) を添加して停止した。酵素反応の結果生じた無機リン酸をChifflet法により発色させ¹⁴⁾、HITACHI U-2000分光光度計を使用し、850 nmで測定することにより定量した。また、あらかじめ300 μ lのSDSを加えて、酵素を変性させてからATPを加えて検出された値をback groundとして差し引いた。Ca-ATPase活性およびMg-ATPase活性は、Lowry法¹⁵⁾を用いたタンパク質量の測定を行って比活性で計算した。

各種条件の測定は以下のように行った。

1) Ca-及びMg-ATPase活性に対するthapsigarginの作用

上記の反応液に3~200 μ Mのthapsigarginを添加してATPase活性を測定した。

2) Ca-ATPase活性に対するMgの作用

1 mMのCaCl₂を含む上記の反応液に0.3~10 mMのMgCl₂を添加してCa-ATPase活性を測定した。

3) Ca-及びMg-ATPase活性に対するazideの作用

上記の反応液に31~1000 μ Mのazideを添加してCa-及びMg-ATPase活性を測定した。

4) Ca-ATPase活性の遊離Ca濃度依存性

0.1 mM EDTAの代わりに1 mM ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA) を添加した上記の反応液に、0~4 mMのCaCl₂を添加してCa-ATPase活性のCa濃度依存性を測定した。遊離Ca濃度は、EGTAとCaの結合定数から計算した。

5) Ca-ATPase活性のpH依存性

50 mM tris-acetate緩衝液(pH 9.43)の代わりに、pH 7.04, 7.48, 7.72, 7.94, 8.12, 8.32, 8.51, 8.75, 9.12, 9.45, 9.67, 10.01の50 mM tris-acetate緩衝液を添加した反応液を用いてATPase活性を測定し、活性のpH依存性を検討した。

6) Ca-ATPase活性に対するvanadateおよびエタクリン酸の作用

上記の反応液に0~50 μ MのNa₃VO₄ (vanadate) あるいはエタクリン酸を添加して、Ca-ATPase活性を測定した。

7) Ca-ATPase活性に対するビスホスホネート及びEGTAとEDTAの作用

ビスホスホネートとして、窒素を含まないetidronateとclodronate、窒素を含むalendronateとrisedronateを使用した。上記の反応液に、各実験に示した濃度のこれらのビスホスホネート、あるいは2価金属イオンのキレーターであるEGTA及びEDTAを添加してCa-ATPase活性を測定した。

8) Ca-ATPase活性に対するカルモジュリンとW7の作用

上記の反応液の1 mMのCaCl₂の代わりに、遊離Ca濃度が100 nMとなるCa存在下で、0~12 μ Mのカルモジュリンを添加して活性を測定した。また、1 mMのCaCl₂存在下で、0~6.62 mMのW7を添加してCa-ATPase活性を測定した。W7は溶媒として10 %のdimethyl sulfoxide(DMSO)を使用して希釈した。

4. 試薬

ATPはSigma-Aldrich (St. Louis, MO), thapsigargin, カルモジュリンとW7は和光純薬(大阪)から購入した。その他の試薬は、特級あるいは生化学用試薬を使用した。

5. 統計処理

結果は、1つの測定条件に対してtriplicateで測定した平均値と標準偏差を示した。多くの測定点では、標準偏差はシンボルの大きさの範囲に入った。

結 果

1. Ca及びMg-ATPase活性の各種阻害薬に対する反応性

E1細胞の膜分画に存在するCa及びMg-ATPaseが、Ca及びMgの両イオンによって活性化される、2価金属に対する特異性の低い酵素であるのか、あるいは別の酵素であるのかを明らかにすることを目的に、各種ATPase阻害薬の作用を検討した。

両活性は、SERCAの特異的阻害薬とされるthapsigarginによって濃度依存的に阻害された。活性の50%阻害濃度(IC₅₀値)は、Ca-ATPaseは25 μ M, Mg-ATPaseでは6.3 μ Mであった(図1)。

CaとMgが拮抗する可能性を検討するために、Ca-ATPase活性に対するMgの作用を調べたところ、Ca-ATPase活性はMg濃度依存性に阻害された。IC₅₀値は約1.7 mMであった(図2)。さらにMgを必要とするF型ATPase活性阻害薬であるazideの作用を調べたところ、Mg-ATPase活性はazideにより濃度依存性に阻害されたが、Ca-ATPase活性は阻害されなかった(図3)。

2. Ca-ATPase活性の酵素学的性質

代表的なCa-ATPaseであるSERCAやPMCAは、P型であり、低濃度のCaにより酵素活性が飽和し、至適pHが中性であるという特徴を示す。そこで、E1細胞のCa-ATPase活性の基本的な性質を検討した。活性のCa濃度依存性を測定したところ、活性はCa濃度依存性に増加した。最大活性は遊離Ca濃度が約1 mMで得られ、Caの50%活性化濃度(K_{0.5})は0.3 mMであった(図4)。活性のpH依存性を測定するとpH依存性に増加した。最大活性はpH 9.1以上のアルカリ性pHで得られ、pH 7.5のほぼ3倍の

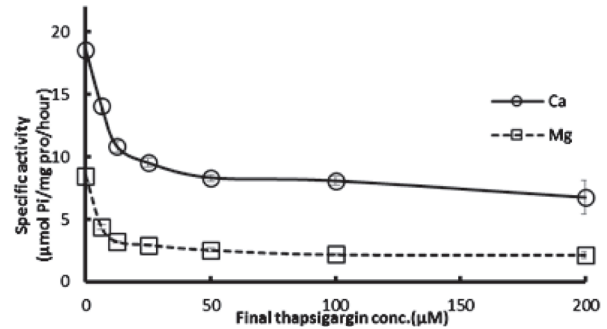


図1 Ca-及びMg-ATPase活性に対するthapsigarginの作用

MC3T3-E1細胞の膜分画を使用してCa- (○) 及びMg-ATPase活性(□)のthapsigargin濃度依存性を測定した。材料及び方法に記載したように、1 μ lの膜分画と、最終濃度が0.1 mM EDTA, 25 mM sucrose, 50 mM tris-acetate (pH 9.43), 1 mMのCaCl₂ (○)あるいは1 mM MgCl₂ (□), 5 mM ATPを含む300 μ lの反応液中でATPase反応を行った。反応はATPの添加によって開始した。生じたPiはChifflet法によって定量してATPase活性を計算した。反応液に図に示した3~200 μ Mのthapsigarginを添加して活性を測定することにより、活性に対するthapsigarginの濃度依存性を測定した。測定はtriplicateで行い、各測定値は平均と標準偏差で示した。

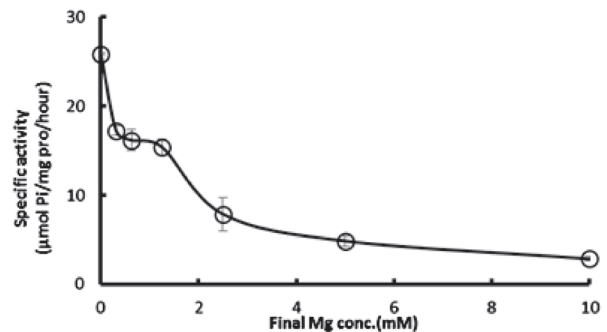


図2 Ca-ATPase活性に対するMgの作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。反応液に図に示した0.3~10 mMのMgCl₂を添加して活性を測定することにより、活性に対するMgの濃度依存性を測定した。

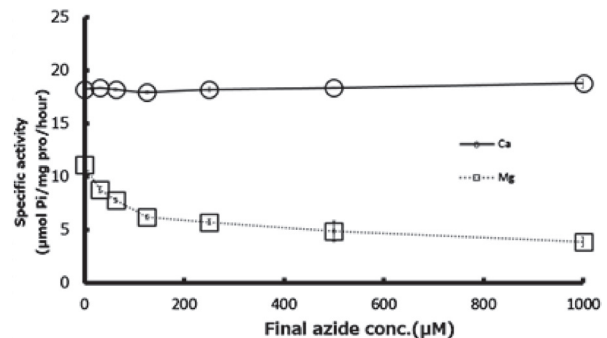


図3 Ca-及びMg-ATPase活性に対するazideの作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa- (○) 及びMg-ATPase (□) 活性を測定した。反応液に、図に示した31~1000 μ Mのazideを添加して活性を測定することにより、活性に対するazideの濃度依存性を測定した。

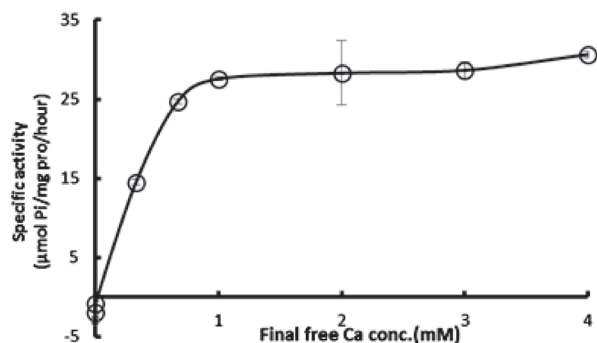


図4 Ca-ATPase活性の遊離Ca濃度依存性

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。ただし、1 mMのCaCl₂の代わりに0~5 mMのCaCl₂を添加し、0.1 mM EDTAの代わりに1 mM EGTAを添加して活性を測定することにより、活性に対するCaの濃度依存性を測定した。遊離Ca濃度はEGTAとCaの結合定数から計算して、図の中の濃度として示した。

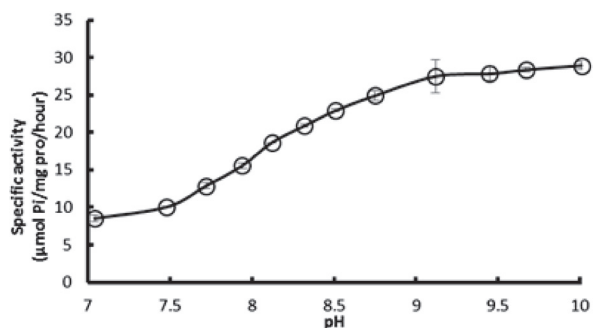


図5 Ca-ATPase活性のpH依存性

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。ただし、50 mM tris-acetate (pH 9.43)の代わりにpH 7.04~10.01の50 mM tris-acetateを添加して活性を測定することにより、活性のpH依存性を測定した。

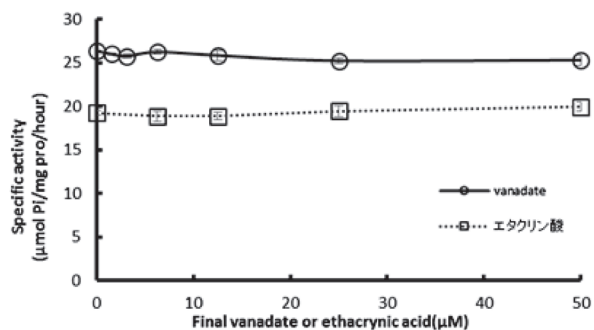


図6 Ca-ATPase活性に対するvanadate及びエタクリン酸の作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。反応液に、図に示した0~50 μMのvanadate (○)あるいはエタクリン酸 (□)を添加して活性を測定することにより、活性に対するvanadateあるいはエタクリン酸の濃度依存性を測定した。

活性を示した (図5)。E1細胞のCa-ATPaseがP型である可能性を検討するために、P型ATPaseの共通した阻害薬であるvanadateとMg依存性のリン酸化中間体形成酵素を阻害するエタクリン酸の作用を検討した。その結果、Ca-ATPase活性はvanadate及びエタクリン酸の濃度に関係なく阻害されなかった (図6)。

3. Ca-ATPase活性に対するビスホスホネート及びEDTAとEGTAの作用

Ca-ATPase活性のCa要求性を確認するために、EDTA及びEGTAの作用を検討したところ、いずれも濃度依存性に活性を抑制した (図7)。次に、2価金属イオンをキレートすることによりアルカリ性ホスファターゼ活性を抑制するとされている4種のビスホスホネートの作用を検討したところ、いずれもCa-ATPase活性の抑制作用を示さなかった (図7)。

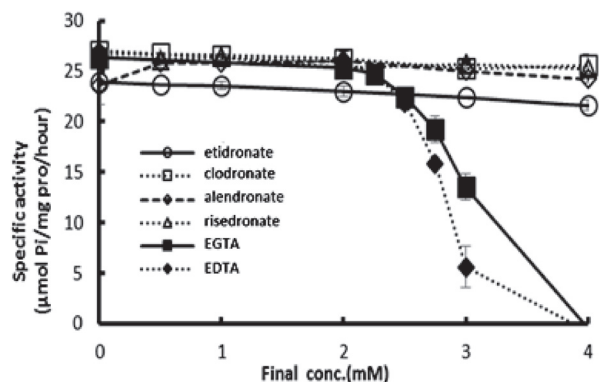


図7 Ca-ATPase活性に対するビスホスホネート薬、EGTA及びEDTAの作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。図に示した0~4 mMのetidronate (○), clodronate (□), alendronate (◇), risedronate (△), EGTA (■)あるいはEGTA (◆)を添加して活性を測定することにより、活性に対するビスホスホネート薬、EGTA及びEDTAの濃度依存性を測定した。

4. Ca-ATPase活性に対するカルモジュリンの作用

カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンは多くのCa依存性の酵素及び機能性タンパク質の活性調節に関与していることから、Ca-ATPase活性に対するカルモジュリンの作用を検討した。遊離Ca濃度が100 nMでは、カルモジュリン非存在下ではCa-ATPase活性はほとんど検出されないが、カルモジュリンを添加するとその濃度に依存してCa-ATPase活性が増加した (図8)。カルモジュリンのK_{0.5}は約6 μMであった。

一方、1 mM Ca存在下のCa-ATPase活性にカルモジュリン拮抗薬であるW7を添加すると、濃度に依存してCa-ATPase活性は抑制された (図9)。W7に対するIC₅₀値は約0.3 μMであった。

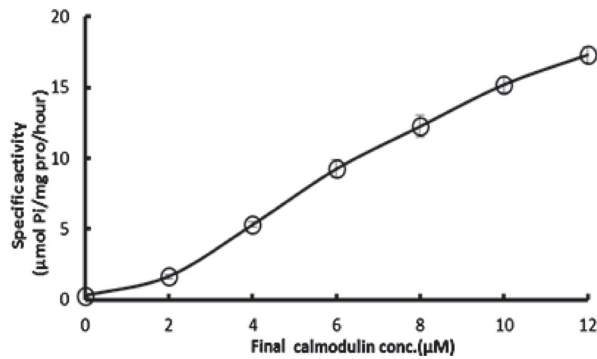


図8 Ca-ATPase活性に対するカルモジュリンの作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。ただし、1 mMのCaCl₂のかわりに、遊離Ca濃度が100 nMとなるCaを添加し、図に示した0~12 μMのカルモジュリンを添加して活性を測定することにより、活性に対するカルモジュリンの濃度依存性を測定した。

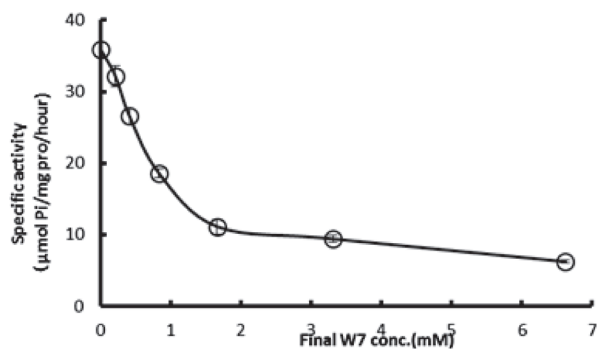


図9 Ca-ATPase活性に対するW7の作用

図1の図の説明に記載したのと同様の方法でCa-ATPase活性を測定した。反応液に、図に示した0~6.62 mMのW7を添加して活性を測定することにより、活性に対するW7の濃度依存性を測定した。

考 察

1. E1細胞のCa-ATPaseはMg-ATPaseとは異なる

森ら⁷⁾、小畑ら⁸⁾の報告ではCa-ATPaseとMg-ATPaseはいずれもE1細胞の石灰化の過程で活性の増加が見られ、アルカリ性至適pHであることから、Ca及びMgで活性化される2価金属要求の特異性が低い1種類の酵素なのか、あるいは2種類の別の酵素であるのかが不明であった。本研究では、Mg-ATPaseはF型Mg-ATPaseの阻害薬であるazideによって阻害を受けるのに、Ca-ATPaseは阻害されないこと(図3)、Ca-ATPase活性はMgによって拮抗される(図2)ことから、Ca-ATPaseとMg-ATPaseは別の酵素であることが示唆された。しかし、SERCAの阻害薬であるthapsigarginは、E1細胞のCa-ATPase及びMg-ATPaseの両方を濃度依存性に抑制した(図1)。Ca-ATPaseについては、Caによる活性化という点からSERCAとの共通の機構が推測される。Mg-ATPaseに関しては著者らの知る限りthapsigarginによる阻害の報告は

なく、しかもCa-ATPaseよりも低濃度で活性が阻害された。E1細胞のCa-ATPaseとMg-ATPaseは、いずれも細胞の石灰化の時期に活性が増大し細胞膜に存在するという共通点がある⁸⁾。また、斎藤ら¹²⁾はE1細胞のMg-ATPaseがP型ATPaseの特徴を保持していると報告している。これらの機能的及び構造的類似性がthapsigarginによるMg-ATPase活性抑制の原因となると推測されるが、現時点では詳細は不明である¹⁶⁾。

2. E1細胞のCa-ATPase活性の性質

今までに知られている代表的なCa-ATPaseであるSERCAやPMCAは、細胞膜に存在する酵素であること、100 μM程度のCa濃度で最大活性を示すこと、至適pHが中性であること、ATP加水分解中にリン酸化反応中間体(phosphoenzyme intermediate, EP)を形成するP型ATPaseであることなどの共通点がある^{2, 3)}。E1細胞のCa-ATPase活性は、細胞膜に存在する酵素であることはSERCAやPMCAと共通しているが、至適pHはアルカリ性であることからSERCAやPMCAとは異なると報告されていた^{7, 8, 10)}。そこで、E1細胞のCa-ATPase活性の性質について詳細に検討した。

活性のCa濃度依存性を測定すると、最大活性は遊離Ca濃度が約1 mMで得られた(図4)。K_{0.5}は0.3 mMとなり、SERCA及びPMCAの約10倍の高濃度を必要とすることから、E1細胞のCa-ATPaseはSERCA及びPMCAのCa-ATPaseとは異なることを示唆する。一方、最大活性のために高濃度のCaを必要とする結果は、Caを輸送する酵素である場合は輸送の能力が高いことを示唆する。E1細胞のCa-ATPaseは石灰化部位にCaを輸送するという機能に適した性質であると考えられる。

Ca-ATPase活性のpH依存性を測定したところ、至適pHはアルカリ性であり、この結果もSERCA及びPMCAとは異なっている。生体のpHとは異なる至適pHは酵素の機能にとっては不利と推測されるが、アルカリ性至適pHのアルカリ性ホスファターゼ、酸性pHで機能する酸性ホスファターゼなど、中性以外のpHで作用する酵素は他にも存在する¹⁷⁾。SERCA及びPMCAは細胞膜を隔ててCa²⁺とH⁺を対向輸送すると推測されている^{2, 3)}。もし、E1細胞のCa-ATPaseもCa²⁺とH⁺を対向輸送するのなら、Caを蓄積する側を同時にアルカリ性にするのが可能であり、石灰化に必要なアルカリ性ホスファターゼが機能する場を提供することにも貢献する可能性がある¹⁷⁾。

SERCA及びPMCAはP型ATPaseの阻害薬であるvanadateによって阻害されるが、E1細胞のCa-ATPaseはvanadateにも、また、EPを形成するMg-ATPaseの阻害薬であるエタクリン酸にも非感受性であった。これらの結果は、E1細胞のCa-ATPaseはP型ではないことを示唆する。

E1細胞のCa-ATPaseがCa要求性であることを確認するために、CaのキレーターであるEGTA及びEDTAの作用

を検討したところ、いずれも濃度依存性に活性を抑制したことからCa要求性が確認された(図7)。一方、2価金属をキレートすることによりアルカリ性ホスファターゼ活性を阻害するとされるetidronate, clodronate, risedronate及びalendronateなどのビスホスホネートはCa-ATPase活性を抑制しなかった(図7)。この結果は、Ca-ATPaseのCa結合部位はアルカリ性ホスファターゼの2価金属結合部位と比較して、ビスホスホネートによってキレートされない環境に存在することを示唆する。アルカリ性ホスファターゼはリン酸エステル結合を加水分解する酵素であり、ATPも基質とすることが可能である¹⁷⁾。従って、アルカリ性至適pHのCa-ATPase活性がアルカリ性ホスファターゼによって発揮される可能性も存在したが、ビスホスホネートに対する非感受性からその可能性はないと考えられた。

以上の結果から、E1細胞のCa-ATPaseはSERCAやPMCAと異なることが示唆された。E1細胞のCa-ATPaseがその活性化にSERCAやPMCAよりも約10倍高濃度のCaを必要とすることから、石灰化部位へのCaの輸送という点ではSERCAやPMCAより適していると推測されるが、今後の研究が必要である。

3. E1細胞のCa-ATPaseはカルモジュリン依存性である

カルモジュリンはカルシウム結合タンパク質である。Ca²⁺と結合する部位が分子内に4か所存在し、この部位にCa²⁺が結合することによりカルモジュリンのタンパク質構造が変化して、特定のタンパク質と結合できるようになる¹⁸⁾。SERCAやPMCAはカルモジュリンによって活性が調節されることから^{2, 3)}、同じくCa輸送酵素の可能性のあるE1細胞のCa-ATPaseに対するカルモジュリンの作用を検討した(図8)。遊離Ca濃度が100 nMでは、Ca-ATPase活性はほぼ認められないが、カルモジュリンを添加すると濃度依存性に活性は増加した。K_{0.5}は約6 μ Mであった。この結果は、E1細胞のCa-ATPaseはカルモジュリン依存性であり、カルモジュリン存在下ではCaに対する親和性が増大して活性化されることを示唆する。また、1 mM Ca存在下のCa-ATPase活性に対する、カルモジュリン阻害剤であるW7の効果を検討すると、活性はW7の濃度依存性に低下した(図9)。この結果は、E1細胞のCa-ATPaseには内在性のカルモジュリンが存在して活性発現に関与するが、カルモジュリンの機能が抑制されると活性も低下することを示唆する。以上の結果は、E1細胞のCa-ATPaseは補助的因子としてカルモジュリンを利用することにより低濃度のCa環境下でもその機能を維持していることを示唆する。

結 論

E1細胞にはアルカリ性至適pHのカルモジュリン依存性Ca-ATPaseが存在する。本酵素は、形態学的に存在が示唆されるCa-ATPaseと類似しており、硬組織形成に関与する可能性がある。

参 考 文 献

- 1) 網塚憲生, 本郷裕美, 坪井香奈子, 長谷川智香, 山本知真也, 原口真衣: 骨の細胞における組織学的・微細構造学的所見. 顕微鏡, 50: 191-196, 2015.
- 2) Zaidi A, Michaelis ML: Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca²⁺-ATPase. Free Radic Biol Med 27: 810-821, 1999.
- 3) Francis MJ, Lees RL, Trujillo E, Martin-Vasallo P, Heersche JN, Mobasheri A: ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. J Biochem 34: 459-476, 2002.
- 4) 田仲宏光, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 福島和昭: ラット脳カルシウムATPase活性の静脈麻酔薬による抑制. 北海道歯誌, 32: 222-229, 2012.
- 5) Fukushima O, Goshi N, Koda M, Tokudome M: Localization of Ca-ATPase activity at high alkaline pH in bone cell. J Bone Miner Metab 3: 88-92, 1985.
- 6) Nakano Y, Beertsen W, Van DenBos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y: Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane: tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase. Bone 35: 1077-1085, 2004.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Sudo H, Kodama HA, 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.
- 10) 工藤智也, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 山崎 裕: 骨芽細胞様MC3T3-E1細胞のCa依存ATPaseの性質と部分精製. 北海道歯誌, 印刷中
- 11) Ganley IG, Wong PM, Gammoh N, Jiang X: Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. Molecular Cell 42: 731-743, 2011.

- 12) 斎藤豪紀, 出山義昭, 吉村善隆, 戸塚靖則, 鈴木邦明 : 骨芽細胞様細胞の Mg^{2+} 依存性ATPase活性の性質. 北海道歯誌, 30 : 61-68, 2009.
- 13) Hogeboom GH : Fractionation of cell components of animal tissues. Methods Enzymol 1 : 16-19, 1955.
- 14) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S : A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein : application to lens ATPases. Anal Biochem 168 : 1-4, 1988.
- 15) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951.
- 16) Rogers TB, Inesi G, Wade R, Lederer WJ : Use of thapsigargin to study Ca^{2+} homeostasis in cardiac cells. Biosci Rep 15 : 341-349, 1995.
- 17) 鈴木邦明 : アルカリ性ホスファターゼという酵素と硬組織形成. 北海道歯誌, 37 : 2-10, 2016.
- 18) Babu YS, Sack JS, Greenhouse TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ : Three-dimensional structure of calmodulin. Nature 315 : 37-40, 1985.

ORIGINAL

Properties of calmodulin-dependent Ca-ATPase activity of a clonal osteoblastic cell (MC3T3-E1)

Kazuma Isaka, Kuniaki Suzuki, Hajime Minamikawa and Yoshitaka Yoshimura

ABSTRACT : Morphological studies suggest the presence of Ca-ATPase at alkaline pH optimum at the site of hard tissue formation, but there are few reports on enzymological properties. Therefore, we investigated Ca-ATPase activity using clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). The cells were cultured until calcification. The cells were then ultrasonically crushed. Further, they were centrifuged to obtain a membrane fraction. The ATPase activity was measured by measuring inorganic phosphate produced by ATP hydrolysis by the Chifflet method. The following results were obtained :

1. Ca-ATPase and Mg-ATPase exist in membrane fractionation. They are inhibited by thapsigargin. Ca-ATPase activity is inhibited by Mg. Mg-ATPase is inhibited by azide, but Ca -ATPase was not inhibited. Both are different enzymes.
2. Ca-ATPase activity increased with Ca concentration dependence, saturated at 1 mM free Ca concentration, and 50% activation was 0.3 mM.
3. Ca-ATPase activity increased in pH dependence and showed maximum activity at pH 9.1. It is nearly three times that of pH 7.5. It is the same value up to pH 10.0.
4. Ca-ATPase activity is not inhibited by vanadate, an inhibitor of P-type ATPase. Its activity is not inhibited by ethacrynic acid, an inhibitor of Mg-ATPase.
5. Ca-ATPase activity is inhibited in a concentration-dependent manner by EGTA and EDTA of bivalent metal chelators. Its activity is not inhibited by bisphosphonates.
6. At free Ca concentration of 100 nM, Ca-ATPase activity in the absence of calmodulin was not detected. Ca-ATPase activity increases with the addition of calmodulin depending on the concentration, and the 50 % activation concentration is about 6 μ M.
7. Ca-ATPase activity is inhibited in a concentration-dependent manner by W7 which is a calmodulin antagonist when calmodulin is not added. The 50 % inhibitory concentration is 0.3 mM.

The above results suggest that Ca-ATPase in MC3T3-E1 cells is calmodulin-dependent, which is optimal at alkaline pH and not P-type. This enzyme may be identical to Ca-ATPase which is morphologically suggested to be present, and it may be involved in hard tissue formation.

Key Words : Ca-ATPase, osteoblastic cell, calmodulin