



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	井坂, 一真
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13053号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70752
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuma_Isaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 井 坂 一 真

学 位 論 文 題 名

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

骨形成において、骨芽細胞が骨基質を合成し細胞外へ分泌したのち、カルシウムなどの無機質が分泌された基質に沈着することにより石灰化が起こり、骨組織が形成される。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。

従来知られている形質膜や筋小胞体に存在する Ca-ATPase は、P 型 ATPase と呼ばれる。P 型 ATPase である Ca-ATPase は、形質膜に存在する PMCA と、小胞体膜に存在する SERCA が知られている。これらの Ca-ATPase は至適 pH が中性である。また、P 型 ATPase である Ca-ATPase 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って活性が調節を受ける。

Fukushima らは形態学的研究により、アルカリ性 pH で活性を示す Ca-ATPase が存在することを報告した。一方、森及び小畑らは、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．

上記のように硬組織形成部位のアルカリ性至適 pH の Ca-ATPase についての報告があるものの，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，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．

E1 細胞は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．回収した細胞を 2 回の遠心分離操作により膜分画を得た．

測定条件によって 0.25～1 μ l のミクロソーム，0.1 mM EDTA を含む 25 mM sucrose および 50 mM tris-acetate 緩衝液 (pH 9.43)，1 mM の CaCl_2 あるいは Mg Cl_2 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 加えて反応を行い、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% 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 法により発色させ，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 として差し引き

た. Ca-ATPase 活性および Mg-ATPase 活性は, Lowry 法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.

MC3T3-E1 細胞の膜分画に存在する 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. 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. 以上のことから, Ca-ATPase と Mg-ATPase は別の酵素であることが示唆された.

MC3T3-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. 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 濃度依存性を測定したところ, 活性は Ca 濃度依存性に増加し, 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した.

活性の pH 依存性を測定すると pH 依存性に増加した. 至適 pH はアルカリ性であり, この結果も SERCA 及び PMCA とは異なっていた.

MC3T3-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。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。

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ことから **Ca** 要求性が確認された。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 **etidronate**, **clodronate**, **risedronate** 及び **alendronate** などのビスホスホネート薬は **Ca-ATPase** 活性を抑制しなかった。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、ビスホスホネート薬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。

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たんぱく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。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.

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. 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.

以上のことから, 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.