



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_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 井坂 一真

審 査 担 当 者	主査	特任教授	鈴木 邦明
	副査	教授	田村 正人
	副査	教授	網塚 憲生

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

審査は、審査担当者全員の出席のもとで行われた。申請者がスライドを使用しながら提出論文の概要の説明を行い、審査担当者が随時、その内容ならびに関連した学問分野について口頭にて試問を行った。学位申請者より説明された提出論文の概要は以下の通りである。

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 のほぼ 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。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。

審査担当者から上記内容および関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- (1) E1 細胞の培養を石灰化時期まで行って、活性測定に使用する膜分画を回収した理由、
- (2) P 型 ATPase の作用機序について、他の ATPase との違いは何か、
- (3) thapsigargin はどのような薬物なのか、Ca-ATPase はなぜ阻害されるのか、
- (4) Ca-ATPase の至適 pH がアルカリ性の意義は、
- (5) カルシウムと対向輸送されるイオンは存在するのか、
- (6) アルカリ性ホスファターゼはビスホスホネートにより阻害されるが、Ca-ATPase が阻害されないのはなぜか、
- (7) Ca-ATPase 活性を測定する膜分画にはカルモジュリンが含まれているのか、
- (8) カルモジュリンが Ca-ATPase に対して作用する機序は、
- (9) カルシウム結合タンパク質には他にどのようなものがあるか、

学位申請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。

本研究の結果は、骨芽細胞様細胞に存在する Ca-ATPase が内在性のカルモジュリンに依存して酵素活性を発現することを明らかにした。石灰化に関与する可能性があることを示した点が、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。加えて、学位申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることを審査員一同が認めた。

以上から、学位申請者は博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認めた。