



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13053号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13053
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70753
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuma_Isaka.pdf



博 士 論 文

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

平成 30 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

井 坂 一 真

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 細胞の保持する 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 依存性に増加した．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 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。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 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、小胞体膜状の Ca-ATPase を非可逆的

に阻害することにより，小胞体への Ca^{2+} の取り込みを阻害すると同時に， Ca^{2+} 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^{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% CO_2 気相下にて，37℃ 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 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 μM 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 Ca Cl_2 を含む上記の反応液に 0.3~10 mM の Mg Cl_2 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 μM 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 Ca Cl_2 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 μM の Na_3VO_4 (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薬及び EGTA と EDTA の作用

ビスホスホネート薬として, 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薬, 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 CaCl_2 の代わりに, 遊離 Ca 濃度が 100 nM となる Ca 存在下で, 0~12 μM 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 CaCl_2 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. データ処理

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

MC3T3-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 (IC_{50} 値) は、Ca-ATPase は 25 μ M, Mg-ATPase では 6.3 μ M であった(Fig.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。 IC_{50} 値は約 1.7 mM であった(Fig. 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 (Fig.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、MC3T3-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 (Fig.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 倍の活性を示した (Fig.5)。

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 (Fig.6)。

3. Ca-ATPase 活性に対するビスホスホネート薬及び 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 (Fig.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薬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(Fig.7).

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(Fig.8)。カルモジュリンの $K_{0.5}$ は約 6 μ M 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(Fig.9)。W7 に対する IC_{50} 値は約 0.3 μ M であった。

考察

1. MC3T3-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 MC3T3-

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 (Fig. 3)、Ca-ATPase 活性は Mg によって拮抗される (Fig. 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 (Fig. 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が、Mg-ATPase に関しては thapsigargin による阻害の報告もなく、その活性抑制の意義は現時点では不明である¹⁶⁾。

2. MC3T3-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 μ M 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 (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)}。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^{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(Fig.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。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。

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ことが可能であり、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 (Fig. 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薬は Ca-ATPase 活性を抑制しなかった (Fig. 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。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、ビスホスホネート薬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 が SERCA や PMCA と異なることが示唆された。一方、SERCA や PMCA とは異なる石灰化部位への Ca 輸送に適した性質を保持することも明らかになったが、今後の研究が必要である。

3. MC3T3-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)},

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 (Fig. 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 μM 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 (Fig. 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。

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, Mobasher 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 Metabo 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*, 受理, 2015.
- 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

- Mg²⁺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 Ca²⁺ 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.

図とその説明

Fig.1 Ca²⁺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^{2+} (○) 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、 $1\ \mu\text{l}$ の膜分画と、最終濃度が $0.1\ \text{mM}$ EDTA, $25\ \text{mM}$ sucrose, $50\ \text{mM}$ tris-acetate (pH 9.43), $1\ \text{mM}$ の CaCl_2 (○) あるいは $1\ \text{mM}$ MgCl_2 (□), $5\ \text{mM}$ ATP を含む $300\ \mu\text{l}$ 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 を 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 $3\sim 200\ \mu\text{M}$ 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。

Fig.2 Ca-ATPase 活性に対する Mg の作用

Fig.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 $0.3\sim 10\ \text{mM}$ の MgCl_2 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。

Fig.3 Ca- 及び Mg-ATPase 活性に対する azide の作用

Fig.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 $31\sim 1000\ \mu\text{M}$ 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．

Fig.4 Ca-ATPase 活性の遊離 Ca 濃度依存性

Fig.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 CaCl_2 の代わりに 0～5 mM の CaCl_2 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．

Fig.5 Ca-ATPase 活性の pH 依存性

Fig.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．

Fig.6 Ca-ATPase 活性に対する vanadate 及びエタクリン酸の作用

Fig.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.

Fig.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

Fig.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 0~4 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.

Fig.8 Ca-ATPase 活性に対するカルモジュリンの作用

Fig.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 CaCl_2 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.

Fig.9 Ca-ATPase 活性に対する W7 の作用

Fig.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.

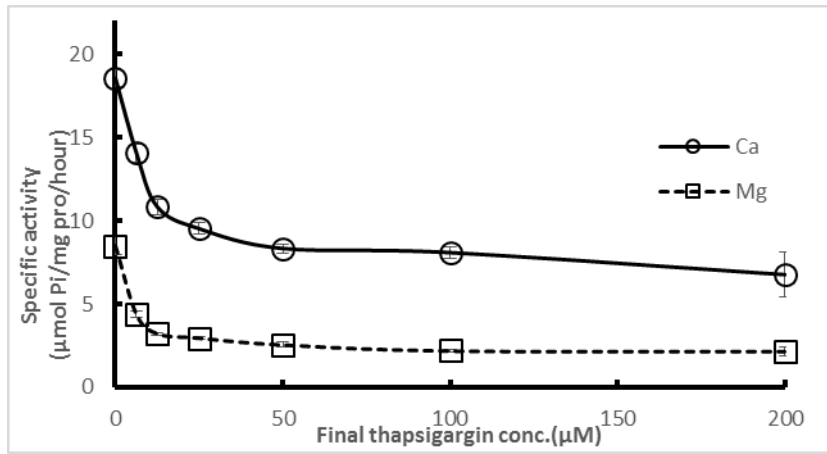


Fig.1

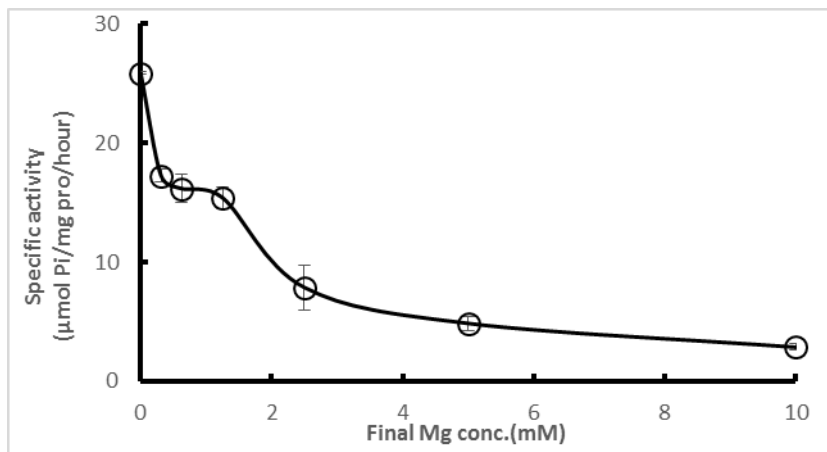


Fig.2

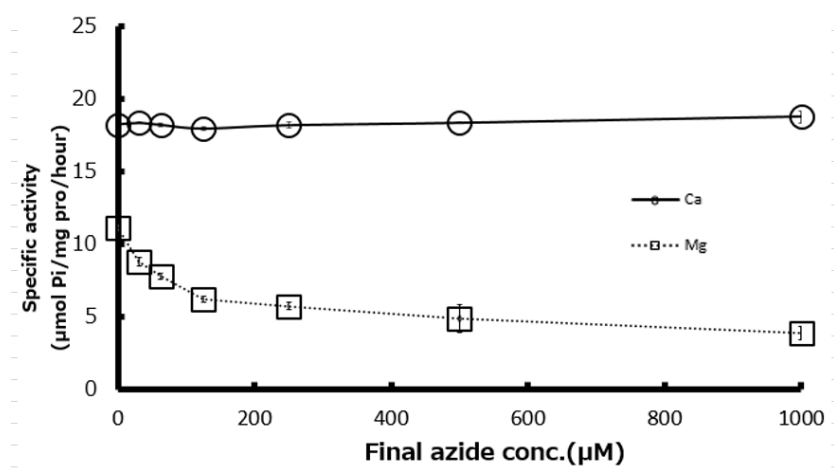


Fig.3

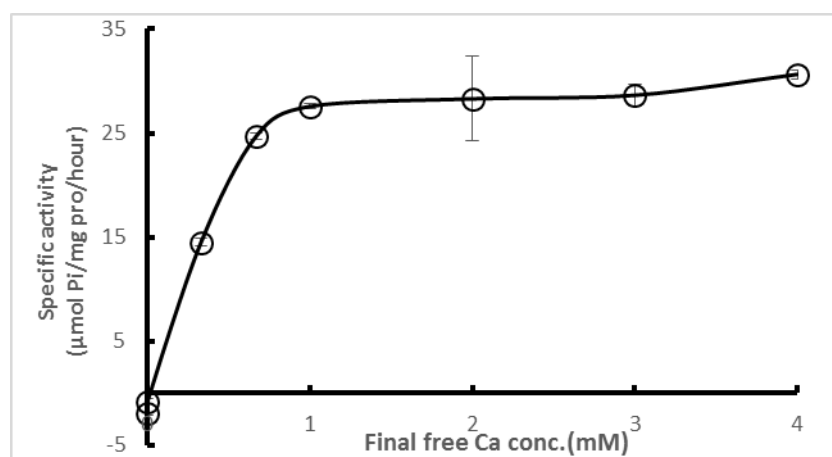


Fig.4

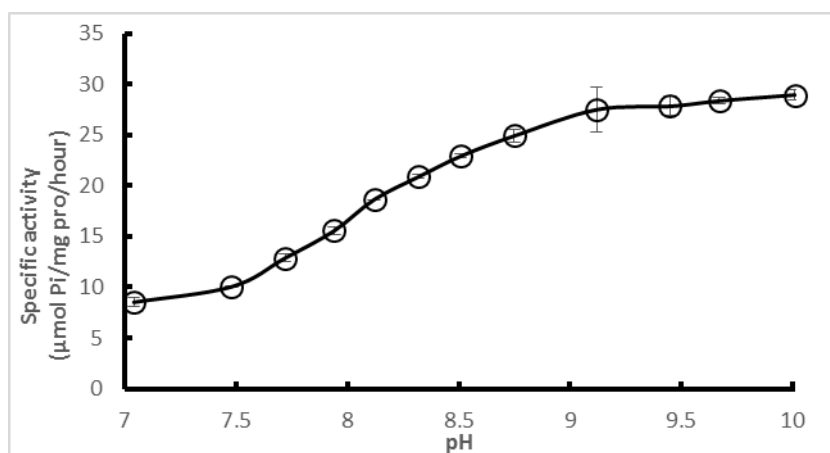


Fig.5

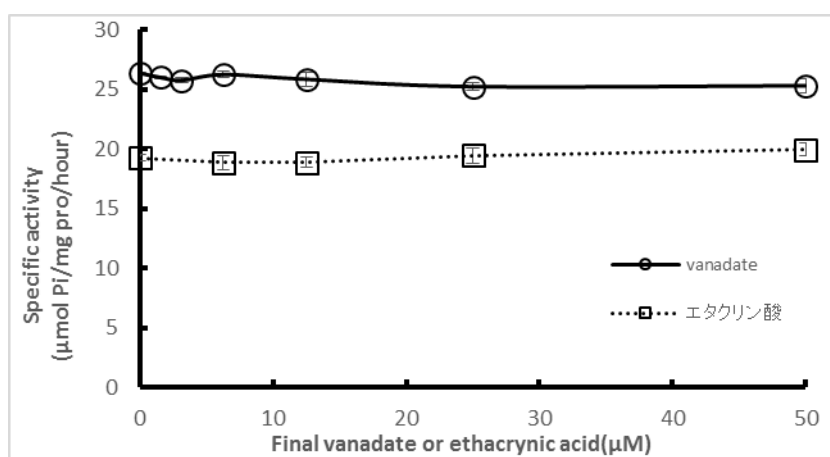


Fig.6

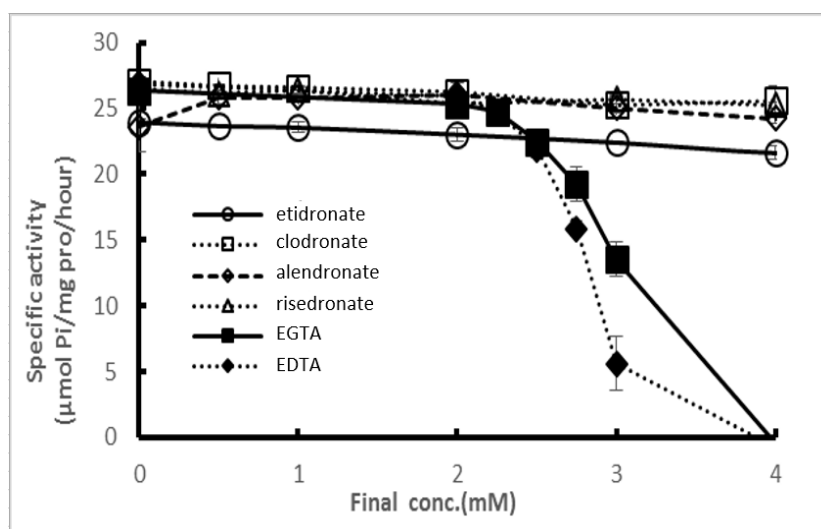


Fig.7

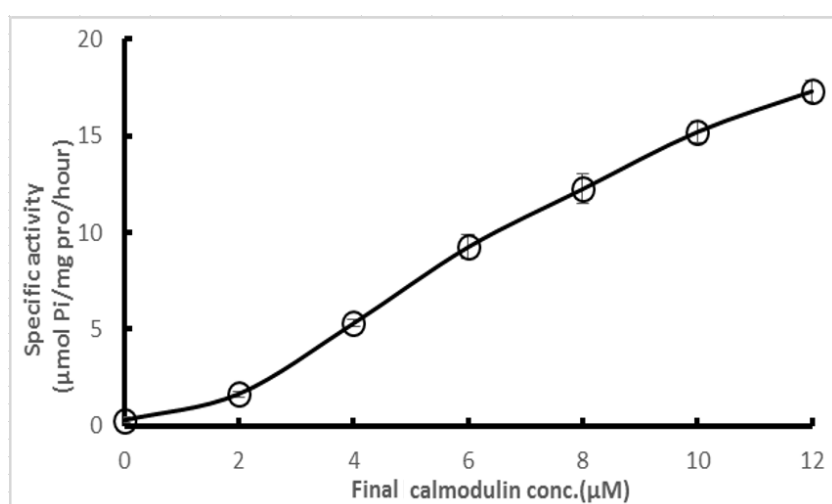


Fig.8

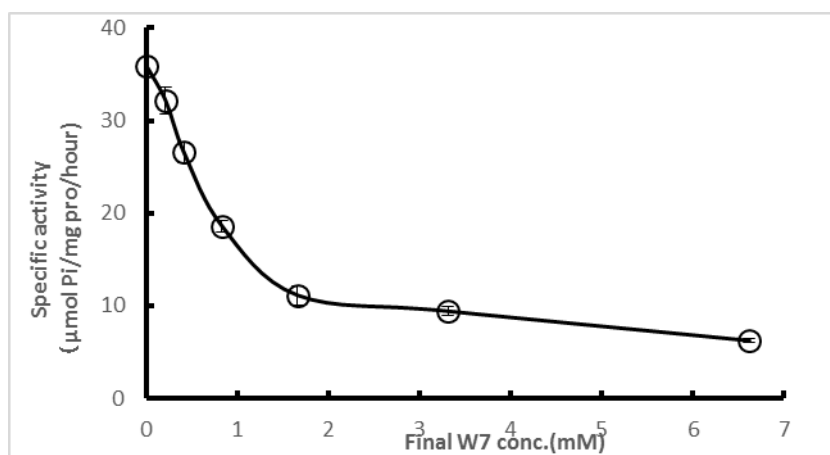


Fig.9

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

Kazuma Isaka, Kuniaki Suzuki, Hajime Minamikawa and Yoshitaka Yoshimura

Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki)

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 studied Ca-ATPase activity using clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). The cells were cultured until calcification. They were 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 is not inhibited by it. 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 is almost 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 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