



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; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 42, 28-35
Issue Date	2021-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82750
Type	journal article
File Information	42_05.pdf



原 著

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

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

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。

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

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

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

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 (山崎 裕 教授)

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

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 (鈴木 邦明 教授)

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1 mg/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 °C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。

3. 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Chifflet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 (pH 7.4) 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 °C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。

Fig. 1

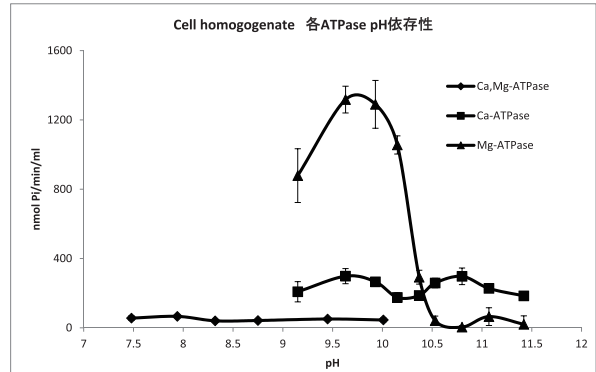


Fig. 1 Effect of pH on calcium,magnesium-ATPase or calcium-or magnesium dependent ATPase activity of MC3T3-E1 cell homogenate.

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 CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ (◆), 2 mM CaCl₂ (■), 2 mM MgCl₂ (▲).

4. 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 °C) 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

細胞破砕物の各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価金属のキレーターである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

Fig. 2a

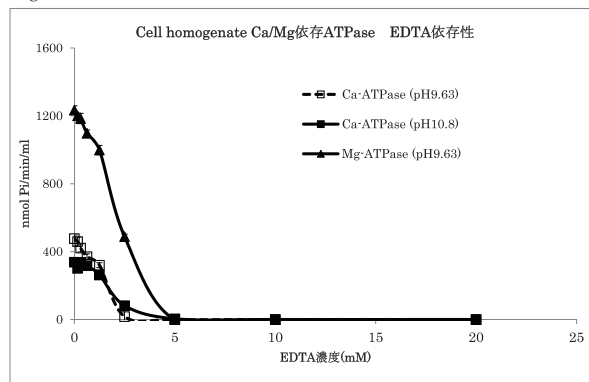


Fig. 2b

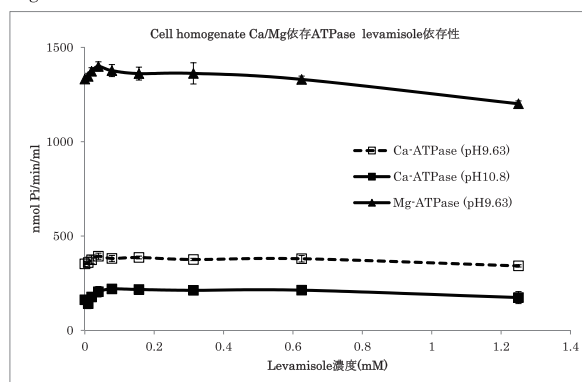


Fig. 2c

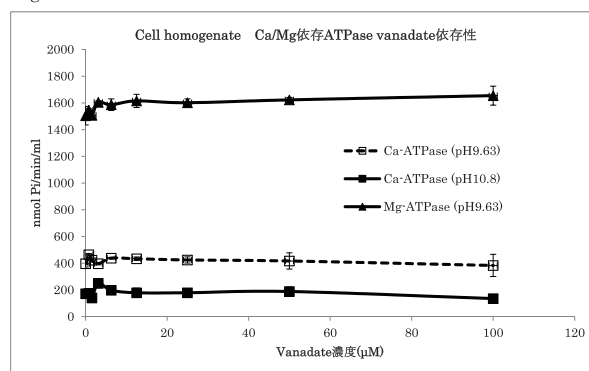


Fig. 2d

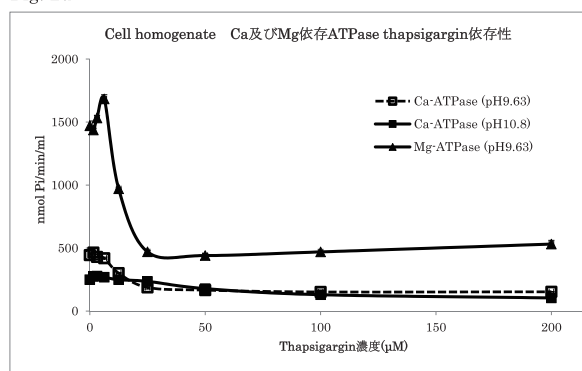


Fig. 2a: EDTA, 2b: levamisole, 2c: vanadate, 2d: thapsigargin concentration-dependent decrease of ATPase activity of MC3T3-E1 cell homogenate.

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 (▲).

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,

Fig. 3

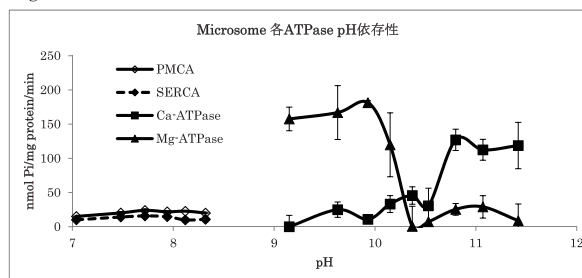


Fig. 3 Effect of pH on calcium,magnesium-ATPase or calcium-or magnesium dependent ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsomes.

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 mM MgCl_2 (◇/◆), 2 mM CaCl_2 (■), 2 mM MgCl_2 (▲).

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

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

Fig. 4a

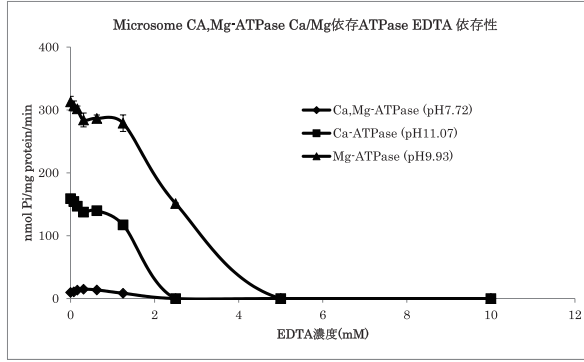


Fig. 4b

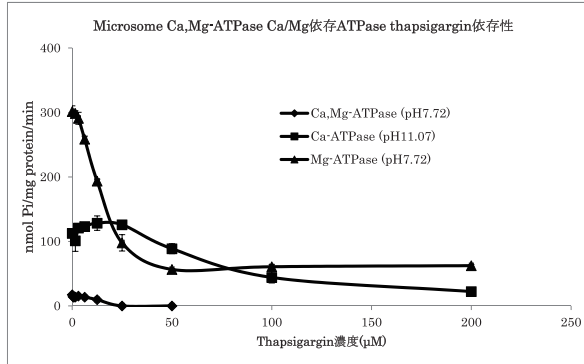


Fig. 4c

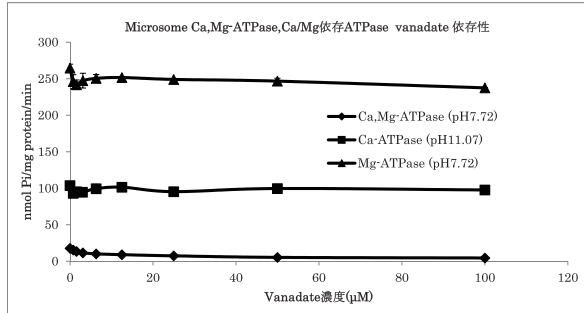


Fig. 4a: EDTA, 4b: thapsigargin, 4c: vanadate concentration-dependent decrease of ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsomes.

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 (▲).

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

Fig. 5a

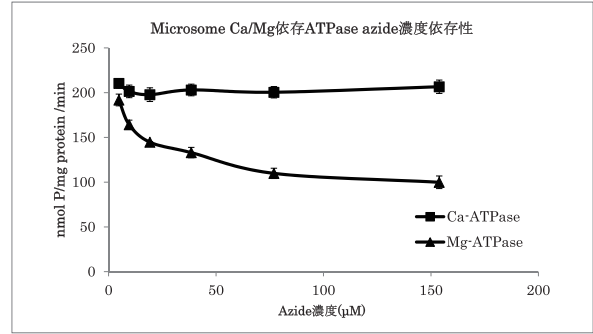


Fig. 5b

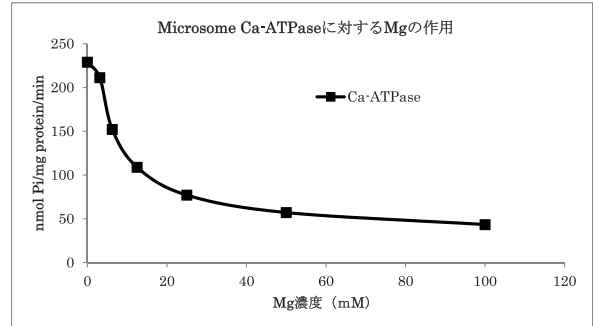


Fig. 5c

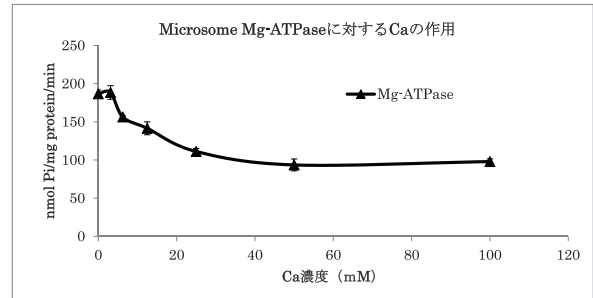


Fig. 5a: The effect of azide on ATPase activity of MC3T3-E1 cell microsomes.

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.

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によっては阻害されなかった (Fig. 7b).

Fig. 6

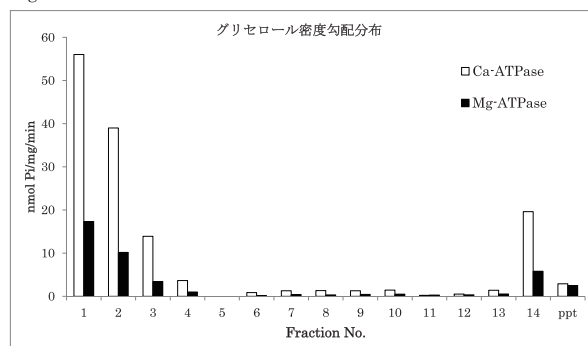


Fig. 6 Distribution of calcium- or magnesium-dependent ATPase activity after SDS treatment and centrifugation by glycerol density gradient.

1mg/ml of microsome was incubated in the presence of 25 mM sucrose, 50 mM tris-acetate, 0.1 mg/ml SDS and 1 mM ATP at 37 °C for 30 minutes, and then centrifuged at 15,000 rpm for 24 hours on glycerol density gradient. The supernatant fractions were recovered by centrifugation at 45,000 rpm 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.

3. 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る。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-

Fig. 7a

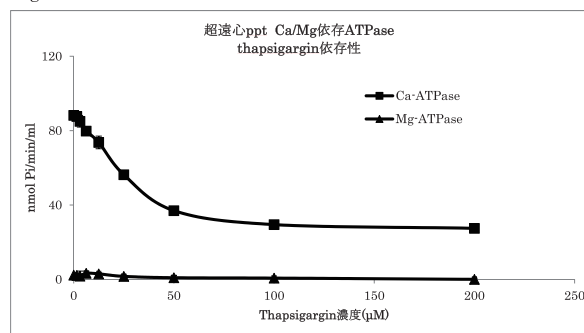


Fig. 7b

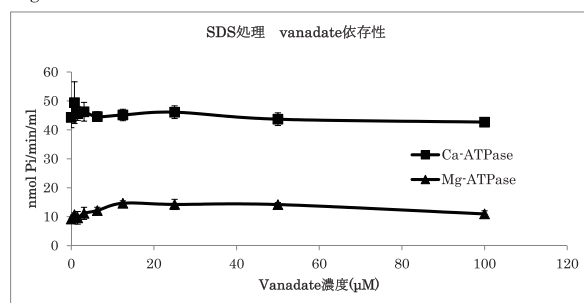


Fig. 7 The effect of thapsigargin (a) or vanadate (b) on separated Ca-ATPase and Mg-ATPase.

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 (▲).

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 μ M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。

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, Mobasher 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.

ORIGINAL

Separation of thapsigargin-sensitive Ca-dependent adenosinetriphosphatase in osteoblastic cells (MC3T3-E1)

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

ABSTRACT : Adenosinetriphosphatase (ATPase) activated by calcium ions (Ca-ATPase) exists and plays a role in bone mineralization; however, not enough research has been conducted on it. Therefore, this report studied the properties of Ca-ATPase in osteoblastic cells (MC3T3-E1). Osteoblastic cells were cultured and harvested at 4 weeks after confluence. The cells were homogenized through ultrasonication and separated into the microsome and cytoplasm by centrifugation. Further, they were solubilized using sodium dodecyl sulfate and separated into fractions, including Ca-ATPase activity on the density gradient of glycerol. In addition, the cell homogenate detected high Ca-ATPase activity at a pH of 9.6 (Ca-P1) and 10.8 (Ca-P2), and Mg-ATPase activity at a pH of 9.6 (Mg-P1). Low Mg-ATPase activity at a pH of 11.1 (Mg-P2) was also detected. The maximum activity of Mg-P1 was 4.5 times higher than that of Ca-P1 and Ca-P2. These activities of ATPase were inhibited by thapsigargin, the specific inhibitor of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, but not by vanadate, an inhibitor of P-type ATPase. Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid, chelators of divalent metallic ions, inhibited both ATPases concentration-dependently. In the microsome fractions, the activity of Ca-P1 decreased remarkably. The activities of Ca-P2, Mg-P1, and Mg-P2 remained the same, but the ratio of Ca-P2 increased. Mg-ATPase was inhibited by azide, an inhibitor of mitochondrial ATPase, but Ca-ATPase was not inhibited. After centrifugation of the density gradient of glycerol, the activity of Mg-P1 decreased remarkably, but the activities of Mg-P2 and Ca-P2 were maintained. The activity of Ca-P2 was found to be thrice higher than that of Mg-P2. Both ATPases were inhibited by thapsigargin. To investigate the role of both ATPases in mineralization, MC3T3-E1 cells were cultured with 25 and 50 μM thapsigargin. Three days after culture, the surface layers of cells separated, and the number of cells decreased. As thapsigargin strongly induced cell apoptosis, we could not culture the cell until mineralization was detected. These results suggested that the E-1 cell has Ca-ATPase with optimal pH at the alkaline side which is inhibited by thapsigargin but not by P-type ATPase inhibitor. In addition, we could separate Ca-ATPase to the extent required for use in its characterization.

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

¹⁾ Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan. Department of Oral Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Yutaka Yamazaki)

²⁾ Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan. Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki)