

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性

学位論文内容の要旨

緒言

硬組織の形成は、硬組織形成細胞による基質の合成および分泌と、基質へのミネラル沈着による石灰化の過程を経て進行する。我々は、マウスの頭蓋冠から樹立された骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) を用いて、細胞の石灰化に ALP の活性が必須であることと、ALP はプロテインホスファターゼとして機能している可能性について示してきた。その過程で、精製した E1 細胞の ALP が ATPase 活性を示すことも明らかになった。そこで、E1 細胞における ATPase 活性の役割を調べる必要があると考え、特にカルシウムによって活性化される ATPase の検出を試みた。

材料と方法

1. 細胞培養と分画

E1 細胞を 10% 牛胎児血清を加えた α -MEM で 5% CO₂-95% 空気、37°C 気相下にて培養し、十分に石灰化が行われた培養開始後約 30 日の細胞を回収した。超音波処理後、遠心操作によって核およびミトコンドリア、細胞質とミクロソーム分画を得た。

2. 各種酵素活性の測定

トリス塩酸あるいは炭酸緩衝液によって広く pH を変えて、ATP、ADP、 β -グリセロリン酸の加水分解反応を行い、酵素反応の結果生じた無機リンを Chifflet らの方法にて定量した。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、ADP、 β -グリセロリン酸を加えても検出される値を、ブランクとして差し引いた。主に以下のような条件について測定を行った。

1) ATPase 活性の pH 依存性

2) ATPase 活性の金属イオン要求性

種々濃度の 2 価金属、Cu²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 存在下での ATPase 活性の変化を調べた。また、2 価金属イオンのキレート剤である EDTA の ATPase 活性に与える影響を調べた。

3) 各種 ATPase 阻害薬の ATPase 活性に与える影響

ATPase 阻害薬である vanadate、ouabain、N-ethylmaleimide、bafilomycin、azide を加えて ATPase 活性の変化を調べた。

3. パラニトロフェニルリン酸加水分解 (pNPPase) 活性の測定

酵素反応の結果生じたパラニトロフェノール (pNP) の発色を、420nm で測定することにより定量した。

結果

1. MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) のカルシウム依存性 ATPase 活性の検出

核とミトコンドリア、細胞質及びミクロソームのカルシウム依存性の ATPase 活性を測定したところ、比活性はそれぞれ 24.2, 19.7 および 110.3 nmol Pi/mg protein/min であった。これ以降の実験では比活性の一番高いミクロソーム分画を用いた。

2. カルシウム依存性 ATPase 活性の pH 依存性

1mM の Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} 存在下での ATPase 活性の pH 依存性を調べた。 Ca^{2+} の方が活性は低い pH で増加し始め、pH7.43 から 8.16 までは Ca^{2+} 存在下の活性は Mg^{2+} 存在下の活性の約 2 倍であった。pH8.56 からは両活性ともほぼプラトーに達したが、 Mg^{2+} 存在下の活性のほうが 10%程度低かった。 Ca^{2+} 存在下での最大活性は約 pH10.5 で得られた。一方、 Mg^{2+} 存在下では、pH8.56 から 9.79 まではほぼプラトーであったが、それより高い pH では活性は低下した。これらのアルカリ性 pH での ATPase 活性は、あらかじめ SDS を添加してタンパク質を変性させると観察されなかった。

3. アルカリ性 pH での ATPase 活性の Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度依存性

pH10.43 において活性は Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度に依存して増加した。 Ca^{2+} の場合 50%活性化濃度は約 $150 \mu\text{M}$ 、 Mg^{2+} 存在下では $60 \mu\text{M}$ 以下であった。 Ca^{2+} 存在下での活性は Mg^{2+} 存在下の約 5 倍の値を示した。

4. pH 7.4 での ATPase 活性の Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度依存性

実験に用いた E1 細胞は pH7.4 前後の α -MEM を用いて培養すると、石灰化部位を形成する細胞である。そこで pH7.4 における ATPase 活性の性質を調べた。pH7.4 においても ATPase 活性は Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度に依存して活性化され、50%活性化濃度はいずれも約 $100 \mu\text{M}$ 程度であった。1mM の Ca^{2+} 存在下での活性は Mg^{2+} 存在下での活性の約 2 倍であった。また、あらかじめ 1mM の Ca^{2+} が存在する条件下で Mg^{2+} の濃度を増加させると、活性は低下した。 Cu^{2+} 存在下では、1mM までの濃度範囲で活性が増加することなくむしろ低下した。

5. 各種 ATPase 活性、およびアルカリ性ホスファターゼ阻害剤の効果

EDTA は濃度に依存して ATPase 活性を抑制し、10mM ではほぼ完全に抑制した。また多くの ATPase の阻害剤として知られている vanadate もその濃度に依存して ATPase 活性を抑制したが、最大でも 10mM において約 50% であった。ouabain、bafilomycin、N-ethylmaleimide および azide を添加しても活性は抑制されなかった。また、アルカリ性ホスファターゼの阻害剤であるレバミゾール存在下においても、ATPase 活性の pH 依存性を示した。

6. 酵素活性の基質特異性

pNPP 分解活性はアルカリ性 pH より、むしろ酸性 pH において高かった。β-グリセロリン酸分解活性は、レバミゾールの有無にかかわらず顕著な pH 依存性を示さなかった。ADP の分解活性は ATPase 活性より低い、ATPase 活性の場合と類似した pH プロファイルで加水分解された。レバミゾール存在下でも、同様の結果が得られた。

考察

1. 従来知られている筋小胞体あるいは形質膜に存在する主要な Ca^{2+} -ATPase はいずれも至適 pH が中性付近であるが、この酵素の至適 pH はかなり高いアルカリ性であった。あらかじめ、SDS を添加してタンパク質変性操作を行ってから活性測定を行うと検出されない、高い pH でのアーチファクトではない。また、アルカリ性ホスファターゼ阻害剤の作用、パラニトロフェニルリン酸および β-グリセロリン酸を基質とした結果などから、測定している ATPase 活性がアルカリ性ホスファターゼによるものとは考えられなかった。

2. ATPase 活性の pH 依存性、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の濃度依存性、vanadate による阻害様式などから、測定している活性が 1 種類とは考えにくい。膜結合酵素であると推定したので、界面活性剤で可溶化した後にグリセロールの密度勾配遠心を行う方法を試みたが、今回は精製を行うことができなかった。精製して、さらに ATPase の性質を検討する予定である。

3. 実験に用いた E1 細胞が基質を石灰化する pH 7.4 でのこの酵素の性質について調べたところ、 Mg^{2+} でも活性化しうるが、本質的には Ca^{2+} 依存性の ATPase が存在するものと考えられた。阻害剤に対する反応性からは、従来知られている ATPase とは異なる。

結論

骨芽細胞様の細胞である MC3T3-E1 のミクロソーム分画に、アルカリ性に至適 pH をもち Ca^{2+} によって活性化される ATPase を見出した。種々の性質より、新規の ATPase である可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 柴 田 健 一 郎

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

硬組織の形成は、硬組織形成細胞による基質の合成および分泌と、基質へのミネラル沈着による石灰化の過程を経て進行することから、カルシウムの能動輸送を行うシステムが必要である可能性があると考えられる。そこで、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) を用いて、カルシウムによって活性化される ATPase の検出を試みた。

通法に従って E1 細胞を培養し、十分に石灰化が行われた培養開始後約 30 日の細胞を回収した。超音波処理後、遠心操作によって核およびミトコンドリア、細胞質とミクロソーム分画を得て、カルシウム依存性の ATPase 活性を測定したところ、比活性はそれぞれ 24.2, 19.7 および 110.3 nmol Pi/mg protein/min であった。これ以降の実験では、比活性が一番高いことと、輸送に関与している可能性があるということからミクロソーム分画を用いた。

1 mM の Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} 存在下での ATPase 活性の pH 依存性を調べたところ、 Ca^{2+} の方が低い pH で活性が増加し始め、pH 7.43 から 8.16 までは Ca^{2+} 存在下の活性は Mg^{2+} 存在下の活性の約 2 倍であった。pH 8.56 からは両活性ともほぼプラトーに達したが、 Mg^{2+} 存在下の活性のほうが 10% 程度低かった。 Ca^{2+} 存在下での最大活性は約 pH 10.5 で得られた。一方、 Mg^{2+} 存在下では、pH 8.56 から 9.79 まではほぼプラトーであったが、それより高い pH では活性は低下した。これらのアルカリ性 pH での ATPase 活性は、あらかじめ SDS を添加してタンパク質を変性させると観察されず、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) の阻害剤存在下でも活性に変化がなかったことから、ALP 以外の酵素活性によるものと結論した。

pH 10.43 において、活性は Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度に依存して増加した。 Ca^{2+} の場合 50% 活性化濃度は約 150 μM 、 Mg^{2+} 存在下では 60 μM 以下であった。

実験に用いた E1 細胞は pH 7.4 前後の α -MEM を用いて培養すると、石灰化部

位を形成する細胞である。そこで pH 7.4 における ATPase 活性の性質を調べた。ATPase 活性は Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度に依存して活性化され、50% 活性化濃度はいずれも約 100 μM 程度であった。1 mM の Ca^{2+} 存在下での活性は Mg^{2+} 存在下での活性の約 2 倍であった。また、あらかじめ 1 mM の Ca^{2+} が存在する条件下で Mg^{2+} の濃度を増加させると活性は低下したことから、本質的にはカルシウムに依存する ATPase 活性が存在すると結論した。

従来知られている各種 ATPase に対する阻害剤の効果を検討した。EDTA は濃度に依存して ATPase 活性を抑制し、10 mM ではほぼ完全に抑制した。また多くの ATPase の阻害剤として知られている vanadate もその濃度に依存して ATPase 活性を抑制したが、最大でも 10 mM において約 50% であった。ouabain、bafilomycin、N-ethylmaleimide および azide を添加しても活性は抑制されなかった。

酵素活性の基質特異性を調べたところ、ALP の基質は良い基質とならなかった。また、ATP の約 50% の ADP 分解活性が検出され、ATPase 活性の場合と類似した pH プロファイルを示した。

以上の結果から、カルシウム依存性で、アルカリ性に至適 pH を持つ新規の ATPase あるいはヌクレオチダーゼが存在すると考え酵素の精製を試みたが、界面活性剤に対して不安定であり、今回は精製できなかった。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、ATPase と ALP の関連、ミクロソーム分画の定義、カルシウムで活性化されない basic な ATPase の性質、ADP 分解活性とヌクレオチダーゼの関連などがあり広範囲にわたった。いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は高いレベルにあり、今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。