

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）の カルシウム依存 ATPase の部分精製とその性質

学位論文内容の要旨

I. 緒言

骨組織の形成においては、骨芽細胞がコラーゲンなどの石灰化の基質を合成した後に細胞外に分泌し、形成された基質にカルシウムやリンが蓄積して石灰化が生じる。多くの細胞の形質膜にはカルシウム輸送たんぱく質として Ca-ATPase が存在し、骨基質へのカルシウムの輸送担体として形質膜の Ca-ATPase を候補とする報告もある。骨芽細胞系細胞の Ca-ATPase に関する研究では、形態学系や酵素系の観点から様々な研究がなされているが、これまで分離精製が行えた報告はなく詳細は不明である。また、マウスの頭蓋冠から樹立された MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) は骨原性細胞から骨芽細胞に分化し、培養中にディッシュ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有用な細胞である。そこで、この細胞の石灰化過程での Ca および Mg 依存性 ATPase 活性の経時的変化を調べた上で、その性質を明らかにするために両 ATPase の分離を試み、分離精製した Ca-ATPase の性質を調べた。

II. 材料および方法

E1 細胞は 5%CO₂-95%空気下 (37℃)、10%牛胎仔血清を加えた α -MEM 中で通法に従い培養した。コンフルエント後、1 週から 5 週後まで毎週細胞を回収した。回収した細胞に超音波処理を行い、細胞のホモジェネートを得た。その後、7,000 rpm、20 分間の遠心を行って上清と沈殿に分け、さらにこの上清を 18,000 rpm、50 分間の遠心を行うことによりミクロソーム分画と細胞質を得た。超音波破碎後のホモジェネート、ミクロソームおよび細胞質の各分画を研究に用いた。

コンフルエント後 4 週で回収した細胞から得たミクロソーム分画を sodium dodecyl sulfate (SDS) で可溶化後、グリセロールの密度勾配遠心を行い、上清を沈殿とともに上層から 8 等分して回収した。

ATPase 活性は ATP 加水分解の結果生成された無機リン量を Chifflet 法に従って定量することによって計測した。反応は ATP の添加により開始し、37℃で 30 分間反応させた後に 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、850 nm で測定することにより定量した。また、予め 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 background として差し引いた。

Ca および Mg 依存 ATPase の精製の条件を決定するために、以下のように界面活性剤に対する安定性を検討した。1 mg/ml ミクロソーム、25 mM sucrose、50 mM tris-acetate (pH 8.56)、1 mM CaCl₂

を含む反応液に各種濃度の Triton X-100 および SDS を添加し、37℃で 30 分間インキュベーションした後に、60,000 rpm、30 分間の遠心を行い、得られた上清と沈殿の ATPase 活性を測定した。また、可溶化時の酵素の安定性における ATP および CaCl_2 の影響を調べるために、1 mM ATP および 1 mM CaCl_2 の添加の有無で、同様の実験を行い、その後、部分精製を行った。

精製後の酵素を用いて、まず上記方法により pH 依存性を調べた。遊離 Ca 濃度依存性を調べる際には、1 mM EGTA、100 mM tris-acetate (pH 8.56) に CaCl_2 を 0～5.3 mM と変化させて ATPase 活性を測定した。ATP 濃度依存性を調べる際には、1 mM EGTA、1 mM CaCl_2 の条件下に ATP 濃度を 0.08～5 mM と変化させ、ATPase 活性を測定した。金属イオン要求性を調べる際には、2 mM の CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnCl_2 、EDTA、EGTA、5 mM の NaCl、10 mM の KCl および 2 mM の CaCl_2 と MgCl_2 を組み合わせて上記の反応液に添加して ATPase 活性を測定した。また、2 mM の CaCl_2 に対して、 MgCl_2 の濃度を 0～10 mM と変化させ、ATPase 活性を測定した。阻害剤の影響を調べる際には、1 mM の vanadate および tetramisole を添加して ATPase 活性を測定した。

タンパク量の測定には Lowry 法を用いた。また、すべての結果は 1 つの測定条件に対して triplicate で測定した平均値と SD を示した。

Ⅲ. 結果と考察

近年、骨芽細胞の分化・機能の調節に関する分子メカニズムの解析の進展がめざましいが、石灰化部位へのカルシウムの輸送の機構に関しては不明な点が多い。E1 細胞は骨原性細胞から骨芽細胞に分化すると、*in vitro* で分泌した基質を石灰化し、十分に石灰化した細胞ではアルカリ性に至適 pH のある Ca 依存 ATPase 活性の存在が報告されている。本研究で、E1 細胞培養中の石灰化に伴う経時的な ATPase 活性の変化を調べたところ、コンフルエント後、Ca および Mg 依存 ATPase 活性は経時的に増加し、総活性は 4 週目でほぼ最大となった。この経過はディッシュ内での石灰化の経過と一致していたことから、両 ATPase 活性が Ca あるいは Mg を石灰化部位に輸送する ATPase 活性として石灰化に関与している可能性が示唆された。また、Ca および Mg 依存 ATPase いずれの活性も pH が中性からアルカリ性にシフトするのに伴って増加し、Ca 依存 ATPase 活性は pH 8.56、Mg 依存 ATPase 活性は pH 9.47 で最大活性を示した。Ca 依存 ATPase 活性では pH 10.43 付近で活性が上昇してショルダーを示し、2 相性の変化が見られた。

これら Ca および Mg 依存性 ATPase の性質と骨芽細胞における機能を調べるためには、ATPase の分離・精製が不可欠であり、E1 細胞から ATPase の精製を試みた。両 ATPase の培養中の総活性はコンフルエント後 4 週でほぼ最大となったため、4 週の細胞から精製することにした。次に、細胞内の局在を調べたところミクロソーム分画に回収されたため、ミクロソーム分画を可溶化して精製を試みることにした。まず、界面活性剤による可溶化の条件を詳細に検討すると比較的 low 濃度の SDS では安定であることがわかった。また、ATP の添加により活性の安定性が増大し、Ca では不安定になることが明らかになったので、これらの条件を組み合わせ ATPase を可溶化した。膜結合 ATPase の精製を試みた従来の報告では、可溶化後のカラムクロマトグラフィーを用いた精製法では成功例が皆無に近いため、Na,K-ATPase の精製において経験のあるグリセロールの密度勾配遠心を行った。遠心時間を変えて得られた各分画の活性を調べたところ、いくつかの分画で明確に Ca および Mg 依存 ATPase を分離することができた。文献検索において、骨芽細胞の両 ATPase の分離の報告は見られず、本研究で得ら

れた標品によって初めて骨芽細胞の Ca-ATPase と Mg-ATPase の酵素学的性質を明らかにすることが可能になったと考えられる。

分離後の Ca-ATPase 活性はアルカリ性への pH のシフトに伴い増加し、pH 8.56 と pH 10.43 付近で 2 相性の最大活性を示した。従来から知られている筋小胞体や形質膜に存在する Ca-ATPase の至適 pH は中性であることから、今後、アルカリ性至適 pH の意義についても検討する必要がある。ATPase 活性は遊離 Ca 濃度依存性に増加し、1.67mM で最大となった。遊離 Ca に対する ATPase 活性の K_m 値は 115 nM であり、非常に低い濃度の Ca で容易に活性化された。ATP 濃度を変化させると ATPase 活性は ATP 濃度依存性に増加し、Lineweaver-Burk plot を行うと直線は折れ曲がった。そして K_m 値が $80\text{ }\mu\text{M}$ と 3.1mM の高・低親和性の結合部位が検出され、リン酸化反応中間体を形成する P 型 ATPase の特徴を示した。Ligand の影響を調べると、EDTA や EGTA などの 2 価金属のキレーターによって完全に抑制されることから、2 価金属要求性であることはわかったが、Ca 以外の他の 2 価金属でも活性は抑制されたことから、特異的に Ca のみを要求していることが示唆された。また、得られた Ca 依存 ATPase 活性は、Mg 濃度依存性に活性が阻害され、Mg 依存 ATPase は異なる酵素であることが示された。アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 阻害薬であるテトラミゾールでは活性は抑制されなかった。また、本研究で分離した Ca 依存 ATPase と ALP、Na,K-ATPase の pH 依存性を比較すると、それぞれの至適 pH が異なったことから、得られた Ca 依存 ATPase は ALP や Na,K-ATPase とは異なるアルカリ性に至適 pH のある ATPase であるということがわかった。また、ATPase に共通した阻害剤である vanadate の影響を調べると、pH 8.56 付近での活性が抑制され、pH 10.43 付近の活性は抑制されなかった。pH 8.56 付近で最大活性を示す ATPase は、従来知られている形質膜の Ca-ATPase である可能性があり、pH 10.43 付近で最大活性を示す ATPase は vanadate では阻害されない新規の ATPase あるいは、他の酵素である可能性が示唆された。現在、この ATPase についてさらに検討を行っており、今後は石灰化におけるこの ATPase の機能を明らかにする予定である。

IV. 結論

MC3T3-E1 細胞のミクロソーム分画に至適 pH がアルカリ性の Ca および Mg 依存性の ATPase が存在した。その活性は培養中経時的に増大することから、MC3T3-E1 細胞の石灰化に関与する可能性がある。さらに、アルカリ性至適 pH の Ca 依存 ATPase を Mg 依存 ATPase と分離し、その性質を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 福 島 和 昭

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の カルシウム依存 ATPase の部分精製とその性質

審査は、審査員全員が出席の下に行った。学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求め、随時、研究内容とそれに関連した知識について口頭試問を行った。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) にカルシウム (Ca) およびマグネシウム (Mg) 依存性 ATPase の存在が報告されているが、分離の報告はなく詳細は不明である。そこで、両 ATPase の分離を行い、Ca 依存 ATPase の性質を調べることを目的として研究を行った。

MC3T3-E1 細胞を材料として通法により培養し、コンフルエント後 1、2、3、4、5 週で細胞を回収した。細胞をホモジェネートとしたのち、ミクロソーム分画と細胞質を得て Ca および Mg 依存 ATPase 活性を測定した。4 週のみクロソームをドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で可溶化後、グリセロールの密度勾配遠心を行って、Ca 依存 ATPase を Mg 依存 ATPase と分離し、その性質を調べた。

本研究により以下のような結果を得た。

- 1) 両 ATPase 活性ともアルカリ性に至適 pH を示し、コンフルエント後、細胞の石灰化時期と一致して経時的に増加したことから、Ca あるいは Mg を輸送する ATPase として石灰化に関与する可能性が示唆された。
- 2) Ca 依存 ATPase 活性の総活性は 4 週で最大となり、主にミクロソーム分画に検出された。4 週のみクロソームを SDS で可溶化後のグリセロールの密度勾配遠心により、Ca 依存および Mg 依存 ATPase を分離することができた。
- 3) Ca 依存 ATPase の性質を調べた。活性は中性からアルカリ性への pH のシフト

に伴って増加し、pH 8.56 と pH 10.43 で 2 相性の最大活性を示した。活性はアルカリ性ホスファターゼ阻害薬では阻害されなかった。ATPase 阻害薬の vanadate では、pH 8.56 付近の活性は抑制されが、pH 10.43 付近の活性は抑制されなかった。

4) ATPase 活性は遊離 Ca^{2+} 濃度依存性に増加し、1.67 mM で最大となった。遊離 Ca に対する ATPase 活性の K_m 値は 115 nM であった。

5) Ca に依存した活性は ATP 濃度依存性に増加した。Lineweaver-Burk plot は折れ曲がり、 K_m 値が 80 μM と 3.1 mM の高、低両親和性の結合部位が検出された。リン酸化反応中間体を形成する P 型 ATPase の特徴を示した。

6) Ca 依存 ATPase 活性は Mg^{2+} 、 Mn^{2+} および 2 価金属イオンのキレーターによって阻害された。

本研究結果をまとめると、MC3T3-E1 細胞の石灰化に関与する可能性がある至適 pH がアルカリ性の Ca 依存性 ATPase を分離し、その性質を明らかにした。

審査担当者からは以下のような質問が行われた。

1. この Ca-ATPase の硬組織形成における機能
2. アルカリ性至適 pH の意義
3. 生体内で実際にアルカリ性に維持される場所、そして維持する機構はあるのか
4. アルカリ性ホスファターゼとの違い
5. 至適 pH が異なる 2 種類の酵素の性質の違い
6. Ca-ATPase と Mg-ATPase の関係

回答が困難な質問も含まれているが、学位申請者からは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についても明確な方針が示された。

本論文の内容は今後のこの分野の研究に大きく寄与するものと考えられる。さらに、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幅広い知識を有していることが示された。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。