

# 骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性に 対するマンガン及び銅イオンの影響

## 学位論文内容の要旨

【緒言】多くの細胞の形質膜にはカルシウム輸送たんぱく質である  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を候補とする報告もあるが、石灰化部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。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は ATP やマグネシウム存在下で 1 分子の ATP が加水分解されるごとに 2 個の  $\text{Ca}^{2+}$  が輸送される。ATP は ATPase により ADP と無機リンに加水分解されるが、この反応により自由エネルギーが放出され、能動輸送などに利用される。MC3T3-E1 細胞のミクロソーム分画には ATPase 活性が存在する。その至適 pH はアルカリ性であり、pH 8.56 付近と 10.43 付近でピークを示すが、この酵素活性に対する至適  $\text{Ca}^{2+}$  濃度や  $\text{Ca}^{2+}$  以外の二価金属イオンによる影響などの詳細に関しては不明である。そこで、本研究では両 pH における  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  をはじめとした各種二価金属イオンによる影響を検討した。

【材料と方法】MC3T3-E1 細胞は 10 % 牛胎仔血清を加えた  $\alpha$ -MEM 中で 5 %  $\text{CO}_2$ -95 % 空気、37 °C 気相下にて培養された。十分に石灰化が行われた培養開始後約 30 日の細胞に 0.25 M sucrose を加え、ラバースクレイパーを用いて回収した。回収した細胞は、超音波処理を 10 秒間 3 回行って細胞を破碎して懸濁液を得た。次に懸濁液を 7,000 rpm、50 分間の遠心を行って上清を得、さらにこの上清を 18,000 rpm、50 分間の遠心を行い、得られた沈渣をミクロソーム分画とし、研究に用いた。ATPase 活性は、ATP 加水分解により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測定した。0.5  $\mu\text{l}$  のミクロソームと最終濃度 25 mM sucrose (EDTA 非添加)、pH 8.64 の 50 mM tris:acetate buffer あるいは pH 10.33 の carbonate buffer、各種濃度の二価金属や EDTA あるいは EGTA を 30  $\mu\text{l}$  含む 250  $\mu\text{l}$  の反応液に、基質として最終濃度 5 mM となる 50  $\mu\text{l}$  の ATP を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 30 分間反応させた後に 300  $\mu\text{l}$  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、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。

### 【結果】

・  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度依存性

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度依存性を pH 8.64 と pH 10.33 において調べた。

いずれの pH においても、1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在すると活性はほぼ最大値を示し、5 mM までは同程度の活性を維持した。

・ ATPase 活性に対する各種金属イオン及びキレーターの作用

pH 8.64 及び 10.33 において、ATPase 活性に対する各種金属イオンの活性化効果を調べた。pH 8.64 では 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で最大活性を示し、2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下でもその約 80% の活性を示したが、2 mM  $\text{Mn}^{2+}$  ではほとんど活性を認めなかった。2 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  が共存すると、それぞれが単独で存在するときに比べて活性は低下した。pH 10.33 では 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下の活性に比べて、2 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下ではその約 20 % であり、2 mM  $\text{Mn}^{2+}$  でも同程度であった。2 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  が共存すると、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下の活性の約 40 % であったが、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下の活性よりは高い活性を示した。2 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下の ATPase 活性は、いずれの pH においても EDTA あるいは EGTA の濃度に依存して抑制され、10 mM の EDTA によりほぼ完全に抑制された。

・  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する各種二価金属イオンの影響

いずれの pH においても  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は共存する  $\text{Mg}^{2+}$  の濃度に依存して減少したが、10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  存在下においても約 20-30 % の活性が残存した。 $\text{Mn}^{2+}$  及び  $\text{Cu}^{2+}$  の影響も調べた。pH 8.64 では  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は共存する  $\text{Mn}^{2+}$  の濃度に依存して減少し、10 mM では完全に抑制された。一方、pH 10.33 では 10 mM 以下の  $\text{Mn}^{2+}$  によって活性は約 50 % に低下し、それ以上濃度を上げて活性はほぼ同程度であった。 $\text{Cu}^{2+}$  の場合は、いずれの pH においても、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は 1 mM 以下の  $\text{Cu}^{2+}$  によって活性は約 30 % 程度に低下し、それ以上濃度を上げて活性は顕著には低下しなかった。

・  $\text{Mn}^{2+}$  及び  $\text{Cu}^{2+}$  の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性抑制における  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の影響

1, 3 及び 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Mn}^{2+}$  及び  $\text{Cu}^{2+}$  の効果を調べた。pH 8.64 での  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は共存する  $\text{Mn}^{2+}$  の濃度に依存して抑制された。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いほど、より低濃度の  $\text{Mn}^{2+}$  によって抑制され、3 及び 5 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下では、10 mM の  $\text{Mn}^{2+}$  により活性はほぼ完全に抑制された。pH 10.33 では  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に関わらず、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は  $\text{Mn}^{2+}$  により類似した濃度依存性で抑制されたが、最大でも約 40 % の活性が残存した。 $\text{Cu}^{2+}$  の場合は pH 8.64 および 10.33 いずれも、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に関わらず、 $\text{Cu}^{2+}$  により類似した濃度依存性で抑制された。抑制の程度は pH によって異なり、pH 8.64 では 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  存在下でも 40 % 程度の活性が残存したが、pH 10.33 では 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  存在下で活性は約 20 % 以下に抑制された。

【考察】 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性を検討したところ、pH 8.64 と 10.33 いずれにおいても、1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  で活性はほぼ飽和しており、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性の高い ATPase であると考えられた。また、両 pH において、二価金属のキレーターである EDTA 及び EGTA によって活性が抑制されることから、明らかに二価金属要求性の活性であると考えられた。次に  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が  $\text{Ca}^{2+}$  以外の二価金属で置き換えが可能か否かを調べた。その結果、調べた  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  はいずれも  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を抑制したことから、測定している  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$  に特異的であると結論した。pH 8.64 と 10.33 で測定される  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が同じ酵素なのかどうかということについては、 $\text{Mn}^{2+}$  による阻害効果が全く異なること及び  $\text{Cu}^{2+}$  による阻害の程度も異なる

ることから、違う酵素であると考えられた。Ca<sup>2+</sup>の濃度を変化させて Mn<sup>2+</sup>及び Cu<sup>2+</sup>による活性阻害の濃度依存性を調べたところ、Ca<sup>2+</sup>の濃度に関係なく Mn<sup>2+</sup>及び Cu<sup>2+</sup>は類似した濃度依存性で Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性を抑制した。以上より、いずれの pH においても、Ca<sup>2+</sup>と Mn<sup>2+</sup>及び Cu<sup>2+</sup>の結合部位は異なることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

## 骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性に 対するマンガン及び銅イオンの影響

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

骨基質へのカルシウムの輸送機構に関しては未だ不明な点が少なくないが、細胞形質膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase が輸送に関与していると考えられている。MC3T3-E1 細胞のミクロソーム分画には  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が存在し、その至適 pH はアルカリ性で、pH 8.56 付近と 10.43 付近でピークを示すことが知られているが、それ以外の詳細については不明である。本研究は  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性をより明らかにする目的で、本酵素活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性や各種二価金属イオンの影響などについて検討したものである。

MC3T3-E1 細胞は 10 %牛胎仔血清を加えた  $\alpha$ -MEM 中で 5 % $\text{CO}_2$ -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 30 日頃にラバースクレイパーを用いて回収した。回収した細胞は、超音波処理により細胞を破碎して懸濁液とし、次にこの懸濁液を 7,000 rpm, 50 分間の遠心を行って上清を得、さらにこの上清を 18,000 rpm, 50 分間の遠心を行い、得られた沈渣をミクロソーム分画とし、研究に用いた。ATPase 活性は、酵素反応の結果生じた無機リンを Chifflet 法により発色させ、HITACHI U-2000 分光光度計を使用し、850 nm で測定した。

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性については、pH 8.64 と 10.33 いずれにおいても、1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  で活性はほぼ飽和しており、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性の高い ATPase と考えられた。また、両 pH において、二価金属イオンのキレーターである EDTA 及び EGTA によって  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が著明に抑制されたことから、明らかに二価金属イオン要求性の活性であると考えられた。二価金属イオン要求性の酵素の中には、二価金属イオンであればその種類を厳密に選択しないものもあることから、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が  $\text{Ca}^{2+}$  以外の二価金属イオンで置き換えが可能か否かについて検討した。検索した  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  はいずれも  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を抑制したことから、本研究で対象とした  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は  $\text{Ca}^{2+}$  に特異

的であると結論した。また、pH 8.64 と 10.33 で測定される  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性が同一酵素か否かについては、 $\text{Mn}^{2+}$ による阻害効果が著しく異なることや  $\text{Cu}^{2+}$ による阻害の程度も全く異なることから、違う酵素であると結論した。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ の濃度を変化させて  $\text{Mn}^{2+}$ 及び  $\text{Cu}^{2+}$ による活性阻害の濃度依存性を調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に関係なく  $\text{Mn}^{2+}$ 及び  $\text{Cu}^{2+}$ は類似した濃度依存性で  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を抑制した。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$ と  $\text{Mn}^{2+}$ 及び  $\text{Cu}^{2+}$ とでは酵素への結合部位は異なることを示しており、 $\text{Mn}^{2+}$ 及び  $\text{Cu}^{2+}$ による  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性阻害は競合によるものではないと結論した。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) 二価金属イオンではない  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ について検索した理由,
- 2) E1 細胞の性格・特徴,
- 3) 至適 pH がアルカリ性であることをどのように解釈するか,
- 4)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の骨石灰化における役割,
- 5) 硬組織石灰化の機序・機構, 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、pH 8.64 と 10.33 で測定される  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性はそれぞれ異なった酵素によるものであること、ならびに  $\text{Mn}^{2+}$ や  $\text{Cu}^{2+}$ による  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性の阻害は競合によるものではないことを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。