

学位論文題名

骨芽細胞様細胞の Mg^{2+} 依存性 ATPase 活性の性質

学位論文内容の要旨

【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 (Ca) やリン (P) が蓄積して石灰化が生じる。骨芽細胞の分化や増殖、機能の調節に関しては多くの報告があり現在も活発な研究がなされているが、石灰化部位への無機イオンの輸送や蓄積の機構に関してはまだ不明な点が多い。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、培養中の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。E1 細胞培養中の石灰化に伴い、経時的に増加する Ca^{2+} および Mg^{2+} -ATPase 活性が存在し、 Ca^{2+} -ATPase 活性の基本的な性質は、アルカリ性が至適 pH であり、Ca に対する親和性が非常に高いこと、リン酸化反応中間体 (EP) を形成する P 型 ATPase の特徴を示す。骨切片を用いた組織化学的な研究において、骨形成が行われている側にアルカリ性ホスファターゼとは異なる中性からアルカリ性が至適 pH である Ca^{2+} および Mg^{2+} -ATPase 活性が存在することが知られている。E1 細胞には培養中の石灰化に伴い経時的に増加する Ca^{2+} および Mg^{2+} -ATPase 活性が存在し、骨切片においても骨形成が行われている側に Ca^{2+} および Mg^{2+} -ATPase 活性が存在すること、また、両 ATPase の性質が類似していることから、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 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もあると考えられる。そこで、石灰化における両 ATPase の関与を明らかにすることを目的とする研究を計画した。本研究では、 Mg^{2+} -ATPase 活性の性質についての報告が少ないことから、E1 細胞の Mg^{2+} -ATPase 活性の pH、Mg および ATP 濃度依存性と活性に対する各種金属イオン、及び ATPase 活性阻害剤の影響などの基本的な性質を検討した。

【材料と方法】E1 細胞は 10 % 牛胎仔血清を加えた α -MEM 中で 5 % CO_2 -95 % 空気、37 °C 気相下にて培養した。コンフルエント後 3~5 週の石灰化期にある E1 細胞を回収し、超音波破碎処理を行った。核とミトコンドリア及び細胞質を除いたマイクロソーム分画を調整して、活性測定に材料とした。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。

【結果】

・ Mg^{2+} -ATPase 活性の基本的性質

MC3T3-E1 細胞の Ca^{2+} -ATPase はアルカリ性に至適 pH を有し、pH 8.56 付近と 10.43 付近で最大活性を示すことから、 Mg^{2+} -ATPase についても活性の pH 依存性を調べた。その結果、活性は中性付近から pH の増加に伴って増大し、pH 9.47 付近において最大活性を示した後減少し、pH 11.00 付近に小さなショルダーを示した。

Mg^{2+} -ATPase 活性の Mg 濃度依存性を調べたところ、活性は遊離 Mg 濃度依存性に増加し、1.67mM で最大となった。また Mg による 50% 活性化濃度は約 110 μ M Mg であった。 Mg^{2+} -ATPase 活性の ATP 濃度依存性を調べたところ、活性は ATP の濃度に依存性して増加した。そこで、ATP 濃度と活性の二重逆数プロットを行った。プロットは折れ曲がり、それぞれの直線から $K_{0.5}$ 値が 80 μ M と 1.7 mM の ATP に対する高・低親和性の結合部位が検出された。

・ Mg^{2+} -ATPase 活性に対する各種金属イオンの作用

pH 9.47 で最大活性を示す Mg^{2+} -ATPase 活性に対する各種イオンの影響を調べ、1 mM の Mg 存在下の ATPase 活性を 100% とした相対値で示した。1 mM の Mg を添加して 2 mM になると、活性は 20% 程度低下した。他の 2 価金属イオンを添加すると 1 mM のマンガン (Mn) では 90%、銅 (Cu) では 60%、Ca 存在下では 30% の活性抑制がみられた。この ATPase が Na^+, K^+ -ATPase である可能性を調べるためにナトリウム (Na) の効果を調べたが、活性は濃度に依存して低下した。同様に pH 11.00 における 1 mM の Mg 存在下の ATPase 活性に対する各種金属イオンの効果を調べた。その結果、1 mM の Mn 存在下で 35%、Cu と Ca で 10 から 20%、Na で 40% 程度の活性の低下がみられた。pH 9.47 と 11.00 での 1 mM Mg 存在下の ATPase 活性に対する Mn による活性抑制の濃度依存性を調べた。活性は pH 9.47 では Mn の濃度に依存して低下し、1 mM では 10% 程度となった。Mn による Mg^{2+} -ATPase 活性の 50% 阻害濃度は約 0.7 mM であった。一方、pH 11.00 では 100 μ M 以下の低い濃度で活性の低下が見られたが、1 mM まで濃度を上げて 65% 程度の活性が残存していた。P 型 ATPase である Na^+, K^+ -ATPase は、数 μ M の白金 (Pt) により活性が阻害されることから、P 型 ATPase の可能性がある Mg^{2+} -ATPase 活性に対する Pt の影響を調べた。その結果、測定したすべての pH において、1 mM の Pt は 1 mM の Mg 存在下の ATPase 活性を抑制しなかった。

・ Mg^{2+} -ATPase 活性に対する阻害剤の影響

Mg^{2+} -ATPase 活性に対する各種 ATPase 阻害剤の影響を調べた。pH を広く変えて P 型 ATPase の代表的な阻害剤である vanadate (1 mM) の Mg^{2+} -ATPase 活性に対する作用を調べたところ、pH 9.47 では 50% の活性が抑制されたが、pH 11.00 では活性は抑制されなかった。1 mM vanadate の pH 9.47 における活性抑制が 50% であったので、vanadate の濃度を広く変えて活性の濃度依存性を調べた。その結果、0.3 mM で約 30% の活性が阻害され、さらに濃度が上がると活性は減少したが、10 mM の vanadate が存在しても 30% の活性が残存し、完全に阻害することはできなかった。さらに低濃度の vanadate での活性低下の濃度依存性を調べたところ、数 μ M で 20% 強の活性が低下した。ミトコンドリアの ATPase を阻害する azide の影響を広く pH を変えて調べたところ、azide によって Mg^{2+} -ATPase 活性はどの pH においても 20 から 30% の活性が抑制された。そこで、azide による阻害の濃度依存性を調べたところ、1 から 10 μ M の azide で 20% 程度の活性が低下し、それ以上濃度を上げて活性の低下は起こらないことが示された。 Na, K -ATPase の特異的な阻害剤である ouabain では、広い濃度範囲で活性の抑制はみられなかった。

【考 察】MC3T3-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する細胞株である。 Ca^{2+} -ATPase はアルカリ性に至適 pH を有し、pH 8.56 付近と 10.43 付近でピークを示すが、本研究における Mg^{2+} -ATPase 活性も pH 9.47 で最大活性を示し 11.00 付近でショルダーを示した。P 型 ATPase のうち Na^+, K^+ -ATPase あるいは形質膜に存在する Ca^{2+} -ATPase の至適 pH は中性であるが、本研究の Mg^{2+} -ATPase はアルカリ性であった。今後、アルカリ性環境の硬組織石灰化における必要性和、アルカリ性環境の形成に関与しているシステムについて、明らかにする必要がある。pH 9.47 の Mg^{2+} -ATPase 活性は 50% であるが vanadate によって阻害された。また、1 mM の Mn 及び Cu によって 90 及び 60% 阻害され、Mn による 50% 阻害濃度は約 0.7 mM であった。一方、pH 11.00 の Mg^{2+} -ATPase 活性は vanadate によって阻害されず、1 mM の Mn 及び Cu によって 35 及び 15% しか阻害されなかった。また、Mn による阻害は 0.1 mM 程度で生じたことから、pH 9.47 と 11.00 で観察される Mg^{2+} -ATPase 活性は別の酵素による活性と推測される。 Mg^{2+} -ATPase が、ATP に対する高・低の両親和性部位を示すこと、及び vanadate によって阻害されることから P 型 ATPase の特徴を保持している。しかし、Pt によって阻害されないことから Na^+, K^+ -ATPase などとは異なっている。放射性的 ATP を用いて EP 形成実験を行い、その性質を明らかにすることにより、本酵素が P 型 ATPase に属するか否かについて決定する必要がある。 Mg^{2+} -ATPase 活性は多くの細胞で検出される活性であるが、一般にその活性は低く機能に関してもほとんど知られていない。ほとんどの ATPase やタンパク質リン酸化酵素は活性発現に Mg を必要とすることから、 Mg^{2+} -ATPase 活性はその一部として測定されている可能性もある。本実験においても Na^+, K^+ -ATPase による

活性である可能性を考え、Na による活性化を調べたが逆に抑制され、 Na^+, K^+ -ATPase の特異的な阻害剤である ouabain によって阻害されなかったことから、 Na^+, K^+ -ATPase とは異なっていた。また、azide によって部分的にしか阻害されなかったことからミトコンドリア酵素とも異なると考えられた。

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 Mg^{2+} 依存性 ATPase 活性の性質

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。

骨芽細胞の分化や増殖、機能の調節に関しては多くの報告があるが、石灰化部位への無機イオンの輸送や蓄積の機構に関しては未だ不明な点が多い。MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) には、細胞培養中の石灰化に伴い経時的に増加する Ca^{2+} および Mg^{2+} -ATPase 活性が存在することが知られているが、 Mg^{2+} -ATPase 活性についてはほとんど研究されていない。

本研究は、Mg あるいは Ca を石灰化部位に輸送する ATPase として石灰化に関与している可能性のある Mg^{2+} -ATPase 活性の基本的な性質を検討したものである。石灰化期にある E1 細胞のミクロソーム分画を調整して活性測定に材料とし、Chifflet 法に従って ATPase 活性を測定した。

Mg^{2+} -ATPase 活性は中性付近から pH の増加に伴って増大し、pH 9.47 付近において最大活性を示した後減少し、pH 11.00 付近に小さなショルダーを示した。ATPase 活性は遊離 Mg 濃度に依存して増加し、1.67 mM で最大となった。Mg による 50% 活性化濃度 ($K_{0.5}$) は約 110 μ M であった。また、ATPase 活性は ATP の濃度に依存性して増加した。ATP 濃度と活性の二重逆数プロットでは、プロットは折れ曲がり、それぞれの直線から $K_{0.5}$ 値が 80 μ M と 1.7 mM の ATP に対する高・低親和性の結合部位が検出された。

pH 9.47 で最大活性を示す Mg^{2+} -ATPase 活性に対する 2 価金属イオンの影響については、1 mM の Mg 添加により ATPase 活性は 20% 程度低下し、1 mM の Mn では 90%、Cu では 60%、Ca 存在下では 30% の活性抑制がみられ、Na では Mg^{2+} -ATPase 活性は濃度依存性に低下した。一方、pH 11.00 で最大活性を示す Mg^{2+} -ATPase 活性に対する 2 価金属イオンの影響については、1 mM の Mn 存在下で 35%、Cu と Ca で 10 から 20%、Na で 40% 程度の活性の低下がみられた。

次に pH 9.47 と pH 11.00 での 1 mM Mg 存在下の ATPase 活性に対する Mn による活性抑制の濃度依存性をみると、活性は pH 9.47 では Mn の濃度に依存して低下し、1 mM では 10% 程度となった。Mn による Mg^{2+} -ATPase 活性の 50% 阻害濃度は約 0.7 mM であった。一方、pH 11.00 では 100 μ M 以下の低い濃度で活性の低下が見られたが、1 mM まで濃

度を上げてても 65%程度の活性が残存していた。なお、1 mM の Pt は 1 mM の Mg 存在下の ATPase 活性を抑制しなかった。

Mg²⁺-ATPase 活性に対する各種 ATPase 阻害剤の影響をみると、1 mM vanadate は、pH 9.47 では 50%の活性を抑制したが、pH 11.00 では抑制しなかった。また pH 9.47 における活性は 0.3 mM で約 30%の活性が阻害され、さらに濃度依存性に活性は減少したが、10 mM vanadate 存在下でも 30%の活性が残存していた。azide の影響をみると、どの pH においても Mg²⁺-ATPase 活性が 20 から 30%抑制された。azide による阻害の濃度依存性をみると、1 から 10 μM で 20%程度の活性低下がみられたが、それ以上濃度を上げてても活性の低下は認められなかった。ouabain でも、広い濃度範囲で活性の抑制はみられなかった。

本研究において、pH 9.47 及び pH 11.00 の Mg²⁺-ATPase 活性は、vanadate、1 mM の Mn 及び Cu による阻害の様式が異なることから、別種の酵素による活性と推測された。pH 9.47 の Mg²⁺-ATPase は、ATP に対する高・低の両親和性部位を示すこと、ならびに vanadate によって阻害されたことから P 型 ATPase の特徴を保持してはいるが、Na⁺, K⁺-ATPase とは異なり Pt によって阻害されないことから、その性質の解明にはさらなる検討が必要である。本研究の Mg²⁺-ATPase 活性は、阻害剤に対する反応性から、Na⁺, K⁺-ATPase 及びミトコンドリアの酵素ではないと推測された。

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) ミクロソーム分画とは細胞成分の何を含むのか、
- 2) MC3T3-E1 細胞の培養において細胞が多層化するのは何故か、
- 3) 培養細胞基質が石灰化する際、MC3T3-E1 細胞は石灰化腔のような箇所にも留まるのか、死滅消失するのか、
- 4) Chifflet 法の原理は、
- 5) P 型 ATPase とはどのような性質の ATPase か、
- 6) Vanadate とは、どのような物質か、
- 7) Mg²⁺-ATPase が P 型 ATPase の特徴を部分的にしか示さなかった理由は、
等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から具体的な回答が得られ、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、MC3T3-E1 細胞において石灰化に伴い経時的に増加する Mg²⁺-ATPase 活性の基本的な性質を検討し、pH 9.47 及び pH 11.00 の Mg²⁺-ATPase 活性は別種の酵素によるものであること、また Na⁺, K⁺-ATPase 及びミトコンドリア酵素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。