



Title	ヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムの阻害剤に対する感受性の相違
Author(s)	飯岡, 拓馬; 出山, 義昭; 吉村, 善隆; 鈴木, 邦明
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 202-209
Issue Date	2012-03
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/48714">http://hdl.handle.net/2115/48714</a>
Type	article
File Information	10-iioka_gencho.pdf



[Instructions for use](#)

## 原 著

ヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムの  
阻害剤に対する感受性の相違

飯岡 拓馬 出山 義昭 吉村 善隆 鈴木 邦明

抄 録：ヒトアルカリ性ホスファターゼ（ALP）アイソザイムは臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型と、臓器非特異的な骨型、肝臓型、腎臓型などに分類される。多くの動物種の臓器由来のALPでは、アイソザイムのタイプによってALP活性の阻害剤に対する反応性が異なることが報告されているが、ヒトALPでは報告が少ない。そこで4種のアイソザイムを用いて、ヒトの場合にも、遺伝子レベルでのアイソザイムの違いにより阻害剤に対する反応性の違いがあるのかと、反応性の違いが構造の安定性に関連するのかを明らかにすることを目的に研究を行った。活性はパラニトロフェニルリン酸(pNPP)を基質として測定した。ALP活性のpH依存性を調べたところ、骨型と小腸型は10.22、肝臓型は9.78、胎盤型は10.62で最大活性を示した。それぞれの至適pHにおけるALP活性の阻害剤濃度依存性を調べた。Tetramisole、levamisoleとL-homoarginine存在下で、4種のALP活性はいずれも阻害剤の濃度に依存して抑制されたが、胎盤型の阻害は最大でも20%以下であった。骨型と肝臓型は最大で90%以上阻害され、小腸型の阻害は50~70%であった。ビスホスホネートであるetidronate存在下でも胎盤型はほとんど阻害されず、肝臓型は濃度依存的に90%阻害された。一方、etidronateに対して小腸型は骨型に比べてより低濃度で阻害された。Etidronateを除いて、アイソザイムのタイプによって阻害剤に対する反応性は異なる傾向を示した。ALPはホモダイマーでありその界面に活性中心が存在する。そこで、タンパク質のサブユニットを解離させ構造に影響を与えるsodium dodecyl sulfate (SDS)を用いて、ALP活性の阻害剤濃度依存性に与える影響を調べた。その結果、骨型はSDS存在下でetidronateによる阻害が促進され、小腸型ではtetramisole、levamisoleとL-homoarginineによる阻害が低下したが、胎盤型ではSDS濃度を4%まで変化させても阻害剤への反応には変化がなかった。胎盤型ALPはホモダイマー間にS-S結合を持つと報告されており、そのタンパク質構造の安定性の高いことが本研究結果からも示唆された。以上の結果は、ヒトALPにおいてもアイソザイムのタイプによって阻害剤に対する反応性が異なることと、胎盤型ALPの阻害剤に対する反応性の低さに構造の安定性が関与する可能性があることが示唆された。

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ、阻害剤、ドデシル硫酸ナトリウム

## 緒 言

アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は至適pHがアルカリ性のリン酸エステラーゼである。広く全身に分布しており、その大部分はホスファチジルイノシトールのアンカーで細胞膜に結合して局在し、一部はアンカーが切断されて血清中に存在している。活性発現に亜鉛を必要とする亜鉛酵素であり、亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。ALPは細胞で産生が増加すると血清中の濃度が上昇するため、血清ALP活性は胆・肝系の疾患や骨疾患のスクリーニング検査、悪性腫瘍の肝転移・骨転移、甲状腺機能亢進症などで検査され、肝疾患・骨疾患・甲状腺疾

患などの指標となる。ALPだけで特定の疾患を確定するのは困難であるが、アイソザイムを測定することにより由来臓器を特定することが可能である<sup>1,2)</sup>。

ヒトALPは、遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型と臓器非特異型である骨型、肝臓型、腎臓型などに分類される<sup>2-5)</sup>。これらのアイソザイムは分子量、熱への安定性、阻害剤への反応性の違いなどの相違点が認められる。小腸型ALPは酵素化学的性質が他のアイソザイムとはかなり異なることが知られている<sup>3)</sup>。骨型ALPは骨芽細胞のマーカー酵素とされ、骨芽細胞への分化、あるいは硬組織形成の指標として測定されることが多い<sup>6,7)</sup>。血清中の肝臓型ALPは臨床検査では主として肝機能の指

標の一つとして扱われることが多い。

ALPは大腸菌からヒトまで保存されており、ヒトではほぼ全身に存在して臓器によるアイソザイムが分類されるが、その生理学的な役割に関しては明らかにされていない点が多い。各タイプの生理的機能を調べる上で有効な方法の一つは生理的な基質を明らかにすることであるが、多くの研究にもかかわらず未解明な点が多く、現時点で確実だとされる基質は骨型ALPのピロリン酸と、小腸型ALPのピリドキサルリン酸のみである<sup>8)</sup>。基質の同定が進まない中で、機能の解明の一助として各アイソザイムの酵素学的性質の研究が積み重ねられてきたが、その研究の多くが動物由来のALPを用いたものであり、胎盤型を除いて入手が困難であることからヒト由来ALPの研究は少ない。阻害剤の反応性に関しては、イヌ胎盤型のALPはイヌ及びヒトの臓器非特異型と類似した阻害剤濃度依存性を示すが、ヒト胎盤型ALPはそれらと異なることが示されている、という報告以外は見いだすことができなかった<sup>9)</sup>。そこで、本研究では比較的最近入手が可能となったヒト由来のALP 4種を用いて、これらのアイソザイムの阻害剤に対する感受性が、他の動物由来のALPと同様にアイソザイムのタイプによって異なるのかを明らかにすることを主な目的として実験を行なった。性質の違いの指標として4種のALP阻害剤tetramisole, levamisole<sup>10)</sup>, L-homoarginine<sup>11,12)</sup>, 第一世代ビスホスホネート製剤のetidronate<sup>13)</sup>に対する反応性の違いを調べた。また、ALPのホモダイマーの界面には活性発現に必須の亜鉛結合部位が存在し、ALP構造がその性質に影響すると推定されている<sup>1,2,12)</sup>。タンパク質の高次構造に影響を与えるsodium dodecyl sulfate (SDS) がウシ小腸ALPのサブユニットをダイマーからモノマーに解離することによって、阻害剤に対する感受性を変化させるという報告があることから<sup>12)</sup>、SDSがALPの阻害剤濃度依存性に与える影響を調べた。これらの結果を基にヒトALPアイソザイムのタイプによる阻害剤感受性の相違と、ALP構造の影響を検討した。

## 材料と方法

### 1. 各種ALP活性のpH依存性

各種ALPアイソザイムの至適pHを調べるため、最終濃度50 mMの炭酸緩衝液を用いて活性のpH依存性を測定した。9種のpH (8.96, 9.46, 9.78, 10.02, 10.22, 10.40, 10.62, 10.90, 11.20) の炭酸緩衝液を調製した。ALP活性のpH依存性測定は、各種ALP (骨型, 肝臓型, 胎盤型, 小腸型), 25 mM sucrose (-EDTA), 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM炭酸緩衝液, および基質として1.6 mMパラニトロフェニルリン酸 (*p*-nitrophenyl phosphate, *p*NPP) 100  $\mu$ lを含んだ反応溶液500  $\mu$ l中にてtriplicateで行った。37°Cで30分間反応させた後に1.5 mlの0.6 N NaOHを加えて停止した。酵素反応の結果生じた分解産物であるパラニトロフェノール

(*p*-nitrophenol, *p*NP) の吸光度を、HITACHI U-2000分光光度計を用いて420 nmで定量し活性を測定した。あらかじめ0.6 N NaOH 1.5 mlを加えてから*p*NPPを添加して測定される吸光度をバックグラウンド値として差し引いた。

### 2. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

各種ALP活性の阻害剤濃度依存性を調べるため、種々濃度の4種の阻害剤存在下でALP活性を測定した。阻害剤は, tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronateの4種を用いた。活性測定は、阻害剤を加える以外はpH依存性測定と同じ条件で行った。

### 3. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性に対するSDSの影響

タンパク質変性作用を持つSDSの各ALP活性の阻害剤濃度依存性に対する影響を調べるため、SDS存在下でALP活性を測定した。SDSは各反応液で0, 1, 2, 3, 4%の5種の濃度になるよう調製した。骨型ALP活性阻害のetidronate濃度依存性, 胎盤型および小腸型ALP活性阻害の各種阻害剤濃度依存性を、SDSを添加した以外は上記2の阻害剤濃度依存性と同等の方法で測定した。

### 4. 試薬

本実験はCALZYMEから購入したヒト由来の骨型, 肝臓型, 胎盤型及び小腸型ALPを使用して行なった。

その他の試薬は特級あるいは生化学用を使用した。

### 5. データ処理

一つの測定条件に対してtriplicateで測定した平均値と標準偏差を結果に示した。多くの測定点では標準偏差はシンボルの大きさの範囲に入った。

## 結 果

### 1. 各種ALP活性のpH依存性

至適pHでALP活性を測定するための基礎データとして、また、各ALPアイソザイムの性質の相違を知ることを目的として、各ALP活性のpH依存性を測定した結果を、それぞれのALPの最大活性を100%とした相対活性で示した (Fig.1)。

各ALPの最大活性を示すpHは、骨型は10.22, 肝臓型は9.78, 胎盤型は10.62, 小腸型は10.22であった。

### 2. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

1) ALPの阻害剤に対する反応性の実験によく使われる, tetramisole (Fig.2a), levamisole (Fig.2b) 及び L-homoarginine (Fig.2c) の濃度に依存した各ALP活性の阻害を、阻害剤非存在下の活性を100%とした相対活性で示した。また、得られた結果からHill plotを

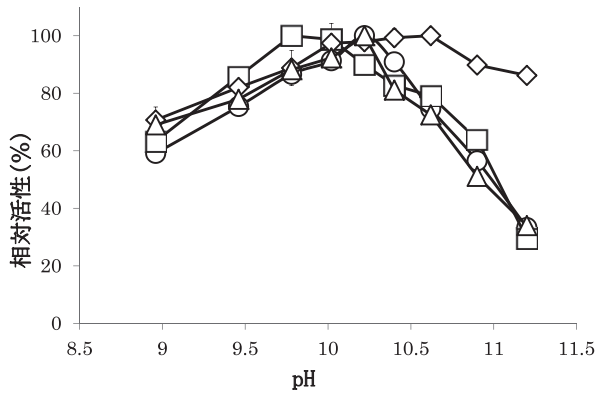


Fig.1 各ALP活性のpH依存性

各ALPの最適pHを調べるため、最終濃度50 mMの炭酸緩衝液を用いてpH依存性を測定した。炭酸緩衝液は、9種のpH (8.96, 9.46, 9.78, 10.02, 10.22, 10.40, 10.62, 10.90, 11.20)を調製した。実験は各ALP (骨型, 肝臓型, 胎盤型, 小腸型), 25 mM sucrose (-EDTA), 1.6 mM  $MgCl_2$ 及び50 mM炭酸緩衝液を含んだ反応溶液400  $\mu$ l中にて行い, triplicateで測定した。1.6 mM  $p$ NPP 100  $\mu$ lを加えて反応を開始し, 37°Cで30分間反応させた後に0.6 N NaOH 1.5 mlを加えて反応を停止した。酵素反応の結果生じた分解産物である $p$ -NPの吸光度を, HITACHI U-2000分光光度計を用いて420 nmで定量し活性を測定した。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。

行なって計算した各アイソザイムの各阻害剤に対する50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ )と最大阻害の割合 (%)を表1に示した。

臓器非特異型ALPに属する骨型と肝臓型のALP活性は低濃度からtetramisole, levamisole及びL-homoarginineの濃度に依存して阻害され, 最大ではほぼ90%以上の阻害を示した (表1)。一方, 胎盤型は各阻害剤の濃度に依存して阻害はされたものの, 最大でも10~20%しか阻害されなかった。小腸型は臓器非特異型と胎盤型の間であり, tetramisoleとlevamisoleでは50%, L-homoarginineでは75%阻害された。骨型と肝臓型阻害の $IC_{50}$ 値はtetramisoleとlevamisoleでは87から477  $\mu$ Mであったが, L-homoarginineでは1.6および3.8 mMであり, 高い濃度を必要とした。

2) ALPの一般的な阻害剤ではないが, ALP活性を抑制すると報告されているetidronateによる阻害の結果をFig.3に示す。Etidronate濃度に依存した各ALP活性の阻害を, etidronate非存在下の活性を100%とした相対活性で示した。Tetramisole, levamisole, L-homoarginineと同様に, 胎盤型はほとんど阻害されず, 肝臓型は最も低濃度で抑制されて最大では90%阻害された。一方, 骨型と小腸型はtetramisole, levamisole, L-homoarginineとは異なり, 骨型は2.9 mMのetidronateで40%阻害されるにとどまったが, 小腸型は75%阻害された。また, 骨型, 小腸型, 肝臓型ともetidronateの濃度に依存し

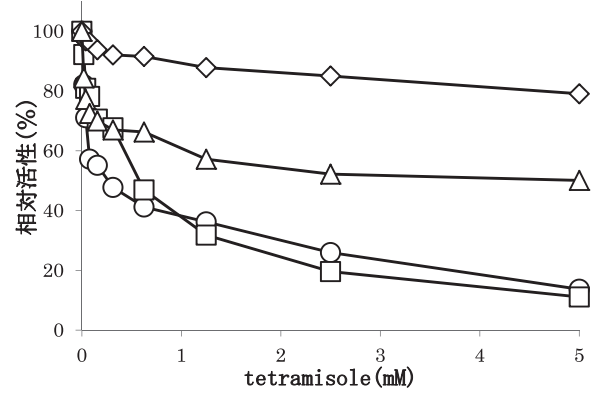


Fig.2a 各ALP活性阻害のtetramisole濃度依存性

各ALPのtetramisole濃度依存性測定は, Fig.1のpH依存性測定と同じ濃度の各種ALP, sucrose (-EDTA),  $MgCl_2$ および炭酸緩衝液 (pHは骨型 10.22, 肝臓型 9.78, 胎盤型 10.62, 小腸型 10.22)と各種濃度のtetramisoleを含んだ反応溶液400  $\mu$ l中にてFig.1と同様の活性測定法で行った。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。

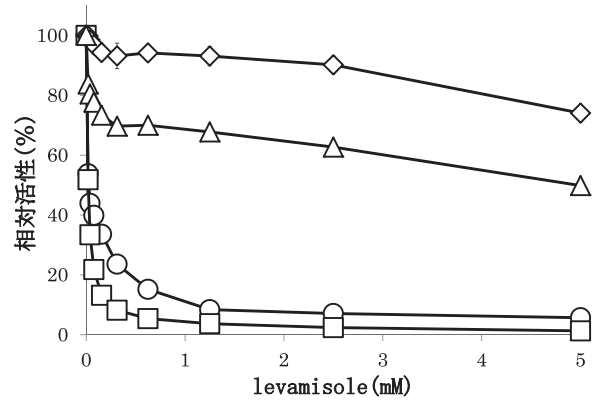


Fig.2b 各ALP活性阻害のlevamisole濃度依存性

Fig.2aと同様の方法でlevamisoleの阻害作用を調べた。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。

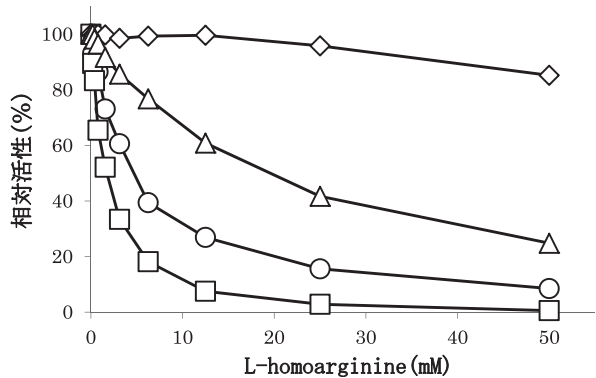


Fig.2c 各種ALP活性阻害のL-homoarginine濃度依存性

Fig.2aと同様の方法でL-homoarginineの阻害作用を調べた。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。

表1. ALPアイソザイム活性阻害の阻害剤濃度依存性

ALP \ 阻害剤	tetramisole		levamisole		L-homoarginine		etidronate	
	IC <sub>50</sub>	最大阻害	IC <sub>50</sub>	最大阻害	IC <sub>50</sub>	最大阻害	IC <sub>50</sub>	最大阻害
骨型	127 $\mu$ M	85%	89 $\mu$ M	95%	3.8 mM	90%	1.4 mM	40%
肝臓型	477 $\mu$ M	90%	87 $\mu$ M	99%	1.6 mM	99%	n.d.	90%
胎盤型	n.d.	10%	n.d.	20%	n.d.	20%	n.d.	10%
小腸型	n.d.	50%	n.d.	50%	11.1 mM	75%	n.d.	75%

(n.d.: 決定できず)

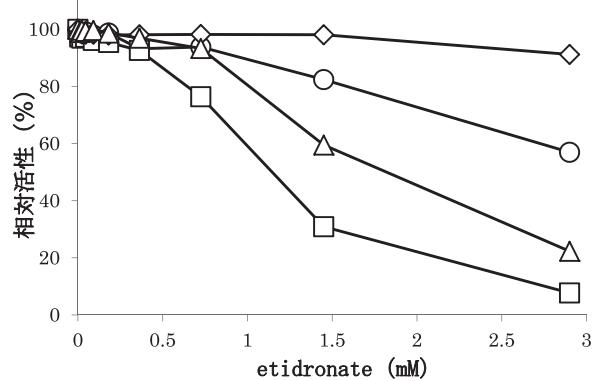


Fig.3 各種ALP活性阻害のetidronate濃度依存性

Fig.2aと同様の方法でetidronateの阻害作用を調べた。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。

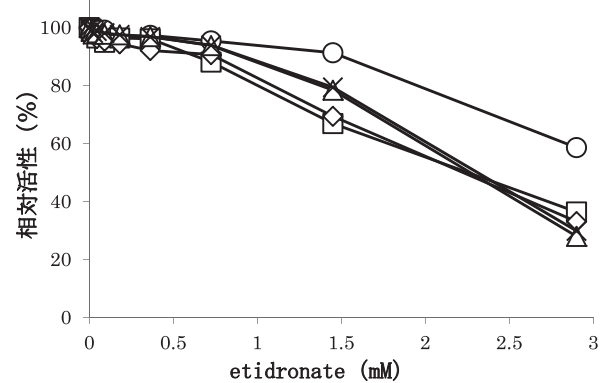


Fig.4 骨型ALPのetidronate阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.2aと同様の方法で, さらにSDS (1%, 2%, 3%, 4%の4種)を加えて骨型ALP活性阻害のetidronate濃度依存性測定を行った。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

てシグモイダルな阻害パターンを示した。

### 3. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性に対するSDSの影響

- 1) タンパク質の高次構造に影響を与えるSDSが各種ALPの阻害剤反応性に及ぼす影響を調べた。1から4%のSDS存在下で骨型ALP活性のetidronate濃度依存性を測定した結果をFig.4に示した。SDS非添加と比較してSDS存在下では, より低濃度のetidronateでALP活性は阻害されたが, SDSの濃度依存性は観察されなかった。
- 2) SDS存在下で胎盤型ALP活性のtetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c)及びetidronate(d)による阻害剤濃度依存性を調べた結果をFig.5a~5dに示した。胎盤型ではSDSの濃度を1から4%まで変化させても各阻害剤に対する感受性には変化が見られなかった。
- 3) SDS存在下で小腸型ALP活性のtetramisole(a), levamisole(b), L-homoarginine(c)及びetidronate(d)による阻害剤濃度依存性を調べた結果をFig.6a~6dに示した。SDS非添加と比較してSDS存在下では, より高濃度のtetramisole, levamisole及びL-homoarginineをALP活性の阻害に必要とした。TetramisoleとL-homoarginineでは

SDS濃度依存性は観察されなかったが, levamisoleではSDS濃度依存的にALP活性阻害が減少した。一方, etidronateによる阻害に関してはSDSの効果は観察されなかった。

## 考 察

### 1. 各ALP活性のpH依存性

各ALPの最大活性を示したpHは, 骨型は10.22, 肝臓型は9.78, 胎盤型は10.62, 小腸型は10.22であった。ALP活性の至適pHは基質の種類, 基質濃度, イオン強度, そのALPの安定性などによって影響されるが, なぜアルカリ性なのかについては未だに明らかではない。Koshikawaらは骨芽細胞のALPを用いて活性の至適pHを測定したところ, pNPPを基質とした場合はpH 10程度であったが, ATPやチロシン残基をリン酸化したタンパク質を基質として測定すると8.5程度までシフトすると報告している<sup>13)</sup>。今回の結果ではいずれの至適pHも極めて高いアルカリ性であるが, 基質として用いたpNPPが原因であると推測される。ALP活性の律速段階はALPへの基質の結合と, 基質によってリン酸化された状態からリン酸を遊離する際の分子構造変化であると推定されており, この律速段階に水素イオンが関与すると報告されている<sup>1)</sup>。pNPPが基質の場合は水素イオン濃度が低い方が活性が促進されるものと

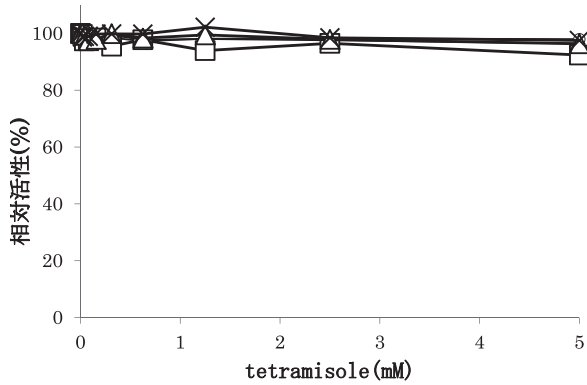


Fig.5a 胎盤型ALPのtetramisole阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.4と同様の方法でSDS存在下の胎盤型ALP活性のtetramisole濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

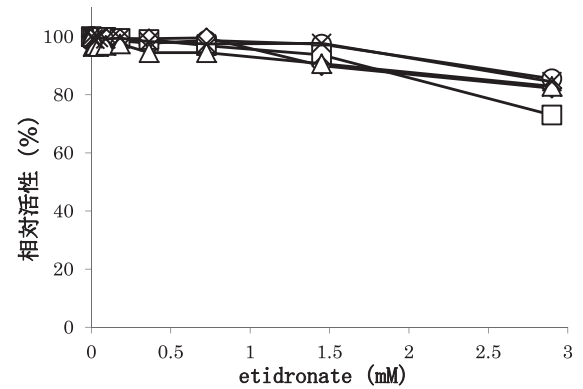


Fig.5d 胎盤型ALPのetidronate阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.5aと同様の方法でSDS存在下の胎盤型ALP活性のetidronate濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

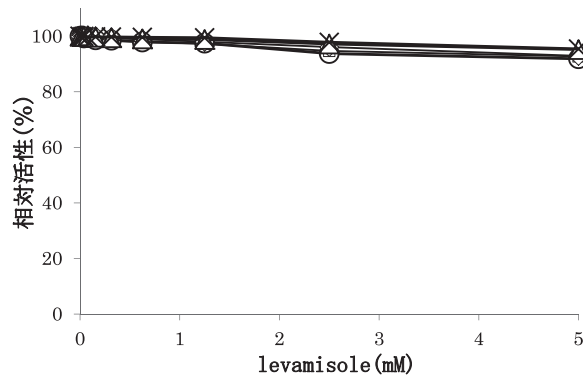


Fig.5b 胎盤型ALPのlevamisole阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.5aと同様の方法でSDS存在下の胎盤型ALP活性のlevamisole濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

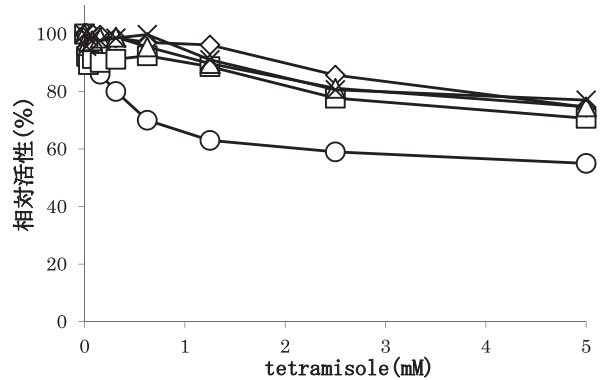


Fig.6a 小腸型ALPのtetramisole阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.5aと同様の方法でSDS存在下の小腸型ALP活性のtetramisole濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

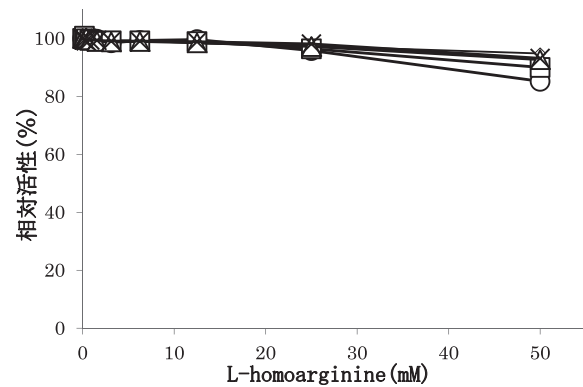


Fig.5c 胎盤型ALPのL-homoarginine阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.5aと同様の方法でSDS存在下の胎盤型ALP活性のL-homoarginine濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

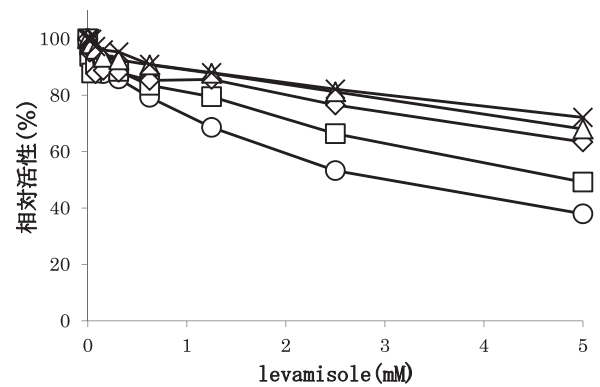


Fig.6b 小腸型ALPのlevamisole阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.6aと同様の方法でSDS存在下の小腸型ALP活性のlevamisole濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

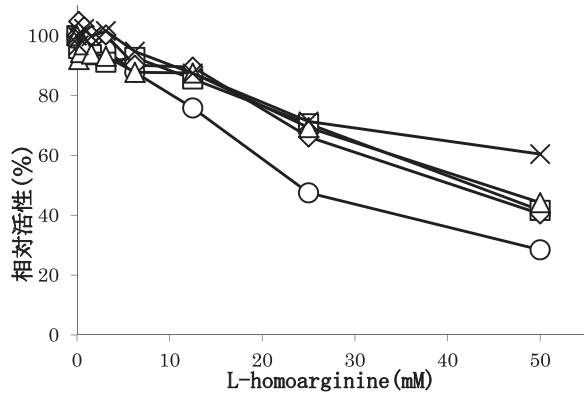


Fig.6c 小腸型ALPのL-homoarginine阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.6aと同様の方法でSDS存在下の小腸型ALP活性のL-homoarginine濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

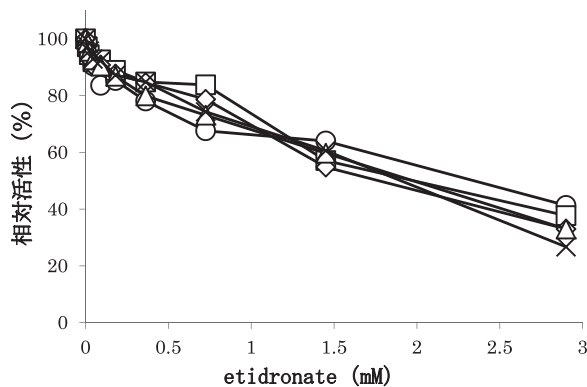


Fig.6d 小腸型ALPのetidronate阻害濃度依存性に対するSDSの効果

Fig.6aと同様の方法でSDS存在下の小腸型ALP活性のetidronate濃度依存性を調べた。SDS非添加を○, 1%を□, 2%を◇, 3%を△, 4%を×で示す。

推測される。

ALPは共通してホモダイマー構造をとっており、修飾糖鎖がアイソザイムにより異なる事が知られている。アイソザイムの構造の違いによって律速段階の分子構造変化が影響されること、また酵素の活性に関与する種々のアミノ酸の解離性原子団はpHによって変化することなどが、各アイソザイムで至適pHの相違が表れた理由と考えられる。

## 2. ALPアイソザイムと活性阻害の阻害剤濃度依存性

すでに報告されている動物由来のALPでは、小腸型、胎盤型と臓器非特異型では各種阻害剤に対する反応性が異なることが知られている<sup>1)</sup>。本研究においても、etidronateを除いて臓器非特異型である骨型と肝臓型は類似した阻害剤反応性を示し、臓器特異的な小腸型と胎盤型もそれぞれ他のALPとは異なる反応性を示した。これら

の結果は、ヒトALPにおいても遺伝子レベルで異なる各アイソザイムは阻害剤に対する反応性の相違によって区別が可能であることを示唆する。さらに検討が必要であるが、血清中に存在するALPの由来を阻害剤反応パターンから判別することにより、簡便に推測する方法に応用可能である。

ヒトALPの阻害剤に対する反応性のうち、胎盤型ALPのみはすでに報告されているブタ胎盤型ALPと異なった反応性を示した。すなわち、ブタ胎盤型ALPはlevamisoleとL-homoarginineに対して骨型及び腎臓型と類似した感受性を示し小腸型とは異なるという報告があるが<sup>12)</sup>、ヒトの場合は比較した他の3種とは異なっていた。ブタとヒトでは胎盤型ALPの構造が異なる可能性がある。

Tetramisoleとlevamisoleは光学異性体の関係であり、各ALPアイソザイムに対して概ね似た阻害パターンを示したが、臓器非特異型に対してはlevamisoleの方がtetramisoleよりも低いIC<sub>50</sub>を示し、最大の阻害程度も大きかった。このことから光学異性体の構造の違いがALP活性阻害の程度に影響を及ぼすことが示唆された。また、L-homoarginineは非競合的阻害剤であり、tetramisoleおよびlevamisoleより高濃度を必要としたが、臓器非特異型に対する阻害パターンはtetramisoleおよびlevamisoleに類似していた。

Etidronateによる阻害は、胎盤型がほとんど抑制されないことを除いて、他のtetramisole, levamisole及びL-homoarginineによる阻害とは異なったパターンを示した。骨型は濃度依存的に阻害されたが、最大でも40%の阻害であり、他の3種の阻害剤では90%近く阻害されるのは異なっていた。骨型のALPは骨形成に関与するとされている。Etidronateを含むビスホスホネートは骨吸収抑制作用を示す一方で顎骨壊死の有害作用も生じることから、etidronateによるALP阻害に関しては今後の更なる検討が必要である。また骨型、肝臓型及び小腸型ALPはetidronateによりシグモイダルな阻害パターンを示し、tetramisole, levamisole及びL-homoarginineによる阻害パターンとは異なっていた。EtidronateのALPに対する結合は他の3種の阻害剤のALPへの結合とは異なって共同性があることを示唆する結果である。

## 3. SDSのALP活性阻害に対する影響

SDSはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にも使用されており1%濃度ではほとんどのタンパク質のサブユニット構造を解離させる。リンの定量法であるChifflet法においては最終濃度6%のSDSではATPase酵素反応を停止させるが、ALP反応を停止するには不十分であった(未発表データ)。この結果は、6%のSDSでは、ALPのホモダイマー構造の境界面に存在する活性中心が影響されるほどの変性は受けにくいことを示唆する。Suzukiらは、

1%のSDS存在下ではウシ小腸型ALPのlevamisole濃度に依存した阻害がシグモイダル型からミカエリスメンテン型に変化する、すなわちlevamisoleのALPへの結合の共同性が失われることを示唆する結果を得た<sup>12)</sup>。さらに1% SDS存在下ではALPがダイマーからモノマーに解離することを示した。この結果をダイマーではサブユニット相互作用が存在するためlevamisoleによる阻害に共同性が観察されたが、モノマーに解離すると共同性が失われるとして説明した。

そこでヒトALPの場合も、SDSによってダイマー構造が影響を受けると阻害剤に対する反応性が変化するか否かを確かめる実験を行なった。その結果、SDS存在下では、骨型ALPのetidronateによる阻害が増強した。一方、小腸型ALPではtetramisole, levamisoleそしてL-homoarginineによる活性阻害はSDS添加によって減少を示し、levamisoleではSDSの濃度依存的であった。これらの結果は、SDSがサブユニット間の相互作用に影響することによってALPの阻害剤に対する反応を変化させた可能性を示唆する。またヒト胎盤型ALPは各種阻害剤による阻害をほとんど受けず、SDSを添加しても阻害剤に対する反応に明らかな影響は見られなかった。ヒト胎盤型ALPは耐熱性ALPと呼ばれるように熱に安定である。またダイマー間にシステイン結合が存在するという報告があることから解離しにくく、他のALPアイソザイムに比べて阻害剤に対しても非常に安定した構造を持つものと推測された。

## 結 論

ヒトALPも他の動物種のALPと同様に、遺伝子の異なるアイソザイムによってtetramisole, levamisole及びL-homoarginineに対する反応性が異なった。また、胎盤型ALPの阻害剤に対する反応性の低さに構造の安定性が関与する可能性があることが示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力いただきました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の諸先生に厚く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

1) McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S : Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London : 373-487. Alkaline Phosphatase d into organ-specific 1979.

- 2) Weiss JM, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H : Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 263 : 12002-12010, 1988.
- 3) Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss JM, Harris H : Sequence and Characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 263 : 12011-12019, 1988.
- 4) Knoll BJ, Rothblum KN, Longley M : Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 263 : 12020-12027, 1988.
- 5) 五関正江, 大井田新一郎, 佐々木哲 : 骨のアルカリホスファターゼの構造と生理的機能. *日骨代謝誌* 6 : 9-19, 1990.
- 6) 五関正江, 大井田新一郎, 佐々木哲 : 骨代謝マーカーとしての骨型ALP. *J Electroph* 38 : 149-153, 1994.
- 7) 鈴木邦明, 松本章 : 骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1の石灰化過程のホスファターゼと遺伝子発現. *北海道歯誌* 20 : 126-137, 1999.
- 8) Orimo H : The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 77, 2010.
- 9) Moak G, Harris H : Lack of homology between dog and human placental alkaline phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 1948-1951, 1979.
- 10) Soory M, Suchak A : Effects of alkaline phosphatase and its inhibitor levamisole on the modulation of androgen metabolism by nicotine and minocycline in human gingival and oral periosteal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 48 : 69-76, 2003.
- 11) Lin CW, Fishman WH : L-homoarginine : An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 247 : 3082-3087, 1972.
- 12) Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A : Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L-homoarginine and its regulation by subunit-subunit interaction. *Jpn J Pharmacol* 64 : 97-102, 1994.
- 13) Koshikawa M, Suzuki K, Sugawara Y, Iida J : Long-term effects of bisphosphonates on mineralization of osteoblastic cell, MC3T3-E1. *Oral Therapeutics and Pharmacology* 22 : 61-68, 2003.



## ORIGINAL

## Differences in the sensitivity of human alkaline phosphatase isozymes to inhibitors

Takuma Iioka, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura and Kuniaki Suzuki

**ABSTRACT** : Human alkaline phosphatase (ALP) isozymes are classified into organ-specific (intestinal/placental) and non organ-specific groups (bone/liver/kidney). It has been reported that the sensitivities of ALP isozymes derived from animals to their inhibitors are different for different isozymes, but there are few report for human ALPs. The study have investigated whether the sensitivities of human ALP to their inhibitors are different for different isozymes and whether the stability of the ALP structure is related to the differences in the sensitivities. The ALP activity was measured with *p*-nitrophenylphosphate as the substrates. The ALP isozymes showed maximum activities at different pH value; for bone type pH 10.22; liver 9.78; placental 10.62; and intestinal 10.22. The concentration-dependent inhibition of ALP activity was measured with tetramisole, levamisole, L-homoarginine and etidronate at the optimum pH. Four isozymes were inhibited depending on the concentrations of tetramisole, levamisole, and L-homoarginine, but the inhibition of the placenta type was less than 20 %. The bone and liver types were more than 90 % inhibited and the inhibition of the intestinal type was 50 to 70 %. Placental ALP was not inhibited by etidronate, a bisphosphonate, and liver ALP was 90 % inhibited, concentration dependently. The inhibition patterns of the bone and intestinal types by etidronate were reversed. These results suggest that the inhibition pattern of human ALP to tetramisole, levamisole, and L-homoarginine are different for different isozyme types, as observed with animal ALPs. Humen ALP is a homodimer and the catalytic site is located between the monomers. The effect of sodium dodecyl sulfate (SDS), which can separate dimmers, on the inhibition pattern of each ALP isozyme to their inhibitors was tested. In the presence of SDS, bone ALP inhibition by etidronate increased, while intestinal ALP inhibition by tetramisole, levamisole, and L-homoarginine decreased; placental inhibition by none of the inhibitors were affected with 1 to 4 % SDS. Placental ALP has an S-S bond between each monomer and high structural stability was confirmed in the study. These and other results suggest that different isozymes of human ALP show different sensitivity to inhibitors and that the low sensitivity of placental ALP to inhibitors may relate to its structural stability.

**Key Words** : Alkaline phosphatase, inhibitor, Sodium dodecyl sulfate