



Title	ビスホスホネートと2価金属イオンとの拮抗によるアルカリ性ホスファターゼ活性の阻害
Author(s)	三上, 翔
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第13052号
Issue Date	2018-03-22
DOI	10.14943/doctoral.k13052
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/70751">http://hdl.handle.net/2115/70751</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Sho_Mikami.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文

---

ビスホスホネートと2価金属イオンとの拮抗による  
アルカリ性ホスファターゼ活性の阻害

---

平成30年3月申請

北海道大学  
大学院歯学研究科口腔医学専攻

三上 翔

## 抄録

ビスホスホネート (BP) によるALP活性抑制の報告があるが、その機構は不明な点が多い。そこで、ヒト骨型、胎盤型、及び肝臓型ALPとマウス由来骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞のALPに対する、窒素非含有型のclodronate (Cl), 窒素含有型のrisedronate (Ri) 及びalendronate (Al) によるALP活性の阻害機構を検討した。Mg, Zn及びCa存在下の活性を、それぞれ、Mg-ALP, Zn-ALP及びCa-ALPとし、基質としてパラニトロフェニルリン酸 (*p*NPP) あるいはピロリン酸 (PPi) を使用した。*p*NPPを基質とした骨型及び肝臓型の各ALP活性はCl, Ri及びAlの濃度に依存して抑制された。Mg-ALPでは、各BPとMgとの拮抗が見られたが、Zn-及びCa-ALP活性におけるBPとZn及びCaとの拮抗は、Mg-ALPほど顕著ではなかった。また、Clと比較してRi及びAlのほうが強いMg-ALP抑制作用を示し、阻害作用は窒素非含有型と比較して含有型BPのほうが強いことが示唆された。PPiを基質とすると、ClはMC3T3-E1及びヒト胎盤型ALPのCa-ALP活性を、Caと拮抗して濃度依存性に抑制した。P-C-P結合を持つBPがP-O-P結合を持つ基質と拮抗する可能性を考慮して、骨型及び肝臓型ALPを使用して、Mg-, Zn-及びCa-ALP活性の*p*NPP濃度依存性に対するCl, Ri及びAlの影響を検討した。BPは濃度に依存して最大活性を抑制したが*p*NPPによる50%活性化濃度には顕著な影響を与えず、BPはALPの基質である*p*NPPとは拮抗しないことを示唆した。以上の結果は、BPはALPの種類、基質、活性化する2価金属の種類に関係なく、2価金属との拮抗によりALP活性を阻害し、その作用は窒素含有型が非含有型と比較して強いことを示唆した。

キーワード：ビスホスホネート, アルカリ性ホスファターゼ, パラニトロフェニルリン酸, ピロリン酸, 2価金属イオン

緒言：

アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は、種々のリン酸エステル化合物を基質とし、アルカリ性環境下で無機リンを遊離させるリン酸エステラーゼであり、活性発現に亜鉛を必要とする亜鉛酵素である<sup>1,2)</sup>。ALPは全身に広く分布しており、ヒトのALPアイソザイムは遺伝子レベルで異なる臓器非特異型、小腸型、胎盤型、胚細胞型の4種に分類され<sup>1,2)</sup>、いずれもZn<sup>2+</sup>（Zn）の結合部位が2個（M1、M2）と、Mg<sup>2+</sup>（Mg）の結合部位が1個（M3）及びCa<sup>2+</sup>（Ca）の結合部位が1個（M4）を有する<sup>3)</sup>。

ヒト骨型ALPは硬組織石灰化に関与し、ヒドロキシアパタイト形成を抑制するピロリン酸（PPi）を加水分解して、Piを供給することによって石灰化を促進する<sup>1,2,4,5)</sup>。骨型ALPにおいてはPPiが生理的な基質と推測されているが不明な点も多く<sup>6-8)</sup>、*in vitro*でのALP活性測定においては、どのタイプのALPも共通して高い親和性で加水分解することから、生体内には存在しないパラニトロフェニルリン酸（pNPP）が基質として頻用されている。

近年の報告では、M1、M2及びM3は基質の加水分解に直接関与すること、M4は活性には関与しないが、CaはMgの代わりにM3に結合して活性に関与しうることが明らかにされた<sup>9)</sup>。また、ZnもM3に結合することができるが、Mgの代わりに機能することはできず、M3に結合したZnはALP活性を低下するという報告もある<sup>9-11)</sup>。さらに、アミノ酸配列の比較から、胎盤型ALPのイオン結合部位は他のヒトアイソザイムにおいても保持されていると推測された<sup>3,12)</sup>。半谷らは、Mg、CaあるいはZnのALP活性に対する作用を検討した。その結果、各イオンは独立してALP活性を発現し、MgとZnあるいはCaとZnが共存すると活性は相加的に増加するが、CaとMgの共存では活性は相加的にはならないことを報告した<sup>11)</sup>。

ALPには骨吸収抑制薬のビスホスホネート（BP）による活性抑制の報告がある<sup>13-17)</sup>。BPは、骨形成の生理的な抑制物質でありALPの基質でもあるPPiの、リン酸エステル結合（P-O-P結合）の酸素原子が炭素に置き換わった基本構造（P-C-P結合）を持つ。骨芽細胞のマーカー

一酵素であるALP活性を抑制することから、ALP活性の阻害による骨形成の抑制がリモデリングに影響を与えて、骨吸収を抑制する可能性も示唆されている。BPによるALP活性の抑制は、BPのキレート作用によりALP活性発現に必要なMgが減少することによるとする説があり<sup>1,18)</sup>、Rezendeは、窒素含有型のBPはMgやZnをキレートすることによりALP活性を抑制すると報告している<sup>18)</sup>。また、島田らはMg、Zn及びCaで活性化したヒト骨型ALPのetidronateによる阻害を解析した。その結果、pNPPを基質とするとetidronateはMgと拮抗したがCa及びZnとは顕著な拮抗阻害は示さず、PPiを基質とすると、Mg、Zn及びCaとの拮抗傾向を示したが、pNPPを基質とした際のMgとの拮抗ほど顕著な拮抗ではなかったと報告した<sup>17)</sup>。これらの結果は、2価金属との拮抗によるetidronateの骨型ALP活性の阻害は、基質によっても影響されることを示唆した。

これらの背景から、本研究は、BPによるALP活性の抑制機構を明らかにすることを目的に行った。酵素としてヒト骨型、肝臓型、胎盤型及びマウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のALPを使用し、基質としてPPiあるいはpNPP、2価金属としてMg、CaあるいはZnを使用してALP活性を測定し、窒素非含有型BPであるclodronate及び窒素含有型BPであるrisedronate、alendronateの作用を検討した。

材料と方法：

#### 1. ALP活性測定<sup>19-21)</sup>

各種ALP、種々濃度のMgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>あるいはZnSO<sub>4</sub>、25 mM sucrose、pH 9.86の50 mM炭酸緩衝溶液あるいはpH 9.43の50 mMトリス塩酸緩衝液を含む反応液250 µl中に、基質として最終濃度が2 mMのpNPPあるいは5 mMのNa-PPiを50 µl添加して反応を開始した。37°Cで60分間反応させた後に、300 µlの20 mM EDTA-trisを加えて反応を停止した。酵素反応の分解産

物である無機リンをChifflet法<sup>22)</sup>でモリブデンリンとして発色させた後、吸光度をHITACHI U-2000分光光度計を用いて850 nmで定量してALP活性を算出した。反応開始前に、20 mMのEDTAを添加した反応液から測定される吸光度は、バックグラウンド値として各測定値から差し引いた。

ALPとしては、ヒトALP各種アイソザイム（骨型、肝臓型及び胎盤型）及びマウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のALPを使用した。MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>あるいはZnSO<sub>4</sub>存在下の活性を、それぞれMg-ALP、Ca-ALP、Zn-ALPとした。ALP活性の2価金属濃度依存性の実験では、各図及び表に記載した濃度のMgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>あるいはZnSO<sub>4</sub>を反応液に添加した。基質濃度依存性の実験では、各図及び表に記載した最終濃度のpNPPあるいはNa-PPiを添加して活性を測定した。ビスホスホネート薬の阻害を測定する実験では、上記の反応液に各図及び表に記載した濃度のclodronate、risedronateまたはalendronateを添加して反応を行った。遊離2価金属濃度の計算は、反応液に1 mMとなるEGTA (ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid) を添加し、EGTAと2価金属の結合定数から行った。

## 2. 試薬

ヒト由来の各種ALPはCALZYME (San Luis Obispo, CA) から、各種BPは東京化成（東京）から、pNPPは4-Nitrophenyl phosphate di (tris) saltとしてSIGMA (St. Louis, MO) から、Na-PPiはピロリン酸十水和物として和光純薬工業（大阪）から購入した。その他の試薬は特級あるいは生化学用を使用した。

## 3. 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含まれた。

結果：

## 1. *p*NPPを基質としたALP活性の、BPによる阻害作用に対する遊離2価金属イオンの影響

ALP活性のBPによる阻害が、BPと2価金属イオンとの拮抗によるものかを検討するための実験を行った。まず、ヒト骨型ALPを用い、*p*NPPを基質としてclodronateの濃度依存性を検討した。種々濃度の遊離Mg存在下の活性をMg-ALP (Fig. 1a), Zn存在下でのALP活性をZn-ALP (Fig. 1b), Ca存在下の活性をCa-ALP (Fig. 1c)とした。各ALP活性はclodronateの濃度に依存して減少し、Mg-ALPでは存在するMgの濃度が増加すると、活性阻害にはより高濃度のclodronateを必要とした (Fig. 1a)。各グラフの測定値から、Hillプロットによりclodronateによる50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を計算した結果を、表1aに示す。Mg-ALPでは、Mg濃度の増加に伴い、 $IC_{50}$ は増加したが、Zn-ALPとCa-ALPでは、Zn及びCa濃度の増加に伴う $IC_{50}$ の変化は顕著ではなかった。同様の実験をヒト肝臓型ALPを使用して行った結果から得られた $IC_{50}$ の変化を表1bに示す。骨型ALPと同様に、Mg-ALPでは、Mg濃度の増加に伴い、 $IC_{50}$ は増加したが、Ca-ALPでは、Ca濃度の増加に伴う $IC_{50}$ の変化は顕著ではなかった。

上記と同様の実験を、ヒト骨型及び肝臓型ALPを使用してrisedronateで行った結果を表1c及び1dに、alendronateを使用して行った結果を表1e及び1fに示した。いずれの結果も、Mg-ALPでは、Mg濃度の増加に伴い、 $IC_{50}$ は増加した。Zn-ALPでも、Zn濃度の増加に伴いrisedronate あるいはalendronateによる $IC_{50}$ 値は増加した。一方、Ca-ALPでは、Ca濃度の増加に伴うrisedronate の $IC_{50}$ 値は増加したが、alendronateによる $IC_{50}$ 値は増加しなかった。

## 2. PPiを基質としたCa-ALP活性の、clodronateによる阻害作用に対するCa濃度の影響

*p*NPPを基質としたCa-ALP活性では、clodronateによるCaとの拮抗は顕著ではなかった。そこで、骨型ALPの生理的な基質とされるPPiを基質とし、骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1のALPを使用して、活性のclodronateによる阻害に対するCa濃度の影響を測定した (Fig. 2a)。

活性は低濃度のclodronate存在下で軽度に増加したのち最大となり，さらに高濃度のclodronateでは濃度に依存して抑制された．共存するCa濃度が高いと，活性抑制には，より高濃度のclodronateを必要とした．測定値から計算したclodronateによる $IC_{50}$ 値を表2に示した．Ca濃度の増加に伴い $IC_{50}$ 値は増加した．ヒト胎盤型ALPを使用して同様の実験を行った結果を，Fig. 2bに示す．MC3T3-E1細胞のALPと比較して低濃度clodronate存在下での活性の上昇は顕著であり，最大活性を示したのち，より高濃度のclodronateでは濃度依存的に活性が低下した．低濃度 clodronateでの活性の増加は遊離Ca濃度が高いほど顕著であり，高濃度clodronateでの活性の減少は，存在する遊離Ca濃度が高いほどより高濃度のclodronateを必要とした (Fig. 2b)．

### 3. ALP活性のpNPP濃度依存性に対するBPの影響

ALP活性のBPによる阻害が，pNPPとの拮抗である可能性を検討するために，ヒト骨型ALPによるMg-ALP，Zn-ALP及びCa-ALP活性のpNPP濃度依存性に対するclodronateの影響を検討した (Figs. 3-a, b, c)．Mg-ALP活性はpNPP濃度に依存して増加し最大値を示したが (Fig. 3a)，共存するclodronate濃度の増加に伴い最大活性は低下した．Zn-ALP (Fig. 3b) 及びCa-ALP活性 (Fig. 3c) でも同様の結果を示した．それぞれの実験から，pNPPの50%活性化濃度 ( $K_{0.5}$ ) を計算した結果を表3aに示す．Mg-ALP，Zn-ALP及びCa-ALP活性いずれも，clodronate濃度の増加に伴う $K_{0.5}$ 値の顕著な変化は認められなかった．

同様の実験を，骨型ALP及び肝臓型ALPを使用してrisedronateを添加して行った結果を表3b及び3cに，alendronateを添加して行った結果を表3d及び3eに示した．いずれの結果においても，risedronateあるいはalendronate濃度の増加に伴うpNPPの $K_{0.5}$ 値の顕著な変化は認められなかった．



考察：

ヒトのALPはモノマーあたりZnの結合部位を2個（M1,M2）と、Mg1個（M3）及びCa1個（M4）を持つ<sup>3)</sup>。M1,M2に結合したZnと、M3に結合したMgはALPの基質加水分解の反応過程で連続して基質と結合して反応に関与する。一方、M4に結合したCaはALPの構造の安定化に寄与して酵素反応には関与しないとされている<sup>3)</sup>。また、M3へCaが結合するとMgの代わりにALP反応に関与することが可能であるが、M3へZnが結合するとALP活性を抑制することが報告されている<sup>23)</sup>。これらの結果より、本研究におけるMg-ALPとCa-ALP活性はM3に結合したMgとCaによる活性であり、Zn-ALPはM1及びM2に結合したZnによるALP活性であると考えられる。

ALPの生体内に存在する基質として考えられるのは、PPi、ピリドキサルリン酸（PLP）、ホスホエタノールアミン（PEA）、ATP、リポポリサッカライド（LPS）、リン酸化オステオポンチンなどであるが<sup>1,4)</sup>、ALPアイソザイムによる基質特異性は低いとされている<sup>15)</sup>。その中で骨型と肝臓型を含む臓器非特異型ALPの基質として、PPi、PLP及びPEAは臨床試験の血漿レベルの上昇により有力視されているが<sup>6-8)</sup>、未解明な点も多い。*in vitro*でのALP活性測定においては、どのタイプのALPも共通して高い親和性で加水分解することから、生体内には存在しないpNPPが頻用されている。そこで、本研究では、ALP各種アイソザイムの活性測定に基質としてpNPP及びPPiを使用した。

#### 1. pNPP を基質とした、BP の 2 価金属イオンとの拮抗による ALP 活性抑制

ALPは、2価金属のキレーターであるEDTAやEGTAにより拮抗阻害を受ける<sup>8,10)</sup>ほか、窒素含有型BPが活性中心のZn及びMgをキレートして拮抗阻害することが報告されている<sup>13)</sup>。また、島田らは、Mg、Zn及びCaで活性化したヒト骨型ALPに対する窒素非含有型BPのetidronateによる阻害を解析し、pNPPを基質とするとetidronateはMgと拮抗し、PPiを基質と

すると、Mg, Zn及びCaとの拮抗傾向を示すことを見出した<sup>17)</sup>。本研究において、pNPPを基質としたヒト骨型及び肝臓型ALPは、窒素非含有型のclodronate、及び窒素含有型のrisedronate及びalendronateによりいずれもMgとの拮抗により阻害された (Figs. 1-a, b, c, 表 1-a-f)。ALPの活性中心にpNPPが結合することで、M3のMg結合部位がBPに接近し、Mgがキレートされやすい状態となることを示唆する。またこの阻害の様式は骨型、肝臓型両アイソザイム間に顕著な差はなかった。一方、clodronateと比較してrisedronate及びalendronateは強いMg-ALP抑制作用を示した。一般にBPの分子骨格には側鎖 (R1, R2) があり、R1側鎖は骨基質との親和性に、R2側鎖は骨吸収能に影響するとされている<sup>24-26)</sup>。clodronateはR1側鎖にCl基を、risedronate及びalendronateはいずれもOH基を持つが、R1にOH基を持つものは骨基質に対する結合能が高い<sup>24-26)</sup>。また、窒素非含有型のClに比べて窒素含有型BPであるrisedronate及びalendronateのR2側鎖は長いことから、BPの分子構造が2価金属イオンをキレートする強さにも影響すると考えられる。

## 2. PPI を基質とした、BP の Ca との拮抗による ALP 活性抑制

生体内に投与されたBPは骨塩基に局在し、吸収窩での濃度はmMレベルに達するとされている<sup>27)</sup>。骨塩基の周囲はCaが豊富な環境であることから、生体内でCa-ALPがBPによってキレートされる可能性を考えた。生理的基質として有力視されているPPIを基質として用い、BPにはclodronateを選択して実験を行った。マウス由来の骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞のALPを用いたところ、clodronateはCaと拮抗傾向を示した (Fig. 2a, 表2)。PPIはヒト由来の臓器非特異型ALPの生理的基質とされているが、臓器特異型のヒト胎盤型でも同様の傾向を示した (Fig. 2b)。また両アイソザイムとも、ALP活性は低濃度のclodronateで上昇し、最大活性に達したのちに抑制を受けた (Figs. 2-a, b)。亜鉛酵素とも呼ばれるALPの活性には

Znの存在が必須であるとされている<sup>1,2)</sup>。そのため、Mg-ALPとCa-ALP活性は、M3に結合したMgとCaのみならず、内在性にALPに結合したZnが必要であり、Zn-ALP活性にはM3に結合する内在性のMgあるいはCaの存在が必須である。本研究においては、M3に結合したZnがALP活性を抑制する報告<sup>9-11)</sup>もあることから、M3に結合した、添加したCaの余剰分やALP内在性のZnが、低濃度clodronateによってキレートされることでALP活性が上昇し、さらに高濃度のclodronateではM3に結合したCaがキレートされて活性が低下したと考えられる。また、CaはM3に結合した場合のみ活性発現に関与する<sup>9)</sup> ことから、pNPPを基質とした際の結果と同様に、PPiの活性中心における結合により、M3のCa結合部位もまたBPに近接することが示唆される。

### 3. ALP活性抑制においてBPと基質は拮抗しない

ALPは活性中心に結合した基質のリン酸エステル結合を加水分解することにより、無機リンを生成する<sup>1,2)</sup>。ALPはBPを加水分解しないことから、基質とBPが拮抗していれば、BPが基質の代わりに活性中心に結合している可能性が考えられる。

pNPPを基質として、ヒト骨型及び肝臓型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するclodronate、risedronate及びalendronateの作用を調べた。両アイソザイムはいずれの2価金属イオン存在下でも、全てのBP濃度に依存してALP活性が低下したが、pNPPのK0.5には顕著な影響を与えなかった(Figs. 3-a, b, c, 表 3a-e)。したがって各種BPによるALP活性阻害は活性中心におけるpNPPとの拮抗ではないと考えられる。pNPPが基質の際、各種BPはMgと拮抗したので(Fig. 1a, 表 1-a-f)、Mg-ALPの場合は添加したMgとBPの拮抗阻害が示唆される。

結論：

BPはALPの種類，基質，活性化する2価金属の種類に関係なく，2価金属との拮抗によりALP活性を阻害し，その作用は窒素含有型が非含有型と比較して強いことが示唆された。

参考文献

- 1) Millan JL: Mammalian Alkaline Phosphatases. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim : 1-322, 2006.
- 2) McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S: Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London : 1-986,1979.
- 3) Le Du MH, Millan JL: Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. J Biol Chem 277: 49808-49814, 2002.
- 4) Millan JL, Whyte MP: Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. Calcif Tissue Int 98 : 398-416, 2016.
- 5) Orimo H: The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch 77: 4-12, 2010.
- 6) Whyte MP: Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. Ann NY Acad Sci 1192 : 190-200, 2010.
- 7) Zhu T, Gan YH, Liu H: Functional evaluation of mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. Chin J Dent Res 15 : 99-104, 2012.
- 8) Sharma U, Pal D, Prasad R: Alkaline Phosphatase: An Overview. Ind J Clin Biochem 29 : 269-278, 2014.

- 9) Hoylaerts MF, Kerckhoven S, Kiffer-Moreira T, Sheen C, Narisawa S, Millán JL: Functional Significance of Calcium Binding to Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. *PLoS One* 10 : e0119874, 2015.
- 10) 川村 良, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 山崎 裕 : 腫瘍及び非腫瘍細胞由来アルカリ性ホスファターゼの阻害剤に対する反応性の相違. *北海道歯誌*, 受理, 2015.
- 11) 半谷純一, 鈴木邦明, 吉村善隆, 南川 元, 兼平 孝, 本多丘人 : Mg, Ca 及び Zn のヒトアルカリ性ホスファターゼ活性に対する作用. *北海道歯誌*, 受理, 2016.
- 12) Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Menez A, Le Du MH: Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem* 276: 31171-31178, 2001.
- 13) Veisman DN, McCarthy AD, Cortizo AM: Bone-Specific Alkaline Phosphatase Activity Is Inhibited by Bisphosphonates - Role of Divalent Cations-. *Biol Trace Elem Res* 104 : 131-140, 2005.
- 14) 飯岡拓馬, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明 : 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. *北海道歯誌*, 32 : 202-209, 2012.
- 15) 更田恵理子, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 山崎 裕 : ヒトアルカリ性ホスファターゼの基質選択性と阻害剤に対する感受性の相違. *北海道歯誌*, 38 : 48-55, 2017.
- 16) Manzano MFJ, Ramos TJ, De Luna BE, Reyes BC, García MO, Ruiz C: Effect of Clodronate on Antigenic Profile, Growth, and Differentiation of Osteoblast-Like Cells. *J Oral Maxillofac Surg* 74 : 1765-70, 2016.
- 17) 島田英知, 鈴木邦明, 吉村善隆, 南川 元, 山崎 裕 : エチドロネートによるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性阻害に対する 2 価金属と基質の影響. *北海道歯誌*, 受理, 2017.
- 18) Rezende AA, Ciancaglini P, Pizauro JM, Leone FA: Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Gland)* 44 :

293-302, 1998.

19) 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.

20) Kajii T, Suzuki K, Yoshikawa M, Imai T, Matsumoto A, Nakamura S: Long-term effects of prostaglandin E2 on mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1). Arch Oral Biol 44 : 233-241, 1999.

21) Yoshikawa M, Suzuki K, Kajii T, Koshikawa M, Imai T, Matsumoto A: Quantitative analysis of alkaline phosphatase activity and mineralization of a clonal osteoblast-like cell MC3T3-E1. J Hard Tiss Biol 8 : 37-42, 1999.

22) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein : application to lends ATPases. Anal Biochem 168 : 1-4, 1988.

23) Hung H, Chang GG: Differentiation of the slow-binding mechanism for magnesium ion activation and zinc ion inhibition of human placental alkaline phosphatase. Protein Science 10: 34-45, 2001.

24) van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, Papapoulos S: Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. J Bone Miner Res 9 : 1875-1882, 1994.

25) Rogers MJ, Xiong X, Brown RJ, Watts DJ, Russell RG, Bayless AV, Ebetino FH: Structure-activity relationships of new heterocycle-containing bisphosphonates as inhibitors of bone resorption and as inhibitors of growth of Dictyostelium discoideum amoebae. Mol Pharmacol 47: 398-402, 1995.

26) 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明 : ビスホスホネートを巡る昨今話題. 北海道歯誌, 33 : 24-26, 2012.

27) Rogers MJ, Watts DJ, Russell RGG: Overview of bisphosphonates. Cancer (Philadelphia) 80:

1652–1660, 1997.

表1a ヒト骨型ALPのpNPP分解における50% clodronate阻害濃度

Mg-ALP		Zn-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Zn conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	1.07	0.77 pM	0.13	100 nM	0.04
2 mM	3.43	12.6 nM	0.06	2 mM	0.06
3 mM	4.57				
4 mM	7.46				

表1b ヒト肝臓型ALPのpNPP分解における50% clodronate阻害濃度

Mg-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	0.53	100 nM	0.04
2 mM	0.83	2 mM	0.06
3 mM	1.19		
4 mM	2.15		
5 mM	2.62		



表1c ヒト骨型ALPのpNPP分解における50% risedronate阻害濃度

Mg-ALP		Zn-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Zn conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	1.12	0.77 pM	0.59	100 nM	0.28
2 mM	1.57	12.6 nM	1.27	2 mM	0.42
4 mM	2.02				

表1d ヒト肝臓型ALPのpNPP分解における50% risedronate阻害濃度

Mg-ALP		Zn-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Zn conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	risedronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	0.33	0.77 pM	0.27	100 nM	0.10
3 mM	0.88	12.6 nM	0.38	2 mM	0.20
5 mM	1.41				

表1e ヒト骨型ALPのpNPP分解における50% alendronate阻害濃度

Mg-ALP		Zn-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Zn conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	1.03	0.77 pM	0.39	100 nM	0.40
2 mM	1.55	12.6 nM	0.48	2 mM	0.32
4 mM	2.71				

表1f ヒト肝臓型ALPのpNPP分解における50% alendronate阻害濃度

Mg-ALP		Zn-ALP		Ca-ALP	
free Mg conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Zn conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)	free Ca conc.	alendronate IC <sub>50</sub> (mM)
1 mM	0.67	0.77 pM	0.39	100 nM	0.09
3 mM	1.45	12.6 nM	0.48	2 mM	0.09
5 mM	3.11				

表2 PPI分解における50% clodronate阻害濃度

MC3T3E1 Ca-ALP	
free Ca conc.	clodronate IC <sub>50</sub> (mM)
100 nM	3.12
1 mM	2.73
2 mM	3.34
3 mM	4.60
4 mM	N/A

表3a ヒト骨型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するclodronateの影響

Mg-ALP (free Mg 1 mM)		Zn-ALP (free Zn 0.77 pM)		Ca-ALP (free Ca 100 nM)	
clodronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	clodronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	clodronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)
0	0.50	0	0.19	0	0.26
0.5	0.65	0.063	0.25	0.01	0.23
1.0	0.88	0.25	0.22	0.05	0.27
1.25	0.42	0.5	0.23		
1.5	0.51				

表3b ヒト骨型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するrisedronateの影響

Mg-ALP (free Mg 1 mM)		Zn-ALP (free Zn 0.77 pM)		Ca-ALP (free Ca 100 nM)	
risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)
0	0.42	0	0.35	0	0.40
1.0	0.38	0.5	0.25	0.25	0.30

表3c ヒト肝臓型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するrisedronateの影響

Mg-ALP (free Mg 1 mM)		Zn-ALP (free Zn 0.77 pM)		Ca-ALP (free Ca 100 nM)	
risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	risedronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)
0	0.87	0	0.22	0	0.30
1.0	0.87	0.1	0.21	0.1	0.32

表3d ヒト骨型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するalendronateの影響

Mg-ALP (free Mg 1 mM)		Zn-ALP (free Zn 0.77 pM)		Ca-ALP (free Ca 100 nM)	
alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)
0	0.42	0	0.35	0	0.40
1.0	0.39	0.5	0.25	0.25	0.26

表3e ヒト肝臓型ALP活性のpNPP濃度依存性に対するalendronateの影響

Mg-ALP (free Mg 1 mM)		Zn-ALP (free Zn 0.77 pM)		Ca-ALP (free Ca 100 nM)	
alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)	alendronate final conc. (mM)	pNPP K <sub>0.5</sub> (mM)
0	0.87	0	0.22	0	0.30
1.0	0.79	0.1	0.23	0.1	0.32

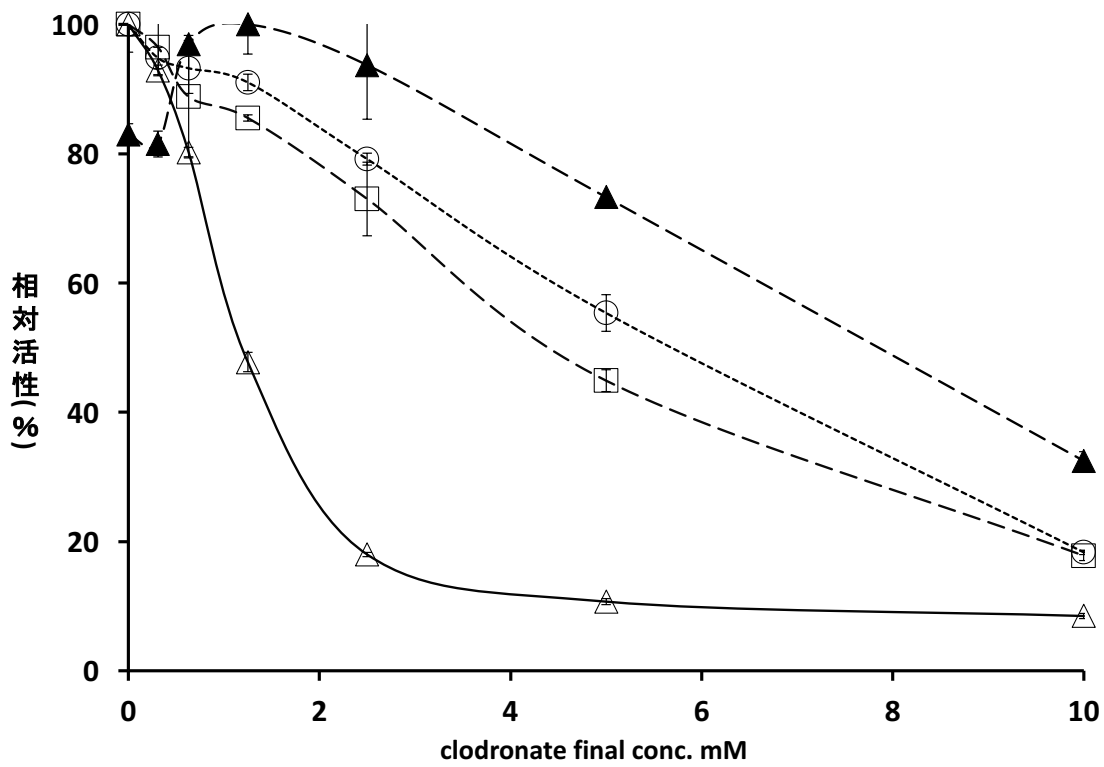


Fig.1a

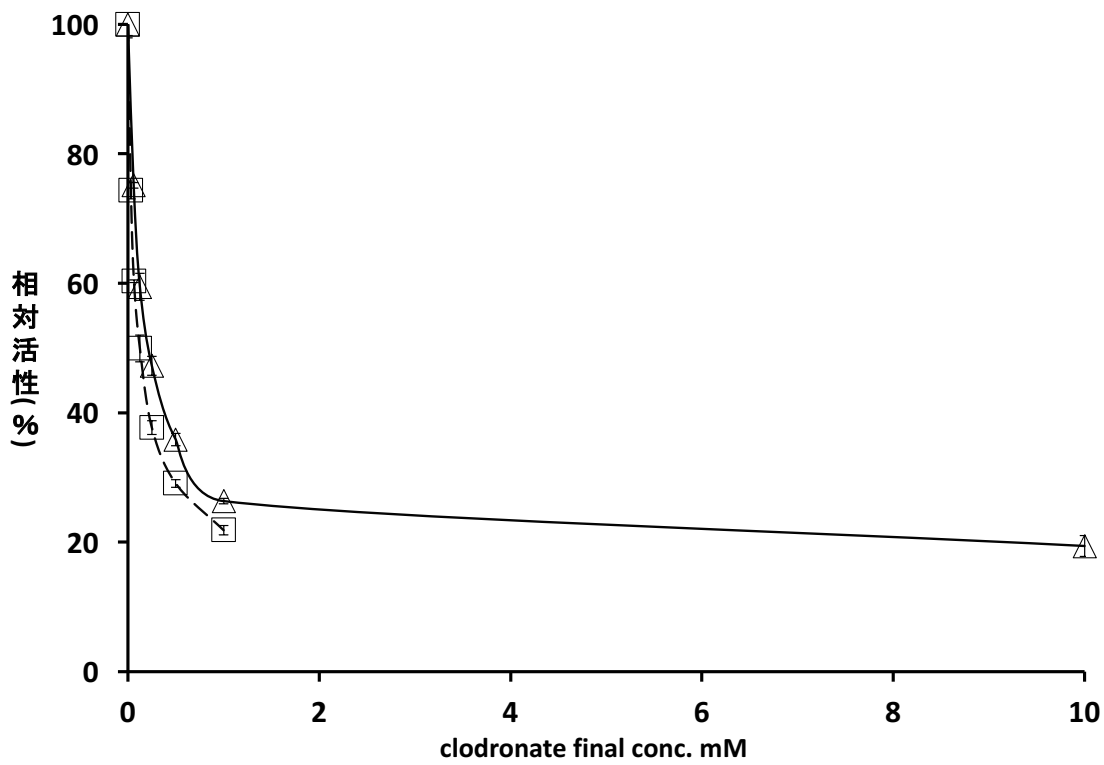


Fig.1b

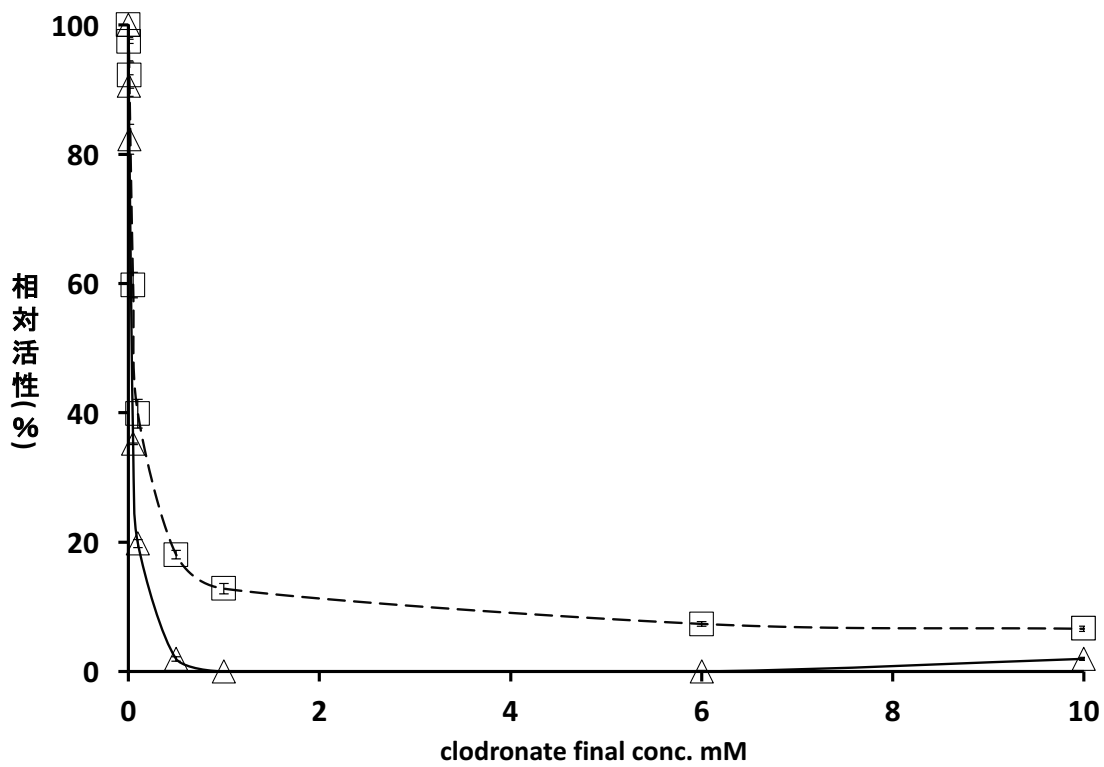


Fig.1c

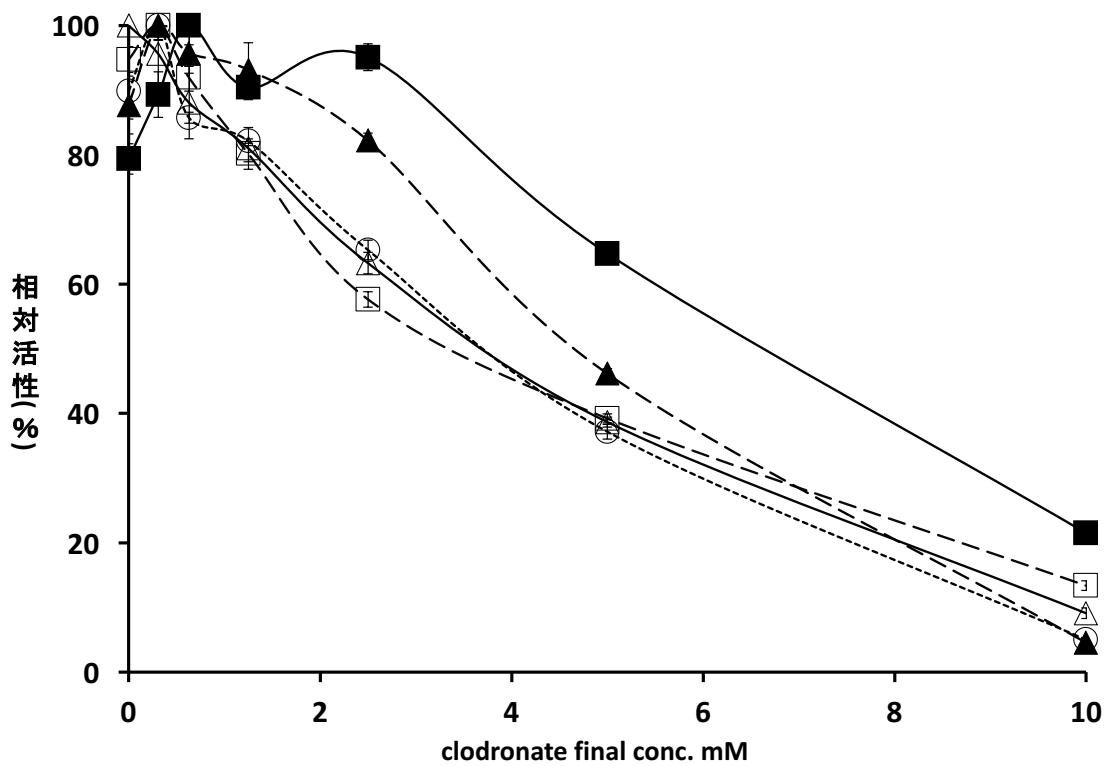


Fig.2a

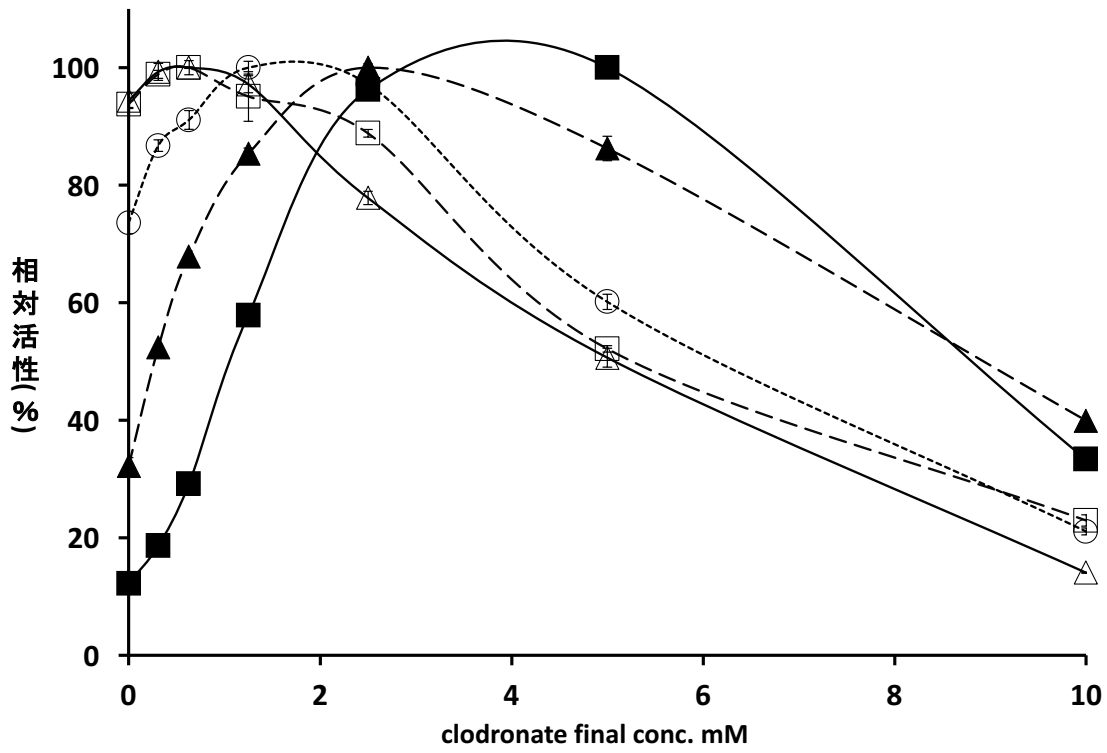


Fig.2b

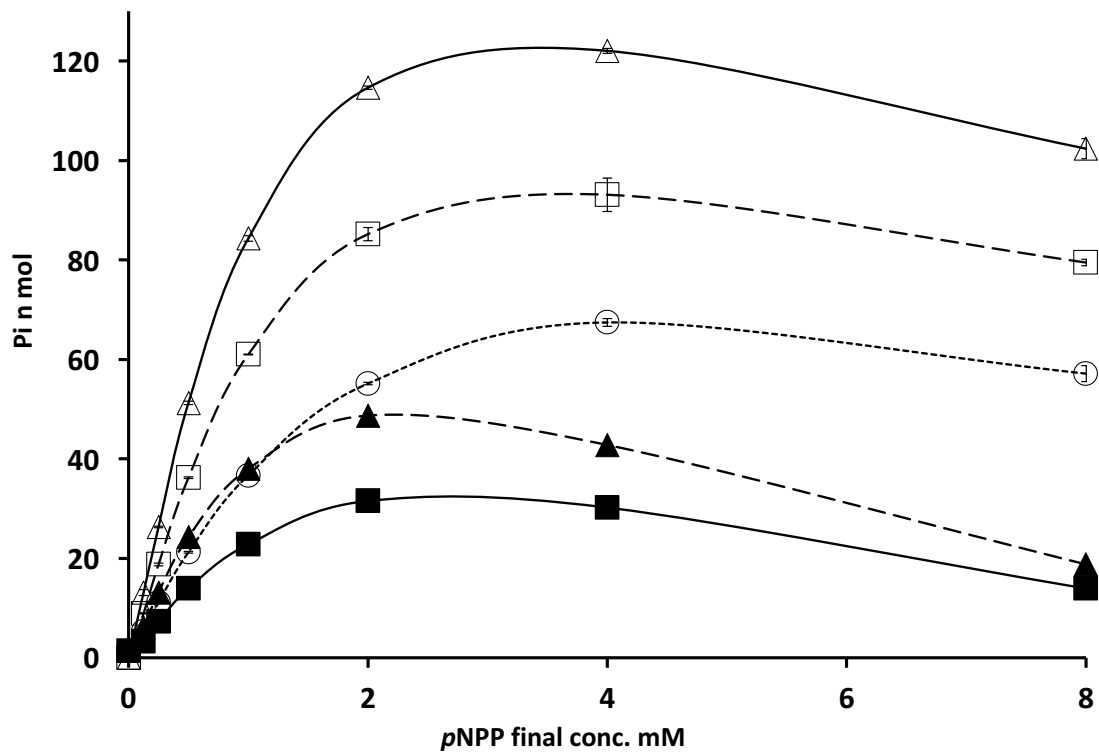


Fig.3a

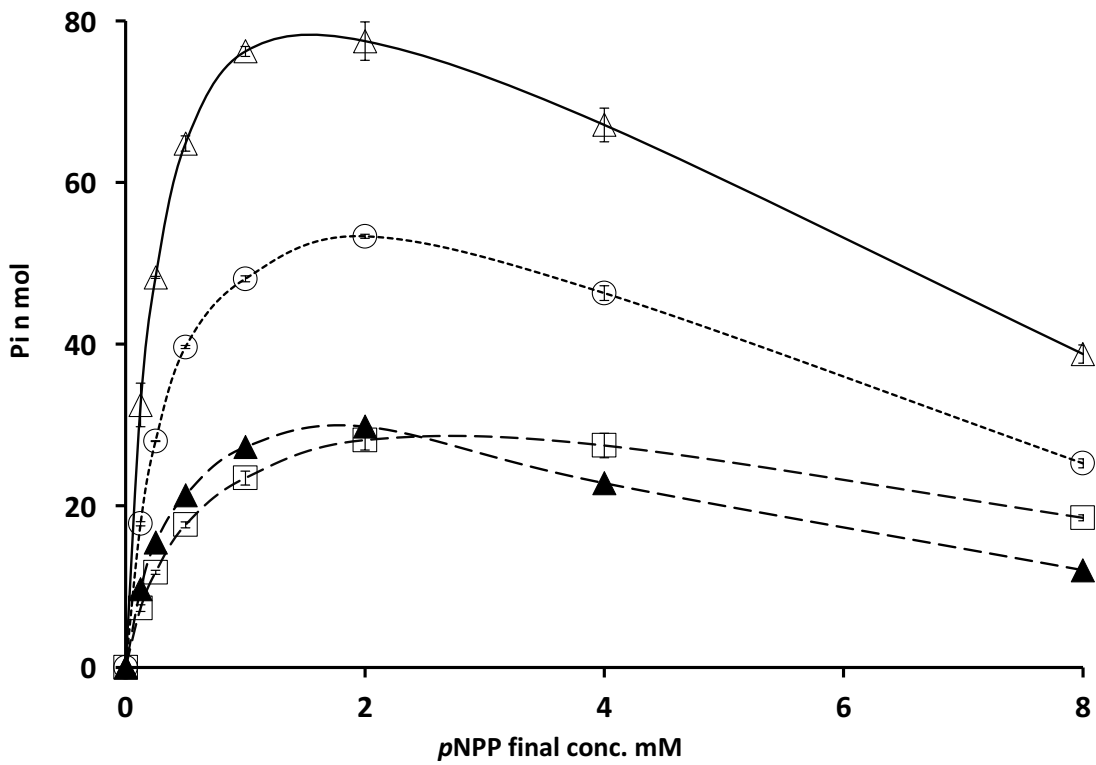


Fig.3b

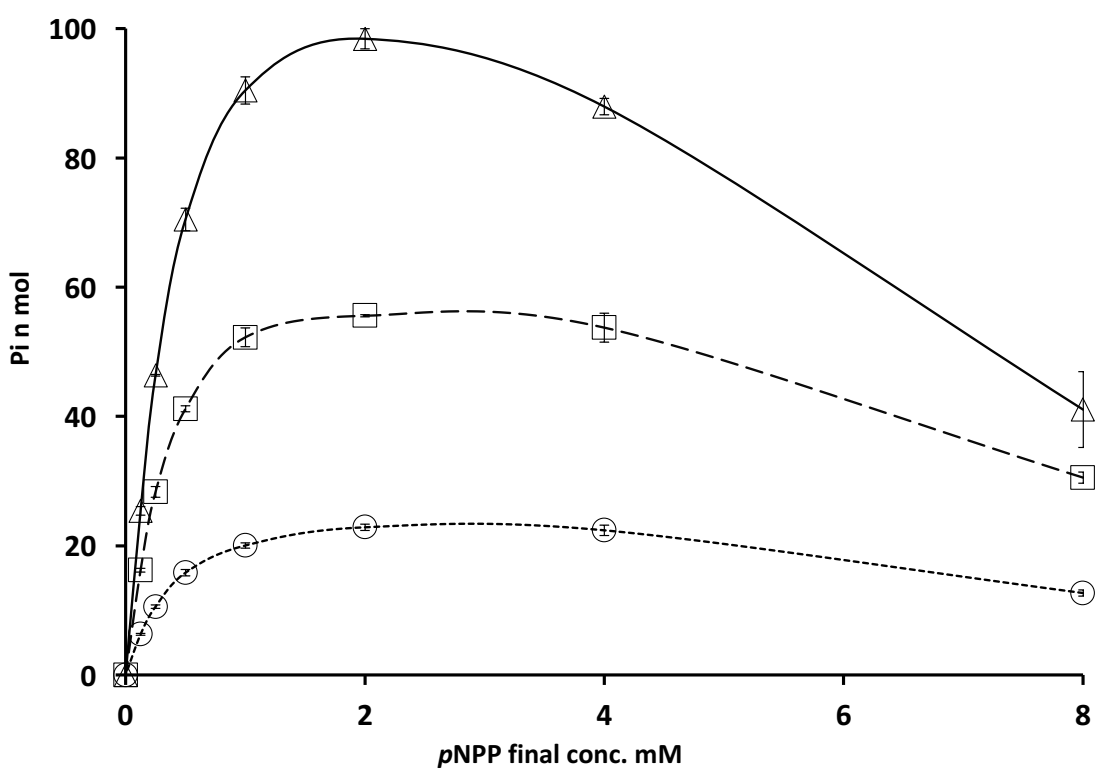


Fig.3c

図の説明



Figs. 1-a, b, c : *p*NPP を基質とした ALP 活性の clodronate 濃度依存性に対する遊離 2 価金属イオンの影響

ALP 活性測定は材料と方法に記載した方法で行い、ALP はヒト骨型を使用した。2 価金属イオンとして、1a では、最終濃度が 1 mM ( $\Delta$ ), 2 mM ( $\square$ ), 3 mM ( $\circ$ ), 4 mM ( $\blacktriangle$ ) となる  $\text{MgCl}_2$  を、1b では 0.77  $\mu\text{M}$  ( $\Delta$ ), 12.6 nM ( $\square$ ) となる  $\text{ZnSO}_4$  を、1c では 100 nM ( $\Delta$ ), 2 mM ( $\square$ ) となる  $\text{CaCl}_2$  をを加えた。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含まれた。

Figs. 2-a, b:  $\text{PPi}$  を基質とした ALP 活性の clodronate 濃度依存性に対する遊離 Ca 濃度の影響

ALP 活性測定は材料と方法に記載した方法で行った。2a では MC3T3-E1 細胞の ALP を、2b ではヒト胎盤型 ALP を使用した。基質には  $\text{PPi}$  を使用し、Ca 濃度は、2a では、最終濃度が 100 nM ( $\Delta$ ), 1 mM ( $\square$ ), 2 mM ( $\circ$ ), 3 mM ( $\blacktriangle$ ), 4 mM ( $\blacktriangle$ ), 2b では 1 mM ( $\Delta$ ), 2 mM ( $\square$ ), 3 mM ( $\circ$ ), 4 mM ( $\blacktriangle$ ), 5 mM ( $\blacksquare$ ) とした。

Figs. 3-a, b, c : ヒト骨型 ALP 活性の *p*NPP 濃度依存性に対する clodronate の影響

ALP 活性測定は材料と方法に記載した方法で行い、基質に *p*NPP を使用した。3a では遊離 Mg 濃度を 1 mM, 3b では遊離 Zn 濃度を 0.77  $\mu\text{M}$ , 3c では遊離 Ca 濃度を 100 nM とした。添加した clodronate 濃度は、3a では 0 ( $\Delta$ ), 0.5 ( $\square$ ), 1 ( $\circ$ ), 1.25 ( $\blacktriangle$ ) 及び 1.5 mM ( $\blacksquare$ ), 3b では 0 ( $\Delta$ ), 0.063 ( $\square$ ), 0.25 ( $\circ$ ) 及び 0.5 mM ( $\blacktriangle$ ), 3c では 0 ( $\Delta$ ), 0.01 ( $\square$ ) 及び 0.05 mM ( $\circ$ ) とし、ALP 活性の *p*NPP 濃度依存性に対する clodronate の影響を測定した。

**Inhibition of alkaline phosphatase activity by competition between bisphosphonates and divalent metal ions.**

Sho Mikami<sup>1</sup>, Kuniaki Suzuki<sup>2</sup>, Hidetomo Shimada<sup>1</sup>, Yoshitaka Yoshimura<sup>2</sup>, Hajime Minamikawa<sup>2</sup>, and Yutaka Yamazaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Professor: Yutaka Yamazaki)

Kita 13 Nishi 7, Kita-Ku, Sapporo 060-8586, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Professor: Kuniaki Suzuki)

Kita 13 Nishi 7, Kita-Ku, Sapporo 060-8586, Japan

Recent investigations have demonstrated that bisphosphonate (BP) inhibits ALP activities, but there are many points still remain uncovered. We tested the inhibitions of human bone, placental, and liver type ALP activity in the presence of Mg, Zn and Ca (as Mg, Zn, and Ca-ALP respectively), with paranitrophenyl phosphate (*p*NPP) or pyrophosphoric acid (PPi) as substrates, using various BPs: non- nitrogen-containing BP clodronate (Cl) and nitrogen-containing BPs risedronate (Ri) and alendronate (Al) for inhibitors. Using *p*NPP as substrate, the relationship between the effects of Cl, Ri or Al on the bone or liver Mg, Zn and Ca-ALP activities, and the concentrations of coexisting Mg, Zn and Ca were examined. Mg, Zn and Ca-ALP activities of both isozymes decreased to the concentration dependency of each BPs; required as higher concentrations of BPs as the coexisting Mg concentration was higher, for the suppression of Mg-ALP activity by BPs. In addition, Ri and Al showed stronger Mg-ALP inhibitory action compared with Cl. These results suggest that BP inhibits the human bone and liver Mg-ALP activity competitively with Mg, and the strength of the inhibition by nitrogen-containing BPs are stronger than those of non-nitrogen-containing BPs. For Zn and Ca-ALP activities BP also showed a tendency of competition with Zn or Ca, but not as significant as Mg. Cl suppressed the Ca-ALP activities of MC3T3-E1 and human placental ALP using PPi as substrates, to the concentration dependency competitively with Ca. Considering of the possibility that BP with P-C-P structure might compete with the substrates containing P-O-P structure, we measured the effect of Cl, Ri and Al on *p*NPP concentration dependency of human bone and liver Mg, Zn and Ca-ALP activities. BP inhibited the maximum activity depending on the concentration but did not significantly affect the 50% activity concentration by *p*NPP, suggesting that BP does not compete with the substrate of ALP, *p*NPP. These results suggest that BP inhibits ALP activity by competition with bivalent metal, regardless of the type of ALP, substrate, and the type of bivalent metal for the activation, and its action of nitrogen-containing BP is stronger than nitrogen-containing BP.

Key words: bisphosphonate, alkaline phosphatase, *p*-nitrophenylphosphate, pyrophosphate, divalent cations