HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	更田, 恵理子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11262号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56233
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eriko_Fukeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　更　田　恵　理　子

学　位　論　文　題　名

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

【緒言】アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は、アルカリ性環境下で、有機リン酸エステルから無機リンを遊離させるリン酸エステラーゼである。ALP は遺伝子構造の違いにより、臓器非特異型である骨型，肝臓型，腎臓型と臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型 ALP に分類される。ALP は大腸菌からヒトまでの進化の過程で保存されているが、各臓器由来の ALP の生体における生理学的な役割および機能においては未だ不明な点が多い。生体内における ALP の基質についても、骨型 ALP のピロリン酸と小腸型のピリドキサルリン酸が確実とされているのみである。ALP アイソザイムの古典的な酵素学的性質の研究における基質として、パラニトロフェニルリン酸が汎用されてきたが、これは生体内には存在しない基質である。また、このような研究において用いられる ALP の多くは動物由来のものであり、ヒト由来の ALP による研究は未だ少ない。本研究では、ヒト臓器由来の ALP を用いて、生体内に存在し基質となり得る３種類のリン酸エステルにおける、ALP 活性の pH 依存性と基質濃度依存性を測定し、ヒト ALP の生体内における真の基質を明らかにすることを目指した。また、2 種の ALP 阻害剤 levamisole、vanadate に対する感受性の相違から、性質の違いを検討した。

【材料と方法】各種 ALP（骨型、肝臓型、胎盤型、小腸型）活性の至適 pH を検討するため、各 pH の 50 mM トリス塩酸緩衝液、及び炭酸緩衝液中における活性を測定した。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）、1.5 mM $MgCl_2$、50 mM トリス塩酸緩衝液、もしくは 50 mM 炭酸緩衝液、および基質として 2 mM パラニトロフェニルリン酸（*p*-NPP）、5 mM ナトリウムピロリン酸（Na-PPi）、2 mM ピリドキサルリン酸（ビタミンＢ6,PLP）、2 mM アデノシン三リン酸（ATP）を含む反応溶液 300 μM 中にて triplicate で行った。37℃で 30 分間反応させた後、20 mM EDTA を加えて反応を停止させ、酵素反応で生じた無機リンを Chifflet 法にて発色させ、波長 850 nm における吸光度を測定し算出した。同様の測定法にて各種 ALP 活性の基質濃度依存性を検討するため種々濃度の基質を使用して ALP 活性を測定した。また、各種 ALP 活性に与える阻害剤の影響を検討するため、種々濃度の阻害剤存在下で ALP 活性を測定した。阻害剤は、

levamisole と vanadate の 2 種を用いた。

【結果】骨型 ALP の生体内基質とされている Na-PPi 分解の至適 pH はどの ALP も 8.8 から 9.1 であり、また Na-PPi 分解の 50%活性化濃度（$K_{0.5}$）も ALP の種類によらず 3 から 4 mM であった。最大活性値はすべてのタイプで 8 mM であり、8 mM 以上に濃度を増加すると、すべての ALP で活性が低下する基質阻害が見られた。基質 Na-PPi の levamisole による阻害効果は，骨型 ALP において，最大阻害 81%の阻害がみられたが，その他のタイプの ALP では低い効果しかみられなかった。基質 Na-PPi の vanadate による阻害効果は、骨型、肝臓型 ALP では最大阻害が 80%以上であり 50%活性阻害濃度（$K_{i0.5}$）も 1.1 から 1.6　μM と低かった．一方，小腸型と胎盤型 ALP においては最大阻害が 55%程度であり、$K_{i0.5}$ も 8.9 から 21.4　μM と高かった。小腸型 ALP の基質とされる PLP 分解の至適 pH はどの ALP も 9.9 から 10.4 であり、また PLP 分解の $K_{0.5}$ も ALP の種類によらず 1.2 から 1.6 mM であった。最大活性値はすべてのタイプで 5 mM であり，10 mM まで濃度をあげると基質阻害が見られた。基質を PLP とした際の levamisole による各 ALP の活性阻害は、骨型と肝臓型 ALP においては最大阻害が 80%以上となり、$K_{i0.5}$ も 5.3 から 18.8　μM であった。しかし、小腸型及び胎盤型 ALP においては、阻害効果も低く、$K_{i0.5}$ 値も大きかった。一方、基質 PLP の vanadate による阻害効果は、骨型及び肝臓型 ALP においては最大阻害が 90%以上であり、$K_{i0.5}$ も 3.5 から 4.1　μM と高い阻害効果を示した。また、胎盤型と小腸型 ALP も 84%の阻害が認められ、$K_{i0.5}$ も 12.0 から 12.5　μM であった。また、骨型 ALP における各基質の至適 pH の比較では、基質 *p*-NPP の場合と比べ、PLP において相違はほとんど見られなかったが、ATP および、Na-PPi の場合は、至適 pH が酸性側にシフトした。*p*-NPP を基質として同様の実験を行った結果、基質に対する至適 pH と基質に対する $K_{0.5}$ は ALP の由来には関係なく基質によって類似していた。また、levamisole などの阻害剤に対する $Ki_{0.5}$ は基質の種類には関係なく、ALP の種類によってほぼ一定であった。

【考察】Na-PPi および PLP を基質とした際の各 ALP の最大活性を示した pH は ALP のタイプにより差異は認められなかった。また、基質濃度依存性においても ALP のタイプによる相違はみられなかったことから、ALP の種類による基質選択性は見いだせなかった。よって、各 ALP 活性の至適 pH および基質に対する親和性は、ALP のタイプによってではなく、基質の種類により異なることが示された。また、骨型 ALP における各基質の至適 pH を比較すると、従来の人工基質であり生体内には存在しない *p*-NPP の場合と比べ、Na-PPi および ATP においては、pH 1 程度酸性側にシフトした。ゆえに、生体内での至適 pH は従来考えられていたよりも中性側であることが示唆された。阻害剤による ALP 活性の阻害剤濃度依存性の測定では、PLP を基質とした際の levamisole の阻害効果に ALP のタイプによる大きな相違が認められた。この際の $Ki_{0.5}$ は、骨型、肝臓型 ALP に比べ、小腸型、胎盤型 ALP は非常に

大きな値を示し、また、最大阻害率も低い値であった。よって、PLP を基質とした際、骨型、肝臓型 ALP に比べ、小腸型、胎盤型 ALP は levamisole への感受性が低いことが示された。ヒト胎盤型 ALP はダイマー間にシステイン結合を持ち、解離しにくく、他の ALP に比べ安定した構造をしていることが知られている。ゆえに、今回の実験においても、阻害剤に対し、低い感受性を示したと推測される。また、胎盤型、小腸型 ALP のホモロジーは 87%とされており、この二つの型の ALP はよく似た遺伝子構造なため、阻害剤に対する反応性も類似していたと推測される。それ以外の阻害効果における測定においても、臓器非特異型である骨型、肝臓型 ALP と、臓器特異型である小腸型、胎盤型 ALP とでは異なる性質を示した。骨型、肝臓型 ALP は臓器非特異型に含まれる同じタイプの ALP であるため、阻害剤に対する反応も類似したものになったと考えられる。

【結論】ヒトに存在する各臓器由来の ALP はその機能と生体内基質に対応して変化してきた可能性があると考えて本研究を行ったが、少なくとも今回検討した基質に関しては ALP の種類による相違は見いだせず、むしろ阻害剤に対する感受性に ALP の種類による相違が見られた。