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_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏名　更田　恵理子

	主査	教授	山崎　裕
審査担当者	副査	教授	鈴木　邦明
	副査	教授	田村　正人

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

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いで口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

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。大腸菌からヒトまで進化の過程で保存されているが、各臓器由来の ALP の生体における真の基質と機能に関して未だに不明な点が多い。比較的最近、ヒト臓器由来の ALP が入手可能になったため、それらの基質選択性及び阻害剤に対する感受性を検索した。

材料はヒトの骨型､小腸型､胎盤型及び肝臓由来の ALP を購入して使用した。基質として、生体内には存在しないが ALP 活性の測定に汎用されるパラニトロフェニルリン酸（*p*-NPP）と、骨型 ALP の基質とされているナトリウムピロリン酸（Na-PPi）、及び小腸型 ALP の基質とされているピリドキサルリン酸（ビタミン B6、PLP）、また生体内リン酸化合物であるアデノシン三リン酸（ATP）を使用して、各 ALP 活性の pH 依存性と基質濃度依存性、及び ALP 阻害剤である levamisole 及び vanadate による阻害効果を検討した。活性は各基質が加水分解されて生ずる無機リンを 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。

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 3.2 から 4.0 mM であった。Na-PPi を基質とした際の阻害剤の 50%活性阻害濃度（$Ki_{0.5}$）は vanadate では、臓器特異型である小腸型、胎盤型に比べ、臓器非特異型である骨型と肝臓型で値が小さく、強い阻害効果が認められた。

また、levamisole では、骨型 ALP に対する阻害効果が他のものより強く認められた。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。PLP を基質とした際の阻害剤の $Ki_{0.5}$ は、vanadate では臓器特異型、臓器非特異型ともに低値傾向を示したが、骨型と肝臓型で特に低値を示し、最大阻害率も高値であった。levamisole における $Ki_{0.5}$ は骨型と肝臓型に比べ、臓器特異型である小腸型、胎盤型では非常に大きな値を示し、阻害効果も低かった。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 及び Na-PPi の場合は至適 pH が酸性側にシフトした。

以上の結果から、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 の種類による明確な相違は見いだせず、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。

続いて，審査担当者から本研究およびその関連事項について質問がなされた。主な質問内容は、以下の通りであった。

1) ヒト ALP の基質となり得るリン酸化合物の種類について
2) 生体内における ALP 基質濃度について
3) 50%活性化濃度（$K_{0.5}$）と基質選択性の関連性について
4) 二つの阻害剤（levamisole、vanadate）において、ALP 活性を阻害するのに必要な濃度が大きく異なる理由
5) ヒト胎盤型 ALP の阻害剤に対する感受性が低い理由
6) ALP 反応溶液に sucrose を加える理由
7) ALP 反応溶液に $MgCl_2$ を加える理由
8) 臓器特異型 ALP と臓器非特異型 ALP の違いについて
9) 本研究の今後の展望について

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が歯学博士の学位を授与される資格を有するものと認めた。