



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11262
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58176
Type	doctoral thesis
File Information	Eriko_Fukeda.pdf



博士論文

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

平成 26 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

更 田 恵 理 子

抄 録：各臓器由来のアルカリ性ホスファターゼ（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。そこで、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、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。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、生体内に存在するナトリウムピロリン酸（Na-PPi）、アデノシン三リン酸（ATP）及びピリドキサルリン酸（PLP）を使用して、各 ALP 活性の pH 依存性と基質濃度依存性、及び阻害剤である levamisole 及び vanadate による阻害を検討した。活性は各基質が加水分解されて生ずる無機リンを Chifflet 法によって定量して測定した。骨型 ALP の生体内基質とされているピロリン酸分解の至適 pH はどの ALP も 8.8 から 9.1 であり、また 50%活性化濃度（ $K_{0.5}$ ）も ALP の種類によらず 3 から 5 mM であった。またピロリン酸を基質とした際の阻害剤の 50%活性阻害濃度（ $K_{i0.5}$ ）も類似しており、ALP の種類による違いは見いだせなかった。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 1.1 から 1.6 mM であった。PLP を基質とした際の阻害剤の $K_{i0.5}$ は、vanadate では ALP の種類によらず類似していたが、levamisole では異なっていた。ATP あるいは *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 $K_{i0.5}$ 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。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。

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ、基質選択性、阻害剤、ナトリウムピロリン酸、ピリドキサルリン酸

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り、活性発現に亜鉛を必要とする亜鉛酵素である¹⁾。ALP の大部分はホスファチジルイノシトールを介して、細胞膜に結合しており、その一部が遊離して血清中に存在している。ALP は様々な臓器の細胞に含まれており、由来臓器によってその糖鎖の構造が異なる。由来臓器に障害が生じると、血清中の ALP の濃度は上昇する。ゆえに血清中の ALP 活性

を調べることにより、異常をきたした臓器を特定することができる。特に胆道系には ALP が多く含まれているため、肝硬変や胆道がんなどの指標として利用される。また、骨形成の過程で ALP が血中に流出するため、悪性腫瘍の骨転移や骨粗鬆症、甲状腺機能亢進症などの指標として用いられる。血清 ALP 活性及びアイソザイムの測定により、原因臓器の特定が可能である^{1, 2)}。

ALP は遺伝子の違いにより、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

2~5). 各臓器特異的に糖鎖付加の修飾を受けることから、電気泳動上で異なるバンドとして分離することが可能である。骨や歯の石灰化に関連するとされる骨型 ALP は骨芽細胞の分化や骨形成活性を反映する骨形成マーカーとして測定される^{6, 7)}。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³⁾。

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 pH 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、ALP 阻害剤である levamisole⁸⁾と 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

1. 各種 ALP 活性の pH 依存性

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、50 mM のトリス塩酸緩衝液、及び炭酸緩衝液を使用して

活性を測定した。各種 ALP (骨型、肝臓型、胎盤型、小腸型)、25 mM sucrose (-EDTA)、1.5 mM MgCl₂、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*-nitrophenyl phosphate, *p*-NPP)、5 mM ナトリウムピロリン酸 (sodium pyrophosphate, Na-PPi)、2 mM アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP)、2 mM ピリドキサルリン酸 (pyridoxal phosphate, ビタミン B6, PLP) を含む 300 μ l のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.06, 7.35, 7.56, 7.78, 7.92, 8.08, 8.26, 8.5, 8.84, 9.16, 9.36, 9.72)、及び炭酸緩衝液 (pH 9.15, 9.63, 9.93, 10.15, 10.37, 10.53, 10.80, 11.07, 11.42) 中で 37°C、30 分間反応させた。その後、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は Chifflet 法⁹⁾でモリブデンリンとして発色させた後、HITACHI U-2000 分光光度計を用いて波長 850 nm における吸光度を測定し算出した。実験は triplicate で行い、吸光度からバックグラウンド値である 20 mM EDTA を先に加えた各基質溶液の吸光度を差し引いた。

2. 各種 ALP 活性の基質濃度依存性

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。活性測定は、上記 1. の実験で決定した活性の至適 pH において、基質とその濃度以外は上記の測定方法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

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。活性測定は、阻害剤を加える以外は上記の測定と同じ条件で行った。

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

結果は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

各種 ALP 活性の各々の基質における pH 依存性を調べて比較することと、以後の ALP 活性測定を行なうための至適 pH を知ることを目的に、各 ALP 活性の pH 依存性を測定した。Na-PPi (Fig. 1a), 及び PLP (Fig. 1b) を基質とし、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。

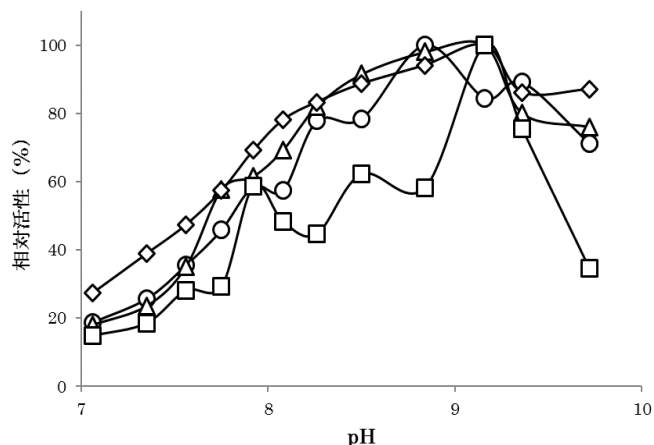


Fig. 1a Na-PPi における各 ALP 活性の pH 依存性

各 ALP の至適 pH を調べるため、最終濃度 50 mM のトリス塩酸緩衝液を用いて pH 依存性を測定した。トリス塩酸緩衝液は、12 種の pH (7.06, 7.35, 7.56, 7.78, 7.92, 8.08, 8.26, 8.5, 8.84, 9.16, 9.36, 9.72) を調製した。実験は、各種 ALP (骨型、肝臓型、胎盤型、小腸型)、25 mM sucrose (-EDTA), 5 mM MgCl_2 および 50 mM トリス塩酸緩衝液を含んだ反応溶液 250 μl 中に行い、triplicate で測定した。基質として、5 mM Na-PPi 50 μl を加えて反応を開始し、37°C で 30 分間反応させた後に 20 mM EDTA 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無機リンの吸光度を、HITACHI U-2000 分光光度計を用いて 850 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。

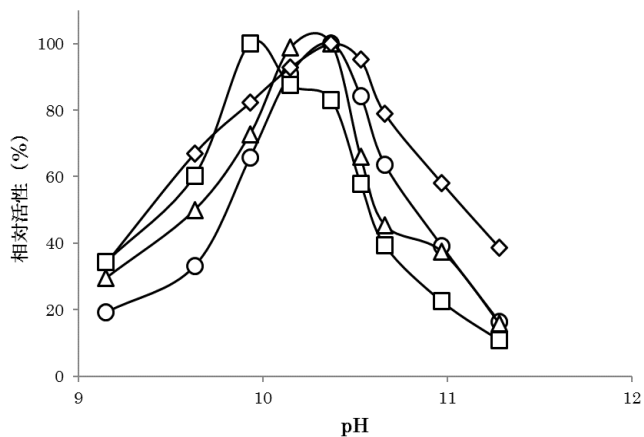


Fig. 1b PLP における各 ALP 活性の pH 依存性

各 ALP 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 pH 依存性を測定した。炭酸緩衝液は、9 種 pH (9.15, 9.63, 9.93, 10.15, 10.37, 10.53, 10.80, 11.07, 11.42) を調製した。実験は、各種 ALP (骨型、肝臓型、胎盤型、小腸型)、25 mM sucrose (-EDTA), 5 mM $MgCl_2$ および 50 mM 炭酸緩衝液を含んだ反応溶液 250 μ l 中に行い、triplicate で測定した。基質として、5 mM Na-PPi 50 μ l を加えて反応を開始し、37°C で 30 分間反応させた後に 20 mM EDTA 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無機リンの吸光度を、HITACHI U-2000 分光光度計を用いて 850 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。

Na-PPi を基質とした際の各 ALP の最大活性を示す pH は、骨型は 8.84, 肝臓型は 9.16, 胎盤型は 9.16, 小腸型は 9.16 であった。PLP を基質とした際の各 ALP の最大活性を示す pH は、骨型は 10.37, 肝臓型は 9.93, 胎盤型は 10.37, 小腸型は 10.37 であった。ALP の各タイプにおいて、Na-PPi 及び PLP を基

質とした際の至適 pH にほとんど差異はみられなかった。

また、骨型 ALP における各基質の至適 pH を比較した結果を Fig. 1c に示した。基質 *p*-NPP の場合と比較し、PLP においては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。

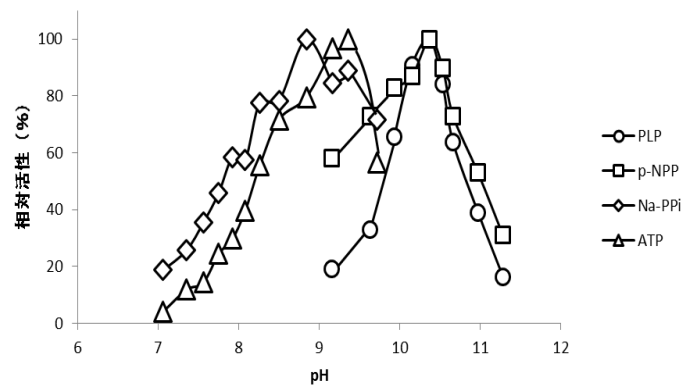


Fig. 1c 骨型 ALP における各基質の至適 pH

骨型 ALP の各基質における至適 pH を調べるため、最終濃度 50 mM の炭酸緩衝液およびトリス塩酸緩衝液を用いて pH 依存性を測定した。炭酸緩衝液は、9 種 pH (9.15, 9.63, 9.93, 10.15, 10.37, 10.53, 10.80, 11.07, 11.42) を調製した。トリス塩酸緩衝液は、12 種の pH (7.06, 7.35, 7.56, 7.78, 7.92, 8.08, 8.26, 8.5, 8.84, 9.16, 9.36, 9.72) を調製した。Fig. 1a および Fig. 1b と同様の方法で ALP 活性測定を行なった。□が基質 *p*-NPP, ○が PLP, △が ATP, ◇が Na-PPi で示す。

2. 各種 ALP 活性の基質濃度依存性

各種 ALP 活性の各々の基質における濃度依存性を調べ、その基質選択性の相違を検索

するため実験を行なった。

骨型 ALP の生体内基質とされている Na-PPi, および小腸型 ALP の基質とされる PLP を基質とし, 各 ALP 活性の基質濃度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. 2 a, b) . また, 得られた結果から Hill plot を行なって計算した各 ALP の各基質に対する 50% 活性化濃度 ($K_{0.5}$) を表 1 に示した。

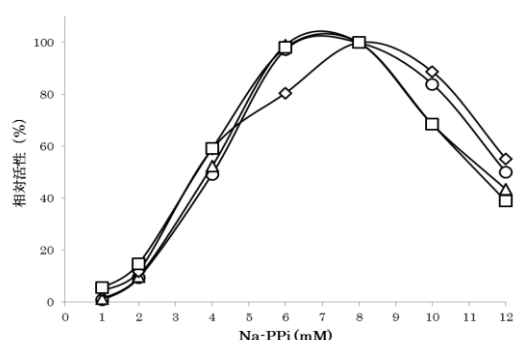


Fig. 2a Na-PPi における各 ALP 活性の基質濃度依存性

各 ALP の基質濃度依存性は, 各濃度に調製した Na-PPi, および pH 依存性測定と同じ濃度の各種 ALP, sucrose(-EDTA), 1 mM $MgCl_2$, トリス塩酸緩衝液 (pH は骨型 8.84, 肝臓型 9.16, 胎盤型 9.16, 小腸型 9.16) を含んだ反応溶液 300 μ 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。

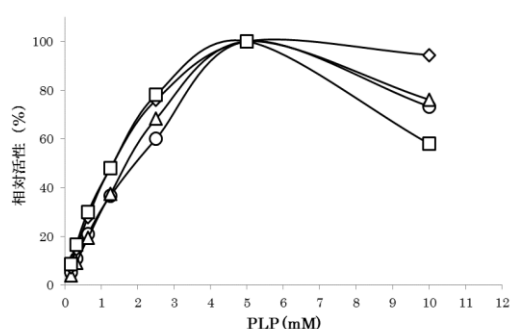


Fig. 2b PLP における各 ALP 活性の基質濃度依存性

各 ALP の基質濃度依存性は, 各濃度に調製した PLP, および pH 依存性測定と同じ濃度の各種 ALP, sucrose(-EDTA), 1 mM $MgCl_2$, 炭酸緩衝液 (pH は骨型 10.37, 肝臓型 9.93, 胎盤型 10.37, 小腸型 10.37) を含んだ反応溶液 300 μ 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。

表 1 各 ALP の各基質に対する 50% 活性化濃度 ($K_{0.5}$)

基質 ALP	Na-PPi	PLP
	$K_{0.5}$ (mM)	$K_{0.5}$ (mM)
骨型	3.2	1.5
肝臓型	3.7	1.3
胎盤型	3.8	1.2
小腸型	4.0	1.6

Na-PPi を基質とした際, 各 ALP 活性は Na-PPi の濃度に依存して増加した (Fig. 2a). 基質濃度依存性は ALP のタイプによる大きな相違はなく, Hill plot の結果から $K_{0.5}$ は 3.2 mM から 4.0 mM の範囲であった. 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. PLP を基質とした際も, 各 ALP 活性は PLP の濃度に依存して増加した (Fig. 2b) . この場合も基質濃度依存性において ALP のタイプによる大きな相違はなく, Hill plot の結果から $K_{0.5}$ は 1.2 mM から 1.6 mM の範囲であった. また, 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 (Fig. 2b).

3. 各種 ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性

Na-PPi および PLP を基質とした際の levamisole 及び vanadate の濃度に依存した各種 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 (Fig. 3 a-d), それぞれの実験結果から Hill plot を行なって計算した各 ALP の 50%活性阻害濃度 ($K_{i0.5}$) と最大阻害の割合 (%) を表 2 および表 3 に示した.

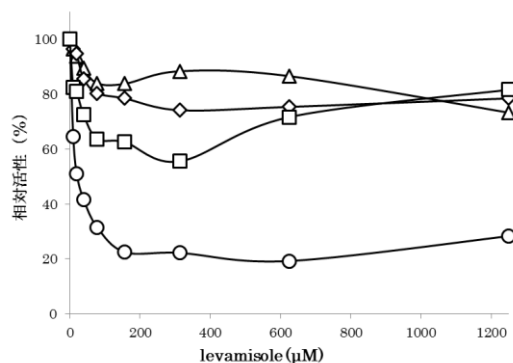


Fig. 3a Na-PPi における各 ALP 活性阻害の levamisole 濃度依存性

各 ALP の levamisole 濃度依存性測定は, 5 mM に調製した Na-PPi, および基質濃度依存性測定と同濃度の各種 ALP, sucrose (-EDTA), 5 mM $MgCl_2$, トリス塩酸緩衝液 (pH は骨型 8.84, 肝臓型 9.16, 胎盤型 9.16, 小腸型 9.16) を含んだ反応溶液 $300 \mu l$ 中にて Fig. 2 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.

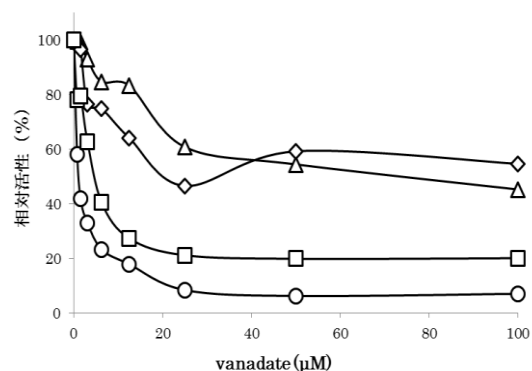


Fig. 3b Na-PPi における各 ALP 活性阻害の vanadate 濃度依存性

Fig. 3a と同様の方法で vanadate 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.

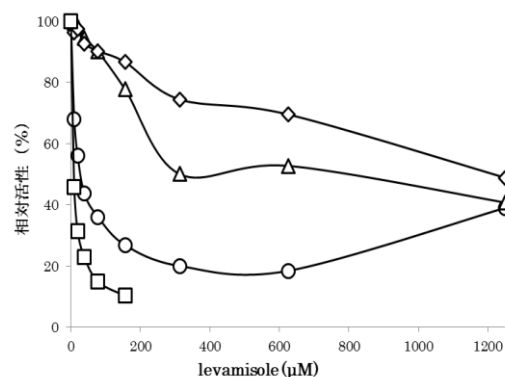


Fig. 3c PLP における各 ALP 活性阻害の levamisole 濃度依存性

各 ALP の levamisole 濃度依存性測定は, 5 mM に調製した PLP, および基質濃度依存性測定と同濃度の各種 ALP, sucrose (-EDTA), 5 mM $MgCl_2$, 炭酸緩衝液 (pH は骨型 10.37, 肝臓型 9.93, 胎盤型 10.37, 小腸型 10.37) を含んだ反応溶液 $300 \mu l$ 中にて Fig. 2 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.

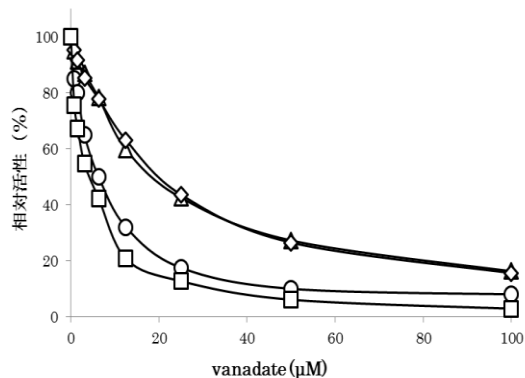


Fig. 3d PLP における各 ALP 活性阻害 vanadate 濃度依存性

Fig. 3c と同様の方法で vanadate 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 2 Na-PPi における各阻害剤の 50%活性阻害濃度 ($K_{i0.5}$) と最大阻害の割合 (%)

阻害剤 ALP	levamisole		vanadate	
	$K_{i0.5}$ (μ M)	最大阻害 (%)	$K_{i0.5}$ (μ M)	最大阻害 (%)
骨型	16.6	81	1.1	94
肝臓型	n.d.	38	1.6	80
胎盤型	n.d.	26	21.4	54
小腸型	n.d.	27	8.9	55

n. d.: not determined

表 3 PLP における各阻害剤の 50%活性阻害濃度 ($K_{i0.5}$) と最大阻害の割合 (%)

阻害剤 ALP	levamisole		vanadate	
	$K_{i0.5}$ (μ M)	最大阻害 (%)	$K_{i0.5}$ (μ M)	最大阻害 (%)
骨型	18.8	82	4.1	92
肝臓型	5.3	91	3.5	97
胎盤型	397.8	51	12.5	84
小腸型	149.4	59	12.0	84

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 (Fig. 3a, 表 2). 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 $K_{i0.5}$ も 1.1 から 1.6 μ M 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 μ M と高かった (Fig. 3b, 表 2). 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 μ M であった (Fig. 3c, 表 3). 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 (Fig. 3c, 表 3). 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 μ M 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 μ M であった (Fig. 3d, 表 3).

考 察

1. 各 ALP 活性の pH 依存性

ALP は膨大な研究の積み重ねがあるが¹⁾, 未だに不明な点のひとつは至適 pH が非常に高いことである. 生体内でもその pH で機能することが可能なのかということが問題とされるが, 一つの原因として ALP 活性の測定に使われる基質が pNPP などのように生体内に存在しない物質であることが挙げられる. 本来の生理的な基質を使用すると, より中性

に近い至適 pH を示すのではないかということである。Iioka¹⁰⁾ らは、今回の研究でも使用したヒト由来の各 ALP を用いて *p*-NPP を基質とした活性の至適 pH を測定したところ、至適 pH は 10 程度であると報告した¹⁰⁾。本研究で骨型 ALP の基質とされている Na-PPi を基質とした際の各 ALP の最大活性を示した pH は、8.84 から 9.16 となり、*p*-NPP を使用した際より pH にして 1 程度、中性側にシフトした。また、骨型 ALP では生体内に存在する ATP を基質とした際至適 pH は、9.2 位までシフトしたことから、生体内に存在する物質の場合は至適 pH が中性側にシフトする可能性があると考えられる。Koshikawa¹¹⁾ らは、骨芽細胞様の MC3T3-E1 細胞から部分精製した ALP を用いて、pNPP を基質とした際の至適 pH は 9.7 程度であるが、ATP やセリン、スレオニンあるいはチロシン残基をリン酸化したタンパク質を基質とした場合は、至適 pH が 8.5 位までシフトすると報告しており、今回得られた結果を支持する。

しかし、本研究において、Na-PPi を基質とした際の各 ALP の pH シフトは共通して起こり、Na-PPi を基質とすると考えられる骨型に特徴的なことではなかった。また、ピリドキサルリン酸は小腸型 ALP の基質の候補に挙げられるが、小腸型に限らずどの ALP でも、至適 pH は pNPP と同程度であった。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、今回の結果の結論は、ALP 活性の至適 pH は ALP の種類ではなく、基質によって決まるということのように見える。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¹⁾。このことから、ALP への基質の結合とリン酸化状態からの脱リン酸化は、ALP の種類ではなく基質の種類によって決定されると考えても良い可能性がある。今後、生体内に存在する他のリン酸エステル化合物を新たな候補物質として検索することを検討するが、新たな発想も必要かもしれない。

2. 各種 ALP 活性の基質濃度依存性

ALP は大腸菌からヒトまで進化の過程で保存されてきており、遺伝子レベルで 4 タイプが出現するのはヒトからである。また、ヒトにおいてはほぼ全身に存在する。骨型の基質にピロリン酸、小腸型にピリドキサルリン酸が想定されているが、もし、各タイプによって生体内での機能が異なるなら、生理的な基質もまた異なるだろうと推測した。そこで、各種の基質を用いて ALP 活性を測定すると、生理的な基質であれば基質に対する親和性が高いと予想し、ALP 活性の基質濃度依存性を測定するとより低濃度で活性が増加することを期待して実験を行った。しかし、Na-PPi を基質とした場合の各 ALP における基質濃度依存性は、ALP の種類による大きな相違は見られず、 $K_{0.5}$ も 3mM から 4 mM であった。また、PLP を基質とした場合の各 ALP における基質濃度依存性も Na-PPi の場合と同様、ALP の種類による相違は見られず、 $K_{0.5}$ は 1.2mM から 1.6mM であった。これらの結果からは、生体内での基質と予想される基質を使用しても基質親和性の相違は見られず、基質に対する親和性も ALP の種類によってではなく、基質の種類によって決定されると示唆された。pH 依存性の実験と同様にま

だ本来の基質を探せていない可能性があり、今後の課題である。

3. 各種 ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性

Na-PPi を基質とした場合の levamisole における阻害剤に対する反応性は、骨型 ALP とその他 ALP において差異がみられた。骨型 ALP においては、最大阻害 80.7 % とその効果がみられたものの、肝臓型、胎盤型、小腸型 ALP においては、最大阻害が 40% にも満たず、阻害効果が小さかった。Na-PPi を基質とした場合、骨型 ALP は levamisole に対する感受性が他の ALP より高いことが示された。しかし、 $K_{i0.5}$ に関しては、ALP の種類において大きな差異はみられなかった。Na-PPi を基質とした場合の vanadate における ALP 活性の阻害反応は、骨型、肝臓型で類似した傾向を示し、また小腸型、胎盤型でも似たような阻害濃度依存性を示した。

PLP を基質とした場合の levamisole における阻害剤に対する反応性は ALP の種類によりその感受性に相違がみられた。臓器非特異型である骨型と肝臓型では levamisole に対する感受性が胎盤型、小腸型に比べ高いことが示された。 $K_{i0.5}$ の値も骨型、肝臓型と胎盤型、小腸型では大きな差異が認められた。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。また、Iioka らは、ヒト由来 ALP における levamisole の活性阻害を pNPP を基質として測定し、臓器非特異型である骨型、肝臓型と臓器特異型の胎盤型と小腸型では阻害剤反応性に相違があることを報告している⁹⁾。PLP を基質とした場合においても、levamisole に対する感受性は臓器非特異型

と他の型では異なる傾向があることが示された。また、胎盤型 ALP は他の ALP よりも $K_{i0.5}$ の値が小さく、最大阻害も 51% であり、levamisole に対する反応性は比較的低かった。これはヒト胎盤型 ALP が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 に比べて安定した構造をしているため、阻害剤に対しても感受性が低かったと推測される¹²⁾。これより、ヒト ALP においても PLP を基質とした場合の levamisole に対する反応性の相違によって ALP の由来を区別することが可能となり得ることが示唆された。

Vanadate においても、levamisole ほどの大きな相違はなかったものの、臓器非特異型 ALP と臓器特異型 ALP ではその阻害反応性に違いが見られた。骨型、肝臓型は vanadate における感受性も比較的高い傾向がみられた。また、胎盤型と小腸型 ALP はほぼ同様の酵素活性阻害反応のパターンを示し、両者のホモロジーが 87% と高いことに基づくと推測された。

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。

参 考 文 献

- 1) McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S: Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London:373-487, 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) 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.
- 9) 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 lens ATPases. Anal Biochem 168 : 1-4, 1988.
- 10) 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.
- 11) Koshikawa M, Suzuki K, Sugawara Y, Yoshikawa M, Matsumoto A, Iida J : Tyrosine Phosphatase-like Activity of Bone-type Alkaline Phosphatase at Neutral pH range. J Hard Tiss Biol 9:71-77, 2000.
- 12) Le Du MH, Millan JL: Structural Evidence of Functional Divergence in Human Alkaline Phosphatase. J Biol Chem 277:49808-49814, 2002

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。

The difference in substrate selectivity and inhibitor sensitivity among human alkaline phosphatases

Eriko Fukeda

The human alkaline phosphatase (ALP) is homologous to not only other mammal ALP but also bacterial ALP. However, the substrate and function of ALP in vivo have not been cleared. Recently, we obtained human ALP as a chemical reagent. In this study, we examined the difference in substrate selectivity and inhibitor sensitivity among several types of human ALP. We used 4 types of human ALP from bone, intestine, placenta or liver. *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP), sodium pyrophosphate (Na-P₂), adenosine triphosphate (ATP) or pyridoxal phosphate (PLP) were used for substrate. The amount of inorganic phosphate as a result of hydrolysis by ALP was measured by Chifflet methods under different pH or substrate density. To examine the inhibitory effect on activity, levamisole or vanadate were used. The substrate density exhibiting 50% activity and the density exhibiting 50% inhibition were proposed as $K_{0.5}$ and $K_{i0.5}$ respectively. When the Na-P₂, the substrate of bone ALP, was used, the optical pH and $K_{0.5}$ did not show differences among each ALP types (optical pH : 8.8 ~ 9.1, $K_{0.5}$: 3 ~ 5 mM). In case of PLP, the substrate of intestine ALP, the optical pH and $K_{0.5}$ did not show differences among each ALP types (optical pH : 9.9 ~ 10.4, $K_{0.5}$: 1.1 ~ 1.6 mM), although the optical pH sifted to alkaline side. Additionally, the optical pH and $K_{0.5}$ on ATP or *p*-NPP, it is not in human body but many researchers used, did not show differences among each ALP types. However, in case of PLP, $K_{i0.5}$ of levamisole was different among each ALP types, although $K_{i0.5}$ of levamisole or vanadate did not show any differences among each ALP types. We found that human ALP showed different inhibitor sensitivity among several ALP types, although the substrate selectivity was not determined.

Key Words : Alkaline phosphatase , substrate selectivity , inhibitor , Sodium pyrophosphate, Pyridoxal phosphate

