HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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［全文の要約］
Author(s)	半谷, 純一
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12156号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62174
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Hanya_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

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

The effect of Mg, Ca and Zn
on human alkaline phosphatase activity

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　半谷　純一

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り、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。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。ヒト胎盤型ALPの結晶構造の解析により1個のサブユニットあたり1個のMgとCa及び2個のZnの結合部位の存在が示されたが、ALP活性における各イオンの機能については不明な点が多い。そこで、骨型のALPを中心にALP活性におけるMg, Ca及びZnの役割を明らかにすること、ALP活性の至適pH及び基質への親和性がMg, Ca及びZnによって異なるのか否かを明らかにすることを目的に本研究を行った。

材料と方法: ALP活性の測定において、Mg存在下で測定されるALP活性をMg-ALP, Ca存在下で測定されるALP活性をCa-ALP, Zn存在下で測定されるALP活性をZn-ALPとした。ヒト由来の骨型、肝臓型、胎盤型及び小腸型ALPをCALZYME社から購入して使用した。基質としてパラニトロフェニルリン酸（*p*NPP）、ナトリウムピロリン酸（Na-PPi）あるいはアデノシン三リン酸（ATP）を、ALP活性阻害剤としてlevamisoleとtetramisoleを使用した。酵素反応により生じた無機リンはChifflet法でモリブデンリンとして発色させた後、分光光度計で測定し活性を算出した。反応液中の遊離型のMg, Ca及びZnの濃度はEGTAとの結合定数から計算した。

結果と考察: 1. 骨型ALPのMg, Ca及びZn濃度依存性を*p*NPPを基質として測定するとMgはμM, CaではpMのオーダーで濃度に依存して活性は増加し、それぞれ676 μM及び100 nMで最大となった。Znでは0.77 pMまで遊離Zn濃度依存性に活性が増加したが、さらに高濃度では逆に活性は抑制された。1個目の結合部位へのZnの結合は活性を増大させるが、2個目の結合は活性の抑制に作用する可能性がある。Na-PPiを基質とすると、活性はMg濃度に依存して増加し676 μMで最大となった。また、活性はCa及びZn濃度に依存して増加し、それぞれ100 nM及び6 pMで最大となった。これらの結果はMg, Ca及びZnはそれぞれALP活性を発現させうることを示す。2. 骨型ALPによるMg-ALP, Ca-ALP及びZn-ALP活性のpH依存性を測定した。*p*NPPを基質とすると、Mg-ALP及びCa-ALPが最大活性を示すpHは9.7, Zn-ALPではややブロードでpH 9.5であった。Na-PPiを基質とするとMg-ALP活性はpH 8.51付近で最大活性を示し、Ca-ALPはpH 9.45以上、Zn-ALP活性はpH 9.12以上のアル

カリ側で最大活性を示した。ALP 研究における大きな疑問である pH 依存性に関して、ALP アイソザイムの種類、基質及び活性化する 2 価金属の種類によって規則性を明らかにすることを目的に本研究を行ったが、統一的な結果を得ることはできなかった。3. 骨型 ALP 活性における Mg, Ca 及び Zn の共存効果を調べると、Mg と Ca 及び Mg と Zn による活性化は相加的であり、それぞれのイオンが独立して ALP を活性化することを示唆した。相加的な活性化は基質が *p*NPP, Na-PPi でも同様に観察された。Mg と Ca あるいは Zn を添加する順序を入れ替えて活性を測定しても、同様の相加的な活性が観察された。しかし Ca と Zn だけでは組み合わせによる活性の相加性は認められなかった。4. *p*NPP, Na-PPi 及び ATP が基質の際の各 ALP 活性の ALP 阻害剤感受性を調べた。*p*NPP あるいは Na-PPi を基質とした Mg, Ca, Zn-ALP 活性はいずれも tetramisole 及び levamisole の濃度に依存して 90%からほぼ 100%阻害された。ATP が基質の場合も活性は tetramisole 及び levamisole 濃度に依存して低下したが tetramisole では最大でも 40%程度までしか活性は低下しなかった。これらの結果から、イオンの種類及び基質の種類によらず、測定している活性は ALP 阻害剤によって阻害される、すなわち ALP 活性であることを確認した。5. 骨型 ALP による Mg-ALP, Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性の *p*NPP, Na-PPi 及び ATP 濃度依存性を調べた。*p*NPP では類似した濃度依存性で活性が増加したが、NaPPi では、Ca と Zn では低濃度で加水分解され、Mg では高濃度必要であった。また、ATP も加水分解されるが、*p*NPP や Na-PPi と比較して高濃度必要であった。これらの結果、Mg-ALP, Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性の *p*NPP, Na-PPi 及び ATP に対する親和性は、イオンの種類によって異なり、特に Na-PPi において顕著であった。また、基質の種類によっても親和性は異なった。6. Mg, Ca 及び Zn に対する親和性を骨型、肝臓型、胎盤型及び小腸型各 ALP アイソザイムで比較した。各アイソザイムの活性はいずれも Mg, Ca 及び Zn 濃度に依存して増加したが，50%活性化濃度は異なりアイソザイムの種類によって Mg, Ca 及び Zn に対する親和性は異なることを示唆した。また、臓器特異型の胎盤型及び小腸型の親和性が高いこと、及び各アイソザイムで共通して Mg よりも Ca 及び Zn に対して親和性が高いことも示された。 7. 各アイソザイムの Mg-ALP, Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性の pH 依存性を比較した。 *p*NPP を基質とすると、Mg-ALP, Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性すべてにおいて骨型、肝臓型及び小腸型は類似した pH プロファイルとなるが、胎盤型は異なった。しかし、Na-PPi を基質にすると、骨型と小腸型は類似した pH プロファイルとなり、肝臓型と胎盤型は大きく異なった。8.

Na-PPi は骨型の生理的な基質とされていることから、胎盤型及び小腸型と比較した。Mg-ALP の Na-PPi に対する親和性は、小腸型と骨型では類似しており、胎盤型は小腸型と骨型よりわずかに低い結果となった。基質に対する親和性は ALP のアイソザイムの種類より、基質の種類によって決定されるように見え、Na-PPi が骨型 ALP に特異的である結果は得られなかった。

結論: 以上の結果は Mg,Ca 及び Zn は独立して ALP 活性を促進することが可能であり、活性の至適 pH 及び基質に対する親和性は存在するイオンによって変化しうることを示唆した。ALP の生体内での機能が存在する 2 価金属イオンと基質の種類によって変化する可能性がある。