HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | アルカリ性ホスファターゼという酵素と硬組織形成 |
| Author(s) | 鈴木, 邦明 |
| Citation | 北海道歯学雑誌, 37(1), 2-10 |
| Issue Date | 2016-09 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/63388 |
| Type | journal article |
| File Information | 37-01_01_suzuki.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　37：2-10，2016.

**特　集**

# アルカリ性ホスファターゼという酵素と硬組織形成

# Alkaline phosphatase and hard tissue formation

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
鈴木　邦明

アルカリ性ホスファターゼ（ALP）は120年以上にわたる研究の歴史があり，様々な酵素の中でも最も詳細に研究された酵素の一つである．1979年にはMcComb RBらによる，1,000ページにわたる「Alkaline Phosphatase」が出版されており，ALPの自然界における分布，ALPの精製，構造，酵素の反応機構，活性測定方法，ALPのアイソザイム，ALP活性測定の臨床的意義，動物種によるALPの相違と獣医学分野における利用，ALPの産業利用，ALPの生理機能の章が設けられ1907年以降の10,000編以上の論文を引用して記載している[1]．その後の1980年から2005年までの25年間には，タイトルにAlkaline Phosphataseを含む論文が約5,000編，キーワードにAlkaline Phosphataseを含む論文は36,000編以上出版されているという[2]．2006年にはMillan JLがMcComb RBら[1] 以降の25年間のALPに関連した新たな重要な知見を，タンパク質と遺伝子の構造及びアイソザイムの機能に焦点を当てて記載した300ページに及ぶ「Mammalian Alkaline Phosphatases」を出版した[2]．この２冊の大著があれば100年以上にわたるALPに関する知見は余すところなく記載されていると感じるが，その後，さらに10年が経過してタイトルにAlkaline Phosphataseを含む新たな論文が約1,400編公表されている（PuB Med）．最近の３年間にはMillan JLらによる骨型ALPに焦点を当てた総説[3] に加え，ALPアイソザイムを比較した総説[4] 及び幹細胞のALPに関する総説が出版された[5, 6]．また，ALPが関連する疾患とその治療に関する総説が増加しており，骨型のALP[7]，小腸型ALP[8-11]，肝臓型ALP[12]，腎臓型ALP[13, 14]，神経系ALP[15, 16] などがある．ALPの研究対象が生理的な機能から疾患に広がって新たな展開を見せる状況で現在に至っている．

私は10年くらいの間，Na,K-ATPaseの反応機構を研究していた．松本章教授から骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を使用した研究への誘いを受けた際，ALPが硬組織形成において重要視されている酵素であることは知っていたので，迷わずALPを研究対象とすることにした．Na,K-ATPaseとALPは基質特異性こそ異なるがどちらもリン酸エステル結合を加水分解する酵素であり，酵素としての扱い方や活性測定法などの経験をそのまま利用することができたからであった．20年前の時点ではあるが，少し調べてみると，上記のようにALPに関する膨大な研究の蓄積があるのに，各ALPアイソザイムの生理的な基質や機能，アルカリ性pHで最大活性を示す意義など，酵素反応を研究する立場から重要かつ基本的なことがほとんど解決されていないことを知った．そこで，私にとって解決されていないと感じたことに興味を持って細々とではあるが大学院生と研究を行ってきた．本特集では，骨型のALPを中心に据えて私が関心を持ってきた領域について現状を紹介するとともに，私たちが行ってきた研究を紹介したい．

## １．アルカリ性ホスファターゼとは[1-4]

ALP（EC 3.1.3.1）はリン酸エステル結合を加水分解して無機リンとアルコールや糖を生ずる酵素である．少なくとも*in vitro*では基質特異性は低く，生体内では想定しにくいpH 8から11くらいのアルカリ性条件下で最大活性を示すことが，アルカリ性ホスファターゼの名前の由来である．ALPは大腸菌からヒトまで保存されており，ヒトではほぼ全身に存在して臓器によるアイソザイムが分類される．ALPの基本構造は同一のサブユニット２個で１タンパク質を構成するホモダイマーである．ヒトALPは，遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型，胎盤型及び胚細胞型と，骨型，肝臓型，腎臓型などを含む臓器非特異型（TNAP）の４種に分類される．これらのアイソザイムは分子量，熱への安定性などの相違点が認められる．また，ALPには種々の阻害薬が存在し，ALPの臓器の由来によって阻害薬に対する反応性が異なることが知られている．

生体内での基質であることがほぼ明らかなのはピロリン酸（PPi）とビタミンB6（ピリドキサルリン酸：PLP）であるが，低ホスファターゼ症（hypophosphatasia）ではこれらに加えてホスホエタノールアミン（phosphoethanolamine：PEA）も増加してくることから，基質の可能性があるとされる．広く認められているALPの生理的な機能については，先天的な代謝異常とノックアウトマウスの解析から明らかになった硬組織形成がある．骨型ALPは骨芽細胞

〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
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

のマーカー酵素とされ，骨芽細胞への分化，あるいは硬組織形成の指標として測定されることが多い．骨型を除くと，ALPの生理的な機能に関しては明らかにされていない点が多い．酵素化学的性質においては，小腸型ALPは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．比較的最近，ALP はiPS細胞において細胞の初期化のマーカーとされている．また腫瘍細胞ではALPのサブユニット構成に変異が生ずるという報告があり，ALPは細胞の分化に関係する可能性がある．

ALPは糖鎖を介して酵素活性のあるサブユニットを細胞外につなぎ止めた状態で存在し，糖鎖の末端はglycosylphosphatidylinositol（GPI）アンカーで細胞の形質膜に結合している．GPIアンカーや糖鎖が切断されるとALPは細胞から離れ血清に移行する．細胞でALPの産生が増加すると血清中の濃度が上昇するため，血清ALP活性量とALPの臓器の由来は疾患のスクリーニング検査の指標とされる．血清中の肝臓型ALPは臨床検査では主として肝機能の指標の一つとして扱われることが多い．また，悪性腫瘍の肝転移・骨転移，甲状腺機能亢進症などで検査され，肝疾患・骨疾患・甲状腺疾患などの指標となる．ALPだけで特定の疾患を確定するのは困難であるが，アイソザイムを測定することにより由来臓器を特定することが可能である．

## ２．石灰化におけるALPの機能

ALPノックアウトマウスの解析から得られた結果と，TNAPが欠損したヒトの低ホスファターゼ症において骨や軟骨の低石灰化を伴うことなどが，硬組織形成におけるTNAPの機能の明らかな証拠である．また，硬組織の石灰化においては必ずALP活性の増加が観察されることや，軟組織における異所性の石灰化においてもALP活性の増大が認められることも，TNAPが石灰化に関与する強力な傍証であった[1–3]．

硬組織代謝とALPの研究に参加した当時の私には，ALPの酵素活性と石灰化の間に直接的な関係を示す証拠が乏しいことと，石灰化の評価に定量的な解析が少ないことが気になった．そこで，定量的な解析をもとにALP活性の石灰化における機能を検討したいと考えて研究を始めた．材料は分泌した基質を*in vitro*で石灰化するマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を使用した．E1細胞の石灰化の過程は位相差顕微鏡下での観察とフォンコッサ染色で確認していたが，定量的に取り扱う系を確立することを試みた．そこで，細胞培養中の一定期間ごとに細胞と細胞外基質を回収し，*p*NPPを基質としてALP活性を測定した．また，コラーゲン生成量の代わりにWoessner法でハイドロキシプロリン量を測定し，Ca量を原子吸光分析で，Pi量をChifflet法で測定することにより，石灰化の経時的な変化を定量的に解析する系をまず確立した[17–19]．Sugawaraらはこの系に対するALP活性阻害薬であるtetramisoleの影響を検討して，ALP活性が阻害されるとE1細胞の石灰化が抑制されることを示し，位相差顕微鏡下での観察とフォンコッサ染色でも確認した[20, 21]．さらに，ALPのGPIアンカーを切断するために，phosphatidylinositol-specific phospholipase C（PIPLC）存在下で同様の実験を行ったところ，ALPが細胞から遊離して培養液中に存在していても，ALP活性が機能していれば石灰化は起こることを示した[21]．すなわち，ALPタンパク質が存在することではなく，ALP活性が機能して基質が加水分解されることが石灰化に必須であることを明らかにした．

現在では，硬組織石灰化におけるALPの機能は明確である[1–3, 22]．基質小胞においては無機リン（Pi）とカルシウムイオン（$Ca^{2+}$）が取り込まれてハイドロキシアパタイトが形成されるが，NPP1 (nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1）などにより産生されるピロリン酸（PPi）がハイドロキシアパタイトの結晶形成を阻害することにより，石灰化を抑制する．TNAPはハイドロキシアパタイト形成を阻害するPPiを基質として加水分解することによってPPiを減少させると同時に，ハイドロキシアパタイト形成を促進するPiを産生することによって石灰化を促進する[1–3, 22]．もしこの機能が，TNAPの中でも骨型のALPだけの機能であるのなら，骨型ALPは他のALPアイソザイムよりもPPiに対する親和性が高いなどの性質を示しても良いと推測されるが，この点に関しては証拠がなかった．

そこで，ちょうど10年くらい前から輸入・市販されて入手可能となったヒト骨型，肝臓型，小腸型，胎盤型の4種のALPを使用して，PPiを含む種々基質を使用してALP活性を測定し，基質親和性を比較したが，骨型ALPが他のアイソザイムと比較してPPiに対して親和性が高いという結果は得られなかった[23, 24]．

現時点ではALPアイソザイムは基質特異性が極めて広くアイソザイム間の相違は見いだせない状況である．生物は進化の過程で合目的な方向へ進むはずと考えていたが，必要もないのにALPはアイソザイムの種類を増やしていったのであろうか．いまだに不思議に感じることである．

## ３．石灰化におけるALP活性調節の情報伝達機構

レチノイン酸（ビタミンA）はTNAP遺伝子の転写活性化により，活性型のビタミンDはTNAP mRNAの安定性を高めてTNAPの発現を増強する．また，*in vitro*の培養細胞を用いた石灰化実験で添加されることのある$\beta$-グリセロリン酸もTNAPの発現を増強する．これらによるTNAP発現の増強は石灰化を促進する[2]．

Kajiiらは，上記の定量的なE1細胞の石灰化過程の解析の系に対するプロスタグランジンE2（prostaglandin E2 : PGE2）と，シクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase

: COX）を阻害してPG合成を抑制するインドメタシン（indomethacin）の効果を検討した．その結果，インドメタシンがE1細胞培養中の経時的なALP活性，ハイドロキシプロリン量，Ca及びPiの蓄積を促進することと，PGE2はその逆の作用を示すことを明らかにした[18]．また，大西らはインターロイキン1-β（IL-1β）のE1細胞に対する効果を検討した．その結果，IL-1βはCOX2の誘導によるPGE2の増加，ALP mRNA及びALP活性の減少と，E1細胞の石灰化の抑制を引き起こすことを明らかにした[25]．これらの結果は，IL-1βからPGE2の情報伝達系は，ALP活性を低下させて石灰化を抑制することを示唆した．

## 4．石灰化以外のALPの機能

ヒトにおいてはALPのさまざまなアイソザイムが存在するが，共通した基本的な機能はリン酸エステル化合物の加水分解である．各アイソザイムは存在部位が異なるものの，基質に対する親和性などには大きな違いは見られない[1–3]．Millanの2006年の著書[2]の時点では，アイソザイムの生理機能の少なくとも一部がほぼ確定していたのは上記の骨型と小腸型のみである．

小腸型は食餌からのPLP（ビタミンB6）の取り込みに関与するとされる．小腸粘膜においてPLPはALPにより脱リン酸化されてピリドキシンとして吸収された後，再びPLPに変換されて補酵素として機能するとされる．また，小腸型ALPは同様の機構で小腸からの薬物の吸収にも関与するとされる．最近では，小腸型ALPは小腸におけるpHの調節，脂質の吸収，遊離ヌクレオチドや，リン脂質，細菌の産生するリポ多糖（lipopolysaccharide : LPS）の脱リン酸化による解毒に関与し，炎症の軽減や腸内細菌叢の維持に関わるとされている．これらの機能低下は炎症性疾患を引き起こすとされ，ALPを使用した治療も検討されている[8–11]．

2006年の時点[2]で，TNAPは肝臓でのPLP代謝に関与すること，TNAP欠損マウスでは全身のPLPレベルが上がることが報告されていたが，肝臓，腎臓などにおけるTNAPの機能に関しては，ほとんど明らかにされていなかった．現在，血清中の肝臓型ALPは胆汁うっ滞，胆汁性肝硬変や硬化性胆管炎のマーカーでもあるとされ，肝臓型ALPが減少すると肝臓の高ATPやLPSの過剰から炎症性疾患に発展すると考えられ，治療法の候補として小腸型ALPの内服も検討されている[12]．腎臓においては，ALPはLPSの脱リン酸化による解毒，また，炎症の結果遊離したATPを脱リン酸化して抗炎症作用と組織保護効果のあるアデノシンを産生することによって，抗炎症的に作用するとされる．そこで，急性腎障害に伴う敗血症の薬物治療にALPの使用が検討されている[13, 14]．

中枢神経系においては，ALPはATPの代謝による神経機能の維持や，炎症による神経傷害及びアルツハイマー病の予防などに関与すると考えられている[15, 16]．

胚細胞型ALPは胎生初期の発生段階及び生殖細胞の分化での関与が推測されていた[2]．胎盤型ALPも免疫グロブリンGとの関連や，細胞分割の調節，DNA合成への関与，腫瘍細胞の増殖などに関する報告があり，胎児の成長の調節に関与すると示唆されていた[2]．また，iPS及びES細胞などの細胞の初期化のマーカーとしてALP活性の上昇が使われていたが，最近，幹細胞のALPに関する総説が公表された[5, 6]．

## 5．ALPの生理的な基質はなにか

生理的な基質は酵素の機能に直結する．ALP活性を測定する際によく使用される基質はパラニトロフェニルリン酸（*p*NPP）であるが，*p*NPPは生体内には存在しない．

ほ乳類のALPは*in vitro*では広い基質特異性を示し，さまざまなリン酸化された物質の加水分解が可能である．Sayら[26]は，骨由来のALPがATP，ADP，AMPなどのヌクレオチド，ピロリン酸，グルコース-1-リン酸，グルコース-6-リン酸，フルクトース-6-リン酸，β-グリセロリン酸，*p*NPPなどを加水分解することを示した．しかし，ATPやピロリン酸の加水分解活性は他の物質と比較して低かった．さまざまな研究の中で，ALPの基質としてリン酸化タンパク質も候補としてあげられた[2]．

上記のように2006年の時点で，ALPの生理的な基質として有力視されているのはPPi，PLP，PEAのみであった[1, 2, 27, 28]．現在では，これらに加えて，ATP，LPS，リン酸化オステオポンチンが生理的な基質と考えられている[3]．

私たちは，新しい視点から*in vitro*でALPの生理的な基質を見いだそうと考えていくつかの試みを行った．生理的な基質の可能性の基準としては，生体内に存在することはもちろんであるが，ALP活性の基質としての親和性が高いこと，ALP活性の至適pHが生理的な中性pHにシフトすることなどである．また入手可能となったヒト４種のALPアイソザイムを使用して基質特異性を比較することにより，他の動物種とは異なったヒト型の特徴を見いだそうとした．さらにタンパク質の機能の調節にリン酸化・脱リン酸化による調節が注目されている頃であったので，ALPがプロテインホスファターゼとして機能する可能性も検討した．

Koshikawaら[29]は，MC3T3-E1細胞のALPをブタノール抽出後，陰イオン交換，Con A アフィニティー及びゲルろ過カラムにより900倍精製して，分子量76,000のほぼ均一なALPを得た．また，プロテインホスファターゼの基質として使用されるチロシンリン酸化ミエリン塩基性タンパク質（Tyr-MBP）とセリン・スレオニンリン酸化ミエリン塩基性タンパク質（Ser,Thr-MBP）を作成し，精製ALPを用いて*p*NPP，Tyr-MBP及びSer,Thr-MBP加水分

解活性を比較した．その結果，ALPは*p*NPPとTyr-MBPを加水分解したが，Ser,Thr-MBPを加水分解しなかった．また，至適pHは*p*NPPに対しては9.7，Tyr-MBPに対しては8.7であったことから，ALPはチロシンリン酸化タンパク質を基質としてタンパク質の機能を調節する可能性があると報告した[29]．

更田ら[23]は，ヒト骨型，小腸型，肝臓型及び胎盤型ALPの基質濃度依存性をPPiとPLPを基質として検討したところ，50％活性化濃度はALPの種類によらず，PPiに対しては3から5 mM，PLPに対しては1.1から1.6 mMであった．PPiは骨型ALPの基質，PLPは小腸型ALPの基質とされるが，in vitroではアイソザイムの種類による基質親和性の相違は観察されなかった．

## 6．ALPの阻害薬

ALPの阻害薬としては拮抗阻害（Competitive Inhibition）型にEDTAなどのキレート作用薬，活性の反応産物である無機リン（Pi），バナデイト（Va）などがある．また，窒素含有型のビスホスホネートであるアレンドロネート（alendronate），パミドロネート（pamidronate）及びゾレドロネート（zoledronate）は活性中心の$Zn^{2+}$及び$Mg^{2+}$をキレートして拮抗阻害すると報告されている[2, 30]．非拮抗阻害（Non-competitive Inhibition）型としてはオカダ酸や利尿薬であるアセタゾラミド，フロセミドなどが知られている[3]．不拮抗阻害（Uncompetitive Inhibition）型としては，フェニルアラニン（L-phe），ロイシン（L-leu），ホモアルギニン（L-homoarg）などのアミノ酸がある．L-pheとL-leuは胎盤型ALPの活性中心における亜鉛やリン酸の結合部位に作用するモデルも提出されている[31]．テトラミゾール（tetramisole）の立体異性体であるレバミゾール（levamisole）はTNAPの不拮抗阻害薬である[1-3]．

Fishmanら[32]は，臨床における必要性から，血清中に検出されるALPが肝臓由来か骨由来かを決定することを目的に，両者の特異的な阻害剤を見いだすことを試み139種類の化学物質を検索した．しかし，両ALPを区別する阻害薬を見いだすことはできなかったが，これら臓器非特異的なALPと小腸型あるいは胎盤型を区別する阻害薬は見いだされ，臨床的にも使用可能であった．

Suzukiら[33]は，阻害薬によるALPアイソザイムの阻害機構の相違を明らかにすることを目的に，E1細胞の骨型ALP，ウシ腎臓及び小腸型ALPとブタ胎盤型ALPに対するlevamisoleとL-homoargの阻害様式を検討した．その結果，骨，腎臓及び胎盤型ALPに対する両阻害薬の阻害様式は類似していたが，小腸型は異なっており，小腸型と他のALPはlevamisoleとL-homoargの阻害実験により区別できることを明らかにした．小腸型ALPはTNAPの不拮抗阻害薬であるlevamisoleによっては阻害されなかった．L-homoargによっては阻害されたが，濃度依存性は他のALPと大きく異なった．Hillプロット解析から，他のALPアイソザイムのL-homoargによる阻害のHill係数は１程度であるのに，小腸型ALPでは1.8でありL-homoargの結合に正の協同性が観察された．また，ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を添加してL-homoargによる阻害実験を行った．SDSの濃度が増加するとより低濃度のL-homoargで阻害が観察され，Hill係数も減少した．さらに，SDS存在下ではゲル電気泳動によりサブユニットの解離も観察されたことから，小腸型ALPの阻害様式にはダイマー構造が関連することが明らかになった．

更田ら[23]は，ヒト骨型，小腸型，肝臓型及び胎盤型ALPを使用して，PPiとPLPを基質としてlevamisoleによる阻害を調べたところ，50％阻害濃度は基質の種類は関係なくALPの種類によってほぼ一定であった．すなわち，阻害薬の阻害様式はALPアイソザイムの構造によって決定されることを示唆した．

飯岡ら[34]は，ヒト骨型，小腸型，肝臓型及び胎盤型ALPのlevamisole，tetramisole及びL-homoargによる阻害を*p*NPPを基質として測定したところ，骨型と肝臓型は類似した濃度依存性で阻害されたが，胎盤型の阻害はきわめて弱く，小腸型はその中間であった．これらの阻害薬による阻害の程度は，アイソザイムの型によって異なることと，胎盤型は構造的に安定していることが示唆された．

Kozlenkovら[35, 36]は，テオフィリンの構造を少しずつ変換して各種ALPの阻害効果をみると，ALPアイソザイムの種類あるいは動物種によって阻害効果が異なった．$Zn^{2+}$結合部位を含むアミノ酸配列のわずかの構造の相違でも阻害薬との相互作用が異なって阻害効果に影響が生じた．Kozlenkovらはこの結果をもとに，TNAPのより特異的な阻害剤を開発することによる異所性の石灰化部位における治療薬の開発を計画した．

## 7．ALPを活性化する２価金属イオンとALPの反応機構

ALPは亜鉛酵素ともよばれる．活性中心に$Zn^{2+}$を結合しており，$Zn^{2+}$を失うと失活するとされていた．一方で，高濃度の$Zn^{2+}$がALP活性を阻害することも知られており，ALP活性測定はマグネシウム（$Mg^{2+}$）を添加して行うことが多い[2]．

ALPタンパク質に結合する２価金属はＸ線結晶構造解析から明らかになった．現在，大腸菌のALP[37]，ヒト胎盤型ALP[38]及びラット小腸型ALP[39]の構造が明らかになっている．

大腸菌では１個のサブユニットあたり１個の$Mg^{2+}$と２個の$Zn^{2+}$の結合部位が見いだされた．これらの$Zn^{2+}$及び$Mg^{2+}$の結合部位を含む活性中心が基質のリン酸結合部位を形成する．この構造をもとに，ALP活性の反応機構の解析は飛躍的に進んだ．大腸菌ALPによるリン酸エステル化合物の加水分解は，活性中心へのリン酸エステル化合

物の結合から始まる．次いで，リン酸基の切断とリン酸の外れた糖やアルコールの遊離が起こり，リン酸が活性中心のセリン残基（Ser）に共有結合してP-Serを形成する．この状態がリン酸化反応中間体（EP）である．次いで，P-Serは加水分解されてALPは脱リン酸化される．その後，非共有結合していた無理リン酸がALPから遊離して反応は終了し，新たなサイクルに入ることが可能となる．これらの過程に２個の$Zn^{2+}$及び$Mg^{2+}$が関与する詳細なALPの反応機構モデルが提出された[2, 33, 40]．

ヒト胎盤型ALPの結晶はダイマー構造をとりモノマーあたり$Zn^{2+}$が２個（M1，M2あるいはZn1，Zn2よばれる）と，$Mg^{2+}$（M3）及び$Ca^{2+}$１個の結合部位（M4）が見いだされた[38]．アミノ酸配列の比較から，胎盤型ALPのイオン結合部位は他のヒトアイソザイムである小腸型，胚細胞型，及び骨型を含む臓器非特異型においても保持されていると推測された[41, 42]．大腸菌ALPの活性中心の構造はヒト胎盤型ALPにおいてもよく保存されており，大腸菌において提出された上記の$Zn^{2+}$と$Mg^{2+}$が関与する基質加水分解の反応機構は，ヒト胎盤型ALPにおいてもほぼ同様であると推測されたのみならず，$Mg^{2+}$の関わる過程がより明快になった．ヒト胎盤型ALPには大腸菌には存在しない非触媒部位の$Ca^{2+}$結合部位（M4）が見いだされた．この部位はヒトの他のアイソザイムとマウスのALPにも保存されていることから，ほ乳類のALPに共通すると推測されるが，活性中心からは外れていることからALPの立体構造の維持に必要であると推測された[2]．

ラット小腸型では$Zn^{2+}$が２個と，$Mg^{2+}$１個の結合部位が存在したが，$Ca^{2+}$の結合部位は見いだされなかった[39]．このモデルではALPタンパク質のクラウンドメインの役割について議論された．

結晶構造解析から見いだされた２個の$Zn^{2+}$と$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$の結合はALP活性においてはどのように機能するのかに興味を持ち，私たちは，ALP活性におけるこれら２価金属の作用を検討した．

川村ら[43]は腫瘍系の細胞を用いて，また，半谷[24]らはヒト骨型のALPを用いてALP活性の$Zn^{2+}$濃度依存性を測定したところ，いずれもごく低濃度の$Zn^{2+}$はALP活性を促進するが，$Zn^{2+}$濃度が増加すると逆に活性が低下することを見いだした．川村は，この$Zn^{2+}$による活性阻害は$Mg^{2+}$が存在すると回復することを見いだした．これらの結果はHungら[44]の報告によって説明可能となった．彼らは，M3への$Mg^{2+}$の結合は低親和性（Km＝3.22 mM）であるが，M3への$Zn^{2+}$の結合は高親和性（Km＝0.11 mM）であること，M3へ$Zn^{2+}$が結合してもALP反応における$Mg^{2+}$の機能を担うことはできないためALP活性は抑制されること，また，$Mg^{2+}$やリン酸の存在によりこの$Zn^{2+}$のM3部位への結合とALP活性の抑制を防ぐことができると報告した．

さらに半谷ら[24]はヒト骨型，肝臓型，小腸型及び胎盤型ALPはいずれも独立して$Zn^{2+}$，$Mg^{2+}$及び$Ca^{2+}$の濃度に依存して活性化されること，さらに$Mg^{2+}$と$Zn^{2+}$あるいは$Ca^{2+}$と$Zn^{2+}$が共存すると活性は相加的に増加するが，$Ca^{2+}$と$Mg^{2+}$の共存では活性は相加的にはならないことを見いだした．また，島田ら[45]は骨型ALP活性の*p*NPP及びPPi濃度依存性を$Zn^{2+}$，$Ca^{2+}$あるいは$Mg^{2+}$存在下で測定すると，いずれも基質濃度に依存した活性の増加がみられるが，２価金属イオンの種類によって活性化の濃度依存性が変化することを見いだした．これらの結果は，Hoylaertsら[46]の巧妙な実験結果から説明可能であった．彼らは，M4への$Ca^{2+}$の結合はALP活性の発現には関与しないが，$Ca^{2+}$はM3の$Mg^{2+}$結合部位に$Mg^{2+}$の代わりに結合してその機能を担うことから，$Zn^{2+}$と$Ca^{2+}$の組み合わせでもALP活性の発現が可能であることを示した．

## ８．なぜ至適pHがアルカリ性なのか

上記のALPのリン酸化反応中間体（EP）を経由した反応機構において，酸性pHではALP反応の律速段階はEPのセリンに結合したリン酸（P-Ser）の切断のステップであるが，アルカリ性pHでは切断後非共有結合で活性中心に存在する無機リン酸のALPからの遊離のステップとなる．ほ乳類のALPは大腸菌などのALPと比較して10から20倍活性が高いが，至適pHはよりアルカリ性にシフトする[2, 3]．ALP活性を高くするために律速段階を無機リン酸のALPからの遊離にすることが有利であるのなら，活性の至適pHがアルカリ性であることは理解できる．しかし，ヒト組織のpHは7.37程度とされる．生体内の多くの酵素の至適pHは7.4前後であり，最適な環境で最大活性を発揮するという点で理にかなう．ところが全身に存在するALPの至適pHは８から11などのかなりのアルカリ性であり，最大活性を発現するという点からは不利だと考えられる．これに対する説明としては，生体内のALP活性が発揮される微小環境ではアルカリ性pHが形成されるという説，*p*NPPのような人工的な基質を使用して*in vitro*で活性を測定するから異常な至適pHを示すとする説など，いくつかの指摘がある[1, 2]．

前者については，破骨細胞がプロトンポンプによって酸性微小環境を形成することを考えると，ALPに対してもアルカリ性の微小環境を提供する仕組みがあるのかもしれない．骨形成の場において私は以下のような可能性を考えている．

石灰化部位にPiを供給するシステムにはALP以外にも，Na/Pi輸送体，ホスホコリン（phosphocholine）やPEAの加水分解によってPiを生じるPHOSPHO1が想定されている．しかし，$Ca^{2+}$を供給する機構はアネキシン$Ca^{2+}$チャネルのみであった[2, 22]．そこで，$Ca^{2+}$輸送ATPaseが存在する可能性を考えて研究を開始した．その結果，E1細胞のミクロ

ソーム分画に，細胞の石灰化の時期に増加してくる至適pHがアルカリ性の$Ca^{2+}$-ATPaseを見いだした[47, 48]．この$Ca^{2+}$-ATPaseはカルモジュリン依存性であった[49]．Fukushimaら[50]は骨芽細胞の形質膜及び細胞内顆粒に局在する高アルカリ性で活性を示す$Ca^{2+}$-ATPaseの存在を電顕細胞学的に確認した．また，Nakanoら[51]は骨切片を用いた組織化学的な研究において，骨形成が行われている側にALPとは異なる中性からアルカリ性が至適pHの$Ca^{2+}$及び$Mg^{2+}$依存ATPase活性が存在すること，免疫組織染色の結果から形質膜に存在する$Ca^{2+}$-ATPaseであると報告した．形態学的な研究から見いだされたこれらの$Ca^{2+}$-ATPaseは私たちの$Ca^{2+}$-ATPaseと同一の可能性が高い[48]．もしこの$Ca^{2+}$-ATPaseが石灰化部位に$Ca^{2+}$を輸送する酵素であるのなら$Ca^{2+}$と対向的に輸送されるイオンは何であろうか．小胞体に存在する$Ca^{2+}$,$Mg^{2+}$-ATPaseの場合は$Ca^{2+}$と対向的に輸送されるイオンは$H^{+}$であると考えられている．もし，石灰化部位に存在する$Ca^{2+}$-ATPaseが石灰化部位に$Ca^{2+}$を供給し，逆方向に$H^{+}$を輸送するのなら，ALPが活性化されるアルカリ性pHの微小環境を形成する可能性があると考えられるが，今のところ証拠はない．

次に，至適pHが中性となるようなALPの基質は存在するのであろうか．ALP活性測定に生理的な基質を使用すると至適pHも中性にシフトする可能性があるという考えで，多くの研究がなされた[1, 2]．その中で，PPi[28]やPLP及びPEA[27]は生理的なpHでALPの基質となると報告されている．

私たちもさまざまなALPと基質を使用して，また，ALPを活性化する２価金属イオンの種類を変えて検討を行ってきた．その結果，ヒト骨型，小腸型，肝臓型及び胎盤型ALPの至適pHは，*p*NPPを基質とするとpH 9.8から10.6の間であり[34]，PPiを基質とするとpH 8.8から9.1，PLPを基質とするとpH 9.9から10.4の間であった[23]．PPiは骨型ALPの基質，PLPは小腸型ALPの基質とされるが，*in vitro*では各ALPアイソザイム間でのpH依存性には変化は観察されなかった．しかし，PPiを基質とすると，*p*NPP及びPLPと比較して至適phが中性にシフトするとは言えるかもしれない．

## ９．ALPのダイマー構造

ALPの基本的な構造はダイマー構造であり，サブユニット間の相互作用によりアロステリック効果が生じALP酵素活性や，阻害薬に対する反応が調節される[1, 2]．Hoylaertsら[52]は，ほ乳類のALPは両サブユニットの２価金属結合部位が完全に満たされている場合は，両サブユニットが独立して機能するアロステリック酵素であること，活性中心に近い部位のわずかなアミノ酸の置換でも，活性中心での$Zn^{2+}$に対する親和性に大きな変化を生ずると報告した．従って，異なった臓器のALPアイソザイムの活性はアイソザイムの性質と周辺の$Zn^{2+}$濃度によって影響を受ける．

ダイマー構造はALPアイソザイムの安定性にも関与する．ヒト胎盤型ALPは２個のS-S結合を持つホモダイマーであり，サブユニット間の結合が強固であることから，熱や阻害剤に対する安定性も高い[1, 2, 33]．ダイマー構造による阻害剤に対する応答性は界面活性剤が存在して構造が影響を受けることによって変化した[33]．

正常組織でのALPの各アイソザイムは同じタイプのALPモノマーでダイマーを形成するホモダイマーである．ところが，腫瘍細胞のALPには異なったタイプのサブユニットで構成されるヘテロダイマーの存在が報告されており，機能との関連が注目される[2]．

## 10．ALPとビスホスホネート

ビスホスホネート（BP）の骨吸収抑制作用は破骨細胞の抑制という点から広く研究されている．一方，BPはALP活性を抑制すること，その機構はALP活性の発現に必要な２価金属イオンをキレートすることによる拮抗作用であるとする説が受け入れられている[2]．実際に，$Zn^{2+}$や$Mg^{2+}$をキレートするEDTAはALP活性を抑制する[24, 43]．Alendronate，pamidronate，zoledronateなどの窒素含有型bisphosphonateは$Zn^{2+}$及び$Mg^{2+}$をキレートすることによってTNAPを拮抗阻害すると報告されている[28]．

飯岡らは，ヒト骨型，小腸型，肝臓型及び胎盤型ALPのetidronateによる阻害を*p*NPPを基質として調べたところ，胎盤型はほとんど阻害されず，骨型，小腸型の順に阻害が強く，肝臓型は最も低濃度で阻害された．各アイソザイムの$Zn^{2+}$あるいは$Mg^{2+}$のetidronateによるキレートのされやすさを反映すると示唆された[34]．また，島田らは$Mg^{2+}$，$Zn^{2+}$及び$Ca^{2+}$で活性化したヒト骨型ALPのetidironateによる阻害を解析した[45]．*p*NPPを基質とするとetidronateは$Mg^{2+}$と拮抗したが$Ca^{2+}$及び$Zn^{2+}$とは顕著な拮抗阻害は示さなかった．一方，PPiを基質とすると，$Mg^{2+}$，$Zn^{2+}$及び$Ca^{2+}$との拮抗傾向を示したが，*p*NPPを基質とした際の$Mg^{2+}$との拮抗ほど顕著な拮抗ではなかった．Etidronateの２価金属との拮抗による骨型ALPの阻害は基質によっても影響されることを示唆する．

ALPに対する直接作用ではないが，RisedronateがMC3T3-E1細胞のALP活性を増大して石灰化を促進したとする報告がある[53]．

## 11．ALP活性測定法

ALP活性測定に最も使用されている基質は*p*NPPである．生体内に存在しないということが問題であるが，*p*NPPはアルカリ性pHで加水分解されると生じた*p*NPが黄色の発色を示し，分光光度計を使用した420 nm程度の吸収波長で吸光度を測定することによって，容易に定量できる[17-19]．

アルカリ性で酵素反応の後，水酸化ナトリウムなどの強アルカリで反応を停止するとそのまま定量できるので簡便である．簡便であるため広く基質として使用されているが，当然のことながら，*p*NPPを基質とした際に適用できる活性測定法である．また，培養細胞に対して培養液に直接アルカリ性のもとで*p*NPPを添加してALP活性を測定することも可能であるが，細胞が多層化している場合は表層か培養液に遊離したALP活性しか測定できないと考えられ，結果の取り扱いに注意が必要となる．

ALPの生理的な基質の候補として各種基質を用いて活性を測定する場合には，加水分解の結果生じたPiを定量することになる．リンの定量には多くの方法があるが，私たちの使用しているChifflet法[54] はナノモルのレベルでPi量を検出することができ，方法も比較的簡単で感度も高く便利である．最近は酵素活性の測定に種々キットを使用することも多く，活性の有無を知りたいということであれば便利である．しかし，キットでは多様な基質を使用することはできず，測定条件を少しずつ変更して酵素反応を解析することはできない．酵素の能力を十分引き出して評価するためには，条件を変えた解析が必須である．

## 謝　　辞

一緒に研究を行った多くの大学院生に感謝します．また，私がALPに関わるきっかけを与えていただいた松本章先生，薬理学教室で研究を行ってきた出山義昭，吉村善隆，南川　元の各先生に感謝します．

## 参 考 文 献

1) McComb RB, Bowers Jr GN, Posen S : Alkaline Phosphatase. Plenum Press New York and London : 1-986, 1979.
2) Millan JL : Mammalian Alkaline Phosphatases. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim : 1-322, 2006.
3) Millan JL, Whyte MP : Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia, Calcif Tissue Int, 98 : 398-416, 2016.
4) Sharma U, Pal D, Prasad R : Alkaline Phosphatase : An Overview. Ind J Clin Biochem 29 : 269-278, 2014.
5) Štefková K, Procházková J, Pacherník J : Alkaline Phosphatase in Stem Cells, Stem Cells International, Volume 2015, Article ID 628368 : 11 pages, 2015.
6) Estève D, Galitzky J, Bouloumié A, Fonta C, Buchet R, Magne D : Multiple Functions of MSCA-1/TNAP in Adult Mesenchymal Progenitor/Stromal Cells, Stem Cells International, Volume 2016, Article ID 1815982 : 8 pages, 2016.
7) Sardiwal S, Magnusson P, Goldsmith DJA, Lamb EJ : Bone Alkaline Phosphatase in CKD–Mineral Bone Disorder. Am J Kidney Dis. 62 : 810-822, 2013.
8) Lalles JP : Intestinal alkaline phosphatase : novel functions and protective effects. Nutrition Reviews 72 : 82-94, 2013.
9) Estaki M, DeCoffe D, Gibson DL : Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World J Gastroenterol 20 : 15650-15656, 2014.
10) Ghosh SS, Gehr TWB, Ghosh S : Curcumin and Chronic Kidney Disease (CKD) : Major Mode of Action through Stimulating Endogenous Intestinal Alkaline Phosphatase. Molecules 19 : 20139-20156, 2014.
11) Fawley J, Gourlay DM : Intestinal alkaline phosphatase : a summary of its role in clinical disease, J Surg Res 202 : 225-234, 2016.
12) Poupon R : Liver Alkaline Phosphatase : A Missing Link Between Choleresis and Biliary Inflammation, Hepatology 61 : 2080-2090, 2015.
13) Peters E, Elsas A, Heemskerk S, Jonk L, Hoeven J, Arend J, Masereeuw R, Pickkers P : Alkaline Phosphatase as a Treatment of Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. J Pharmacol Exp Ther 344 : 2-7, 2013.
14) Peters E, Heemskerk S, Masereeuw R, Pickkers P : Alkaline Phosphatase : A Possible Treatment for Sepsis-Associated Acute Kidney Injury in Critically Ill Patients. Am J Kidney Dis 63 : 1038-1048, 2014.
15) Pike AF, Kramer NI, Blaauboer BJ, Seinen W, Brands R : An alkaline phosphatase transport mechanism in the pathogenesis of Alzheimer's disease and neurodegeneration. Chemico-Biol Interact 226 : 30-39, 2015.
16) Sebastián-Serrano A, Diego-García L, Martínez-Frailes C, Ávila J, Zimmermann H, Millán JL, Miras-Portugal MT, Díaz-Hernández M : Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Regulates Purinergic Transmission in the Central Nervous System During Development and Disease. Comput Struct Biotech J 13 : 95-100, 2015.
17) 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.
18) 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.

19) 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.
20) Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J : Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. Jpn J Pharmacol 88 : 262-269, 2002.
21) Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Deyama Y, Hatta M, Iida J : Effects of phospholipase C on alkaline phophatase and mineralization. Oral Ther Pharmacol 21 : 68-74, 2002.
22) Orimo H : The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch 77 : 4-12, 2010.
23) 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：受理，2014.
24) 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.
25) 大西玄一，出山義昭，鈴木邦明，大畑　昇：骨芽細胞様細胞に対するインターロイキン1βの作用．北海道歯誌，24 : 15-23, 2003.
26) Say JC, Ciuffi K, Furriel RPM, Ciancaglini P, Leone FA : Alkaline phosphatase from rat osseous plates : purification and biochemical characterization of a soluble form. Biohimica et Biophysica Acla 1074 : 256-262, 1991.
27) Fedde KN, Lane CC, Whyte MP : Alkaline Phosphatase Is an Ectoenzyme That Acts on Micromolar Concentrations of Natural Substrates at Physiologic pH in Human Osteosarcoma (SAOS-2) Cells. Arch Biochem Biophys 264 : 400-409, 1988.
28) 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.
29) 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 : 71-78, 2000.
30) 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.
31) Hoylaerts MS, Manes T, Millan JL : Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. Biochem J 286 : 23-30, 1992.
32) Fishman WH, Sie HG : Organ-specific inhibition of human alkaline phosphatase isoenzymes of liver, bone, intestine and placenta ; L-phenylalanine, L-tryptophan and L-homoargine. Enzymologia 41 : 141-167, 1971.
33) Suzuki K, Yoshimura Y, Hisada Y, Matsumoto A : Sensitivity of intestinal alkaline phosphatase to L - homoarginine and its regulation by subunit - subunit interaction. Jpn J Pharmacol 64 : 97-102, 1994.
34) 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.
35) Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Milla'n JL : Function Assignment to Conserved Residues in Mammalian Alkaline Phosphatases. J Biol Chem 277 : 22992-22999, 2002.
36) Kozlenkov A, Le Du MH, Cuniasse P, Ny T, Hoylaerts MF, Milla'n JL : Residues Determining the Binding Specificity of Uncompetitive Inhibitors to Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. J Bone Miner Res 19 : 1862-1872, 2004.
37) Kim EE, Wyckoff HW : Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two metal ion catalysis. J Mol Biol 218 : 449-464, 1991.
38) Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Menez A, Stura EA : Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å resolution. Implication for a substrate specificity. J Biol Chem 276 : 9158-9165, 2001.
39) Ghosh K, Tagore DM, Anumula R, Lakshmaiah B, Kumar PPBS, Singaram S, Matan T, Kallipatti S, Selvam S, Krishnamurthy P, Ramarao M : Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase – Role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases. J Struct Biol 184 : 182-192, 2013.
40) Stec B, Holtz KM, Kantrowitz ER : A Revised Mechanism for the Alkaline Phosphatase Reaction Involving Three Metal Ions. J Mol Biol 299 : 1303-1311, 2000.
41) Le Du MH, Millan JL : Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. J Biol Chem 277 : 49808-49814, 2002.

42）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.
43）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.
44）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
45）島田英知，鈴木邦明，吉村善隆，南川　元，山崎　裕：Mg,Ca及びZnで活性化されるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対するエチドロネートの作用．J Oral Biosci, Suppl : 401, 2016.
46）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.
47）森　幸徳，鈴木邦明，小畑　真，出山義昭：骨芽細胞様細胞のカルシウム依存ATPase活性．北海道歯誌，2 : 213-220, 2003.
48）小畑　真，出山義昭，吉村善隆，福島和昭，鈴木邦明：骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）のカルシウム依存ATPaseの部分精製．北海道歯誌，27 : 104-111, 2006.
49）井坂一真，鈴木邦明，吉村善隆，南川　元：骨芽細胞様細胞のカルモジュリン依存性Ca-ATPase活性の性質．第89回日本生化学会大会プログラム・抄録集：印刷中, 2016.
50）Fukushima O, Goshi N, Koda M, Tokudome M : Localization of Ca-ATPase activity at high alkaline pH in bone cell. J Bone Miner Metabo 3 : 88-92, 1985.
51）Nakano Y, Beertsen W, Van DenBos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y : Site-specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane : tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase. Bone 35 : 1077-1085, 2004.
52）Hoylaerts MS, Manes T, Millan JL : Mammalian Alkaline Phosphatases Are Allosteric Enzymes. J Biol Chem 272 : 22781-22787, 1997.
53）Malavasia M, Louroa R, Barrosa MB, Teixeirab LN, Peruzzob DC, Jolya JC, Martinezb EF, Napimoga MH : Effects of risedronate on osteoblastic cell cultures. Arch Oral Biol 68 : 43-47, 2016.
54）Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R and 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.