HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エチドロネートによるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性阻害に対する２価金属と基質の影響［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	島田, 英知
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12600号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65585
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hidetomo_Shimada_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　島　田　英　知

学　位　論　文　題　名
エチドロネートによるヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性阻害に対する２価金属と基質の影響

ピロリン酸（PPi）はアルカリ性ホスファターゼ（ALP）の基質であり，骨形成の生理的な抑制物質として作用する．ビスホスホネート（BPs）は，PPi のリン酸エステル結合の酸素原子が炭素に置き換わった基本構造を持つ． BPs による ALP 活性の抑制は，BPs のキレート作用により ALP 活性発現に必要な遊離 Mg^{2+} (Mg)が減少することによるとする説があるが, 報告が少なく詳細は明らかではない. ALP 活性に対する BPs の作用を検討する際に，活性発現に使用する２価金属の影響も考慮する必要があると考えられるが, 報告は全く見られない. そこで, ALP はヒト骨型 ALP, 基質として PPi あるいは *p*NPP, ２価金属として Mg，Ca^{2+} (Ca)あるいは Zn^{2+} (Zn)を使用して ALP 活性を測定し，窒素を含まない BPs であるエチドロネート（etidronate）の作用を検討した．

Mg，Ca または Zn 存在下で測定される ALP 活性をそれぞれ Mg-ALP，Ca-ALP，Zn-ALP とする．反応液中に，CALZYME より購入したヒト骨型 ALP，種々濃度の $MgCl_2$（Mg-ALP），$CaCl_2$（Ca-ALP）あるいは $ZnSO_4$（Zn-ALP），sucrose，炭酸緩衝溶液（基質が *p*NPP の場合）あるいはトリス塩酸緩衝液（基質が PPi の場合）を添加した．反応は *p*NPP あるいは Na-PPi を添加して開始し，37℃で 60 分間反応させた後に EDTA-tris を加えて停止した．分解産物である無機リンは Chifflet 法で発色させ，吸光度を分光光度計を用いて 850 nm で定量し活性を測定した．バックグラウンド値は各測定値から差し引いた．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．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算出した．

ALP 活性における etidronate と２価金属イオンとの拮抗の有無を検討するために，種々濃度の遊離 Mg，Ca 及び Zn 存在下で *p*NPP を基質として ALP 活性の etidronate 濃度依存性を測定したところ，Mg-ALP 活性は etidronate 濃度に依存して低下し， etidronate による 50%活性抑制濃度（IC50）は存在する Mg 濃度が高いほど増加した．同様に Ca-ALP 活性，Zn-ALP 活性も etidronate 濃度に依存して低下したが Ca，Zn 濃度の増加による IC50 値の顕著な増加傾向は認められなかった．

Na-PPi を使用し，種々濃度の遊離 Mg，Ca 及び Zn 存在下で Mg-ALP，Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性の etidronate 濃度依存性を測定した．いずれの ALP 活性でも，Mg，Ca 及び Zn 濃度の増加に伴って IC50 値は増加の傾向を示した．

EDTA 及び EGTA による Mg-ALP 活性の抑制においても, Mg 濃度が増加するとより高濃度の EDTA 及び EGTA を必要とするので，etidronate による Mg-ALP 活性の阻害も，阻害の機構はキレート作用による拮抗と推測される．*p*NPP を基質とした際，etidronate が Mg と顕著な拮抗を示したのは，*p*NPP の活性中心への結合により M3 の Mg 結合部位が etidronate の接近しやすい開いた状態にあることを示唆する．一方，Zn や Ca の結合部位は閉じた状態にあるため，容易には etidronate によるキレートを受けないと推測される．PPi の場合は，Mg,Ca,Zn すべてが etidronate によるキレート作用を受ける ALP

の構造を引き起こすと推測される．これらの結果は，ALP に結合する Mg,Ca,Zn に対する etidronate のキレート作用は，結合する基質の大きさや構造によって影響を受けることを示唆する．

次に ALP 活性における etidronate と *p*NPP との拮抗の有無を検討するために，Mg，Ca あるいは Zn 存在下の ALP 活性の *p*NPP 濃度依存性に対する etidronate の影響を調べた．遊離 Mg，Ca，または Zn 存在下の ALP 活性は，*p*NPP 濃度に依存して増加した．最大活性は共存する etidronate 濃度に依存して減少したが，*p*NPP 濃度に依存した 50%活性化濃度($K_{0.5}$)は etidronate 濃度が増加しても顕著には変化しなかった．従って etidronate による ALP 活性阻害は活性中心における *p*NPP との競合的拮抗ではないと考えられる．*p*NPP が基質の際 etidronate は Mg と拮抗したので，Mg-ALP の場合は添加した Mg との拮抗阻害が示唆される．

また、ALP 活性における etidronate と PPi との拮抗の有無を検討するために，Mg-ALP，Ca-ALP 及び Zn-ALP 活性の PPi 濃度依存性に対する種々濃度の etidronate の共存による影響を検討した. Mg-ALP 活性は etidronate の有無にかかわらず PPi 濃度に依存して増加したが，etidronate 濃度の増加とともに最大活性及び $K_{0.5}$ 値は低下した．また，etidronate 非存在下での Mg-ALP 活性は PPi 濃度に依存してシグモイダルなカーブで増加したが，etidronate が存在するとシグモイダル性は低下し PPi に対する親和性が増加した．これらの結果において，活性の低下は etidronate と Mg との拮抗で説明可能である．また，PPi に対する親和性の増大に関しては，etidronate と PPi との活性中心における位置的相互作用の結果と推測される．

Ca-ALP 活性または Zn-ALP 活性も etidronate の有無にかかわらず PPi 濃度に依存して増加したが，etidronate 濃度が増加すると最大活性は低下した．Mg-ALP と違い，etidronate 非存在下でも PPi 濃度に依存した活性の増加曲線はシグモイダル性を示さなかった．また，etidronate 濃度が増加しても $K_{0.5}$ は顕著には変化しなかった. PPi を基質とした Ca 及び Zn-ALP 活性において, etidronate は Ca 及び Zn と拮抗したので，この拮抗が etidronae による ALP 活性低下をもたらす可能性がある．

以上により，etidronate は *p*NPP あるいは PPi を基質としたヒト骨型 Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性を濃度に依存して阻害するが，阻害の機構は活性化する金属イオンと基質の種類によって異なることが示唆された．