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_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　島田　英知

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

学位論文題名

The effects of divalent cations and substrates on the inhibition of human bone-type alkaline phosphatase activity by etidronate.

（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）

審査は，審査担当者全員の出席の下，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，その後，その内容ならびに関連した学問分野について審査担当者が口頭にて試問を行った。学位申請者より説明された提出論文の概要は以下の通りである。

ビスホスホネート（BPs）はアルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性の発現に必要な遊離 Mg^{2+} (Mg) をキレートしてALP活性を阻害するとされているが，不明な点も多い。また，最近，ALP活性はMg, Ca^{2+} (Ca)及び Zn^{2+} (Zn)により独立して活性化され（Mg, Ca 及び Zn-ALP とする），活性化には基質の種類も影響することが報告されたが，それらに対するBPsの作用は明らかではない。そこでヒト骨型 ALP の Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性のエチドロネート（etidronate）による阻害機構を，基質としてパラニトロフェニルリン酸（*p*NPP)またはピロリン酸（PPi)を使用して検討した。

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 Mg 濃度が高いほど増加したが，Ca 及び Zn では顕著な変化を認めなかった。よって，etidronate は Mg とは拮抗するが，Ca 及び Zn と拮抗しないことが示唆された。

一方，基質を PPi に変えると，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ことから，Mg, Ca, Zn との拮抗が示唆された。

Mg, Ca 及び Zn-ALP 活性の *p*NPP 濃度依存性に対する etidronate の影響を調べると，etidronate の濃度に依存して各活性は抑制されたが，*p*NPP の 50%活性化濃度（$K_{0.5}$）に対する顕著な影響はないことから，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。

一方，基質が PPi の場合， 各活性は etidronate 濃度に依存して抑制され，Ca 及び Zn-ALP 活性では etidronate は PPi とは非拮抗的であった。Mg-ALP でのみ $K_{0.5}$ 値は低下し， etidronate 非存在下で 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。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。

以上により，etidronate による骨型 ALP の阻害様式は基質及び活性化する 2 価金属の種類によって異なることが示唆された。

審査担当者から上記内容および関連事項について，以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

(1) ヒト骨型 Mg-ALP 活性の Na-PPi 濃度依存性に対する etidronate の影響では，etidronate の有無で基質に対する親和性が変わった理由について
(2) Etidronate による ALP 活性阻害の様式について
(3) ALP を活性化する遊離2価金属イオンの濃度規定方法について
(4) 基質や活性化させる2価金属イオンの違いで，最大活性はどう変化したか
(5) 酵素活性発現時，ALP 構造のどの部位に etidronate が存在していると考えられるか
(6) 骨型 ALP の構造での crown domain，GPI の場所と働きについて

本研究の結果は，学術的にも高く評価されると考えられた。加えて，上記の質疑応答から，申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより，関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された。

以上のことから，審査担当者全員は，学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認めた。