



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; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(1), 48-55
Issue Date	2017-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67307
Type	journal article
File Information	38_01_05_Fukeda.pdf



原 著

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

更田恵理子¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 山崎 裕¹⁾

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活性を調べることで、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

¹⁾ 〒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院 口腔健康科学分野 高齢者歯科学教室（主任：山崎 裕 教授）

²⁾ 〒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院 口腔病態科学分野 細胞分子薬理学教室（主任：鈴木邦明 教授）

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に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、非競合的ALP阻害剤であるlevamisole⁸⁾と競合的阻害剤である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℃、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 (図1 a)、及びPLP (図1 b) を基質とし、各

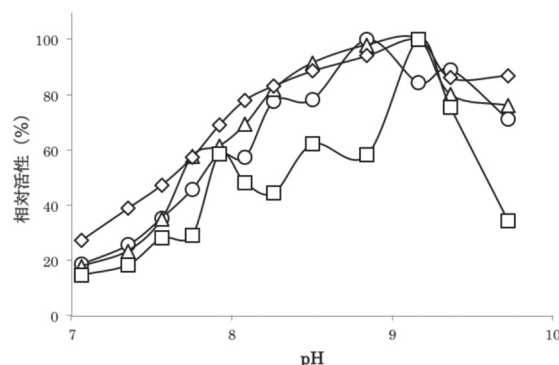


図1 a Na-PPIにおける各ALP活性のpH依存性

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 MgCl₂ および50 mMトリス塩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℃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。

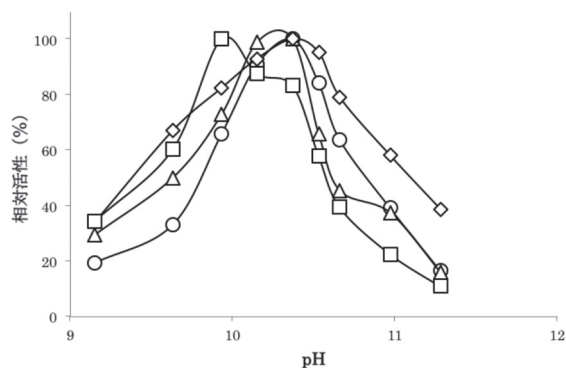


図1b PLPにおける各ALP活性のpH依存性

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 μl 中に行い、triplicateで測定した。基質として、5 mM PLP 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。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。

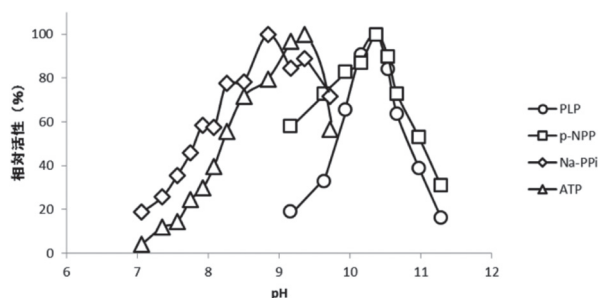


図1c 骨型ALPにおける各基質の至適pH

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。図1aおよび図1bと同様の方法でALP活性測定を行なった。□が基質pNPP、○がPLP、△がATP、◇がNa-Piを示す。基質p-NPPの場合と比較し、ATPおよびNa-Piが基質の場合は、至適pHが酸性側にシフトした。

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。

Na-Pi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-Pi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を比較した結果を図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-Piの場合は、至適pHが酸性側にシフトした。

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の実験を行なった。

骨型ALPの生体内基質とされているNa-Pi、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 (図2a, 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。Na-Piを基質とした際、各ALP活性はNa-Piの濃度

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-Pi	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

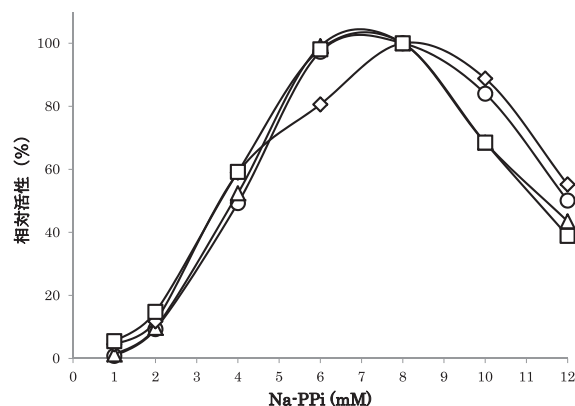


図2a Na-Piにおける各ALP活性の基質濃度依存性

各ALPの基質濃度依存性は、各濃度に調製したNa-Pi、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 μl 中にて図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。Na-Piを基質とした際、各ALP活性はNa-Piの濃度に依存して増加した。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。

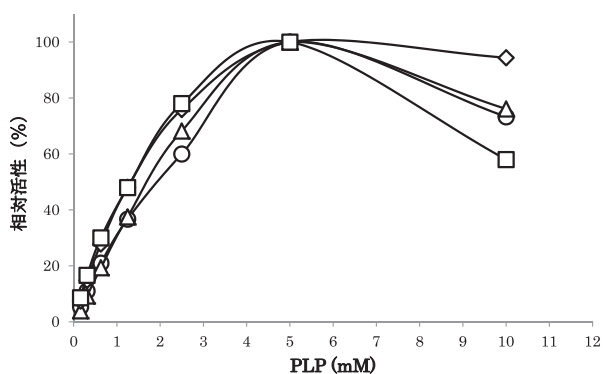


図2b PLPにおける各ALP活性の基質濃度依存性

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 μl 中にて図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。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。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。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。

に依存して増加した (図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 (図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 (図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 (図3a-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。

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 (図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 μM 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 μM と高かった (図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

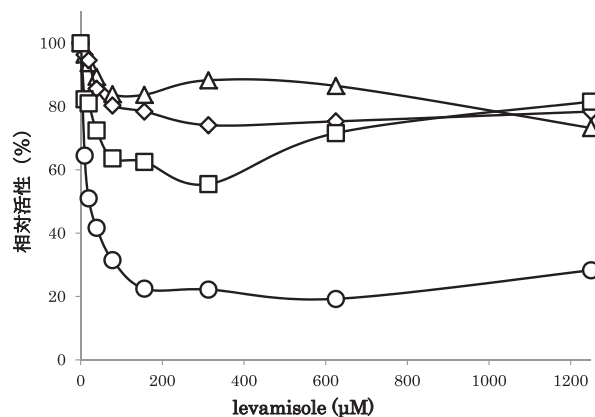


図3a Na-PPiにおける各ALP活性阻害のlevamisole濃度依存性

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じ濃度の各種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 μl 中にて図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。基質Na-PPiのlevamisoleによる阻害効果は、骨型ALPにおいて、比較的強い阻害効果がみられたが、その他のタイプのALPでは低い効果しかみられなかった。

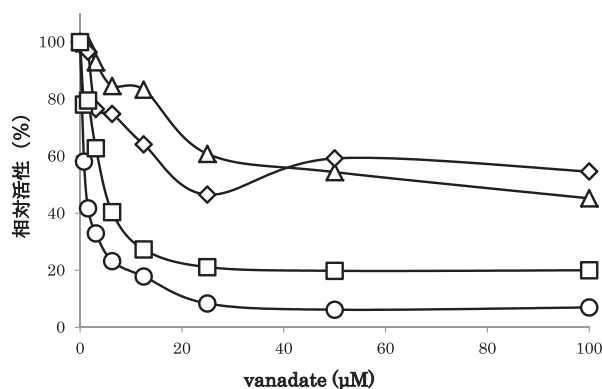


図3b Na-PPiにおける各ALP活性阻害のvanadate濃度依存性

図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。基質Na-PPiのvanadateによる阻害効果は、骨型、肝臓型ALPでは比較的強く、小腸型と胎盤型ALPにおいては低かった。

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 (%)

ALP \ 阻害剤	levamisole		vanadate	
	$K_{i0.5}$ (μM)	最大阻害 (%)	$K_{i0.5}$ (μM)	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

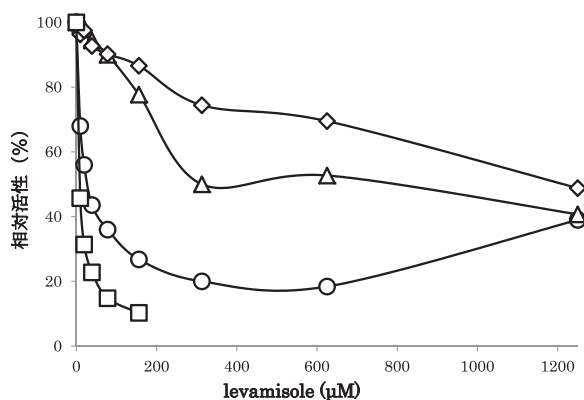


図3c PLPにおける各ALP活性阻害のlevamisole濃度依存性
各ALPのlevamisole濃度依存性測定は、5 mMに調製したPLP、および基質濃度依存性測定と同じ濃度の各種ALP、sucrose (-EDTA), 5 mM MgCl₂, 炭酸緩衝液 (pHは骨型10.37, 肝臓型9.93, 胎盤型10.37, 小腸型10.37) を含んだ反応溶液300 μl中にて図2と同様の活性測定法で行った。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。基質をPLPとした際のlevamisoleによる阻害効果は、骨型と肝臓型ALPにおいては強く、小腸型及び胎盤型ALPにおいては低かった。

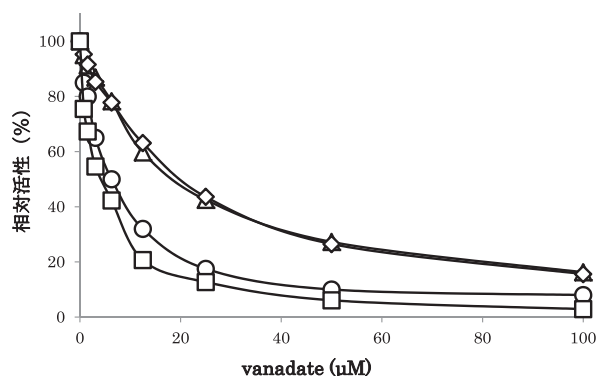


図3d PLPにおける各ALP活性阻害のvanadate濃度依存性
図3cと同様の方法でvanadateの阻害作用を調べた。骨型を○, 肝臓型を□, 胎盤型を◇, 小腸型を△で示す。基質PLPのvanadateによる阻害効果は、骨型及び肝臓型ALPにおいて、高い阻害効果を示した。また、胎盤型と小腸型ALPも比較的高い阻害効果を確認した。

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 (%)

ALP \ 阻害剤	levamisole		vanadate	
	$K_{i0.5}$ (μM)	最大阻害 (%)	$K_{i0.5}$ (μM)	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

最大阻害が80%以上となり、 $K_{i0.5}$ も5.3から18.8 μMであった (図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 (図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 μM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 μMであった (図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。飯岡¹⁰⁾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、ALP阻害剤の有

無で細胞を培養した際にリン酸化レベルの異なるタンパク質を検索して同定を試みるなどの新たな視点での検討も行い必要がある。

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3 mM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1.2 mMから1.6 mM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、飯

岡らは、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。

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。

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.

ORIGINAL

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

Eriko Fukeda¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾
and Yutaka Yamazaki¹⁾

ABSTRACT : 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 agent. In this study, we examined the differences in substrate selectivity and inhibitor sensitivity among several types of human ALP. We used 4 types of human ALP from bone, intestine, placenta, and liver. Also used were *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP), sodium pyrophosphate (Na-PPi), adenosine triphosphate (ATP) or pyridoxal phosphate (PLP) for substrate. The amount of inorganic phosphate as a result of hydrolysis by ALP was measured by Chifflet methods under different pH or substrate concentration. To examine the inhibitory effect on activity, levamisole or vanadate were used. The substrate concentration exhibiting 50% activity and the concentration exhibiting 50% inhibition were proposed as $K_{0.5}$ and $K_{i0.5}$ respectively. When Na-PPi, the substrate of bone ALP, was used, the optical pH and $K_{0.5}$ did not show differences among each of the ALP types (optical pH : 8.8 ~ 9.1, $K_{0.5}$: 3 ~ 5 mM). In the case of PLP, the substrate of intestine ALP, the optical pH and $K_{0.5}$ did not show differences among each of the ALP types (optical pH : 9.9 ~ 10.4, $K_{0.5}$: 1.1 ~ 1.6 mM), although the optical pH shifted to the alkaline side. Additionally, the optical pH and $K_{0.5}$ on *p*-NPP, which is not in the human body, but many researchers use it, did not show differences among any of the ALP types. However, in the case of PLP, $K_{i0.5}$ of levamisole was different among each of the ALP types, although $K_{i0.5}$ of levamisole or vanadate did not show any differences among the 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

¹⁾Geriatric Dentistry, Department of Oral Health Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Yutaka Yamazaki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan