

学位論文題名

Tyrosine phosphatase-like activity of bone-type alkaline phosphatase at neutral pH range

(骨型アルカリ性ホスファターゼの中性 pH 領域における
チロシンホスファターゼ様活性)

学位論文内容の要旨

【目的】アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は生体内に広く存在し、特に骨型 ALP は骨芽細胞の分化や硬組織形成能の指標あるいは骨の動態を反映するマーカー酵素として多くの研究に用いられている。ALP は硬組織の石灰化過程において重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能は明らかではなく、生理的基質や至適 pH の同定もされていない。ALP 活性を測定する際、*p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) 等の人工基質を用いると、生理的状态からはるかに離れたアルカリ側が至適 pH となる。生体内で働く本来の基質を用いた際に、ALP はアルカリ側の pH で効率よく作用することができるのかどうか問題となる。

そこで骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の精製 ALP を用いて ALP がプロテインホスファターゼとして働く可能性を検討した。本研究は骨芽細胞の ALP が中性付近の pH でチロシンホスファターゼ様の活性を持つか否かを調べた最初のものである。

【材料と方法】骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を通法に従って石灰化前期まで培養した。培養細胞を回収後、超音波破碎し butanol 抽出した。各カラムクロマトグラフィーは FPLC システムを用いた。濾過後の酵素を用いて陰イオン交換 (POROS 50D)、Con A アフィニティー (HiTrap Con A)、さらにゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 HR 10/30) を行い、ALP を精製した。ゲル濾過スタンダードタンパクを同様にカラムに通し、その分子量を推測した。同様に SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、その精製度と分子量を推測した。

ALP 活性は *p*NPP 加水分解活性 (*p*NPPase) とし、Bessey らの変法を用いて測定した。プロテインホスファターゼ活性はチロシンリン酸化したミエリン塩基性タンパク質 (Tyr-P-MBP)、セリン・スレオニンリン酸化したミエリン塩基性タンパク質

(Ser/Thr-P-MBP)、チロシンリン酸化した RCM-lysozyme (Tyr-P-RCM-lysozyme)、セリン・スレオニンリン酸化した Histone (Ser/Thr-P-Histone) を基質として、ラジオアイソトープラベルしたリンの脱リン量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。各クロマトグラフィーにより得られた分画の脱リン酸化活性を測定し、*p*NPP の

加水分解活性と比較検討した。さらにゲル濾過後の酵素を用い、各活性の pH 依存性と阻害剤に対する感受性を調べた。また、他の生理的基質検索のため、ALP による種々のリン酸化合物の加水分解活性とその pH 依存性についても検討を行った。

【結果と考察】3種類のカラムを用いた精製により、最終精製酵素はおよそ 900 倍以上精製された。また SDS-PAGE 後の銀染色において単一のバンドとして認められた。その酵素の推定分子量はゲル濾過の結果から 78,000、SDS-PAGE より 76,000 であり、従来報告されている骨型 ALP のモノマーの分子量と一致した。さらに、ゲル濾過までの精製過程で *p*NPPase と Tyr-P-MBP 脱リン酸化活性は同一の挙動を示したが、大部分の Ser/Thr-P-MBP 脱リン酸化活性は陰イオン交換カラムクロマトグラフィー後に *p*NPPase 活性から分離され、ゲル濾過クロマトグラフィー後にはほとんど検出されなかった。また Tyr-P-RCM-lysozyme、Ser/Thr-P-Histone は脱リン酸化活性が広い範囲の pH に渡って検出されず、ALP の示すプロテインホスファターゼ様活性には基質特異性が観察された。

*p*NPPase と Tyr-P-MBP 脱リン酸化の至適 pH はそれぞれ 9.4-10.4 と 8.3-8.8 であった。*p*NPPase は中性 pH ではほとんど活性を示さないが、Tyr-P-MBP 脱リン酸化の至適 pH はアルカリ側に存在するものの、中性付近の pH7.0-7.6 でも最大活性の約 62%の活性が保たれていた。

*p*NPPase と Tyr-P-MBP の脱リン酸化活性に対するいくつかの阻害剤の効果を調べた結果、両活性とも ALP の特異的阻害剤である levamisole により阻害されたが、プロテインホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸と dephostatin によっては阻害されなかった。また vanadate や L-homoarginine においても *p*NPPase と Tyr-P-MBP の脱リン酸化活性は阻害された。これにより、*p*NPPase と Tyr-P-MBP の脱リン酸化活性はいずれも ALP により行われる反応であることが強く示唆された。

他の様々なリン酸化合物の加水分解活性の至適 pH を調べたところいずれもアルカリ側にあった。至適 pH における活性と pH7 での活性の比率は *p*NPP で 32.2、Tyr-P-MBP で 1.6 であり、測定したリン酸化合物の中では Tyr-P-MBP の値が最小であった。

【結論】ALP の生理的機能を理解するため、生理的基質とその至適 pH を知ることは非常に重要である。本研究では、MC3T3-E1 細胞の ALP を精製し、基質特異性を調べ、様々な基質を用いて至適 pH を検索した。推測した分子量とアルカリ側での高い *p*NPPase と阻害剤の実験により、最終精製酵素は ALP の典型的な特徴を示した。

著者は ALP の生理的な基質を用いた場合、活性の至適 pH は中性付近にシフトすると推測して研究を行った結果、Tyr-P-MBP を基質とした際、中性 pH でも活性が保たれる事が明らかとなった。他のいくつかのリン酸化合物について ALP の生理的基質となる可能性を調べたが、いずれも中性 pH では ALP の良い基質にはならなかった。

以上より、ALP が中性 pH においてチロシンホスファターゼ様活性を保持することを示した。またこの活性が硬組織石灰化における ALP の機能に関連している可能性のあることが考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Tyrosine phosphatase-like activity of bone-type alkaline phosphatase at neutral pH range

(骨型アルカリ性ホスファターゼの中性 pH 領域における
チロシンホスファターゼ様活性)

審査はいずれの担当者も口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。

矯正臨床における歯の移動のメカニズムを理解する上で、骨形成機構の研究は重要である。なかでも骨型アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は骨芽細胞の分化や硬組織形成能の指標として多くの研究に用いられている。ALP は硬組織の石灰化過程において重要な役割を果たしていると考えられるが、その機能は明らかではなく、生理的基質や至適 pH の同定もされていない。そこで骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の精製 ALP を用いて ALP がプロテインホスファターゼとして働く可能性を検討する事を目的として以下の実験を行った。

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を通法に従って石灰化前期まで培養し回収後、超音波破碎と butanol 抽出を行った。さらに陰イオン交換、Con A アフィニティー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、ALP を精製した。ゲル濾過スタンダードタンパクを同様にカラムに通し、その分子量を推測した。同様に SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、その精製度と分子量を推測した。ALP 活性は *p*NPP 加水分解活性 (*p*NPPase) とし、Bessey らの変法を用いて測定した。プロテインホスファターゼ活性はチロシンリン酸化したミエリン塩基性タンパク質 (Tyr-P-MBP)、セリン・スレオニンリン酸化したミエリン塩基性タンパク質 (Ser/Thr-P-MBP) を基質として、ラジオアイソトープラベルしたリンの脱リン量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。各分画の脱リン酸化活性を測定し、*p*NPPase と比較検討した。さらにゲル濾過後の酵素を用い、各活性の pH 依存性と阻害剤に対する感受性を調べた。また、他の生理的基質検索のため、ALP による種々のリン酸化合物の加水分解活性とその pH 依存性についても検討を行った。

最終精製酵素は、約 900 倍以上精製され SDS-PAGE 後の銀染色において単一のバンドとして認められた。その酵素の推定分子量はゲル濾過より 78,000、SDS-PAGE より 76,000 であり、従来報告されている骨型 ALP のモノマーの分子量と一致した。さらに、ゲル濾過までの精製過程で *p*NPPase と Tyr-P-MBP 脱リン酸化活性は同一の挙動を示したが、大部分の Ser/Thr-P-MBP 脱リン酸化活性は陰イオン交換カラム後に *p*NPPase 活性から分離され、ゲル濾過後にはほとんど検出されなかった。*p*NPPase と Tyr-P-MBP 脱リン酸化の至適 pH はそれぞれ 9.4-10.4 と 8.3-8.8 であった。*p*NPPase は中性 pH ではほとんど活性を示さないが、Tyr-P-MBP 脱リン酸化の至適 pH はアルカリ側に存在する

ものの、中性付近の pH7.0-7.6 でも最大活性の約 62%の活性が保たれていた。*p*NPPase と Tyr-P-MBP の脱リン酸活性に対する阻害剤の効果を調べた結果、両活性とも ALP の特異的阻害剤である levamisole により阻害されたが、プロテインホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸と dephostatin によつては阻害されなかった。これにより、*p*NPPase と Tyr-P-MBP の脱リン酸活性はいずれも ALP により行われる反応であることが強く示唆された。他の様々なリン酸化合物の加水分解活性の至適 pH を調べたところいずれもアルカリ側にあった。至適 pH における活性と pH7 での活性の比率は *p*NPP で 32.2、Tyr-P-MBP で 1.6 であり、測定したリン酸化合物の中では Tyr-P-MBP の値が最小であった。

本論文は、歯科矯正学的な歯の移動を行う際の重要な生体反応の一つである骨形成機構における ALP の生理的機能について検討を加えたものである。本研究では、骨芽細胞様細胞株の ALP を精製し、基質特異性を調べ、様々な基質を用いて至適 pH を検索した。最終精製酵素は ALP の典型的な特徴を示し、Tyr-P-MBP を基質とした際、中性 pH でもその活性が保たれる事が明らかとなった。他のいくつかのリン酸化合物についてその可能性を調べたが、いずれも中性 pH では ALP の良い基質にはならなかった。以上より、ALP が中性 pH においてチロシンホスファターゼ様活性を保持し、この活性が硬組織石灰化における ALP の機能に関連している可能性のあることが示唆された。

この研究は生理的 pH の範囲で ALP 活性を測定した基質検索実験で興味深く、この分野の研究に貢献できる新知見があり、この成果は、矯正学的にも、骨形成に関する基礎的研究としても、大いに貢献するものと考えられる。加えて、試問に対する明快な回答から、申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的、臨床的な広い学識を有していると認められた。よつて申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。