

学位論文題名

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

学位論文内容の要旨

【目的】

ヒトアルカリ性ホスファターゼ (ALP) アイソザイムは遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型, 胎盤型, 胚細胞型と, 臓器非特異的な骨型, 肝臓型, 腎臓型などに分類される. 多くの動物種の臓器由来の ALP では, アイソザイムのタイプによって ALP 活性の阻害剤に対する反応性が異なることが報告されているが, ヒト ALP では報告が少ない. そこで4種のアイソザイムを用いて, ヒトの場合にも, 遺伝子レベルでのアイソザイムの違いにより阻害剤に対する反応性の違いがあるのかと, 反応性の違いが構造の安定性に関連するのかを明らかにすることを目的に研究を行った.

【材料と方法】

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. 活性はパラニトロフェニルリン酸 (p NPP) を基質として測定し, 37℃で 30 分間反応させた後に NaOH を加えて停止した. 酵素反応の結果生じたパラニトロフェノール (p NP) の吸光度を, 分光光度計を用いて 420 nm で定量し活性を測定した. ALP 活性の pH 依存性は 9 種の pH の炭酸緩衝液を使用して測定した. ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性を調べるため, 種々濃度の tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate の存在下で活性を測定した. また, タンパク質の高次構造の変化の影響を調べるため, 種々濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下で ALP 活性の阻害剤濃度依存性を測定した.

【結果と考察】

1. 各種 ALP 活性の pH 依存性

至適 pH で ALP 活性を測定するための基礎データとして, また, 各 ALP アイソ

ザイムの性質の相違を知ることが目的として、ALP活性のpH依存性を測定した。最大活性を示すpHは、骨型は10.22、肝臓型は9.78、胎盤型は10.62、小腸型は10.22であった。

いずれの至適pHも極めて高いアルカリ性であるが、基質として用いた μ NPPが原因であると推定される。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。 μ NPPが基質の場合は水素イオン濃度が低い方が活性が促進されると推測される。また、アイソザイムの構造の違いによって律速段階の分子構造変化が影響されること、及び酵素の活性に関与する種々のアミノ酸の解離性原子団はpHによって変化することなどが、各アイソザイムで至適pHの相違が現れた理由と考えられる。

2. 各種ALP活性阻害の阻害剤濃度依存性

1) 臓器非特異型ALPに属する骨型と肝臓型のALP活性は低濃度からtetramisole, levamisole及びL-homoarginineの濃度に依存して阻害され、最大ではほぼ90%以上の阻害を示した。一方、胎盤型は各阻害剤の濃度に依存して阻害はされたものの、最大でも10~20%しか阻害されなかった。小腸型は臓器非特異型と胎盤型の中間であり、tetramisoleとlevamisoleでは50%、L-homoarginineでは75%阻害された。骨型と肝臓型阻害の IC_{50} 値はtetramisoleとlevamisoleでは87から477 μ Mであったが、L-homoarginineでは1.6と3.8mMと高い濃度を必要とした。

動物由来のALPに関する報告と同様に、本研究においても、臓器非特異型である骨型と肝臓型は類似した阻害剤反応性を示し、臓器特異的な小腸型と胎盤型もそれぞれ他のALPとは異なる反応性を示した。これらの結果は、ヒトALPにおいても遺伝子レベルで異なる各アイソザイムは阻害剤に対する反応性の相違によって区別が可能であることを示唆する。

2) Etidronateによって胎盤型はほとんど阻害されず、肝臓型は最も低濃度で抑制され最大では90%阻害された。一方、骨型と小腸型はtetramisole, levamisole, L-homoarginineとは異なり、骨型は2.9mMのetidronateで40%阻害されるにとどまったが、小腸型は75%阻害された。また、骨型、小腸型、

肝臓型とも etidronate の濃度に依存してシグモイダルな阻害パターンを示した。

Etidronate による阻害は、胎盤型がほとんど抑制されないことを除いて、他の tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine による阻害とは異なったパターンを示した。Etidronate の ALP に対する結合には共同性があり、他の 3 種の阻害剤の ALP への結合とは異なることを示唆する結果である。

3. 各種 ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性に対する SDS の影響

1) タンパク質の高次構造に影響を与える SDS 存在下で骨型 ALP 活性はより低濃度の etidronate で阻害された。

2) 胎盤型 ALP 活性は SDS の濃度を 1 から 4% まで変化させても tetramisole, levamisole, L-homoarginine 及び etidronate に対する感受性には変化が見られなかった。

3) 小腸型 ALP 活性は SDS 存在下では、ALP 活性の阻害により高濃度の tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine を必要とした。一方, etidronate による阻害に関しては SDS の効果は観察されなかった。

これらの結果は、SDS がサブユニット間の相互作用に影響することによって ALP の阻害剤に対する反応を変化させた可能性がある。またヒト胎盤型 ALP は各種阻害剤による阻害をほとんど受けず、SDS を添加しても阻害剤に対する反応に明らかな影響は見られなかった。ヒト胎盤型 ALP は耐熱性 ALP と呼ばれるように熱に安定である。またダイマー間にシステイン結合が存在するという報告があることから解離しにくく、他の ALP アイソザイムに比べて阻害剤に対しても非常に安定した構造を持つことが考えられる。

【結論】

ヒト ALP においても他の動物種の ALP と同様に、遺伝子の異なるアイソザイムのタイプによって tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine に対する反応性が異なった。Etidronate による各アイソザイムの阻害は他の 3 種の阻害剤の場合と異なることから、阻害の様式が異なるものと推測された。胎盤型 ALP の阻害剤に対する反応性の低さに構造の安定性が関与することが示唆された。また、SDS がタンパク質の構造を変化させることにより、ALP のホモダイマー境界面に存在する活性中心に影響がおよんで、ALP の性質が変化する可能性が推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 柴 田 健一郎
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

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

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

ヒトアルカリ性ホスファターゼ (ALP) アイソザイムは遺伝子レベルで臓器特異的な小腸型、胎盤型、胚細胞型と、臓器非特異的な骨型、肝臓型、腎臓型などに分類される。各アイソザイムは阻害剤に対する反応性が異なるのか、また、反応性と構造の安定性の関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

実験には市販のヒト由来の骨型、肝臓型、胎盤型及び小腸型 ALP を用い、パラニトロフェニルリン酸 (p NPP) を基質として活性を測定した。種々濃度の tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate の存在下で活性を測定して、ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性を調べた。また、タンパク質の高次構造の変化の影響を調べるため、種々濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下で ALP 活性の阻害剤濃度依存性を測定して以下のような結果を得た。

1. 各種 ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性

1) 骨型と肝臓型の ALP 活性は低濃度から tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine の濃度に依存して阻害され、最大ではほぼ 90%以上の阻害を示した。胎盤型は各阻害剤の濃度に依存して阻害されたが、最大でも 10~20%の阻害であった。小腸型は骨型及び肝臓型と胎盤型の中間であり、tetramisole と levamisole では 50%, L-homoarginine では 75%阻害された。動物由来の ALP に関する報告と同様に、臓器非特異型である骨型と肝臓型は類似した阻害剤反応性を示し、臓器特異的な小腸型と胎盤

型は他の ALP とは異なる反応性を示したことから、ヒト ALP においても遺伝子レベルで異なる各アイソザイムは、阻害剤に対する反応性の相違によって区別が可能であることが示唆された。

2) Etidronate によって胎盤型はほとんど阻害されず、肝臓型は最も低濃度で抑制され最大では 90% 阻害された。一方、骨型は 2.9 mM の etidronate で 40% 阻害されるにとどまったが、小腸型は 75% 阻害された。Etidronate は濃度に依存してシグモイダルなパターンで骨型、小腸型、肝臓型 ALP を阻害した。Etidronate の ALP に対する結合には tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine とは異なり共同性があることが示唆された。

2. 各種 ALP 活性阻害の阻害剤濃度依存性に対する SDS の影響

タンパク質の高次構造に影響を与える SDS 存在下で、骨型 ALP 活性はより低濃度の etidronate で阻害され、小腸型 ALP 活性の阻害にはより高濃度の tetramisole, levamisole 及び L-homoarginine を必要とした。SDS がサブユニット間の相互作用に影響して ALP の阻害剤に対する反応を変化させた可能性を示唆する。一方、胎盤型 ALP 活性は、SDS の濃度を 1 から 4% まで変化させても阻害剤に対する感受性には変化が見られなかった。ヒト胎盤型 ALP はダイマー間にシステイン結合が存在し安定した構造を持つことから、各種阻害剤や SDS の影響を受けにくいと推測した。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、

- 1) 臓器特異的な ALP と非臓器特異的な ALP の酵素学的な相違について
- 2) ALP のダイマーを構成する各モノマーが GPI アンカーで細胞と結合しているのか
- 3) ALP と ATP の関連
- 4) ヒト胎盤型 ALP に S-S 結合を切るメルカプトエタノールを添加して実験を行うとどうなるか
- 5) Etidronate による骨型 ALP 阻害の様式と骨芽細胞に対する作用との関連性
- 6) SDS の作用に濃度依存性が無い場合は 1% の SDS で飽和しているということなのか
- 7) 反応液に ALP, SDS, 阻害剤を入れる順番や時間間隔を変えて実験を行なうと、作用機構がより明らかになるのではないかと、

などがあり広範囲にわたった。いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。

本論文の内容は今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられ、試問

の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。