

— 総説 —

アルカリホスファターゼの生化学

織田 公光¹, 柴田 寿信^{1,2}, 福士 真理子¹¹新潟大学歯学部口腔生化学教室, ²口腔外科学第二教室

Alkaline phosphatase

Kimimitsu Oda¹, Hisanobu Shibata^{1,2} and Mariko Fukushi¹¹Department of Oralbiochemistry and ²Second Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, School of Dentistry, Niigata University

I. はじめに

骨や歯などの硬組織を研究する者にとって、アルカリホスファターゼ (ALP) は特別な意味をもつ酵素である。70年以上も前に石灰化に関するアルカリホスファターゼ説が Robison¹⁾によって唱えられて以来、時代によってその評価に変遷はあるものの現在まで基本的にはその仮説は命脈を保っている。今、手元に20年前に書かれた「硬組織のアルカリホスファターゼの生理的意義」と題するよくまとまった総説があり、当時の ALP の研究の状況がうかがわれて興味深い²⁾。この20年の間に(1)ヒト ALP の4種類のアイソザイムの遺伝子構造が決定されたこと、(2) ALP が細胞表面で特殊な存在様式をしている事実が明らかとなったことをはじめとして、ALP 分子そのものに関する生化学研究は飛躍的に進展した。ところが、in vivo, in vitro の系における石灰化の有用な指標として、ALP 活性の上昇がしばしば用いられているにも係わらず、では実際にどのような生化学的な機構で ALP が石灰化に関与しているかとなると相変わらずはっきりしない。まして、組織非特異的 ALP 以外の胎盤型、小腸型 ALP の場合にはその生理学的な役割さえも明らかではない。本総説では、これまでに明らかとなっている ALP の分子像の紹介を中心にして、最近報告された組織非特異的 ALP のノックアウトマウスに関する研究についてもふれてみたい。

II. アルカリホスファターゼのアイソザイム

一般にリン酸モノエステル結合を加水分解する非特異的な酵素をホスファターゼとよぶ。アルカリ性で強い酵素活性を発現するものがアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, orthophosphoric-monoester phos-

phorylase, [EC3.1.3.1]) で一般に細胞表面に存在している。これと対照的に酸性側に至適 pH をもつことが知られているのが酸性ホスファターゼで、細胞内のリソゾームに局在している。ALP の活性の測定には真の生理的な基質が不明なため、活性測定が簡便な合成基質が用いられており、図1に示すように p-ニトロフェニルリン酸を用いたアッセイ法はその代表的なものである。ALP は一般に生理的 pH から大きくはずれたアルカリ側 (pH10-10.5) に至適 pH が観察される。しかし、この pH で ALP が機能しているとは考えにくく、あくまでも人工基質を使ったことによるアーティファクトの可能性が高い。また、基質濃度も ALP の至適 pH に大きく影響し、低濃度のホスホエタノールアミン、ピリドキサルリン酸を基質に用いた場合には、ALP は生理的 pH に近い至適 pH を示すことが報告されている³⁾。ちなみに、酸性ホスファターゼの場合にはリソゾーム内腔が酸性に保たれており、至適 pH (pH4-5) と酵素が局在している環境の pH とが一致している。

ALP は小腸粘膜、胎盤、乳腺、腎臓、骨、肺、肝臓、脾臓の順で多く、骨格筋や結合組織には少ない。これまでこれらの組織から部分精製、あるいは完全精製された

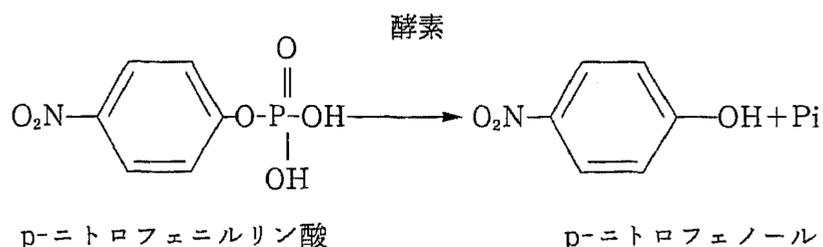


図1 アルカリホスファターゼの比色定量法

P-ニトロフェニルリン酸はいかなる pH でも無色であるが、酵素により加水分解されてできた生成物 p-ニトロフェノールはアルカリ溶液中で強い黄色を呈するので、その吸光度を測定することにより酵素活性を定量することができる。

酵素標品を用いて生化学的及び免疫学的な検討が加えられて来た。その結果、ヒトにはALP活性を示す酵素として以下の4種類のアイソザイムが確認されている⁴⁾。

- (1) 組織非特異的ALP (tissue nonspecific ALP, 別名, 肝臓・骨・腎臓型)
- (2) 小腸型ALP (intestinal ALP)
- (3) 胎盤型ALP (placental ALP)
- (4) 生殖細胞型ALP (germ cell ALP, placenta-like ALP)

なお、(2)―(4)はその局在が限られていることから組織特異的ALPとよばれるのに対して、組織非特異的ALPは肝臓、骨、腎臓、精巣、線維芽細胞、マクロファージなど広範囲の組織、細胞で発現している。

表1, 2に示すように、酵素の温度安定性や阻害剤に対する感受性に関しては、組織非特異的ALPと組織特異的ALPとの間に大きな差がある。これらの感受性の差は酵素の活性部位あるいはその近傍のアミノ酸配列の違いによる立体構造の差を反映していると考えられる。さらに、精製胎盤型ALPに対するポリクローナル抗体が小腸型ALP、生殖細胞型ALPとは交差するが組織非特異的ALPとは交差しないことから、免疫学的にも組織非特異的ALPと組織特異的ALPの間にはかなりの違いがあることが知られていた。さらに、抗ペプチド抗体法、モノクローナル抗体法の導入により、組織非特異的ALPと組織特異的ALPとの差はもとより、組織特異的ALPグループ内での細かな差も明らかとなっていた。このことは、酵素の温度安定性や阻害剤に対する感受性の違いにも反映されている(表1, 2)。しかし、次

の項で述べるように4種のアイソザイムの存在は遺伝子のクローニングにより確定された。

III. cDNA 及び遺伝子構造

1980年代の中頃になって次々にALPのcDNAが単離され、各アイソザイムのアミノ酸配列が決定された⁴⁾。いずれのアイソザイムも20個前後のいわゆるシグナルペプチドをN末端に有し、その後507-513個のアミノ酸残基が続いている(表3)。但し、V.で述べるように、このうちC末端側の30前後のアミノ酸は合成直後に切断される。アミノ酸配列を比較すると、組織特異的ALPグループ内のアイソザイムのホモロジーが非常に高く(87%以上)、特に胎盤型ALPと生殖細胞型ALPとでは513アミノ酸のうち12アミノ酸だけに違いがあった(成熟型としては484残基中7アミノ酸だけが異なる)⁵⁾。一方、組織特異的ALPと組織非特異的ALPのホモロジーは50-60%であった。この結果は、II.で述べた酵素、蛋白質レベルでの実験に基づく結果とよく一致している。さらに、449個のアミノ酸からなる大腸菌ALPと組織非特異的ALP、胎盤型ALPとのホモロジーは、全体ではそれぞれ25%、29%と報告されている。この数値は一見低いように思われるが、活性部位を構成するアミノ酸(基質や金属との結合に関与)では3者でほぼ一致しており、大腸菌のALPがヒトのALPの原型と考えられる。ところで、胎盤型ALPと生殖細胞型ALPとではわずかに7個のアミノ酸の違いしかないにもかかわらず、阻害剤に対する感受性にはかなりの差が観察され(例えば表2の

表1^a アルカリホスファターゼのアイソザイムの温度感受性

アイソザイム	56度 ^b	65度
組織非特異型	7.4	1.0
小腸型	>60.0	6.5
胎盤型・生殖細胞型	—	>60.0

a 引用文献(4)より改変

b それぞれのアイソザイムを56度または65度で50%失活させるのに必要な時間(分)

表2^a アイソザイムに対する阻害剤の影響

阻 害 剤	アルカリホスファターゼ			
	組織非特異型	小腸型	胎盤型	生殖細胞型
L-フェニルアラニン	31	0.8	1.1	0.8
L-ホモアルギニン	2.7	40	>50	36
L-フェニルアラニルグリシグリシン	30.6	3.7	0.1	2.9
L-ロイシン	13.1	3.6	5.7	0.6
L-レバミソール	0.03	6.8	1.7	2.7

a 引用文献(4)より改変

b 活性を50% 阻害するのに必要な阻害剤の濃度(mM)

ロイシンに対する感受性), これには429番目のアミノ酸が大きく関与していることがつきとめられている⁶⁾。

また, 各アイソザイムの遺伝子の構造を比較すると, 組織特異的 ALP と組織非特異的 ALP とではその構造が大きく異なることがわかる(図2)。組織非特異的 ALP の場合, 2種のリーダーエクソン1(B, L) と11のエクソンから構成されており, 全長50Kb 以上もある^{4,7)}。スプライシングにより, 2つのエクソンのどちらかと11のコーディングエクソンからなる2種類のメッセンジャーRNA を生じ, 1L (liver) は肝臓に特異的に, 1B (bone) は肝臓, 骨組織を含めて多くの組織で発現している。これに対し, 組織特異的 ALP はいずれも11のエクソンからなり全長は約5 Kb 程である。この差はイントロンの長さ起因しており, 組織特異的 ALP のそれは非常に小さく74-425bp である。また, 組織非特異的 ALP は1番染色体の短腕 (p34-p36.1) に位置するのに対して, 各組織特異的 ALP はそろって2番染色体の長腕の末端に (q34-q37) 近接して存在する。

これらの結果から, 現在図3に示すように各アイソザイムの進化が想定されている。つまり, 遺伝子重複によりまず組織非特異的 ALP ができ, 次に小腸型 ALP が生じたと考えられている。ところで, ヒトの胎盤型 ALP に相当する性質のアイソザイムは霊長類だけに見つかることから, 胎盤型 ALP の出現は進化上比較的最近になって起きたことが推定される。ちなみにマウスでは,

組織非特異的 ALP, 小腸型 ALP, 胚型 (embryo type) ALP そして偽遺伝子の4種類の遺伝子が見つかる⁸⁾。ヒトでは組織特異的 ALP が局在する胎盤および生殖細胞にマウスでは組織非特異的 ALP が発現しており, ヒトとマウスではアイソザイムの種類や発現が異なる。

これまでに多くの臨床研究により ALP の様々な「新しいアイソザイム」が報告されて来た。しかし, 現時点ではそのほとんどが上記4種類の遺伝子産物であるが, 遺伝子多型性 (polymorphism) や糖鎖などの翻訳後修飾により電気泳動で異なる移動度を示したり, 免疫学的な反応性に変化が生じたものと考えられている。例えば, 組織非特異的 ALP では5カ所, 胎盤型 ALP では2カ所のアスパラギン型糖鎖結合部位が推定されることから, 臓器特異性や癌化にともなう糖鎖のプロセッシングの変化により, いろいろな分子種が出現する可能性がある。なお, 日本人によって発見された「Nagao isozyme」は真の新しいアイソザイムであり, その後の遺伝子クローニングの結果生殖細胞型 ALP と名付けられた⁹⁾。一方, 原発性の肝臓癌患者の血清中に発見された「Kasahara isoenzyme」は, 遺伝子クローニングの結果から小腸型 ALP と同一であることがわかり, 小腸型 ALP との違いは糖鎖修飾の差によるものと推定された⁹⁾。

表3 アルカリホスファターゼのアミノ酸残基数とホモロジー

アイソザイム	シグナルペプチド	ポリペプチド
組織非特異型	17	507
小腸型	19	509
胎盤型	21	513
生殖細胞型	18	513
アイソザイム間のホモロジー		
胎盤型 vs 生殖細胞型	98%	
小腸型 vs 胎盤型, 生殖細胞型	87%	
組織非特異型 vs 組織特異型	50-60%	

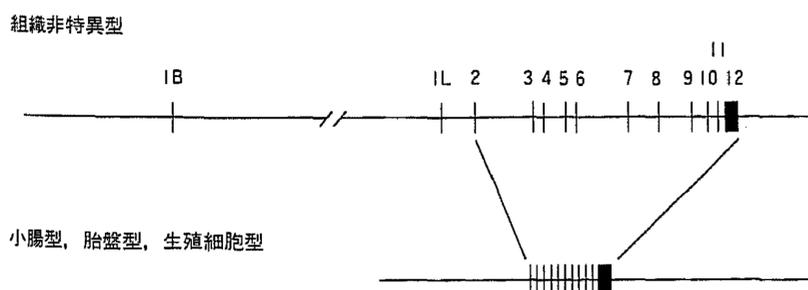


図2 アルカリホスファターゼの遺伝子構造
縦の縞はエクソンを表す。組織非特異型遺伝子は, 5'側にエクソン1B, 1L (ともに翻訳されない) をもつ。
引用文献(4), (7)より改変。

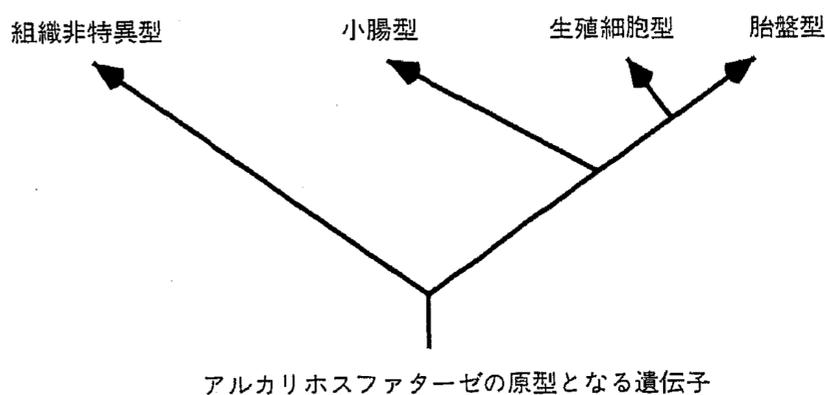


図3 アルカリホスファターゼのアイソザイムの進化

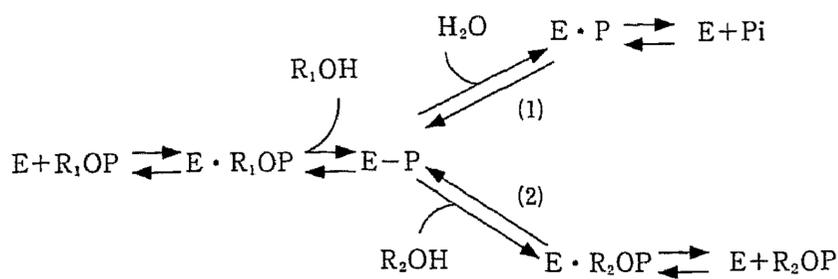


図4 アルカリホスファターゼの反応機構

E-Pは酵素の活性中心(Ser102)が共有結合でリン酸と結合していることをあらわし、加水分解(1)により非共有結合性の複合体(E·P)を経て酵素(E)とPi(リン酸)になる。一方、高濃度のアルコールが存在するとリン酸はアルコールに転移され、結果としてR₁OPからR₂OPへのtransphosphorylationが起きる(2)。

引用文献(10)より改変。

IV. ALPの触媒作用

ALPの触媒活性は図4のように進行すると推定されている。まず最初に、酵素(E)と基質であるリン酸モノエステル(R₁OP)が反応すると、酵素と基質とが非共有結合で複合体を一時的に形成(E·R₁OP)する。次にリン酸モノエステルが加水分解を受けるとアルコールであるR₁OHが酵素から遊離し、リン酸は共有結合で酵素の活性部位のセリン残基に結合する(E-P)。E-Pは最終的には非共有結合による複合体(E·P)を経由して酵素とリン酸に分離して触媒作用を完了する。なお、酸性条件下ではE-Pの加水分解の速度が遅くなることが知られており、放射性のリン酸を用いてALPを標識することも可能である¹⁰⁾。アルカリ条件下ではE·Pの分解が律速段階になっている。ところで、反応液中にエタノールアミンやトリスなどのアルコール(R₂-OH)が高濃度で存在すると、酵素はリン酸をR₂-OHに転移してR₂-OPを生じ、結果としてR₁OPからR₂-OPへのリン酸の転移(transphosphorylation)が起きる。

大腸菌のALPはホモダイマーでそのサブユニットは449個のアミノ酸からなる。活性には金属イオンが必要で、サブユニットあたり2分子のZn²⁺が直接触媒作用に関与していることがX線回析から明らかになっている¹¹⁾。一方、1分子のMg²⁺の作用は間接的で、20%の活性の上昇をもたらすとされている。リン酸が結合するセリン(102)、アルギニン(166)をはじめ2分子のZn²⁺に配位するアスパラギン酸(51, 327, 369)、ヒスチジン(331, 370, 412)、とMg²⁺に配位するグルタミン酸(322)、アスパラギン酸(51)、スレオニン(155)などのアミノ酸はIII。でもふれたようにヒトのALPでもほぼ完全に保存されていることから、基本的には触媒機構はヒトと大腸菌のALPで同じと考えられている^{4,12)}。今後、ヒト

ALPのアイソザイム間でのみ保存されているアミノ酸や、アイソザイムに特異的なアミノ酸が酵素活性や酵素の安定性などにどのように関わっているかを知る上で、ヒトのALPの立体構造の解析が待たれる。また、低ホスファターゼ症の項で言及するように、組織非特異的ALPのミスセンス突然変異の解析からその重要性が示唆されたアミノ酸もある。

V. 特殊な翻訳後修飾

ALPはglycosylphosphatidylinositol(GPI)-アンカー型の膜結合性酵素で、共有結合した脂質を介して形質膜に存在している(図5)。リン脂質の1つであるホスファチジルイノシトールに特異的なホスホリパーゼCで形質膜を消化するとALPが遊離されてくることから、ALPがホスファチジルイノシトールを介して膜に結合している可能性が考えられていた^{13,14)}。その後胎盤型ALPを中心に解析され、その詳細が明らかとなったのは1980年代の後半になってからである¹⁵⁻¹⁸⁾。GPI-アンカー型蛋白質の構造的な特徴は、ホスホエタノールアミン、オリゴ糖(マンノース、グルコサミン)とホスファチジルイノシトールからなるGPI-アンカー部位で、ホスファチジルイノシトールの脂肪酸が形質膜脂質二重層の外層に、ちょうどアンカーのように、埋め込まれている。そして蛋白質は、C末端のアミノ酸のカルボキシル基を介してGPIアンカー部位のホスホエタノールアミンにアミド結合している。現在までに全てのALPのアイソザイムがGPIで細胞表面にアンカーされていることが確認されており、その構造の特殊性から、ALPを含めたGPIアンカー型蛋白質はホスホリパーゼCで処理すると図5の矢印の箇所で加水分解され酵素蛋白質が膜からはずれて遊離される(但し、イノシトール環がアシル化されているときには消化されない)。その他、遊離型(血清型)となる可能性としては、ホスホリパーゼDによりホスファチジルイノシトールから蛋白質部分が切り離される場合、さらに、蛋白質部分のC末端近傍で蛋白分解酵素が働く場合にも考えられる。また、以下でふれるようにGPIアンカー型蛋白質分子は形質膜上で脂質と強く会合(特殊なマイクロドメイン)しているらしく、いわば膜ごと剥がれてくる(shedding)可能性もある。胆管結紮やコルヒチン投与により血中に出てくる非常に高分子量のALPがそれに相当するかもしれない¹⁰⁾。また、ラットの場合には脂肪食を与えると、小腸型ALPが一過性に血中で上昇する(血中ALPの70%にもなる)ことが知られている。この小腸型ALPのかなりの活性は肺のサーファクタント様のリン脂質に富む膜状構造に結合している¹⁹⁾。しかし、いずれにしても血中のALPは微量なためそのC末端の構造の化学的な分析は進んでいない。

図6には胎盤型 ALP の生合成の過程を示した。胎盤型 ALP の生合成はリボソームで開始され、N 末端のシグナルペプチドを介して新生ポリペプチドは小胞体内腔へ導かれる。N 末端のシグナルペプチドが切断された後、ポリペプチド鎖は小胞体内腔へと伸長をつづけ、同時にポリペプチド鎖は糖鎖による修飾を受ける。全長513個のアミノ酸からなるポリペプチド鎖の合成が完了すると、トランスアミダーゼの働きにより小胞体膜内腔側で既に合成されていた GPI アンカー部位がアスパラギン酸(484)に結合される。この際、アスパラギン酸(484)より後の29個のアミノ酸からなるペプチドは同時に切断されると考えられている。従って成熟型の胎盤型 ALP は全長484個のアミノ酸からなり、成熟型ポリペプチド鎖から切り離される C 末端側の延長ペプチドは N 末端のシグナルペプチド(プレ配列)と区別してプロペプチドと呼ばれる。また詳細なタイミングは不明だが、ポリペプチド鎖はホモダイマー(又はテトラマー)を形成し、活性を獲得するようになるかと推測される。さらに、酵素を還元すると失活することから、サブユニット内でのジスルフィド結合が活性発現に必要ならしい。まとめると、胎盤型 ALP の mRNA は N 末端と C 末端にそれぞれ21個と29個のアミノ酸からなる疎水性の延長ペプチドを有

する全長534個のアミノ酸からなる前駆体(プレプロ型)をコードしていることになる。

ところで、C 末端側の延長ペプチドはどのような働きをするのであろうか。これまでに知られている GPI アンカー型の蛋白質の cDNA を検討してみると、いずれも胎盤型 ALP のプロペプチドに相当する領域を持ち、しかも連続する疎水性アミノ酸からなる配列を含むことが判っていた¹⁷⁾(最近例外的にこの特徴的な配列をもたない小腸型 ALP-II も報告された¹⁹⁾)。そこで分泌蛋白質の C 末端に、胎盤型 ALP 由来のプロペプチドを連結したキメラ蛋白質コードするプラスミドを構築してその発現を検討したところ、本来可溶性の蛋白質が GPI アンカー型膜蛋白質として細胞表面に発現された²⁰⁾。このことから蛋白質が GPI アンカーという特殊な修飾を受けるためには、プロペプチドが信号(GPI アンカーシグナル)の役割を果たしていることがわかった。同様な方法で組織非特異的 ALP の場合にも、C 末端側の30アミノ酸が GPI アンカーシグナルであることを確認しているが(柴田寿信, 未発表), 現在までのところ GPI アンカーが結合するアミノ酸の同定までには至っていない。

一方、GPI アンカー部位は蛋白質に転移される最終段階までは蛋白質の合成とは独立して逐次的に合成され

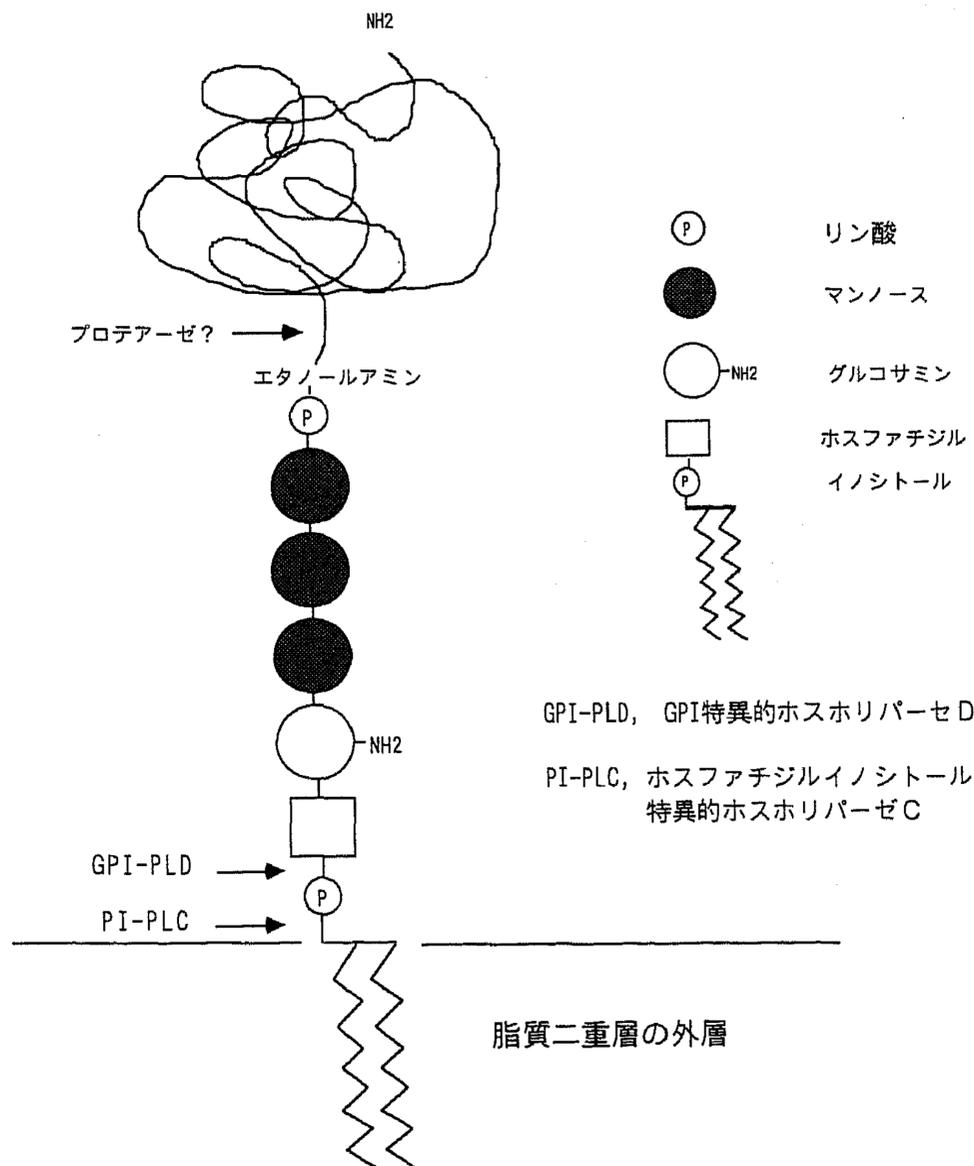


図5 GPI(glycosylphosphatidylinositol)-アンカー型膜蛋白質の基本構造

る。図7に示すように、今ではその過程(少なくとも6つのステップがある)が詳細に研究されている²¹⁾。特筆すべき事として、GPIアンカー合成の第1ステップに参与

する酵素の欠陥によりPNH (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, 発作性夜間血色素尿症) が起きることが、木下タロウのグループにより突き止められた²²⁾。

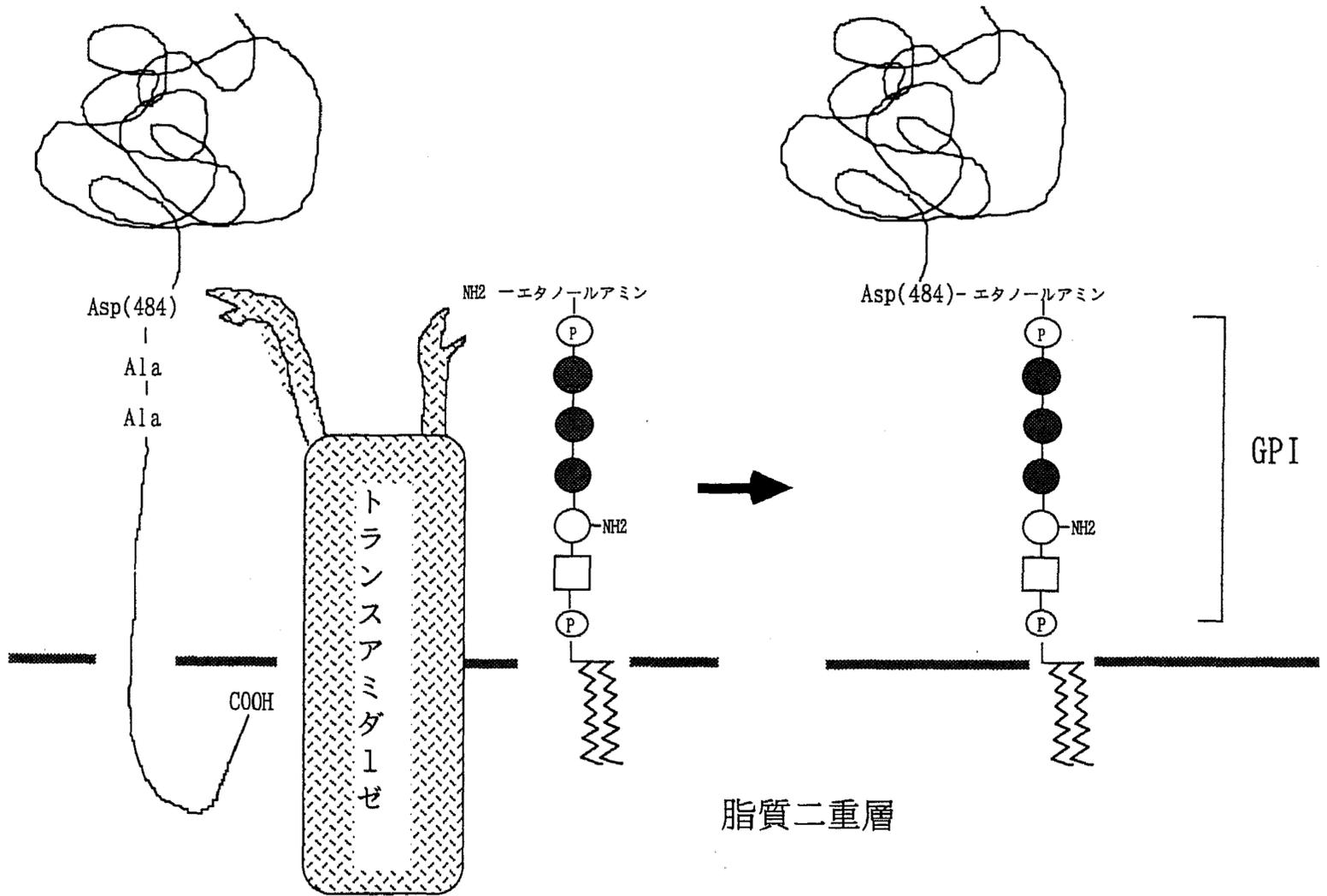


図6 胎盤型アルカリホスファターゼの生合成

(1) (2) (3) (4) (5) (6)

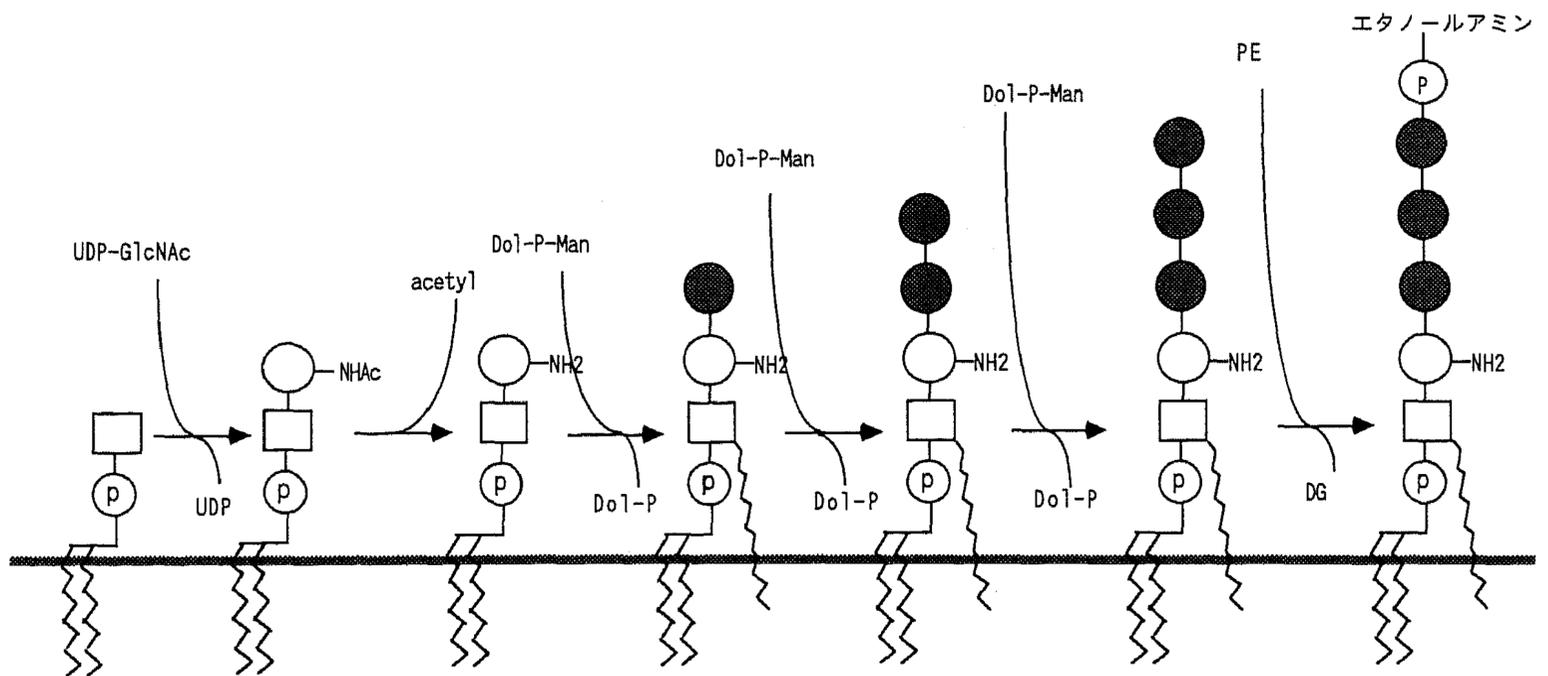


図7 GPI-アンカー部位の生合成

GPI-アンカー部位は小胞体で(1)―(6)の過程を経ながら逐次的に合成される。(3)―(6)のステップでイノシトール環アシル化が起こる。DOI, ドリコール; PE, ホスファチジルエタノールアミン; DG, ジアシルグリセロール
引用文献20より改変。

PNHは、単クローン性造血幹細胞の突然変異により3血球系細胞に共通の異常をを伴う比較的稀な疾患である。GPI アンカー部位が合成されないためにPNH患者の血球では好中球ALP、赤血球コリンエステラーゼ、赤血球補体制御因子(DAF)など複数のGPI アンカー型膜酵素が欠損している²³⁾。

ALPを含めたGPI アンカー型蛋白質の興味深い性質として、TritonX-100などの中性の界面活性剤で可溶化されにくいことが知られている。その理由は、GPI アンカー型蛋白質がコレステロール、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質が濃縮されている膜上のマイクロドメインに存在していることによると考えられている。胎盤型ALPの細胞内輸送の実験によるとALPはゴルジ装置でTritonX-100不溶性となることから、ゴルジ装置でマイクロドメインに組み込まれるらしい²⁴⁾。上皮細胞では

GPI アンカー型蛋白質は主に apical 側の形質膜で発現されることが知られおり、ゴルジ装置内でマイクロドメイン(いかに例えられる)に組み込まれることにより、ゴルジ装置から形質膜の apical 側への選択的に輸送されると考えられている^{25,26)}。また、骨芽細胞ではALPの発現は極性を示すことが以前より知られている。すなわち、側壁ならびに血管側細胞膜に強く、骨側細胞膜には弱くしか発現していない²⁷⁻²⁹⁾。このような骨芽細胞における極性にもALPのGPI アンカー部位が関係しているのかもしれない。さらに、形質膜のマイクロドメインにはGPI アンカー型蛋白質や、caveolaeの構造蛋白質であるカベオリンの他、情報伝達に係わる分子であるCD-14、非レセプター型のチロシンキナーゼ(Src family)やヘテロ3量体GTP結合蛋白質なども存在することが報告されている(図8)³⁰⁻³²⁾。GPI アンカー型蛋白質が全

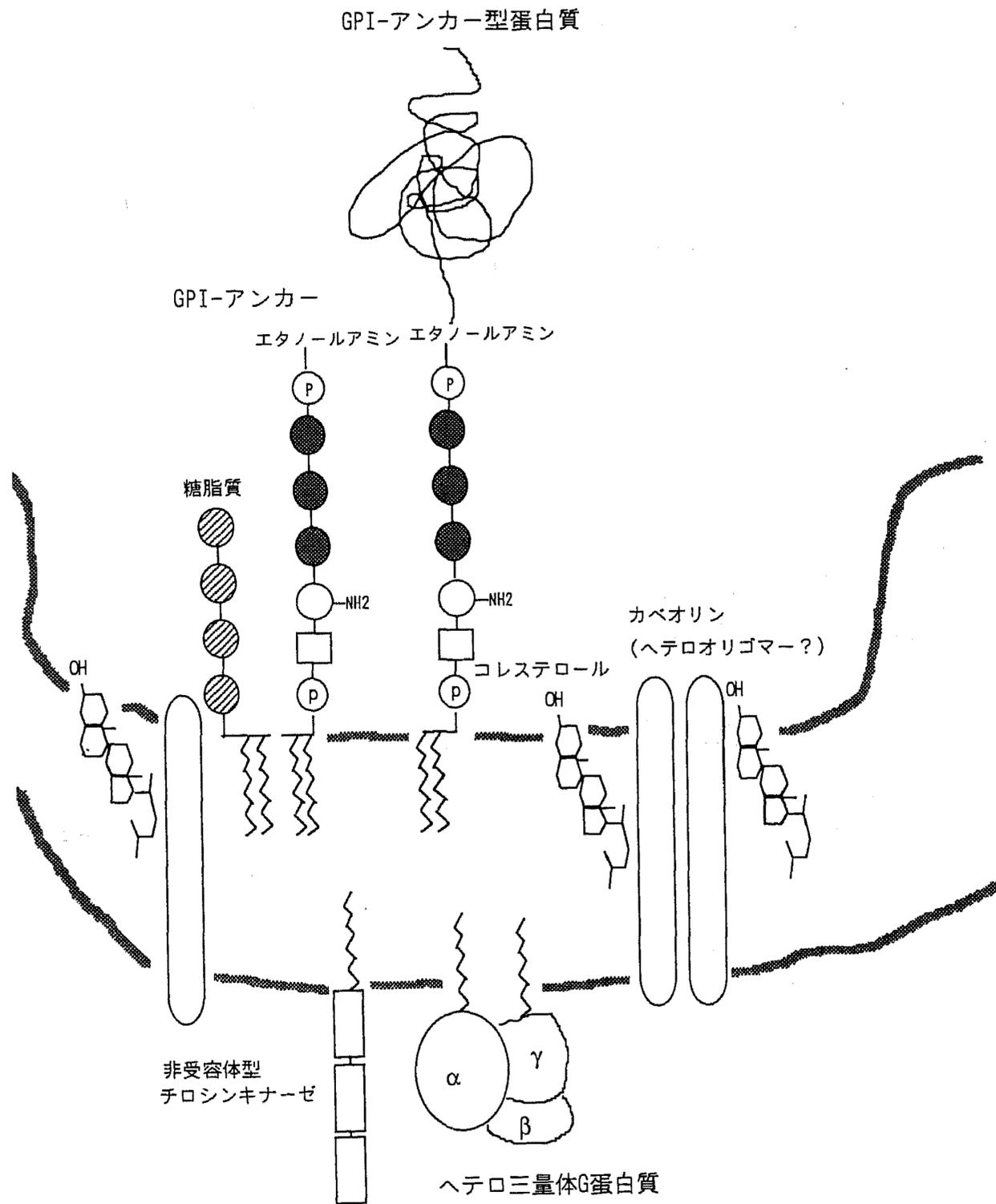


図8 Caveolaeの構造(引用文献31より改変)

て形質膜上の caveolae に局在するか否か、ミクロドメインと caveolae との関連などについてはいまだ議論が続いているが^{33,34)}, caveolae を介した potocytosis や情報伝達機構への GPI アンカー型蛋白質の関与も想定されている。さらに、細胞表面の GPI アンカー部位が独自に情報伝達物質の役割を果たす可能性^{35,36)}やその他、TNF- α , β , IL-1 β などのサイトカインがその特異的受容体以外にも GPI アンカーの糖鎖部位を認識するとの報告もあるが³⁷⁾, その生理的意義はまだ不明である。

VI. 低ホスファターゼ症

1948年、カナダの小児科医 Rathbun は、てんかん様発作及び体重の減少をともなって死亡した重篤な病様症状の小児では、その血中のアルカリホスファターゼ活性が著しく低下していたことを報告し、これを低ホスファターゼ症 (hypophosphatasia) と名付けた³⁸⁾。混同されがちな病や骨軟化症の原因がほとんど血中のカルシウムやリン酸濃度の低下であるのに対して、低ホスファターゼ症ではそれらは正常かむしろ上昇している。低ホスファターゼ症は以下のように分類されている。

- (1) perinatal (lethal), 胎児型: 子宮内死亡又は出生後早期に死亡
- (2) infantile, 乳児型: 生後半年以内に発症
- (3) childhood, 小児型: 子供のころに発症
- (4) adult, 成人型: 大人になって発症
- (5) odontophosphatasia

一般に、発症の時期が早いほど重い症状を呈し胎児型と乳児型は重症型、その他は軽症型といえる。いずれも、骨や歯の低石灰化をともなうが、その症状は骨の石灰化がほとんど見られない死産の例から、骨格異常、乳歯の早期脱落、永久歯の脱落、成人での偽骨折 (pseudofracture) まで様々であり、グループ内でも症状にかなりの差が見られるとされている。なお、odontophosphatasia は、低ホスファターゼ症のなかでも歯のみに異常がみとめられる症例である。歯の脱落については一般にセメント質の形成不全、発育不全、形成異常が見られ、切歯にもっとも影響があらわれやすいらしい。また、少数例ではエナメル質の形成不全も報告されている³⁹⁾。

低ホスファターゼ症は組織非特異的 ALP の活性の減少に起因しており、組織非特異的 ALP と硬組織の石灰化との密接な関係を証拠立てた自然の実験系ともいえる。1988年に Weiss らによって初めて、低ホスファターゼ症の患者の組織非特異的 ALP の遺伝子に先天的な変異のあることが報告された⁴⁰⁾。この例では、患者は組織非特異的 ALP にミスセンス変異 (Ala162 \rightarrow Thr) をもつホモ接合体であり、骨に著明な低石灰化が認められた重症型で、生後3カ月で死亡している。両親は病因遺伝子を

もつヘテロ接合体 (キャリアー) で臨床的には正常だった。従って、この症例は常染色体劣性遺伝疾患に分類され、重篤な症状はホモ接合体の子供に現れる。一般に、同一変異遺伝子を有するヘテロ接合体どうしが結婚する頻度は、集団の中に含まれるヘテロ接合体の頻度に依存しており、血族結婚やその集団構成員でのみ結婚を繰り返してきたような閉鎖的な社会では、疾患が高い頻度で出現することが知られている。事実、カナダのマニトバ州のキリスト教 mennonite 派のある集団では、25人に1人が組織非特異的 ALP に変異をもつキャリアーであり、新生児の2,500人に1人の頻度で重篤な症状があらわれた。一方、同じカナダのトロントでは、重症例は新生児の100,000人に1人の頻度であるという³⁹⁾。表4に低ホスファターゼ症でみつかった組織非特異的 ALP 遺伝子の変異を示した。これまで報告された例は多くの場合ミスセンス突然変異によるものであったが⁴⁰⁻⁴⁴⁾, その他に、1塩基欠失によるフレームシフトの例⁴⁵⁾や、ごく最近になってエクソン内3塩基リピートの欠失によりアミノ酸が欠損した例⁴⁶⁾などが相次いで報告されており、今後さらに色々な変異が見つかる可能性がある。これまでのところ、プロモーター領域の変異や欠損、スプライシングの異常などによる mRNA の欠損や異常の報告はない。興味深い症例として、それぞれ小児型、成人型低ホスファターゼ症に分類された患者がいずれも747Aと1057C変異をもつことが報告されている⁴²⁾。この例は、特定座位で2つの変異対立遺伝子をもつ、いわゆる複合ヘテロ接合体 (compound heterozygote) とよばれるものであった。重症型が常染色体劣性遺伝疾患であるのに対して、軽症型の低ホスファターゼ症の場合には発症は常染色体優勢のパターンを示すという報告もある。いずれにしても軽症型の場合には、その発症は組織非特異的 ALP の遺伝子の変異に加えて環境因子や他の遺伝的な素因もかかわっている可能性が大きい³⁹⁾。

表4に示した組織非特異的 ALP で検出されたアミノ酸の変異が酵素蛋白質に与える影響は必ずしも明確ではない。しかし、進化上保存されているアミノ酸が多いことから、第一にはアミノ酸の変異による酵素活性の影響が考えられている。今後、X線回析等の物理化学的な方法による組織非特異的 ALP の立体構造の研究の進展から、それぞれのアミノ酸の役割がより明らかになることが期待される。一方、ALP は形質膜に発現してはじめてその機能を果たすと考えられることから、たとえ活性をもつ酵素蛋白質が合成されたとしても、アミノ酸の変異により細胞内輸送になんらかの障害が生じた場合には、結果として低ホスファターゼ症を引き起こす可能性がある。家族性高コレステロール血症患者の LDL レセプターや α_1 -アンチトリプシンの突然変異型の例では、細胞内輸送の障害が病気の原因とが知られている⁴⁷⁾。最近、

表4 低ホスファターゼ症患者の組織非特異型アルカリホスファターゼに検出された突然変異

突 然 変 異				頻 度				総数
塩基の位置	塩基の変異	アミノ酸の位置	アミノ酸の変異	胎児・乳児型	小児型	成人型	odonto型	患者数
274	C → T	16	Ala → Val	3	0	0	0	47
387	C → T	54	Arg → Cys	1	0	0	0	48
388	G → C	54	Arg → Pro	1	0	0	0	47
711	G → A	162	Ala → Thr	1	0	0	0	43
747	G → A	174	Glu → Lys	1	4	2	0	46
796	A → C	190	Gln → Pro	1	0	0	0	47
1057	A → C	277	Asp → Ala	2	2	2	0	50
1309	A → T	361	Asp → Val	1	4	2	2	42
1482	T → C	419	Tyr → His	1	0	0	0	45
1177	G → A	317	Gly → Asp	1				
1068	G → A	281	Glu → Lys	1				
1735	T → 欠損	503	フレームシフト	1				

引用文献(42-44)より改変

筆者らは突然変異型組織非特異的 ALP (Ala162 → Thr) の cDNA を COS 細胞に発現してその生合成を野生型と比較したところ、GPI アンカー化は起きるものの細胞内輸送の速度に顕著な遅れることを見いだした(柴田ら, 投稿準備中)。この例では、低ホスファターゼ症は酵素自体の活性の低下よりも、むしろ生合成後の蛋白質の細胞内輸送の欠陥に起因すると思われる。また、これは低ホスファターゼ症の例ではないが、(Glu218 → Gly)に置き換わった変異体では活性が全く発現されないと同時に、ALP 分子自体の細胞内輸送が完全に阻害されて、小胞体に貯留されることを見出した⁴⁸⁾。これらの限られた例からも、ただ1つのアミノ酸の変異が組織非特異的 ALP 活性及びその細胞内輸送に大きく影響することがわかる。

VII. 石灰化と組織非特異的 ALP

石灰化がどのようにして起きるのかその機構は現在もよくわかっていない。石灰化は硬組織でのリン酸カルシウムの析出とその後のハイドロキシアパタイトへの変換と考えられ、ミネラル(ハイドロキシアパタイト)の沈着の機構を大別すると、(1)ブースター説(2)核形成説(3)阻害説がある。様々な検討がなされてきたが、これらの説は必ずしも相互に排他的ではなく、それぞれ石灰化という複雑な現象の異なる側面を強調したものと捉えられよう⁴⁹⁾。ALP により有機リン酸エステルが加水分解されて局所のリン酸濃度が高められる結果、リン酸カルシウムの析出が促進されるというのがブースター説だが、小腸や胎盤はもとより、同じアイソザイムが局在している肝臓や腎臓では通常石灰化が起きないことはよく知られ

ている。従って、組織非特異的 ALP は石灰化には必要であるが、それだけでは十分ではなく、石灰化には阻害因子を含めた複数の因子やミネラル沈着の核となる硬組織の特殊な環境(細胞外基質、基質小胞)が複雑に係わっていると想像される。現在、動脈硬化における血管壁の石灰化や異所性石灰化を含めて、生体内での石灰化は基質小胞で開始されると考えられている⁵⁰⁾。基質小胞の形成に関しては必ずしもはっきりしないが、分離された基質小胞には Ca²⁺-ATP アーゼ、ピロホスファターゼ活性とならんで強い ALP 活性が検出されており、組織非特異的 ALP は基質小胞という限定された場でのみ石灰化に関係しているかもしれない。なお、基質小胞にはミネラルの結晶構造がみられ、それが小胞の周囲に成長して石灰化球を形成するが、重症型の低ホスファターゼ症患者の肥大軟骨細胞層では基質小胞は小型で、しかも結晶構造に乏しいという観察もなされている⁵¹⁾。

ヒトの ALP は腸管では粘膜上皮微絨毛に、胎盤では栄養膜上皮の合胞体細胞に、腎では近位尿細管上皮細胞の刷子縁に、また肝では毛細胆管微絨毛に膜酵素として局在している²⁷⁻²⁹⁾。いずれも物質輸送に関連した細胞の形質膜に局在していることから、以前から ALP と物質輸送との関係が想定されていた。大腸菌の ALP はヒトの場合と異なり可溶性であり、内膜と外膜との間の periplasm に存在している。リン酸を含まない培地で培養すると他の蛋白質とともに誘導されてくることから、リン酸の取り込みや輸送に関係していると考えられる。しかし、大腸菌の ALP は可溶性であることを考慮すると、内膜でのリン酸の輸送は別の蛋白質が担っている可能性が大きい。同じように、ヒトの ALP は大腸菌の ALP のように可溶性ではないが、当初漠然と想像されていたよう

な膜貫通型の酵素ではなく、その全てのアミノ酸は細胞外へ露出している(図5)。そのため、細胞表面で局所的にリン酸濃度を高めることはできても、それ自身はリン酸あるいは他のイオン(例えばCa²⁺)の輸送体としては働き得ない。従って、ヒトのALPは他の輸送体と共役することでリン酸ないしは脱リン酸された基質の輸送に間接的に関与している可能性がある。

ところで、低ホスファターゼ症では尿や血中のホスホエタノールアミン、ピロリン酸、ピリドキサルリン酸(PLP)が増加することが知られている。このことから、組織非特異的ALPがこれらの化合物を天然の基質としている可能性が考えられる³⁹⁾(図9)。特にピロリン酸は、低濃度では非結晶性の不定形リン酸カルシウムの生成を促進するが、高濃度では hidroキシアパタイト表面に吸着してその形成、成長を阻害し結晶毒のように働く。そこで、ALPは阻害物質であるピロリン酸を加水分解することで石灰化を促すという仮説が唱えられていた(FleischとNeuman⁵²⁾)。石灰化しつつある硬組織でのピロリン酸の働きやその濃度など未だに不明な点が多いが、今後さらに検討されるべき仮説である。

また、cDNAのホモロジー検索により、ALPには細胞外基質の蛋白質(cartilage matrix protein)やレセプター(C3bi receptor, leukocyte adhesion receptor), complement factor B, von Willebrand factorなど高いホモロジーを示すドメインがあることが報告されていた⁵³⁾。予想されたようにALPには他の蛋白質に結合する性質があり、特に基質小胞から抽出されたALPはコ

ラーゲン分子(特にII型, X型)に結合した⁵⁴⁾。さらに、CHO細胞で発現された組織非特異的ALPを用いてもコラーゲン分子と結合することが確かめられた⁵⁵⁾。しかも、II型コラーゲン分子の存在下では組織非特異的ALPの基質に対する親和性が増加するという⁵⁵⁾。これらの性質はALPの新しい機能として注目に値する。一方、胎盤型ALPではコラーゲン分子との結合力は弱いですが、IgGとより強く結合することから、胎盤ではFcレセプターとして機能している可能性もあるらしい。

VIII. ノックアウトマウス

特定疾患の病体モデルとして、あるいは特定遺伝子の機能の解析のためにノックアウトマウスがしばしば使われる。ALPについては、組織非特異的ALPを欠損させたマウスが作出されてその性状がMacGregorらのグループにより初めて報告された⁵⁶⁾。しかし、出生後9日目のマウスには、重症例の低ホスファターゼ症の症例から予測されたような、骨格異常や骨端部の軟骨組織の変性などは全く観察されなかった。また、ホスホエタノールアミン、ピリドキサルリン酸は正常マウスに比べその血中濃度が20倍にも上昇したが、一方ピロリン酸濃度は変わらなかった。結果的には、ヒト低ホスファターゼ症の病体モデルがマウスではできなかったことになる。その理由は不明だが、ピロリン酸濃度が上昇しなかったことに関係しているのかもしれない。一方、ホスホエタノールアミン、ピリドキサルリン酸(ビタミンB₆)の代謝や輸送に関しては、少なくともマウスでは組織非特異的ALPが関与している可能性が高い。中でもピリドキサルリン酸は細胞表面の組織非特異的ALPにより脱リン酸化されてはじめて細胞内に効率よく輸送され、細胞内で再リン酸化されて補酵素として働くらしい。ノックアウトマウスはほぼ生後2週間後からてんかん様の重症の発作をおこし、寿命は1カ月弱である。著者によると、発作の一因は神経伝達物質であるγ-aminobutyric acid(GABA)の量の低下によるらしい。脳内でのGABAの生成にはグルタミン酸脱炭酸酵素が関与しているが、補酵素であるピリドキサルリン酸が脳内で不足することで、グルタミン酸脱炭酸酵素がうまく機能していない可能性がある。これを支持する結果として、ピリドキサルリン酸を腹腔内注入することで、3分の2のノックアウトマウスは延命されという。しかも延命されたマウスの観察から、切歯がもろくて折れやすいことや、エナメル質の低石灰化が観察された。このことは、少なくとも歯牙の石灰化の維持には組織非特異的ALPが関与していることを示している。

ごく最近 Millánらのグループにより、重症例の低ホスファターゼ症により近い症状を呈する組織非特異的

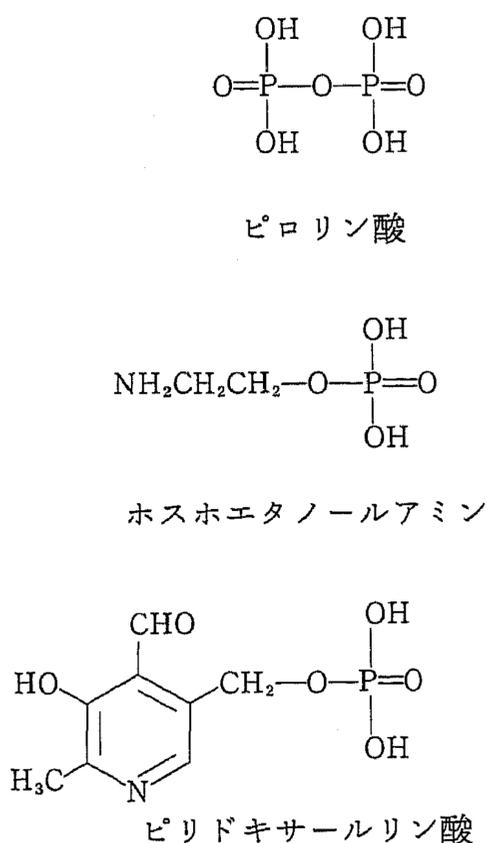


図9 低ホスファターゼ症患者の尿、または血中に増加するリン酸化化合物

ALPのノックアウトマウスの系が作出された⁵⁷⁾。このノックアウトマウスは出生直後は見かけ上正常であるが、生後4-6日目から体重の増加が落ち、生後~10日で死亡した。なお、その時点での体重はコントロール群の30-50%であった。死亡1-2日前から激しいてんかん様の発作をおこすようになり、長時間の発作がもとで死亡し、その際、胸郭、肺組織そして脳室内にしばしば出血が見られることがあった。その他、無呼吸、脾臓や胸腺の異常、腸の機能障害、体温の低下などの自律神経系の異常に関連していると考えられる様々な症状を呈し、そして神経、特に自律神経の形態に異常が認められた。一方、骨に異常については、胎児及び出生直後では認められなかったが、生後8日目では頭蓋側壁、肩甲骨、脊椎骨、肋骨に著明な低石灰化が観察され、骨端部の軟骨組織に異常が観察された。また、腓骨、肋骨の自然骨折、切歯の破損の例もあった。但し、ホスホエタノールアミン、ピロリン酸、ピリドキサルリン酸の血中濃度については報告されていない。以上のことから、Millánらは、組織非特異的ALPは(1)胎生期における神経管の発生と(2)生後の骨代謝及び石灰化の維持に関与していると考えている。

以上組織非特異的ALPのノックアウトマウスについてやや詳しく紹介した。MacGregorとMillánのグループが作出したノックアウトマウスは、同一の遺伝子が破壊されたにもかかわらず、異なる症状を呈する理由はよくわからないが、Millánはノックアウトマウスの遺伝的背景(genetic background)の違いを可能性の1つにあげている。但し、ヒトとマウスではALPのアイソザイムの種類や分布が異なるため、ノックアウトマウスの結果を直ちにヒトに適用することには問題がある。少なくともマウスに関しては、組織非特異的ALPが生後の骨代謝及び石灰化の維持に関与していると考えてよいであろう。では、組織非特異的ALPは初期のミネラルの沈着には関与していないのだろうか。また、関与していると仮定して、組織非特異的ALPはどのような役割を果たしているのだろうか。依然として未解決の問題である。今後、組織非特異的ALPの機能の解明のためにはノックアウトマウスを含めたさらなる研究の進展が望まれる。

IX. あとがき

総説を書きながらALPに関しては実に多くの研究がなされていることに改めて気付かされました。他にも引用すべき多数の論文がありましたが、紙面の都合で割愛しました。特にこの総説では、できるだけ生化学的な話題に絞ったために大部分の形態学的、臨床研究の紹介を省略しました。この総説の題を「アルカリホスファターゼの生化学」とした所以でもあります。また、生化学の

面でも著者の不勉強、好みにより当然紹介すべき事項を書き漏らし総説としてバランスを欠いていることも充分考えられます。個々について御指摘をいただければ幸いです。また、それぞれのアイソザイムの組織特異的な発現機構の問題や酵素の誘導などに関する話題は、別の機会に譲ります。ノックアウトマウスに関する未発表論文の内容を紹介することを許可していただいたMillán博士(Umeå University)、ALPの遺伝子構造に関して教えていただいた折茂英生博士(日本医科大学)に深く感謝致します。最後に御校閲いただいた星和人博士に感謝致します。

文 献

- 1) Robison, R. (1923) *Biochem. J.* 17, 286-293
- 2) 大井田新一郎, 佐々木 哲 (1977) *口病誌* 44, 141-149
- 3) Fedde, K. E., Lane, C. C. & Whyte, M. P. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 400-409
- 4) Harris, H. (1989) *Clinica Chimica Acta* 186, 133-150
- 5) Millán, J. L. & Manes T. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 3024-3028
- 6) Watanabe, T., Wada, N., Kim, E. E., Wyckoff, H. W. & Chou, J. Y. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 21174-21178
- 7) Matsuura, S., Kishi, F. & Kaji, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 993-1000
- 8) Manes T., Glade, K., Ziomek, C. A. & Millán, J. L. (1990) *Genomics* 8, 541-554
- 9) Higashino, K., Muratani, K., Hada, T., Imanishi, H., Amuro, Y., Yamamoto, Y., Furuyama, J., Hirano, K., Hong, Y.-M. Shimoura, M., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1989) *Clinica Chimica Acta* 186, 151-164
- 10) Kominami, T., Oda, K. & Ikehara, Y. (1984) *J. Biochem.* 96, 901-911
- 11) Kim, E. E. & Wyckoff, H. W. (1991) *J. Mol. Biol.* 218, 449-464
- 12) Weiss, M. J., Henthorn, P. S., Lafferty, M. A., Slaughter, C., Raducha, M. & Harris, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7182-7186
- 13) Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T. & Ohyabu, T. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 450, 154-164
- 14) Low, M. G. & Finean, J. B. (1977) *Biochem. J.* 167, 281-284
- 15) Micanovic, R., Brink, B. L., Gerber, L., Pan, Y.-C.,

- Hulmes, J. D. & Udenfriend, S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1398-1402
- 16) Takami, N., Ogata, S., Oda, K., Misumi, Y. & Ikehara, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3016-3021
- 17) 池原征夫 (1988) *実験医学* 6, 692-697
- 18) Udenfriend, S. & Kodukula, K. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64, 563-591
- 19) Engle, M. J., Mahmood, A. & Alpers, D. H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11935-11940
- 20) Oda, K., Cheng, J., Saku, T., Takami, N., Sohda, M., Misumi, Y., Ikehara, Y. & Millán, J. L. (1994) *Biochem. J.* 301, 577-583
- 21) 木下タロウ, 竹田潤二 (1994) *生化学*66, 1471-1487
- 22) Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T. & Kinoshita, T. (1993) *Cell* 73, 703-711
- 23) 中熊秀喜 (1994) *生化学*66, 137-149
- 24) Brown, D. A. & Rose, J. K. (1992) *Cell* 68, 533-544
- 25) Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A. & Rodriguez-Boulan, E. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 2145-2156
- 26) Simons, K., & Wandinger-Ness, A. (1990) *Cell* 62, 207-210
- 27) 高橋六一 (1972) *歯科学報* 72, 21-51
- 28) 小沢英浩, 山田まりえ, 山本敏男, 高野吉郎, 内田隆, 岩久文彦, 森田修一(昭和54年3月) *骨代謝* 12, 6-15
- 29) Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y. & Ozawa, H. (1996) *Histochem. & Cell Biol.* in press.
- 30) Anderson, R. G. W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10909-10913
- 31) Rodgers, W., Crise, B. & Rose, J. K. (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 5384-5391
- 32) 西島正弘 (1995) *蛋白質, 核酸, 酵素* 40, 359-369
- 33) Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. & Parton, R. G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30745-30748
- 34) Schnitzer, J. E., McIntosh, D. P., Dvorak, A. M., Liu, J. & Oh, P (1995) *Science* 269, 1435-1439
- 35) Low, M. G. & Saltiel, A. R. (1988) *Science*, 239, 268-275
- 36) Van't Hof, W., Rodriguez-Boulan, E. & Menon, A. K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24150-24155
- 37) 久下小百合, 福島慶子, 大倉 隆司, 山下克子(1996) 第69回日本生化学会大会, 第19回日本分子生物学会年会合同年会発表抄録集 2-p-0027
- 38) Rothbun, J. C. (1948) *Am. J. Dis. Child* 75, 822-831
- 39) Whyte, M. P. (1994) *Endocrine Rev.* 15, 439-461
- 40) Weiss, M. J., Cole, D. E. C., Ray, K., Whyte, M. P., Lafferty, M. A., Mulivor, R. A. & Harris, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 7666-7669
- 41) Weiss, M. J., Ray, K., Fallon, M. D., Whyte, M. P., Fedde, K. N., Lafferty, M. A., Mulivor, R. A. & Harris, H. (1989) *Am. J. Hum. Genet.* 44, 686-694
- 42) Henthorn, P. S., Raducha, M., Fedde, K. N., Lafferty, M. A. & Whyte, M. P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9924-9928
- 43) Henthorn, P. S. & Whyte, M. P. (1992) *Clin. Chem.* 38, 2501-2505
- 44) Greenberg, C. R., Taylor, C. L. D., Haworth, J. C., Seargeant, L. E., Philipps, S., Triggs-Raine, B. & Chodirker, B. N. (1993) *Genomics* 17, 215-217
- 45) Orimo, H., Hayashi, Z., Watanabe, A, Hirayama, T., Hirayama, T. & Shimada, T. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3, 1683-1684
- 46) 折茂英生, 五関正江, 佐藤清二, 島田 隆 (1996) 第69回日本生化学会大会, 第19回日本分子生物学会年会合同年会発表抄録集 4-p-1057
- 47) Aamra, J. F., Cheng, S. H. & Smith, A. E. (1992) *Trends in Cell Biology* 2, 145-149
- 48) 柴田寿信, 大橋 靖, 織田公光(1996) *歯科基礎* 38, p144
- 49) 久保木芳徳 (1995) *蛋白質・核酸・酵素* 40, 475-491
- 50) 早川太郎, 須田立雄著 *口腔生化学* (第2版) 医歯薬出版
- 51) Ornoy, A., Adomian, G. E. & Rimoin, D. L. (1985) *Am. J. Med. Genet.* 22, 743-758
- 52) Fleish, H. & Neuman, M. W. (1964) *Am. J. Physiol.* 200, 1296-1300
- 53) Tsonis, P. A., Argraves, W. S. & Millán, J. L. (1988) *Biochem. J.* 254, 623-624
- 54) Wu, L. N. Y., Genge, B. R., Lloyd, G. C. & Wuthier, R. E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 1195-1203
- 55) Bossi, M., Hoylaerts, M. F. & Millán, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 25409-25416
- 56) Waymire, K. G., Mahure, J. D., Jaje, J. M., Guilar-te, T. R., Coburn, S. P. & MacGregor, G. R. (1995) *Nature Genetics* 11, 45-51
- 57) Narisawa, S., Frohlander, N. & Millán, J. L. submitted for publication