

## サテライトシンポジウム

### 骨形成細胞のホスファターゼと ATPase

1.

#### 組織非特異型アルカリホスファターゼと低ホスファターゼ症の発症機序

(Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and molecular basis of hypophosphatasia)

新潟大学大学院医歯学系(歯)口腔生化学分野

織田公光

ヒトには4種類のアルカリホスファターゼのアイソザイムが知られている。1)組織非特異型、2)小腸型、3)胎盤型そして4)生殖細胞型である。組織非特異型は別名肝/骨/腎型酵素とも呼ばれており、骨以外にも肝臓、腎臓、その他に広く分布するアイソザイムである。4種のアイソザイムの中でその生理的な役割が明らかになっているのは組織非特異型で、その遺伝子上の突然変異に起因して低ホスファターゼ症を発症する事が知られている。低ホスファターゼ症は临床上、重症例の1)周産期型と2)乳児型、それに軽症例の3)小児型、4)成人型そして5)歯限局型に分類されている。特に重症例では骨の石灰化不全が顕著で、しばしば致死的である。一方、ノックアウトマウスの解析から長らく不明であった組織非特異型酵素の天然の基質は無機ピロリン酸、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)であることが強く支持されている。特に、無機ピロリン酸は高濃度ではハイドロキシアパタイトの結晶毒として作用する事が知られており、突然変異により組織非特異型酵素の活性が低下した患者の骨の形成部位では、無機ピロリン酸が分解されないためにハイドロキシアパタイトの形成(石灰化)が阻害されると考えられている。

さて、現在までに全世界で 188 例の組織非特異型酵素遺伝子の突然変異が報告されており、その約80%はアミノ酸の置換によるミスセンス変異である。発表者はこの 10 年間、重症の低ホスファターゼ症に関連した変異を中心に、変異が組織非特異型酵素に及ぼす影響を細胞レベルで解析を行ってきた。その結果大別して、1)本来 GPI (glycosylphosphatidylinositol)-アンカー酵素として細胞表面に発現している本酵素が、細胞内輸送の過程で小胞体やゴルジ装置(シス)で滞留して、最終的に変異タンパク質としてユビキチン化を受けた後、プロテアソームで分解されることを報告した。一方、2)野生型とほぼ同じ速度で細胞表面には到達するが、細胞表面で触媒活性が著しく低下している変異酵素2例を最近見いだしている。以上の研究から、低ホスファターゼ症の発症メカニズムは個々の変異により大きく異なることが明らかになりつつある。

2.

#### 骨芽細胞におけるプロテインフォスファターゼの発現と機能

Expression and function of protein phosphatases in osteoblastic cells.

岡村裕彦<sup>1</sup> 吉田賀弥<sup>2</sup> 羽地達次<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔組織学分野

<sup>2</sup>徳島大学・歯学部口腔保健学科・口腔保健基礎学講座

蛋白質リン酸化状態の変化は細胞の増殖、分化および細胞死など様々な現象に関与している。ところが、蛋白質リン酸化と表裏一体であるにもかかわらず蛋白質脱リン酸化に関する研究は、蛋白質リン酸化の研究に比して遅れてきた。

プロテインフォスファターゼ (PP)ファミリーは PP1, PP2A, PP2B/Calcineurin, PP4-7 から構成されるセリン/スレオニン脱リン酸化酵素である。我々は骨芽細胞における PP1, PP2A および PP2B/Calcineurin の発現と機能に注目して研究を進めてきた。PP1 の触媒サブユニット ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ) の細胞内局在は特徴的な分布を示した。PP1 $\alpha$  は核に、PP1 $\gamma 1$  は核と核周辺に、PP1 $\delta$  は核小体に特異的に局在した。骨芽細胞では PP1 $\gamma 2$  の発現は認められなかった。また、PP1, PP2A の特異的阻害剤であるオカダ酸とカリクリン A を用いた研究から PP1 と PP2A が骨芽細胞の分化やアポトーシスに関与することが示された。MC3T3-E1 細胞をオカダ酸で処理すると、ALP, RANKL および Cbfa-1 の発現が誘導された。我々は PP1 の基質である PKR に注目し、骨芽細胞における PKR の役割を解明するために PKR 変異細胞株を樹立した。PKR 変異細胞は *in vitro* において骨分化マーカーの発現が弱く、石灰化能を欠如していた。よって、PP1 は PKR の機能調節を介して骨芽細胞の分化に関与すると考えられる。

PP2B/Calcineurin の触媒サブユニット (CnA) は遺伝子欠失マウスの解析などから骨代謝においてその重要性が明らかになってきたが、詳細な機構はよく分かっていない。我々は骨に必須の転写調節因子 Osterix と相互作用する因子を解析した。Osterix 蛋白には CnA 結合モチーフが存在する。Flag タグした Osterix (F-Osx) を細胞内に導入し免疫沈降を行うと CnA が共沈した。また *in vitro* で F-Osx を発現させた細胞抽出液をリコンビナント CnA と反応させるとリン酸化が抑制された。以上の結果は PP2B/Calcineurin は Osterix 蛋白のリン酸化に関与し、その機能を調節することを示唆する。

3.

ATP をリン酸供給源とする骨石灰化の可能性

Possibility of bone mineralization mediated by ATP as a phosphate source.

中野裕紀子<sup>(1)</sup>、高野吉郎<sup>(2)</sup>、Mari T. Kaartinen<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>マギル大学歯学部 <sup>(2)</sup>東京医科歯科大学大学院 硬組織構造生物学分野

体液のカルシウムとリン酸イオンの活動度積はアパタイトの溶解度積よりも高く過飽和であるが、生体の生理的石灰化現象は骨や歯などいわゆる硬組織でしか生じない。生体では、硬組織形成の場においてのみハイドロキシアパタイト結晶を析出させる何らかの制御機構が働いている

に他ならない。骨の初期石灰化誘導には phosphatase 特に alkaline phosphatase (ALPase)による局所のリン酸 (Pi)濃度の押し上げと石灰化阻害剤であるピロリン酸 (PPi)の除去、および基質小胞の働きが重要といわれている。近年では、phosphatase は細胞外基質中の Pi 濃度を局所的に上昇させるのみならず、PPi との存在比を変化させることで石灰化の誘導と結晶組成を決定し、さらには細胞外基質と骨芽細胞を媒介する outside-in シグナルとしても働くことが報告されている。このように石灰化と phosphatase およびその反応生成物であるリン酸の役割については多くの研究報告があり、情報の蓄積も進んでいるが、phosphatase の生理的基質の特定と生体内での酵素の挙動の全貌は未だに解明されていない。

骨型 ALPase である tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP)は、Hypophosphatasia 症例やノックアウトマウスの解析から、骨石灰化を担う重要な因子であることが証明されている。しかしながらこれらの患者、動物では低石灰化ながらも骨の形成が進行するため、TNSALP 以外の phosphatase がこの酵素の欠損を補っている可能性が強く示唆されている。TNSALP の生理的基質の候補としては PPi、pyridoxal-5'-phosphate (PLP)、phosphoethanolamine (PEA)、adenosine 5'-triphosphate (ATP) が挙げられるが、このうち、PPi、PLP、PEA は Hypophosphatasia 患者や TNSALP ノックアウトでその血中値が上昇していることから、TNSALP の生理的 (特異的) 基質であると推定される。しかし ATP の血中濃度は同一条件下で変化が見られないことから、ATP は TNSALP 以外の酵素 (phosphatase/ATPase) によって恒常的に加水分解されている可能性が伺われる。

以上を踏まえ、ここでは骨芽細胞とその細胞外基質における ATP の加水分解の実際とそれが骨石灰化に果たす意義について、*in vivo*での酵素活性とその局在性および培養骨芽細胞における石灰化誘導実験の結果を基に検証してみたい。

#### 4 .

##### 骨芽細胞の Ca-ATPase の性質と機能

Characterization and function of Ca-ATPase in osteoblast

出山義昭、小畑 真、El-Beialy Waleed R., 吉村善隆、鈴木邦明

北大大学院歯学研究科口腔病態学講座

骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) にカルシウム (Ca) およびマグネシウム (Mg) 依存性 ATPase の存在が報告されているが、分離の報告はなく詳細は不明である。そこで、両 ATPase の分離を行い、Ca および Mg 依存 ATPase の性質を調べた。

MC3T3-E1 細胞を材料として通法により培養し、コンフルエント後1、2、3、4、5週で細胞を回収した。細胞をホモジェネートとしたのち、マイクロソーム分画と細胞質を得て Ca および Mg 依存 ATPase 活性を測定した。4 週目のマイクロソームをドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で可溶化後、グリセロールの密度勾配遠心を行って、Ca 依存 ATPase を Mg 依存 ATPase と分離した。それらの性質を調べ、以下のような結果を得た。

1) 両 ATPase 活性ともアルカリ性に至適 pH を示し、コンフルエント後、細胞の石灰化時期と一致して経時的に増加したことから、Ca あるいは Mg を輸送する ATPase として石灰化に關与する可能性が示唆された。

2) Ca 依存 ATPase 活性の総活性は4週で最大となり、主にミクロソーム分画に検出された。4週 of ミクロソームを SDS で可溶化後のグリセロールの密度勾配遠心により、Ca 依存および Mg 依存 ATPase を分離することができた。

3) Ca 依存 ATPase の性質を調べた。活性は中性からアルカリ性への pH のシフトに伴って増加し、pH 8.56 と pH 10.43 で 2 相性の最大活性を示した。活性はアルカリ性ホスファターゼ阻害薬では阻害されなかった。ATPase 阻害薬の vanadate では、pH 8.56 付近の活性は抑制されが、pH 10.43 付近の活性は抑制されなかった。

4) ATPase 活性は遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性に増加し、1.67 mM で最大となった。遊離 Ca に対する ATPase 活性の  $K_m$  値は 115 nM であった。

5) Ca に依存した活性は ATP 濃度依存性に増加した。Lineweaver-Burk plot は折れ曲がり、 $K_m$  値が 80  $\mu\text{M}$  と 3.1 mM の高、低両親和性の結合部位が検出された。リン酸化反応中間体を形成する P 型 ATPase の特徴を示した。

6) Ca 依存 ATPase 活性は  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  および 2 価金属イオンのキレーターによって阻害された。

7) Mg 依存 ATPase 活性の遊離 Mg 濃度依存性を調べたところ、50% 活性化濃度 ( $K_{0.5}$ ) は 110  $\mu\text{M}$  程度であり 1.67 mM では最大値を示した。2.2 mM Mg 存在下で ATPase 活性の pH 依存性を調べたところ、至適 pH は約 8.5 のアルカリ性であった。

8) Mg 依存 ATPase 活性の ATP 濃度依存性を調べた結果を用いて Lineweaver-Burk のプロットを行ったところ直線は折れ曲がり、 $K_{0.5}$  が 0.08 および 1.7 mM の高、低 2 種類の親和性部位が検出された。

9) E1 細胞にはアルカリ領域に至適 pH を持つ Mg 依存 ATPase 活性が存在し、リン酸化反応中間体を形成する P 型 ATPase である可能性を示唆する。

以上の結果と従来 of 報告をもとに、骨芽細胞 of ATPase の性質と機能について考察したい。