原 著

解糖系酵素におよぼすフッ化物の影響

(F Series No. 12)

第1部 enolase

矢 崎 武*

概要：精製酵素およびマウス筋 homogenate 上清を使用し in vitro で、また in vivo ではマウスにFを含む水を1週間飲ませ、Fによる筋 enolase に対する影響を検索した。その結果 in vitro では homogenate 粗酵素に強い抑制を認め、特にFを含む粗酵素で酵素反応をスタートさせた場合非常に強い阻害を認めた (50%抑制率 0.5mM F)。これは今までの Warburg らの考え方だけでは理解できなかったが、2つの阻害型を考えることによつて解釈された。一つは不完全阻害(可逆性)、もう一つは H-factor (homogenate factor) の存在による完全阻害 (不可逆あるいは難可逆性)である。H-factor は homogenate 粗酵素の特性を成すもので、その働きは homogenate の蛋白を主とする成分がその中心となり、さらに Mg, HPO_4 , など各種イオンとによる総合作用と考えられた。また H-factor の働きの中に HPO_4 など陰イオンによる活性化促進作用も認めた。in vivo の実験では、control に対し100および 400ppm 群で有意の低下を認めた。これは一週間の高濃度急性毒性であり、必ずしもFと enolase による特異的反応の結果のみとは結論し得ない。しかし考えねばならないことは、H-factor の関与する阻害が一般に生体組織内で起り得るものと推測され、さらにこの阻害に時間的増強が認められたことから、微量Fの長期間投与の場合の酵素系に対する影響はさらに追試、検討する必要があるという点である。

The Effect of Fluoride on Glycolytic Enzyme System. Part 1: Effect on Enolase

Takeshi YASAKI

The effect of fluoride on purified enolase and the supernatant of mouse muscle homogenate was studied in vitro and the change of enolase activity in mouse muscle was determined after feeding fluoride water of graded concentration for a week. The crude enolase in homogenate supernatant was more strongly inhibited than purified enolase, particularly when the activity was assayed by the sample mixed with fluoride in advance, namely as high as 50% inhibition in 0.5mM F. The author introduced a new hypothesis of incomplete inhibition (reversible) and complete inhibition (irreversible). In the latter case, it required the third factor, i. e. homogenate factor (H-factor), to be fully demonstrated. It was contained in the homogenate and probably composed of phosphate, magnesium or other divalent metal and

*東京歯科大学大学院歯学研究科 衛生学専攻 (上田喜一教授指導)

Department of Hygiene, Tokyo Dental College.

昭和45年1月10日受付

special protein. With the H-factor, the enolase became very sensitive to fluoride and was strongly and irreversibly inhibited. The inhibition went on to the greater extent with time.

In vivo experiment, the slight inhibition of enolase activity was only observed at 100 and 400 ppm F feeding. The level was, however, so high that other enzyme systems might also be disturbed and the result might not be attributed solely to the effect of fluoride.

1. 解糖系酵素とフッ化物

フッ素のう蝕予防効果が認められて以来、特にフッ化物の局所塗布を中心としてその衛生学的応用研究がなされてきた。そして、一方全身的に投与しう蝕予防を期待する方法としては、水道水のフッ素化、食物への添加、錠剤として内服等が考えられた。全身的投与方法として最も一般的で効果の期待できる水道水のフッ素化は、1945年アメリカで試みられて以来各国で行われそのう蝕抑制効果が報告されている^{1,2,3,4)}。わが国においては、昭和27年から京都山科浄水場で0.6ppm濃度で12年間フッ素化が行われ、その予防効果が報告された⁴⁾。しかし現在水道水フッ素化に対し、特にわが国では次のような諸点が問題となっており、そのため水道水フッ素化は普及していない現状である。

水道水フッ素化の問題点⁵⁾

1. 毒性、安全性：全身の中毒、斑状歯。
2. 他の投与経路との優劣：局所塗布、食品添加。
3. 日本に適した至適濃度：食品中フッ素の影響。
4. 水道行政上の問題。

そこで著者はこれら問題点のうち一番問題になる毒性、安全性について、その最も基本的問題であるフッ化物による酵素阻害をとりあげその影響の検索を試みた。

古くから、フッ素が酵素反応を抑制することはよく知られており⁶⁾、生化学領域では酵素特に解糖系およびTCAサイクルの阻害剤としてフッ化物が使用されている。しかしこのような場合に使用されるフッ化物は、相当に高濃度であつて水道水フッ素化から考えれば生体内での実現性は疑わしい濃度である。

そこで比較的低濃度のフッ素による酵素系への

影響が問題となる訳であるがこの点では、Theorell⁷⁾は水道水フッ素化に用いる1ppm($0.53 \times 10^{-4}M$)は数種の酵素に対する抑制濃度に近いものでありしかも個体による感受性の差から考えれば必ずしも安全ではないと述べている。SmithとArmstrong⁸⁾はacid phosphataseおよびenolaseを用いて0.5, 1.0ppmのフッ素で影響のないことを確め、影響のある2~3ppmのフッ素は水道水フッ素化程度では、生体内濃度として実現し得ないと報告している。さらに彼らはacid phosphataseが低濃度のフッ素によつてむしろ活性増強あるいは活性安定化されることを認めている。Frajora⁹⁾は8ppmの高フッ素地帯で5種の血清酵素活性をしらべ、フッ素による変化を認めていない。WarburgとChristian¹⁰⁾はenolaseを精製、結晶化し、そのフッ素による阻害機構を明らかにした。彼らによれば、enolaseは Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} の存在で $10^{-4} \sim 10^{-2}M$ のフッ素によつてMg-fluorophosphoenolaseをつくり、それ以上のフッ素濃度では簡単なMg-fluoroenolaseをつくつて阻害されるという。そして解糖系および発酵系のフッ素による阻害はこのenolaseが阻害されるためであるとしている。Najjar¹¹⁾はphosphoglucose mutaseを精製、結晶化し、そのフッ素による阻害機構を同様にMg-F₂-Glucose-1-phosphate enzyme complexに求めている。その他では、Borei⁶⁾がフッ素による酵素への影響に関し詳細な総説を発表し、またHodge¹²⁾は酵素阻害を示すフッ素濃度を示している。

以上のように、各種酵素に対するフッ化物の影響は各方面から研究されているが、低濃度フッ素の生体内酵素系への影響という点ではいまだ十分なる確証をうるに至っていない現状である。そこで著者はそのような観点に立ち、フッ素に敏感といわれる酵素のうちenolaseを中心とした解糖系

酵素を取りあげ、フッ素による影響を検索し新たな知見を得たのでその概要を報告する。

2. enolase とフッ化物

enolase*は筋、酵母、をはじめその他解糖のある生物界に広く存在する酵素で、次の反応を触媒する。

図1 解糖系：Enolase の位置

この酵素は1934年 Lohmann と Meyerhof によつて見出されてから Warburg と Christian をはじめ、主として Wold, Ballou, Bücher, Malmström らによつてその性質が詳細に研究されてきた。それによれば、enolase は活性化において2価の金属イオンを必要とし、その順序は、 $\text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$ である^{13,14}。またその基質特異性は、2-phosphoglycerate (2PGA), phosphoenolpyruvate (PEP) のみに示される¹⁴。至適 pH は酵母のものは7.7、筋肉のものでは6.7¹⁵、6.9¹⁴である。

この酵素のフッ素による阻害は先に述べたように Warburg, Christian, によつて、Mg-fluoro-

phosphoenolase という結合による阻害機構が示されたが、他にも Ca^{2+} , Sr^{2+} による競合阻害¹⁸ さらに Mg, Mn などの金属あるいは 2PGA の高濃度での阻害も報告されている^{14,16,17,19}。ところが意外なことに、フッ素による阻害現象の研究は、Warburg, Christian 以来詳細な報告を見ることはできない。そこで著者は彼らとはやや異つ

た見地から改めてこの問題を取りあげてみた。

3. 実験材料及び方法

3.1 in vitro 実験

基質 2PGA (三ナトリウム塩)および enolase (兎筋肉より抽出、硫酸アンモニウム中結晶性懸濁液、約27単位/mg/0.5ml)は Boehringer・Mannheim 社製標品を用い、それぞれ蒸留水に溶解あるいは希釈して用いた。酵素は必要量だけ使用直前に氷冷した蒸留水に希釈し、氷中に保存した。動物組織を用いる実験では、体重20gの♂マウスを撲殺後、後肢筋肉300mgをとり0.9% KCl 10mlを加え、Potter-Elvehjem型 homogenizer (Teflon pestle 付)で2分間 homogenize した後、10,000g で25分遠沈その上清を粗酵素液として用いた。この間の操作はすべて 0°C あるいは氷中にて行つた。

3.2 in vivo 実験

平均体重20gの♂ dd 系マウスを1群10匹づつ4群に分け、それぞれ0, 10, 100, 400ppmのフッ素(F)を含む水を一週間自由に飲ませ、7日目に24時間断食後撲殺し後肢筋肉を採取した。以下 in vitro の場合と同様に homogenize し遠沈後上清を粗酵素液として酵素活性を測定した。

3.3 酵素活性値の測定

Warburg, Christian の分光光度法¹⁰に基づく Marmström の報告²⁰にしたがい、これを改変して行つた。基本とした反応液組成は final concentration で、2PGA $2 \times 10^{-3}\text{M}$, MgSO_4 $5 \times 10^{-3}\text{M}$,

* EC 4. 2. 1. 11 : 2-Phospho-D-glycerate hydrolyse
常用名 Phosphopyruvate hydratase
別名 Enolase

EDTA $1 \times 10^{-3} \text{M}$, Tris(hydroxymethyl) amino-methan-HCl buffer $5 \times 10^{-2} \text{M}$, pH 7.0, 酵素液 0.1ml を含み蒸留水で final volume 3.0ml とした。反応は 30°C で行い, 1 cm 石英液槽を用い 3 分間 preincubation 後, $240 \text{m}\mu$ における吸光度の単位時間(分)当りの変化を測定した。光電光度計は伊藤超短波 DU-3 型の紫外部を改良したものを用い, これにレコーダーを装置し吸光度の変化をチャート上に記録した。液槽温度は thermospacer によつて一定に保った。なお酵素反応を開始する方法として, 最後に酵素を添加した時点をスタートとする場合 (E.s) と最後に基質を入れた時点をスタートとする場合 (S.s) とを区別して行つた(図 2)。実際に両者の間で抑制の様相が異つていたからである。

酵素活性値は Warburg らの速度定数を以つてする方法に対する Malmström の反論²⁰⁾ にしたがひ初速度を以つて活性値とした。すなわち 1 cm

図 2 酵素反応スタートの方法

液槽において $240 \text{m}\mu$ での 1 分間当りの吸光度の変化を蛋白量で除した値 ($\Delta \text{OD}_{240 \text{m}\mu} / \text{min/g}$ 蛋白) を以つて活性値とした。

なお, 粗製酵素使用の注意として反応初期の粗酵素それ自身による吸収, そして他酵素 (phosphatase, phosphoglyceromutase 等) による基質の分解が挙げられている²¹⁾。前者については特にそのような所見を認めなかったが, 念のため反応スタート 30 秒後の ΔOD を採用, 後者については精製 alkaline phosphatase (Sigma Chemical Co.) を用い, 精製 enolase に対する影響をしらべたが高濃度の phosphatase でむしろ抑制的傾向さえ

認めたためこの影響はないものと見なした。

3.4 その他

蛋白量は Lowry らの方法²²⁾ にしたがひ標準蛋白としては bovin albumin 結晶 (第一化学薬品製) を用いた。リン (P) の定量は Fiske-Subbarow 法, マグネシウム (Mg) は原子吸光法で測定した。原子吸光分光光度計は日立 207 型を使用。F としては NaF を用い, 蒸留水はすべてガラス蒸留器で再蒸留したものを使用した。

4. 実験成績と考察

4.1 精製酵素に関する実験成績と考察

1) Mg の影響

低濃度域では明らかな Mg 依存性を示し, 10^{-4}M では 50% 以下の活性値しか示さなかった。高濃度域では, ほとんど影響がなく 10^{-1}M 以上で僅かな抑制を示すにすぎない(図 3)。これに関してはすでに Malmström^{16,17)}, Wold, Ballou¹⁴⁾,

図 3 精製酵素標品に及ぼす Mg の影響
最適 Mg 濃度 (5 mM) の活性値に対する %
enolase: $7 \mu \text{g}$ (0.18u)

Boser¹⁹⁾ らの報告があるが, 今回の結果はそれらの報告にくらべ特に Mg 高濃度のところではつきりとした抑制を認めることができなかった。Wold, Ballou の場合, KCl 存在下での測定結果が今回の場合に比較的近いパターンを示しており, それについて彼らは K イオンの影響を考えているが確証を得ている訳ではない。しかし今回の

場合、そのような測定条件のちがいと考える他はない。Boser の場合は酵素反応を基質添加から開始させているために、Mg 高濃度域での抑制が強くあらわれたと考えられる。著者の実験でも基質で反応をスタートさせた場合 (S.s) には、酵素で反応をスタートさせた場合 (E.s) にくらべはつきりとした高濃度 Mg による抑制を認めた。

この障害は非競合障害であり、過剰の Mg が酵素の両 imidazol 基と直接に結合し不活化を呈するものと解釈されている¹⁴⁾。つまり S.s の場合には、基質を入れる前 medium 中で酵素と Mg が十分に結合する時間が与えられたと考えられる。また逆に E.s の場合抑制が小さかったのは、酵素の imidazol 基に Mg の結合と基質の結合が同時に競合して行われ、反応が進行しえたためと考えられる。さらに Mg による障害が不活性な Mg 基質複合体によるものでないことも示している。

2) リン酸 (HPO_4) の影響

条件を同じくするためリン酸 buffer としてではなく、 NaH_2PO_4 あるいは KH_2PO_4 、として medium に添加した。その結果 10^{-3}M 迄活性値に影響を認めず、また Na 塩と K 塩とに差異を認めなかった。これ以上の濃度の添加は medium pH の低下を来し活性値も低下した。このイオンに関しては Warburg ら¹⁰⁾もこれ単独で障害を示さないことを認めている。

3) F の影響

medium 中に F を加えた場合 E.s と S.s とで相違を認め、1~10mM の F 濃度域では S.s の抑制が大きくそれ以上の濃度では同じ程度の抑制率を示した。50%抑制は E.s では 7.6mM, S.s では 3.2mM で示された (図4)。F を含まない control における活性値の E.s と S.s のちがいにに関しては後程検討する。S.s で抑制が大きかったのは Mg の場合と同様に酵素と F とが十分に接触する状態にあつたためと考えられ、E.s の場合は F と酵素は接触しながらも同時に酵素反応が進行していったため比較的小さい抑制であつたと考えられる。さらに F 高濃度域で抑制率が同程度になつたことは F による障害に限界があることを示している。これに関しては後で考察する。

図4 精製酵素標品におよぼす medium F の影響
F=0 活性値に対する%, enolase: $7\mu\text{g}$ (0.18u)

表1 精製 enolase の F 抑制におよぼす Mg の影響

	对 照	实 験 群			
F mM	0	5	5	5	5
Mg mM	5	5	10	50	100
活 性 值	141	105	105	60	42

次に予め酵素液中に F を加えたものを使用すると、E.s は medium 中に F のある場合の E.s と一致するが S.s ではおそらく medium 中に F が解離して低濃度となるためであろうが非常に小さい抑制しか示さなかつた。これらの解釈は後に 4.4 で述べる。

4) F, Mg, の影響

F 濃度を一定 (5mM) に保ち Mg 濃度を変化させると、Mg 量の増加と共に活性値の低下を認めた (表1)。これから F による抑制を Mg が強めていることが判るが、Warburg らの報告のように Mg 濃度の変化が障害において 10 倍の変化を来す程にはその効果を認めることはできなかつた。そして F 濃度にくらべて非常に高濃度の Mg を必要としていることから、Warburg らのいう相乗的作用より相加的作用あるいは Mg 高濃度の非競合障害が重なつたものと考えた方が考え易いように思われる。

5) F, HPO_4 , の影響

図 5 精製酵素標品に対する medium F の影響

F=0 活性値に対する%, medium に KH_2PO_4 1 mM, 添加, enolase: $7\mu\text{g}$ (0.18u), 20°C

HPO_4 を一定 (1 mM) に保ち F 濃度を変化させると, HPO_4 の共存しない状態にくらべ著しい抑制を認め, すでに 3.0 mM の F で 50 % 抑制を示した (図 5)。このように HPO_4 に F 阻害の強い増強効果を認めるが, medium 中 Mg の作用つまり Warburg らのいう F, Mg, HPO_4 , 3 イオンによる阻害として考えるべきものであるかも知れない。あるいはまた, 後で homogenate 粗酵素についても考察するように, Mg による活性化は HPO_4 , F による阻害に先立つ必要現象であるとも考えられる。このように生体組織でも解糖系の F による阻害には, HPO_4 が極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。

以上のような精製酵素の実験結果にもとづいて, 以下動物組織における F の影響を検索した。

4.2 組織 (マウス筋) homogenate 上清に関する実験成績と考察

a) medium に F を加えた場合

反応 medium 中に F を加えると, S.s で極めて強い抑制が認められ, E.s では精製酵素の場合の E.s とほとんど同じ抑制パターンを示した (図 4 参照)。50% 抑制はそれぞれ E.s では, 7.4 mM, S.s では 1.0 mM の F 濃度で示された (図 6)。E.s と S.s の対照活性値が多少異なるので, それぞれの条件下の対照に対する 50% 抑制で現わした。

図 6 homogenate 粗酵素に対する medium F の影響
F=0 活性値に対する%

b) 酵素に F を加えた場合

粗製酵素である homogenate 上清に予め F を加えこれを酵素液として用いた。その結果, E.s において今迄の文献値にはみられない非常に強い抑制が認められ, S.s の場合も予想に反して比較的強い抑制を示した。50% 抑制は E.s で 0.5 mM, S.s で 1.4 mM の F 濃度で示されたが, 後に述べるようにおそらく微妙な時間的影響を受け活性値にバラツキが認められた。また 3 mM 以上の高濃度域の F では抑制率は極大に近づき 20% 前後の活性値を保持した (図 7)。これに反し a) の場合の S.s は高 F 濃度域ではこれよりも強い抑制 (10%

図 7 F 前処理 homogenate 粗酵素の活性

前後)に極大を示した。

以上 homogenate 粗酵素に認められた F による強い抑制現象をまとめると、

i) 特に a の S.s, b の E.s, S.s で強い抑制が認められ、その順序は b の $E.s > a$ の $S.s > b$ の $S.s > a$ の E.s, であつた。

ii) この強い抑制が起るには、つまり抑制の強い場合の共通条件として、F, homogenate の成分、および homogenate 中の enolase の 3 者が酵素反応の始まる前に、一緒に共存する時間（少くとも数分以上）を有していたこと。

iii) b の S.s が比較的強い阻害型を示したことから、この阻害が基質の存在にかかわらず不可逆性あるいは難可逆性であると推測される。

iv) F による阻害は一定濃度以上の F で極大に達した。これは精製酵素にも見られたが、homogenate 粗酵素では、それがさらに低濃度域の F で認められた。

v) a の E.s は精製酵素の同条件の E.s に類似した。

以上のような現象は、今までの Warburg らによる抑制機構からは解釈することが困難である。さらに、次のような回復現象も認められた。

4.3 回復現象について

homogenate 粗酵素の場合も、精製酵素の場合も、medium に F を加えた時の E.s を除いてつまり medium に F を加えた時の S.s, および酵素に予め F を入れた時の E.s, S.s, において酵素活

表 2 回復現象：homogenate 粗酵素の例

ΔOD 240 $m\mu$	control		medium + F		enzyme + F	
	E.s	S.s	E.s	S.s	E.s	S.s
sec						
30 ~ 60	0.081	0.106	0.074	0.053	0.011	0.032
60 ~ 90	0.078	0.102	0.076	0.062	0.017	0.035
90 ~ 120	0.080	0.099	0.074	0.072	0.020	0.037

性測定中 ΔOD が反応スタート直後に比較して僅かながら増強して行くことが認められた。その一例を表 2 に示す。これは一種の回復現象と考えられる。この回復現象を F の濃度関係から考えると次のように解釈される。すなわち 予め酵素中に

F を添加した場合の E.s, S.s, は medium 総量に対する F 絶対量の割合が小さく、一度結合した F が離れ易いなど酵素としては回復し易い状態になるものと考えられ、おそらく一定量以上の F は medium 中に解離し直接的あるいは間接的に酵素活性の回復を来すものと考えられる。ところが予め medium 中に F を加えておいた場合は反対に酵素量に対する F 絶対量が大きく、特に S.s では 予め酵素阻害に関与した F は、すでに F の存在する medium 中に添加されてももはや解離し難いなどの原因で F 濃度に比例的に阻害度も強まつていくと考えられる。また E.s の場合は阻害反応と酵素反応とが同時に進行するためむしろ次第に ΔOD の減少的傾向を来すものと考えることがができる。

ところが medium に F を入れた時の S.s で、予想に反して ΔOD の上述の時間的増加(表 2)が認められた。これは上のような単なる可逆的反応から解釈することができない。そこでこの場合、考えられ得ることは反応スタート時に入れる基質によつて回復される、あるいはされ易い、ある阻害の型が存在するのではないかということである。勿論、このような一定の型の存在は酵素中に F を入れた場合についても考えられることであろう。

著者は 4.2, 4.3 に見られたような、今迄の考え方では理解できない、一見矛盾する諸現象を次のように解釈することができると考えた。

4.4 抑制機構についての仮説

F による阻害には下記のように 2 種類あると仮定する。

(i) 不完全阻害型

F と酵素とが比較的簡単な形で結合しており、単純な解離あるいは基質、Mg などの存在で容易に回復する。つまりこの阻害は可逆性を示す。Warburg らのいう可逆性阻害もこれに含まれる。

(ii) 完全阻害型

例えば、homogenate 中のある因子 (homogenate factor: H-factor) によつて何らかの影響を受けて、F と酵素が回復し難い阻害を来し、不可逆性あるいは難可逆性を示す。この阻害型になるには、それらが共存する時間を必要とし、さらに

図 8 抑制機構 (著者の仮説)

A : 活性酵素 B : 不完全阻害酵素 C : 完全阻害酵素 H : H-factor, F : フッ素

その時間の影響を受けているようである。

そこで, homogenate 粗酵素, 精製酵素, それぞれの場合をこの考えに基づいて考察する。

a) homogenate粗酵素の場合

酵素にFを加えた場合: homogenate の中では, A: 阻害されていない酵素, B: 不完全阻害酵素, C: 完全阻害酵素, が一緒に混在している(図8)。ただしF量が大きくなるとA $\rightarrow$ BあるいはC, B $\rightarrow$ Cなどが進み, Aは少くあるいはなくなり, 当然過剰のFが存在するようになる。A $\rightarrow$ C, B $\rightarrow$ Cには homogenate 中の因子(H-factor)が関与する, したがってCの量は H-factor の量で支配, 制限されることになる。

E.s で抑制が強かったのは, 酵素反応開始と同時に主としてBおよびAの状態のものだけが, Fの解離あるいは基質, Mg, によつて回復または活性化されつつ酵素反応が進行したためであると考えられる。これに対し S.s の場合は preincubation 中に, Bあるいはある程度のCの回復, そして Mg によるAの活性化など基質による回復も行われ易い状態にあつたため, E.s より高い活性値を示したと考えられる。

medium にFを加えた場合: S.s の強い抑制は preincubation の間に medium 中で A $\rightarrow$ B あるいは C, B $\rightarrow$ C と完全阻害型への反応が進んだためと考えられる。この場合, この反応が進むためには, homogenate 粗酵素が medium に拡散しても H-factor が常に共存していたものと考えられる, すなわち homogenate はある程度のブロックの状態に拡散したと推測される。また先の予め酵素にFを加えた場合の E.s よりやや高い活性

値を示したのは, 一般的な E.s, S.s のちがいで, つまりこの S.s では preincubation の間に僅かながら, B, A あるいはCが回復そして活性化されたため, これに対し先の E.s では, そのような回復, 活性化が行われながら同時に酵素反応が進行したのと考えられることができる。

この場合の E.s は, A $\rightarrow$ C, B $\rightarrow$ Cに一定の時間を必要とするために, A $\rightleftharpoons$ Bの範囲内で酵素反応が進んでしまう, つまりこの結果, 次に述べる精製酵素の E.s と全く同じ条件下におかれることになり, 近似した抑制パターンを示したものと考えられる。

b) 精製酵素の場合

medium 中にFを加えた場合: 精製酵素では H-factor が存在しないために, A, B, Fの3者の関係から同じように解釈される。E.s ではA $\rightarrow$ Bが起りつつ酵素反応も進み比較的小さい抑制率を示した。S.s ではA $\rightleftharpoons$ Bはすでに右辺に傾いており, 基質あるいは Mg による回復そして活性化が起りつつ酵素反応が進むため, E.s よりはやや強い抑制を認めるものと思われる。Fが高濃度になると, E.s, S.s, にかかわらず, A $\rightleftharpoons$ Bの平衡は強く右辺にかたより, これが回復しながら酵素反応を起すため結局は同様な抑制パターンを示すようになると考えられる。

精製酵素にFを加えた場合: S.s ではFの medium 中への解離, つまり B $\rightarrow$ A が大きく Fは medium の final concentration として問題になるだけであるから抑制は小さい。E.s も同様に B $\rightarrow$ Aが簡単に起りつつ酵素反応が行われるため, 活性値としては S.s より小さいが, パターンとしては同様な抑制率を示したものと思われる。

c) homogenate 粗酵素, 精製酵素ともに高F濃度域で抑制率の変化が小さくなつた現象, すなわち抑制が極大を示すような現象もA $\rightleftharpoons$ B($\rightarrow$ C)間の平衡関係から理解できる。homogenate 粗酵素の場合前述のようにCは H-factor 量にしたがうという制限があつたが, その制限量をこえた所ではA $\rightleftharpoons$ Bの問題となり, その平衡は強く右辺にかたよつつ反応が進行する。その結果抑制率の変化も小さくなつてくるものと考えられる。精製酵

素の場合も全く同様にA $\rightleftharpoons$ Bの問題である。さらに homogenate 粗酵素の方が低濃度の F でこのようになるのは、主としてCの生成によるA, B量減少の問題と考えられるが、あるいはCのA, B, に対する影響があるのかも知れない。

4.5 H-factor について

著者の仮定した H-factor に関するこれ迄の知識からその性質をまとめてみると、

a) 精製酵素にはなく、あるいは少く, homogenate 上清中に含まれる。

b) enolase のFによる阻害を不可逆性あるいは難可逆性とし、増強させる。

c) この factor の関与する阻害現象には一定の時間が必要とされる。

d) homogenate enolase とこの factor は、homogenate 中では勿論、medium 中でも一所に存在し行動する。

等が挙げられ、これはそのまま H-factor は何かという疑問につながってくる。

そこまでまずFその他阻害剤のない状態で精製酵素と homogenate 粗酵素との性質のちがいから考えると、今回の実験に用いた精製酵素はウサギ筋肉から抽出のものであり、また homogenate 粗酵素はマウス筋肉を使用している。しかし酵母および筋 enolase の性質のちがいは報告されているが^{14,15)}、筋肉間で種の特異性の報告はみられない。そこで今回はそのような特異性はないものと考え、その他の点を検索した。

i) Fその他阻害剤のない状態で、一般に精製酵素は E.s と S.s の間に大きな活性値の相違を認め、homogenate 粗酵素ではその差が少なかった(図9)。それぞれの活性値について S.s/E.s 比をみると、精製酵素では1.1~3.5と非常に幅がある、つまり S.s, E.s 間の差が大きくその活性は比較的安定であつた、homogenate 粗酵素では1.0~1.5位で活性値も比較的安定で再現性もよかつた。

この原因として精製酵素、homogenate 粗酵素ともにまず考えられるのは、E.s の場合酵素自体の温度(0°)と medium 温度(30°) のちがい、酵素 pH と medium pH とのちがい、など酵素が

図9 酵素反応開始方法の差による活性

1) homogenate 粗酵素 2) 精製酵素標品
3) 煮沸 homogenate 上清+精製酵素標品,
精製 enolase: 7 μ g (0.18u)

medium 中で活性化される段階での時間の遅れの問題である。S.s の場合酵素は preincubation されるため、このような酵素と medium のちがいはないと考えられる。またこれらの原因は精製、粗製両酵素についていえる共通現象でもあり、実際、酵素を medium と同一温度に保ちあるいは酵素の pH をかえて反応を行つたが、S.s/E.s 比にほとんど変化を認めなかつたので、まず除外しようとする。

それゆえ、H-factor としての性質をも含め homogenate 粗酵素の特性を決定するものは、homogenate 中で homogenate enolase とそれととりかこむ homogenate 溶液にあるものと考えられる。そこで homogenate medium には enolase の活性化あるいは阻害に関与する factor が存在し、それは金属イオン、金属以外のイオン、その他の成分と分けて考えることができる。このような観点から以下の検索を行つた。

ii) 活性化に関与する金属として、すでに述べたように古くから Mg^{2+} など2価の金属イオンが知られている。そこで homogenate 粗酵素の S.s/E.s 比が小さい、つまり E.s が S.s に近い値を示した原因が homogenate 溶液中の2価の金属イオンによるものであるならば、逆に考えれば精製酵素にはこのような2価の金属イオンが含まれてい

なかつたために E.s で小さい活性値を示したものと考えるならば、予め Mg^{2+} などを精製酵素に添加しこれを用いて E.s, S.s を行えば、その比は小さくなるものと考えられる。その結果 (図9) Mg^{2+} の存在しない E.s にくらべ活性値の増大を認めるが、その値は不安定で再現性に欠ける点が認められた。それ故このような2価金属イオンの存在意義はある程度認められるが、これだけが精製、粗製両酵素の本質的の差ではないように思われる。

iii) homogenate 上清を煮沸、凝固蛋白その他のを遠沈しその上清を蒸留水に代用して精製酵素を調製し、E.s, S.s を測定した。

iii・a Fその他阻害剤を入れない場合 E.s, S.s は homogenate 粗酵素に近い S.s/E.s を示したが、ii) と同様にやや不定で再現性に乏しい点があつた (図9)。

iii・b このように調製した精製酵素を用いて F の影響をみると medium 中に F を入れた場合 S.s で、同条件の精製酵素、homogenate 粗酵素にくらべ後者に非常に近いが、やや弱い抑制パターンが示された (図10)。E.s は精製酵素、homogenate 粗酵素、そしてこの場合と、同じ条件下ではほぼ一致するパターンが示されたがその理由は前節と同様に考察される。

図10 [homogenate 煮沸上清+精製酵素] に対する medium F の影響
精製 enolase: $7\mu g$ (0.18u)

図11 [煮沸 homogenate 上清+精製酵素] に対する F 前処理の影響
精製 enolase: $7\mu g$ (0.18u)

iii・c この精製酵素に予め F を添加した場合、E.s は同様に homogenate 粗酵素に近く iii・b の S.s よりやや弱い抑制パターンを示した。S.s は不安定で、同様に抑制は弱いが homogenate 粗酵素に類似したパターンを示した (図11)。

以上は精製酵素が、主として熱凝固性蛋白成分以外の homogenate 中各種成分を酵素 medium として与えられたのであるが、homogenate 粗酵素の場合よりやや弱い抑制パターンを示し安定性にも欠ける点があつた。つまりこの場合の精製酵素は homogenate 中酵素と同じ状態になることができなかった、すなわちそれら煮沸上清成分中の factor が酵素と離れ易い形で存在したと考えることによつて上の実験結果は十分に説明される。このように、煮沸上清中成分の働きは、H-factor を含む homogenate の性質のすべてではないといふことができる。

iv) homogenate 粗酵素をセロファン膜を用いて蒸留水に対し一昼夜透析を行い、これを粗酵素として使用した。

iv・a Fその他阻害剤のない状態で E.s, S.s は精製酵素の場合以上に活性値のちがいを認め

S.s/E.s 比は3.5~5.5であつた。このことは先の実験でも示されたように Mg^{2+} をはじめとする homogenate 中のイオンが活性化に關与していることを示すものである。

iv・b 透析粗酵素に Mg を加えたところ、精製酵素の場合と同様に E.s で活性値の増大を認めた(図13)。S.s は iv・a の場合も同様であるがおそらく medium 中の Mg による活性化があるため、酵素に加えた Mg の影響はほとんど認められなかつた。透析粗酵素に関しては後程さらに検討する。

v) F による enolase 阻害が Mg, HPO_4 , 各イオンの影響をうけるという点を考慮し、各種 sample の P, Mg および蛋白の定量を行つた(表3)。その結果、大体予想どおり少くとも今回の

表 3 各種酵素の P, Mg, 蛋白量 (平均値)

	PmM(ppm)	MgmM(ppm)	蛋白 mg**
精製酵素	0.11 (3.4)	0.07 (1.7)	0.076
ho.*粗酵素	1.5 (48)	0.58 (14)	1.3
煮沸 ho. 上清	1.3 (40)	0.42 (10)	0.3
煮沸 ho. 上清 + 精製酵素	1.4 (43)	0.49 (12)	0.38
透析 ho.	0.08 (2.5)	0.05 (1.2)	1.1

* homogenate

** bovine albumin 相当量

実験では精製酵素と透析酵素は P および Mg 量でほとんど無視できる濃度であり、一方 homogenate 粗酵素では特に P 量が多く、すでに示したように HPO_4 存在下での F の影響が意味をもつてくることになる(図5参照)。

vi) v) の結果にしたがい精製酵素に HPO_4 と Mg を加え、さらにこれに F を添加し活性値を測定した(図12)。この結果 F の抑制は弱く、medium に HPO_4 , F を加えた場合に比べればさらに弱い抑制であつた(図5参照)。これは Warburg らのいう、 HPO_4 , Mg, F そして酵素が離れ易い complex をつくつたため、すなわち図8で考えた B の形であつたと考えられる。

vii) 透析粗酵素を用いこれに F, Mg, HPO_4 を予め添加し E.s の活性値をみると(表4), Mg, HPO_4 , F の3者が同時に存在する時に限つて明ら

図 12 Mg (0.5mM), HPO_4 (2mM), 添加精製酵素に対する F 前処理の影響
精製 enolase : $7\mu g$ (0.18u)

表 4 透析粗酵素に対する各種イオン添加の影響

濃度 1 mM	Mg *	HPO_4	Mg HPO_4	Mg F	F HPO_4	Mg HPO_4 F	con- trol
ΔOD /分	0.043	0.032	0.034	0.035	0.044	0.019	0.044

* 1 ~ 2 mM

かに他より強い抑制を認めた。精製酵素ではこれら3者の存在にもかかわらず、そのようなちがいを認めることができなかった。

以上の成績から、F による阻害には Mg, HPO_4 , F の3イオンが必要ということと、さらに透析粗酵素にあつて精製酵素にないあるいは少い因子の存在が大きな役割を果しているものと考えられる。おそらく enolase をとりかこみ酵素活性を安定化させそして煮沸上清因子と共に F による抑制を増強させ、あるいはそれら抑制因子の解離をおさえていたものは、蛋白成分を中心とするこの透析粗酵素中の因子であつたと考えられる。これを非透析因子としてその性質を探索するため以下の実験を行つた。

viii) 非透析因子の性質について

viii・a iv で述べたように透析粗酵素に対し Mg を添加しその影響をみると活性化は認められるが、精製酵素にみられたような低濃度の Mg ではほとんど活性化されなかつた(図13)。この程度の Mg は enolase 以外の蛋白その他にも結合

あるいは附着されてしまうためと考えられる。このように透析粗酵素の場合には、精製酵素に必要なとされる Mg 量よりそして homogenate 粗酵素から実測された Mg 量より高い濃度の Mg を必要とした。このことから、透析前の homogenate 粗酵素には Mg 以外にも活性化因子が存在し、それらの総合作用によつて活性が示されているものと考えることができる。だから透析粗酵素を Mg のみで活性化させるためには、homogenate における Mg 含有量以上の濃度が必要であつたと解釈できる。さらに、この Mg 添加実験では酵素活性の不安定性はみられなかつたが再現性に欠ける場合があつた、これは透析粗酵素の蛋白成分など sample 間での量的相違、さらに Mg が粗酵素中に入り結合する時間的因子も考慮する必要があるものと思われる。

viii・b 透析粗酵素に KH_2PO_4 を添加したところ Mg ほどではないが活性化を認めた(図13)。そしてこの時 medium 中の Mg を除くと活性化を示さないことから、 HPO_4 それ自体には活性化作用のないことが判る (Mg ではその予め酵素液に添加する濃度にしたがい medium 中の Mg を

除いても活性化を認めた)。これを特に K^+ の作用と考えられないことはないが、Wold, Ballou, が K^+ の働きについて示唆してはいる¹⁴⁾ がはつきりとしたものでなく、またこれまで一価の金属イオンによる活性化の報告はみられない。

viii・c 透析粗酵素に F を添加したところ、Mg, HPO_4 の場合より小さいが低濃度領域で活性化を認めた(図13)。この現象から考えれば、上の場合も K^+ より HPO_4 の働きであろうと考えられる。

HPO_4 と F による活性化の場合、特に sample により何らかの原因で再現性に欠ける点があつた。これは次のように理解できる、すなわちある状態ではこれらのイオンがおそらく電氣的に medium 中の Mg^{2+} を吸引し酵素の活性化を促進させる働きを示す。そしてその状態はこれらイオンの濃度だけの問題ではなく、酵素をとりかこむ蛋白その他、つまり非透析因子とこれらイオンとがどのような状態にあるかということによつて左右されるもので、sample 間で、あるいは後述する時間的影響によつて相違ができるものと考えられる。

図 13 透析粗酵素に対するMg, HPO_4 , F 前処理の影響、反応はすべて E.s で測定

表 5 Mg 0.5 mM, HPO_4 2.0 mM 添加透析粗酵素に対する F 添加の影響, E. s 法.

F mM	0	0.1	0.5	1.0	2.0
ΔOD/min	0.031	0.044	0.040	0.026	0.015

viii・d v) の結果にしたがい透析粗酵素にMg 0.5mM, HPO_4 2.0mM, それに F を添加した。しかしおそらく上に述べたように Mg 量不足のため、F を含まない場合でも十分なる活性化が認められず低濃度 F では活性化も認められ抑制がはつきりしなかつた(表5)。このことから、まず酵素が Mg その他活性化金属によつて活性化されることが F の阻害に先立つ必要条件であると考えられる。そこで Mg を増加させたところ homogenate 粗酵素に近い抑制パターンを認めることができた(図14)。

さらにもう一つ考慮しなくてはならないのはすでに述べてきたように、時間的影響である。

ix) homogenate 粗酵素に F を加え、添加後の

図 14 Mg (10mM), HPO_4 (1mM)を含む透析粗酵素に対するF前処理のおよぼす影響

図 15 酵素F前処理時間と活性値

酵素液調整後のF=0 活性値に対する%, 反応はすべて E.s 法

時間的経過が活性値におよぼす影響をみた (図 15)。その結果Fを含まない control 値の変化がほとんどないのにくらべ、F含有酵素は一樣に時間と共に活性値の低下が認められた。

この時間的影響がどうして起るのかを考えてみると、homogenate 粗酵素ではその中で、enolase が他の蛋白成分をはじめその他各種イオンなどにかこまれて、つまり、それらを medium として存在する。そしてそこにFが存在するようになると、Warburg からも述べているように¹⁰⁾当然、F、

Mg, HPO_4 などのイオンと酵素が complex をつくる時間が考えられる。しかし homogenate 粗酵素ではそれだけでなく他の特性つまり H-factor としての働きがそこにプラスされる。例えば、透析粗酵素の Mg による活性化を考えれば、Mg は enolase に特異的に結合する訳ではないので、すべてのあるいは大部分の enolase に Mg が結合するためには一定量の Mg が必要であり、かつ一定の時間が必要であると考えられる。また HPO_4 , F による活性化を考えると、これらのイオンが一部の enolase あるいは enolase のある部、あるいはまた enolase をとりかこむ蛋白その他に附着あるいは結合し、この段階で medium 中の Mg^{2+} を吸引し enolase の活性化を促進させたものと考えられるが、これが時間的経過によつて特にFは直接的あるいはその他のイオンと共に間接的に enolase と結合するようになると考えられる。またこの際Fの活性促進が小さかったのは、その電気的陰性度の他に直接的あるいは間接的阻害があるためであろう。 HPO_4 は pH 低下による以外はあまり抑制的に働かずFによる阻害機構で、そしてまたこの時間的影響の問題でも具体的にはどのように働くものか推測の難しい点が多い。なお pH はすべての場合で、S.s は勿論 E.s の場合も反応開始と同時に、 7 ± 0.05 におちつきこれによる影響はないものと考えられる。このように homogenate では、Mg 他活性化金属および HPO_4 など陰イオンを中心としたイオンがFと共に、蛋白その他の成分の中で酵素活性に対し促進から抑制に向つて作用し次第に強固な阻害形をつくつてゆくものと推測される。この阻害形はおそらく Mg あるいは他の活性化金属、 HPO_4 , F, 酵素の complex によるものと思われ、これが蛋白その他の成分によつて不可逆性あるいは難可逆性を示しているものと考えられる。しかし勿論このような complex ではない可能性も考えられる。

x) 以上 H-factor の働きを含めた homogenate の特性をまとめると、

1. homogenate 粗酵素は Mg^{2+} およびそれ以外の活性化金属を含み、おそらくそれらにより予めある程度活性化された状態にある。

2. Mg^{2+} およびその他の活性化金属, HPO_4^{2-} 他各種イオンは homogenate 粗酵素溶液中に存在し精製酵素のように易解離性を示さない。

3. homogenate 蛋白成分などに, ある状態で結合あるいは附着した HPO_4^{2-} , F^- は medium 中 Mg^{2+} を吸引して活性化を促進する。この働きは homogenate 中その他の陰イオンによっても示される可能性がある。

4. F による障害は, Mg , HPO_4 , F の 3 者共存によつて強く示されるが, 特に homogenate の蛋白を主とする成分の存在によつて不可逆性あるいは難可逆性となる。

5. homogenate の蛋白を主とする成分中での活性化あるいは抑制には, 一定の時間を必要としさらにその時間の影響をうける。

結局, H-factor としての働きは homogenate 中蛋白を主とする成分がその中心をなすものであつて, それに同じく homogenate 中の Mg 他活性化金属因子, HPO_4 他各種イオンとによる協同作用であつたといふことができる。

4.6 in vivo 実験の結果と考察

control 群に対し100および400ppm 群の筋 enolase 活性値に有意差を認めた (図16)。しかしこのような高濃度 F で認められた障害は, 直ちに F と enolase との特異的反応と結論することは困難で, 全身的代謝異常を来した上の一症状にすぎない可能性が十分考えられる。また飲料水より得た F は組織中の F 濃度としてどの程度実現性があるのか問題であり, 前述の in vitro 実験結果が示すように, 50%抑制率は最も敏感な状態で 0.5 mM F (約 10ppm) を必要としたが, この程度の組織中 F 濃度を来すためには相当高濃度の F を飲用する必要があるものと考えられる。しかし一つ問題になるのは in vitro 実験で認められた時間的影響, つまり低 F 濃度であつても長い期間に亘つた場合にどうだろうかという点である。これに関しては Riekstniece らも示摘しているところである²³⁾。しかし常に代謝の進行している生体を考えれば, in vitro でみられた時間的影響をそのまま適用することはむづかしいといえるが, 今後さらに追試, 検討の要求される所である。

図 16 筋 enolase 活性に及ぼす F の影響 (in vivo, 実験) 測定条件は 2PGA 2mM, $MgSO_4$ 0.5mM, EDTA 0.01mM, Tris-HCl buffer 50mM (pH 6.8), 筋 homogenate 0.1ml 20°C

図 16 附表 マウス 1 匹当たり, 1 週間の水および F 摂取総量

群	水摂取量 ml	F mg
対 照	34.6	0
10 ppm	32.4	0.324
100 ppm	31.9	3.19
400 ppm	24.1	9.64

5. 総 括

生体内酵素系に対する微量 F の影響を知るため, 特に F に敏感といわれる enolase をとりあげ, 精製酵素およびマウス筋 homogenate 粗酵素を用いて F の影響をしらべ, また in vivo 実験としてマウスに F を含む飲料水を 1 週間自由を与えその筋肉 enolase に対する影響を検索した。

1) 酵素反応をスタートさせる方法として, 酵素を加えた時点をスタートとする場合 (E.s) と基質を加えた時点をスタートする場合 (S.s) とでその活性値に相違を認め, その活性値比 S.s/E.s は精製酵素で 1.1~3.5, homogenate 粗酵素で 1.0

～1.5であつた。

2) homogenate 粗酵素ではFによる特に強い阻害が認められ、その阻害度は、酵素に予めFを加えた E.s>medium にFを加えた S.s>酵素に予めFを加えた S.s>medium にFを加えた E.s.の順であり、それぞれの50%抑制率は、0.5 mM, 1.0mM, 1.4mM, 7.4mM のF濃度で示された。

3) これらFによる阻害現象は2つの阻害型を考えることによつて解釈された。1つは可逆性の不完全阻害であり、他は不可逆性あるいは難可逆性の完全阻害である。そして homogenate 中は勿論、一般に生体組織内でもこのような阻害が起るものと推測される。

4) 不完全阻害は Warburg らの提唱した阻害型を含めた可逆性阻害で、その平衡は Mg, 基質あるいは単純なFの解離などによつて回復の方向に向い得る。

5) 1) でも示されたように homogenate 粗酵素には、精製酵素にみられない特異な性質を認めその原因は著者の提唱する H-factor(homogenate factor) によるものと考えた。

6) 完全阻害もこの H-factor の存在で起り、これには一定の時間を必要とし、また時間的にその阻害が増強することを認めた。

7) その他の H-factor の働きとして、homogenate 中 enolase を予め活性化し活性値比 S.s/E.s を1に近づけること、酵素活性を安定化させることなどが挙げられる。

8) homogenate 透析粗酵素において、2価金属イオンによる活性化は勿論、ある状態下で、 HPO_4 , F, の陰イオンによる活性化促進効果も認め、少量のFが活性増強あるいは安定化させる可能性があるという報告に対し、一つの裏づけを与えた。

9) 透析粗酵素に Mg, HPO_4 , Fを添加することによつて homogenate 粗酵素と同様な強い阻害を認めた。但しこの際まず Mg などによる活性化を前提条件とした。

10) 以上のような事実から、H-factor は homogenate 中各種蛋白を主とする成分がその働きの

中心をなし、Mg などの活性化金属因子、 HPO_4 他各種イオンとによる協同作用である、ということが出来る。

11) in vivo 実験では、control に対し、100および 400ppm 群で筋 enolase 活性値に有意の低下を認めたが、直ちにFと enolase との特異的反応の結果であると結論することはできない。

12) homogenate 粗酵素で時間的にF阻害の進行を認めたが、同じように生体組織で低濃度のFであつても、それが長期間に亘つた場合の影響はさらに追試、検討の待たれるところである。

稿を終るに際し、種々御指導御校閲を下された上田喜一教授に、併せて絶えざる御援助をいただいた西村正雄助教授に深謝します。なおその他教員諸氏の御助力に謝意を表します。

本研究の要旨は第17回口腔衛生学会総会(昭和43年7月)、第42回産業医学学会総会(昭和44年4月)、第180回東京歯科大学学会(昭和45年2月)に発表した。

参考文献

- 1) Arnold, F. A., Jr. Dean, H. T., Jay, Philip., and Knutson, J. W.: Effect of fluoridated public water supplies on dental caries prevalence. 10th year of Grand Rapids-Muskegon study. Pub. Hlth Rep., 71: 652-658, 1956.
- 2) Hutton, W. L., Linscott, B. W. and Williams, D. B.: The Brantford fluorine experiment. Interim report after five years of water fluoridation. Canada. J. Pub. Hlth. 42: 81-87, 1951.
- 3) McClure, F. J., (ed): Fluoride drinking waters., National Inst. of Dental Research, Bethesda, Maryland, 1962.
- 4) 美濃口玄他: 上水道フッ素化によるう蝕予防効果に関する研究, 厚生科学研究報告書, 昭34, 口腔衛生学会上水道フッ素化調査委員会: 上水道フッ素化のう蝕予防効果に関する調査報告, 口腔衛生学会雑誌, 12: 27-41, 1962.
- 5) 上田喜一: 上水道フッ素化の問題点, 歯界展望, 25, 927-936, 昭40.
- 6) Borei, H.: Inhibition of cellular oxidation by fluoride. Arkiv Kemi, Mineral. Geol., 20 A, No. 8: 1-208, 1945.
- 7) Theorell, H.: Caries prevention through fluorine. Summary of report by advisory committee of experts., Stockholm, 1959, p. 9.
- 8) Smith, Q. T., Armstrong, W. D. and Singer, L.: Inhibition of human salivary and prostatic acid phosphatase and yeast enolase

- by low fluoride concentration. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 102 : 170-173, 1959.
- 9) Frajola, W.J. : Fluoride and enzyme inhibition., in "Fluorine and Dental Health", edited by Muhler, J. C. and M. K. Hine., Indiana Univ. Press. 1959, 60-69.
 - 10) Warburg, O. and Christian, W. : Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments, Enolase. *Biochem. Z.*, 310 : 384-421, 1942.
 - 11) Najjar, V. A. : The isolation and properties of phosphoglucumutase. *J. Biol. Chem.*, 175 : 281-290, 1948.
 - 12) Hodge, H. C. and Smith, F. A. : Effect of fluorides on enzyme systems., in "Fluorine Chemistry" Vol. 4, Academic press. New York and London, 176-190, 1965.
 - 13) Wold, F. and Ballou, C. E. : Study on the enzyme enolase, 1. Equilibrium studies. *J. Biol. Chem.* 227 : 301-312, 1957.
 - 14) Wold, F., and Ballou, C.E., : Study on the enzyme enolase, 2. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 227 : 313-328, 1957.
 - 15) Holt, F. and Wold, F. : The isolation and characterization of rabbit muscle enolase. *J. Biol. Chem.* 236 : 3227-3231, 1961.
 - 16) Malmström, B.G., : The interaction of purified enolase with its activating metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 46 : 345-363, 1953.
 - 17) Malmström, B. G. : *Arch. Biochem. Biophys.* 58 : 381-397, 1955.
 - 18) Ohlmeyer, P. and Duait, R. : *Naturwiss.*, 29 : 672, 1941, 酵素ハンドブック (赤堀四郎監修), 朝倉書店, 1966, p. 641, 17) より引用.
 - 19) Boser, H. : Zur Heterogenität von Enzymen. 1. Über Enolase aus Kartoffelknollen. *Z. Physiol. Chem.* 315 : 163-170, 1959.
 - 20) Malmström, B. G. : "Enolase", in "The Enzymes", edited by Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrbäck, H., : Vol. 5 Acad. Press. New York and London. 1961, 471-494.
 - 21) Bücher, T. : Enolase from brewers yeast., in "Method in Enzymology", edited by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. : Vol. 1 Acad. Press. New York, 1955, 427-435.
 - 22) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 - 23) Riekstniece, E., Meyers, H. M. and Glass, L. E. : In vivo effects of sodium fluoride on serum proteins and enzymes as studied with starch gel electrophoresis. *Arch. Oral. Biol.* 10 : 107-117, 1965.