正常ラット唾液腺の酸性ホスファターゼについて

多 和 敏 一   奥 井 伊 佐 子
松 田   弘   村 川   明

大阪歯科大学 生化学教室*1

横 田   豊   阿 部   公 生

岐阜歯科大学 口腔生化学教室*2

〔受付：昭和48年10月5日〕

抄録：体重120g前後の健康呑竜ラット(♀)の顎下腺、舌下腺、および耳下腺組織中の酸性ホスファターゼ(EC. 3, 1, 3, 2)について、細胞内分布特性、および酵素学的特性を比較観察した。

分別遠沈法で分画した各種唾液腺の細胞質上清液、および顆粒画分中にはラット肝、血球、その他組織と同等の酸性ホスファターゼ活性が出現する。

細胞質成分中の活性は DEAE-セルロースカラムクロマト、あるいはセルロゲル電泳法により、特有のパターンに分画されるが、基質特異性や阻害剤の効果などから、細胞質溶性画分の活性がすべて顆粒画分由来と断定できない。また、同画分中の酵素は溶性酵素として存在するために化学的修飾を受けている可能性を示した。

緒 言

酸性ホスファターゼ(EC. 3, 1, 3, 2)は生体内における生理作用がいまだ明確でないにもかかわらず、その動態は古来から生化学的に、また臨床的に多大の興味をもたれてきた^{1,2)}。広く臓器や組織中に存在するが³⁾、そのうち前立腺に由来するものが特異的である。前立腺の発育は性ホルモン依存性で、酸性ホスファターゼは腺の成熟とともに増加する^{4,5)}。本組織の癌化により、著しい活性の増加がみられるが、前立腺癌は Huggins (1945, 1963)^{6,7)}の主張するホルモン依存性癌であり、その増殖は生体内部環境に応答を示す特異例である。酸性ホスファターゼはこれに対応した動態を示す。しかし、一般に健康血清中の活性発現には著明な性差がなく、これは各臓器や組織由来

のものが出現したと解されている³⁾。

一方、唾液腺の形態や機能にも生後熟成が認められ、例えばラット顎下腺については Jacoby et al. (1959)⁸⁾、Leeson et al. (1959)⁹⁾、Jacob et al. (1963)¹⁰⁾、Fukuda (1967)¹¹⁾、あるいは立花 (1971)¹²⁾らの、また、舌下腺では Leeson et al. (1961)¹³⁾などの報告があり、その他の動物に関する報告も多い¹⁴⁻²⁰⁾。

このような生後熟成がホルモン依存性であるか否かについては問題があると考えている。例えば、性ホルモンとの間に相関があるという Junqueira (1949)²¹⁾や、Screebny et al. (1955)²²⁾、あるいは Liu et al. (1969)²³⁾の報告や、副腎皮質ホルモン、あるいは甲状腺ホルモンとの相関について観察した Liu (1967)²⁴⁾の報告があり、また、最近では甲状腺ホルモンとの相関を観察した立花

Study on acid phosphatase of salivary gland in normal rats.

Tosikazu TAWA, Isako OKUI, Hiromu MATSUDA and Akira MURAKAWA (Department of Biochemistry, Osaka Dental University)

Yutaka YOKOTA and Kimio ABE (Department of Oral Biochemistry, Gifu College of Dentistry)

*1 大阪市東区京橋 1-47 (〒540)

*2 岐阜県本巣郡穂積町高野 (〒501-02)

(1971)¹³⁾の報告もあるが、被験動物全体からみた相関という観点からはこの効果が唾液腺のみを指向するものか、あるいは個体の生長、もしくはこれによる何らかの応答の結果であるのかという点において多少の疑問が残る。

われわれは動物の病態、特に担癌条件下にみられる生体側の反応を、細胞質成分のライソゾームに由来する酵素群の動態から観察しているが、これら研究の一環として唾液腺機能と病態との相関について検討を始めた。

ホルモン支配という観点にたつ前立腺と唾液腺の発育や、機能の比較などに関する問題は論外であるが、唾液腺の機能と病態に関する相関の検討には前述のような唾液腺の有する生後熟成という特性を十分に考慮する必要がある。このような観点と、今後の研究に関する基礎的な資料をうる目的から、今回は7~8週令の健康呑竜系ラット(♀)の唾液腺について、細胞質成分内に分布する酸性ホスファターゼ活性の生化学的な観察を行なった。

実験材料と方法

1. 酵素液の調製

実験材料は呑竜系ラット(♀)でCLEA固型飼料(CE-2)と水道水を自由に与えて飼育した。体重120g前後のラットはエーテル麻酔下で、両側顎下腺と舌下腺、および耳下腺を剔出した。

各唾液腺はそれぞれ、直ちに秤量してから、ガラス製Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで氷冷下に10倍容(v/w)の等張KCl液でホモジネートし、分別遠沈法により、細胞質成分の分画を行なった。700×g, 10分の沈渣は核分画とし、以下、上清を12000×g, 40分遠沈して、沈渣を顆粒分画(Part. 分画と略記)、さらに上清は105000×g, 40分の遠沈でミクロソーム(Micro 分画と略記)と、細胞質上清液(Cyto 分画と略記)に分画した。

核, Part. あるいは Micro 分画からの酵素の可溶化は凍結融解法²⁵⁾により、遠沈上清はそれぞれ粗酵素液として実験に使用した。

2. 酵素活性の測定

Bessey et al. (1946)²⁶⁾の報告に準じ、従来からの方法^{1,2)}に従って、*p*-ニトロフェニル磷酸(*p*-

NPP と略記)を基質として行なった。

本酵素の基質特異性観察には *p*-NPP, α -ナフチル磷酸(α -NP と略記)、および β -グリセロ磷酸(β -GP と略記)を基質として、先と同様組成の反応液を作製し、30分間、37°Cに温置後、10%トリクロル酢酸2mlを添加して反応を停止し、遠沈上清について Fiske et al. (1925)²⁷⁾の報告に準じて、生成した燐量を定量した。

基準反応液から基質、あるいは酵素液を除去したものはそれぞれ対照として用いた。

酵素活性の単位は基準反応液中で、37°C, 30分間に遊離する反応生成物の μ g 数で現わし、また、比活性値は単位蛋白量(mg)当りの活性とした。

酵素液の蛋白量は Lowry et al. (1951)²⁸⁾の方法に準じて、牛血清アルブミンを標準試料として測定した。

3. DEAE-カラムクロマトグラフィー

先に報告した方法²⁾に従い、DEAE-セルロースカラムを作製し、同様のトリス-磷酸緩衝液で安定化したのち、0.133 M, 0.187 M, および 0.233 M NaCl を添加した Stepwise 展開を行なった。LKB 7000 型フラクションコレクターを用い、溶出液中の蛋白量は LKB 4700 ユビコード1型紫外線吸収計により、280 m μ の吸光度変化を自記記録計によって測定した。AcPase 活性は各フラクションについて、それぞれ、先述の方法で測定した。

4. セルロースアセテート膜電気泳動

AcPase 活性の質的検索のために、セルロースアセテート膜(Cellogel: 生化学工業社扱い)を支持体として電気泳動的観察を行なった。泳動条件と操作はつぎの通りである。

通常の電泳箱、および定電流・定電圧装置を用いた。緩衝液はペロナール-ペロナール Na 系で、pH 8.6 (20°C)、 $\mu=0.06$ である。セルロゲルは 5.7×15 cm を用い、前記緩衝液中に15分浸漬後、陰極端から 3.5 cm の部分に通常、8 μ l/0.9 cm の試料をマイクロピペットを用いて塗布した。泳動条件は電圧 200 V. ブリッジ間は 8.5 cm で、泳動時間は50分とし、4°Cの低温槽内で泳動した。

泳動終了後のセルロゲルは、下記組成の反応液

中に移し、37°C、60分温置して、AcPaseを同定した。

反応液組成

0.1 M: 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

0.5 mM: *p*-NPP

1.0 mM: Fast Blue RR-塩

泳動終了後のゲルの一部は蛋白質染色のために通常のボンソー3R液による染色²⁹⁾を行ない比較した。

実験結果

1. 各唾液腺由来 AcPase の基質特異性

基質の *p*-NPP, α -NP, および β -GP に対する

Table. 1 Substrate Specificity of Acid Phosphatase Activity Distributed in Salivary Gland of Normal Donryu Rat

	Substrate Fraction	<i>p</i> -NPP	α -NP	β -GP	<i>p</i> -NPP/ α -NP
Submaxillary Gland	Cytoplasm	0.79	0.30	0.09	2.6
	Particulate	2.68	1.70	0.33	1.6
	Nuclei	4.92	6.90	0.19	0.7
Sublingual Gland	Cytoplasm	1.37	0.40	0.09	3.4
	Particulate	4.25	3.42	0.87	1.3
	Nuclei	2.23	1.30	0.47	1.7
Parotid Gland	Cytoplasm	0.14	0.10	0.07	1.0
	Particulate	0.70	0.70	0.58	1.0

各種唾液腺由来 AcPase の活性出現は Table 1 に示す通りである。各数値は比活性値で表示した。

各唾液腺由来の AcPase に対し、*p*-NPP と α -NP はいずれも良好な基質となるが、 β -GP はほとんど水解されない。細胞質成分内に分布する活性の出現では Cyto 画分と比較すると、Part 画分は3~5倍強い活性が出現し、また、検討した粗核画分にも著明な活性をみた。

良好な基質となる *p*-NPP と α -NP に対する活性比較では、顎下腺と舌下腺においては Cyto 画分由来活性が *p*-NPP/ α -NP 値において、それぞれ2.6と3.4を示し、*p*-NPP に高い親和性を示すけれども、両唾液腺によってこの比率は異なる。これに対し、Part 由来活性の場合はそれぞれ1.6と1.3を示し、両基質に対する親和性にあまり明確な差異を示さない。また、耳下腺由来活性では、Cyto 画分由来活性が1.4、Part 画分が1.0を与え、いずれも顎下腺や舌下腺由来のものより低値である。したがって、各唾液腺内に分布する活性は腺の種類によって、また、細胞質成分内分布によって差異のあることが明らかである。

2. 至適酸度について

各種 pH の酢酸緩衝液を用いて、各唾液腺から

Fig. 1 Effect of pH on Acid Phosphatase Activity in Subcellular Fractions of Normal Rat Salivary Gland

得た Cyto, および Part 画分由来 AcPase の活性出現状態を観察した。この結果は Fig. 1 に示す通りである。主要な活性出現の至適酸度は pH 5.0 付近にあると考えられるが, AcPase の起源によって単一の活性曲線にはならない結果を得た。

3. 各種唾液腺内 AcPase の細胞内分布特性について

p-NPP を基質とし, 各種唾液腺について, それぞれの細胞内に分布する AcPase 活性の出現特性を 4 ~ 6 例について観察した結果を集約して Table 2 に示した。

各分画中に出現する AcPase 活性の例数を重ねた観察結果では, 舌下腺由来のものがもっとも強い活性を示し, 顎下腺と耳下腺ではあまり著明な差異を認めない。また, Part 画分中には総活性比較においては Cyto 由来のものより約 2 倍高い活性出現を示す。核画分では一般に, Cyto 画分中の活性と同等か, あるいはやや高い出現をみた。

個体差による AcPase 活性発現の状態は試料処理などの要因以外に大きい差異は認めなかった。

Table 2 Comparison of Acid Phosphatase Activity Distributed in Various Salivary Gland of Normal Donryu Rat

	Cytoplasm		Particulate		Nuclei	
	R. A.	S. A.	R. A.	S. A.	R. A.	S. A.
Submaxillary Gland	8.58 (0.57)	0.52 (0.06)	3.17 (0.46)	0.97 (0.07)	5.05 (0.55)	0.59 (0.07)
Sublingual Gland	8.85 (1.43)	0.64 (0.03)	0.92 (0.09)	1.11 (0.15)	2.40 (0.50)	0.73 (0.06)
Parotid Gland	7.47 (1.12)	0.51 (0.03)	2.27 (0.31)	0.98 (0.06)	1.67 (0.31)	0.48 (0.08)

Parenthese indicate standard error

4. 各種由来 AcPase 活性の基質親和性

p-NPP を基質とし, 各種濃度における AcPase 活性の出現状態を観察し, 酵素-基質相関から Leinweaver-Burke のプロットを行ない, ミハエリス恒数 (K_m 値) を求めて比較した。この結果は Table 3 の通りである。

各種由来 AcPase の K_m 値はそれぞれ $10^{-4}M$ のオーダーを示した。Cyto 画分では各唾液腺とも

Table 3 Comparison of Substrate Affinity (Michaelis Constant) of Acid Phosphatase Distributed in Salivary Gland of Normal Donryu Rat

Salivary Gland	Cytoplasm ($\times 10^{-4}M$)	Particulate ($\times 10^{-4}M$)	Microsome ($\times 10^{-4}M$)
Submaxillary G.	1.5	2.1	3.7
Sublingual G.	1.5	3.7	1.5
Parotid G.	1.4	2.3	1.4

ほぼ等しい値を示すが, Part 画分ではこれよりいづれも高い K_m 値をとり, そのうち, 舌下腺由来のものがもっとも高い。顎下腺と耳下腺由来のものはほぼ等しい値である。参考として Micro 画分由来のものについても検討したが, 顎下腺由来 AcPase が最も高い値を示し, 舌下腺と耳下腺由来 AcPase は Cyto 画分中 AcPase とほぼ等しい値である。

5. AcPase 活性に対する各種阻害剤の効果

AcPase 活性に対する酒石酸や弗素, 銅, あるいはマグネシウムイオンの効果を観察し, Table 4 に阻害率で総括して示した。

Table 4 Summary of Inhibition Studies on Acid Phosphatase

	Inhibitors Fractions	Tart.	NaF	CuSO ₄	MgCl ₂
Submaxillary Gland	Cyto.	27.8	30.2	64.3	-13.4
	Part.	55.8	73.9	34.7	-12.1
	Nuclei	47.3	57.8	47.6	- 7.0
Sublingual Gland	Cyto.	36.8	41.7	59.4	- 9.0
	Part.	64.3	76.4	53.9	19.8
Parotid Gland	Nuclei	51.3	71.5	23.0	0.0
	Cyto.	79.4	81.0	28.6	- 9.5
	Part.	70.4	81.5	27.8	10.0
	Nuclei	84.8	54.4	47.8	- 4.4

酒石酸と弗素による阻害効果は各唾液腺において, Cyto 由来酵素ではほぼ等しい現れ方を示すが, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺の順序に阻害出現が強くなる。この傾向は Part 由来酵素の場合にも認められた。また, Part 由来 AcPase では弗素による阻害効果が酒石酸の場合より 10%以上強く出現している。これに対して銅イオンの場合は, 顎下腺と舌下腺の Cyto 由来 AcPase に対し, 50

Fig. 2 DEAE-Cellulose Column Chromatogram of Cytoplasm Fraction in Submaxillary Gland of Normal Donryu Rat

Fig. 3 DEAE-Cellulose Column Chromatogram of Particulate Fraction in Submaxillary Gland of Normal Donryu Rat

%阻害を越える効果を示したが、耳下腺では30%以下で、前二者の効果と逆の結果を得た。また、このような傾向は Part 画分由来酵素の特性として各唾液腺について認められた。

マグネシウムイオンは舌下腺と耳下腺由来の Part 画分中 AcPase に対しては阻害、その他由来の AcPase には促進的な効果を示した。

6. カラムクロマトグラフィー

顎下腺と舌下腺の Cyto, および Part 画分由来 AcPase について、DEAE-セルロースカラムクロ

マトグラフィーによる活性部分の分画を行なった。各起源酵素液について溶出蛋白量の変動、および活性出現の状態は非常に再現性のよい結果が得られた。そのうちの代表的な例として、顎下腺由来の両画分の流出曲線を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

これらの結果を集約すると、stepwise 溶出によるクロマトグラフィーによって展開される蛋白は主として NaCl 濃度 0.133 M の部分に存在し、0.187 M, および 0.233 M 濃度範囲のものは少な

い。特に、舌下腺 Cyto 画分、あるいは両唾液腺 Part 画分の場合では0.233 Mで溶出されるものが認められない。AcPase 活性部分の溶出は単一ピークを示さない。Cyto 由来酵素では0.133 M NaCl 含有緩衝液中に通常3部分の、0.187 M NaCl 濃度で1個の活性が出現する。しかし、舌下腺では最後の活性部分を認めない場合が多い。Part 由来酵素では0.133 M NaCl 濃度において主要ピークが溶出される。これら画分は溶出順にそれぞれ I ~ IVと番号づけを行なった。

7. クロマト分画に対する阻害剤の効果

クロマトグラフィーによって分画した各活性部分はプールして、低温下にコロジオンバッグを用いて原容の約1/3に減圧濃縮した。これら酵素液について酒石酸と弗素、銅およびマグネシウムイオンの作用を検討し、Table 5 に総括して示した。表中の数値は阻害率である。

先の粗酵素液に対する効果と比較すると、顎下腺の場合、Cyto 画分では画分 I に対して酒石酸と弗素、およびマグネシウムイオンは全く逆の効果を示し、画分 II では銅イオンの効果が負の阻害となって出現した。舌下腺の場合、画分 I に対する酒石酸と弗素イオンの効果は顎下腺の場合と類似するが、銅およびマグネシウムの場合は異なる。さらに、画分 II では全く阻害を受けない特性を示している。

Part 画分の場合は試料の関係上、舌下腺の場

Table 5 Summary of Inhibition Studies on Acid Phosphatase in Salivary Gland of Normal Donryu Rat

		Tart.	NaF	CuSO ₄	MgCl ₂
Submaxillary Gland	Cyto. (Original)	27.8	30.2	64.3	-13.4
	I	71.8	84.7	66.7	35.3
	Chromato. fraction	30.1	39.7	-19.3	-10.3
	III	0.0	28.6	0.0	-14.3
	IV	6.0	38.6	38.6	-38.6
	Part. (Original)	55.8	73.9	34.7	-12.1
Sublingual Gland	Chromato. fraction	80.0	85.0	21.3	0.0
	Cyto. (Original)	36.8	41.7	59.4	- 9.2
	I	89.2	94.7	12.2	- 7.0
	Chromato. fraction	-31.3	-12.5	7.1	-17.9
	III	66.7	33.3	-13.7	-10.0

合は十分な確認を行なっていないが、顎下腺の場合は粗酵素液と比較すると酒石酸と弗素イオン阻害が高く、銅イオン阻害は低下する成績を得ている。

8. AcPase 多形性の電気泳動的分画

セルロゲルを支持体とする電気泳動の結果は Fig. 4 の通りである。顎下腺の Cyto、および Part 画分由来酵素液のポンソー 3 R による蛋白成分染色と、これに対応する AcPase 定性反応の成績を示している。対照として健康ラット血清を用いた。

健康ラット血清では明確な蛋白分層バンドに対

Fig. 4 Cellogel Electrophoresis of Normal Donryu Rat Serum and Soluble Fractions in Salivary Gland
Buffer system : Veronal-veronal Na (pH 8.6, $\mu=0.06$).
Electrophoresis : 200 V, 60 mins. at 4°C.
Stained with Ponceu 3 R (A), and α -naphthyl phosphate and Fast Blue RR salt system (B). $\uparrow$: Application of the sample.

して、AcPase 活性は辛じて確認できる程度である。Cyto 由来のものでは通常原点付近と、 α 、 β -グロブリン域に幅広い染色域が出現し、また、原点付近で陰極側に1本のバンドを認める。Part 画分では原点部分に強い活性が出現し、 β -リボプロテインと β -グロブリン域の間に幅広いバンド、また原点の強い活性バンドと β -グロブリン域に細い脆弱な3本のバンド、および Cyto 画分の場合と同じく原点付近で陰極側に1本のバンドの計6本が出現する。原点付近の著明な発色は試料の変性などによる非泳動成分中に残存する AcPase 活性の出現によるとの見方もあるが、同条件で泳動後、ポンソー染色を行なったものでは染色バンドを検出しないから、試料に特有のものと考えられる。また、血清蛋白泳動像からみると、 γ -グロブリン域に属している。

討 論

ラット唾液腺の AcPase 活性は他の組織由来のものと比較して、かなり明確な出現をみせ、特に舌下腺で高い値を示した。細胞内分布では Part 中に存在する活性が高い。基質特異性では p -NPP や α -NP は良好な基質となるが、 β -GP の水解は著明ではない。酢酸緩衝液中において p -NPP に対する至適酸度は3唾液腺由来 AcPase で多少の差異があり、また、細胞内分布の差異によっても異なる結果を得た。しかし、通常、 p -NPP/ α -NP の値は Cyto 由来のものが高く、 p -NPP に高い親和性を示す。 K_m 値は Cyto 由来のものが Part 由来のものより低値を与え、基質親和性が高い。また、阻害剤効果でも、Cyto、および Part 由来の活性には差異が認められる。これは各唾液腺によって構成細胞、あるいは生理機能に差異があり、漿液性唾液を分泌する顎下腺、あるいは耳下腺と、粘液性唾液を分泌する舌下腺の特性に起因するものとみてよいと考えられる。しかし、同じ漿液性唾液を分泌する顎下腺と耳下腺でも AcPase 活性には差異がある。

AcPase は従来前立腺型と赤血球型の2型に類別されてきた。また、それぞれの AcPase にも基質に対する特異性や至適酸度、あるいは阻害剤の効果を異にする活性出現から、多形性が認められ

るようになった³⁰⁻³³⁾。しかし、これら多形性が明確になったのはイオン交換クロマトや、電気泳動の手法によるものである。たとえば、赤血球中の AcPase は DEAE-カラムクロマトで3つの活性に³⁴⁻³⁶⁾、また、でん粉ゲル電泳法³⁷⁾で5型に分画される。

Moore et al. (1961)³⁸⁾は DEAE-セルロースカラムクロマトにより、ラット肝由来 AcPase を3つの画分に分離し、Shibko et al. (1963)³⁹⁾も同様の方法で3画分を得ている。Bright-Well et al. (1968)⁴⁰⁾は、その一画分を350倍に精製し、Igarashi et al. (1968)⁴¹⁾は分離した2画分の1つについて結晶化したことを報じている。

前立腺由来の活性では、London et al. (1955)⁴²⁾の部分精製した標品についての報告、Ostrowski et al. (1965)⁴³⁾や Vernom et al. (1965)⁴⁴⁾、あるいは Smith et al. (1968)⁴⁵⁾などの報告がある。

その他ヒト胎盤由来⁴⁶⁾の AcPase でも3分画され、その1画分は5000倍に精製された⁴⁷⁾。

担癌条件下の AcPase 活性変動についてはすでに報告した²⁾。

これら成績の要約は困難で、報告者によって各種のとり上げ方をしているが、ラットの各種組織由来の AcPase はイオン交換クロマトで通常、3分画され、その他動物の場合も、同傾向と考えられるものが多い。そのうちの1画分は分子量約10万のものが含まれ^{41,43,44,46)}、さらに低分子の AcPase は、16,590⁴⁸⁾、あるいは35,000⁴⁶⁾であるという。

細胞内分布特性からみると Part 由来と Cyto 由来のものがクロマト分画され、そのうち、Part 由来活性は2番目に溶出されてくる。両者は動力学的に、あるいは阻害剤効果に差異を認めるとするものが多いが、同一試料についても成績は一定しない。また、電気泳動の成績にも同様の傾向がみられ^{32,39,49,50)}、これは起原の差異とともに泳動条件の差も大きい要素となっている。

唾液腺の AcPase 活性にも、これら報告のような多形性が認められ、Cayo 画分に由来する AcPase は DEAE-セルロースカラムクロマトにより、3~4種の活性に分別される。これに対して

Part 画分では通常、単一の活性のみが出現した。逆に、それぞれの粗酵素液を用いたセルロゲル電泳法では Part 画分は 6 本の活性に、Cyto 画分は 3 本の活性に分画された。クロマト画分で 3~4 画分に分画される顎下腺の Cyto 由来活性は、阻害剤の効果からみると、酒石酸と弗素イオンの作用が第 I と第 III 画分で共通した特性を示し、これに対して第 II 画分は異なる。しかし、第 II 画分は Part 画分由来活性とは近似の効果を受けている。したがって、この成績は既述の報告のうち、第 II 画分が、Part に由来した活性であるという Shibko et al. (1963)³⁹⁾や Dipietro et al. (1967)⁴⁶⁾あるいは Vanha-Perttula (1971)⁵¹⁾の報告と同一の結果があるが、Part 画分のクロマト溶出順位は Cyto 由来の第 II 活性とは一値しない。また、舌下腺 Cyto 由来の I~III 画分では顎下腺由来活性と阻害剤効果が全く異なる。

従来から AcPase や β -グルクロニダーゼなど一連のリソゾーム酵素の細胞内分布についてはこれら酵素がミクロソームで生成され、細胞質内を移動してリソゾーム中に包含され、また、リソゾームの破壊によって細胞質内に遊出してくると考えられているが、今回の観察結果、あるいは従来からの報告^{1,2,52)}から考察すると、溶性 AcPase のすべてが、Part 画分から由来したものであるとは断定できない。

また、各唾液腺に存在する AcPase は至適条件下で、著明な活性を示すが、酵素活性においては、それぞれの由来によって差異を認めている。したがって、溶性 AcPase では細胞質中に存在する場合、酵素蛋白分子が何らかの化学的修飾を受けて遊出、あるいは存在するものと考えが必要がある。この場合、電泳的に分画される Part 由来酵素の多形性がその源泉となっているものと推測できる。また、結節型腫瘍の増殖時における細胞外組織液中のリソゾーム酵素の活性^{1,52)}や、腹水型腫瘍の増殖に伴う腹水中の AcPase 活性²⁾が腫瘍細胞内に分布する AcPase 活性と酵素学的に差異を有することもこの観点からの考察が必要であると考えている。

結 論

体重 120 g 前後の健康呑竜系ラット(♀)の顎下腺、舌下腺および耳下腺組織中に存在する酸性ホスファターゼについて、細胞内分布特性、および酵素的特性を観察した。

分別遠沈法で分画した細胞質上清液、および顆粒画分中にはラットの肝、血球、その他の組織と同等の酸性ホスファターゼ活性が出現する。

基質の *p*-ニトロフェニール燐酸は各種由来酸性ホスファターゼによって著明な水解を受ける。 α -ナフチル燐酸も良好な基質となるが、 β -グリセロ燐酸はほとんど水解されない。これら基質に対する酸性ホスファターゼの親和性、あるいは特異性は、由来する組織と細胞内分布特性によってそれぞれ異なる。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより顎下腺組織の細胞質上清液中の活性は 4 画分に、舌下腺では 3 分画される。顆粒画分由来酵素では通常、1 画分の活性のみが分画された。

粗酵素液のセルロゲル電泳法によって、顆粒画分由来の酸性ホスファターゼは 6 個の、また溶性画分では 3 個の活性に分画される。

分画された活性に対する阻害剤の効果などから、酸性ホスファターゼ活性の細胞内分布特性について討論し、細胞内容性画分中の活性がすべて顆粒画分に由来するものとは断定できないこと、および本酵素が溶性画分中に遊出する場合、あるいは溶性酵素として存在するためには酵素蛋白が何らかの化学的修飾を受ける可能性があることを推定した。

文 献

- 1) 河村 宏：結節型多和肉腫細胞の酸性ホスファターゼ活性とその動態。齒科医学, 34: 901-917, 1972.
- 2) 多和敏一, 奥井伊佐子, 横田 豊：腹水型多和肉腫の増殖と酸性ホスファターゼの変動。齒科医学, 35: 890-904, 1972.
- 3) WALKER, B. S., LEMON, H. M., DAVISON, M. M. et al.: Acid phosphatase, A review. *Amer. J. clin. Path.*, 24: 807-837, 1954.
- 4) GUTMAN, A. B. and GUTMAN, E. B.: "Acid" phosphatase and functional activity of the prostate (Man) and preputial glands (Rat). *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 39: 529-532,

- 1938.
- 5) GUTMAN, A. B. and GUTMAN, E. B. : Adult phosphatase levels in prepubertal Rhesus prostate tissue after testosterone propionate. *ibid.*, 41 : 277-281, 1939.
  - 6) HUGGINS, C. : The physiology of the prostate gland. *Physiol. Rev.*, 25 : 281-295, 1945.
  - 7) HUGGINS, C. : The hormone-dependent cancers. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 39 : 752-757, 1963.
  - 8) JACOBY, F. and LEESON, C. R. : The post-natal development of the rat submaxillary gland. *J. Anat.*, 93 : 201-216, 1959.
  - 9) LEESON, C. R. and JACOBY, F. : An electron microscopic study of the rat submaxillary gland during its post-natal development and in the adult. *ibid.*, 93 : 287-295, 1959.
  - 10) JACOB, J. and SIRLIN, J. L. : Electron microscope studies on salivary gland cells. I. The nucleus of *Bradysia mycorum* Frey (Sciaridae), with special reference to the nucleolus. *J. Cell. Biol.* 17 : 153-165, 1963.
  - 11) FUKUDA, M. : Histochemical studies on the rat submaxillary gland during post-natal development. *Histochem.* 8 : 342-354, 1967.
  - 12) 立花民子 : 顎下腺顆粒管形成に関する研究. 齒科学報, 71 : 252-265, 1971.
  - 13) LEESON, C. R. and BOOTH, W. C. : Histological, histochemical, and electron-microscopic observations on the postnatal development of the major sublingual gland of the rat. *J. dent. Res.*, 40 : 838-845, 1961.
  - 14) PARKS, H. F. : On the fine structure of the parotid gland of mouse and rat. *Amer. J. Anat.*, 108 : 303-329, 1961.
  - 15) PARKS, H. F. : Morphological study of the extrusion of secretory materials by the parotid gland of mouse and rat. *J. Ultrastruct. Res.*, 6 : 449-465, 1962.
  - 16) SHACKLEFORD, J. M. and SCHNEYER, C. A. : Structural and functional aspects of rodent salivary glands including two desert species. *Amer. J. Anat.*, 115 : 279-308, 1964.
  - 17) 養老孟司 : マウス顎下腺の生後発生. 解剖学誌, 45 : 22, 1970.
  - 18) LUCKMAN, C. E. : The response of the submaxillary glands of mature mice to treatment with the hormones of the thyroid gland and the testis. *Anat. Rec.*, 139 : 77-83, 1961.
  - 19) KRONMAN, J. H. and SPINALE, J. J. : A histochemical study of the effect of endocrine alternation upon the submandibular gland of the golden hamster (*Cricetus auratus*). *J. oral Ther. Pharm.*, 4 : 60-70, 1967.
  - 20) 須賀康夫 : ヒトおよび諸種哺乳動物唾液腺の組織的, 組織化学的ならびに電子顕微鏡的研究IV. ヒト胎児および成人唾液腺の組織化学的所見の比較. 齒基礎誌, 14 : 51-58, 1972.
  - 21) JUNOUEIRA, L. C. U. : Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. cell. comp. Physiol.*, 34 : 129-158, 1949.
  - 22) SCREEBNY, L. M., MEYER, J., BACHEM, E. et al. : Post-natal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. *Growth*, 19 : 57-74, 1955.
  - 23) LIU, F. T. Y. and LIN, H. S. : Effect of progesterone on growth and development of submandibular glands in female rats. *J. dent. Res.*, 48 : 943-946, 1969.
  - 24) LIU, F. T. Y. : Effect of estrogen, thyroxin and their combination on dental caries and salivary gland in ovariectomized and intact female rats. *ibid* 46 : 471-477, 1967.
  - 25) GIANETTO, R. and DEDUVE, C. : Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem. J.*, 59 : 433-438, 1955.
  - 26) BESSEY, O. A., LOWRY, O. H. and BROCK, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. biol. Chem.*, 164 : 321-329, 1946.
  - 27) FISKE, C. H. and SABBAROW, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *ibid.*, 66 : 375-400, 1925.
  - 28) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et al. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *ibid.*, 193 : 265-275, 1951.
  - 29) 小川恕人 : セルローズアセテート膜による電気泳動分析ならびに免疫沈降反応における蛋白質のボンソー 3 R 染色検出法. 医学と生物学, 16 : 234-237, 1963.
  - 30) ABUL-EADL, M. A. M. and KING, E. J. : Properties of the acid phosphatase of erythrocytes and the human prostate gland. *Biochem. J.*, 45 : 51-60, 1945.
  - 31) TUBOI, K. K. and HUDSON, P. B. : Acid phosphatase. 1. Human red cell phosphomonoesterase; general properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 43 : 339-357, 1953.
  - 32) GOOLAD, G. A. J. and MILLS, G. T. : The acid phosphatases of rat liver. *Biochem. J.*, 66 : 346-354, 1957.
  - 33) AHMED, Z. and KING, E. J. : Placental phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta*, 34 : 313-325, 1959.
  - 34) ANGELETTI, P. U. and GAYLE, R. : Chro-

- matography of red cell hemolysate. *Blood*, **20** : 51-55, 1962.
- 35) IIO, M., HASHIMOTO, T. and YOSHIKAWA, H. : Purification and some properties of erythrocyte acid phospho-monoesterase. *J. Biochem.*, **55** : 321-326, 1964.
- 36) FENTON, M. R. and RICHARDSON, K. E. : Isolation of three acid phosphatase isozyme from human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120** : 332-337, 1967.
- 37) HOPKINSON, D. A., SPENCER, N. and HARRIS, H. : Red cell acid phosphatase variats, A new human polymorphism. *Nature*, **199** : 969-971, 1963.
- 38) MOORE, B. W. and ANGELETTI, P. U. : Chromatographic heterogeneity of some enzymes in normal and tumor tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94** : 659-667, 1961.
- 39) SHIBKO, S. and TAPPEL, A. L. : Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **73** : 76-86, 1963.
- 40) BRIGHTWELL, R. and TAPPEL, A. L. : Lysosomal acid pyrophosphatase and acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **124** : 333-343, 1968.
- 41) IGARASHI, M. and HOLLANDER, V P. : Acid phosphatase from rat liver purification, crystallization, and properties. *J. biol. Chem.*, **243** : 6084-6089, 1968.
- 42) LONDON, M., SOMMER, A. and HUDSON, P. B. : Further studies on the purification, of prostatic acid phosphatase. *ibid.*, **216** : 81-95, 1955.
- 43) OSTROWSKI, W. and RYBARSKA, J. : Purification of acid phosphomonoesterase from human prostate gland. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94** : 68-78, 1961.
- 44) VERNON, C. A., GAULDIE, J., HANSON, J. M. et al. : Acid phosphatases. *Nature*, **208** : 382-383, 1965.
- 45) SMITH, J. K. WHITBY, L. G. : The heterogeneity of prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **151** : 607-618, 1968.
- 46) DIPIETRO, D. L. and ZENGERLE, F. S. : Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. *J. biol. Chem.*, **242**, 3391-3396, 1967.
- 47) DIPIETRO, D. L. : Purification and properties of human placental acid phosphatase III. *Biochim. Biophys. Acta*, **235** : 458-465, 1971.
- 48) HEINRIKSON, R. L. : Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. *J. biol. Chem.*, **244** : 299-307, 1969.
- 49) LUNDIN, L. G. and ALLISON, A. C. : Acid phosphatases from different organs and animal forms compared by starch-gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, **127** : 527-529, 1966.
- 50) KANEKO, A., DEMPO, K. and ONOÉ, T. : Changes in acid phosphatase during AZO-dye carcinogenesis. *GANN*, **63** : 41-48, 1972.
- 51) VANHA-PERTTULA, T. : A new type of acid phosphatase from rat testis. *Experientia*, **27** : 42-44, 1971.