ダイコクネズミ顎下腺可溶画分のカリウム依存性 Phosphatase について

牧 村 正 治

日本大学松戸歯学部 生化学教室* (指導: 滝口久教授)

[受付: 昭和51年10月18日]

抄録: 一般に, K^+ -依存性 p-nitrophenyl phosphatase (K^+ -NPPase) は細胞膜で Na^+ , K^+ の能動輸送に関与する Na^+ , K^+ -ATPase の脱リン酸反応の段階に働くといわれている。すでに, 著者らは, ダイコクネズミ顎下腺の上清画分に microsome の K^+ -NPPase とは性質を異にする K^+ -NPPase が存在することを報告した [Intl. Res. Commun. System. Med. Sic., 3, 456 (1975)]。本論文は, この可溶画分の K^+ -NPPase の部分的精製および諸性質を検討した。Donryu 系雄ダイコクネズミ顎下腺 homogenate の 300000×g 上清を硫酸分画および澱粉ブロック電気泳動にかけ酵素を部分的精製した。酵素は, 電気泳動により移動度を異にする2つの K^+ -NPPase (K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II) にわけられた。 K^+ -NPPase I および II の至適 pH はそれぞれ 8.4, 8.2 であり, 基質に対する K_m 値は前者は 3.0mM, 後者は 1.2mM, K^+ に対する K_m 値はそれぞれ 1.0mM, 2.5mM であった。両酵素共 ouabain 感受性であり, また p-chloromercuribenzoate で阻害された。

緒 言

Na^+ , K^+ -依存性 adenosine triphosphate phosphohydrolase (Na^+ , K^+ -ATPase と略す) [EC 3.6.1.3] は Mg^{2+} 存在下に Na^+ と K^+ によって活性化される ATPase であって, 1957年 SKOU¹⁾ によってカニの神経組織に見い出されたものである。以来, この Na^+ , K^+ -ATPase についての多くの研究が進められ, この酵素は膜画分に広く分布し, 膜における Na^+ , K^+ の能動輸送に関与していることを示唆する多くの証拠が得られた¹⁻⁷⁾。

Na^+ , K^+ -ATPase の反応としては, FAHN ら⁸⁾ および POST⁹⁾ によって次のような機構が提唱されている。

まず, Mg^{2+} と Na^+ が存在すると酵素 (E) と ATP から ADP ができる。

しかしこのときに高濃度の Mg^{2+} が存在すると E_1P は E_2P に変化してしまい上式の逆反応は進行しない。この E_2P は K^+ の存在下に E と無機リン (Pi) に分解する。

このように, Na^+ , K^+ -ATPase 反応は酵素蛋白質のリン酸化反応とリン酸化酵素蛋白質の脱リン酸の二段階に分けられる。また, この Na^+ , K^+ -ATPase 標品は, さらに p-nitrophenyl phosphate (NPP と略す), acetyl phosphate, carbamyl phosphate などを K^+ 存在下に加水分解することも見い出された¹⁰⁻¹³⁾。そして, この K^+ -依存性 phosphatase (K^+ -NPPase と略す) 活性が, 能動輸送の特異的阻害剤である ouabain で抑制されることから, K^+ -NPPase 反応は Na^+ , K^+ -ATPase 反応における中間体であるリン蛋白質の脱リン酸反応に相当するものであると考えられている¹¹⁾。

Potassium-Dependent Phosphatase in the Soluble Fraction of Rat Submandibular Gland.

Masaharu MAKIMURA (Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.)

* 千葉県松戸市栄町西2丁目870番1 (〒271)

* 現在 臨床病理学教室

Jap. J. oral Biol., 19: 79-88, 1977.

したがってこの K^+ -NPPase の作用機構や酵素化学的性質を明らかにすることは Na^+ , K^+ -ATPase の本態の解明に役立つであろう。

最近、著者ら¹⁰⁾は、ダイコクネズミの顎下腺の可溶画分に microsome 画分の K^+ -NPPase とは性質を異にする ouabain 感受性の K^+ -NPPase が存在することを報告した。

その後、千代川¹⁵⁾はダイコクネズミ腎臓の可溶画分に ouabain 不感受性の K^+ -NPPase を見出し出している。しかし、ダイコクネズミ顎下腺の可溶画分の K^+ -NPPase の性質については不明の点が多い。

今回、著者は本酵素の部分的精製を行ない、酵素化学的性質を調べたので報告する。

材料および方法

1. 試料の調製

実験動物は、Donryu 系、雄のダイコクネズミ (体重200~220g) にオリエンタル固型飼料 (MF) と水を自由に与えて飼育したものを用い、頭部を強打後、顎動脈の切断により脱血させてから顎下腺を摘出した。この顎下腺を細切し、その重量の3倍量相当の0.25M sucrose を加えてテフロン・ペッセル付 Potter ホモジナイザー (クリアランス: 0.3 mm) を用いて、毎分400回転で1分間 homogenize した。この homogenate を aluminium wire sieve (2 mm mesh) で濾過し、この濾液を $100000 \times g$ 60分間、遠心沈殿して上清を得た。この上清をさらに $300000 \times g$ (Performance Index = 40.0×10^8) 60分間、遠心沈殿を行い、得られた上清を可溶画分とした。こうして得られた可溶画分を通法により固定 ammonium sulfate を用いて硫酸分画し、0~50%画分を得た。この画分の沈殿を 0.05M tris-HCl buffer (pH 8.2) に対して透析した。この透析した試料について澱粉ブロック電気泳動を行った。電気泳動は、市販の馬鈴薯澱粉を蒸留水で数回洗浄後、0.05M tris-HCl buffer (pH 8.2) で bufferize してから、泳動槽 (10×50×300mm) に充填した。試料を加えずに、約1時間通電したのち、泳動槽の中央部に試料を2.5ml 加え、200V, 4mA で24時間泳動を行った。泳動終了後、泳動方向に垂直に澱粉

を10mm 幅のブロックとして取り出して4ml の 0.05M tris-HCl buffer (pH 8.2) を加えて、よく攪拌しながら酵素を抽出し、これを酵素活性の測定のための試料として用いた。

2. 基質の調製

NPP-tris 塩の調製は、まず市販の NPP-Na 塩を BESSEY ら¹⁶⁾の方法によって精製して、この精製 NPP-Na 塩の25g を100ml の蒸留水に溶解してから H⁺形の Amberlite IR 120の column (4×40cm) に注ぎ蒸留水で NPP を溶離した。この NPP 水溶液の pH を tris 水溶液を用いて7.0に合わせたから凍結乾燥して NPP-tris 塩を得た。

3. p-chloromercuribenzoate 溶液の調製

p-chloromercuribenzoate (PCMB と略す) 溶液の調製は PCMB を 400mM tris 水溶液中に溶解し蒸留 HCl を少しずつ加えて pH を 8.2 に合わせた。この溶液に蒸留水を加え PCMB が 1mM になるように調製した。

4. K^+ -NPPase 活性の測定法

K^+ -NPPase 測定用の酵素反応液は、NPP-tris 塩 10 μ moles, tris-HCl buffer (pH 8.2) 60 μ moles, KCl 4 μ moles, および $MgCl_2$ 8 μ moles を含む溶液に酵素液を加え、蒸留水で終末液量が 1.0 ml になるように調製した。この反応液を日立ダブルビーム分光光度計 (124型) の sample side に set し、reference side には、上述の反応液から KCl のみを除いた反応液を set し、25°C で生成した p-nitrophenol (NP と略す) の 410 nm の吸収増大を自記記録計で記録して酵素反応の初速 (零次反応) を測定した。

5. 酵素の単位

25°C で1分間に 1.0 μ moles の NP 量を生成する酵素量を K^+ -NPPase の1単位とした。

6. 蛋白質の定量

蛋白質の定量はウシ血漿アルブミン (Sigma 社製) を基準物質に用い、LOWRY ら¹⁷⁾の方法に従って行った。

成 績

1. K^+ -NPPase の部分的精製

可溶画分を硫酸分画および澱粉ブロック電気泳動して部分的精製した。

図 1 電気泳動パターン

表 1 酵素の部分的精製

	比 活 性 (munit/mg of protein)	回収率 (%)
可 溶 画 分	1.9	100
硫 安 分 画	3.2	75.3
電 気 泳 動		
peak I	3.5	3.3
peak II	52.2	17.8

a). K^+ -NPPase の電気泳動パターン

可溶画分を硫安分画して得られた硫安画分を澱粉ブロック電気泳動したところ、 K^+ -NPPase 活性は、図1に示すごとく peak I と peak II の2ヶ所に見られた。以後 peak I における K^+ -NPPase を K^+ -NPPase I, peak II における K^+ -NPPase を K^+ -NPPase II と呼ぶ。(図1)

図からわかるように K^+ -NPPase I の活性は K^+ -NPPase II のそれに比べ非常に低い値を示した。

b). 部分的精製の結果

可溶画分から K^+ -NPPase を部分的精製した結果は表1に示すごとくであった。(表1)

K -NPPase I は上清より約3%の収率で回収され、その精製度は約1.8倍であった。一方、 K^+ -NPPase II の回収率は約18%であり精製度は約27倍であった。

2. pH と酵素活性

tris-HCl buffer を用いて K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II の至適 pH を調べたところ、図2に示すように、前者においては、8.4、後者にお

図 2 pH と酵素活性

図 3 基質濃度と酵素活性

いては8.2であった。(図2)

3. 基質濃度と酵素活性

K^+ -NPPase 活性と基質 (NPP) 濃度の関係について調べたところ、図3に見られる結果を得た。(図3)

K^+ -NPPase I および、 K^+ -NPPase II のいずれについても8~10mM で最大活性値を得た。

両 K^+ -NPPase の酵素活性と基質に関する LI-NEWEAVER-BURK プロットを行なったところ、図4および図5に示す結果を得た。(図4, 5)

この図4および図5から求めた NPP に対する

図 4 酵素活性と基質濃度に関する
LINEWEAVER-BURK プロット

図 5 酵素活性と基質濃度に関する
LINEWEAVER-BURK プロット

MICHAELIS 定数 (K_m) は, K^+ -NPPase I については 3.0mM, K^+ -NPPase II については 1.2 mM であった。

4. K^+ 濃度と酵素活性

K^+ 濃度と酵素活性の関係は図 6 に示すごとであった。(図 6)

図からわかるように, K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II の両酵素とも至適 K^+ 濃度は 4mM であった。さらに K^+ 濃度と酵素活性に関する LINEWEAVER-BURK プロットを行なったところ, 図 7 に示すごとくであり, この図から求めた酵素の K^+ に対する K_m 値は K^+ -NPPase I については 1.0mM, K^+ -NPPase II については 2.5 mM であった。(図 7)

5. Mg^{2+} 濃度と酵素活性

図 6 K^+ 濃度と酵素活性

図 7 K^+ 濃度と酵素活性に関する
LINEWEAVER-BURK プロット

Mg^{2+} 濃度が酵素活性に与える影響を調べたところ, 図 8 に示すごとくであり K^+ -NPPase I においては 6 mM, K^+ -NPPase II においては 8 mM の時最大活性を示した。(図 8)

酵素活性と Mg^{2+} 濃度に関する LINEWEAVER-BURK プロットを行なったところ, 図 9 に示すごとくであり, この図から求めた酵素の Mg^{2+}

図 8 Mg²⁺濃度と酵素活性

図 9 酵素活性と Mg²⁺濃度に関する LINEWEAVER-BURK プロット

に対する Km 値は, K⁺-NPPase I については 2.5mM, K⁺-NPPase II については 5.0mM であつた。(図 9)

6. ouabain の影響
K⁺-NPPase 活性に対する ouabain の影響を調

表 2 ouabain の影響

ouabain	相 対 活 性	
	K ⁺ -NPPase I	K ⁺ -NPPase II
無 添 加	100	100
10 ⁻⁵ M	97.8	93.8
10 ⁻⁴ M	85.7	87.5
10 ⁻³ M	68.0	79.3

図 10 ouabain の基質に対する阻害形式

図 11 ouabain 基質に対する阻害形式

べたところ, 表 2 に示すごとく, K⁺-NPPase I および K⁺-NPPase II のいずれも ouabain で阻害された。(表 2)

ouabain の阻害形式を調べたところ, 基質に対しては, K⁺-NPPase I は図10に示すごとく, uncompetitive inhibition であり K⁺-NPPase II においては図11に示すように competitive inhibition であった。(図 10, 11)

図 12 ouabain の K⁺に対する阻害形式

図 13 ouabain の K⁺に対する阻害形式

また、ouabain の K⁺ に対する阻害形式を調べたところ、K⁺-NPPase I においては図12に示すごとく competitive inhibition を示し、K⁺-NPPase II については図13に示すごとく uncompetitive inhibition であった。(図 12, 13)

さらに、ouabain の Mg²⁺ に対する阻害形式を調べたところ図14ならびに図15に示すごとく、K⁺-NPPase I および K⁺-NPPase II のいずれの酵素においても uncompetitive inhibition であった。(図 14, 15)

7. PCMB の影響

K⁺-NPPase に与える PCMB の影響を調べたところ、表 3 に示すごとく、K⁺-NPPase I および K⁺-NPPase II のいずれの酵素活性も PCMB

図 14 ouabain の Mg²⁺に対する阻害形式

図 15 ouabain の Mg²⁺に対する阻害形式

表 3 PCMB による阻害と GSH による回復

	相 対 活 性	
	K ⁺ -NPPase I	K ⁺ -NPPase II
無 添 加	100	100
PCMB(0.1mM)	62.0	41.3
PCMB(0.2mM)	11.6	32.7
PCMB(0.3mM)	10.3	29.8
GSH (1 mM)	129.0	106.7
PCMB(0.1mM)		
+ GSH (1 mM)	94.7	100

図 16 PCMB の基質に対する阻害形式

図 19 PCMB の K⁺ に対する阻害形式

図 17 PCMB の基質に対する阻害形式

図 20 PCMB の Mg²⁺ に対する阻害形式

図 18 PCMB の K⁺ に対する阻害形式

により阻害を受け、PCMB によって低下した酵素活性は、両酵素とも glutathione (GSH と略す) の添加により完全に回復した。(表 3)

両 K⁺-NPPase ともに PCMB によって阻害が観察されたので、PCMB の酵素に与える阻害形式を調べた。

結果は、図16, 17, 18, 19, 20, 21 に示すごとくであって、基質に対しては、K⁺-NPPase I の場合は uncompetitive inhibition であり、K⁺-NPPase II の場合は noncompetitive inhibition であった。K⁺ に対する PCMB の阻害形式は、K⁺-NPPase I については noncompetitive inhibition であり K⁺-NPPase II については uncompetitive inhibition であった。

図 21 PCMB の Mg^{2+} に対する阻害形式

また、 K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II における Mg^{2+} に対する阻害形式は、いずれの酵素の場合も noncompetitive inhibition であった。(図 16, 17, 18, 19, 20, 21)

8. 陽イオンの影響

K^+ -NPPase 活性に与える 1 価 および 2 価陽イオンの影響を調べたところ表 4 ならびに表 5 に示す結果を得た。(表 4, 5)

総括ならびに検討

ダイコクネズミ顎下腺の可溶画分の K^+ -NPPase を部分的精製したところ、澱粉ブロック電気泳動により K^+ -NPPase I と K^+ -NPPase II の 2 つが認められた。 K^+ -NPPase I は電気泳動で anode 側に泳動され、 K^+ -NPPase II は K^+ -NPPase I と異なり chathode 側に泳動された。この事実から K^+ -NPPase I と K^+ -NPPase II 酵素蛋白質は異なったアミノ酸構成をもつと考えられ、この両者は isoenzyme である可能性がある。 K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II の至適 pH は前者が 8.4、後者は 8.2 で両者間に著明な差は認められなかった。基質 (NPP) に対する K_m 値は K^+ -NPPase I については 3.0mM であり、 K^+ -NPPase II はこれに比べ低く 1.2mM であった。従って細胞内では K^+ -NPPase II の方が K^+ -NPPase

表 4 1 価 cation が酵素活性に与える影響

cation	相 対 活 性	
	K^+ -NPPase I	K^+ -NPPase II
K^+	100	100
NH_4^+	58	39
Cs^+	33	16
Li^+	8	0
Na^+	17	33

注 1) 各化合物は塩化物を用いた。

注 2) 各陽イオンの終末濃度は 4 mM

表 5 2 価 cation が酵素活性に与える影響

cation	相 対 活 性	
	K^+ -NPPase I	K^+ -NPPase II
Mg^{2+}	100	100
Co^{2+}	12	16
Ba^{2+}	16	31
Ca^{2+}	15	23
Ni^{2+}	50	21
Cu^{2+}	26	16

注 1) 各化合物は塩化物を用いた。

注 2) 各陽イオンの終末濃度は 8 mM。

I に比べ強い活性を発揮することが出来よう。

K^+ に対する K_m 値は K^+ -NPPase I については 1.0mM、 K^+ -NPPase II については 2.5mM で両者間に差が認められた。この K^+ -NPPase I の K_m 値は microsome K^+ -NPPase の K_m 値 1.1 mM と近い値であったが、 K^+ -NPPase II の K_m 値は microsome 酵素のそれと異なっていた。

Mg^{2+} に対する K_m 値は、 K^+ -NPPase I については 2.5mM、 K^+ -NPPase II については 5.0mM であって両者間に著明な差が認められた。

K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II のいずれの酵素も ouabain による阻害が観察された。千代川¹⁵⁾ によって報告されたダイコクネズミ腎臓可溶画分の K^+ -NPPase は ouabain 不感受性であるので、顎下腺における本酵素は腎臓の K^+ -NPPase と異なったものと考えられる。

ouabain の基質に対する阻害形式は K^+ -NPPase I については uncompetitive inhibition であり、 K^+ -NPPase II については competitive inhibition であった。浅川¹⁸⁾ によるとウシの耳下腺に

おける microsome の K^+ -NPPase における ouabain の基質に対する阻害形式は uncompetitive inhibition であるので、本研究における K^+ -NPPase I の場合における阻害形式と一致する。しかし K^+ -NPPase II の阻害形式は competitive inhibition であるので microsome の酵素の場合と全く異なっていた。ouabain の K^+ に対する阻害形式は K^+ -NPPase I の場合は competitive inhibition であってウシの耳下腺¹⁸⁾ の場合の阻害形式と同じである。しかし、 K^+ -NPPase II における場合は uncompetitive inhibition であって、ウシの耳下腺¹⁸⁾ の microsome の酵素の場合と異なっていた。

ouabain の Mg^{2+} に対する阻害形式は K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II のいずれにおいても uncompetitive inhibition であって、いずれの酵素の場合もウシの耳下腺¹⁸⁾ の microsome の酵素の場合と同じ阻害形式であった。

PCMB の基質に対する阻害形式は K^+ -NPPase I においては uncompetitive inhibition であり、 K^+ -NPPase II においては noncompetitive inhibition であって両酵素間に違いが認められた。浅川¹⁸⁾によるとウシの耳下腺 microsome の K^+ -NPPase における PCMB の基質に対する阻害形式は competitive inhibition であって顎下腺可溶画分の両酵素とは異なっている。PCMB の K^+ に対する阻害形式は K^+ -NPPase I の場合は noncompetitive inhibition であり K^+ -NPPase II の場合は uncompetitive inhibition であり両酵素間に違いが観察された。PCMB の Mg^{2+} に対する阻害形式は K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II のいずれの酵素の場合も noncompetitive inhibition であり、いずれの場合もウシの耳下腺の microsome の場合¹⁸⁾ の阻害形式 competitive inhibition とは異なっていた。これらの酵素に対する PCMB の影響は glutathione の添加により回復したので SH 系酵素と考えられる。

1 価または 2 価カチオンが K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II に与える影響を調べたところ、諸種の 1 価カチオンまたは 2 価カチオンが両酵素の活性に与える影響は多少異なっていた。

顎下腺可溶画分に存在するこれら 2 種の K^+ -NPPase がいかなる生理的役割を果たしているか

は不明であるが、これらの酵素は ouabain 感受性であるので細胞膜における K^+ -NPPase (Na^+ , K^+ -ATPase) 分解途上の産物である可能性もあろう。

現在、当教室においても、これらの酵素の生理的意義の解明が行なわれている。

結 論

著者は、ダイコクネズミ顎下腺可溶画分の K^+ -NPPase を部分的精製し、二、三の酵素化学的性質を調べ次の結論を得た。

1. 可溶画分を硫酸分画、澱粉ブロック電気泳動を行って K^+ -NPPase を部分的精製し、電気的移動度を異にする K^+ -NPPase I と K^+ -NPPase II を得た。 K^+ -NPPase I の精製度は 1.8 倍、 K^+ -NPPase II については 27.4 倍であった。

2. 本酵素は NPP を基質とした場合、至適 pH は tris-HCl buffer 中で、 K^+ -NPPase I は 8.4、 K^+ -NPPase II については 8.2 であった。

3. 酵素活性に与える基質 (NPP) 濃度を調べたところ、 K^+ -NPPase I、 K^+ -NPPase II とともに 8~10mM のときに最大活性が得られ、NPP に対する K_m 値は、前者が 3.0mM、後者が 1.2mM であった。

4. K^+ 濃度が酵素活性に与える影響を調べたところ、 K^+ -NPPase I、 K^+ -NPPase II とともに 4mM のとき最大活性が得られ、 K^+ に対する K_m 値は、前者では 1.0mM、後者では 2.5mM であった。

5. Mg^{2+} 濃度が酵素活性に与える影響を調べたところ、 K^+ -NPPase I では 6mM、 K^+ -NPPase II では 8mM のとき最大活性が得られ、 Mg^{2+} に対する K_m 値は、前者は 2.5mM、後者は 5.0mM であった。

6. 両酵素とも ouabain 感受性であった。

7. 両酵素とも PCMB で阻害され、この阻害は GSH の添加により回復することから SH 系酵素と推定した。

8. K^+ -NPPase I および K^+ -NPPase II 活性に与える各種 1 価または 2 価カチオンの影響は異なっていた。

文 献

- 1) SKOU, J. C.: The Influence of Some Cati-

- on on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves; *Biochim. Biophys. Acta*, **23**: 394-401, 1957.
- 2) BONTING, S. L., SIMON, K. A. and HAWKINS, N. M.: Studies on Sodium-Potassium-activated Adenosine Triphosphatase. I. Quantitative Distribution in Several Tissues of the Cat; *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**: 416-423, 1961.
 - 3) BONTING, S. L. CARVAGGIO, L. L. and HAWKINS, N. M.: Studies on Sodium-Potassium-activated Adenosine Triphosphatase. IV. Correlation with Cation Transport Sensitive to Cardiac Glycosides; *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**: 413-419, 1962.
 - 4) GLYNN, I. M.: 'Transport Adenosine Triphosphatase' in Electric Organ. The Relation between Ion Transport and Oxidative Phosphorylation; *J. Physiol.*, **169**: 452-465, 1963.
 - 5) HOKIN, M. R.: Studies on a Na^+ + K^+ -dependent, Ouabain-Sensitive Adenosine Triphosphatase in the Avian Salt Gland; *Biochim. Biophys. Acta*, **77**: 108-120, 1963.
 - 6) SCHWARTZ, A., LASETER, A. H. and KRAINTZ, L.: An Enzymatic Basis for Active Cation Transport in the Parotid Gland; *J. Cellular Comp. Physiol.*, **62**: 193-205, 1963.
 - 7) SKOU, J. C.: Preparation from Mammalian Brain and Kidney of the Enzyme System Involved in Active Transport of Na^+ and K^+ ; *Biochim. Biophys. Acta*, **58**: 314-325, 1962.
 - 8) FAHN, S., KOVAL, G. J. and ALBERS, R. W.: Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase of Electrophorus Electric Organ; *J. Biol. Chem.*, **243**: 1993-2002, 1968.
 - 9) POST, R. L., KUME, S., TOBIN, T., ORCUTT, B. and SEN, A. K.: Flexibility of an Active Center in Sodium-plus-Potassium Adenosine Triphosphatase; *J. gen. Physiol.*, **54**: 306s-326s, 1969.
 - 10) JUDAH, J. D., AHMED, K. and MCLEAN, A. E. M.: Ion Transport and Phosphoproteins of Human Red Cells; *Biochim. Biophys. Acta*, **65**: 472-480, 1962.
 - 11) NAGAI, K., IZUMI, F. and YOSHIDA, H.: Studies on Potassium Dependent Phosphatase; Its Distribution and Properties; *J. Biochem.*, **59**: 295-303, 1966.
 - 12) BADER, H. and SEN, A. K.: (K^+)-dependent Acyl Phosphatase as Part of the (Na^+ + K^+)-dependent ATPase of Cell Membranes; *Biochim. Biophys. Acta*, **118**: 116-123, 1966.
 - 13) TAKIGUCHI, H., FURUYAMA, S., OGATA, Y. and KANNO, J.: Potassium Dependent Phosphatase in Bovine Parotid Gland; *Archs. Oral. Biol.*, **13**: 1285-1287, 1968.
 - 14) MAKIMURA, M., OSHIMI, H., TOBINAGA, H., TAKAYAMA, T., and TAKIGUCHI, H.: Potassium-Dependent Phosphatase in the Soluble Fraction of Rat Submandibular Gland; *Intl. Res. Commun. System. Med. Sci.*, **3**: 456, 1975.
 - 15) 千代川泰久: ダイコクネズミ腎臓上清画分中の K^+ -依存性 phosphatase について, 日大口腔科学, **2**: 印刷中.
 - 16) 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.
 - 17) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent; *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
 - 18) 浅川章光: ウシの耳下腺 microsome のカリウム依存性 phosphatase の諸性質について, 日大歯学, **47**, 396-410, 1973.