ラット唾液腺のシアリダーゼに関する研究

佐藤 顕 正 平 松 正 彦 柏 俣 正 典
村 山 真 人 夏 見 良 宏 上 田 和 也
南 直 臣

城西歯科大学歯科薬理学講座（主任：南 直臣教授）

〔受付：昭和62年8月20日〕

Sialidase in rat salivary glands

Akinao Sato, Masahiko Hiramatsu, Masanori Kashimata,
Makoto Murayama, Yoshihiro Natsumi, Kazuya Ueda
and Naomi Minami

Department of Pharmacology, Josai Dental University Sakado,
Saitama 350-02, Japan

(Chief: Prof. Naomi Minami)

〔Accepted for publication: August 20, 1987〕

Key words: Sialidase / salivary glands / rat

Abstract: We measured sialidase activity in the rat salivary glands using a synthetic substrate, 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid (4 MU-AcNeu), and investigated some characteristics of this enzyme.

The sialidase activity in tissue homogenates was maximum at pH 4.0 in the submandibular gland, and at pH 4.5 in both the sublingual and parotid glands, the values being almost similar to those of sialidase in the brain, liver and kidney. The specific activity was highest in the submandibular gland, followed by parotid and sublingual glands. Intracellular distribution study showed that sialidase activity in the salivary glands was mainly found in the lysosomal fraction. In the submandibular and parotid glands, sialidase activity was also found in the fraction, although the activity was relatively low.

The optimum pH for the lysosomal sialidase was 4.0 in the submandibular gland, and 4.5 in both the sublingual and parotid glands. The K_m value for 4 MU-AcNeu in lysosomal sialidase was about 0.09 mM in all tissues, the value being almost the same as K_m value of sialidase determined in the tissue homogenates. On the other hand, the optimum pH for soluble sialidase was 5.5, and K_m value for 4 MU-AcNeu was 0.25 mM in both the submandibular and parotid glands.

緒 言

シアリダーゼ (EC 3. 2. 1. 18, neuraminidase, α -N-acetylneuraminosyl glycohydrolase) は、糖タンパクや糖脂質などのシアロ複合体の末端に位置するシアル酸 α 配位のケトシドを基質とし、シアル酸残基を遊離させる加水分解酵素である。本酵素はウイルス、細菌、放線菌などの微生物をはじめ、鳥類、哺乳動物の組織中に広く分布してい

る¹⁾。哺乳動物のシアリダーゼは、1960年に Warren と Spearing²⁾ によってその存在が明らかにされ、その後、種々の組織においてその酵素学的性質について検討した多くの成果が報告されている。特にラットの肝臓^{3,4)}、脳⁵⁾、乳腺⁶⁾、さらにヒトの肝臓^{7,8)}ではリソゾーム性と可溶性の酵素があり、それぞれの性質が異なることが知られている。

一般に動物性シアリダーゼは、細菌性のシアリダーゼに比べて酵素活性が低く、さらに非常に不

安定であるため、高度の精製は困難とされていたが、最近、Miyagi と Tsuiki⁹⁾ は、ラットの肝臓から可溶性シアリダーゼを比較的高純度に精製することに成功している。動物性シアリダーゼは、シアロ糖複合体の代謝、血液凝固、生殖、細胞間相互認識、ホルモンと標的細胞の相互作用などに関与していると推察されているが、生理作用の詳細については明らかではない。一方、臨床では本酵素の欠損により、組織や尿中にシアロ複合体の異常蓄積をきたす遺伝疾患（シアリドーシス）が発症することが知られている^{10,11)}。

唾液腺のシアリダーゼについては、Nijjar ら¹²⁾ がラットの顎下腺と舌下腺で酵素の存在を認めているが、その他の報告はなく、酵素の性質についてはほとんど明らかにされていない。唾液腺、特に舌下腺と顎下腺には糖タンパクが極めて多く¹³⁻¹⁵⁾、従って、唾液腺のシアリダーゼの酵素的性質を解明することは、糖タンパクの代謝を明らかにするためにも重要であると考えられる。また、唾液腺のシアリダーゼは口腔内シアリダーゼの起源の一つと考えられており¹⁶⁾、口腔内の機能維持や歯周疾患の発症にも関与していることが推察されている^{12,16,17)}。

今回われわれは、シアリダーゼに対して特異的で、さらに高感度の測定が可能な合成基質である 4-methylumbellifery- α -D-N-acetylneuraminic acid (4MU-AcNeu) を用い、ラット唾液腺のシアリダーゼ活性を測定し、さらに2・3の性質について検討し、他の組織のシアリダーゼの性質と比較したので報告する。

材料および方法

1. 酵素液の調製

実験には恒湿条件下で自由飲水および固形飼料(CA-1)で飼育した雌の Wistar 系ラット(体重、200~250 g)を用いた。エーテル麻酔でラットを殺し、顎下腺、舌下腺、耳下腺、さらに、脳、肝臓および腎臓を摘出し、生理食塩液で十分洗浄した。摘出した組織に氷冷した0.2M acetate buffer (pH 4.5)を加え、グラステフロンホモナイザーを用いて10%ホモジネートを調製し、これを上記の buffer で希釈し、酵素活性の測定試料と

した。

2. シアリダーゼ活性の測定

シアリダーゼ活性は Potier ら¹⁸⁾の方法に準じて測定した。すなわち、0.2M acetate buffer (pH 4.0あるいは pH 4.5)の0.1ml中に、基質として0.4mM の4MU-AcNeu (Sigma Chemical Co.)の0.1mlを加え、さらに酵素液の0.2mlを加えて37°Cで60分間反応させた。その後、0.06M のNaClと0.04M のNaCO₃を含む0.13M glycine-NaOH buffer (pH 10.7)の1mlを加えて反応を停止させ、5,000×gで10分間遠心分離して上清を得た。上清中の4-methylumbelliferone (4 MU)を分光蛍光光度計(Jasco, FP-770)を用い、excitation 365nm, emission 450nmで測定した。さらに対照として80°Cで30分間熱処理した酵素試料についても同様な反応を行い、酵素活性は4 MUの検量線から求めた。活性の単位は、1分間に1 pmolの4 MUを生成する酵素量を1 unitとした。

3. 細胞分画

唾液腺に0.45Mのsucrose (pH 7.0)を加え、グラステフロンホモナイザーを用いて10%ホモジネートを調製した。これをナイロクロスで濾過した後、Cohen-Forterre ら¹⁹⁾の方法に従って細胞分画を行った。最初にホモジネートを650×gで5分間遠心分離し、得られた沈殿を核画分とした。上清をさらに12,000×gで20分間遠心分離した後の沈殿を粗リソゾーム画分とし、ここで得られた上清をさらに105,000×gで60分遠心分離し、ミクロゾーム画分(沈殿)と可溶性画分(上清)を得た。核画分、粗リソゾーム画分およびミクロゾーム画分は、可溶性画分と等量になるように0.45M sucroseを加え、懸濁させた後、酵素活性とタンパク質量を測定した。

4. その他の酵素活性およびタンパク質量の測定

N-Acetyl- β -glucosaminidase 活性は、P-nitrophenyl- β -glucosaminide を基質とし、Borooah ら²⁰⁾の方法に従って測定した。 β -Glucuronidase 活性は P-nitrophenyl- β -glucuronide を基質とし、Stahl と Touster²¹⁾の方法に従って測定した。試料中のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標

Fig. 1 Effect of pH on sialidase activity in salivary gland homogenates. The buffer used in the assay mixture was 0.2M acetate buffer. SMG, submandibular gland; SLG, sublingual gland; PG, parotid gland.

Fig. 2 Effect of pH on sialidase activity in brain, liver and kidney homogenates. The buffer used in the assay mixture was 0.2M acetate buffer.

準とし、Lowry ら²²⁾の方法に従って定量した。

結 果

1. シアリダーゼ活性に対する pH の影響

動物組織のシアリダーゼは不安定であり、凍結融解によって著しく活性が低下することが知られている^{8,9,23)}。そこで本実験では、酵素活性の測定は、組織を摘出してから24時間以内に行った。

唾液腺ホモジネートについてシアリダーゼ活性

の pH による影響を検討したところ、顎下腺の至適 pH は4.0であり、舌下腺と耳下腺の至適 pH は4.5であった (Fig. 1)。また脳と腎臓のホモジネートのシアリダーゼの至適 pH は4.0であり、肝臓では4.5であった (Fig. 2)。これらの結果をまとめて Table 1 に示した。唾液腺のシアリダーゼは、脳、肝臓および腎臓の場合と同様に至適 pH が酸性域にあり、ほぼ同一の pH (4.0~4.5) で最大活性を示した。

Table 1 Optimum pH of sialidase activity in salivary gland, brain, liver and kidney homogenats

Tissue	Optimum pH
SMG	4.0
SLG	4.5
PG	4.5
Brain	4.0
Liver	4.5
Kidney	4.0

Table 2 Sialidase activity in salivary glands, brain, liver and Kidney

Tissue	Sialidase activity	
	(units/mg tissue)	(units/mg protein)
SMG	7.9± 0.82	77.9± 6.0
SLG	5.2± 0.48	62.1± 6.3
PG	7.1± 0.62	69.0± 5.4
Brain	14.5± 0.56	173.4±10.6
Liver	31.3± 2.21	254.0±23.3
Kidney	312 ±10.62	2346 ±143

Each value shows the mean±S.E. of 6 animals.

Table 3 Sialidase activity in subcellular fractions of salivary glands

Fraction			Sialidase activity	
			(units/g tissue)	(units/mg protein)
SMG	Nuclear	38.9	2107 (14.5)	54.2 (13.1)
	Lysosomal	44.4	8602 (59.3)	193.7 (46.7)
	Microsomal	20.5	3186 (22.0)	155.4 (37.4)
	Supernatant	51.2	602 (4.2)	11.8 (2.8)
SLG	Nuclear	18.6	1854 (25.1)	99.7 (32.9)
	Lysosomal	38.3	3868 (52.2)	101.0 (33.4)
	Microsomal	13.2	1140 (15.4)	86.4 (28.6)
	Supernatant	35.0	538 (7.3)	15.4 (5.1)
PG	Nuclear	11.1	722 (5.7)	65.0 (18.2)
	Lysosomal	42.9	8445 (66.3)	196.9 (55.0)
	Microsomal	33.9	2735 (21.5)	80.7 (22.6)
	Supernatant	54.7	827 (6.5)	15.1 (4.2)

Enzyme activity was measured at pH 4.5.

Values in parentheses show the percent of total activity.

2. シアリダーゼ活性の比較

各至適 pH における組織ホモジネートのシアリダーゼ活性を測定した結果、唾液腺では、総活性は顎下腺で最も高く、次いで耳下腺、舌下腺の順であった。比活性で比較した場合も同様に、顎下腺、耳下腺および舌下腺の順であった。しかし、各唾液腺間で著しい活性の差はみられなかった (Table 2)。さらに、脳、肝臓および腎臓のホモジネートの活性と比較したところ、いずれの組織でも唾液腺に比べて活性が高かった。特に腎臓の活性が著しく高く、顎下腺の30倍以上の活性を示した (Table 2)。

3. シアリダーゼの細胞内分布

唾液腺のホモジネートを遠心分画し、それぞれ

の細胞画分におけるシアリダーゼ活性を pH 4.5 の条件下で測定した。なお、リソゾーム画分のマーカー酵素である N-acetyl- β -glucosaminidase と β -glucuronidase の活性を測定したところ、結果には示さなかったが、各唾液腺ともにリソゾーム画分で50%以上の活性が認められた。

各画分のシアリダーゼ活性を測定した結果、Table 3 および Fig. 3 に示したように、顎下腺、舌下腺、耳下腺ともに多くの活性がリソゾーム画分に認められた。総活性で比較した場合、この画分の活性は顎下腺で59.3%、舌下腺で52.2%、さらに耳下腺では66.3%であった。従って、唾液腺のシアリダーゼは主にリソゾーム性であることが明らかとなった。この結果は、他の動物組織での

Fig. 3 Interacellular distribution of sialidase activity in salivary glands. Enzyme activity was measured at pH 4.5. Relative specific activity=percentage of total activity/percentage of total protein. N, nuclear fraction; L, lysosomal fraction; M, microsomal fraction; S, soluble fraction.

Fig. 4 Intracellular distribution of sialidase activity in salivary glands. Enzyme activity was measured at pH 5.5. Relative specific activity=percentage of total activity/percentage of total protein. N, nuclear fraction; L, lysosomal fraction; M, microsomal fraction; S, soluble fraction.

Fig. 5 Effect of pH on sialidase activity in salivary gland crude homogenate (○—○), lysosomal fraction (●—●) and soluble fraction (△—△). The buffer used in the assay mixture was 0.2 M acetate buffer.

酵素の細胞内分布での結果とよく一致する^{3-6,24)}。さらに、核画分とミクロゾーム画分にも比較的高い活性が認められたが、可溶性画分の活性は極めて低く、総活性は顎下腺で4.2%、舌下腺で7.3%、さらに耳下腺では6.5%であった。

各画分のシアリダーゼ活性を pH 5.5の条件下で測定した結果、Fig. 4 に示したように、顎下腺と耳下腺では全体の活性が pH 4.5で測定した場合に比べて低くなり、特にリソゾーム画分の活性が明らかに低下した（顎下腺の総活性、26.3%；耳下腺の総活性、41.5%）。一方、この条件下（pH 5.5）では可溶性画分の総活性がかなり高くなり、顎下腺では50.8%、耳下腺では28.8%にまで活性が増加した。なお、舌下腺の各画分の総活性は、pH 5.5で測定した場合でも明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、顎下腺と耳下腺では、リソゾーム画分と可溶性画分のシアリダーゼの至適 pH が異なることが強く示唆された。そこで、これらの画分の酵素に対する pH の影響について検討した。

4. リソゾームと可溶性画分のシアリダーゼ活性に対する pH の影響

結果は Fig. 5 に示したように、各唾液腺のリソゾーム画分のシアリダーゼ活性の pH による変動カーブは、ホモジネートでのカーブと比較的の

く一致した。さらに、至適 pH も同一であった（顎下腺、pH 4.0；舌下腺と耳下腺、pH 4.5）。しかし、顎下腺と耳下腺の可溶性画分の酵素の pH による変動カーブは、リソゾーム画分のそれとはかなり異なり、より中性域に最大活性が認められた（顎下腺、耳下腺ともに至適 pH 5.5）。なお、舌下腺の可溶性画分では、酵素活性が低かったため、今回は pH による影響を検討することはできなかったが、前述の結果（各細胞画分の pH 4.5 と pH 5.5での活性の比較）から判断した場合、舌下腺の可溶性画分のシアリダーゼの至適 pH は、リソゾーム画分のそれに近い値を示すことが推察される。

以上の結果から、顎下腺と耳下腺のシアリダーゼは、リソゾーム性と可溶性の酵素の間で至適 pH がかなり異なることが明らかとなった。

5. シアリダーゼ活性と基質濃度との関係

唾液腺 ホモジネートについて、基質（4 MU-AcNeu）濃度と酵素活性との関係について検討した結果は Fig. 6 に示した。Lineweaver-Burk のプロットから K_m 値を求めた結果、顎下腺で0.091 mM、舌下腺で0.089mM、さらに耳下腺では0.092 mM であり、いずれもほぼ等しい K_m 値を示した。

また、脳、肝臓および腎臓のホモジネートでの

Fig. 6 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in crude homogenate enzyme preparations from SMG (O), SLG (Δ) and PG ($\square$).

Fig. 7 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in crude homogenate enzyme preparations from brain, liver and kidney. Enzyme was measured at pH 4.5.

K_m 値は、それぞれ0.091mM, 0.208mM および 0.192mM であり (Fig. 7), 肝臓と腎臓での K_m 値は同じ基質を用いた他の報告での値とよく一致した²⁵⁾。

唾液腺のリソゾーム画分のシアリダーゼについて、Lineweaver-Burk のプロットから K_m 値を求めたところ、顎下腺、舌下腺、耳下腺ともに約 0.09mM であり (Fig. 8), ホモジネートでのシ

Fig. 8 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in lysosomal enzyme preparations from SMG (O), SLG (Δ) and PG (□). Enzyme activity was measured at pH 4.5.

Fig. 9 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in lysosomal enzyme preparations from brain, liver and kidney. Enzyme activity was measured at pH 4.5.

アリダーゼの K_m 値とよく一致する値を示した。さらに、脳、肝臓および腎臓のリソゾーム画分について求めた K_m 値は、それぞれ0.089 mM, 0.201mM および0.185mM であり、やはりホモジネートでの K_m 値とよく一致した (Fig. 9)。

一方、唾液腺（顎下腺と耳下腺）の可溶性画分の酵素の K_m 値は、ともに0.25mM であり (Fig. 10), リソゾーム画分での K_m 値とはかなり異なる値を示した。舌下腺の可溶性画分では酵素活性が低いため、今回は K_m 値を求めることはで

Fig. 10 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in soluble enzyme preparations from SMG (O) and PG (□). Enzyme activity was measured at pH 5.5.

Fig. 11 Effect of 4MU-AcNeu concentration on the rate of hydrolysis in soluble enzyme preparations from brain, liver and kidney. Enzyme activity was measured at pH 5.5.

きなかった。

脳、肝臓および腎臓の可溶性画分のシアリダーゼの K_m 値は、それぞれ0.25mM, 0.42mM および0.31mM であった (Fig. 11)。

考 察

哺乳動物のシアリダーゼは種々の組織中に広く分布しているが、脳と肝臓で活性が高く、本酵素に関する研究は、主にこれらの組織においてなさ

れてきた。Carubelli ら²⁶⁾は、ラット諸臓器のシアリダーゼ活性を比較しており、肝臓、脳、乳腺で高い活性が認められ、腎臓と小腸では中等度の活性が、さらに脾臓や睾丸では極めて活性が低いことを認めている。彼らは、基質としてシアリルラクトースを用いているが、今回われわれが 4 MU·AcNeu を基質として測定したところ、肝臓と脳よりも腎臓でかなり高い活性値が得られた。この結果は、同基質を用いた最近の報告²⁵⁾での結果とよく一致する。

一般に細菌性および動物性シアリダーゼは、使用する基質によって異なる活性を示すことによく知られており²⁷⁻³⁰⁾、単に活性値の比較だけで、酵素の増減を比較することは困難であると思われる。シアリダーゼの基質特異性の違いは、酵素の種類、酵素の純度、内因性基質の存在などに起因するものと思われるが、動物性シアリダーゼは不安定であり、高度の精製が困難なため、どの基質に対して最も特異的に作用するかを明らかにするためには、さらに今後の研究が必要である。

今回われわれが用いた 4 MU·AcNeu は比較的最近合成された基質であり¹⁸⁾、シアリダーゼ活性を正確に測定でき、しかも測定操作が簡易なため、多くの研究者が酵素活性の測定にこの基質を使用するようになった^{7,23,25,31-34)}。

ところで、唾液腺では、ラットの顎下腺と舌下腺でシアリダーゼの存在が報告されているだけであり¹²⁾、唾液腺の本酵素の性質については全く明らかにされていない。本研究で三大唾液腺のシアリダーゼを測定したところ、脳、肝臓および腎臓の活性に比べて低活性ではあったが、明らかなシアリダーゼ活性が認められた。総活性および比活性ともに顎下腺が最も高く、次いで耳下腺、舌下腺の順であったが、各唾液腺間で著しい活性の差はみられなかった。唾液腺の糖タンパクはシアル酸を多量に含み、さらに、三大唾液腺のうち、舌下腺が最も多くの糖タンパクを含有することが知られているが¹³⁻¹⁵⁾、シアリダーゼ活性は舌下腺で最も低かった。従って、唾液腺のシアリダーゼは、単に糖タンパクの代謝系に関与しているだけではないことが推察される。生体内でのシアリダーゼの内因性基質に関しての詳細については明ら

かではなく、本酵素の生理学的意義についても多くの可能性が提唱されているが¹⁾、いまだ不明な点が多い。

本研究で唾液腺ホモジネートのシアリダーゼの pH による影響を検討した結果、至適 pH は顎下腺で 4.0、舌下腺と耳下腺では 4.5 であった。これらの値は脳、肝臓および腎臓の酵素の至適 pH (4.0~4.5) とよく一致した。

唾液腺シアリダーゼの細胞内分布を検討した結果、顎下腺、舌下腺、耳下腺ともにリソゾーム画分に 50% 以上の活性が認められた。従って、唾液腺のシアリダーゼの多くはリソゾーム性であり、この結果も脳、肝臓および腎臓の酵素の細胞内分布における結果とよく一致する^{3-6,24)}。さらに、唾液腺では可溶性画分にもわずかではあるが活性が認められた (pH 4.5 で測定した場合)。しかし、pH 5.5 で測定したところ、顎下腺と耳下腺の可溶性画分の活性がかなり上昇することがわかった。このことから、リソゾーム画分と可溶性画分の酵素の至適 pH が異なることが推察されたので、両画分の酵素につき、さらに pH による影響について検討した。その結果、リソゾーム画分での至適 pH はホモジネートで測定した場合の値 (pH 4.0~4.5) とよく一致したが、可溶性画分では、顎下腺、耳下腺ともに至適 pH が 5.5 であり、リソゾーム画分での至適 pH とはかなり異なる値を示した。なお結果には示さなかったが、唾液腺シアリダーゼの核画分とミクロゾーム画分の酵素の至適 pH は 4.0 から 5.0 の範囲にあった。

動物性シアリダーゼは主にリソゾーム性であるが、いくつかの組織では可溶性の酵素も存在し、リソゾーム性の酵素の性質とは異なることが知られている³⁻⁸⁾。例えば、肝臓、脳、乳腺のリソゾーム性酵素の至適 pH は 4.0 から 4.5 であるのに対して、可溶性酵素のそれは 5.0 から 5.8 の範囲にあることが報告されている^{4-6,8)}。

Perlitzsh と Glickman¹⁶⁾ は、ヒトの分泌唾液中にシアリダーゼの存在を認めており、その至適 pH は 5.5 から 6.0 の範囲にあることを報告している。この値は顎下腺と耳下腺の可溶性画分の酵素の至適 pH によく一致しており、従って、唾液腺の可溶性画分のシアリダーゼが唾液中に分泌され

ている可能性が十分考えられるが、この点については今後さらに検討する必要があると思われる。

唾液腺のホモジネート、リソゾーム画分および可溶性画分のシアリダーゼの基質（4 MU-AcNeu）に対する K_m 値を比較したところ、ホモジネートでの K_m 値は、各唾液腺ともに約0.09 mM であり、リソゾーム画分での K_m 値もほぼ等しい値を示した。一方、顎下腺と耳下腺の可溶性画分での K_m 値は0.25mM であり、リソゾーム画分の K_m 値とはかなり異なる値を示した。さらに、脳、肝臓および腎臓のホモジネートでの K_m 値は、約0.09mM、0.21mM および0.19mM であり、肝臓と腎臓での K_m 値は、同基質を用いた他の報告での値とよく一致した²⁵⁾。また、これらの組織のリソゾーム画分での K_m 値は、いずれもホモジネートでの K_m 値とほぼ等しい値を示したが、可溶性画分での K_m 値は脳で0.25mM、肝臓で0.42mM、さらに腎臓で0.31mM であった。

以上の結果から、ラットの唾液腺（顎下腺と耳下腺）のシアリダーゼは、脳や肝臓の場合と同様にリソゾーム性と可溶性の酵素が存在し、それぞれの至適 pH と K_m 値が異なることが明らかとなった。目下、われわれは唾液腺シアリダーゼのさらに詳細な性質について検討中である。

結 論

ラット唾液腺シアリダーゼを合成基質である 4 MU-AcNeu を用いて測定し、さらに、2・3の酵素学的性質について検討し、以下の結論を得た。

1. 唾液腺のシアリダーゼは、脳、肝臓および腎臓の活性に比べて低かったが、明らかな活性が認められた。総活性および比活性ともに顎下腺が最も高く、次いで耳下腺、舌下腺の順であったが、

各唾液腺間で著しい活性の差はみられなかった。

2. 唾液腺ホモジネートのシアリダーゼの至適 pH は、顎下腺で4.5、舌下腺と耳下腺では4.0であった。脳、肝臓および腎臓のホモジネートのシアリダーゼ活性の至適 pH も4.0から4.5の範囲であった。この場合の基質、4 MU-AcNeu に対する K_m 値は、顎下腺、舌下腺、耳下腺ともに約0.09mM であった。一方、脳、肝臓および腎臓のホモジネートでの K_m 値は、それぞれ0.091mM、0.208mM および0.192mM であった。

3. 唾液腺ホモジネートを遠心画し、各画分の活性を比較した結果、顎下腺、舌下腺および耳下腺ともにリソゾーム画分に高い活性が認められた(pH 4.5で測定した場合)。可溶性画分にもわずかなではあるが活性が認められ、pH 5.5で測定すると顎下腺と耳下腺の可溶性画分の活性がかなり増加した。舌下腺の可溶性画分の活性は極めて低かった。

4. リソゾーム画分のシアリダーゼの至適 pH は、顎下腺で4.0、舌下腺と耳下腺では4.5であり、これらの値はホモジネートで測定した場合の値と同一であった。リソゾーム画分での 4 MU-AcNeu に対する K_m 値は、各唾液腺ともに約0.09mM であり、唾液腺ホモジネートでの K_m 値とよく一致した。脳、肝臓および腎臓のリソゾーム画分での K_m 値も、ホモジネートで求めた K_m 値にほぼ一致した。

5. 可溶性画分のシアリダーゼの至適 pH は、顎下腺、耳下腺ともに5.5であった。この場合の 4 MU-AcNeu に対する K_m 値はともに0.25mM であり、リソゾーム画分での K_m 値は異なる値であった。脳、肝臓および腎臓の可溶性画分の K_m 値も、リソゾーム画分の K_m とは異なる値を示した。

抄録：ラット唾液腺のシアリダーゼ活性を合成基質である 4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid (4MU-AcNeu) を用いて測定し、さらに、2・3の酵素学的性質について検討した。唾液腺のシアリダーゼは、総活性、比活性ともに顎下腺で最も高く、次いで耳下腺、舌下腺の順であった。唾液腺ホモジネートでのシアリダーゼの至適 pH は、顎下腺で4.0、舌下腺と耳下腺では4.5であり、脳、肝臓および腎臓のシアリダーゼの至適 pH (4.0~4.5) とよく一致した。各唾液腺ともにリソゾーム画分に多くの活性が認められ、顎下腺と耳下腺では可溶性画分にも活性が認められた。リソゾーム画分のシアリダーゼの至適 pH、さらに 4MU-AcNeu に対する K_m 値は、ホモジネートで測定した場合の値とよく一致した(至適 pH, 4.0~4.5 ;

Km 値, 0.09mM)。一方, 顎下腺と耳下腺の可溶性画分の至適 pH は5.5, Km 値は0.25mM であり, リソゾーム画分のシアリダーゼのそれらとは異なる値を示した。

文 献

- 1) 斎藤政樹: シアリダーゼ. 代謝 16: 761-780, 1979.
- 2) Warren, L. and Spearing, C. W.: Mammalian sialidase (neuraminidase). Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 489-492, 1960.
- 3) Horvat, A. and Touster, O.: On the lysosomal occurrence and properties of the neuraminidase of rat liver and of ehlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 243: 4380-4390, 1968.
- 4) Tulsiani, D. R. P. and Carubelli, R.: Studies on the soluble and lysosomal neuraminidases of rat liver. J. Biol. Chem. 245: 1821-1827, 1970.
- 5) Carubelli, R. and Tulsian, D. R. P.: Neuraminidase activity in brain and liver of rats during development. Biochim. Biophys. Acta 237: 78-87, 1971.
- 6) Tulsiani, D. R. P. and Carubelli, R.: Studies on the soluble and lysosomal neuraminidases of rat mammary glands. Biochim. Biophys. Acta 227: 139-153, 1971.
- 7) Alhadeff, J. A. and Wolfe, S.: Characterization of human liver (4-methylumbelliferyl- α -D-N-actylneuraminic acid)neuraminidase activity. Int. J. Biochem. 13: 975-980, 1981.
- 8) Meyer, D. M., Lemonnier, M. and Bourrillon, R.: Human liver neuraminidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 1302-1309, 1981.
- 9) Miyagi, T. and Tsuiki, S.: Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver. J. Biol. Chem. 260: 6710-6716, 1985.
- 10) Lowden, J. A. and O'Brien, J. S.: Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 31: 1-18, 1979.
- 11) 小林卓郎, 黒岩義五郎: シアリドーシス. 日本臨床 44: 1671-1676, 1986.
- 12) Nijjar, M. S., Pritchard, E. T., Dawes, C. and Philips, S. R.: Neuraminidase activity in the salivary glands of rats and human saliva. Arch. Oral Biol. 15: 89-92, 1970.
- 13) Kofoed, J. A., Curbelo, H. M. and Houssary, A. B.: Acid glycosaminoglycans and sialic acid content in salivary glands of rats. J. Dent. Res. 48: 555-558, 1969.
- 14) Moschera, J. and Pigman, W.: The isolation and characterization of rat sublingual mucus-glycoprotein. Carbohydr. Res. 40: 53-67, 1975.
- 15) Herp, A., Wu, A. M. and Moschera, J.: Current concepts of the structure and nature of mammalian salivary mucous glycoproteins. Mol. Cell. Biol. 23: 27-44, 1979.
- 16) Perlitsh, M. J. and Glickman, I.: Salivary neuraminidase: II. Its source in human whole saliva. J. Dent. Res. 45: 1239, 1966.
- 17) Perlitsh, M. J. and Glickman, I.: Salivary neuraminidase: III. Its relation to oral disease. J. Periodontol. 38: 189-192, 1967.
- 18) Potier, M., Mameli, L., Bélisle, M., Dallaire, L. and Melancon, S. B.: Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic acid) substrate. Anal. Biochem. 94: 287-296, 1979.
- 19) Cohen-Forterre, L., Mozere, G., Andre, J. and Sternberg, M.: Studies on kidney sialidase in normal and diabetic rats. Biochim. Biophys. Acta 801: 138-145, 1984.
- 20) Boroah, J., Leaback, D. H. and Walker, P. G.: Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl- β -glucosaminidase. Biochem. J. 78: 106-110, 1961.
- 21) Stahl, P. D. and Touster, O.: β -Glucuronidase of rat liver lysosomes: purification, properties, subunits. J. Biol. Chem. 246: 5398-5406, 1971.
- 22) 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.
- 23) Spaltro, J. and Alhadeff, J. A.: Solubilization, stabilization and isoelectric focusing of human liver neuraminidase activity. Biochim. Biophys. Acta 800: 159-165, 1984.
- 24) Mahadevan, S., Nduaguba, J. C. and Tappel, A. L.: Sialidase of rat liver and kidney. J. Biol. Chem. 242: 4409-4413, 1967.
- 25) Baricos, W. H., Cortez-Schwartz, S. and Shah, S. V.: Renal neuraminidase: Characterization in normal rat kidney and measurement in experimentally induced nephrotic syndrome. Biochem. J. 239: 705-710, 1986.
- 26) Carubelli, R., Trucco, R. E. and Caputto, R.: Neuraminidase activity in mammalian organs. Biochim. Biophys. Acta 60: 196-

- 197, 1962.
- 27) Drzeniek, R.: Difference in splitting capacity of virus and v. cholerae neuraminidases on sialic acid type substrates. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **26** : 631-638, 1967.
- 28) Drzeniek, R. and Gauhe, A.: Difference in substrate specificity of myxovirus neuraminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38** : 651-656, 1970.
- 29) O'Brien, J. S.: Neuraminidase deficiency in the cherry red spot-myoclonus syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79** : 1136-1141, 1977.
- 30) Strecker, G. and Michalski, J. C.: Biochemical basis of six different types of sialidosis. *FEBS Lett.* **85** : 20-24, 1978.
- 31) Myers, R. W., Lee, R. T., Lee, Y. C., Thomas, G. H., Reynolds, L. W. and Uchida, Y.: The synthesis of 4-methyl-umbelliferyl α -ketoside of N-acetylneuraminic acid and its use in a fluorometric assay for neuraminidase. *Anal. Biochem.* **101** : 166-174, 1980.
- 32) McNamara, D., Beauregard, G., Nguyen, H. V., Yan, D. L. S., Bélisle, M. and Potier, M.: Characterization of human placental neuraminidases: stability, substrate specificity and molecular weight. *Biochem. J.* **205** : 345-351, 1982.
- 33) Den Tandt, W. R. and Scharpe, S.: Methylumbelliferyl-N-acetylneuraminic acid sialidase in human liver. *Biochem. Med.* **31** : 287-293, 1984.
- 34) Samollow, P. B., VandeBerg, J. L., Kunz, H. W. and Gill, T. J.: Analysis of neuraminidase isozyme phenotypes in mammalian tissues: an electrophoretic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** : 1182-1188, 1985.