

〔原著〕 松本歯学 5 : 21~26, 1979

カエル舌粘膜のホスファターゼ活性 その1

河野のり子, 野村 浩道

松本歯科大学 口腔生理学教室 (主任 野村浩道 教授)

Phosphatase Activities of the Mucous Membrane of the Frog Tongue I

NORIKO KONO and HIROMICHI NOMURA

*Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College
(Chief ; Prof. H. Nomura)*

Summary

Biochemical and histochemical studies on the phosphatase activities of the mucous membrane of the frog tongue were carried out.

The biochemical study strongly suggested that the mucous membrane of the tongue contains both ATPase and alkaline phosphatase activities. But, since the ATPase activity was dependent on the pH of the incubating solution and the maximal activity was obtained around pH 9.0, the ATPase activity may be partly due to the alkaline phosphatase activity.

The histochemical study revealed that ATPase activity was localized on the superficial layer of the tongue. Great activity was exhibited in the sensory discs of the fungiform papillae and in the ciliated cell layer of the back of the tongue. Alkaline phosphatase activity could not be demonstrated histochemically in the present study.

ヒトや哺乳動物の口腔粘膜、とくに味蕾周辺の上皮組織にはホスファターゼが豊富に存在する。Baradi & Bourne (1953) は、ウサギ葉状乳頭を組織化学的に調べ、味蕾周辺の上皮にスクレオチダーゼ、ATP アーゼ、アルカリ性および酸性ホスファターゼ活性がみられることを示している。また、Kagawa & Osanai (1963) によると、ネコでは、アルカリ性ホスファターゼ活性は、舌粘膜、頬粘膜および口腔底上皮の全面に亘ってみられる

という。しかし、これらホスファターゼがどのような役割を果しているかはわかっていない。

口腔粘膜のホスファターゼの生化学的研究は少なく、味蕾内の酵素を対象とした若干の研究があるに過ぎない。その中でもっとも詳細に行われた Lum & Henkin (1976) の研究によると、味蕾を含む有郭乳頭も、味蕾をほとんど含まない舌上皮も、ともに高い酸性ホスファターゼ、Mg-ATP アーゼ、5'-スクレオチダーゼ活性がみられるという。従って、これらホスファターゼが味覚受容

(1979年4月21日受理)

にとくに密接に関連しているとは考えにくい。

野村と浅沼 (1976) は, カエル舌の ^{45}Ca とり込みおよび放出が冷却によって減少することから, カエル舌粘膜に Ca イオンを能動輸送する系があることを示唆している。 Ca イオンの能動輸送は一般に Ca-ATP アーゼによって行われる (Schatzmann, 1975) ので, もしこの示唆が正しければ, カエル舌粘膜には強い Ca-ATP アーゼ活性がみられる可能性がある。そこで, 本研究は, 味覚器を有するカエル舌背粘膜と味覚器を有しない舌下面粘膜を摘出し, ホモジナイズし, ホモジネートおよびその遠心分画について Ca-ATP アーゼおよびアルカリ性ホスファターゼ活性がみられるかどうかを調べた。また参考のため, ATP アーゼおよびアルカリ性ホスファターゼの組織化学も行った。

材料と方法

I. 材料

本研究で使用した材料は体重 200~250 g のウシガエル (食用ガエル *Rana catesbiana*) の舌である。脳および脊髓を針で破壊したのち, 切り出した舌は氷で冷却したリンガー液の入ったビーカーに入れ, ついで, 5°C の低温室において舌背および舌下面粘膜を分離した。1 回のホモジニゼーションに用いたウシガエルの舌は約 10 個で, 湿重量にしてそれぞれ 0.3~0.7 g であった。なお組織化学の実験ではトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) およびニホンアカガエル (*Rana japonica*) を使用した。

II. 方法

A. 遠心分画

遠心分画の方法は前報 (河野, 野村, 1977) で述べた方法とほぼ同様である。舌粘膜片に 0.25 M 蔗糖を含む pH 7.4 の 10 mM トリス塩酸緩衝液を約 9 倍量加え, 30 秒ずつ 2 回ホモジナイズし, 図 1 の方法に従って遠心分画して P_1 , P_2 , P_3 , および S_3 を得た。ホモジナイズには ULTRA-TURRAX TP18-10 (JKA Werk) を使用した。酵素活性測定および蛋白質定量に際しては, P_1 は 2~4 ml の, P_2 および P_3 は 1 ml の上記緩衝液で再懸濁し, ホモジネートは同緩衝液で 4 倍に稀釈した。なお上清 S_3 は原液のまま使用した。

B. 酵素活性測定

ホスファターゼ活性は, 試料溶液 0.025 ml または 0.05 ml に反応溶液を加えて全量を 1 ml とし, 通常 30°C で 30 分間インキュベートし, その直後同量のトリクロール酢酸 (12%) を加えて反応を停止させ, 除蛋白後生成無機磷酸量を Fiske-Sabbarow 法にて測定した。

各ホスファターゼ活性測定に使用した反応溶液の基準の組成は以下の通りである。

(a) Ca^{2+} -ATP アーゼ

40 mM トリス塩酸緩衝液, 10 mM CaCl_2 , 60 mM NaCl , 2~5 mM ATP , 1 mM ウアバイン。

(b) Na , K -ATP アーゼ

40 mM トリス塩酸緩衝液, 140 mM NaCl , 14 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , 5 mM ATP 。

(c) アルカリ性ホスファターゼ

50 mM NaHCO_3 - NaOH 緩衝液 (pH 9.6), 5 mM β -グリセロ磷酸ナトリウム, 5 mM CaCl_2 または MgCl_2 。

C. 蛋白質定量

蛋白質の定量は Lowry 法にて行った。試料溶液は 1 回の実験に 0.05 ml を用い, 比色定量は 660 nm で行った。標準には牛血清アルブミン結晶 (Sigma 社製) を用いた。

D. 組織化学

トノサマガエルあるいはニホンアカガエルから舌を切り出し, リンガー液でよく洗ったのち 10% カルシウムホルモールあるいは 5% グルタルアルデヒドで 30~60 分間固定した。固定した舌は, 一昼夜水洗いしてから 10% ゼラチンで包み, -30°C ~ -27°C に冷却したクリオスタットで厚さ 5~6 μm の切片にした。切片は十分に乾燥してから反応溶液に浸し, 通常 1~2 時間インキュベートした。

ホスファターゼ活性は通常用いられている方法で調べた。すなわち, ATP アーゼ活性は, 磷酸鉛法およびカルシウム・コバルト法で, アルカリ性ホスファターゼ活性は, カルシウム・コバルト法, アゾ色素法およびパラニトロフェニール法で調べた。

結 果

A. 蛋白質量

舌背および舌下面粘膜片のホモジネートから得られた総蛋白質量は, それぞれ粘膜片の湿重量の

2.73%, 1.54%であった。この蛋白質を図1の方法に従って P_1 , P_2 , P_3 および S_3 に分画したところ、それぞれ90%, 89%を回収することができ、図2のごとき割合で各分画へ配分された。前報のウサギ葉状乳頭および舌背粘膜片の各遠心分画の蛋白質配分率と比較して、可溶成分(S)における蛋白質量が若干少なく、 P_1 分画の蛋白質量が若干多い。この違いは動物の種類が異なることと、カエルでは舌粘膜の切り出しの際にかなり多量の筋肉が入ったことによると考えられる。

舌背粘膜片と舌下面粘膜片と比べて、前者では若干 P_2 および P_3 分画の蛋白質量の配分率が高くなっている。このことも粘膜を構成する細胞の違いとともに、筋肉の混入の程度の違いがその一因となっているのかも知れない。

B. Ca-ATP アーゼ活性

(1)各遠心分画の Ca-ATP アーゼ活性

図3は、カエル舌背および舌下面粘膜片ホモジネートから得られる各分画における Ca-ATP アーゼの比活性を示すグラフである。3回の実験の平均値で示してある。図からわかるように、舌背粘膜片の P_3 分画では著しく Ca-ATP アーゼ比活性が高く、ホモジネートの4.2倍もある。これに対し舌下面粘膜片では2.1倍に過ぎない。形質膜の破片を多く含むと考えられるこの分画で Ca-ATP アーゼ活性が高いことは、この酵素が膜結合酵素であることを示唆している。

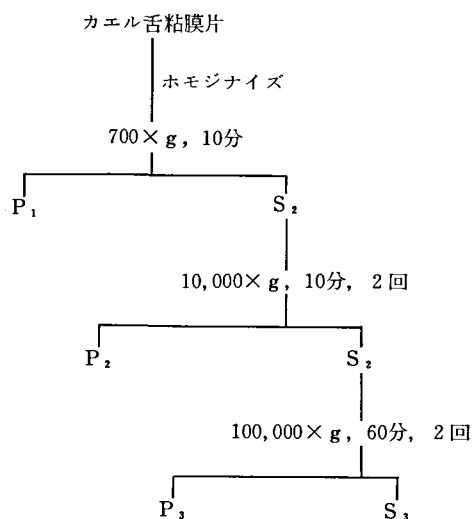


図1: 遠心分画法の概要 P: 沈渣, S: 上清

前報(河野, 野村, 1977)のウサギ葉状乳頭と舌背粘膜の場合とは異なり、カエルでは味蕾を含む舌背粘膜と味蕾を含まない舌下面粘膜とで、ホモジネートにおける Ca-ATP アーゼ比活性は後者の方が高かった。このことは、恐らくカエル舌下面粘膜は絨毛上皮で覆われているので、絨毛上皮に高い Ca-ATP アーゼ活性があるためと考えられる。

(2) Ca-ATP アーゼ活性測定条件の検討

(a)基質濃度

ATP 濃度を 0.2 mM から 15 mM まで変化させて舌背粘膜 P_3 分画の Ca-ATP アーゼ比活性に及ぼす ATP 濃度の影響を調べたところ、反応速度は 2~5 mM で最大に達し、測定した 15 mM まで一定であった。従って、基質濃度としては 2 mM あるいは 5 mM が適当と考えられた。

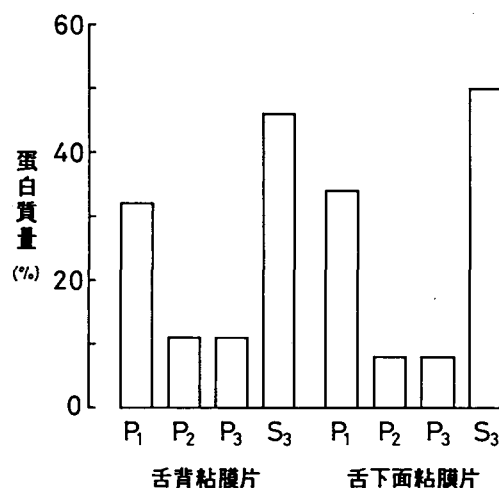


図2: 各遠心分画の蛋白質質量配分率

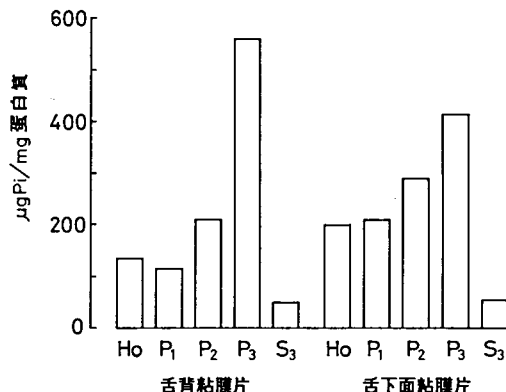


図3: 各遠心分画のCa-ATPアーゼ比活性

(b) 温度

インキュベーション温度を 15°C から 45°C まで変化させて, 舌背粘膜 P₃ 分画の Ca-ATP アーゼ比活性に及ぼす温度の影響を調べたところ, 反応速度は温度に正比例した. 従ってこの範囲の温度であれば, どの温度でも差し支えないと考えられた.

(c) インキュベーション時間

インキュベーション時間を 0 分から 90 分まで変化させて, 舌背粘膜 P₃ 分画の Ca-ATP アーゼ比活性に及ぼすインキュベーション時間の影響を調べたところ, 生成無機燐量とインキュベーション時間との関係を示すグラフはやや上に凸の対数函数的曲線となったが, 30~60 分のところではほぼ直線に近かった. インキュベーション時間は 30 分が適当であろうと考えた.

(d) 試料の量

舌背粘膜 P₃ 分画を用いて, 試料の量について検討したところ, 0.02 ml 以上であれば試料の量と生成無機燐量との間に正比例の関係が成り立ち, 実験誤差が少ないことがわかった. 従って, 実験に用いる試料の量は 0.05 ml または 0.1 ml が適当と考えられた.

(e) pH

図 4 は, 舌背粘膜 P₃ 分画の Ca-ATP アーゼ比活性に及ぼす pH の影響を調べた実験結果を示すグラフである. 比活性は pH 7.0 付近よりアルカリ側で徐々に上昇し, pH 9.0 で約 2 倍に達している. 1 例だけの実験結果であるが, pH 9.6 で比活性はやや低下していたので, この酵素の至適 pH は 9.0 付近にあるように思われる. この結果は, カエル舌粘膜には pH 9.0 付近で至適 pH を有するホスファターゼ, すなわちアルカリ性ホスファ

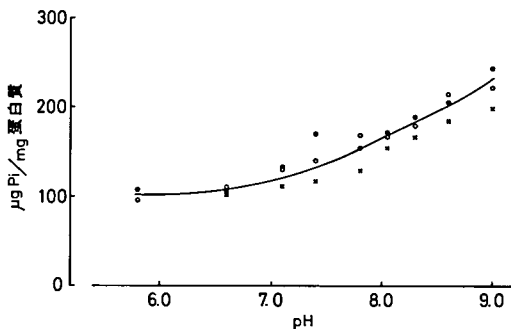


図 4: Ca-ATP アーゼ活性に及ぼす pH の影響. 舌背粘膜 P₃ 分画 3 例の結果を示す.

ターゼと, pH にほとんど依存しない ATP アーゼがあることを示唆している.

(f) Ca および Mg イオン

舌背粘膜 P₃ 分画を用い, インキュベーション溶液中の CaCl₂ あるいは MgCl₂ 濃度を変え, Ca および Mg イオンの Ca-ATP アーゼ比活性に及ぼす影響を調べたところ, 図 5 のごとき結果が得られた. 図でみられるごとく, CaCl₂ や MgCl₂ を全く加えなくてもかなり高い活性を示すが, CaCl₂ あるいは MgCl₂ を加えることにより 2~3 倍活性が上昇した. 至適濃度はどちらも 8 mM の付近にあった. このことは, ATP アーゼの基質が Ca-ATP あるいは Mg-ATP であることを示唆する. 以上の結果から, インキュベーション溶液には 5~10 mM CaCl₂ あるいは MgCl₂ を加える必要があると考えられた.

C. その他のホスファターゼ活性

(1) Na, K-ATP アーゼ活性

P₂ および P₃ 分画を用いて, Na, K-ATP アーゼ活性がみられるかどうかを検討した. しかし, Na, K-ATP アーゼの特異的阻害剤であるウアバインの効果がほとんどみられなかったことから, カエル舌粘膜には強い Na, K-ATP アーゼ活性は無いと思われた. 図 6 は実験結果をグラフにしたもので, 舌背粘膜 P₂ および P₃ 分画についてはウアバインを加えない方がやや高い比活性を示しているが, 有意の差ではないように思われる.

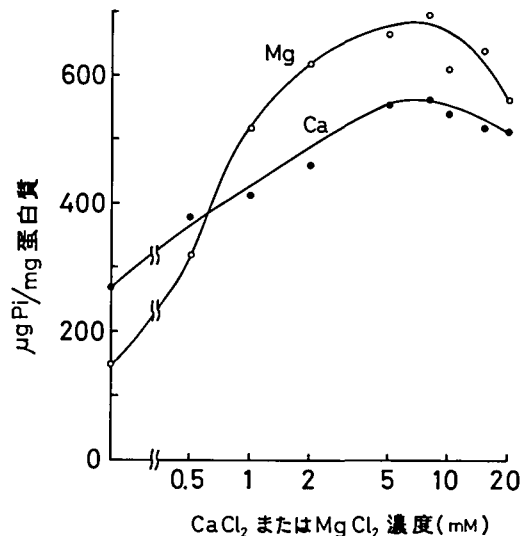


図 5: Ca-ATP アーゼ活性に及ぼす CaCl₂ または MgCl₂ 濃度の影響

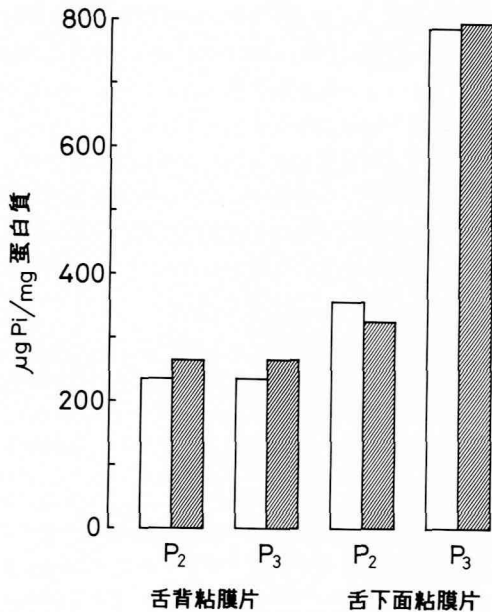


図6：ATPアーゼ活性に及ぼすウアピンの影響。白：1mMウアピン添加，斜線：ウアピン添加なし。

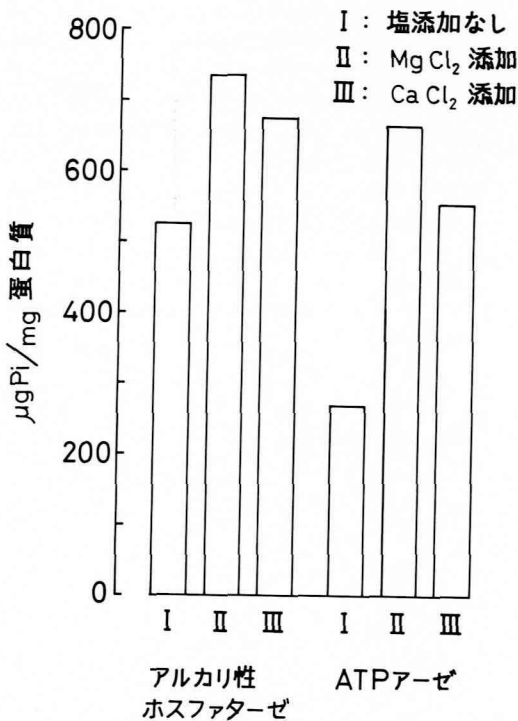


図7：アルカリ性ホスファターゼ活性とATPアーゼ活性の比較。舌背粘膜P₃分画を使用した。添加した塩濃度は5mM。

このグラフでは、舌下面粘膜のP₃分画が極めて高い酵素比活性を示している。しかし、この点は1回の実験結果であるので結論を出すことはできない。

(2)アルカリ性ホスファターゼ活性

舌背粘膜P₃分画を用いてアルカリ性ホスファターゼ活性を調べたところ、ATPアーゼ活性より高い活性がみられた。図7は、5mM CaCl₂ または MgCl₂ を加えたときと加えないときの酵素活性を調べた結果を示すグラフであるが、CaCl₂ または MgCl₂ を加えることによって活性はそれぞれ1.28倍および1.46倍に上昇している。

D. ATPアーゼとアルカリ性ホスファターゼの組織化学

図8は、燐酸鉛法によるATPアーゼ活性の組織化学の結果を示す。舌縁および舌下面粘膜は纖毛上皮で覆われているが、纖毛細胞に強いATPアーゼ活性がみられる。舌背には茸状乳頭(矢印)および糸状乳頭があるが、茸状乳頭の頂の感覚円盤の表層にATPアーゼ活性が強くみられるが、茸状乳頭の柄の表層や糸状乳頭の表層にもかなり強いATPアーゼ活性がみられる。

アルカリ性ホスファターゼ活性はどの方法を用いてもはっきりと検出することができなかった。

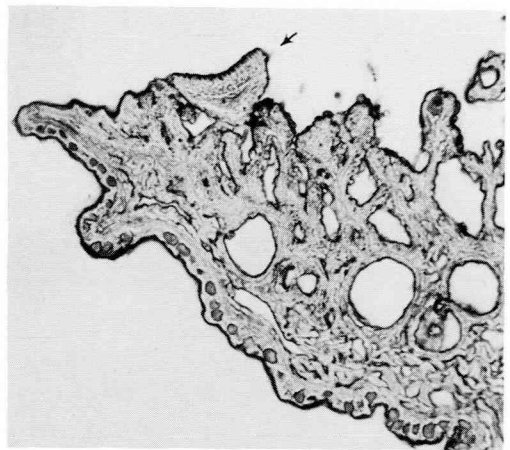


図8：カエル舌粘膜ATPアーゼ活性。材料：ニホンアカガエル，方法：硝酸鉛法，インキュベーション：23℃，1.5時間，切片の厚さ：3.5μm。矢印は茸状乳頭を示す。

考 察

本研究において, ウシガエル舌背および舌下面粘膜のホモジネートおよびその遠心分画を用いた生化学的実験ならびにトノサマガエルとニホンアカガエルを用いた組織化学的実験から, カエル舌粘膜に ATP アーゼおよびアルカリ性ホスファターゼ活性があることが強く示唆された。しかし, つぎに述べるごとき疑問点も残されており, 両ホスファターゼの存在を十分確認するには至っていない。

その疑問点は, 本研究で見いだされたカエル舌粘膜の Ca-ATP アーゼ活性がアルカリ性ホスファターゼによる見かけ上の活性ではないかという点である。いろいろの動物や臓器のアルカリ性ホスファターゼの中には ATP を加水分解するものも少なくないし, また本研究で得た Ca-ATP アーゼ活性に及ぼす pH の影響を示す曲線は, pH 9.0 付近で最大活性を有し, pH が低下するとともに活性は低下したので, この曲線は Ca-ATP アーゼ活性を示す曲線というよりはアルカリ性ホスファターゼ活性を示す曲線であると考えた方が説明しやすい。しかし, 組織化学的実験では, ATP アーゼ活性は強く現われたのに対しアルカリ性ホスファターゼ活性は極めて現われにくかったので, 本研究で見いだされた Ca-ATP アーゼ活性がアルカリ性ホスファターゼによる見かけ上の活性だと結論することもまたできない。この点は今後検討したい。

本研究に関連してもっとも興味を引く点はカエルだけでなくヒトや他の哺乳動物にもみられてい

る口腔粘膜のホスファターゼの役割である。我々は前報(野村, 浅沼, 1977)においてカエル舌粘膜に Ca イオン能動輸送系のあることを示唆したが, ヒトの冠血管拡張薬として与えられるニトログリセリンの口腔粘膜における吸収のメカニズムなどを含めて, 口腔粘膜における物質の透過に能動輸送系が存在するかどうかの問題は今後十分に検討されるべきものと考えられる。

文 献

- 1) Barad, A. F. and Bourne, G. H. (1953) Gustatory and olfactory epithelia. *Int. Rev. Cytol.* 2: 289—330.
- 2) Kagawa, S. and Osanai, K. (1963) Histochemical demonstration of hydrolytic enzymes and dehydrogenases in the oral mucosa of cats. *J. Histochem. Cytochem.* 11: 635—640.
- 3) 河野のり子, 野村浩道 (1977) ウサギ葉状乳頭ホスファターゼの生化学的研究 I. 葉状乳頭遠心分画の各種ホスファターゼ活性. *松本歯学*, 3: 122—127.
- 4) Lum, C. K. L. and Henkin, R. I. (1976) Characterization of fractions from taste bud and non-taste bud-enriched filtrates from and around bovine circumvallate papillae. *Biochim. Biophys. Acta*, 421: 362—379.
- 5) 野村浩道, 浅沼直和 (1976) カエル舌粘膜におけるカルシウムイオンの受動および能動輸送. *松本歯学*, 2: 20—27.
- 6) Schatzmann, H. J. (1975) Active calcium transport and Ca^{2+} activated ATPase in human red cells. *Current Topics in Membranes and Transport* Vol. 6, p.125—168. edited by Bronner, F. and Kleinzeller, A. Academic Press, New York.