

〔原著〕 松本歯学 12 : 158~163, 1986

key words : Ca or Mg-ATP アーゼ - 表層ホスファターゼ - 舌粘膜 - カエル

カエル舌粘膜のホスファターゼ活性 2. 生体舌粘膜の表層 ATP アーゼ活性

河野のり子, 平川良勝, 浅沼直和, 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 2. Surface ATPase activity of intact tongue

NORIKO KONO, YOSHIKATSU HIRAKAWA, NAOKAZU ASANUMA and HIROMICHI NOMURA
Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. H. Nomura)

Summary

In order to reveal the role of the ATP hydrolyzing enzyme in the mucous membrane of the frog tongue test solutions containing ATP were applied to the tongue surface of intact frogs. The ATP of the solutions was found to be hydrolyzed proportionally to the number of application, indicating that the active sites of the ATP hydrolyzing enzyme is exposed in the oral cavity. Some properties of the ATP hydrolyzing enzyme were also studied.

結 言

先に, 河野と野村¹⁾は, カ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沈分画の ATP アーゼ活性を測定し, 舌背粘膜にかなり高い ATP アーゼ活性のあることを見出した。また, この ATP アーゼ活性を組織化学的に調べた結果, 活性は茸状乳頭および糸状乳頭表層にあることが確かめられた²⁾。

口腔粘膜にホスファターゼ活性のあることは, ヒトおよび哺乳動物で報告されているが³⁻⁷⁾, これらホスファターゼの活性基が口腔側に面しているかどうかについての検討はなされていない。Dur-

ban & Kircher⁸⁾は, カエルの単離した胃の intact mucosa を用いて p-ニトロフェニルホスファターゼ活性を調べ, 胃腔側に与えた p-ニトロフェニルリン酸が分解され p-ニトロフェノールとリン酸とになるが, その大部分が胃腔側に残ることを示した。そこで, カエル舌背粘膜 ATP アーゼの活性基が口腔側に面しているならば, 舌背表面に与えた ATP は分解され, 口腔側に残るであろうと考え, ATP アーゼ基質溶液を生きているカエルの舌背にかけ, 回収される溶液中の ATP が分解されているかどうかを調べた。

材料と方法

実験に用いた材料は生きているウシガエル (*Rana catesbeiana*, 体重200~250 g) の舌であ

る。脳および脊髄を針で破壊したのち、カエルを図1に示す標本台上に背位に置き、舌を引出し、台上に拡げてピンで固定した、この舌表面にATPアーゼ基質溶液6 mlを5回反復して流すことによって反応を行った。

実験に用いたATPアーゼ基質溶液は前回¹⁾用いたものと同様で、40 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH7.0), 60 mM NaCl, 2 mM Na₂ATP, 1 mM ウワバイン, 5 mM CaCl₂である。なお、ウワバインはNa, K-ATPアーゼ活性を阻害するため加えた。反応後回収した溶液はその後の非酵素的分解を抑制するため直ちに氷冷した。次ぎの反応は舌を5分間リンガー液でよく洗浄したのち行った。実験温度および反応溶液の温度は室温(20~24℃)である。

ATPアーゼ活性の測定方法も前回¹⁾と同様である。溶液中の遊離無機リン酸(Pi)量をFiske-Subbarow⁹⁾法で定量し、回収した溶液中の無機リン酸量から非酵素的分解による無機リン酸量を差し引くことによって酵素活性を求めた。この場合の非酵素的無機リン酸量とは放置液中の無機リン酸量および粘液由来の無機リン酸量(基質を含まない溶液を舌にかけて回収した溶液中の無機リン酸量)である。

Ca-ATPアーゼ活性は、Caイオンを含む溶液における無機リン酸量からCaイオンを含まない溶液における無機リン酸量を差し引いたものとした。

無機リン酸量測定に際しては、毎回10 μg/ml 標準無機リン酸溶液を用いて較正することとし、室温にて15分間発色させた後、740 nm で比色定量した。

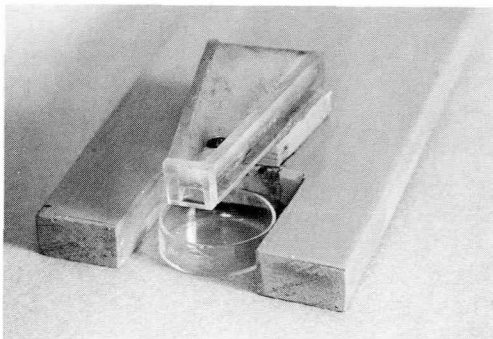


Fig. 1. Apparatus for collecting test solutions applied to the tongue.

Table 1. Relationship between the amount of reaction product and the number of application of the test solution.

	回	全 Pi 量	放置液Pi量	粘液由来Pi量	酵素活性によるPi量
A	1	2.13	1.04	1.73	-0.64
	2	2.97	1.06	1.65	0.26
	3	4.02	1.09	1.73	1.20
	4	4.83	1.14	1.69	2.00
	5	5.37	1.23	1.78	2.36
B	1	2.64	0.74	1.41	0.49
	2	3.60	0.74	1.43	1.42
	3	4.59	0.76	1.52	2.32
	4	5.35	0.88	1.40	3.08
	5	6.13	0.92	1.43	3.88
C	1	2.49	0.73	1.55	0.21
	2	3.92	0.78	1.50	1.65
	3	5.32	0.86	1.62	2.85
	4	6.71	0.87	1.54	4.29
	5	7.53	0.89	1.62	5.02
D	1	2.66	0.74	2.21	-0.29
	2	4.74	0.83	2.11	1.80
	3	6.33	0.83	2.33	3.17
	5	9.55	0.83	2.50	6.22
	7	12.09	0.87	2.44	8.78
	9	14.57	0.87	2.53	11.17
	10	15.98	0.87	2.48	12.53

(単位: μgPi/ml)

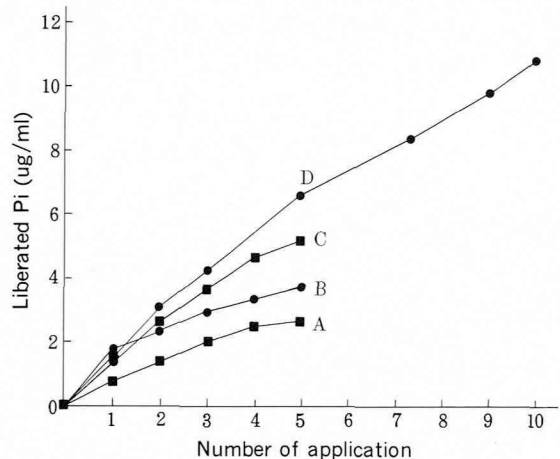


Fig. 2. Relationship between the amount of reaction product (inorganic phosphate, Pi) and the number of application of the test solution. This figure was constructed from the data shown in Table 1.

結 果

1. 表層 ATP アーゼ活性測定方法の検討

生体の粘膜を用いた酵素活性測定では、実験結果の再現性がよくない可能性があるため、まずその点を検討したところ、極めて再現性のよいことが分かった。表1および図2は、4匹のウツガエルを用いて ATP 基質溶液を与えたときの、溶液をかけた回数と反応溶液中に生成された無機リン酸量との関係を示す。この実験では、最初36 ml の基質溶液を準備し、1回かけるごとに2 ml を測定用に回収し、2回目は残りの34 ml、3回目はさらにその残りの32 ml をかけるようにしたものである。酵素活性によって生成された無機リン酸量は、回収された反応溶液中の全無機リン酸量から放置液中の無機リン酸量および粘液由来の無機リン酸量を差し引いたものである。酵素活性によって生成される無機リン酸量が、かけた回数にほぼ正比例して増加していることが分かる。この実験結果は、生体の舌を用いても定量的酵素活性測定が可能であることを示している。

2. ATP 分解速度と ATP 濃度との関係

図3は、至適基質濃度を調べるために行った実験結果を示す。図中の各点と縦棒はそれぞれ5例の平均値と標準誤差を示す。10 mM CaCl₂ 存在下では、0.2 mM から 5 mM の範囲で ATP 濃度に

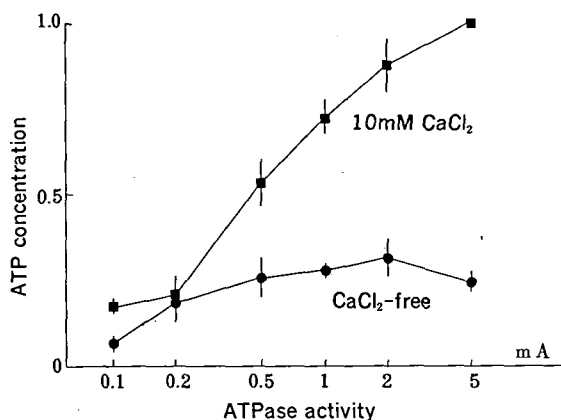


Fig. 3. Effect of substrate concentration on ATPase activity. The activity was shown by the relative amount of reaction product to that obtained in 2mM ATP solution. Each value indicates the mean and the standard error.

ほぼ直線的に生成無機リン酸量（ただし、各カエルで生成量が異なるので、ATP 2 mM で求めた値を1とし、相対的値として求めた。）が増大しているのが分かる。そこで、以下の実験では、基質（ATP）標準濃度は2 mM とした。

図3に示したごとく、カエル舌背の表層 ATP アーゼ活性は Ca イオンが存在しなくてもかなり高いが、Ca イオンの存在によって顕著に増大した。このことは、カエル舌背の表層 ATP アーゼ活性がおもに Ca イオン依存性 ATP アーゼの活性によることを示唆する。（溶液中に Ca イオンが存在しなくてもかなり高い ATP アーゼ活性がみられているが、このことは必ずしも Ca イオン依存性 ATP アーゼ以外の ATP アーゼが存在することを意味しない。なぜならば、カエル舌からは絶えず粘液が分泌され、その粘液にはかなりの Ca イオンが含まれていると考えられるからである。）なお、ATP の自然分解が Ca イオンによって促進されることはなかった。

図4は、図3の10 mM CaCl₂ 存在下の ATP アーゼ活性を示したデータを基にして描いた Lineweaver-Burk プロットである。このプロットから求めた Michaelis 定数 (K_m) は 4.0×10^{-4} M であった。

2. ATP 分解速度に及ぼす Ca および Mg イオンの影響

図5は、CaCl₂ 濃度を0.2~10 mM の範囲で変化させたときの ATP アーゼ活性の変化を調べた結果を示す。図5のグラフ内の各点は、3~5例

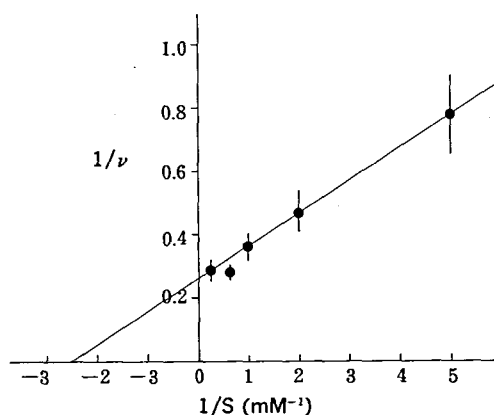


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of the curve shown in Fig. 3.

の平均値と標準誤差である。基質濃度を 2 mM としたとき、CaCl₂は 2 mM 以上必要であることが分かる。

図 6 は、このグラフから CaCl₂の見掛け上の Michaelis 定数 (K_m) を求めるために描いた Lineweaver-Burk プロットである。このプロットから求めた見掛け上の K_m は、 $5.0 \times 10^{-4} M$ である。

図 7 は、CaCl₂の代わりに MgCl₂を加えて Mg イオンの影響を調べた 3 例の結果をグラフにしたものである。見掛け上の K_m は $8.0 \times 10^{-4} M$ である (図 8)。Mg イオンがあれば、Ca イオンなしでも

活性のみられることから、カエル舌表層 ATP アーゼは Ca or Mg-ATP アーゼであることが示唆される。

3. 基質特異性

図 9 は、それぞれ 4 例について基質特異性を調べた実験結果を示す。実験に用いた基質は、ATP, UTP, GTP, ITP, CTP, ADP および AMP で、2 mM ATP における活性を 1 としてグラフを描いてある。AMP を除き、調べた基質全部がほぼ同程度に分解されていることが分かる。すなわち、カエル舌表層 ATP アーゼは基質特異性の極めて弱い ATP アーゼであることが分かる。

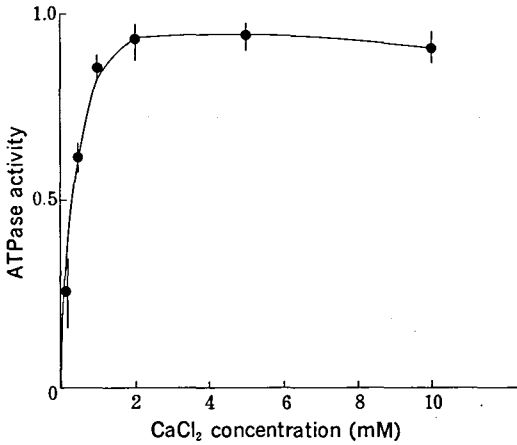


Fig. 5. Effect of CaCl₂ concentration on ATPase activity.

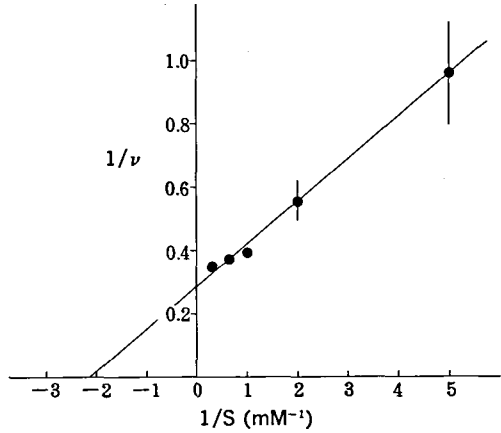


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of the curve shown in Fig. 5.

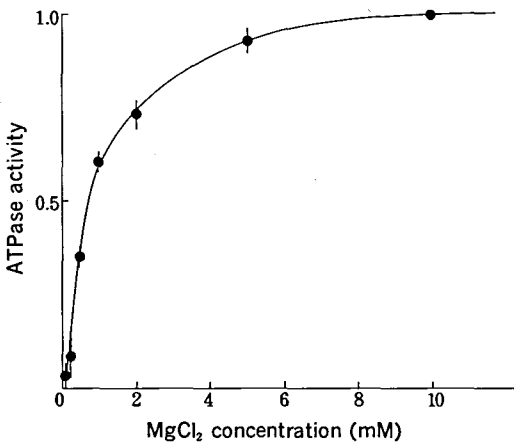


Fig. 7. Effect of MgCl₂ concentration on ATPase activity.

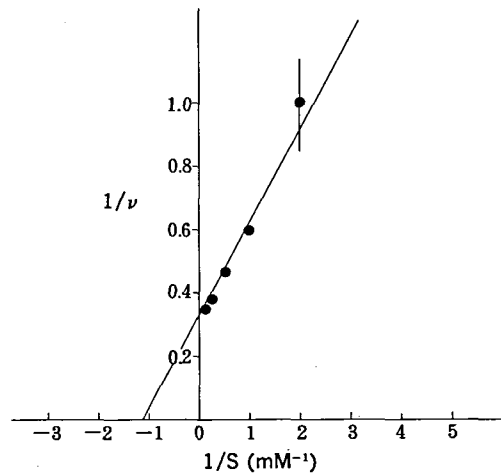


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of the curve shown in Fig. 7.

図10は、図9のグラフのLineweaver-Burkプロットである。このプロットから求めた見掛け上のKmは、ATP $2.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、CTP $5.3 \times 10^{-4} \text{M}$ 、UTP $6.1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、ITP $8.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 、GTP $15.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、ADP $11.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、GTP $15.4 \times 10^{-4} \text{M}$ であり、ATPに対する親和性ももっとも高い。

4. 至適 pH

トリス・マレイン酸およびトリス塩酸緩衝液を用いて基質溶液のpHを4.9と9.9の範囲で変化させ、舌表層ATPアーゼ活性を調べたところ、活性の見られたのはpH8.6まででpH9.0では活性が認められなかった。

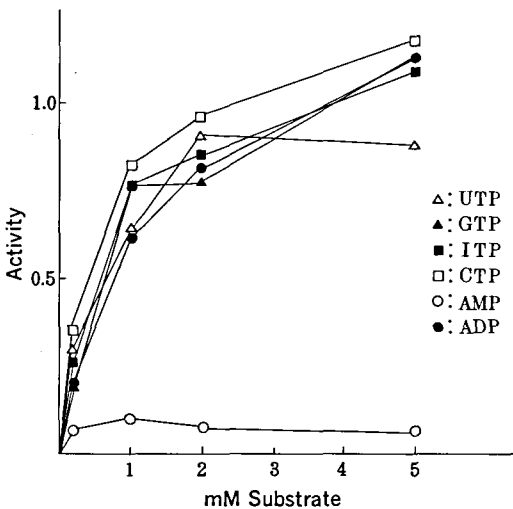


Fig. 9. Substrate specificity of the enzyme.

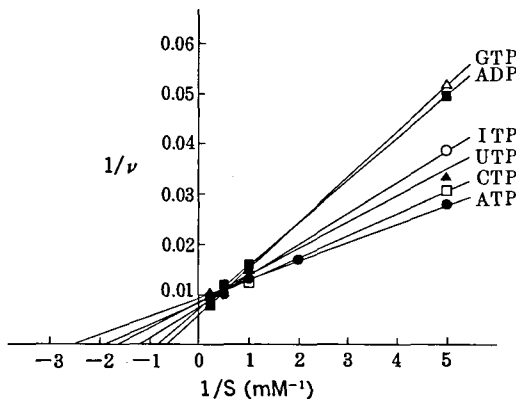


Fig. 10. Lineweaver-Burk plots of the curves shown in Fig. 9.

5. ATP アーゼ阻害剤の効果

Ca 依存性 ATP アーゼにはいくつかの種類があり、阻害剤の抑制効果もそれぞれに異なることが報告されている。そこで、赤血球膜のCaイオン能動輸送ATPアーゼの抑制剤であるルテニウム赤¹⁰⁾およびNEM¹¹⁾の抑制効果を調べたが、ルテニウム赤は1 mMにおいて、NEMは10 mMにおいてほとんど抑制効果が認められなかった。

考 察

本研究において、前報¹⁾で示したカエル舌背粘膜ホモジネートに存在するATPアーゼ活性は、舌背粘膜の糸状および茸状乳頭上皮に存在して、活性基を口腔側に向けていることが示された。古くから、舌粘膜上皮に表在性ホスファターゼの存在することは組織化学的研究から分かっているが、ATPアーゼ活性についてはヒト胎児でLatalski²⁾が報告しているだけである。例えば、Itoizら⁴⁾は、マウス、ハムスター、モルモット、ブタ、イヌ、ネコおよびヒトの舌粘膜のアルカリ性ホスファターゼ、中性ホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、ATPアーゼ、5'-ヌクレオチダーゼおよびエステラーゼ活性を組織化学的に調べているが、舌背表層における活性は、アルカリ性ホスファターゼ活性がイヌとネコで、5'-ヌクレオチダーゼ活性がマウス、イヌおよびヒトで、中性ホスファターゼ、酸性ホスファターゼおよびエステラーゼ活性がほとんどすべての動物で見られるものの、ATPアーゼ活性はどの動物においても味蕾を除いて検出できなかったと報告している。同様な報告はラットについてSjogren一派^{6,7)}が、ネコについてKagawa & Osanai^{2,3)}も行っている。そこで、本研究で見出されたATPアーゼ活性が、他のホスファターゼ、特にアルカリ性ホスファターゼ活性に基いているのではないかという可能性が考えられるが、上述のごとく、アルカリ性ホスファターゼ活性が強く検出されてもATPアーゼ活性は検出できなかったという点からこの可能性は一応否定できる。ただ、カエルのアルカリ性ホスファターゼは哺乳類のアルカリ性ホスファターゼと異なり、ATPを分解できるのではないかという可能性が残るが、われわれの行った別の研究の結果¹²⁾はこの可能性を否定している。また、上述したごとく、pH 9以上でATPアーゼ活性が

示されなかった点もこのことを支持している。

現在のところ、カエル舌粘膜の表層 ATPアーゼの役割については、文献的にも取上げるべき見解が見当たらず、まったく分からない状態にある。この点は、今後の研究の成果を待ちたい。

文 献

- 1) 河野のり子, 野村浩道 (1979) カエル舌粘膜のホスファターゼ活性 その 1. 松本歯学, 5: 21-26.
- 2) Kagawa, S. and Osanai, K. (1962) Histochemical demonstration of tongue epithelium of human fetuses. J. Osaka Univ. Dent. School, 2: 59-65.
- 3) 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.
- 4) Itoiz, M. E., Carranza, F. A. and Cabrini, R. L. (1966) Histochemical study of the tongue mucosae in different species. Acta histochem. 25: 183-192.
- 5) Latalski, M. (1969) Histochemical studies on the lingual epithelium in the human embryo. Hydrolases. Folia Morph. 28: 313-322.
- 6) Sjogren, S., Hammaestrom, L. and Larsson, A. (1981) Enzyme histochemistry of developing rat oral mucosa. J. Histochem. Cytochem. 29: 57-64.
- 7) Sjogren, S. (1984) Acid, neutral, and alkaline phosphatases in developing rat oral mucosa. J. Histochem. Cytochem. 32: 510-516.
- 8) Durbin, R. and Kircher, A. G. (1973) A surface p-nitrophenyl phosphatase of frog gastric mucosa. Biochim. Biophys. Acta, 321: 553-560.
- 9) Fiske, J. H. and Subbarow, Y. (1925) The calorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66: 375.
- 10) Watson, E., Vincenzi, F. F. and Davis, P. W. (1971) Ca²⁺-activated membrane ATPase: Selective inhibition by ruthenium red. Biochim. Biophys. Acta, 249: 606-610.
- 11) Blostein, R. and Burt, V. K. (1971) Interaction of N-ethylmaleimide and Ca²⁺ with human erythrocyte membrane ATPase. Biochim. Biophys. Acta, 241: 68-74.
- 12) 河野のり子, 平川良勝, 浅沼直和, 野村浩道 (1986) カエル舌粘膜のホスファターゼ活性 3. 生体舌粘膜の表層アルカリ性ホスファターゼ活性 (執筆中)