

〔原著〕 松本歯学 3 : 122~127, 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

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)

Biochemical Studies on Phosphatase Activities in the Foliate Papilla of Rabbit

I. Fractionation of Foliate Papilla by Centrifugation.

NORIKO KONO and HIROMICHI NOMURA

Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. H. Nomura)

Summary

Histochemical studies have revealed that taste organs in mammals have high activities of several phosphatases, but the nature and roles of these phosphatases have not yet been elucidated. The present study was undertaken to find a suitable material for biochemical study on phosphatases in mammalian taste organ.

Each experiment was carried out with six foliate papillae of rabbit dissected thoroughly under a stereoscopic microscope. The foliate papillae were homogenized and centrifuged to obtain P₁ (900 ×g, 10 min), P₂ (5,000 ×g, 10 min), P₃ (8,000 ×g, 20 min), P₄ (105,000 ×g, 60 min) and S₄.

The highest specific activities of Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase were obtained in P₄ fractions. The specific activity of Mg²⁺-ATPase in the P₄ fraction of the foliate papillae of rabbit was several hundred times higher than that obtained in bovine circumvallate papillae by Lum & Henkin⁹⁾. This indicates that the material used in the present study is suitable for the enzymatic study of ATPase in mammalian taste organ.

味蕾およびその周辺の組織には酵素、とくにホスファターゼが豊富に存在することが知られている。これらの酵素はおもに組織化学者によって見いだされたものであるが、彼らの多くは、これら酵素が味覚受容と密接な関連をもっていると考えている。例えば、Baradi & Bourne^{1) 2)}は、ウサギ葉状乳頭の味蕾およびその周辺の組織にエステラーゼ、リパーゼおよびいくつかの種類のホスファターゼの存在を示すとともに、これら酵素の1つまたはいくつかは味物質によってその活性に変化の生じることを見だし、味覚受容の第一段階は味物質がこれら酵素の特定部位に結合してその酵素の活性を変化させる反応であると考えた。この考えは、今日“味覚受容の酵素説”と呼ばれている。しかしながら、味覚応答の潜時が数10msecに過ぎないとか、KCNがNaClやKClとはほぼ同様に作用するなどいくつかの実験結果³⁾から、味物質は味細胞内の酵素と反応するとは考えられないこと、また彼らの強調するアルカリ性ホスファターゼは、ヒトやウサギでは乳頭上皮表層にのみ存在して味蕾にはみられないこと^{2) 4)}などから、この説は今日そのままの形では認めがたいものとなっている。

味蕾を含む葉状乳頭や有郭乳頭のホスファターゼに関する生化学的研究は多くなく、ウシ有郭乳頭のアデニルシクラーゼ⁵⁾、ホスフォジェステラーゼ^{6) 7)}、(Na⁺, K⁺, Mg²⁺)—ATPアーゼ⁸⁾と5′-ヌクレオチダーゼ⁸⁾に関する短報のほかには、Lum & Henkin⁹⁾のやや詳しい報告がなされているに過ぎない。また、これらホスファターゼの役割についてもほとんど言及されていない。そこで著者らは、これらホスファターゼの分離精製方法を検討しながら、同時にこれらホスファターゼの性質を調べ、その役割を推察しようと考えた。

本研究で特に考慮されたのは、使用する材料である。前述したすべての研究は大量の試料を得るためウシ有郭乳頭を使用しているが、本研究ではウサギ葉状乳頭を実体顕微鏡下で解剖して葉状乳頭のみにしたものを試料とした。この試料を用いることにより、筋や腺に存在する酵素を完全に除外できるのみでなく、葉状乳頭の酵素の比活性を高めることができると考えたからである。

材料と方法

I. 材料

本研究で使用した材料は、ウサギ葉状乳頭である。アモバルビタールナトリウムを体重1kg当り100~150mg静注して殺したのち、速やかに葉状乳頭を含む舌粘膜を切り出し、冷却したリンガー液の入ったビーカーに入れる。ついで、5℃の低温室において、実体顕微鏡下で葉状乳頭以外の部分をできるだけ完全に除去し、葉状乳頭のみとした。本研究で使用した13羽のウサギの平均体重は3.86kg(2.35~5.5kg)、使用した葉状乳頭片は左右2枚で平均湿重量35mgであった。通常3羽のウサギから摘出した6枚の葉状乳頭片を1回の実験に使用した。

II. 方法

A. 遠心分画

6枚の葉状乳頭片を約9倍量の10mMトリス塩酸緩衝液でpH7.4にした0.25M蔗糖溶液に加えホモジナイズしたのち、図1に従って遠心分画

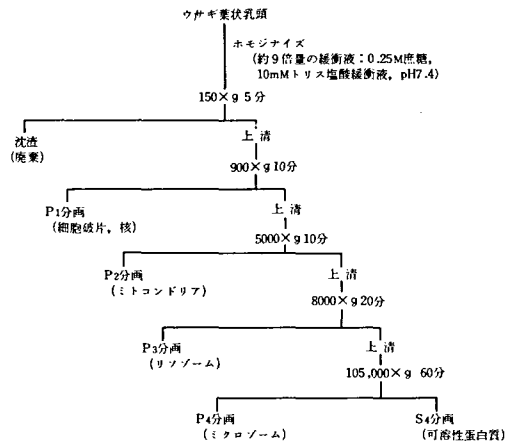


図1: 分画法の概要

し、P₁, P₂, P₃, P₄ およびS₄ を得た。これらはそれぞれ、核分画、ミトコンドリア分画、リソゾーム分画、ミクロソーム分画および可溶性蛋白分画に相当するものと考えられる¹⁰⁾。

B. 酵素活性測定

P₁, P₂, ……S₄ の各分画は、10mMトリス塩酸緩衝液でpH7.4にした0.25M蔗糖溶液に再懸濁し、全量を1mlにしたのち、適当量を用いてホスファターゼ活性測定および蛋白質定量を行った。

通常ホスファターゼ活性測定には 0.1 ml, 蛋白質定量には 0.3 ml を使用した。

ホスファターゼ活性は, 試料溶液にインキュベーション溶液を加えて全量を 1 ml とし, 37°C で通常 30 分インキュベートし, その直後同量のトリクロール酢酸または 0.02N NaOH(アルカリ性ホスファターゼの場合) を加えて酵素反応を停止させ, 除蛋白後生成無機磷量を Fiske-Sabbarow¹¹⁾法にて測定した。

各ホスファターゼ活性測定に使用したインキュベーション溶液の組成は以下の通りである。

(a) Mg^{2+} -ATP アーゼ

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM $MgCl_2$, 0.04 mM $CaCl_2$, 5 mM ATP および 1 mM ウアバインからなる溶液を使用した。なお比較のため, ウアバインを含まない溶液も使用した。

(b) Ca^{2+} -ATP アーゼ

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM $CaCl_2$, 0.5 mM EDTA, 5 mM ATP および 1 mM ウアバインからなる溶液を使用した。なおこの場合もウアバインを含まない溶液も使用した。

(c) Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATP アーゼ

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP および 1 mM ウアバインからなる溶液を使用した。なおこの場合もウアバインを含まない溶液も使用した。

(d) 5'-ヌクレオチダーゼ

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 酒石酸ナトリウムカリウムおよび 5 mM AMP からなる溶液を使用した。

(e) アルカリ性ホスファターゼ

50 mM グリシン緩衝液 (pH 9.5) および 1 mM パラニトロフェノール磷酸 (pNp-p) からなる溶液を使用した。なおこの場合, 試料溶液は 0.2 ml 使用し, インキュベート時間も 2 時間とした。また酵素反応停止には 0.02N NaOH を使用し, 酵素活性測定は生成ニトロフェノール量を 405 nm で比色定量して行った。

(f) 酸性ホスファターゼ

50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.8) および 5 mM パラニトロフェノール磷酸 (pNp-p) からなる溶液を使用した。インキュベート時間その他はアルカリ性ホスファターゼの場合と同様であった。

C. 蛋白質定量

蛋白質の定量は Lowry, et al.¹²⁾法によって行った。牛血清アルブミン結晶 (Sigma 社製) を規準とし, 660nm で比色定量した。

結 果

A. 蛋白質量

葉状乳頭および対照として使用した葉状乳頭周辺部舌粘膜 (以後対照と呼ぶ) のホモジネートの総蛋白質量は 1~2 mg であったが, この蛋白質を

表 1. 各遠心分画における蛋白質配分率

		葉 状 乳 頭				対 照			
		1	2	3	平 均	1	2	3	平 均
総蛋白質量	ホモジネート	2.10	1.44	1.06	1.53	2.31	2.19	2.12	2.21
	各分画蛋白質量の総和	1.97	1.87	0.95	1.60	2.01	2.40	1.64	2.02
	回収率 (%)	93.8	129.7	89.6	104.6	87.0	109.5	77.3	91.4
蛋白質配分率 (%)	P ₁	12.7	14.4	26.9	18.0	15.4	21.7	32.5	23.2
	P ₂	5.6	5.3	6.4	5.8	5.0	5.4	13.1	7.8
	P ₃	5.6	4.8	5.8	5.4	7.0	4.2	6.0	5.7
	P ₄	5.6	6.4	12.0	8.0	6.0	5.1	7.1	6.0
	S ₄	70.5	69.1	48.9	62.8	66.6	63.7	41.3	57.2

図1の方法に従って P_1, P_2, \dots, S_4 に分画したところ77%以上回収することができた。

表1は、葉状乳頭および対照それぞれ3回の実験における蛋白質の各分画への配分の割合を示す。葉状乳頭および対照のいずれの場合も、蛋白質の半分以上は可溶性分画 S_4 にあり、 P_2, P_3 および P_4 の細胞顆粒分画における蛋白質量は少ない。この点は、Lum & Henkin⁹⁾ がウシの有乳頭で行った実験で、有乳頭ホモジネートの細胞顆粒分画に約50%の蛋白質のあることを示した結果と若干異なる結果である。ただし、対照についての実験結果はほぼ一致する。

B. ATPアーゼの比活性

表2. ATPアーゼ比活性

		Mg^{2+} -ATPase	Ca^{2+} -ATPase	Mg^{2+}, Ca^{2+} -ATPase	Mg^{2+}, Ca^{2+} -free ATPase
葉状乳頭	homo	88.2	169.2	60.7	1.6
	P_1	27.6	50.8	19.7	0.8
	P_2	56.0	100.0	35.2	3.3
	P_3	116.8	210.5	71.8	1.9
	P_4	346.3	474.2	273.7	2.7
	S_4	23.4	23.7	12.5	2.6
	P_3 /homo	1.3	1.2	1.2	1.7
対照	P_4 /homo	3.9	2.8	4.5	1.6
	S_4 /homo	0.3	0.1	0.2	1.6
対照	homo	17.2	12.7	16.8	0.7
	P_1	12.5	7.4	20.0	0.2
	P_2	12.0	6.2	16.3	1.0
	P_3	17.8	15.6	25.0	1.6
	P_4	49.8	59.1	45.8	0.2
	S_4	1.8	4.2	2.3	0.5
	P_3 /homo	1.0	1.2	1.5	0.3
対照	P_4 /homo	2.9	4.7	2.7	0.3
	S_4 /homo	0.1	0.3	0.1	0.7

(μ M/mg蛋白質/30分)

表2は、葉状乳頭および対照のホモジネート(homo)と P_1, \dots, S_4 各分画のATPアーゼの比活性を調べた結果である。ホモジネートの比活性に対し Mg^{2+} -ATPアーゼ、 Ca^{2+} -ATPアーゼおよび Mg^{2+}, Ca^{2+} -ATPアーゼの比活性のいずれもが P_3 および P_4 分画で上がっている。しかし、 P_3 における比活性増加は僅かであり、

ATPアーゼは P_4 分画つまりミクロゾームに存在することが示唆される。

表1最右欄は、5mM ATPを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に0.5mM EGT A および0.5mM EDTAを加え、Ca塩も加えなかったときのATPアーゼ活性を調べた結果であるが、葉状乳頭、対照いずれの場合もほとんど活性がみられていない。このことは、本研究で調べたATPアーゼが、2価イオン依存性ATPアーゼであることを示す。

P_4 分画におけるATPアーゼ比活性は、 Ca^{2+} -ATPアーゼ、 Mg^{2+} -ATPアーゼおよび Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPアーゼの3者で顕著な違いはみられないが、この順序で多少比活性が落ちていることがわかる。このことは、ウサギ葉状乳頭に3種類のATPアーゼがあるのではなく、ATPアーゼは1種類であるが、このATPアーゼのMgおよびCaイオンによる活性化の程度に若干差異があるためと考えられる。また、 Mg^{2+}, Ca^{2+} -ATPアーゼの比活性が最も小さいことは、おそらく $MgCl_2$ と $CaCl_2$ を5mMずつ入れたことによって2価イオンによる抑制効果が現われてきたためであろう。

本実験では、葉状乳頭のATPアーゼ比活性は対照のATPアーゼ比活性より高く、ホモジネートで比べて、 Mg^{2+} -ATPアーゼで5.1倍、 Ca^{2+} -ATPアーゼで13.3倍、 Mg^{2+}, Ca^{2+} -ATPアーゼで3.6倍であった。対照のATPアーゼ比活性がかなり高いのは、筋肉が対照中に多量に入ったことによると考えられる。

C. その他のホスファターゼ活性

表3は、アルカリ性ホスファターゼ、酸性ホスファターゼおよび5'-スクレオチダーゼの比活性の結果を示す。いずれもATPアーゼの場合に比べて、遠心分画しても P_4 分画の比活性があまり上がっていない。これに対し、 S_4 分画の比活性は、ATPアーゼの場合0.3以下に落ちているのに、これらホスファターゼの場合は0.3~0.9である。このことは、これらホスファターゼ、特にアルカリ性ホスファターゼがかなり可溶性蛋白質としてミクロゾームから離れやすい性質をもっていることによると考えられる。

表3. その他のホスファターゼの比活性

		アルカリ性 ホスファ ターゼ	酸性ホス ファター ゼ	5'-ヌ クレオチ ダーゼ
葉 状 乳 頭	homo	1.5	2.8	2.5
	P ₁	2.7	1.3	1.0
	P ₂	1.2	1.0	1.9
	P ₃	1.6	1.1	2.4
	P ₄	2.2	3.9	4.2
	S ₄	1.3	0.9	1.1
	P ₄ /homo S ₄ /homo	1.5 0.9	1.4 0.3	1.7 0.4
対 照	homo	0.3	1.7	1.4
	P ₁	0.2	0.8	0.8
	P ₂	0.2	0.6	1.3
	P ₃	0.3	0.7	1.6
	P ₄	0.5	3.4	2.9
	S ₄	0.2	0.7	0.9
	P ₄ /homo S ₄ /homo	1.7 0.7	0.6 0.4	2.1 0.6

(μM/mg 蛋白質)

考 察

本研究で用いたウサギ葉状乳頭を実体顕微鏡下で解剖して葉状乳頭のみにしてホモジナイズする方法は、ATP アーゼの比活性を著しく上げ、Lum & Henkin⁹⁾ がウシ有郭乳頭で1時間インキュベートした値と、われわれが30分間インキュベートした値と比較して、ホモジネートで10倍、ミクロゾーム分画で100倍以上、彼らが蔗糖密度勾配法で精製した試料の比活性とわれわれが遠心分画しただけの試料と比べても、われわれの試料の方が約10倍高い比活性を有している。このことはわれわれの葉状乳頭のみにしてからホモジナイズする方法が従来の方法に比べ、極めて純度の高いATP アーゼ標本を得ることのできる方法であることを示す。

Iwayama & Nada⁴⁾、および Nomura¹³⁾の光顕による組織化学的研究によると、ATP アーゼ活性は味蕾先端で強くみられるが、そのほかにも静脈洞や結合組織芯でみられるので、ウサギ葉状乳頭のATP アーゼは1種類でなくて数種類である可能性が強い。しかし本研究の結果は、ATP アーゼが1種類であると考えた方がよい結果となっ

た。また、Na, K-ATP アーゼは組織化学的には検出されないのでその存在部位は確かめられていないが、Lo⁸⁾ および Lum & Henkin⁹⁾ によると、かなり高い活性のあることが示されている。本研究ではウアバインの効果がみられなかったので、ウサギ葉状乳頭中には、Na, K-ATP アーゼは存在しないように思われた。しかし、これらの点は本研究の結果のみで結論を出すことはできないように思われる。

Lum & Henkin⁹⁾ は、蔗糖密度勾配法を用いることにより ATP アーゼの比活性を40倍以上に上げている。もし、ウサギ葉状乳頭のホスファターゼの中に、他の組織ではみられないホスファターゼが見いだされ、そのホスファターゼを精製しようとするときには蔗糖密度勾配法は有効な手段となると考えられる。しかしわれわれの目的は各ホスファターゼの性質を明らかにすることが主目的であり、精製は各酵素の分離と実験に必要なだけに比活性を上げるために行うに過ぎないので、蔗糖密度勾配法は不可欠な方法ではないように思われる。

文 献

- 1) Baradi, A. F. and Bourne, G. H. (1951) Localization of gustatory and olfactory enzymes in the rabbit, and the problems of taste and smell. *Nature*, 168: 977-979.
- 2) Baradi, A. F. and Bourne, G. H. (1953) Gustatory and olfactory epithelia. *Int. Rev. Cytol.* 2: 289-330.
- 3) Beidler, L. M. (1961) Taste receptor stimulation. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* 12: 107-151.
- 4) Iwayama, T. and Nada, O. (1967) Histochemical observation on the phosphatases of the tongue, with special reference to taste buds. *Arch. histol. jap.* 28: 151-163.
- 5) Kurihara, K. and Koyama, N. (1972) High activity of adenylyl cyclase in olfactory and gustatory organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 30-33.
- 6) Kurihara, K. (1972) Inhibition of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase in bovine taste papillae by bitter taste stimuli. *FEBS Letters*, 27: 279-281.
- 7) Price, S. (1973) Phosphodiesterase in tongue epithelium: Activation by bitter taste stimuli. *Nature*, 241: 54-55.

- 8) Lo, C. (1973) The plasma membranes of bovine circumvallate papillae isolation and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 291 : 650—661.
- 9) Lum, C. L. K. 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.
- 10) 今井嘉郎, 佐藤 了 (1967) ミクロソームの調製法, 生体膜実験法 (大西勳編集) 151—158頁, 南江堂, 東京・京都.
- 11) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 : 375—400.
- 12) Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.
- 13) 野村浩道 (1976) ウサギ葉状乳頭ホスファターゼの組織化学. 松本歯学 2 : 163—164.