

Incubation 下の酸性ホスファターゼの挙動

小笠原 八十吉

(昭和59年9月30日受理)

Behavior of Acid Phosphatase under the Incubation

Yasokichi OGASAWARA

(Received September 30, 1984)

緒 言

酸性ホスファターゼの大部分はライソソーム顆粒に由来している^{1),2)}。Sloat らは、それら酸性ホスファターゼのうちで、穏和な磨砕処理でライソソーム顆粒膜外に容易に遊離するそれを遊離型と、いっぽう、激しい処理をしなければ膜外に遊離しにくいそれを結合型と命名した³⁾。著者もすでに、これら両型の酸性ホスファターゼを、ポリアクリルアミドゲルのデスク電気泳動にかければ、その遊離型は Rm0.22 付近に1つの高い活性ピークを、いっぽう、その結合型は Rm0.12 付近に、それより低い活性ピークを分離することを明らかにした¹⁾。

本報においては、豚肝のライソソーム分画そのものを、またはそれを Incubation させたものを、DEAE-セファデックスA-50またはデスク電気泳動を用いて分離し、それら両型の酸性ホスファターゼ活性における挙動を比較検討した。以下それらの結果について報告する。

実験方法

1 ライソソーム分画の調製法

既報¹⁾の表1に示す操作に準拠して、去勢した豚の肝臓からライソソーム顆粒に富む沈殿物IIを調製した。得られた沈殿物IIを、0.2Mショ糖を含む pH7.4, 0.01 Mトリス・塩酸緩衝液に溶解したものを、ライソソーム分画として使用した。

2 酵素活性の測定法

酸性ホスファターゼ活性は Shibko らの方法⁴⁾により、また、トリプシンやカテプシン活性はテクニコン自動分析法^{5),6)}に準拠して測定した。

3 蛋白量の測定法

蛋白量は既報の Cu-Folin 法⁷⁾に準拠して測定した。

4 DEAE-セファデックスA-50による分画

DEAE-セファデックスA-50による蛋白質や酸性ホスファターゼの分画は、Barrett 法⁸⁾に準拠して行なった (Column size : 2.5×20cm, 1 tube : 10ml)。

5 デスク電気泳動法

ポリアクリルアミドゲルのデスク電気泳動および蛋白質ピークの検出は Ornstein 法⁹⁾に、また、酸性ホスファターゼ活性ピークの検出は Burstone 法¹⁰⁾に準拠して行なった。

結果および考察

1 両型酵素の分離

調製直後の新鮮なライソソーム分画を、磨砕器 (Glass pestle) で10回磨砕処理後¹⁾、遊離した酸性ホスファターゼを15,000×gで遠心分離した。得られた上澄液の酸性ホスファターゼをDEAE-セファデックスA-50で分別し、図1のIを得た。これによれば、Tube No.53付近に酸性ホスファターゼの唯一つの低い活性ピーク (分画C) を分離した。分離した分画Cをデスク電気泳動にかければ、Rm0.22 付近に酸性ホスファターゼの唯一つの低い活性ピークを分離した (図1のII)。著者はすでに、Rm0.22 付近に位する酸性ホスファターゼは、ライソソームから遊離し易い遊離型であることを明らかにしている¹⁾。したがって、このDEAE-セファデックスA-50で分別した分画Cの酸性ホスファターゼは遊離型であるものと考えられた。

調製直後の新鮮なライソソーム分画を、5℃で2週間

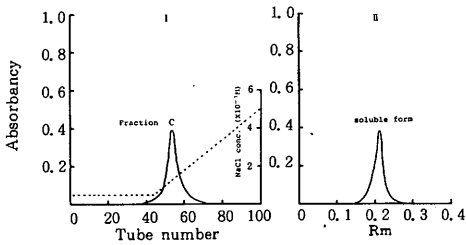


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 Chromatogram (I) and Disc Electrophoretogram (II) of acid phosphatase released from lysosomes by homogenizing.

冷冷蔵したものを、10回の凍結融解処理¹⁾と10回の磨砕処理後、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼを、DEAE—セファデックスA—50で分別しても、図1と同様に Tube No.53付近に唯一つの高い活性ピーク(分画C)を分離した(図2のI)。ここに分離した分画Cも、デスク電気泳動的に

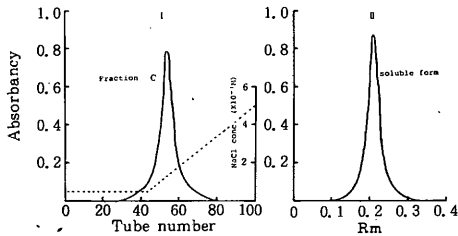


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 Chromatogram (I) and Disc Electrophoretogram (II) of acid phosphatase released from lysosomes by freeze-thawing and homogenizing after storage at 5°C for 2 weeks.

は、Rm0.22 付近に唯一つの活性ピークをあらわしたので、これも遊離型と考えられたが、この場合の遊離量は著しく増大していた(図2のII)。

以上の実験で、上澄液中に遊離した酸性ホスファターゼを除去した残りの沈殿部に、0.2Mショ糖と1%トライトンX-100を含むpH7.4、0.01Mトリス・塩酸緩衝液を加え、10回磨砕処理後、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼを、DEAE—セファデックスA—50で分別すれば、Tube No.53付近にはごく低い活性ピーク(分画C)を分離したが、いっぽう、Tube No.6付近にも新たに著しく高い活性ピーク(分画A)を分離した(図3のI)。分離したこれらをデスク電気泳動的に検討したところ、分画CのそれはRm0.22 付近に位していたので、残存した少量の遊離型であることを確認できたが、分画Aのそれは Rm0.12 付近にあらわれた(図3のII)。著者はすでに、Rm0.12

付近に位する酸性ホスファターゼは、ライソソーム顆粒から遊離しにくい結合型であることを明らかにしているので¹⁾、この分画Aのそれは結合型であるものと考えられた。

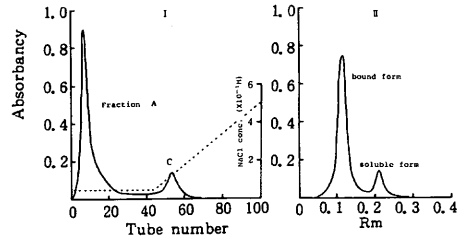


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-50 Chromatogram (I) and Disc Electrophoretogram (II) of acid phosphatase released from lysosomes by homogenizing with triton X-100.

同一条件下で調製した大量のライソソーム顆粒を、長日時にわたって使用したい場合、しばしばその顆粒の凍結乾燥品が用いられている。このように凍結乾燥したライソソーム分画に、0.2Mショ糖を含む pH7.4、0.01Mトリス・塩酸緩衝液を加え、10回磨砕処理後、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼを、DEAE—セファデックスA—50で分別すれば、高い活性ピークを Tube No.53(分画C)と低いそれを Tube No.6(分画A)付近に分離すると共に、さらに低い活性ピークを Tube No.16(分画B)と Tube No.73(分画D)にも分離した(図4のI)。分画したそれらをデスク電気泳動的に検討したところ、分画AとCは、それぞれ Rm0.12または0.22付近に位していたので、結合型または遊離型であることを確認できた。いっぽう、分画Bは Rm0.06 付近に、また、分画DはRm 0.44 付近に活性ピークを分離した(図4のII)。ここに分離した分画BとDは、凍結乾燥操作を加えることによって生成した酸性ホスファターゼと考えられたので、さらに次のような検討を行なった。

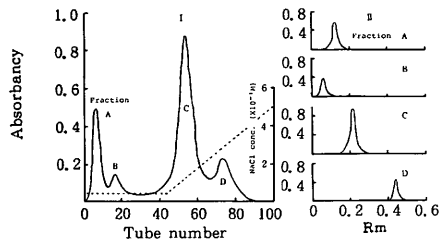


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-50 Chromatogram (I) and Disc Electrophoretograms (II) of acid phosphatase released from freeze-dried lysosomes by homogenizing.

2 Incubation下の顆粒内酵素の挙動

まず、凍結乾燥したライソソーム分画に、1%トリプシンを含むまたは含まない pH6.0, 0.1M酢酸緩衝液を加え、10回磨砕処理した全溶液を37°Cで60時間にいたるまで Incubation させた後、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼを、DEAE-セファデックスA-50またはデスク電気泳動で分離し、図5のI, IIおよびIIIを得た。

図5のIはトリプシンを加えないで Incubation させたものを、セファデックスで分別した場合の結果である。Tube No 6, 16, 53または73付近に活性ピークを分離し、これらはそれぞれ図4に示す分画A, B, CまたはDに相当するものと考えられた。Incubation 下の遊離水解酵素類による自己消化の進むにつれて、分画AとCは減少傾向をとり、特に分画Aは60時間に及べば消失した。いっぽう、分画BとDは、Incubation 下の自己消化の進むにつれて増大していったが、分画Bは60時間後にいたれば急速に消失していった。

図5のIIは、トリプシンを加えないで Incubation

または0.22付近に分離した結合型または遊離型の活性ピークは減少傾向をとり、特に Rm0.12 に位する結合型は60時間に及べば消失した。いっぽう、Rm0.06, 0.27, 0.44および0.60付近に新しくあらわれていく活性ピークは次第に増大していったが、Rm0.06付近のそれは、60時間後にいたれば消失していった。

図5のIIIは、1%トリプシンを加えて Incubation させたものを、電気泳動で分離した結果である。Incubation 下の遊離水解酵素類やトリプシンによる消化の進むにつれて、Rm0.22 付近に位する遊離型の活性ピークは減少していった、同時に、それが移行したと考えられるRm0.44 付近の活性ピークを著増していった。しかし、Rm0.27 付近の活性ピークは認められなかったし、当初認められた Rm0.06 や0.12付近の低いそれらは増大しないで消失した。この場合も、図5のIIと同様に、Rm 0.60付近に低い活性ピークもあらわしていった。以上のように、トリプシンを加えれば、遊離型や結合型の酸性ホスファターゼは、緩やかな自己消化であられる Rm 0.27などのピークを経ることなく、それらは一挙に Rm 0.44または0.60へと移行していった。この場合、トリプシンを加えないで自己消化させたものに比較して、特別な活性ピークを他の位置にあらわすようなことは起らなかった。このことは、自己消化とトリプシンとの両作用は著しく異なっていないことを示すものである。

3 Incubation下の残渣内酵素の挙動

凍結乾燥したライソソームの顆粒膜は、新鮮なそれと比較して、かなり脆くなっている^{2), 5), 6)}。本実験では、凍結乾燥品から、前実験同様に調製したライソソーム分画液を、10回磨砕処理後、1,5000×gで遠心分離した沈殿部を、汙過・洗浄後、その残渣を得た。得られたライソソームの顆粒残渣は、その微細破片に結合している酸性ホスファターゼを含む分画である。この分画に、1%トリプシンを含むまたは含まない pH6.0, 0.1M酢酸緩衝液を加え、10回磨砕処理した全溶液を、37°Cで60時間にいたるまで Incubation 後、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼを、DEAE-セファデックスA-50またはデスク電気泳動で分離し、図6および図7のIとIIを得た。この場合、上澄液部に遊離しないで、微細破片に結合したままの酸性ホスファターゼは、セファデックス処理や電気泳動処理にかけても、勿論、移動できない原点部位に残留する区分である。これら残留区分の酸性ホスファターゼ量を、特

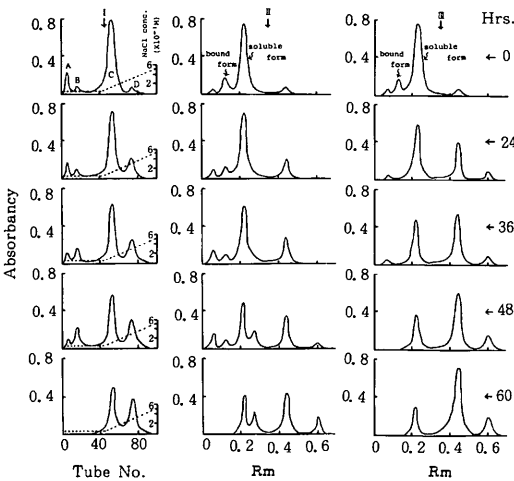


Fig. 5. DEAE-Sephadex A-50 Chromatograms (I) and Disc Electrophoretograms (II and III) of acid phosphatase released from freeze-dried lysosomes during incubation without (I and II) or with (III) trypsin at 37°C for up to 60 hours in the buffer solution, pH 6.0.

させたものを、電気泳動で分離した結果であり、図5のIとよく一致した挙動をあらわした。Incubation下の遊離水解酵素類による自己消化の進むにつれて、Rm0.12

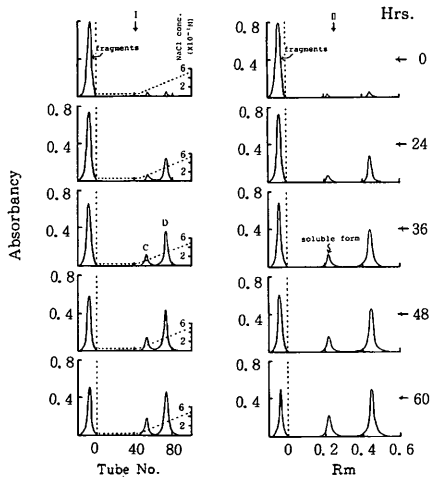


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-50 Chromatograms (I) and Disc Electrophoretograms (II) of acid phosphatase released from lysosomal fragments during incubation at 37°C for up to 60 hours in the buffer solution, pH 6.0.

にその活性ピークとして図6および図7の原点部位にあらわした。

図6のIまたはIIは、トリプシンを加えないで Incubation させたものを、セファデックスまたは電気泳動で分離した結果である。これら両図から見れば、原点部位に示した残留活性ピークは、60時間へと Incubation の進むにつれて遊離化後、移動していった。Incubation の60時間にいたるまで遊離化した結合型は認められなかったが、Tube No.53, すなわち Rm0.22 付近に位する遊離型は低い活性ピークを徐々に増大していった。いっぽう、Incubation の進むにつれて、その自己消化生成物である Tube No.73 付近に位する分画D, すなわち Rm 0.44 付近に位する活性ピークを次第に増大していった。以上の結果は、微細破片に結合している酸性ホスファターゼは、Incubation 下の自己消化の進むにつれて、次第に遊離化していき、いっぽう、遊離化したそれも、同時にさらに次第に自己消化されて、やがて Tube No.73 に位する分画D, すなわち Rm0.44 付近のピークへと移動していったことを示すものである。

図7のIとIIは、1%トリプシンを加えて Incubation させたものを、セファデックスまたはデスク電気泳動で分離した結果である。図7に示すように、原点付近にあらわした微細破片に結合したままの残留酸性ホスファターゼは、トリプシンを加えた Incubation 下の

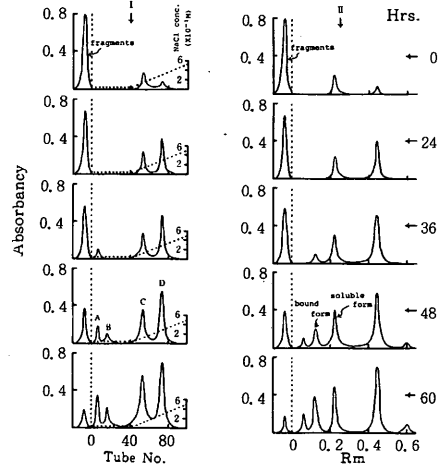


Fig. 7. DEAE-Sephadex A-50 Chromatograms (I) and Disc Electrophoretograms (II) of acid phosphatase released from lysosomal fragments during incubation with trypsin at 37°C for up to 60 hours in the buffer solution, pH 6.0.

消化の進むにつれて、その活性ピークを著減していった。同時にいっぽうでは、Tube No.6, 16, 53 および 73 付近、すなわち Rm0.06, 0.12, 0.22 および 0.44 付近に位する活性ピークを増大していった。以上の結果から、トリプシンを加えれば、それによる消化も自己消化にさらに加わって、微細破片に結合している酸性ホスファターゼの遊離型のみならず、結合型をもさらに一段と遊離化を促進していき、同時に、遊離化したそれら両型も、やがてさらに消化を促進させて、遂に Tube No.73 に位する分画D, すなわち Rm0.44 付近のピークへと移動していくことは明白である。この場合、Rm0.60 付近にも低い活性ピークをあらわしていった。

4 Incubation下の両型酵素の挙動

凍結乾燥品から、前実験同様に調製したライソソーム分画液を、5°Cで2週間冷保蔵後、10回磨砕処理し、さらに15,000×gで遠心分離して上澄液区分と沈殿区分を分取した。得られた上澄液区分をDEAE-セファデックスA-50にかけ、図2のIとIIに示すような、Tube No.53すなわち Rm0.22 付近に位する遊離型のみを含む分画Cを分取した。いっぽう、沈殿区分には1%になるようにトライトンを加え、10回磨砕処理後、同様なセファデックスにかけ、図3のIに示すような分画Aを分取した。これは、Tube No.6すなわち Rm0.12 付近に位する結合型のみを含む区分であった。分取したこれら分画

Cまたは分画Aに、1%トリプシンを含むまたは含まない pH6.0, 0.1M酢酸緩衝液を加え、37°Cで60時間にいたるまで Incubation させたものを、15,000×gで遠心分離した。その上澄液に遊離した酸性ホスファターゼをデスク電気泳動で分離し、図8または図9のIとIIを得た。

図8のIは、トリプシンを加えないで、分画Cの遊離

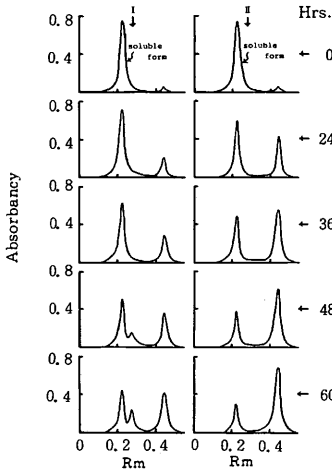


Fig. 8. Disc Electrophoretic patterns for the soluble form of acid phosphatase during incubation without (I) or with (II) trypsin at 37°C for up to 60 hours in the buffer solution, pH 6.0.

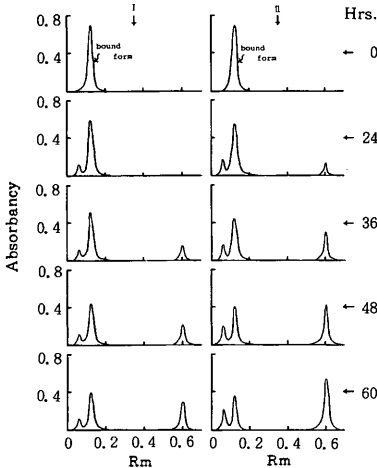


Fig. 9. Disc Electrophoretic patterns for the bound form of acid phosphatase during incubation without (I) or with (II) trypsin at 37°C for up to 60 hours in the buffer solution, pH 6.0.

型を Incubation させたものを、電気泳動で分離した結果である。Incubation 下の自己消化の進むにつれて、Rm0.22 付近に位する遊離型の活性ピークは次第に減少していき、同時に、Rm0.44 付近へと活性ピークを増大させていった。この場合、Incubation が進めば、Rm 0.27付近にも活性ピークをあらわしたが、これは低いピークにとどまった。図4のIIから、このときの Rm0.44 に位するピークは、Tube No73に位する分画Dに相当している。図8のIIは、1%トリプシンの混在下で Incubation させたものを、電気泳動で分離した結果である。この場合には、トリプシンによる Incubation 下の消化がさらに加わって、Rm0.22 付近に位する遊離型の活性ピークは、一層減少傾向を促進していき、同時に、Rm0.44 付近への活性ピークを著増していったが、Rm0.27 付近へのそれはあらわれなかった。以上の結果は、凍結乾燥品を用いた場合の図5のIIとIIIにあらわれた遊離型の活性ピークの挙動とよく一致した傾向を示すものであった。

図9のIは、トリプシンを加えないで分画Aの結合型を Incubation させたものを、電気泳動で分離した結果である。Incubation 下の自己消化の進むにつれて、Rm0.12 付近に位する結合型の活性ピークは低下していき、いっぽう、Rm0.06 および0.60付近のそれらを次第に増大していった。この場合、図9のIIに示すように、トリプシンを加えてから Incubation させたものでは、Rm0.06 および0.60付近に位する活性ピークを一層増大していった。このように、ライソソーム顆粒から遊離させた結合型の分画Aそのものにトリプシン処理を加えれば、消化を一層促進させて Rm0.60 付近の活性ピークを一層明瞭に確認できるようになった。著者はすでに、ライソソーム分画内に遊離しているカテプシン活性の挙動を明らかにしている¹¹⁾。このような挙動から見ても、本実験における Incubation 下の消化による酸性ホスファターゼの各活性ピークの挙動を推測できる。

以上の諸結果から見れば、遊離型の酸性ホスファターゼを自己消化すれば、Rm0.27 を経て0.44付近に、いっぽう、結合型のそれを自己消化すれば、Rm0.06 および0.60付近にその活性ピークを移動していくようになった。この場合、トリプシンを加えれば、そのような傾向は一層顕著にあらわれるようになった。電気泳動的に分離したこれら4種類の酸性ホスファターゼの特性の相違については、十分に検討の上、改めて報告する。

要 約

1 豚肝のライソソーム分画から、酸性ホスファターゼの遊離型と結合型を分離し、さらにそれら両型を Incubation させた場合の挙動を比較検討した。

2 ライソソームの酸性ホスファターゼを DEAE-セファデックス A-50 で分別すれば、その結合型または遊離型は Tube No.6 または 53 付近に分離した。さらにそれらを Incubation させれば、Tube No.16 または 73 付近へと移動していった。

3 デスク電気泳動的には、結合型または遊離型は Rm0.12 または 0.22 付近に分離した。さらにそれらを Incubation させれば、その結合型は Rm0.06 と 0.60 付近へと、また、その遊離型は Rm0.27 を経て 0.44 付近へと、その活性ピークを移動していった。この場合、トリプシンを加えて Incubation させれば、それらの傾向を一層促進させた。

文 献

- 1) 小笠原八十吉：東京家政大学研究紀要, 24(2), 1 (1984)
- 2) A. V. S. DE Reuck and M. P. Cameron : *Lysosome*, 78, 176 (1963)
- 3) B. F. Sloat and T. M. Allen : *Anal. New York Acad. Science*, 166, 574 (1969)
- 4) S. Shibko and A. L. Tappel : *Biochim. Biophys. Acta*, 73, 76 (1963)
- 5) 小笠原八十吉：農化誌, 40, 347 (1966)
- 6) 小笠原八十吉：農化誌, 40, 371 (1966)
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 8) A. J. Barrett : *Biochem. J.*, 104, 601 (1967)
- 9) L. Ornstein and B. J. Davis : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404 (1964)
- 10) K. Rudolph and M. A. Stahmann : *Plant Physiol.*, 41, 390 (1966)
- 11) 小笠原八十吉：食工誌, 18, 191 (1971)

Summary

Two forms of acid phosphatase, bound form and soluble form, were isolated from hog liver lysosome fraction and their behaviors under incubation were studied.

Lysosomal acid phosphatase was chromatographed with DEAE-Sephadex A-50. Bound form and soluble form showed peaks at around tube No.6 and 53 respectively. These peaks shifted to near tube No.16 and near 73 respectively under incubation.

Disc electrophoretically, bound form was isolated at around Rm 0.12 while soluble form was at around Rm 0.22. When incubated, the activity peaks of bound form shifted to near Rm 0.06 and 0.6. On the other hand, those of soluble form moved to the range of Rm 0.27 to 0.44. Incubation with trypsin markedly accelerated these tendencies.