

ライソソーム顆粒の酸性ホスファターゼの挙動

小笠原八十吉

(昭和58年9月18日受理)

Behavior of Acid Phosphatase in Lysosomal Particles

Yasokichi OGASAWARA

(Received September 18, 1983)

緒 言

生鮮食品の鮮度や品質はライソソーム顆粒の安定性に大きく左右される^{1)~6)}。それゆえに、ライソソーム顆粒の安定性を明確にすることは、生鮮食品のよりよい保藏法と製造法を開発する上にきわめて肝要である。いっばう、生体内における酸性ホスファターゼのほぼ80%はライソソーム顆粒から由来するものと考えられ、したがって、ライソソーム顆粒を識別する上のマーカーとして用いられている⁷⁾。

本報においては、食品の保藏と製造に関する基礎的資

料を得るために、豚肝から分離したライソソーム顆粒の調製下における酸性ホスファターゼの挙動を比較検討した。以下その結果について報告する。

実験方法

1 試料の調製法

既報⁷⁾の操作に準拠して表1に示すように、去勢豚の肝臓からライソソーム顆粒に富む分画を調製した。これらの全操作は0°Cの冷室内で行なった。

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⁷⁾により、

表1 ライソソームの調製



*G-S液：グリコーゲン (0.4mg/ml) を含む0.2Mショ糖液の略。調製の全操作を0°Cの冷室内で行なった。

また、カテプシン活性はテクニコン自動分析法⁴⁾に準拠して測定した。

3 蛋白質量の測定法

既報の Cu-Folin 法⁸⁾に準拠して測定した。

4 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におけるゲルの調製、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の検出は Burstone 法¹⁰⁾に準拠して行なった。

結果および考察

1 調製過程における挙動

表 1 にしたがってライソソームを調製した。分離した各分画のライソソーム顆粒膜を破壊し、そのなか存在する酸性ホスファターゼとカテプシンの総活性を測定し、ホモジネートのそれに対する比率であらわした。図 1 はその結果である。酸性ホスファターゼも、カテプシンも、共に同一傾向をとりながら、ライソソーム顆粒の調製の進むにつれて、膜外に遊離しつつ、各分画へと広く移行・分布していった。

図 2 には、ライソソームの調製過程における各分画の酸性ホスファターゼとカテプシンの比活性度を、ホモジネートのそれに対する比率で示した。調製の進むにつれて、それら両酵素の純度も進み、ライソソーム分画である分画 VI では 4.8 倍付近へと上昇した。けれども、ライ

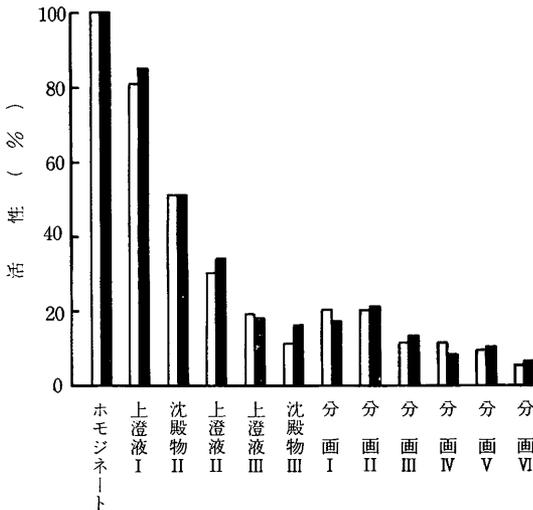


図 1 ライソソームの調製過程における酸性ホスファターゼ (白棒) とカテプシン (黒棒) の活性総量

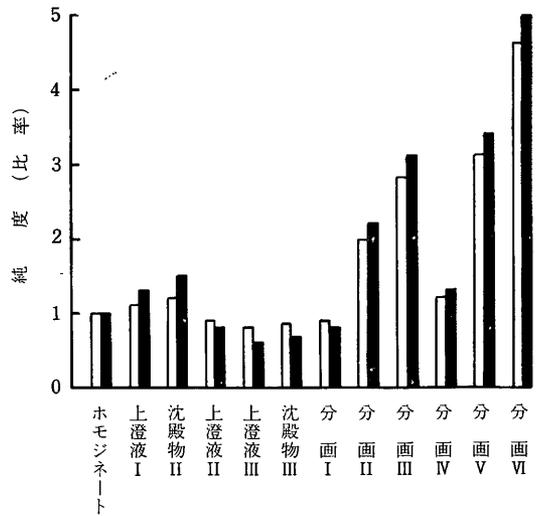


図 2 ライソソームの調製過程における酸性ホスファターゼ (白棒) とカテプシン (黒棒) の純度

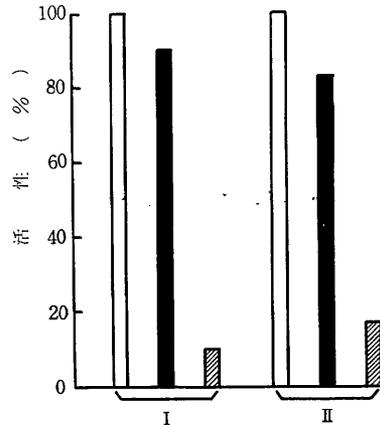


図 3 遠心分離による分画 VI のライソソームの酸性ホスファターゼ (I) とカテプシン (II) の総活性 (白棒)、結合型活性 (黒棒) および遊離型活性 (斜線棒) の挙動

ソーム顆粒は、これら両酵素以外にも多種多様の酵素類を含んでいるので、それ以上の純化にはさらに工夫を必要とするものと考えられた。

一般に、ライソソームのカテプシンは、酸性ホスファターゼよりも、その顆粒外に遊離され易い^{11,12)}。このことは、本実験の図 3 から明らかである。試料に用いた分画 VI は、0.2 M ショ糖液でよく洗浄して、遊離酵素類を除去したライソソーム分画であった。しかし、その後のわずかな遠心分離 (0°C, 15,000 × g で 10 分間) で、

カテプシンは17%も遊離していった。いっぽう、そのときの酸性ホスファターゼのそれは10%にとどまった。

2 ネーテブなライソソーム

表1で調製した沈殿物IIと分画VIに含んでいる蛋白質と酸性ホスファターゼを、さらにデスク電気泳動で検討し、図4に示した。沈殿物IIも分画VIも、共に、Rm 0.03, 0.05, 0.12, 0.15, 0.19, 0.23, 0.31, 0.40, 0.45, 0.68および0.71付近に位する11の蛋白質ピークをあらわした。これら以外に、純度の低い沈殿物IIは、Rm 0.50と0.76付近に位する2つの蛋白質ピークをあらわした。しかし、沈殿物IIの酸性ホスファターゼは、Rm 0.12と0.22に位する2つの活性ピークを示したのに対して、分画VIのそれは、それら両ピークのほかに、さらに Rm0.27付近にも活性ピークをあらわした。ここに新生した Rm 0.27に位する酸性ホスファターゼは、よりネーテブな沈殿物IIのライソソーム顆粒から、調製中にさらに生成されたものと考えられる。したがって、以後の本実験では、試料として沈殿物IIを用いることにした。なお、ここに

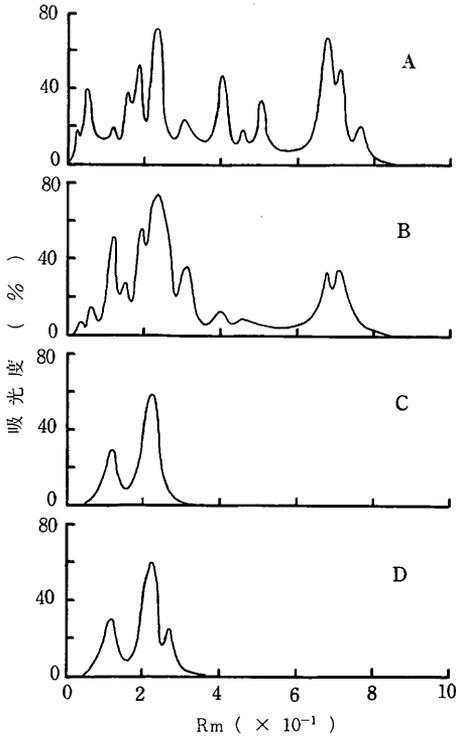


図4 沈殿物II (AまたはC)または分画VI (BまたはD)における蛋白質 (AまたはB)と酸性ホスファターゼ(CまたはD)のデスク電気泳動図

新生した Rm 0.27 の活性ピークについては、十分に検討の上、改めて報告する。

3 磨砕処理における挙動

沈殿物IIを、直ちに0.2Mショ糖を含むpH7.4, 0.01Mトリス・塩酸緩衝液に溶解後、磨砕器 (Glass pestle) で20回にいたるまで磨砕処理したものを遠心分離 (15,000×gで10分間)した。分離した上澄液中に遊離する酸性ホスファターゼ活性を測定し、当初のライソソーム顆粒内酸性ホスファターゼ総活性に対する比率で表示した。図5のIはその結果である。磨砕回数の進むにつれて、ライソソーム顆粒膜の破壊も進み、酸性ホスファターゼの膜外遊離量も増加した。いっぽう、表1の上澄液IIを、同様20回にいたるまで磨砕処理にかけた後、その中の遊離酸性ホスファターゼ活性の安定性を検討し、図5のIIを得た。20回にいたるまでの磨砕処理による酸性ホスファターゼの失活は認められなかった。したがって、磨砕処理を20回反復しても、膜外に遊離する酸性ホスファターゼは50%付近にとどまり、残りの50%付近は、なおライソソーム顆粒内に存在しているものと考えられた。

図5のIの実験で調製した各上澄液を用いて、さらにデスク電気泳動を検討し、図6を得た。20回にいたるまでのいずれの磨砕処理の場合にも、Rm 0.22付近にただ1つの酸性ホスファターゼの活性ピークをあらわし、それ以外には認められなかった。この場合、磨砕が進み、遊離の増すにつれて、その活性ピークも高くなった。ここに分離した活性ピークは、きわめて遊離しやすい酸性ホスファターゼであった。

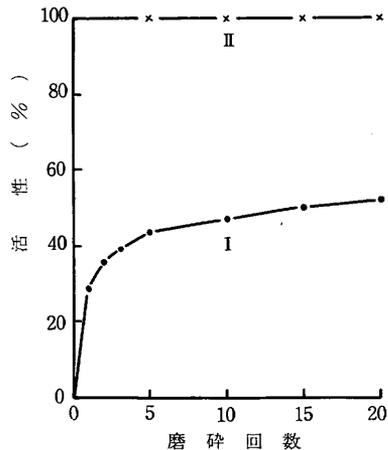


図5 磨砕処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性(I)とその安定性 (II)

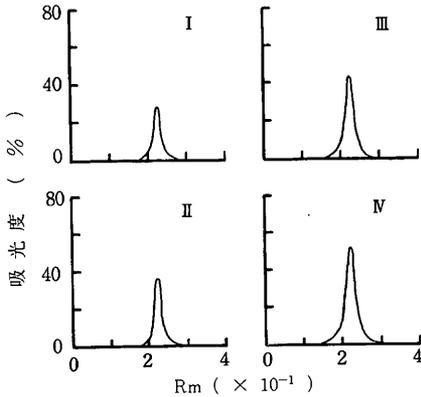


図6 1回(I), 2回(II), 5回(III)および20回(IV)の磨砕処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性のデスク電気泳動図

4 凍結融解処理における挙動

凍結融解処理をおこなえば、ライソソーム顆粒膜は崩壊していく^{4),11),12)}。本実験では、0.2 M ショ糖を含む pH 7.4, 0.01 M トリス・塩酸緩衝液に溶解した沈殿物 II を、ドライアイス・アセトンで凍結し、20°C で融解する操作を10回にいたるまで反復することによって、ライソソーム顆粒膜を破壊したものを遠心分離 (15,000×g で10分間) した。分離した上澄液中に遊離する酸性ホスファターゼ活性を測定し、当初のライソソーム顆粒内酸性ホスファターゼ総活性に対する比率で表示した。図7のIはその結果である。凍結融解の回数の進むにつれて、その膜外遊離量も増大していった。また、表1で調製した上澄液 II を、10回にいたるまで凍結融解処理後、その中に遊離している酸性ホスファターゼ活性の安定性を検討し、図7のIIを得た。10回にいたるまでの処理による酸性ホスファターゼの失活は認められなかった。それゆえに、凍結融解処理を10回反復しても、膜外に遊離する酸性ホスファターゼは75%付近にとどまり、残りの25%付近は、なおライソソーム顆粒内に存在しているものと考えられた。

図7のIの実験で調製した各上澄液を用いて、さらにデスク電気泳動を検討し、図8を得た。これによれば、10回までのいずれの凍結融解処理の場合にも、Rm 0.22付近にただ1つの酸性ホスファターゼの活性ピークをあらわし、それ以外のピークは認められなかった。この場合、凍結融解が進み、遊離が増すにつれて、その活性ピークも高くなった。ここに分離した活性ピークも、遊離

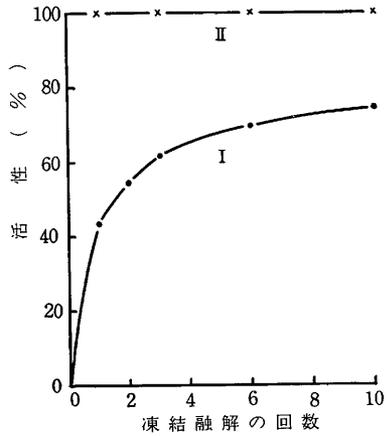


図7 凍結融解処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性(I)とその安定性(II)

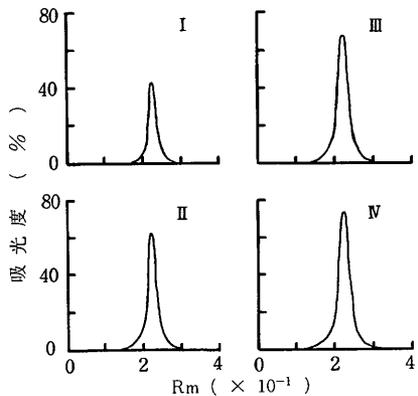


図8 1回(I), 3回(II), 6回(III)および10回(IV)の凍結融解処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性のデスク電気泳動図

し易い酸性ホスファターゼであるものと考えられた。

5 トライトン処理における挙動

顆粒内酵素の遊離化には、しばしばトライトン処理が用いられる^{13)~16)}。本実験では、2%にいたるまでのトライトン X-100 と 0.2 M ショ糖を含む pH 7.4, 0.01 M トリス・塩酸緩衝液に溶解した沈殿物 II を、10回磨砕処理にかけたものを遠心分離 (15,000×g, 10分間) した。分離した上澄液中に遊離する酸性ホスファターゼ活性を測定し、当初のライソソーム顆粒内酸性ホスファターゼ総活性に対する比率で表示した。図9のIはその結果である。これによれば、トライトン濃度の高まるにつれて、その膜外遊離量も増大していき、ついに 100%に達した。

この場合、トライトンを加えないときでも、10回の磨砕処理でその47%を遊離することは、すでに図5で明らかにした。表1の上澄液IIに、2%にいたるまでのトライトン X-100 を含ませたものを、10回磨砕処理後、その中に遊離する酸性ホスファターゼ活性の安定性を検討し、図9のIIを得た。これによれば、2%までのトライトン処理による同酵素の失活は認められなかった。したがって、2%トライトン処理で、失活することなく、ライソソーム顆粒内の全酸性ホスファターゼを、完全に遊離させつくしたものと考えられた。本報における総活性は、このときの遊離量をさしている。

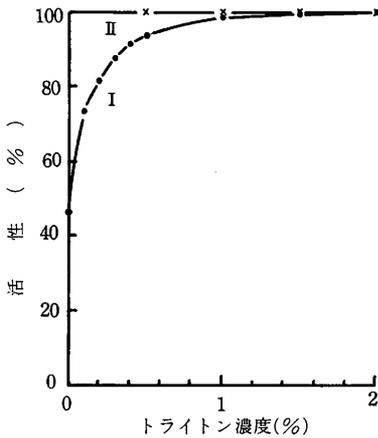


図9 トライトン処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性(I)とその安定性(II)

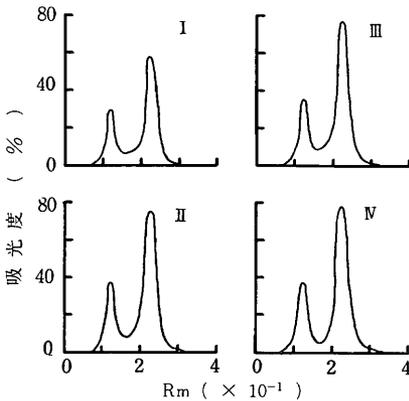


図10 0.1%(I), 0.5%(II), 1%(III)および2%(IV)のトライトン処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性のデスク電気泳動図

図9のIの実験で調製した各上澄液を用いて、さらにデスク電気泳動を検討し、図10を得た。これによれば、いずれのトライトン濃度の場合にも、Rm 0.22付近に高い、そして、0.12付近にはそれより低い酸性ホスファターゼの活性ピークを分離した。この場合、2%へとトライトン濃度が高まり、酵素遊離量が増すにつれて、その両活性ピークも高くなった。以上の結果から、2%のトライトンを用いれば、Rm 0.12と0.22の両活性ピークの酸性ホスファターゼは、ライソソーム顆粒からほぼ遊離しつくすものと考えられた。遊離しつくしたときのRm 0.12と0.22における両活性ピークの大きさは3:10の比率であった。

6 5°C 保蔵処理における挙動

ライソソーム顆粒を保蔵すれば、自己消化によってその顆粒は崩壊されていく^{13,14)}。本実験では、調製直後の沈殿物IIを、0.2M ショ糖を含むpH 7.4, 0.01M トリス・塩酸緩衝液に溶解したものを、5°Cで15日にいたるまで保蔵後、遠心分離(15,000×g, 10分間)した。分離した上澄液中に遊離する酸性ホスファターゼ活性を測定し、当初のライソソーム顆粒内の総活性に対する比率で表示した。図11のIはその結果である。これによれば、14日へと5°C保蔵の進むにつれて、その総活性に対する膜外遊離量も77%へと増大していき、その最高に達し、それ以後は増加しなかった。また、表1の上澄液IIを、5°Cで15日にいたるまで保蔵後、その中に遊離している酸性ホスファターゼ活性の安定性を検討し、図11のIIを得た。5°C保蔵15日にいたるまで同酵素の失活による消失はほとんど認められなかった。

図11のIにおける実験で調製した各上澄液を用いて、さらにデスク電気泳動を検討し、図12を得た。これによれば、いずれの保蔵日数の場合にも、Rm 0.22付近に位する酸性ホスファターゼのただ1つの活性ピークを分離し、それ以外には認められなかった。この場合、5°C保蔵が進み、酵素遊離量が増すにつれて、その活性ピークの大きさも増大していった。そして、14日保蔵におけるRm 0.22の活性ピークは、図10のIVに示した2%トライトン処理におけるそれと、ほぼ等しい大きさをあらわした。これから見れば、5°Cで14日保蔵すれば、Rm 0.22に位する酸性ホスファターゼは、失活を伴わないで、ライソソーム顆粒からほぼ遊離しつくすものと考えられた。しかし、14日を経過しても、Rm 0.12付近に位するそれは膜外に遊離しなかった。

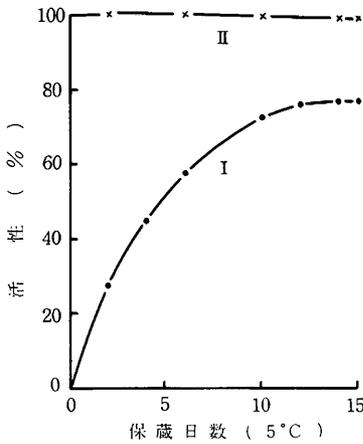


図11 5°C保藏処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性(I)とその安定性(II)

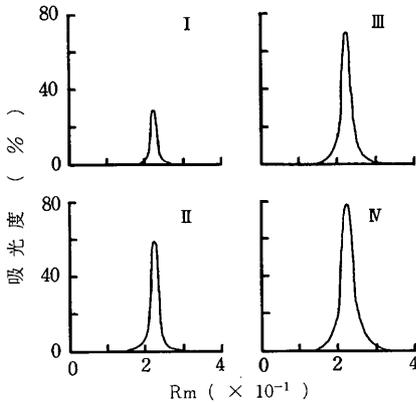


図12 2日(I), 6日(II), 10日(III)および14日(IV)の5°C保藏処理によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性のデスク電気泳動図

7 遊離型と結合型の分離

以上の結果を併せ考え、さらに次のような実験を再検討した。表1の沈殿物IIを、前述と同じ緩衝液に溶かしたものを、10回の凍結融解処理後、さらに10回の磨砕処理を加えてから遠心分離(15,000×gで10分間)した。図13のIは、その上澄液のデスク電気泳動図であり、Rm 0.22付近にただ1つの酸性ホスファターゼの活性ピークを分離した。遊離し易いこのピークをAllenら¹⁴⁾は遊離型と称した。いっぽう、その沈殿部を同様な緩衝液で2回洗浄後、2%トライトンX-100を含む同様な緩衝液を加え、10回磨砕処理後、再び遠心分離した。図13のIIは、その上澄液の酸性ホスファターゼの泳動図で

あり、Rm 0.12付近に低い明確な活性ピークを分離した。遊離しにくいこのピークをAllenら¹⁴⁾は結合型と称した。この場合、ごく低い遊離型に相当する活性ピークをもRm 0.22付近に分離した。

いっぽう、沈殿物IIを、緩衝液に溶かしたものを、5°Cで14日保藏後、遠心分離した。図13のIIIは、その上澄液の酸性ホスファターゼの泳動図であり、Rm 0.22付近にただ1つの高い遊離型の活性ピークを分離した。いっぽう、その沈殿部を緩衝液で2回洗浄後、2%トライトンX-100を含む緩衝液を加え、10回磨砕処理後、再び遠心分離した。図13のIVは、その上澄液の酸性ホスファターゼの泳動図である。このときも、図13のIIのそれと同様に、Rm 0.12付近に結合型の活性ピークのほか、Rm 0.22付近にもごく低い遊離型のそれを分離した。

以上のように、凍結融解と磨砕処理を併用するか、あるいは5°Cで2週間保藏すれば、ライソソーム顆粒内の酸性ホスファターゼのうちで、まず、遊離型をほぼ遊離させつくすことができた。いっぽう、残りの沈殿部のライソソームを、2%トライトン処理にかければ、その結合型をさらに遊離させつくすことができた。このときの遊離型と結合型はほぼ10:3で存在しているものと考えられた。

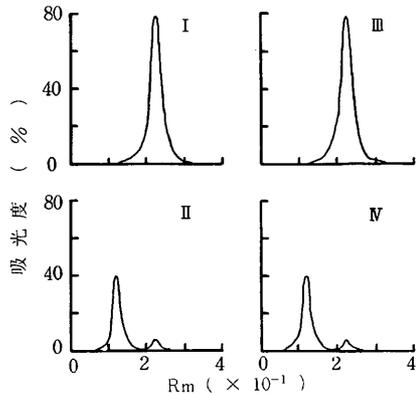


図13 10回の凍結融解処理後10回の磨砕処理(I), Iの処理後の沈殿部をトライトン処理(II), 5°Cで14日の保藏処理(III), またはIIIの処理後の沈殿部をトライトン処理(IV)によりライソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性のデスク電気泳動図

要 約

(1) 豚肝のライソソームの調製が進むにつれて、その

顆粒膜は崩壊して、そのなかの酸性ホスファターゼやカテプシンをその膜外に遊離していった。

(2) 磨砕処理, 凍結融解処理または5°Cで14日の保蔵処理を行なえば, まず, 遊離型の酸性ホスファターゼを, さらに, 2%トライトンの磨砕処理を行なえば, 結合型のそれをも分離していった。

(3) デスク電気泳動的には, 遊離型のそれはRm 0.22付近に1つの高い活性ピークを, いっぽう, 結合型のそれはRm 0.12付近にそれより低い活性ピークを分離した。

(4) その遊離型と結合型はほぼ10:3の割合で顆粒内に存在していた。

文 献

- 1) A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron : *Lysosomes*, 1~427 (1963)
- 2) S. K. Hoehn and J. N. Kanfer : *J. Nutr. (Can.)*, **110**, 2085 (1980)
- 3) C. H. Chung, R. L. Elliott and J. L. Mego : *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 251 (1980)
- 4) 小笠原八十吉 : 食工誌, **18**, 191 (1971); 農化誌, **40**, 347, 371 (1966)
- 5) R. A. Musson, H. Shafran and P. M. Henson : *J. Reticuloendothel. Soc. (USA)*, **28** (3), 249 (1980)
- 6) E. U. Moesinger : *Biochem. Pharmacol. (Ger.)*, **28** (7), 1015 (1979)
- 7) S. Shibko and A. L. Tappel : *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 76 (1963)
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 9) L. Ornstein and B. J. Davis : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 10) K. Rudolph and M. A. Stahmann : *Plant Physiology*, **41**, 390 (1966)
- 11) F. M. Baccino and G. A. Rita : *Biochem. J.*, **122**, 363 (1971)
- 12) C. Chang and F. Moog : *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 154 (1972)
- 13) T. Barka : *J. Histochem. Cytochem.*, **9**, 542, 564 (1961)
- 14) J. M. Allen and J. Gockermann : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 616 (1964)
- 15) P. J. Lad and A. A. White : *Arch. Biochem. Biophys.*, **197**, 244 (1979)
- 16) R. Blake, L. P. Hager and R. B. Gennis : *J. Biol. Chem.*, **253**, 1963 (1978)

Summary

The membrane of lysosomal particles was gradually disrupted with proceeding the preparation of lysosomal particles, and acid phosphatase and cathepsin existed in there were released from the membrane.

Soluble form of acid phosphatase was released from membrane first of all by employing homogenizing, freeze thawing or storage at 5°C for two weeks. Further, bound one was released by homogenizing in the solution containing triton X-100.

Soluble form of acid phosphatase showed the only high activating peak near by Rm 0.22 and bound one did lower activating peak close to Rm 0.12 in Disc electrophoretic patterns.

Soluble form and bound one in lysosomal particles were in being at the ratio of 10 to 3 or so.