

心室を4%ホルムアルデヒドまたは2%グルタルアルデヒドにより1~2時間固定、洗浄後、凍結または未凍結切片を作成、クエン酸鉛法により各種ホスファターゼ活性の検出を行なつた。時に未固定組織のクリオスタット切片(20μ)も用いた。滲漬液のpHは9.2~9.4を主とし、pH7.2~7.4も併せ行なつた。基質としては、nucleoside phosphates(ATP, ADP, AMP, ITP, IDP, IMP, CTP, CDP, CMP, UTP, UDP, IDP, UMP, およびGTP, 各3mM)を用い、比較としてthiamine pyrophosphate(2mM), thiamine monophosphate(2mM), sodium β-glycerophosphate(20mM)を用いた。

一般にホスファターゼ活性は、筋形質膜、筋小胞体、糸粒体、ゴルジ装置、リゾーム、毛細血管壁、赤血球原形質膜、軸索-シュワン細胞間、線維細胞などに陽性であつた。ただし局在性は基質の種類により差がみられる。たとえば、筋小胞体は主として nucleoside triphosphates、糸粒体は主として nucleoside triphosphates、ことにATP、ゴルジ装置は nucleoside diphosphatesと thiamine pyrophosphate、リゾームは sodium β-glycerophosphateを基質としたときに活性を示したが、その他の構造におけるホスファターゼ活性はほとんどすべての基質に対して活性を示す傾向がある。

糸粒体内ホスファターゼ活性検出の際には滲漬液にDNP(通常0.1mM)を添加した。活性は主として nucleoside triphosphatase活性のようであり、とくに ATPase活性である可能性が強い。ATPを基質としたとき磷酸鉛の沈着は基質全体を埋めるように存在したが、内膜およびクリステを構成する単位膜様構造の基質側から基質に向けて粒子状に突出して沈着している像も観察された。

(追加討論)

共役因子とホスファターゼ活性の関係

信州大学医学部生化学

香川 靖雄

共役因子Iは糸粒体の内膜に存在する分子量284,000の酵素で、単離することによつて強いATPase活性($60\mu\text{モル}/\text{mg蛋白}/\text{min}$)を示す。糸粒体は酸化的磷酸化によつて生体エネルギーの大半をATPの形で供給するが、この共役因子IがATP合成の担い手である¹⁾。また糸粒体内膜の負染色電顕像で Fernández-Moránが見出した微細構造は、実は基本粒子(電子伝達を含む)ではなく、共役因子Iそのものであつた^{1,2)}。

糸粒体分画には微弱な酸-, アルカリホスファターゼ活性があり、細胞膜ホスファターゼとの相似を考え、共役因子との関連を検討した。すなわち、細胞膜のNa-, K ATPaseはイオン輸送の機能をもつが、K-依存性ホスファターゼ活性(P-nitrophenyl phosphate)も有していると、多数の研究者は考えている³⁾。これは反論的にも興味ある事実であるが、Na-KATPaseの標品は膜断片にすぎず、精製が成功していないので、この結論には疑問が残つてゐる。共役因子Iは精製され、またOligomycin感受性付与因子(F₀)⁴⁾に吸着させて糸粒体ATPase活性が再構成されること、糸粒体ATPaseをOligomycin感受性をもつたまま単離できる点から⁴⁾、明確な結論が期待される。アルカリホスファターゼはKing-Armstrong法、酸ホスファターゼはBessey, Lowry and Brook法で測定し下記の結果を得た。

- (1) 共役因子I(100μg/Assay)に両活性は検出されない。
- (2) Oligomycin感受性ATPaseや再構成糸粒体ATPaseにも両活性は現われない。
- (3) 糸粒体両活性はOligomycin阻害、DNP促進をうけない点、糸粒体ATPaseとは異なる。

糸粒体ATPaseがホスファターゼと機能的、構造的関連をもつとは考えられず、糸粒体分画に両活性をもつLysosome, Golgiの混入も否定できない。

- 1) M. E. Pullman & G. Schatz: *Annual Review of Biochem.*, **36**: 539, 1967.
- 2) Y. Kagawa & E. Racker: *J. Biol. Chem.*, **241**, : 2467,

- 2475, 1966.
 3) 戸田剛太郎・他：生化学. 39:181, 1967.
 4) Y.Kagawa: in *Methods in Enzymology*. 10 : 505, 1967.

5. 精子形成過程とホスファターゼ, とくに 核内ホスファターゼについて

奈良県立医科大学解剖
安澄権八郎

2種類の精子を形成する *Cipangopaludina malleata* Reeve を材料として, 諸種の phosphatases, さらに UDPG-pyrophosphorylase および pseudocholin esterase の活性について報告する. この材料の異型精子細胞においては, 核物質とくに DNA が細胞質中に現われ, ついで多糖類に転換される. その過程における glucose-1-P→UDP-glucose→glycogenについて, 初めて電子顕微鏡によつて観察した結果を述べる. なお正常および異型精子細胞核の蛋白質の組成, これら核, ミトコンドリア, 尾部軸糸における ATPase および acid phosphatase の活性, ミトコンドリアにおける pseudocholin esterase の活性, Golgi 氏器管における thiamine pyrophosphatase および uridine diphosphatase の活性についても述べる予定である.

(追加討論 1)

鉛法による核内ホスファターゼ反応の特異性 について

京都大学結核胸部疾患研究所細胞化学
水谷 昭

各種ホスファターゼ作用が, 組織化学的に核内に存在するか否かについては, 古く光学顕微鏡レベルでの酸性およびアルカリ・ホスファターゼに関する初期の時代か

ら繰り返されてきた問題である. これらの酵素については, つぎの点から一般に核での反応の特異性には否定的である. すなわち, (1) アゾ色素法では核に反応が出ない. (2) アルカリ・ホスファターゼでは Gomori によるコバルト法では核が染るが, 高松による銀法ではほとんど染らない. 以来, 種々の特殊なホスファターゼ作用の証明法が報告され, また電子顕微鏡レベルでの研究が盛んになってきたが, 核での反応の特異性に関する問題には大した進展がみられない. たとえば, 漠然と鉛(あるいは金属)の核への親和性などと表現されているが, 問題はそのような単純なものではないと思われる.

非特異的に核に反応産物の沈着が起こる可能性としてはつぎの場合が考えられる. 1) 酵素自身の diffusion. 2) 基質ないしは基質と鉛の complex が核に沈着する. 3) 磷酸イオンが核と結合する. 4) 鉛イオンが結合する. 5) 磷酸鉛が核に沈着する. われわれは, これら各条件を順次検討した. すなわち, モデルケースとして酸性ホスファターゼおよび ATPase において, 核の反応のもつとも現われやすい条件を固定液, 基質と鉛の濃度の関係などについて検討し, さらに鉛イオン, 磷酸鉛および磷酸イオンのそれぞれの核に対する親和性を検討し興味ある所見を得た.

結論として, 現在電顕的に証明可能なホスファターゼの中で, 少なくとも高等動物の細胞核に問題なく存在するものとしては, ERとともに Nuclear pores に局在する酵素群 (Glucose 6-phosphatase その他) に限定されるようである.

(追加討論 2)

アゾ結合法によるホスファターゼ活性検出について

岩手医科大学医学部解剖
大倉 卓治