HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	UNTERSUCHUNGEN UBER PHOSPHATASEN IN ZAHNGEWEBEN
Author(s)	YAMAUCHI, Shotaro
Citation	Japanese Journal of Veterinary Research, 4(3), 89-100
Issue Date	1956-09-30
DOI	https://doi.org/10.14943/jjvr.4.3.89
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/1693
Type	departmental bulletin paper
File Information	KJ00002373080.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PHOSPHATASEN IN ZAHNGEWEBEN

Shotaro YAMAUCHI

Physiologisches Institut, Veterinär Fakultät,
Hokkaido Universität, Sapporo, Japan

(Eingegangen am 19 Juli, 1956)

Die Phosphatase ist durch ihre Stellung im Körper- und Zellhaushalt eines der physiologisch wichtigsten Fermente. Sie ist u. a. beteiligt an den Vorgängen der Atmung, der Assimilation, der Gärung, der Blutglykolyse, der Muskelkontraktion und besonders der Kallusbildung.[6] Für das Studium ihrer Rolle innerhalb dieser Vorgänge ist die genaue Kenntnis zunächst der phosphatatischen Wirkung und ihrer Natur allein erforderlich.

Wie von alters her ausführlich dargelegt worden ist, wird die Phosphorsäure in Form von organischen Verbindungen wie Glycerin-Phosphorsäure, Hexosediphosphat etc., mehr nutzbar als die anorganische. Vielleicht können solche organischen Phosphorsäuren von dem Ferment gespalten werden, und die abgespalteten Teile gehen mit dem dort befindlichen Calcium eine unlösliche Verbindung ein. Es ist auch bereits angenommen, dass die Fermente in den verschiedenen Geweben quantitativ und qualitativ verschieden sind, und ein verschiedenes Verhalten gegenüber äusseren Einflüssen zeigen.[11]

Das Dasein der Alkaliphosphatase im Zahn ist schon von vielen Forschern[13,14,15,16] bemerkt worden. Dass die Fermente auch im Zahn ein eigentümliches Verhalten unter Umstände zeigen, innerlich unter Veränderung des Blutwesens, äusserlich unter Lokalentzündung z. B. Gingivitis oder Beschaffenheiten in der Mundhöhle, z. B. Speichelwesen, und dass die Fermente dadurch auf das Wachsen oder die Erhaltung des Zahnes bedeutungsvollen Einfluss ausüben, sind leicht denkbar. Bisher aber sind Phosphatasen im Zahn wenig anerkannt worden. Deshalb habe ich die grundlegenden Eigenschaften der Zahnphosphatasen vorzüglich durch die biochemische Methode untersucht.

EXPERIMENT

1. Die Aktivität der Zahnphosphatasen gegen pH

Die Phosphatasen sind in Klassen, in denen sie ein analoges pH-Optimum haben, angeordnet worden. In wenigen Nachrichten über Zahnphosphatasen ist das Dasein der Sauerphosphatase, ausserdem der Alkaliphosphatase, von MATSUNO[10] mitgeteilt worden, der sie in histochemischen Präparaten bemerkt hat. Deshalb wollte ich die Natur der

Phosphatasen in den Zahngeweben aus der Phosphatase-Aktivität gegen pH im allgemeinen genau erforschen.

Als Material wurden 5 Gewebe, Zahnpulpa, Zahnfleisch, Zahnbein, Zement und Schmelz des gesunden Pferdes benutzt. Die einzelnen Sorten der Materialien wurden fein zerlegt, davon beim Hartgewebe 5 g in einem Glasrohr abgewogen und mit 30 ml destilliertem Wasser, aus dem das Kohlensäuregas im voraus weggenommen wurde, extrahiert. Beim Weichgewebe dagegen wurden 20 g des Materials und 50 ml destilliertes Wasser gemischt. Ein Tropfen Toluol wurde hinzugefügt und das Gemisch bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang stehen gelassen. Ein ml von der extrahierten Lösung wurde mit 1 ml von 5% Natrium β-Glycerophosphat-Lösung versetzt, die auf einer Reihe pH, welche von 3.5 bis 11 mit 0.5 Abstand 15 Einteilungen hat und mit 7 ml von angepasstem Puffer gepuffert wurde. Weiter wurde das Gemisch bei 38°C 40 Minuten lang im Thermostaten stehen gelassen. Nach Enteiweissung mit 9 ml von 30% Trichloressigsäure, wurde die Zunahme des freien anorganischen Phosphors nach BODANSKY[1,2] mit dem elektrischen Kolorimeter bestimmt. Als Kontrolle wurde das enteiweisste Filtrat benutzt. pH-Messungen wurden mit dem elektrischen pH-Meter vorgenommen.

Aus der Abb. 1, 2, 3, 4 und 5 geht hervor, dass (a) die Phosphatasen der 5 Geweben

ABB. 1. *Aktivität der Zahnpulpa-Phosphatasen gegen pH*

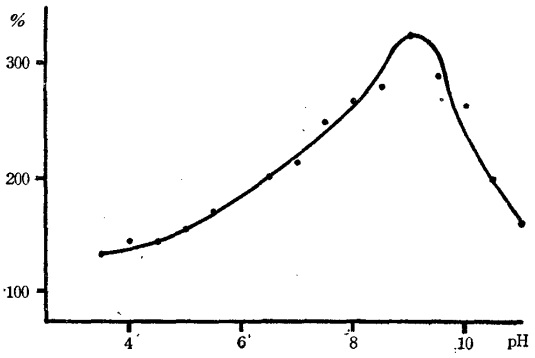


ABB. 2. *Aktivität der Zahnfleisch-Phosphatasen gegen pH*

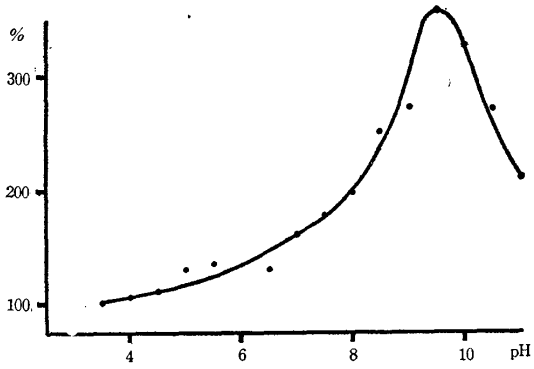


ABB. 3. *Aktivität der Zahnbein-Phosphatasen gegen pH*

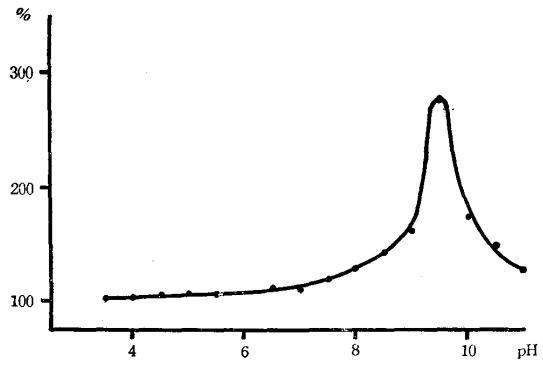


ABB. 4. *Aktivität der Zement-Phosphatasen gegen pH*

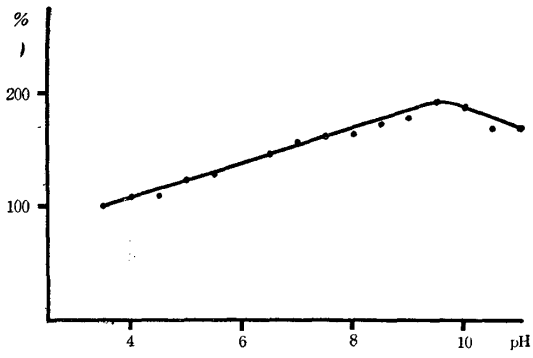
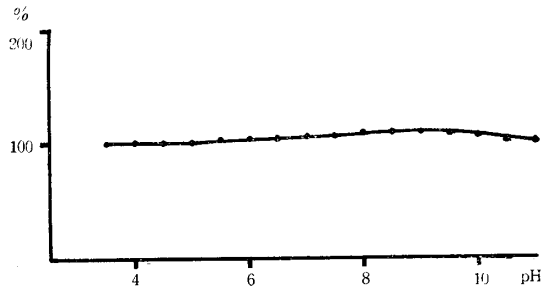


ABB. 5. *Aktivität der Schmelz-Phosphatasen gegen pH*



im Zahn alle in alkalischem Gebiet ihr pH-Optimum haben, (b) ihr pH-Optimum ist überall ähnlich, aber nicht ganz gleich, jedoch ist noch unklar, ob diese Differenz aus ihrem quantitative Unterschied stammt, oder ob die Fermente von einander verschieden sind, (c) in diesem Versuch allein scheint es keine Sauerphosphatase in dem Hartgewebe zu geben und (d) das Vorhandensein von Sauerphosphatase wurde hier nicht bemerkt.

2. Die Stabilität der Zahnphosphatasen gegen pH

Setzt man Lösungen der Phosphatase längere Zeit bei Zimmertemperatur der Einwirkung bestimmtes pH aus und bestimmt man nach gegebenen gleichen Zeiten die noch vorhandenene Aktivität, so erhält man die Stabilität-pH-Kurve. Die so gewonnene Kurve steht in keinerlei Beziehung zur bekannten Aktivität-pH-Kurve. Und weil sie lediglich eine Fermentstörung beschreiben soll, so sind ihre Lage und ihre Steilheit abhängig von der Inaktivierung-Zeit, insbesondere von der Art des verwendeten Ferments.

Das Material ist gleich dem des vorhergehenden Experimentes. Je 1 ml Extrakt wurde mit 2 ml von verschiedener Puffer-Lösung versetzt. Weiter wurde es bei Zimmertemperatur 40 Stunden lang stehen gelassen. Das auf diese Weise behandelte Extrakt wurde mit 1 ml von 5% Natrium β-Glycerophosphat-Lösung, die stets auf eigenes pH-Optimum mit 7 ml von M/10 H_3BO_3·KCl+M/10 Na_2CO_3 Puffer gepuffert wurde, vermischt. Dann wurde es bei

ABB. 6. *Stabilität der Phosphatasen in der Zahnpulpa gegen pH*

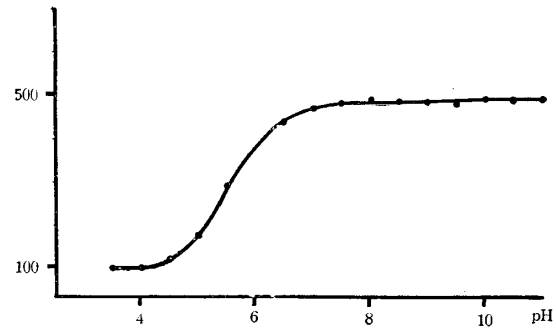
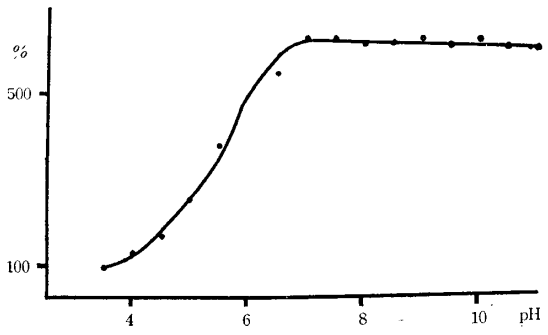


ABB. 7. *Stabilität der Phosphatasen in dem Zahnfreisch gegen pH*



38°C 40 Minuten lang stehen gelassen. Nachdem geschah die Enteiweissung mit 30% Trichloressigsäure (es wurden meist 9 ml Trichloressigsäure auf 13 ml Versuchsflüssigkeit gegeben).

In diesem Versuch erhält man die Kurven der Abb. 6, 7, 8, 9 und 10. Sie zeigen, dass die Zahnphosphatasen alle in alkalischem Gebiet vollkommen stabil sind, dass aber ein steiler Abfall der Stabilität einsetzt bis zu einem pH von ungefähr 7 und dass schon bei einem pH von 5 oder von 4.5 kaum noch Phosphatase nachweisbar ist.

ABB. 8. *Stabilität der Phosphatasen in dem Zahnbein gegen pH*

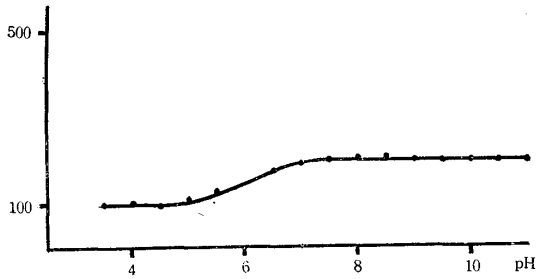


ABB. 9. *Stabilität der Phosphatasen in dem Zement gegen pH*

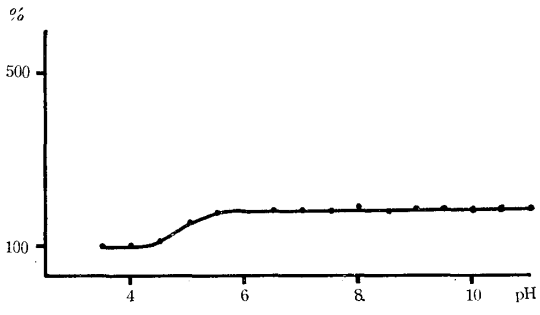
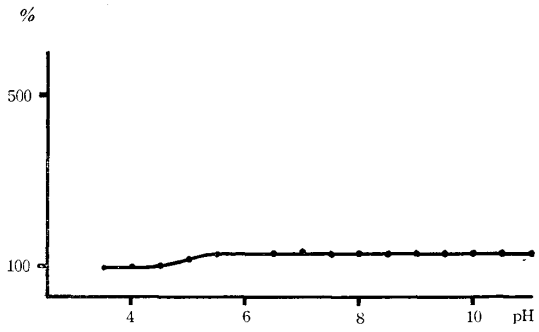


ABB. 10. *Stabilität der Phosphatasen in dem Schmelz gegen pH*



3. Einfluss der anorganischen Ionen auf die Zahnphosphatasen

Es ist schon nachgewiesen, dass die anorganischen Ionen ein verschiedenes Verhalten gegenüber den verschiedenen Phosphatasen zeigen.[5] Einige von ihnen aktivieren einige Phosphatasen, die anderen unterdrücken sie. In dieser Hinsicht wurde die Wirkung der folgenden Substanzen auf Zahnphosphatasen untersucht.

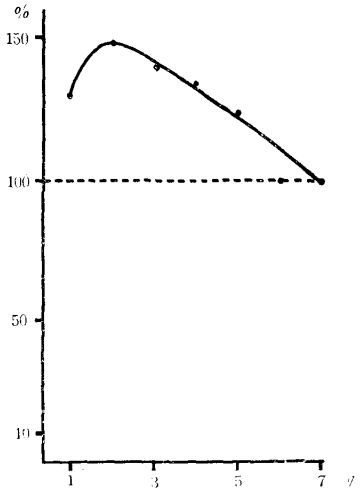
a) Einfluss des Calciums auf Zahnphosphatasen

Es steht auch fest, dass Calcium die Nierenphosphatase leicht unterdrückt und dass in der Niere, wo die Nierenphosphatase[7] reichlich vorhanden ist, keine Präzipitation von Calcium und Phosphor stattfindet. Und die Zahnphosphatasen, nach obigen Experiment-Resultaten zu urteilen, scheinen der Nierenphosphatase analog zu sein. Es ist also recht bedeutungsvoll, den Einfluss des Calcium auf Zahnphosphatasen zu erforschen.

Man sieht in dem Abb. 11. dass Calciumionen die Zahnphosphatase aktivieren, und je

konzentrierter die Lösung von $CaCl_2$, um so günstiger die Wirkung auf sie ist. Jedoch liegt hier die Optimumkonzentration bei 2 q Ca. Hierbei ist je konzentrierter die Lösung, die Wirkung um so schlechter.

ABB. 11. *Einfluss des Calciums auf die Zahnpulpa*



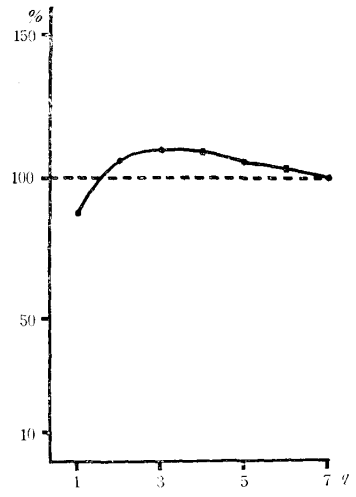
Wie schon erklärt worden ist, ist die Zahnpulpaphosphatase der Nierenphosphatase analog bei der Aktivität gegen pH. Sie zeigt aber hier, bei der Aktivität mit $CaCl_2$, ein ganz anderes Verhalten.

b) Einfluss des Magnesium auf Zahnphosphatasen

Die Phosphatasen wurden nach dem pH-Optimum, oder nach Schwierigkeit der Spaltung von Natrium α-Glycerophosphat und Natrium β-Glycerophosphat gewöhnlich in 4 Klassen eingeteilt. Bei dem Einfluss des Magnesium auf sie wurde ebenfalls ein Unterschied zwischen ihnen angenommen. Bei pH-Optimum aktiviert Magnesium Phosphatase der Nieren und der Erythrozyten. Die Milzphosphatase wird dabei nie beeinflusst; die Oberhefenphosphatase dagegen wurde von ihm unterdrückt. Beim Puffer von 7.6 wurde die Nierenphosphatase leicht, die Erythrozyten- und Milzphosphatase stark von ihm aktiviert. Es ist also interessant zu untersuchen, wie Magnesium bei den Zahnphosphatase wirken wird. Die Methode ist ganz gleichder des Versuches von Calcium.

Aus dem Resultat meines Experimentes (Abb. 12), bemerkt man, dass Magnesium ebenso wie Calcium auf Zahnpulpaphosphatasen wirkt. Bei einigen Phosphatasen,[3,5] die von ihm aktiviert wurden, ist die optimale Konzentration von Magnesium schon bestimmt worden. In verschiedenen Präparaten unter verschiedenen Umständen liegt sie gewöhnlich zwischen 1.7 und 3.3 q Mg.

ABB. 12. *Einfluss des Magnesiums auf die Zahnpulpa*



Bei den Zahnphosphatasen scheint die optimale Konzentraion bei 3 q Mg zu liegen, wirkt demnach je konzentrierter, desto schlechter. Wenn hingegen die noch stärker als 1.5 q Mg ist, wirkt Magnesium unterdrückend auf die Phosphatasen.

c) Einfluss des Mangan auf die Zahnphosphatasen

Das manche Gewebephosphatasen von Mangan aktiviert, und andere beschränkt werden, ist schon festgestellt worden.

Bei den Zahnpulpaphosphatasen, wie dem Abb. 13 zeigen, aktiviert es sie auch bei schwacher Konzentration. Die Konzentration von 2 q Mn aber unterdrückt sie auffallend.

ABB. 13. *Einfluss des Mangans auf die Zahnpulpa*

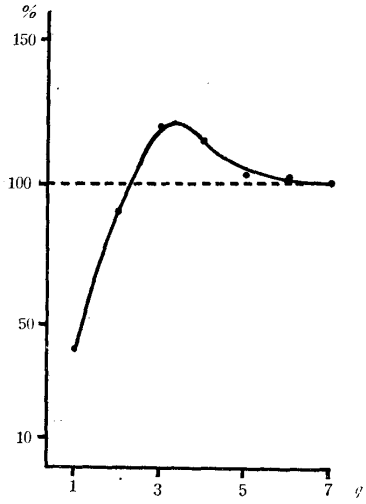
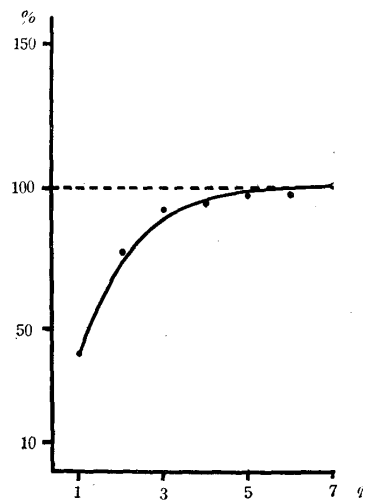


ABB. 14. *Einfluss des Fluorids auf die Zahnpulpa*

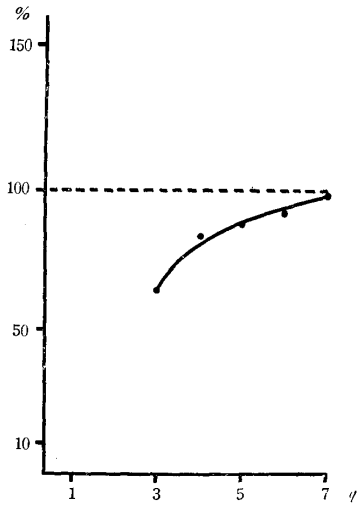


d) Einfluss des Fluorids auf die Zahnphosphatasen

Gewöhnlich ist von Fluoridionen geglaubt worden, dass sie auf Phosphatase beschränkend wirken.[5,8] Nach SAITO[12] aber aktiviert Flourid sie in dünner Konzentration von 7 q F. Sei dies zutreffend oder nicht, ist es jedenfalls interessant zu erforschen, wie es auf Zahnpulpaphosphatasen wirkt, da bisweilen geglaubt wird, dass Aufnahme von Fluorid per os, das Faulen der Zähne verhüten könne.

Wie man in dem Abb. 14 sieht, zeigen die Zahnpulpaphosphatasen bei Vorhandensein von NaF bedeutende Abnahme der Aktivität, wenn seine Konzentration auch noch so dünn ist.

ABB. 15. *Einfluss des Kupfers auf die Zahnpula*



e) Einfluss des Kupfers, des Quecksilbers, des Bariums, des Zinks und des Kaliums

Der von JINNER und KAY beschrieben Einfluss der oben erwähnten Metalle besteht darin, dass alle mehr oder weniger die Wirkung der Gewebephosphatasen beschränken. Dabei sind aber nicht die Art von Phosphatasen und die Konzentration der Metalle genau beschrieben worden.

Bei meinen Versuchen mit obigen Metallen wurde beobachtet, dass sie, wie man in den Abb. 15, 16, 17, 18 und 19 sieht, alle stark die Zahnpulpaphosphatasen beschränkt hat.

ABB. 16. *Einfluss des Quecksilbers auf die Zahnpulpa*

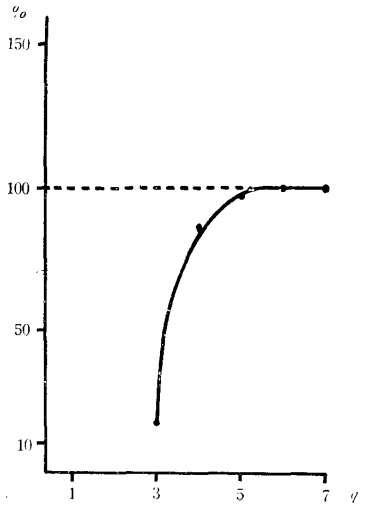


ABB. 17. *Einfluss des Bariums auf die Zahnpulpa*

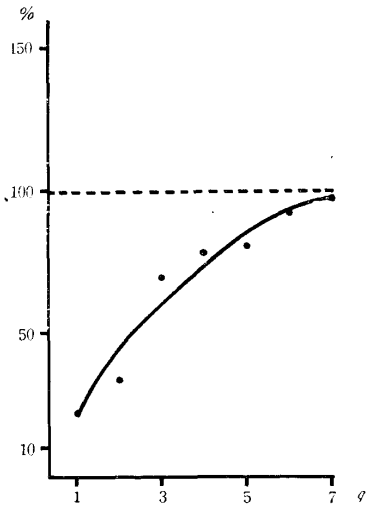


ABB. 18. *Einfluss des Zinks auf die Zahnpulpa*

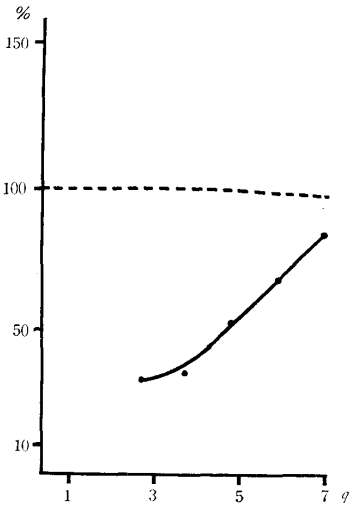
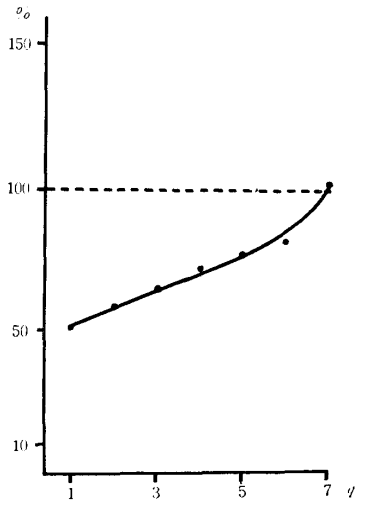


ABB. 19. *Einfluss des Kaliums auf die Zahnpulpa*



4. Konzentration des freien Phosphors und Aktivität der Hartgewebephosphatasen mit Magnesium

Es ist bemerkenswert, dass im Phosphatase-Material der Gehalt an Magnesiumionen, welche die Phosphatase aktivieren, und an Phosphorionen oder Phosphorsäure, welche das Ferment unterdrücken, ziemlich hoch ist. Es ist daher die Frage, ob es z. B. im Zahnschmelz und im Zement vielleicht keine Phosphatase gebe, selbst wenn die auch in dem Rohmaterial mit den Hemmungsbestandteilen, wie Phosphor, und mit den Aktivierungssubstanzen, wie Magnesium, nicht wahrzunehmen ist.

Aus diesem Grunde habe ich den Gehalt des freien Phosphor in 5 Zahngeweben bestimmt.

Wie man in der Tabelle 1 sieht, ist Konzentration des freien Phosphor in Hartgeweben ziemlich höher als die in Weichgeweben.

Ich habe daher nochmals die Phosphatase-Aktivität der Hartgeweben gegen pH bestimmt, indem ich, anstatt die Hemmungsbestandteile zuentfernen, Magnesium hinzufügte, das das Ferment aktiviert. Die Entfernung der anorganischen Bestandteile aus dem Rohsaft durch Dialyse bereitet nähmlich wegen des verhältnismässig niedrigen Molekulargewichts der Phosphatase Schwierigkeiten. Das Ferment ist durch Kollodiumhülsen in kurzer Zeit fast quantitativ dialysierbar.

Bei diesem Versuch kann man deutlich das Vorhandensein von Alkaliphosphatase bemerken (Tabelle 2).

TABELLE 1. *Gehalt von freiem Phosphor in Zahngeweben*

	ZAHNPULPA	ZAHNFLEISCH	ZAHNBEIN	ZEMENT	SCHMELZ
Freie Phosphat (Relativer Wert)	28	20	172	150	195

TABELLE 2. *Aktivität der Hartgewebe-Phosphatasen gegen pH Abgespaltenes Phosphat (Relativer Wert)*

	ZAHNBEIN	ZEMENT	SCHMELZ
Ohne $MgCl_2$	137	140	115
Mit $MgCl_2$	153	151	121

5. Einfluss einiger organischer Substanzen

Es ist auch schon festgestellt worden, dass die organischen Substanzen einen grossen Einfluss auf Phosphatasen ausüben, besonders dass das freie Aminoradikal bei der Phosphatase-Wirkung nötig ist.[3,4]

In meinem Experiment habe ich den Einfluss des Zuckers und der Aminosäure untersucht. Dabei wurden als Zucker Traubenzucker, Fruchtzucker und Rohrzucker, und als Aminosäure Glycin benutzt.

Wie aus der Abb. 20, 21, 22 und 23 hervorgeht, zeigen alle diese Substanzen auffallende Beförderungswirkung auf die Zahnphosphatasen, und dass bei dem Zucker, je konzentrierter die Lösung davon, um so günstiger die Wirkung ist. Bei der Aminosäure aber gibt es die optimale Konzentration von 2 q Glycin.

ABB. 20. *Einfluss des Traubenzuckers auf die Zahnpulpa*

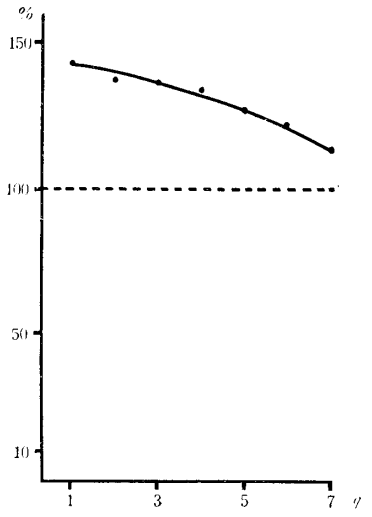
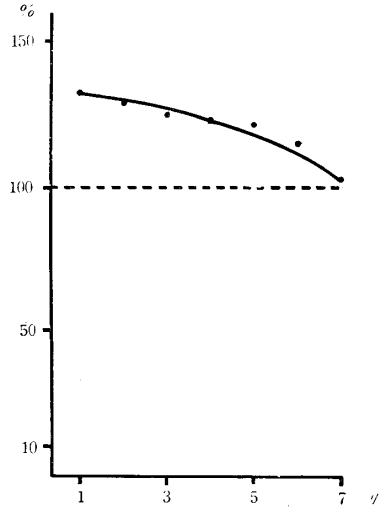


ABB. 21. *Einfluss des Rohrzuckers auf die Zahnpulpa*



ABE. 22. *Einfluss des Fruchtzuckers auf die Zahnpulpa*

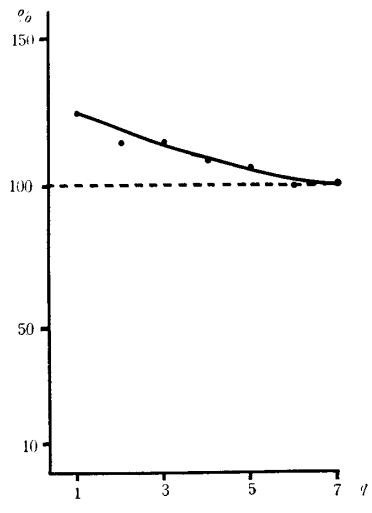
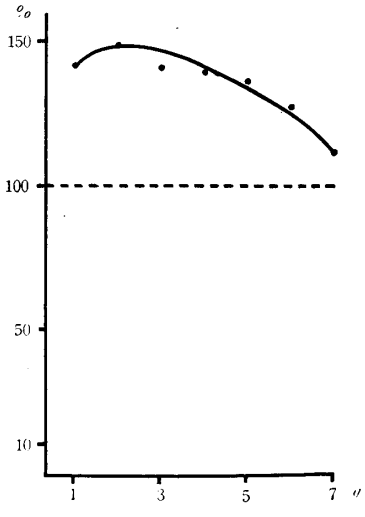


ABB. 23. *Einfluss des Glycins auf die Zahnpulpa*

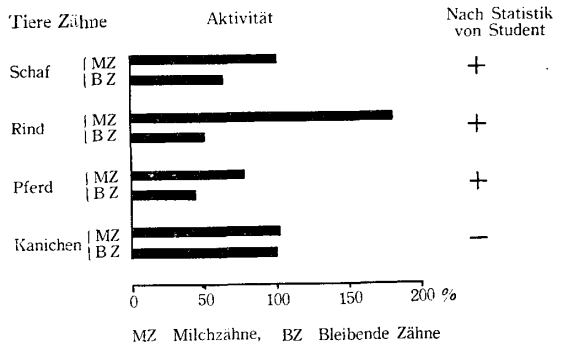


6. Aktivität der Zahnphosphatasen von verschiedenen Tieren

Wenn es auch nicht sicher festgestellt werden könnte, wie und wieviel die Zahnphosphatasen direkt oder indirekt an dem Wachstum des Zahns und an seiner Erhaltung beteiligt sind, ist es immerhin kein bedeutungsloser Versuch, die Zahnphosphatase-Wirkung bei verschiedenen Tieren miteinander sowohl am bleibenden Zahn als auch am Milchzahn zu vergleichen. Weil die Phosphatasen jede für sich mehr oder weniger verschieden sein mögen, z. B. der Zahn von Nagetieren, wo sein Wachsen lebenslang zu sehen ist, unterscheidet sich von dem anderen Tiere.

Beim Versuch wurde Zahnpulpa von normalen gesunden Tieren gebraucht. Die Tiere waren Pferd, Kuh, Schaf und Kaninchen, das letztere also zu den Nagetieren gehörend.

ABB. 24. *Zahnphosphatase-Aktivität bei einigen Tieren*



Aus der Abb. 24 kommt Verfasser zu folgenden Schlüssen.

1) Bei Pferd, Kuh und Schaf ist die Phosphatase-Aktivität des Milchzahns ziemlich stärker als die des bleibenden Zahnes. 2) Bei Kaninchen hingegen, das zu den Nagetieren gehört, ist die Ferment-Aktivität in beiden Zähnen beinahe gleich. 3) Beim neugebornen Rind ist die des Milchzahns besonders stark.

BEMERKUNGEN ZU DEN VERSUCHSERGEBNISSEN

Aus Grund der umfangreichen, schon statistisch auswertbaren Arbeiten über den Bau und die Spezifität des Fermentes, konnte der Schluss gezogen werden, dass die Wirkungsspezifität eines Fermentsystems ausschliesslich durch die im Coferment enthaltene Wirkungsgruppe und die Substratspezifität allein durch das Apoferment bestimmt wird. Hinsichtlich der Phosphatase hat man schon angenommen, dass ihre gleiche Wirkungsspezifität, ihr Vermögen, Ester der Phosphorsäure zu spalten, zurückgeht auf in ihrem Molekül vorhandene gleiche oder zum mindesten nahe verwandte Cofermente mit gleicher Wirkungsgruppe, und dass ihre Substrat- und ihre pH-Spezifität zurückgeht auf chemisch verschiedene Apofermente.

In meinen Versuchen haben die Zahnphosphatasen des Pferdes alle im alkalischen Gebiet ihr pH-Optimum. Und dies pH-Optimum ist nicht in allen Fällen

gleich, sondern es sind kleine Unterschiede zwischen den einzelnen Fällen bemerkt worden. Es ist aber noch unklar, ob diese Differenz auf chemisch verschiedenen Apofermente der Phosphatase oder auf andere Ursachen bei dem Versuchsprozesse zurückgeht.

Die Phosphatase des Knochens,[11] die auch ihr pH-Optimum im alkalischen Gebiet hat, scheint mit der Nierenphosphatase eine Gruppe zu bilden, wenn es auch einen kleinen Unterschied dazwischen gibt. In meinem Versuch über den Einfluss der anorganischen Substanzen auf die Zahnphosphatasen sind die Fermente von einigen Metallen z. B. Calcium und Magnesium aktiviert, und von andern z. B. Fluorid, Mangan, Quecksilber, Barium, Zink und Kalium beschränkt worden. Die Nierenphosphatase ist hingegen von Calcium leicht unterdrückt worden. Weiter ist der Wirkungsgrad solcher anorganischen Substanzen auf die beide Fermente mehr oder weniger verschieden.

Aus diesem Resultaten glaubt Verfasser, dass es zwischen diesen beiden Phosphatase-Arten einen gründlichen Unterschied, d. h. den der beiden Apofermente, gibt.

Dass die Aktivität der Milchzahnphosphatase ziemlich stärker als die der Phosphatase im bleibenden Zahn ist, dass bei Kaninchen, dessen Zahn-Wachstum lebenslang zu sehen ist, die Ferment-Aktivität der beiden Zähne beinahe gleich ist und dass beim neugeborenen Rind, die Phosphatase-Aktivität des Milchzahns besonders stark ist, das alles bedeutet die grosse Rolle der Zahnphosphatase bei dem Wachsen des Zahnes.

Zusammenfassung

Ich habe die grundlegenden Eigenschaften der Zahnphosphatasen durch die biochemische Methode untersucht. Aus diesem Versuch zieht man die folgende Schlüssen.

1. Die Phosphatasen der 5 Zahngewebe haben alle im alkalischen Gebiet ihr pH-Optimum und ihre pH-Optima sind analog mit einander.
2. Das Vorhandensein der Sauerphosphatase wurde hier bei diesem Versuch nicht bemerkt.
3. Die Zahnphosphatasen sind alle vollkommen stabil in alkalischem Gebiet, aber ein steiler Abfall der Stabilität setzt bei einem pH von ungefähr 7 ein, und es zeigt sich, dass schon bei einem pH von 5 oder von 4.5 kaum noch Phosphatase nachweisbar ist.
4. Die Zahnphosphatasen wurden von Calcium, Magnesium und Mangan aktiviert und von Fluorid, Kupfer, Quecksilber, Barium, Zink und Kalium beschränkt.
5. Die Phosphatase-Wirkung wurde auch im Hartgewebe des Zahns bei Hinzufügung von Magnesium bemerkt.

6. Zucker und Aminosäure aktivieren die Zahnphosphatasen des Pferdes.
7. Bei Pferd, Kuh und Schaf ist die Phosphatase-Aktivität des Milchzahns ziemlich stärker als die des bleibenden Zahns.
8. Beim Kaninchen hingegen, das zu den Rodentia gehört, ist die Ferment-Aktivität der beiden Zähne beinahe gleich.
9. Beim neugeborenen Rind ist die des Milchzahns besonders stark.

LITERATUR

1) BODANSKY, A. (1932): *J. biol. Chem.*, **99**, 197.
2) BODANSKY, A. (1933): *Ebenda*, **101**, 93.
3) BODANSKY, O. (1936): *Ebenda*, **114**, 273.
4) BODANSKY, O. (1936): *Ebenda*, **115**, 101.
5) JENNER, H. D. & H. D. KAY (1931): *Ebenda*, **93**, 733.
6) KAMADA, K. (1932): *Fukuoka-Igakuzasshi*, **25**, 207 (auf japanisch).
7) KUWABARA, G. (1932): *J. Biochem., Tokyo*, **16**, 403.
8) LIPMANN, F. (1928): *Biochem. Z.*, **196**, 3.
9) MATHEWS, A. P. und T. H. GLENIN (1911): *J. biol. Chem.*, **9**, 29.
10) MATSUNO, A. (1952): *Sapporo-Ikadaigaku-Kiyo*, **2**, 304 (auf japanisch).
11) ROBINSON, R. (1923): *Biochem. J.*, **17**, 286.
12) SAITO, S. (1954): *Shikagakuho*, **52**, 201 (auf japanisch).
13) YAGIU, Y. (1929): *Nihonshika-Igakuzasshi*, **22**, 179 (auf japanisch).
14) YAGIU, Y. (1931): *Ebenda*, **24**, 591 (auf japanisch).
15) YAGIU, Y. (1933): *Ebenda*, **26**, 691 (auf japanisch).
16) YAGIU, Y. (1935): *Rinsho-Shika*, **7**, 124 (auf japanisch).