

無および低カタラーゼ血症マウスの カタラーゼ分子の性質に関する研究

第 2 編

マウス肝カタラーゼの等電点電気泳動による分析

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

佐 藤 征 紀

（昭和63年2月25日受稿）

Key words : アカタラセミア, ヒボカタラセミア, 電気泳動, アガロース, KI

緒 言

Feinstein は、1964年、C57BL系統マウスに放射線照射をすることによって作製したマウスの内に変異種である無カタラーゼ血症(C₀C₀)を発見した¹⁻⁴⁾。この変異マウスの血液の残余カタラーゼ活性は正常マウスの約2.4%を示すのに対して、他の臓器のカタラーゼ量は比較的高く、肝では約28.0%であった³⁾。又、同時に同型接合体の低カタラーゼ血症(C₀C₀, C₀C₀, C₀C₀, C₀C₀)も見出され²⁾、この残余カタラーゼの活性度は血液では11~20%、肝では77~82%もあった³⁾。これは放射線による遺伝子の障害の程度の差によるものと考えられている。この無カタラーゼ血症マウスの残余カタラーゼは、正常マウスのカタラーゼに比べて熱に不安定であり⁴⁾、又、網状赤血球中のカタラーゼ活性が成熟赤血球より明らかに高いことが緒方らによって見出された⁵⁾⁶⁾。この成績はAebiの報告したスイス人の無カタラーゼ血症⁷⁾、及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G-6-PD)欠乏症⁸⁾⁹⁾に近似しており、少なくとも酵素を赤血球内で安定な構造に保つためのアミノ酸を規定する構造遺伝子の変異があると説明されている。

無カタラーゼ血症マウスのカタラーゼの構造の差異を確認するための一つの方法として著者は、系統維持されている純系マウスC3Hの無及び低カタラーゼ血症マウスの肝カタラーゼに、

陰イオン系界面活性剤のLIS(3-5ジヨードサリチル酸リチウム塩)、蛋白質変性剤の塩酸グアニジン、及び酵素活性部に作用するアジ化ナトリウム(アジド)を添加し、カタラーゼ活性への阻害度ならびに加温とpHに対する安定性を調べ、各カタラーゼ分子の構造の変異を中心に検討した¹⁰⁾。その結果、無カタラーゼ血症(C₀C₀)及び同型接合体低カタラーゼ血症(C₀C₀)のみならず、無カタラーゼ血症異型接合体マウス(C₀C₀)の肝カタラーゼの性質は正常マウス(C₀C₀)とは異っており、それぞれのカタラーゼ分子の構造は異なっていると推定された。

本報では更に、各マウスの肝カタラーゼ分子の構造の変異をより直接的な方法で証明する為に、等電点電気泳動法を用いて分析を行った。電気泳動法によるカタラーゼ分子の研究は、Thorupらのデンブン・ゲルによる人の赤血球の研究¹¹⁾、MatsubaraらのPAG・デンブン・アガロース混合ゲルでスイス人の無及び低カタラーゼ血症の赤血球カタラーゼに電気泳動上の差異があるという報告¹²⁾、Feinsteinらのセルロース・ポリアセテート電気泳動法で正常と同型接合体低カタラーゼ血症マウスの赤血球カタラーゼに差異が見出されなかった研究⁴⁾、Mörikofer-Zwezらの人と馬の赤血球カタラーゼのデンブンゲルとPAG電気泳動法による研究¹³⁾、及びOgataらの日本人無カタラーゼ血症残余カタラーゼのSDS-PAG電気泳動法による分析¹⁴⁾などがある。

一方、Polyacrylamide gel (PAG) は、Awdeh らが1968年に薄層 PAG を用いて IgG 抗体の不均一性を本法により解析¹⁵⁾して以来、各分野で急速に利用され、すぐれた解析法として認められている。しかし、PAG の分子篩効果が却って欠点となって大きな分子の蛋白では PAG の中に入っていない、native な状態で分析することが出来ない¹⁶⁾。著者の試みでも分子量約240,000のカタラーゼ蛋白の PAG での電気泳動は出来なかった。そこでアガロースゲルを支持体とする Rosen らの等電点電気泳動法¹⁷⁾を用いて、C 3 H 系統の正常、無及び低カタラーゼ血症マウスの肝カタラーゼの性状を解析した。

又、各種の分析法による正常マウス肝カタラーゼの多様性については磷酸カルシウムゲルによるクロマトグラフィーを用いた Price ら¹⁸⁾の研究、DEAE・セルロースクロマトグラフィーによる東ら¹⁹⁾の報告があり、肝臓中で数種のアイソザイムとしてカタラーゼが分画され、その2、3の性状について相互の比較が行われている。著者は更に、無及び低カタラーゼ血症マウスの肝カタラーゼを DEAE・カラムクロマトグラフィーで、A、B、C の3分画に分離し、各分画の等電点を調べた成績について報告する。

実験材料及び方法

1. 材 料

本実験に用いたマウスの strain はすべて純系 C 3 H の生後1~3ヶ月齢の雄で、正常(野性型)の同型接合体である C^a/C^a 、無カタラーゼ血症の同型接合体である C^b/C^b 、低カタラーゼ血症の同型接合体の一種である C^c/C^c 、無カタラーゼ血症の異型接合体である C^a/C^b の4種を用いた。

2. 肝カタラーゼ上清酵素液の調製

軽いエーテル麻酔を施したマウスより肝臓を摘出し、純水中で充分脱血し、1/30M 磷酸緩衝液でよく洗う。これに4倍量の8.5%蔗糖溶液を加えてテフロンホモゲナイザーで2回ホモゲナイズし、約20% (Wet weight/V) の肝ホモジネートを1,000×g で10分間遠心し核分画を除き、次にその上清を9,500×g、10分間の遠心によりミトコンドリア分画を除去し、更に上清を105,000×

g、60分間超遠心してマイクロゾーム分画を除いて得られる上清液を本実験に用いた (Fig. 1)。

3. DEAE・カラムクロマトグラフィー²⁰⁾

上述の肝上清液を0.001M、pH 6.8の磷酸バッファー中で24時間水室で透析したもの2mlを、DEAE セファセル (Pharmacia 社) を充填したカラム ($\phi 20 \times 440$ mm) 中を窒素ガス飽和の磷酸バッファー (pH 6.8) の濃度を段階的に変えて溶出操作を行った。まず、0.001M で50ml、0.003M で50ml、0.01M にして125ml、0.1M で125ml と変えて各 fraction tube に5ccづつ分取し、コロジオン・バック (Sartorius 社) を用いてカタラーゼ活性が1.5PU/mlになる様濃縮した。

4. ゲルの調製及び電気泳動¹⁷⁾

1% Agarose IEF (Pharmacia 社)、12% D-ソルビトール(半井化学薬品社)、0.4% Starch soluble の水溶液を100°Cの water-bath で加熱

Strain of normal and mutant mice

Normal ----- C3H/ANL C^a/C^a
 Acatalasiaemia ----- C3H/ANL C^b/C^b
 Hypocatalsiaemia --- C3H/ANL C^c/C^c

Purification of mouse liver catalase (All procedure is carried out at 0-4°C)

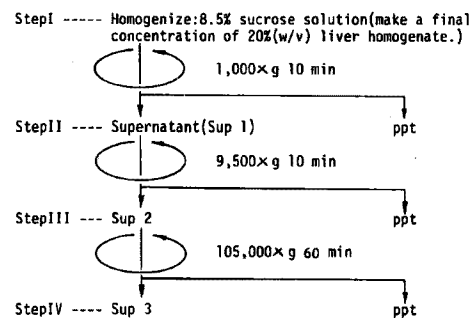


Fig. 1 Strain of normal and mutant mice (above).

Process of purification of mouse liver catalase (below).

し、気泡の入らないように攪拌、Agaroseが完全に溶解した後75°Cで両性担体 Pharmalyte pI 3-10 (Pharmacia 社)を最終濃度6%になるように加える。これを水平台上の親水性プラスチックシート (Gel Bond-film, FMC コーポレーション社)に、1.2mmの均一な厚さになるように注ぎ広げ、5分後湿潤箱に入れ、4°Cの冷蔵庫に入れて一晩置き、ゲルの強度を増加させた (Fig. 2)。電極液の陰極は1 MのNaOH溶液、陽極は0.05MのH₂SO₄溶液とし、ゲル両端においた電極ストリップスを濾紙片で溶液槽とつなぐ。各、肝上清液又は、濃縮溶出液は6μづつ小濾紙片に浸透させたものをゲルの上にのせる。泳動条件はまず、160Vで20分、次いで300Vで30分、500Vで30分、700Vで20分 (各6°C) 行った後、コマシー・プリリアント・ブルー・R-250による蛋白染色及び、Thorup らの方法¹¹⁾に従ってヨードデンプン反応を利用した染色法で、カ

Preparation of agarose gel plates

Sorbitol (12%)	} Water-bath (100°C)
Agarose (1.0%)	
Starch soluble (0.4%)	
Distilled water	

Ampholine solution (6.0%) +

↓

Agarose coated plastic sheet.
(Giving a thickness of 1.2 mm)
Keep over night at +4°C.

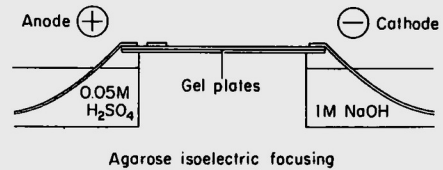


Fig. 2 Preparation of agarose gel plates (above), and scheme of agarose isoelectric focusing (below).

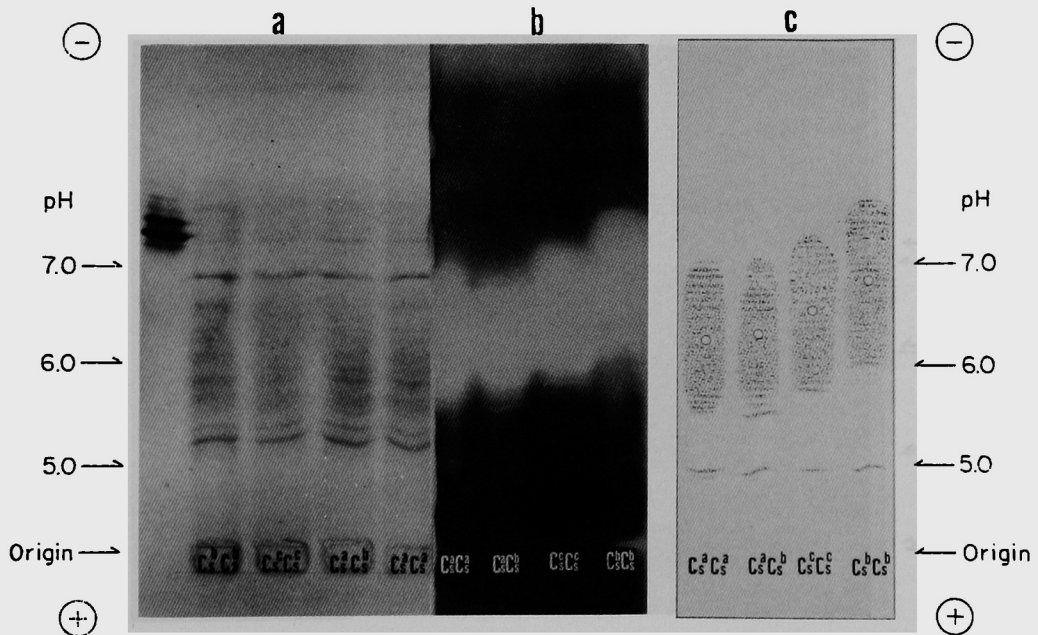


Fig. 3 Agarose isoelectric focusing of purified liver catalase from various mice. C_s^aC_s^a, Normal; C_s^bC_s^b, Acatalasemic homozygote; C_s^cC_s^c, Hypocatalasemic homozygote; C_s^aC_s^b, Acatalasemic heterozygote.

- a : Protein staining with Coomassie-Brilliant-Blue R-250.
- b : Catalase activity bands by starch iodine reaction.
- c : Scheme of "b".

タラーゼ活性の所在を検索した。等電点の測定には pI-Marker (オリエンタル酵母工業社) を用いた。

実験結果

1. 肝上清液の電気泳動

まず、超遠心法による肝上清液を正常 ($C_s^a C_s^a$), 無カタラーゼ血症異型接合体 ($C_s^a C_s^b$), 低カタラーゼ血症同型接合体 ($C_s^c C_s^c$), 無カタラーゼ血症同型接合体 ($C_s^c C_s^b$) を並べて等電点電気泳動を行い、カタラーゼ活性染色を施した結果、酸性側にすべて共通の細いカタラーゼ活性のバンド (約 pI 5.0) と、それよりもアルカリ性側に pI 5.4~7.6 にわたって各種異なった幅広いカタラーゼ活性のバンドの 2 種類が認められた (Fig. 3 - b. c). 即ち $C_s^a C_s^a$ は約 pI 5.4~7.0 (6.20), $C_s^a C_s^b$ は約 pI

5.6~7.0 (6.30), $C_s^c C_s^c$ は約 pI 5.8~7.3 (6.55), $C_s^c C_s^b$ は約 pI 5.9~7.6 (6.75) を示した (但し、括弧内は酵素活性バンドの中心点の pI). 比較の為に、コマシー・ブリリアント・ブルー・R-250 による蛋白染色も Fig. 3-a に示す。Fig. 4 は他のマウスを用いて同様に肝カタラーゼの等電点電気泳動を行った結果であるが、この各種カタラーゼのバンドの中心点の pI の平均値で比較すると、 $C_s^a C_s^a$ は pI 6.20, $C_s^a C_s^b$ は pI 6.30, $C_s^c C_s^c$ は pI 6.55, $C_s^c C_s^b$ は 6.75 でこの順にアルカリ性側に近く認められ、その成績は Fig. 3 と全く同じであった。Fig. 3 又は Fig. 4 の成績より得られたマウス肝カタラーゼの等電点は Table 1 に示す。

2. $C_s^a C_s^a + C_s^c C_s^b$ 混合肝上清液と

$C_s^a C_s^b$ の電気泳動の比較

無カタラーゼ血症異型接合体 ($C_s^a C_s^b$) マウス

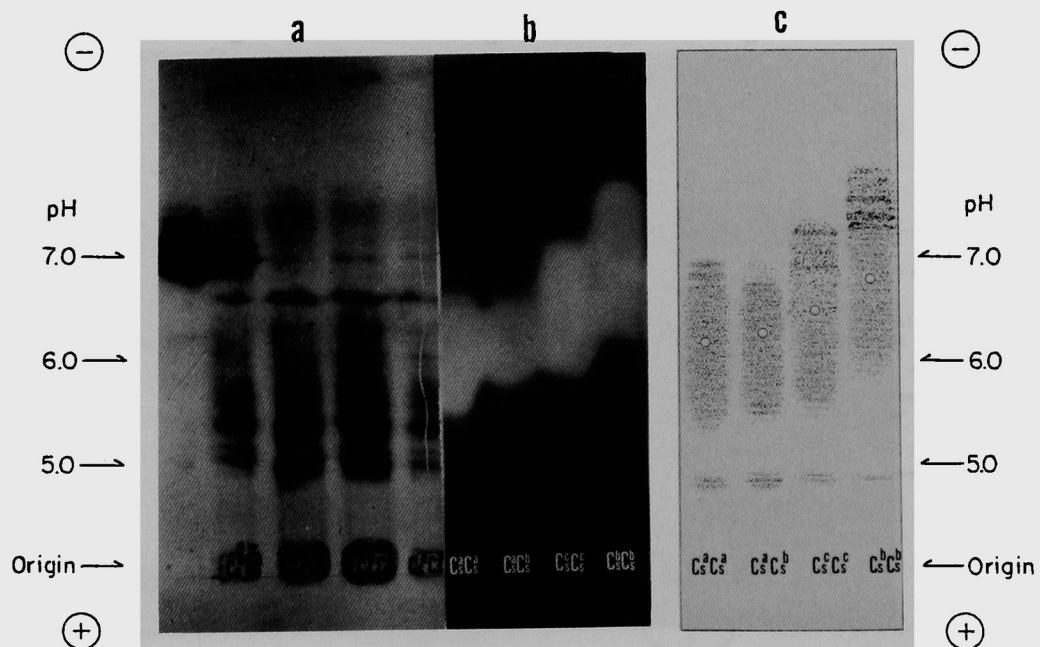


Fig. 4 Agarose isoelectric focusing of purified liver catalase from various mice.

$C_s^a C_s^a$, Normal; $C_s^b C_s^b$, Acatalasemic homozygote; $C_s^c C_s^c$, Hypocatalasemic homozygote; $C_s^a C_s^b$, Acatalasemic heterozygote.

a; Protein staining with Coomassie-Brilliant-Blue R-250.

b; Catalase activity bands by starch iodine reaction.

c; Scheme of "b".

の血液カタラーゼの活性は正常 ($C^a C^a$) の約半分であるが²¹⁾, 先に著者が行った肝カタラーゼの加温処理による結果も¹⁰⁾, その両親である $C^a C^a$ と $C^b C^b$ の中間の性質を示している. そこで, $C^a C^a$ と $C^a C^b$ と $C^b C^b$ の等量混合液よりなるか否かを明らかにする目的で $C^a C^b$ 肝カタラー

ゼと $C^a C^b$ 肝カタラーゼ上清液を 1 : 1 で混合したものを泳動した (Fig. 5). 混合した肝カタラーゼの活性バンドは pI 5.4~7.3 であって, $C^a C^b$ の活性バンド pI 5.6~7.0 より幅広く, 且つ活性バンドの中心点は $C^a C^a$ よりややアルカリ性側にある点で明らかに両者は異っていた.

Table 1 pI values of the liver catalase of normal, acatalasemic heterozygote, hypocatalasemic and acatalasemic mouse.

		Range of pI (isoelectric band)	Average
Normal	$C^a C^a$	5.4-7.0	6.20
Acatalasemic heterozygote	$C^a C^b$	5.6-7.0	6.30
Hypocatalasemic homozygote	$C^c C^c$	5.8-7.3	6.55
Acatalasemic homozygote	$C^b C^b$	5.9-7.6	6.75

pI : pH of isoelectric point.

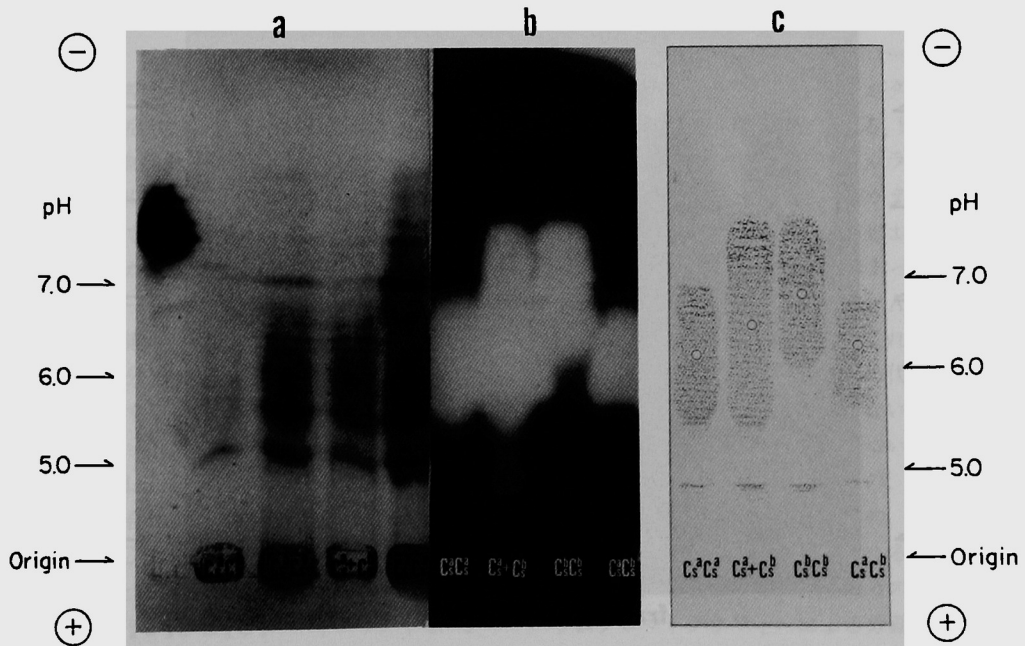


Fig. 5 Agarose isoelectric focusing of purified liver catalase from various mice, and the mixture of equal volumes of purified liver catalase from $C^a C^a$ and $C^b C^b$. $C^a C^a$, Normal; $C^b C^b$, Acatalasemic homozygote; $C^a C^b$, Acatalasemic heterozygote.

- a : Protein staining with Coomassie-Brilliant-Blue R-250.
- b : Catalase activity bands by starch iodine reaction.
- c : Scheme of "b".

3. 肝カタラーゼ分画溶出液の電気泳動

$C_s^a C_s^a$ と $C_s^b C_s^b$ の肝上清液を、DEAE・カラムクロマトグラフィーで分画溶出した結果、フラクションA, B, Cに3分画された。そして、それぞれの溶出液を濃縮したものと肝上清液を等電点電気泳動すると多様な活性バンドが認められた (Fig. 6, Table 2). $C_s^a C_s^a$ と $C_s^b C_s^b$

の各分画を比較すると、フラクションAでは $C_s^a C_s^a$ と $C_s^b C_s^b$ 共に pI 5.9~7.0ではほぼ等しいが、フラクションBでは $C_s^a C_s^a$ が pI 5.4~6.2, $C_s^b C_s^b$ が pI 6.0~7.1, フラクションCは $C_s^a C_s^a$ が pI 5.6~6.6, $C_s^b C_s^b$ が6.1~7.6とフラクションB, Cはいずれも $C_s^b C_s^b$ が $C_s^a C_s^a$ よりアルカリ性側に活性バンドを示した。同一マウスの各分

Table 2 pI values of liver catalase-fraction A, B and C from normal and acatalasemic mouse.

Mouse strain		Fractions		
		A	B	C
Normal	$C_s^a C_s^a$	pI5.9—7.0(6.45)	pI5.4—6.2(5.80)	pI5.6—6.6(6.10)
Acatalasemic homozygote	$C_s^b C_s^b$	pI5.9—7.0(6.45)	pI6.0—7.1(6.55)	pI6.1—7.6(6.85)

() : Average pI of isoelectric band.

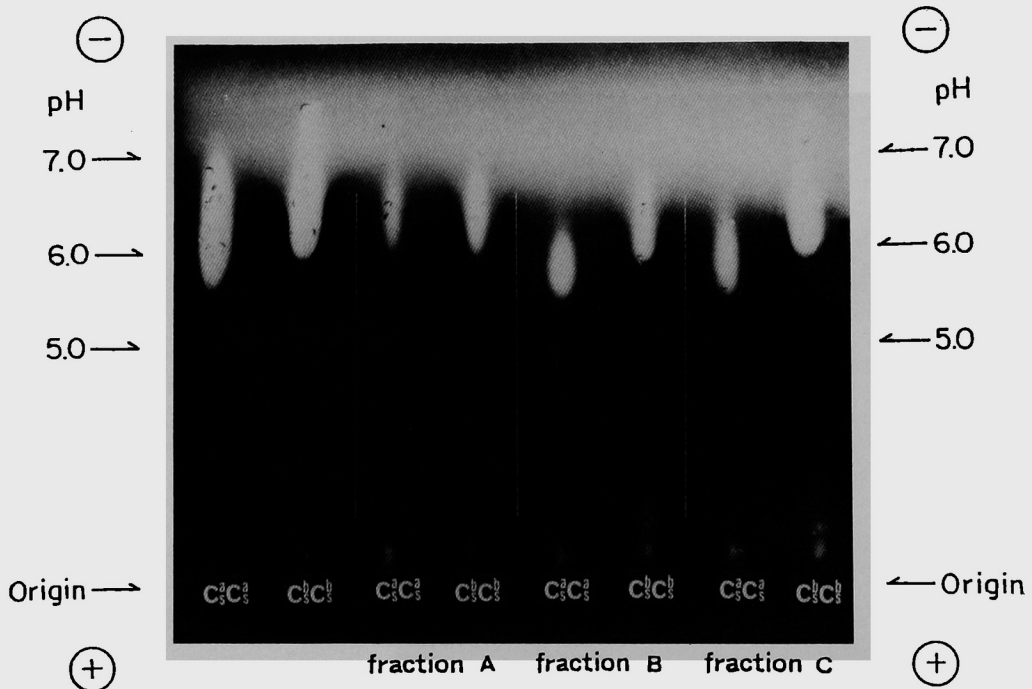


Fig. 6 Agarose isoelectric focusing of purified liver catalase and fraction A, B and C from $C_s^a C_s^a$ and $C_s^b C_s^b$.

- a : Whole samples of mouse liver catalase.
- b : Fraction A of catalase from $C_s^a C_s^a$ and $C_s^b C_s^b$.
- c : Fraction B of catalase from $C_s^a C_s^a$ and $C_s^b C_s^b$.
- d : Fraction C of catalase from $C_s^a C_s^a$ and $C_s^b C_s^b$.

画の等電点については、今後検討する予定である。

考 察

これら変異マウスの肝カタラーゼ分子の構造を相互比較する為に、幅広い方の活性バンドの中心点のpIを調べると、正常(C₂C₂)、低カタラーゼ血症同型接合体(C₂C₂)、無カタラーゼ血症同型接合体(C₂C₂)の順に等電点は高く、アルカリ性側に位した。即ち、C₂C₂、C₂C₂、C₂C₂の等電点が相互に異なることで、それぞれのカタラーゼ分子の構造に変異があることが認められた。この構造の変異については、Feinsteinら²¹⁾の熱や尿素に対する安定性の結果や、水垣²²⁾のSDSによる変性、著者¹⁰⁾のLIS、塩酸グアニジン、アジ化ナトリウムによる阻害度及び熱やpHに対する安定性の結果より推定されていたが、これらマウス肝カタラーゼのより直接的な等電点の差異によって、無カタラーゼマウスの肝カタラーゼ分子の性質が更に明確になったと思われる。

又、同型接合体である正常(C₂C₂)と無カタラーゼ血症(C₂C₂)を両親として生まれた無カタラーゼ血症異型接合体(C₂C₂)の等電点は、ややC₂C₂に近いものの両親の中間を示した。異型接合体であるC₂C₂のカタラーゼ分子の荷電極性側鎖が同型接合体であるC₂C₂、C₂C₂の肝カタラーゼ(及び、両者の等量混合物)のいずれとも違うと考えられる。この点について、カタラーゼ分子が4つのサブユニットから成ることを考慮する必要がある。異型接合体の各々のサブユニットの性質がC₂C₂、C₂C₂の中間を示すよりはむしろスイス人の無カタラーゼ血症の異型接合体(Aebi, 1977²³⁾)の例の如く、一部はC₂C₂、一部はC₂C₂である可能性が高い。このことについてAebiはカタラーゼ活性を考慮の上C₂C₂とC₂C₂のハイブリダイゼーションを行い、澱粉電気泳動法で分離した結果、両者の中間の等電点を示すカタラーゼを得ている。この結果はC₂C₂がC₂C₂とC₂C₂のモザイクであることを否定している。等電点電気泳動による等電点の差異から考えると、C₂C₂はC₂C₂とC₂C₂のサブユニットを共有している可能

性が考えられる。この点については正常と異型接合体低カタラーゼ血症の肝又は赤血球カタラーゼの尿素によるサブユニットへの分離、更に透析による再結合で作製したハイブリッド分子の等電点を、低カタラーゼ血症異型接合体のカタラーゼの等電点と比較する実験が必要であり、今後検討の予定である。

又、すべてに共通のpI 5.0の細く僅かなカタラーゼ活性を示すバンドは、Feinsteinが、C₂C₂でカタラーゼ蛋白全体の約3%と報告している肝カタラーゼと一致する²⁴⁾。これは他の蛋白やポリペプチドと結合したものではないかと推定される。

等電点電気泳動によって肝上清液のカタラーゼ活性を示すバンドのpIレンジの幅が約1.4~1.6と幅広いことは、酵素量の多いことにもよるが、肝カタラーゼが酸化の程度で種々のSH基を有する分子が存在していることを示唆している。このことは燐酸カルシウムゲルによるクロマトグラフィーでマウス肝カタラーゼを分画したPrice¹⁸⁾らの報告や、DEAEセルロースによるクロマトグラフィーでラットの肝カタラーゼを分画した東ら¹⁹⁾の研究も参考となる。更に、変異マウスの肝カタラーゼをDEAE・カラムクロマトグラフィーで分画した結果、無カタラーゼ血症同型接合体C₂C₂の肝カタラーゼは正常C₂C₂と酵素活性やpIレンジに違いはあっても同様の多様性があり、共にフラクションA、B、Cの3種の分画を認めた。東ら²⁵⁾は、これらがアイソザイム、あるいはこの酵素蛋白の代謝過程における異った状態を示すものではないかと考え、カタラーゼの肝細胞内局存性について、ミトコンドリアに強く結合しているもの、ミトコンドリアから容易に遊離しやすいもの、可溶性の状態細胞内に存在すると考えられるものと區別している。著者のマウス肝上清液のDEAE・カラムクロマトグラフィーによる分画と、東らのラット肝の3分画を比較する必要があると考えられる。

C₂C₂とC₂C₂のフラクションAの等電点がほぼ等しい事は、双方には同じ分子構造のカタラーゼ蛋白が存在する可能性を示唆している。

結 論

正常(C₂C₂), 無カタラーゼ血症同型接合体(C₂C₂), 低カタラーゼ血症同型接合体(C₂C₂)及び無カタラーゼ血症異型接合体(C₂C₂)マウスの肝カタラーゼの等電点をアガロースゲル等電点電気泳動後, 活性染色により測定し次の結果を得た.

1) カタラーゼ酵素活性部のバンドの中心点で比較すると, 等電点はC₂C₂, C₂C₂, C₂C₂の順に高かった.

2) C₂C₂の等電点はC₂C₂とC₂C₂の間中点を示した. 又, C₂C₂の等電点よりもやや酸性側にあった.

3) C₂C₂とC₂C₂をDEAE・カラムクロマトグラフィーで溶出液の燐酸バッファの濃度を濃くすることにより分画した結果, フラクシオンA, B, Cの3種が認められた. それぞれ

の分画で比較すると, フラクシオンAではC₂C₂とC₂C₂の等電点に明らかな差は認められないが, フラクシオンB, Cでは共にC₂C₂の等電点がC₂C₂の等電点より高かった.

これらの成績から, 無及び低カタラーゼ血症同型接合体(C₂C₂とC₂C₂)の肝カタラーゼの等電点は, 正常マウス(C₂C₂)とは各々異っている. 又, 無カタラーゼ血症異型接合体マウス(C₂C₂)の肝カタラーゼの等電点はC₂C₂とC₂C₂の間中点を示し, それぞれ程度に差異はあるが, カタラーゼ分子の構造が異ると推定された.

稿を終えるに臨み, 御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った緒方正名教授に衷心より感謝を捧げます.

なお, 本論文の要旨は日本人類遺伝学会第27回大会で発表した.

文 献

- 1) Feinstein RN, Seaholm JE, Howard JB and Russell WL: Acatlasemic mice. Proc Natl Acad Sci Wash (1964) 52, 661—662.
- 2) Feinstein RN, Howard JB, Braun JT and Seaholm JE: Acatlasemic and hypocatlasemic mouse mutants. Genetics (1966) 53, 923—933.
- 3) Feinstein RN, Braun JT and Howard JB: Acatlasemic and hypocatlasemic mouse mutants. II. Mutational variations in blood and solid tissue catalases. Arch Biochem Biophys (1967) 120, 165—169.
- 4) Feinstein RN, Braun JT and Howard JB: Nature of the heterozygote blood catalase in a hypocatlasemic mouse mutants. Biochem Genet (1968) 1, 277—285.
- 5) Ogata M, Tomokuni K and Takahara S: Catalatic activity of immature and mature red blood cells in Japanese acatalasemia (difference between Japanese and Swiss acatalasemia) Acta Med Okayama (1969) 23, 421.
- 6) Ogata M, Inoue T, Tomokuni K and Takahara S: Catarase activity of immature and mature red cells from acatalasemic mouse mutant. Acta Haemat (1970) 44, 11—20.
- 7) Aebi H and Cantz M: Über die cellulare Verteilung der katalase im Blut homozygoter und heterozygoter Defekttträger (Akatalasia). Humangenetik (1966) 3, 50—63.
- 8) Tönz O and Rossi E: Morphological demonstration of two red cell populations in human females heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Nature (1964) 202, 606—607.
- 9) Yoshida A: Hereditary disorder of erythrocyte metabolism (ed. by Beutler, E.), Crune and Stratton, New York and London. (1967) 146—162.
- 10) 佐藤征紀: 無および低カタラーゼ血症マウスのカタラーゼ分子の性質に関する研究, 第1編, マウス肝カタラーゼ活性に対する変性剤の影響, 岡山医誌 (1985) 97, 927—936.

- 11) Thorup OA, Strole WB and Leavell BS : A method for the localization of catalase on starch gels. *J Lab Clin Med* (1961) **8**, 122—128.
- 12) Matsubara S, Suter H and Aebi H : Fractionation of erythrocyte catalase from normal, hypocatalatic and acatalatic humans. *Humangenetik* (1967) **4**, 29—41.
- 13) Mörikofr-Zwez S, Cantz M, Kaufman H, von Wartburg JP and Aebi H : Heterogeneity of erythrocyte catalase. Correlations between sulfhydryl group content, chromatographic and electrophoretic properties. *Eur J Biochem* (1969) **11**, 49—57.
- 14) Ogata M and Mizugaki J : Properties of catalase subfractions separated by chromatofocusing of acatalasemia hemolysates. *Acta Med Okayama* (1982) **36**, 73—76.
- 15) Awdeh ZL, Williamson AR and Askonas BA : Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature* (1968) **219**, 66—67.
- 16) Saravis CA and Zamchek N : Isoelectric focusing in agarose. *J Immunol Methods* (1979) **29**, 91—96.
- 17) Rošen A, Ek K and Åman P : Agarose isoelectric focusing of native human immunoglobulin M and α_2 -macroglobulin. *J Immunol Methods* (1979) **28**, 1—2.
- 18) Price VE and Greenfield RE : Liver Catalase, II. Catalase fractions from normal and tumor-bearing rats. *J Biol Chem* (1954) **209**, 363—376.
- 19) Higashi T and Peters TJr : Studies on rat liver catalase 1. Combined immunochemical and enzymatic determination of catalase in liver cell fractions. *J Biol Chem* (1963) **238**, 3945—3951.
- 20) Thorup OA, Carpenter J and Howard P : Human erythrocyte catalase : Demonstration of heterogeneity and relationship to erythrocyte aging in vivo. *Brit J Haematol* (1964) **10**, 542—550.
- 21) Feinstein RN, Howard JB and Savol R : Heat and urea stability of blood catalase of catalase-mutant mouse strains. *Experientia* (1971) **27**, 1152—1153.
- 22) 水垣順子 : 肝カタラーゼのSDSによる変性について, 岡山医誌 (1975) **87**, 543—548.
- 23) Aebi H, Wyss SR and Scherz B : Unstable mutants and molecular hybrids in enzyme deficiency conditions. *Acta Biol Med Germ* (1977) **36**, 735—741.
- 24) Feinstein RN and Peraino C : Separation of soluble and particulate mouse liver catalase by isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta* (1970) **214**, 230—232.
- 25) 東 惠彦, 柴田泰生, 平井秀松 : カタラーゼのアイソザイム. *生物物理化学* (1965) **11**, 37—43.

**Properties of the catalase molecule obtained
from acatalasemic and hypocatalasemic mice
Part II. Analysis of liver catalase of acatalasemic mice
by isoelectrofocusing.**

Yukinori SATO

Department of Public Health, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M.Ogata)

The properties of catalases in the liver homogenate of acatalasemic (C3H/C_s^bC_s^b), hypocatalasemic (C3H/C_s^cC_s^c), acatalasemic heterozygous (C3H/C_s^aC_s^b) and normal (C3H/C_s^aC_s^a) mice were analyzed directly by agarose isoelectric focusing.

Homogenates of mouse liver were prepared with isotonic sucrose solution and separated from the subcellular fractions by repeated centrifugation followed by ultra-centrifugation (105,000×g). Agarose isoelectric focusing was performed in a pH 3-to-10 Pharmalyte gradient gel at 8°C. Isoelectric range of catalase in liver supernatants was compared normal and mutant mice which were designated acatalasemia, hypocatalasemia and acatalasemic heterozygous.

Liver catalases of C_s^bC_s^b, C_s^cC_s^c, C_s^aC_s^b and C_s^aC_s^a were focused to a band at pI 5.9 - 7.6, pI 5.8 - 7.3, pI 5.6 - 7.0 and pI 5.4 - 7.0, respectively. The difference in the isoelectric points of catalases among C_s^bC_s^b, C_s^cC_s^c, C_s^aC_s^b and C_s^aC_s^b suggested the presence of some structural differences in the catalase molecule between normal and mutant mice.

The homogenates of liver from C_s^aC_s^a and C_s^bC_s^b were separated into four fractions (non-catalase fraction and A, B and C catalase fractions) by DEAE cellulose column chromatography with a discontinuous buffer system of 1mM, 3mM, 10mM and 100 mM phosphate buffer. The eluates were concentrated to 1.5 PU/ml by ultrafiltration, and pI values of the fractions were examined by isoelectric focusing. Acatalasemic fractions B and C focused at a more alkaline pI than normal fractions B and C.