

無カタラーゼ血症残余カタラーゼの ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法による研究

岡山大学医学部公衆衛生

緒方正名・水垣順子

香川大学保健管理センター

泉正樹・武田和久

(昭和57年6月21日受稿)

Key words: 無カタラーゼ血症,

ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動,

クロマトフォーカシング,

DEAE セルロース・クロマトグラフィー,

分子量

緒言

日本人の無カタラーゼ血症には0.09から4.0%の僅かのカタラーゼ活性が見出されており、残余カタラーゼによるものと考えられている¹⁾。この残余カタラーゼは、熱安定性、網状赤血球と成熟赤血球との間の分布、イオン交換クロマトグラフィー、二重免疫拡散および免疫電気泳動上の諸性質において、正常カタラーゼと区別することは困難である。たゞ、ショ糖密度勾配遠心法による両者の比較では²⁾、無カタラーゼ血症の残余カタラーゼの方が正常人のそれよりも分子量がやや小さい傾向にあるがほぼ等しい。厳密な比較を行うためにはより明瞭な分離が得られる方法を用いる必要がある。

Ogata 及び Mizugaki³⁾はクロマトフォーカシングにより部分精製したカタラーゼをSDSポリアクリルアミド・ゲル電気泳動によって分析し、正常人溶血液ではカタラーゼ活性が高い分画の主要蛋白のサブユニット分子量は60,000であったが、無カタラーゼ血症例の溶血液では同一のサブユニット分子量を有する淡い蛋白バンドのほかにサブユニット分子量30,000の濃染する蛋白バンドを認めた。この方法ではこれら蛋白バ

ンドのカタラーゼとしての同定が困難なため、今回は同様の材料につきポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動を行い、カタラーゼの活性と蛋白を同時に染色し、未変性カタラーゼの分子量を求め対比検討した。

材料及び方法

健常対照例および正常例に比し0.2%の残余カタラーゼ活性を有する無カタラーゼ血症例(GIO)⁴⁾から既報の方法²⁾によって採血、処理して溶血液を得、この一部について直接クロマトフォーカシングを行い、他の一部についてはDEAEセルロース・バッチ法⁵⁾を用いてカタラーゼを部分精製し、透析、濃縮後クロマトフォーカシングを行った。クロマトフォーカシングの条件は、開始バッファーのpHが7.2、溶出液のpHが4.5のほかは既報のそれ²⁾と同様であった。溶出液は蛋白濃度およびカタラーゼ活性を測定後数分画づきを集め、一部の分画についてはさらにMatrex PBA (Amicon社)を用いてヘモグロビンを除き、Minicon B 15 (Amicon社)にて濃縮、各10 μ lを用いてPAA 4/30 (Pharmacia社)を支持体としたポリアクリル

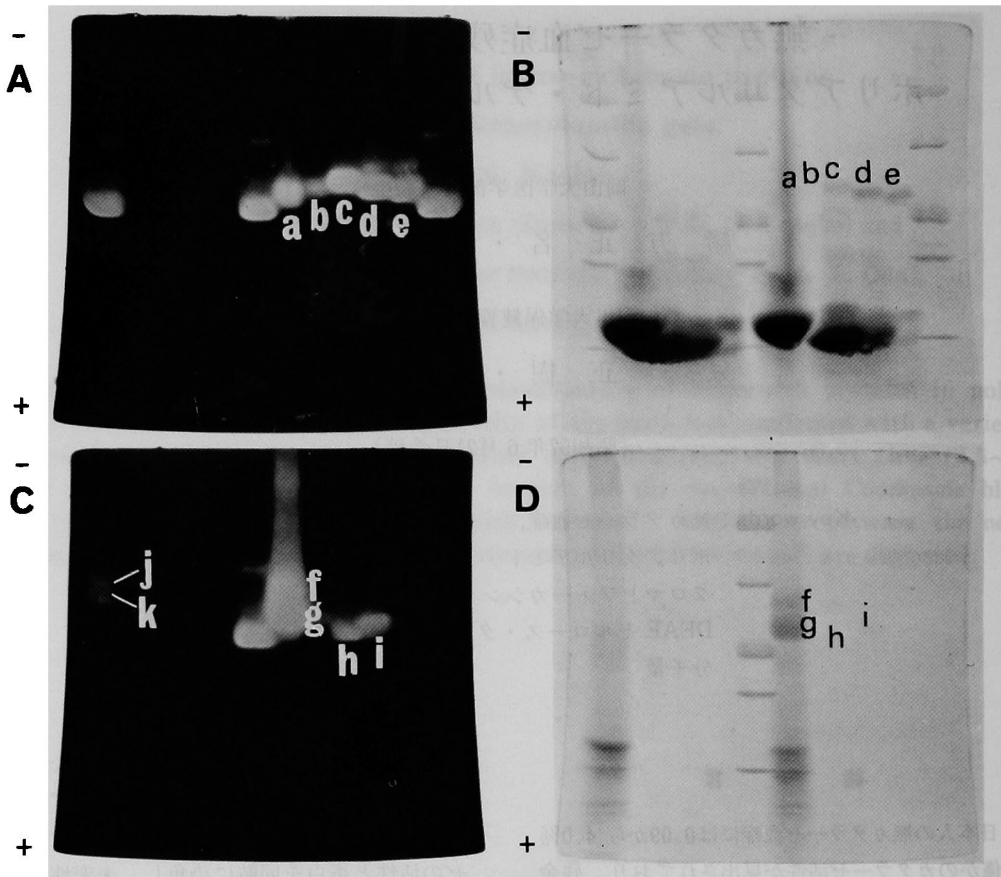


図1 無カタラーゼ血症および正常例の溶血液各分画のポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動像。A, Cはカタラーゼの活性染色, B, Dは蛋白染色。A, Bは溶血液を直接クロマトフォーカシングにより分画したもの: 左より, 分子量マーカー, 無カタラーゼ血症溶血液(5 μ l), 同分画30-34($\times 90$), 同分画35-40($\times 108$), 同分画41-52($\times 216$), 分子量マーカー, 正常人溶血液(5 μ l), 同分画30-34($\times 100$, Matrex 処理後 $\times 25$), 同分画30-34($\times 100$), 同分画35-40($\times 100$), 同分画41-50($\times 200$), 分子量マーカー。C, Dは溶血液をDEAEセルロースにて部分精製した後クロマトフォーカシングにより分画したもの: 左より, 無カタラーゼ血症溶血液のDEAEセルロースによる部分精製標品($\times 30$), 同分画16-20($\times 6 \times 76$), 同分画21-31($\times 6 \times 190$), 同分画33-41($\times 6 \times 152$), 同分画43-50($\times 6 \times 114$), 分子量マーカー, 正常人溶血液のDEAEセルロースによる部分精製標品($\times 34$), 同分画16-20($\times 1.7 \times 160$), 同分画26-34($\times 1.7 \times 320$), 同分画35-40($\times 1.7 \times 200$), 同分画41-46($\times 1.7 \times 200$)。 ()内は各過程における濃縮倍率, 分子量マーカーの各バンドは-から+方向に図2の分子量が大きい方から小さい方向の各●に対応, aからiまでの各バンドはカタラーゼ活性とそれに対応する蛋白バンド, j, kに示す無カタラーゼ血症では残余カタラーゼ活性のみ明らかなバンドを示し, 対応する蛋白バンドは不明。

アミド・グラジエント・ゲル電気泳動を行った⁶⁾ (前通電, 125V 20分間; 前泳動, 70V 45分間; 泳動, 125V 15時間)。泳動後蛋白はクマシー・ブリリアント・ブルー-R 250 にて染色し, カタラーゼ活性は, ゲルを1%過酸化水素溶液と室温で45分間反応させた後, 0.1N過マンガン酸カリ溶液に15分間浸して検出した⁷⁾。分子量マーカー

には高分子(HMW) 検量キット(Pharmacia 社)を用いた。

結 果

正常人溶血液のクロマトフォーカシングにおいて, 18から28までの分画にヘモグロビンが溶出され, その分画にカタラーゼ活性も僅かに存

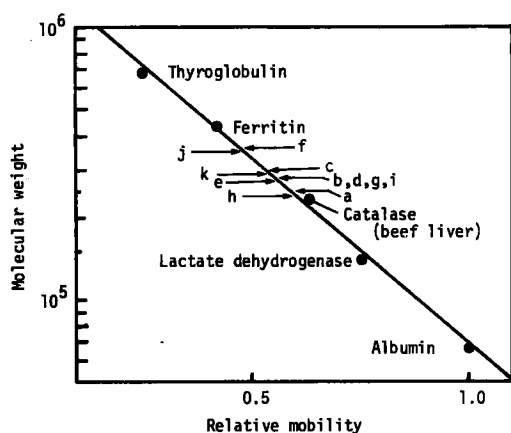


図2 ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動により得られた検量線による各分画カタラーゼ分子量の推定。●, 分子量マーカー。aからkは図1の対応するカタラーゼの蛋白ないし活性バンドの分子量を示す。

在したが、カタラーゼ活性の主なピークは30から50までの分画に見られた。無カタラーゼ血症例の溶血液のクロマトフォーカシングにおいて、ヘモグロビンのピークは16から29までの分画に見られ、正常人溶血液のヘモグロビンとほぼ同一のpH 勾配部位に溶出され、それらの分画にカタラーゼ活性も認められた。しかし、それ以後のpHの低い分画(30から52)には、ヘモグロビンのピークに見られたカタラーゼの活性と同等かや、低い活性しか認められなかった。DEAEイオン交換体を用いてカタラーゼを部分精製した後のクロマトフォーカシングにおいては、正常人溶血液のカタラーゼ活性は16から46までの分画に大きな一つピークとして溶出され、無カタラーゼ血症例のそれは16から49までの分画まで、数峰の活性ピークとして認められた。

これらの各分画をいくつかに分けて集め、濃縮後ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動を行った結果を図1に示した。溶血液を直接クロマトフォーカシングして得られた分画のザイムグラム(A)では、正常例の溶血液とその各分画、分子量の検量用マーカーとして用いた牛カタラーゼおよび馬フェリチンの部位にカタラーゼ活性帯がそれぞれ1本づつ、見られたが、無カタラーゼ血症例の溶血液とその各分画にはカタラーゼの活性帯は全く見られなかった。

これに対応する蛋白染色においても(B),正常例にのみ認められ無カタラーゼ血症例に認められない蛋白バンドがあり、ザイムグラム上での活性バンドと完全に一致したので、これらの蛋白バンドはカタラーゼ蛋白に一致するものと考えられた。

DEAEセルロースにて部分精製後電気泳動を行った場合には(C),正常例で2本の強いカタラーゼ活性帯が見られ、無カタラーゼ血症例の同様の標品にも淡い2本の活性帯が認められた。さらに、これらの標品をクロマトフォーカシングによって分画したものを電気泳動した場合には、正常例の一部の分画に僅かの活性が認められたのみであった。正常例ザイムグラムのカタラーゼの各活性帯は蛋白染色(D)においてもすべて認められたが(h, iはDの写真では極く淡いバンドとして存在する),無カタラーゼ血症例のカタラーゼ活性帯に対応する蛋白バンドは明らかでなかった。これらの成績は、クロマトフォーカシングで得られた分画に活性が認められながら電気泳動後の染色で一部の分画に活性が認められなかったことは、濃縮および泳動過程での失活に加え、酵素蛋白量も少なかったことを示している。

分子量マーカー蛋白を用いた検量線から求めた各バンドの分子量を図2に示した。正常人溶血液カタラーゼ(a)の分子量は 25×10^4 で、サブユニット分子量 6×10^4 ⁴³⁾の4量体に近い値であった。クロマトフォーカシング後の分画の分子量は、(b)が 28×10^4 、(c)が 30×10^4 とアルカリ側で溶出される分子種で増大したが、(d)は 28×10^4 、(e)は 27×10^4 と酸性側で溶出される分子種では再び減少傾向を示した。DEAEセルロースによる部分精製で、正常人溶血液カタラーゼの分子量はや、増加し、(f)が 36×10^4 、(g)が 28×10^4 であった。この標品のクロマトフォーカシングでは、アルカリ側で溶出された分画に分子量の小さい(h) (24×10^4)と(i) (28×10^4)が認められたのみであった。無カタラーゼ血症例の溶血液の部分精製標品に見られた2分子種の分子量は(j)が 35×10^4 、(k)が 29×10^4 で、正常人のそれぞれの分子種の分子量と区別出来なかった。

考 察

日本人の定型的無カタラーゼ血症の赤血球残余カタラーゼ活性は正常人赤血球カタラーゼ活性の1/500と低いため、その蛋白質としての特性を明らかにし、遺伝学上の問題点を解明することは極めて困難である。しかし、緒言で述べたごとく、熱安定性、イオン交換クロマトグラフィーによる分離態度、電気泳動あるいは免疫学的諸性質について種々検討がなされ、無カタラーゼ血症の残余カタラーゼは正常人のカタラーゼと区別出来ないことが現在までに明らかにされている。

蛋白質の微細な構造の差を証明するには電気泳動法が分離能において優れているが、微量の標品しか分析出来ない点に問題がある。われわれは今回の研究において、無カタラーゼ血症例の赤血球カタラーゼを部分精製すると同時に濃縮することによりこの問題点を解決し、ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル上に2本の活性バンドを検出することが出来、それらの分子量が正常人赤血球のカタラーゼ分子量にほぼ一致することを示した。たゞ、未処理の正常人溶血液のカタラーゼは電気泳動上単一のバンドを示したので、この点に関してはさらに検討が必要である。

正常人溶血液カタラーゼのクロマトフォーカシングにおいて、アルカリ側で溶出されるカタラーゼ分子種が高分化していることが明らかとなったが、この変化は、溶血液カタラーゼをDEAEセルロースにてあらかじめ部分精製してクロマトフォーカシングすることによって同一部位の分子種が低

分子化するという逆の結果が得られたので、その意義付けは慎重でなければならない。

なお本研究において、溶血液カタラーゼの活性と蛋白の電気泳動上のバンドを対比検討することにより、カタラーゼのバンドを蛋白染色により同定することが可能になったので、今後は蛋白の高感度染色を行うことにより、残余カタラーゼの蛋白質としての微細な性質の差を究明することも可能と考えられる。

結 語

1. 無カタラーゼ血症例および正常人の溶血液中のカタラーゼをDEAEセルロースを用いて部分精製し、ポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動を行うことにより2本のカタラーゼ活性帯を認め、その分子量は無カタラーゼ血症例で 29×10^4 および 35×10^4 、正常例で 28×10^4 および 36×10^4 と両者の間に明らかな差を見出せなかったが、正常例の未処理溶血液カタラーゼの分子量 25×10^4 よりは前者はや、大であり後者はさらに大であった。
2. 正常例溶血液カタラーゼのクロマトフォーカシングにより、アルカリ側で溶出されるカタラーゼ分子種の分子量は 30×10^4 まで増加したが、DEAEセルロースにより部分精製した標品では 24×10^4 まで分子量が低下した。
3. クロマトフォーカシングによって得られた分画をポリアクリルアミド・グラジエント・ゲル電気泳動でさらに分画することにより、正常人カタラーゼを蛋白バンドとして同定することが出来る可能性とその有用性を示した。

文 献

1. 緒方正名：無カタラーゼ血症の遺伝生化学的研究の進め方。医化学実験法講座，第5巻B，遺伝生化学II，中山書店，東京，pp. 301—320，1974。
2. Ogata, M., Tomokuni, K., Watanabe, S., Osaki, H., Sadamoto, M. and Takahara, S.: Residual catalase in the blood of Japanese acatalasemia. *Tohoku J. Exp. Med.* 107, 105—114, 1972.
3. Ogata, M. and Mizugaki, J.: Properties of catalase subfractions separated by chromatofocusing of acatalasemia hemolysates. *Acta Med. Okayama* 36, 73—76, 1982.
4. Ogata, M. and Mizugaki, J.: Properties of residual catalase in the erythrocytes of Japanese-type acatalasemia. *Hum. Genet.* 48, 329—338, 1979.

5. Aebi, H., Wyss, S.R., Scherz, B. and Gross, J.: Properties of erythrocyte catalase from homozygotes and heterozygotes for Swiss-type acatalasemia. *Biochem. Genet.* 14, 791—807, 1976.
6. 泉 正樹, 武田和久, 渡辺 誠, 長島秀夫: 肝癌関連 γ -GTPアイソザイムのリボ蛋白との非共存性. 肝臓 21, 500, 1980.
7. 緒方正名, 高原滋夫: 低および無 Catalase血液症における血液 Catalaseの異型性(Heterogeneity). 医学と生物学 73, 292—298, 1966.

**Polyacrylamide Gel Electrophoretic Studies of Residual
Catalase in Acatlasemia**

Masana OGATA and Junko MIZUGAKI

**Department of Public Health, Okayama University Medical School
Okayama, Japan**

Masaki IZUMI and Kazuhisa TAKETA

Health Research Center, Kagawa University, Takamatsu, Japan

Erythrocyte catalase of a Japanese-type acatalasemia case and a normal control subject was separated by chromatofocusing with or without prior partial purification with DEAE cellulose and analyzed by polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

Two bands of catalase activity were found in the partially purified preparations with molecular weights of 29×10^4 and 35×10^4 in the acatalasemia case and of 28×10^4 and 36×10^4 in the normal control. The molecular weight of normal catalase in untreated hemolysate was 25×10^4 .

With normal catalase, chromatofocusing fractionation caused a shift toward higher molecular species in the alkaline range eluates from the untreated hemolysate and an opposite shift toward lower molecular weight species in the same pH range eluates from the partially purified preparation.

Normal catalase could be identified as protein bands on polyacrylamide gradient gel with hemolysate fractionated by chromatofocusing. Possible application of this technigne in the study of acatalasemia protein with a sensitive protein stain was suggested.