

肝カタラーゼの SDS による変性について

岡山大学医学部公衆衛生学教室

(指導：公衆衛生学教室，緒方正名教授，耳鼻咽喉科学教室，高原滋夫名誉教授)

水 垣 順 子

(昭和50年4月9日受稿)

1. 緒 言

肝カタラーゼ分子は蛋白質分解酵素¹⁾ 酸やアルカリ²⁾、ホルムアミド、グアニジン、尿素等の蛋白質変性剤³⁾、凍結融解⁴⁾ によって分子量 $1/6 \sim 2/3$ のサブユニットに解離することおよびその際パーオキシダーゼ様活性が出現する場合があることが知られている。最近阿南らはカタラーゼ分子のサクシニル化⁵⁾、エトキシホルミール化⁶⁾ によってカタラーゼ分子がサブユニットに解離することを示した。また鮫島ら⁷⁾ はカタラーゼ分子のサクシニル化やアセチル化を行い、これにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) や尿素を作用させて、その挙動からサブユニットの構造の推定を行っている。一方 Feinstein ら⁸⁾ も牛肝カタラーゼの尿素やアルカリ処理によってカタラーゼ活性が消失し、パーオキシダーゼ様活性が出現することを報告している。ついで彼らは正常マウスおよびアカタラセミアマウスの肝ホモジネートにおいても尿素やアルカリ処理によって上記の現象が認められるが、アカタラセミアのカタラーゼ分子の方が変性を受け易いことを示唆している。

本研究では結晶牛肝カタラーゼに陰イオン系界面活性剤の一種であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および 3, 5-ジヨードサリチル酸のリチウム塩 (LIS) を添加し、カタラーゼ活性とパーオキシダーゼ様活性の変化、カタラーゼ分子のサブユニットへの解離について調べた。またマウス肝カタラーゼ粗酵素液に SDS を添加し、正常マウスとアカタラセミアマウスの肝カタラーゼ分子の構造の比較検討を行った。

2. 実験材料および方法

1. 結晶牛肝カタラーゼの調製

市販 (Sigma 社) の結晶牛肝カタラーゼ 20~23 mg/ml, 30,000~35,000 unit/ml を希釈して用いた。

2. マウス肝カタラーゼ粗酵素液の調製

約 2 ヶ月令の正常およびアカタラセミアマウス各々 3 個体の肝臓を摘出し、純水中で充分脱血し、1/30 M リン酸緩衝液でよく洗う。1% トリトン X-100 を含む 1/30 M リン酸緩衝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、20,000 rpm で 30 分間遠心した。上清を 1/30 M リン酸緩衝液で約 5% (wet weight/ml) の濃度に希釈し、SDS 処理に用いた。

3. SDS および LIS 処理

SDS : 終濃度 0.025 M ~ 0.15 M の 2 倍濃度の溶液 (対照は純水) を用意し、各々の SDS 溶液に等量のカタラーゼ溶液を加えて混和し、室温で 30 分間反応させた。反応終了後、直ちにカタラーゼおよびパーオキシダーゼ様活性の測定を行った。

LIS : 濃度および反応条件は SDS の場合と同様である。

4. カタラーゼ活性の測定

過珪素酸を基質とする Feinstein の方法¹⁰⁾ に準じたが、反応終了時に硫酸の他に三塩化酢酸を加えた。

5. パーオキシダーゼ様活性の測定

ピロガロール-1,3-ジメチルエーテルを基質とする Feinstein らの方法¹¹⁾ に従って測定した。

試薬

- 15 mg/ml のピロガロール-1,3-ジメチルエーテル水溶液
- 0.05% の過酸化水素水
- 10% のスルホサリチル酸
- 5 mg/ml の EDTA-2 Na (pH 6.0)
- Universal buffer¹²⁾ (pH 6.0)

方法

試験管に a . b . d . e の溶液を 1 ml ずつ取り、よく混和し、あらかじめ 37℃ の恒温槽で暖めておく。対照には b の H₂O の代りに純水を加える。この試験管に酵素液 1 ml を加え、全体を充分振盪した後、

37°Cの恒温槽に入れ、正確に10分間孵置する。10分後にCの溶液を加えて反応を停止させる。反応後の液が混濁している時は濾過または遠心により沈殿を除き、上清の吸光度を480 nmで測定する。

6. 沈降定数の測定

結晶牛肝カタラーゼ0.6~1.2%溶液に0.1M SDS溶液を等量加えて、室温で30分間反応させた。その後分析用超遠心機(日立UCA-2型)で設定回転数55,430 rpmで沈降速度の測定を行い、沈降定数を算出した。

3. 実験結果

1. 結晶牛肝カタラーゼに SDS および LIS を作用させた場合

Fig. 1 に示すように、カタラーゼ活性は SDS の

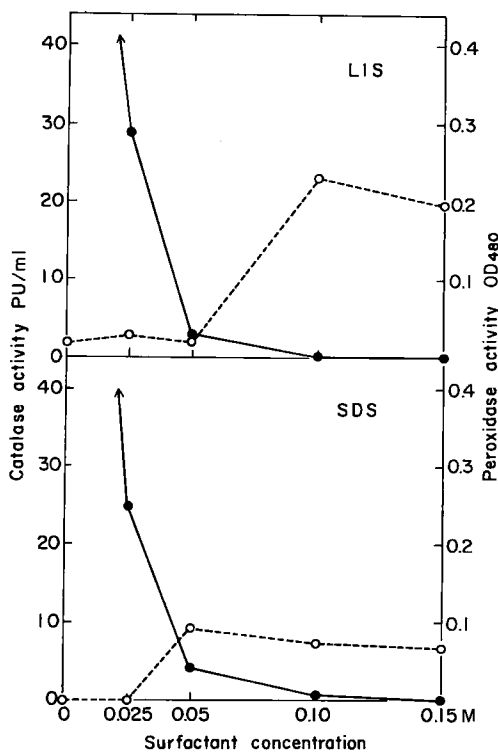


Fig. 1 Denaturation of crystalline beef liver catalase by the surfactant treatment. (catalase activity, 273 PU/ml; catalase protein, 1.53 mg/ml) ●—● catalase activity, ○—○ peroxidatic activity

添加によって減少し、SDSの濃度が増すにつれて次第に減少し、やがて消失した。一方未変性のカタラーゼにはほとんど認められなかったパーオキシダーゼ様活性は0.05 M SDSによって出現し、SDSの濃度の増加につれてやや減少した。また LIS でもカタ

ラーゼ活性の減少、消失が起り、SDSと同様の挙動を示した。パーオキシダーゼ様活性は0.1M LISで出現し、濃度の増加につれてやや減少したが、SDSの場合より強い活性を示した。

2. SDS 処理した結晶牛肝カタラーゼの沈降定数の測定

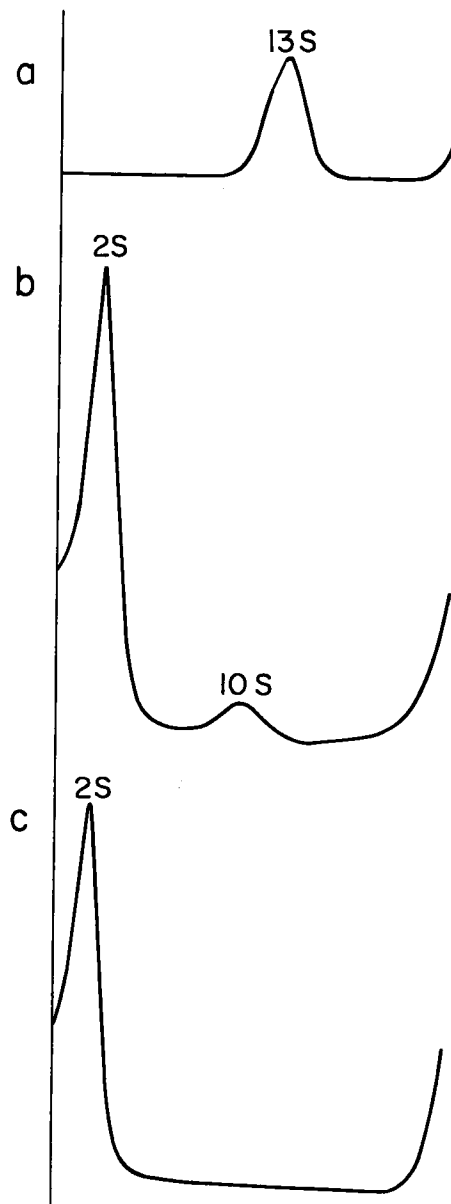


Fig. 2 Ultracentrifugal analysis of the denatured crystalline beef liver catalase with 0.05 M SDS. a, native catalase (0.4%); b, SDS treated catalase (0.6%); c, SDS treated catalase (0.3%)

a. 未変性カタラーゼ (0.4%) は沈降定数約13 Sの単一ピークを示した。

b. カタラーゼ活性とパーオキシダーゼ様活性の両方が存在する条件すなわち0.05 M SDS を添加した場合、0.6%のカタラーゼ溶液で、沈降定数約10 Sの早いピークの他に遅いピークが出現した。

c. bの遅いピークを同定するために0.3%のカタラーゼ溶液に0.05 Mの SDS を加えると、沈降定数約2 Sの単一ピークが得られた。これらの超遠心沈降図は Fig. 2 に示す如くであるが、カタラーゼ分子が SDS によって二つのサブユニットに解離したことを示唆している。

3. マウス肝カタラーゼ粗酵素液の SDS 処理

カタラーゼ活性936 PU/ml, 蛋白質濃度2.4mg/mlの正常マウスの肝カタラーゼ粗酵素液および254 PU/ml, 2.0mg/mlのアカタラセミアマウスの肝カタラーゼ粗酵素液に0.025~0.15 Mの SDS を作用させた場合のカタラーゼ活性の減少とパーオキシダーゼ様活性の出現について示したのが Fig. 3 である。本図から明かな様に、カタラーゼ活性の減少曲線は正常カタラーゼとアカタラセミアカタラーゼとの間に

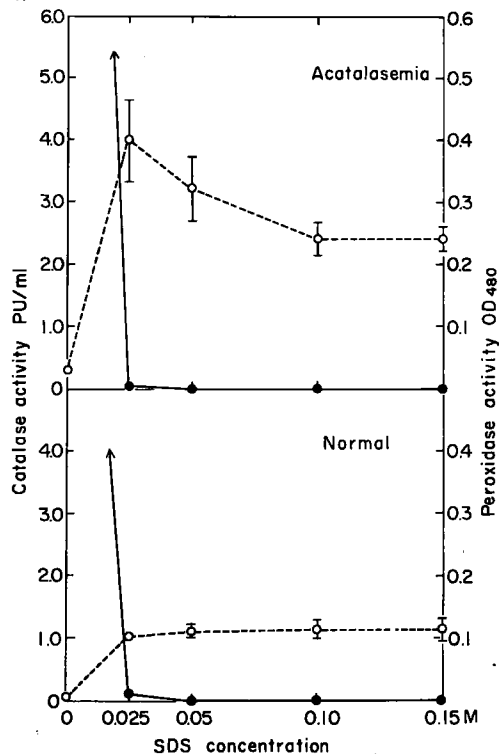


Fig. 3 Denaturation of liver extracts from normal and acatalasemia mice by SDS treatment. ●—● catalase activity, ○—○ peroxidatic activity

ほとんど差が認められなかった。しかし、パーオキシダーゼ様活性はいずれの場合も0.025 M SDS で出現したが、活性値はアカタラセミアの方が正常よりも高く出現した。またパーオキシダーゼ様活性は正常では SDS 濃度の増加には関係なくほぼ一定の値を示したが、アカタラセミアでは濃度が増すにつれてやや減少した。これらの事実から正常マウスの肝カタラーゼ分子とアカタラセミアマウスのそれとの間に構造上の差異があることが推定された。

4. 考 按

結晶牛肝カタラーゼに陰イオン系の界面活性剤である SDS と LIS を作用させた場合には Feinstein ら¹¹⁾による尿素処理の場合と同様にカタラーゼ活性の減少とパーオキシダーゼ様活性の出現が認められた。0.05 Mの SDS を加えた場合カタラーゼ活性とパーオキシダーゼ様活性の両者が存在するので、超遠心分析によって両成分の分離を試みた。その結果沈降定数約10 S と 2 S の 2 成分に解離していることが示唆された。この事は武田ら¹²⁾が1% SDS を加えて、約9 S と 2 S の 2 成分に解離すると報告した成績とほぼ一致する。

マウスの肝カタラーゼ粗酵素液に SDS を加えた場合、Feinstein ら¹¹⁾による尿素を加えた実験と同様カタラーゼ活性が減少し、パーオキシダーゼ様活性が出現した。アカタラセミアマウスの肝カタラーゼ粗酵素液と正常のそれにおいて、カタラーゼ活性の減少曲線は類似していたが、パーオキシダーゼ様活性は前者がより強く出現した。この事実はアカタラセミアマウスの肝カタラーゼ分子が構造上の変異を有し、SDS によってパーオキシダーゼ様活性の出現し易い型に変化していると考えられる。そのために正常のカタラーゼ分子とは構造上の差異があると考えられる。

5. 結 論

肝カタラーゼに陰イオン系界面活性剤の一種であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) または3, 5-ジヨードサリチル酸-リチウム塩 (LIS) を添加し、カタラーゼ活性およびパーオキシダーゼ様活性を測定し、次の結果を得た。

1) 結晶牛肝カタラーゼに SDS または LIS を添加すると、カタラーゼ活性は減少し、やがて消失した。これに伴ってパーオキシダーゼ様活性の出現を認めた。

2) 超遠心分析によって SDS 処理した結晶牛肝カタラーゼは沈降定数約10Sと2Sのサブユニットに解離することを認めた。

3) 正常およびアカタラセミアマウスの肝カタラーゼ粗酵素液に SDS を添加すると、カタラーゼ活性が減少し次いで消失したが、その過程は両者ともに酷似していた。一方、パーオキシダーゼ様活性は両者とも出現したが、正常よりアカタラセミアの方が高く出現した。即ち、アカタラセミアマウスの肝カタラーゼ分子は正常肝カタラーゼ分子より SDS

によってパーオキシダーゼ様活性の出現しやすい構造に変化しており、正常のカタラーゼ分子とは構造上の差異があると思われる。

稿を終わるに臨み懇切丁寧な御指導をいただきました緒方正名教授ならびに高原滋夫名誉教授に深甚なる謝意を捧げます。なお技術的援助をいただきました耳鼻咽喉科学教室の黒田泰生先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Anan, F.K. The proteinase inactivation of catalase and some properties of the digests. *J. Biochem.*, **45**, 211, 1958.
- 2) Samejima, T. Splitting of catalase molecule by alkali treatment. *J. Biol. Chem.*, **46**, 155, 1959.
- 3) Inada, Y., Kurozumi, T. and Shibata, K. Peroxidase activity of hemoproteins. 1. Generation of activity by acid or alkali denaturation of methemoglobin and catalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 30, 1961.
- 4) Samejima, T., Kamata, M. and Shibata, K. Dissociation of bovine liver catalase at low pH. *J. Biochem.*, **51**, 181, 1962.
- 5) Osbahr, A.J. and Eichhorn, G.L. A study by rotatory dispersion of the denaturation of catalase and peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1820, 1962.
- 6) Tanford, C. and Lovrien, R. Dissociation of catalase into subunits. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1892, 1962.
- 7) Samejima, T and Shibata, K. Denaturation of catalase by formamide and urea related to the subunit make-up of the molecule. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 407, 1961.
- 8) Kurozumi, T., Inada, Y. and Shibata, K. Peroxidase activity of hemoproteins. 111. Activation of methemoglobin and catalase by formamide and guanidine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 464, 1961.
- 9) Anan, F.K., Hiraga, M., Numata, N. and Aebi, K. 7th International Congress of Biochemistry, Abstract, F-50, Pp, 761, Tokyo, 1967.
- 10) 阿部喜代司, 平賀正純, 阿南功一, Catalase に於ける Histidine 残基の状態とその役割について, *生化学*, **45**, 717, 1973.
- 11) 古田裕明, 太田ゆみ子, 鮫島達也, アセチル化によるカタラーゼ分子の解離, *生化学*, **44**, 679, 1972.
- 12) 武田 篤, 八森 章, 佐藤克己, 鮫島達也, アセチル化カタラーゼ分子の SDS による解離, *生化学*, **45**, 716, 1973.
- 13) 鮫島達也, 武田 篤, 服部公俊, 秋山洋子, 八森 章, 牛肝カタラーゼのサブユニットについて, *生化学*, **46**, 405, 1974.
- 14) Feinstein, R.N., Savol, R. and Howard, J.B. Conversion of catalatic to peroxidatic activity in livers of normal and acatalasemic mice. *Enzymol.*, **41**, 345, 1971.
- 15) Feinstein, R.N. Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.*, **180**, 1197, 1949.
- 16) Tohnson, W.C. and Lindsey, A.J. An improved universal buffer. *Analyst*, **64**, 490, 1939.

Denaturation of Catalase in Livers by SDS Treatment

by

Junko Mizugaki

From the Department of Public Health

Okayama University Medical School

(Director : Prof. Masana Ogata, Dept. Public Health, and Honorary Prof.

Shigeo Takahara, Dept. Otorhinolaryngology)

When the crystalline beef liver catalase was treated with SDS (sodium n-dodecyl sulfate) or LIS (3, 5-diiodosalicylic acid lithium salt) which is a kind of the anionic surfactant, its catalase activity dwindled and disappeared at last, and its peroxidatic activity was exhibited.

It was found by the ultracentrifugal analysis that the molecule of beef liver catalase treated with SDS splited into two subunits with sedimentation constants of about 10 S and 2 S.

The same phenomena as mentioned above were compared in the crude catalase extracts of livers from normal mice and acatalasemia mice. In the crude catalase extracts from both mice, catalase activities dwindled and disappeared in the same way and peroxidatic activities appeared if treated with SDS. But peroxidatic activity of acatalasemia liver extract was higher than that of normal liver extract. It seems that the liver catalase in acatalasemia mouse is more labile by SDS treatment than that in normal mouse, resulting in showing the conformational changes of catalase molecule in acatalasemia mouse liver.