

アカタラセミアマウスの非貧血および 貧血時における赤血球カタラーゼの酸および アルカリに対する安定性

岡山大学医学部公衆衛生学教室（主任：緒方正名教授）

藤 村 順 一

（昭和63年11月29日受稿）

Key words：アカタラセミアマウス，貧血カタラーゼ，酸，アルカリ，安定性

緒 言

先天性代謝異常である無カタラーゼ血液症（acatalasemia）は1947年に高原¹⁾²⁾によって発見された疾患である。本症は血液中にカタラーゼ酵素活性がほとんど認められない疾患で、本症の発見となった特異な進行性壊疽性口腔疾患については臨床的に高原氏病³⁾⁴⁾という名称が用いられている。

高原はヒトのアカタラセミアの血液中に正常人の1/500程度のカタラーゼ活性が検圧法によって測定されたことを報告²⁾している。しかし、このカタラーゼ活性が残余カタラーゼの活性によるものか、ヘモグロビンに由来するメトヘモグロビンのカタラーゼ様活性から明らかでなかった。また、Aebiは1961年にスイス人2家族11人のアカタラセミアを発見した⁵⁾。そしてアカタラセミアの血液中にカタラーゼ活性の存在を認め残余カタラーゼとして報告⁶⁾している。また、Aebiは、スイス人アカタラセミアの残余カタラーゼが熱に対して不安定であり、且つ網状赤血球における残余カタラーゼの活性度が成熟赤血球の活性度にくらべて極めて高いことを報告した。そして、スイス人アカタラセミアでは、残余カタラーゼ分子の構造が不安定なために、生体内において赤血球の成熟過程とともに活性度を失うものとして、カタラーゼの構造遺伝子に変化のあることを推定⁷⁾している。また、緒方らは日本人アカタラセミアの血液を Sephadex G

-100ゲル濾過法によってヘモグロビンを殆ど含まない分画に精製した。そして分画中に正常血液のカタラーゼ活性の約1/1000の残余カタラーゼ活性の存在を認めた⁸⁾。

次いで残余カタラーゼ活性の分布を網状赤血球と成熟赤血球について比較した成績では、二種の赤血球の間における活性の差異は認められなかった⁹⁾¹⁰⁾。また、日本人アカタラセミアの血液中の残余カタラーゼ活性は、スイス人のそれと比べて熱に安定で、正常カタラーゼに近かった。それゆえ日本人アカタラセミアとスイス人アカタラセミアとは、遺伝子上の変異の部位が異なるものと推定される。

一方マウスのアカタラセミアについては、Feinsteinが1963年にマウスに放射線を照射することによって変異種であるアカタラセミア同型接合体マウスを見い出している¹¹⁾。次いで彼等はアカタラセミア同型接合体マウスと正常マウスのかけあわせによって得られたアカタラセミア異型接合体の血液カタラーゼの活性度が、その両親である正常マウスとアカタラセミア同型接合体マウスの約50%であることを見い出している¹²⁾。同時に異型接合体マウスの血液カタラーゼの尿素および熱に対する安定性を調べ、カタラーゼの性質が両親の中間を示すことを報告している¹²⁾。

また、緒方らはアカタラセミアマウス血中の残余カタラーゼの熱に対する耐性は正常マウス血中カタラーゼのそれより低く、且つアカタラセミアマウスに貧血をおこさせることにより、

網状赤血球を多量に含有する血液を得た。そして、その中のカタラーゼ活性度を測定し、その値が正常値に比べて、きわめて高いことを明らかにした¹³⁾。即ち、アカタラセミアマウス血中の残余カタラーゼ分子は、スイス人の残余カタラーゼ分子の例と類似して、残余カタラーゼ蛋白質はその構造に変化があり、赤血球の成熟とともに活性が失われるために血中のカタラーゼ活性が低くなるものと考えた。

本報では、マウスの血液中残余カタラーゼの性質を調べるために、正常マウス (C_3H/C_3H^a)、アカタラセミア同型接合体マウス (C_3H/C_3H^b) および異型接合体ヒポカタラセミアマウス (C_3H/C_3H^c) の非貧血マウス赤血球 (成熟赤血球を多く含む) と貧血マウス赤血球 (網状赤血球を多く含む) カタラーゼについて溶血液を用いて、酸およびアルカリ性に対する安定性を比較検討し、さらに DEAE Sephacel カラムによるカラムクロマトグラフ法を用いて精製された非貧血マウス赤血球および貧血マウス赤血球カタラーゼの粗酵素液を用いて、残余カタラーゼの酸およびアルカリに対する安定性を比較検討し、その成績をここに報告する。

実験材料および方法

1. 材 料

本実験に用いた雌のマウスの strain は正常 (野性型) の同型接合体である $C_3H/AnlC_3H^a$ 、アカタラセミアの同型接合体である $C_3H/AnlC_3H^b$ 、異型接合体ヒポカタラセミアである $C_3H/AnlC_3H^c$ であった。実験には各々の strain について、生後 1~3 ヶ月齢の雌マウスを数個体用いた。マウスの血液はヘパリン添加の毛細管で、眼窩静脈叢より採血した。

2. 溶血液及びカタラーゼ粗酵素液の調整

①溶血液の調整；採血されたマウス成熟赤血球を生理的食塩水で3回洗浄した後、採血時の血液量の5倍になるように蒸留水を加えて溶血し、これを非貧血マウス赤血球 (成熟赤血球を多く含む) 溶血液とした。

また貧血マウス赤血球 (網状赤血球を多く含む) 溶血液は、1日1回0.2mlのしゃ血を5日間継続した後、最後のしゃ血の翌日に採血を行っ

た後、非貧血マウス赤血球溶血液と同様の方法で調整を行い、これを貧血マウス赤血球溶血液とした。

②カタラーゼ粗酵素液の調整¹⁴⁾；採血されたマウス成熟赤血球を生理的食塩水で3回洗浄した後、採血時の血液量の1.5倍になるように蒸留水を加え溶血した。次に、カラム中に DEAE Sephacel (Pharmacia Fine Chemicals 製) を充填し、赤血球溶血液をカラム上部より流入し、Sephacel に吸着させた。その後、1.5mM, Na, K, Phosphate, Buffer (pH6.8) を流してヘモグロビンを除去した。次で50mM, Na, K, Phosphate Buffer (pH6.8) を流入して、カタラーゼを含む溶出液を得た。この溶出液を、コロジョンバッグ (Dassel W. Germany 製, カットオフ分子量12,000) で濃縮し、蛋白濃度を0.20 mg/ml に調整した。この液を非貧血マウス赤血球のカタラーゼ粗酵素液として用いた。

また、カラムクロマトグラフ法を用いた貧血マウス赤血球 (網状赤血球を多く含む) カタラーゼ粗酵素液としては1日1回0.2mlのしゃ血を5日間行った後、最後のしゃ血の翌日に採血を行った。次いで、赤血球を生理的食塩水を用いて洗浄し、元の血液量の1.5倍になるように蒸留水を加え溶血し、赤血球溶血液とした。次にカラム中に DEAE Sephacel (Pharmacia Fine Chemicals 製) を充填し、赤血球溶血液をカラム上部より流入し、Sephacel に吸着させた後、1.5mM, Na, K, Phosphate Buffer (pH6.8) を流し、ヘモグロビンを除去した。次に50mM, Na, K, Phosphate Buffer (pH6.8) を流入してカタラーゼを含む溶液を回収し、コロジョンバッグ (カットオフ分子量12,000) を用いて濃縮したものを貧血マウス赤血球カタラーゼ酵素液として用いた。

3. 溶血液とカタラーゼ酵素液の pH 処理

酵素液に等量の pH3.5, 4.4, 5.5, 6.8, 8.0, 9.0 に調整された緩衝液を加えて混和した。そして、37°C にて10分間ふ置を行った。使用した緩衝液は以下の如くである。

1/15M Acetate Buffer (pH 3.5, pH 4.4, pH 5.5),

1/15M Phosphate Buffer (pH 6.8, pH 8.0),

1/15M Boric Acid-Borax Buffer (pH9.0).

4. カタラーゼ活性度の測定

過硼素酸を基質とする Feinstejn の方法¹⁵⁾に準じたが、その一部を改変し、反応終了時に 2 N 硫酸、30%三塩化酢酸の 3 : 1 溶液を加えた。

5. メトヘモグロビン濃度の測定

正常及びアカタラセミアマウスの血液の溶血液について酸・アルカリ処理前後の液中に含まれるメトヘモグロビンの定量は Van Kampen 法¹⁵⁾に従って測定した。即ち、ふ置後の溶血液において、酸性メトヘモグロビンによる 630nm の吸収スペクトル (吸光度 E_1) 上に KCN 5% 溶液一滴を加え、メトヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンに変化させた場合に生じる 630nm の吸光度 (E_2) の減少を測定した。次いで、一方ふ置後の溶血液に赤血塩を加えて、その中のヘモグロビンをメトヘモグロビンに変えさせ、吸光度 (E_3) を測定した。そして、その中のメトヘモグロビンを KCN でシアンメトヘモグロビンとし、その 630nm の吸光度、(E_4)とした。そし

て、次式によってメトヘモグロビンの含有百分率 (R, MetHgb) を測定した。

$$R, \text{MetHgb} = \frac{E_1 - E_2}{E_3 - E_4} \times 100$$

実験結果

1. 非貧血マウス赤血球 (成熟赤血球を多く含む) 溶血液中のカタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性について (その成績は Fig. 1 (A), Table 1 に示す)

A. 酸に対する安定性; 溶血液では、アカタラセミアマウスカタラーゼ ($C_s^b C_s^b$) の酸に対する安定性は高く、正常マウス ($C_s^a C_s^a$) は、アカタラセミアマウスのそれに比べて不安定であった。この事実は著者の期待と異なっていた。異型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_s^a C_s^b$) カタラーゼの安定性は、正常マウスとアカタラセミアマウスの安定性の中間のそれを示した。

B. アルカリに対する安定性; アルカリに対する安定性については、正常マウス ($C_s^a C_s^a$) カタ

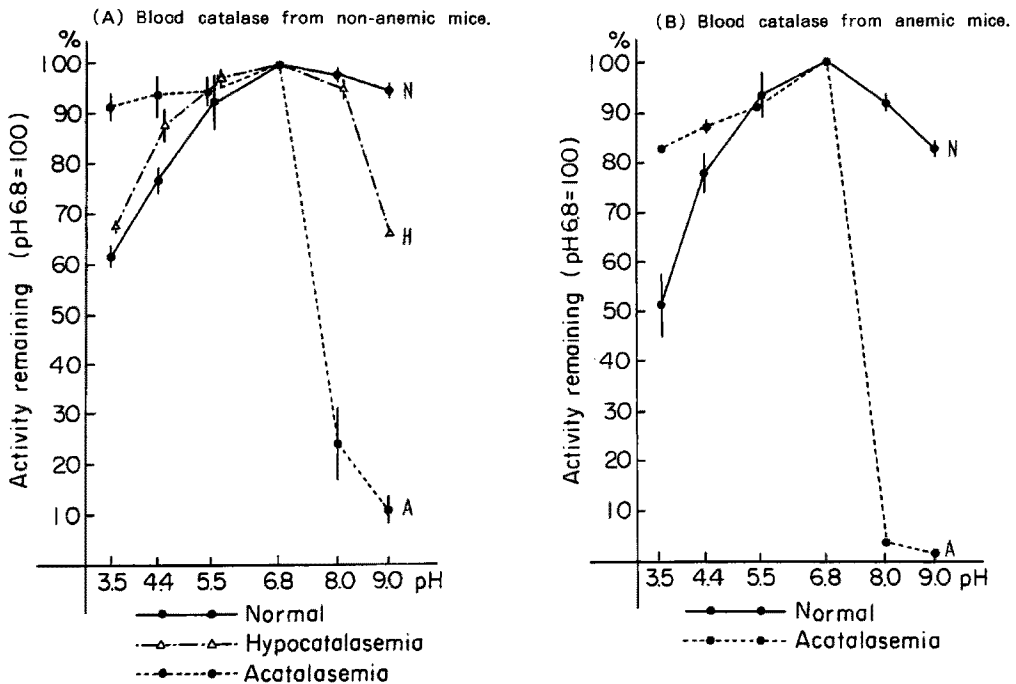


Fig. 1 Catalase activity remaining after pH treatment in hemolysates.

Table 1 Catalase activity in the hemolysate remaining after pH treatment with non-anemic normal ($C_s^a C_s^a$), acatalasemia ($C_s^b C_s^b$) and acatalasemic heterozygote ($C_s^a C_s^b$)

Surfactant Concentration	$C_s^a C_s^a$	$C_s^b C_s^b$	$C_s^a C_s^b$
pH 3.5	60.1±2.9	91.5±2.6	66.9±1.8
4.4	77.0±3.0	94.3±4.8	88.5±2.7
5.5	92.4±3.8	94.3±3.0	97.6±0.8
6.8	100%	100%	100%
8.0	98.3±1.8	24.2±6.2	95.7±2.5
9.0	95.1±1.0	10.7±2.9	66.0±0.4
	n = 3	n = 3	n = 3

Activities are expressed as mean±standard deviation (%)

ラーゼが安定性が高く、アカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)のそれより不安定であった。異型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_s^a C_s^b$)は、正常マウスとアカタラセミアマウスの中間の安定性を示していた。

2. 貧血マウス赤血球(網状赤血球を多く含む)

溶血液中のカタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性について(その成績は Fig. 1(B), Table 2 に示す)

この実験で使用した貧血マウス赤血球は、正常マウスでは、しゃ血前の赤血球数 $660 \times (10)^4$ 、網状赤血球含有率1.9%であった。しゃ血後の赤血球数 $524 \times (10)^4$ 、網状赤血球含有率30.5%であった。アカタラセミアマウスでは、しゃ血前の赤血球数 $740 \times (10)^4$ 、網状赤血球含有率0.9%、しゃ血後の赤血球数 $539 \times (10)^4$ 、網状赤血球含有率35.0%であった。したがって網状赤血球を多く含む貧血マウス赤血球は、幼若赤血球を多く含んでいる。

A. 酸に対する安定性; 溶血液はアカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)カタラーゼの酸に対する安定性は、非貧血マウス赤血球溶血液と同様に、正常マウス ($C_s^a C_s^a$)カタラーゼのそれよりも高かった。

B. アルカリに対する安定性; 正常マウス ($C_s^a C_s^a$)カタラーゼの安定性はアカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)のそれよりも高かった。

Table 2 Catalase activity in the hemolysates remaining after pH, treatment with anemic normal ($C_s^a C_s^a$), and acatalasemic ($C_s^b C_s^b$) mice,

Surfactant Concentration	$C_s^a C_s^a$	$C_s^b C_s^b$
pH 3.5	51.9±7.0	83.3±0.8
4.4	77.8±3.5	87.6±1.7
5.5	93.4±3.8	92.2±0.6
6.8	100%	100%
8.0	91.8±1.5	3.13±0.6
9.0	82.2±1.9	1.07±0.6
	n = 3	n = 3

Activities are expressed, as mean ± standard deviation (%) .

3. 非貧血マウス赤血球(成熟赤血球を多く含む)粗酵素液中のカタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性について(その成績は Fig. 2(A), Table 3 に示す)

A. 酸に対する安定性; 溶血液と異なり、正常マウス ($C_s^a C_s^a$)カタラーゼの酸に対する安定性は高く、アカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)カタラーゼは正常マウスのそれに比べて不安定であった。この成績は溶血液とは異なるものである。異型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_s^a C_s^b$)カタラーゼでは、正常マウスのそれとほぼ同等の安定性を示した。

B. アルカリに対する安定性; 正常マウス ($C_s^a C_s^a$)が安定性が高く、アカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)は、正常マウスに比べて不安定であった。この成績は、溶血液のそれとほぼ同様であった。異型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_s^a C_s^b$)は、正常マウスとアカタラセミアマウスの中間を示した。

4. 貧血マウスの赤血球(網状赤血球を多く含む)粗酵素液中のカタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性について(この成績は Fig. 2(B), Table 4 に示す)

A. 酸に対する安定性; 正常マウス ($C_s^a C_s^a$)カタラーゼの酸に対する安定性は、アカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$)のそれよりも高かった。この成績は、溶血液とは異なるのである。

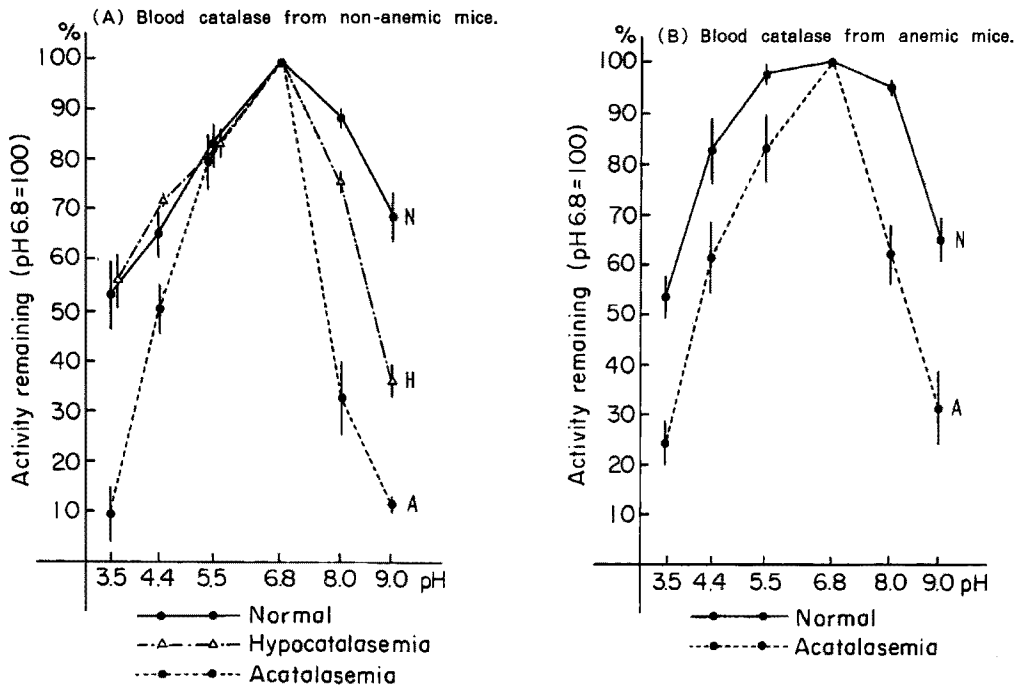


Fig. 2 Catalase activity remaining after pH treatment in crude enzyme solution.

Table 3 Catalase activity in crude catalase solution, remaining after pH treatment with non-anemic normal ($C_s^a C_s^a$), acatalasemic ($C_s^b C_s^b$) and acatalasemic heterozygote ($C_s^a C_s^b$) note: Crude catalase solutions were prepared from non-anemic blood by DEAE column.

Surfactant Concentration		$C_s^a C_s^a$	$C_s^b C_s^b$	$C_s^a C_s^b$
pH	3.5	53.5±7.0	9.72±5.9	56.6±5.5
	4.4	65.5±4.8	50.2±4.6	70.3±1.2
	5.5	83.1±4.0	79.7±5.6	83.2±3.9
	6.8	100%	100%	100%
	8.0	88.2±2.2	33.7±7.3	76.4±1.9
	9.0	69.1±5.5	11.7±2.0	36.4±3.8
		n = 3	n = 3	n = 3

Activities are expressed as mean ± standard deviation (%).

B. アルカリに対する安定性: アルカリに対する安定性も, 正常マウス ($C_s^a C_s^a$) がアカタラセミアマウス ($C_s^b C_s^b$) よりも高かった. この成績は, 溶血液と同様であった.

Table 4 Catalase activity in crude catalase solution, remaining after pH treatment with anemic normal ($C_s^a C_s^a$) and acatalasemic ($C_s^b C_s^b$) mice. note: crude catalase solutions were prepared from anemic blood by DEAE column.

Surfactant Concentration		$C_s^a C_s^a$	$C_s^b C_s^b$
pH	3.5	53.3±3.3	24.7±4.4
	4.4	82.7±5.3	61.1±6.7
	5.5	98.0±2.0	83.5±7.8
	6.8	100%	100%
	8.0	95.3±1.8	61.3±6.4
	9.0	64.9±4.3	31.1±7.8
		n = 3	n = 3

Activities are expressed as mean ± standard deviation (%).

5. 正常マウス及びアカタラセミアマウス溶血液の酸及びアルカリ溶液におけるメトヘモグロビン生成について
アカタラセミアマウス溶血液は正常マウス溶

血液と比べて、酸に対するカタラーゼの耐性が高いことについて、メトヘモグロビンのカタラーゼ様活性の関与を調べるために、溶血液を各種 pH の液にふ置後のメトヘモグロビン濃度を測

定した。

Fig. 3 のうち、Fig. (A)は正常溶血液の吸収スペクトル、Fig. (B)は pH3.5 37°C の条件下に10分ふ置した場合の吸収スペクトルを示す、Fig.(C)

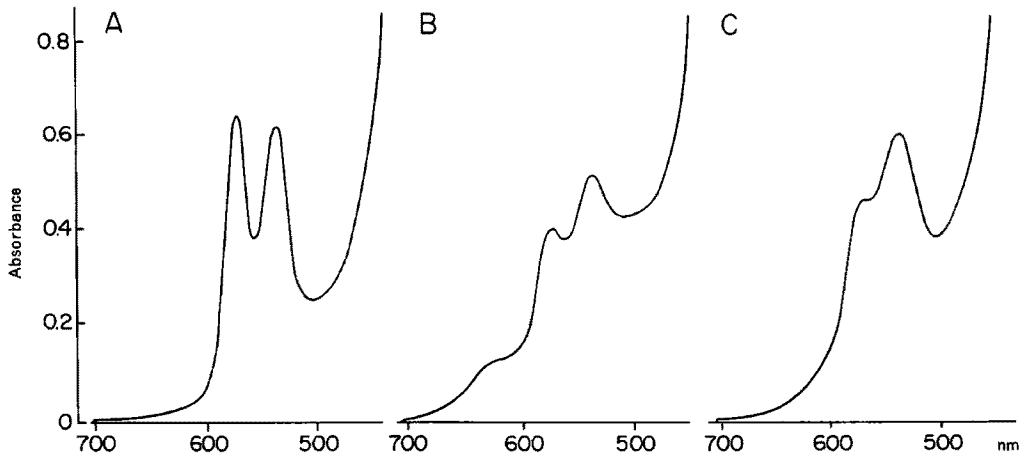


Fig. 3 Absorption spectra of acatalasemic hemolysates, before (A) and after incubation with acetate buffer (pH 3.5) for 10 min. at 37°C (B) after addition with KCN into the solution (C) .

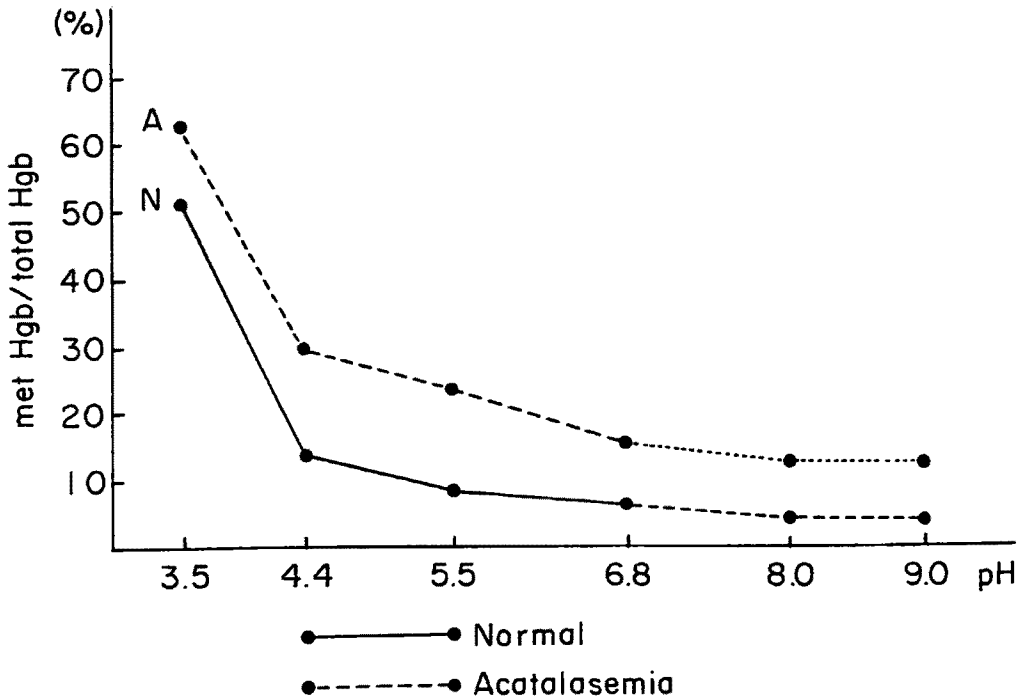


Fig. 4 Methemoglobin formation from hemoglobin in the normal and acatalasemic hemolysates at various hydrogen ion concentration.

は Fig. (B) にシアンを添加後の吸収スペクトルを示す。Fig. (C) において 630nm の酸性メトヘモグロビンのピークが明らかに消失することが認められた。

Fig. 4 は、溶血液を酸、アルカリ溶液にふ置後のメトヘモグロビン含有率を示したものである。pH3.5. ピークに、酸性領域において、溶血液のヘモグロビンよりメトヘモグロビンの生成されることが認められた。

6. カタラーゼの酸、アルカリに対する安定性について、非貧血マウスと貧血マウスとの比較

A. 赤血球溶血液

非貧血マウスと貧血マウスとの比較のために、Fig. 1 を再構成したものを Fig. 5 に示す。

正常マウス ($C_5^aC_5^a$) およびアカタラセミアマウス ($C_5^bC_5^b$) 共に、酸、アルカリに対して貧血マウスの赤血球溶血液中カタラーゼが非貧血マウスのそれよりも不安定であった。

B. カタラーゼ粗酵素液

非貧血マウスと貧血マウスの比較のために、Fig. 2 を再構成したものを、Fig. 6 に示す。

正常マウス ($C_5^aC_5^a$) では、酸、アルカリに対

して有為な差異は認められなかった。しかしアカタラセミアマウス ($C_5^bC_5^b$) においては酸、アルカリ共に貧血マウス赤血球カタラーゼ酵素液が、非貧血マウス赤血球のそれよりも安定であった。

7. カタラーゼの酸、アルカリに対する安定性について、溶血液とカタラーゼ粗酵素液との比較

A. 非貧血マウス

溶血液とカタラーゼ粗酵素液との比較のために、Fig. 1 (A) と Fig. 2 (A) を再構成したものを Fig. 7 に示す。

アカタラセミアマウス ($C_5^bC_5^b$) 赤血球溶血液中カタラーゼの酸に対する安定性は、粗酵素液中カタラーゼに比べて著しく高かった。しかし正常マウス ($C_5^aC_5^a$) では、アカタラセミアマウスほど両試料間で差異は認められなかった。

B. 貧血マウス

溶血液とカタラーゼ粗酵素液との比較のために、Fig. 1 (B) と Fig. 2 (B) を再構成したものを Fig. 8 に示す。

非貧血マウスと同様に、アカタラセミアマウ

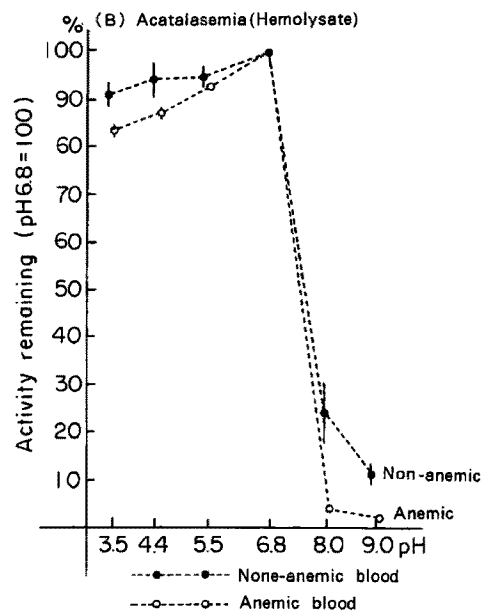
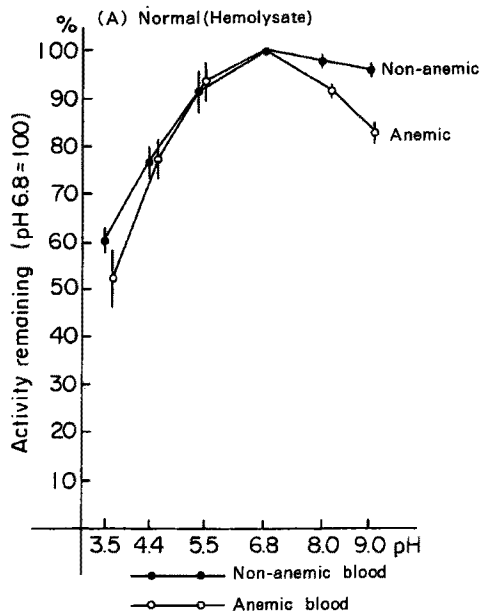


Fig. 5 Comparison of catalase activity remaining after pH treatment in hemolysate between anemic and non-anemic mice.

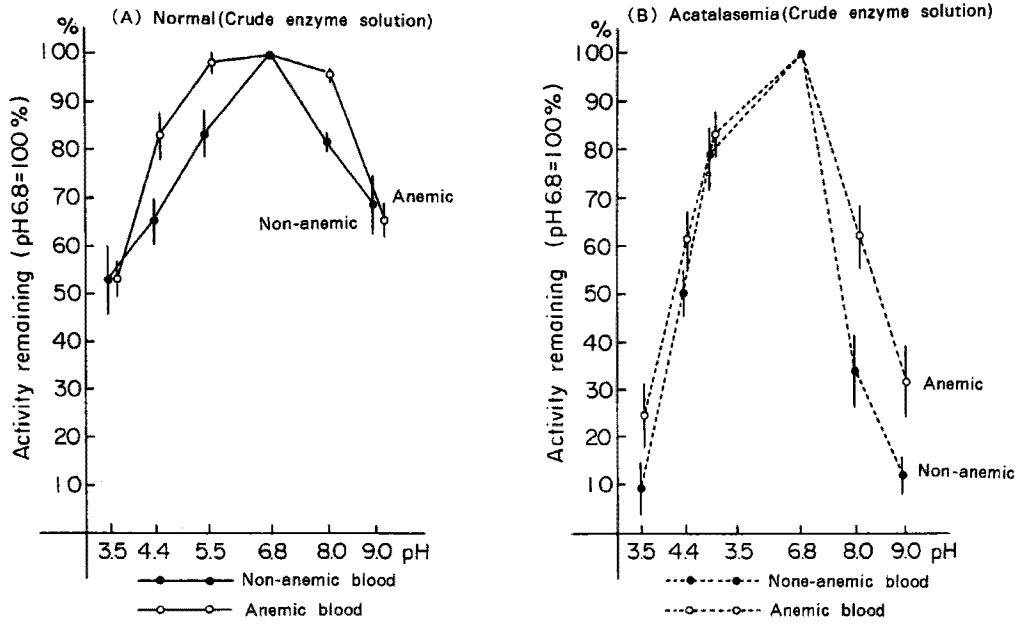


Fig. 6 Comparison of catalase activity remaining after pH treatment in crude enzyme solution between anemic and non-anemic mice.

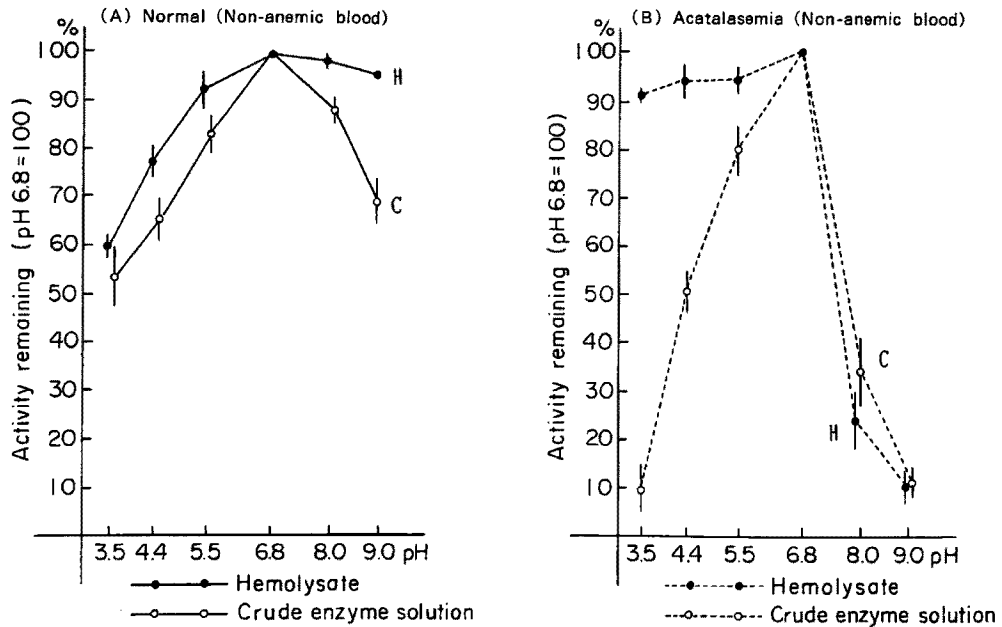


Fig. 7 Comparison of catalase activity remaining after pH treatment between hemolysate and crude enzyme solution.

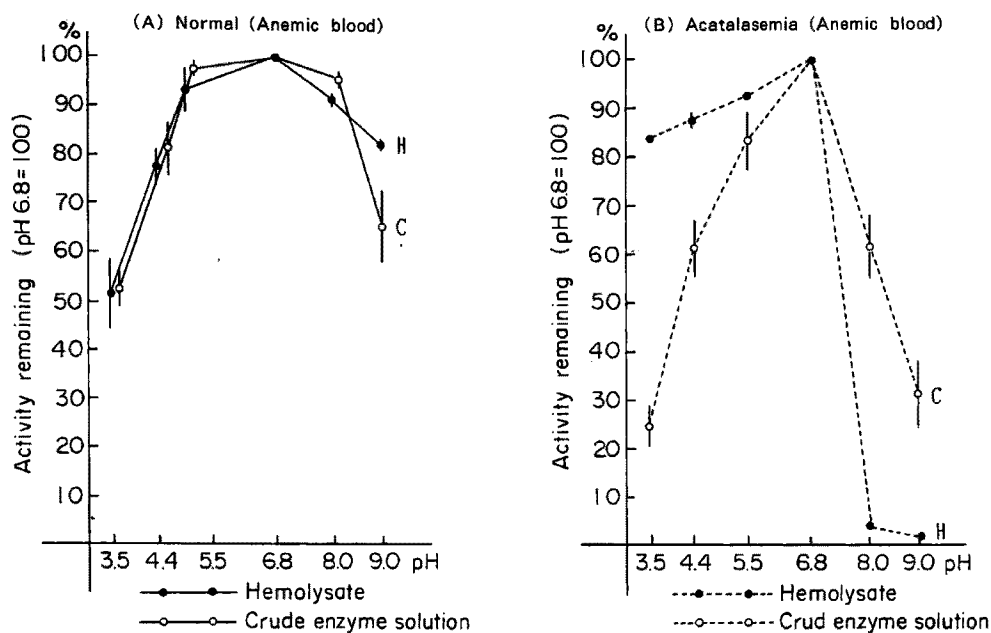


Fig. 8 Comparison of catalase activity remaining after pH treatment between hemolysate and crude enzyme solution.

Table 5 Acid and alkaline stability of catalase in the hemolysate and crude enzyme solution obtained from non-anemic and anemic bloods of normal (N), heterozygous hypocatalasemic (H) and acatalasemic (A) mice.

(A) Comparison among normal (N), heterozygous hypocatalasemic (H) and acatalasemic (A) mice.

Specimens	Hemolysate (refer Fig. 1)						Crude enzyme solution (refer Fig. 2)								
	A-1 Acid			Alkaline			A-2 Acid			Alkaline					
Treatment	←	↔	→	←	↔	→	←	↔	→	←	↔	→			
Strain	NN	↔	H	↔	A	N	↔	H	↔	A	N	↔	H	↔	A
None-anemic bl.	Unstable		Rather Stable		Stable	Stable		Rather Stable		Unstable	Stable		Rather Stable		Unstable
Anemic bl.	Unstable		Stable		Stable	Stable		Unstable		Stable	Stable		Unstable		Unstable

(B) Comparison of catalase activity remaining after pH treatment in hemolysate and crude enzyme solution between anemic and non-anemic mouse.

Specimens	B-1 Hemolysate (refer Fig. 5)				B-2 Crude enzyme solution (refer Fig. 6)				
	Acid		Alk a line		Acid		Alka line		
Red cells	Non-anemic bl.	↔	Anemic bl.	Non-anemic bl.	↔	Anemic bl.	Non-anemic bl.	↔	Anemic bl.
N	Stable		UnStable	Stable		UnStable	Unchangeable		Unchangeable
A	Stable		UnStable	Stable		UnStable	UnStable		Stable

(C) Comparison at catalase activity remaining after pH treatment between Hemolysate and Crude enzyme solution.

Red cells	C-1 Non-anemic Blood (refer Fig. 7)				C-2 Anemic blood (refer Fig. 8)				
	Acid		Alkaline		Acid		Alkaline		
Specimens	Hemolysate	↔	Crude enzyme solution	Hemolysate	↔	Crude enzyme solution	Hemolysate	↔	Crude enzyme solution
N	Stable		Little Unstable	Stable		Unstable	Unchangeable		Unchangeable
A	Stable		Unstable	Unchangeable		Unchangeable	Stable		Unstable

ス(C_s^bC_s^b)赤血球溶血液中カタラーゼの酸に対する安定性は、粗酵素液中カタラーゼに比べて著しく高くなった。

以上の Fig. 1, Fig. 2, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8 を総括して Table 5 に示している。

(附) Table 1, 2, 3, 4 の検定成績は、Table 6, a, b, c, d に示している。

考 察

変異マウスの酸およびアルカリに対するカタ

ラーゼの安定性の比較；本実験において、アカタラセミアマウス(C_s^bC_s^b)の非貧血マウス赤血球(成熟赤血球を多く含む)及び貧血マウス赤血球(網状赤血球を多く含む)の溶血液を用いた場合は、そのカタラーゼの安定性は期待と異なり、酸に対して高い安定性を示した(Table 5, A-1)。この点に関しては、溶血液のヘモグロビンは由来する酸性メトヘモグロビンによるカタラーゼ様作用が考えられる。即ち折田¹⁷⁾によって無カタラーゼ血液症のヘモグロビンが酸性域において、過酸化水素によってメトヘモグロビ

Table 6 Differentiation of stability of catalase activity against acid and alkaline treatments.

a. Catalase activity in the hemolysate remaining after pH treatment with non-anemic normal (N), acatalasemia (A) and acatalasemic heterozygote (H).

	N-A	N-H	H-A
pH 3.5	< **	< *	< **
pH 4.4	< **	< **	< -
pH 5.5	< -	< -(W)	> -
pH 6.8			
pH 8.0	> **	> -	> **
pH 9.0	> **	> **	> ** (W)

** ; p<0.01 * ; p<0.05 W ; Welch test

b. Catalase activity in the hemolysate remaining after pH treatment with anemic normal (N), acatalasemic (A) mice

	N-A
pH 3.5	< * (W)
pH 4.4	< *
pH 5.5	< -(W)
pH 6.8	
pH 8.0	> **
pH 9.0	> **

** ; p<0.01 * ; p<0.05 W ; Welch test

c. Catalase activity in crude catalase solution, remaining after pH treatment with non-anemic normal (N), acatalasemia (A) and acatalasemic heterozygote (H).

nate : Crude catalase solutions were prepared non-anemic blood by DEAE column

	N-A	N-H	H-A
pH 3.5	> **	< -	> **
pH 4.4	> *	< -	> **
pH 5.5	-	=	-
pH 6.8			
pH 8.0	> **	> **	> **
pH 9.0	> **	> **	> **

** ; p<0.01 * ; p<0.05

d. Catalase activity in crude catalase solution, remaining after pH treatment with anemic normal (N) and acatalasemia (A) mice.

nate ; crude catalase solution were prepared from anemic blood by DEAE column

	N-A
pH 3.5	** >
pH 4.4	* >
pH 5.5	* >
pH 6.8	
pH 8.0	** >
pH 9.0	** >

** ; p<0.01 * ; p<0.05

ンが生成されることが証明された。また Keilin, D., Hartree¹⁸⁾は、酸性メトヘモグロビンはカタラーゼ様作用を有することを推定している。この反応には、ヘモグロビンの非酵素的なカタラーゼ様作用が関与されていると思われる。

この点を明らかにするために、各種の酸、アルカリ溶液に正常及びアカタラセミア血を37℃、10分間ふ置後の溶血液の吸収スペクトルにおいて明らかに630nmに酸性メトヘモグロビンの最大吸収帯とする吸収峰が認められた。またメトヘモグロビンの定量成績においても、酸性になるほどメトヘモグロビンの含有率が高く、pH3.5(メトヘモグロビンの含有率62.4%)で最高のメトヘモグロビンの生成が認められた。アルカリ性においては、メトヘモグロビンの生成が微量であった。そしてアカタラセミア溶血液の酸性領域のメトヘモグロビン生成量は正常のそれより明らかに高かった。それ故①アカタラセミア溶血液においては、正常溶血液に対しカタラーゼの含有比が少なく、メトヘモグロビンのカタラーゼ様作用による過酸化水素の分解の割合がカタラーゼに比べて高い。②アカタラセミア溶血液では、酸性状態においてメトヘモグロビン含有率が正常マウス溶血液より高い。

以上の理由により、酸性領域ではアカタラセミア溶血液はメトヘモグロビンのカタラーゼ様作用による過酸化水素の分解作用が強く作用し、メトヘモグロビンのほうがカタラーゼより酸に安定な事実より考え、酸性において、アカタラセミア溶血液のカタラーゼ様作用が正常より安定性の高い成績を示したと考えられる。

そこで、ヘモグロビンの干渉を避けるために、ヘモグロビンを除去した粗酵素液での実験では、アカタラセミアマウス(C_s^aC_s^b)カタラーゼは正常マウスのそれよりも酸に対して相対的に不安定であった(Table 5, A-2)。また、異型接合体ヒポカタラセミアマウス(C_s^aC_s^b)の赤血球中のカタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性は、その両親である正常マウス(C_s^aC_s^a)とアカタラセミアマウス(C_s^bC_s^b)のカタラーゼの安定性の中間のそれを示した。

これは、異型接合体ヒポカタラセミアマウスのカタラーゼ分子の性質が、同型接合体である

正常マウスとアカタラセミアマウスのカタラーゼ分子の各々の性質とは異なっていることによると思われる。

このヒポカタラセミアの性質に関しては、過去において Feinstein¹⁹⁾らによる尿素と熱に対する赤血球カタラーゼの安定性、および水垣²⁰⁾による赤血球カタラーゼの SDS, LIS に対する安定性、更に佐藤²¹⁾によるマウス肝カタラーゼの熱処理, pH 処理に対する安定性を調べた実験があり、いずれの成績も異型接合体ヒポカタラセミアのカタラーゼが、正常マウスとアカタラセミアマウスのカタラーゼの中間の性質を示した成績と一致する。

また、異型接合体ヒポカタラセミアマウスのカタラーゼが正常マウスとアカタラセミアマウスのカタラーゼ分子のサブユニットを共有しているか、または正常マウスとアカタラセミアマウスのカタラーゼ分子の混合物であるかについては、今後 Hybrid 等による実験を用いて検討したいと考えている。

非貧血マウス赤血球と貧血マウス赤血球(網状赤血球を多く含む)溶血液を試料とした際のカタラーゼの安定性の比較; 溶血液による比較では、非貧血マウス赤血球溶血液のカタラーゼとしゃ血による貧血マウス赤血球溶血液中のカタラーゼの酸およびアルカリに対する安定性を比較した場合、正常マウスおよびアカタラセミアマウス共に貧血マウス赤血球溶血液が非貧血マウス溶血液よりも不安定であった(Table 5, B-1)。

一方、粗酵素液による比較では、非貧血マウス赤血球及び貧血マウス赤血球(網状赤血球を多く含む)の溶血液中に混在するヘモグロビンの影響を排除した粗酵素液中の非貧血マウス及び貧血マウス赤血球カタラーゼの安定性を比較した場合に、正常マウスでは、酸及びアルカリに対して有為な差異は認められなかった。しかしアカタラセミアマウスの粗酵素液においては、酸、アルカリ共に貧血マウス赤血球カタラーゼが非貧血マウス赤血球カタラーゼより安定であった(Table 5, B-2)。

この事実は、溶血液では、混在するヘモグロビンの量が非貧血マウス赤血球よりも貧血マウ

ス赤血球の方が少なく、ヘモグロビンによる酸及びアルカリに対する保護作用が弱いために貧血マウス赤血球溶血液中のカタラーゼの感受性が高くなったと考えられる。一方、粗酵素液においてはアカタラセミアマウスの貧血マウス赤血球カタラーゼが非貧血マウス赤血球カタラーゼよりも酸及びアルカリに対して耐性が強くなっていることは、非貧血マウス赤血球カタラーゼと貧血マウス赤血球カタラーゼの活性度の差異によるものか、またはカタラーゼの本来の性質によるものと考えられる。

酸及びアルカリに対する溶血液中と粗酵素液中カタラーゼの安定性の比較；アカタラセミアマウス非貧血マウス赤血球溶血液中のカタラーゼの酸に対する安定性は、粗酵素液中のカタラーゼに比べて著しく高かった。しかし（カタラーゼ/Hb）比の高い正常マウスでは、アカタラセミアマウスほど両試料間で差異は認められなかった（Table 5-c）。

これは、前述したように、溶血液中のメトヘモグロビンのカタラーゼ様活性によるものと考えられる。

結 論

非貧血マウス赤血球（成熟赤血球を多く含む）及び貧血マウス赤血球（網状赤血球を多く含む）溶血液中の血液カタラーゼの酸及びアルカリに対する安定性を調べ、次いで溶血液より DEAE カラムで精製した粗酵素液中のカタラーゼの、酸及びアルカリに対する安定性を調べた結果以下の成績を得た。

1. 酸 (pH3.5~5.5) に対する非貧血マウス赤血球（成熟赤血球を多く含む）溶血液中のカタラーゼの安定性は、アカタラセミアマウス > 異型接合体ヒポカタラセミアマウス > 正常マウスの順に低下する。

一方、酸に対する非貧血マウス赤血球粗酵素液でのカタラーゼの安定性は、正常マウス及び異型接合体ヒポカタラセミアマウス > アカタラセミアマウスの順に低下した。

2. 酸に対する貧血マウス赤血球（網状赤血球を多く含む）溶血液中カタラーゼの安定性は、アカタラセミアマウス > 正常マウスの順で低下

する。

これと対照的に、酸に対する貧血マウス赤血球の溶血液から精製した粗酵素液でのカタラーゼの安定性は、正常マウス > アカタラセミアマウスの順で低下した。

3. 酸性領域において、アカタラセミアマウス溶血液のメトヘモグロビン生成量は正常マウス溶血液より多いと認められた。

4. 上述の成績から、アカタラセミアマウスの非貧血マウス赤血球と貧血マウス赤血球中のカタラーゼの酸に対する安定性は、溶血液中のヘモグロビンに由来するメトヘモグロビンのカタラーゼ様活性も主として関与していると推定される。

5. アルカリ (pH 8~pH 9) に対する非貧血マウス赤血球溶血液中及び粗酵素液中のカタラーゼの安定性は、何れも正常マウス > 異型接合体ヒポカタラセミアマウス > アカタラセミアマウスの順に低くなっている。

6. アルカリに対する貧血マウス赤血球溶血液と粗酵素液中のカタラーゼの安定性は、何れも、正常マウス > アカタラセミアマウスの順で低下した。

7. 酸及びアルカリに対する安定性を非貧血マウス赤血球と貧血マウス赤血球の溶血液から精製した粗酵素液中カタラーゼについて比較した。その際、正常マウスでは、両粗酵素液中のカタラーゼの間に貧血マウス赤血球粗酵素液中カタラーゼは非貧血マウス赤血球粗酵素液中のカタラーゼよりやや安定であるが、有意な差異は認められなかった。一方において、アカタラセミアマウスでは、酸アルカリ共に、貧血マウス赤血球粗酵素液中のカタラーゼが非貧血マウス赤血球粗酵素液中のカタラーゼよりも安定であった。

本稿の要旨は、昭和63年9月9日第33回日本人類遺伝学会にて発表した。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った緒方正名教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 高原滋夫：無カタラーゼ血液症並びに夫に困って来たと惟える新疾患の提唱。岡山医誌 (1951) **63**, 8—11.
- 2) Takahara S : Progressive oral grngrene probably due to lack of catalase in the blood. *Lancet* (1952) **2**, 1101.
- 3) 古屋 勝：無カタラーゼ血液症について。口腔病 (1952) **2**, 1101.
- 4) 上代 三：無カタラーゼ症。総合医学 (1955) **12**, 117.
- 5) Aebi H, Heiniger JP, Butler R and Hassig H : Two cases of acatalasemia in Switzerland. *Experientia* (1961) **17**, 466.
- 6) Aebi H, Jevnet F, Richterish R, Suter H, Butler R, Frei J and Marti HR : observations os two Swiss families with acatalasemia. *Enzymel* (1962) **2**, 1.
- 7) Aebi M and M : uber die cellulare Verterlung der Katalase im Blut homozygoter und heterozygoter Detekttträger (Akatakasia) *Humangenetic* (1966) **3**, 50—63.
- 8) Ogata M and Takahara S : On minimal catalatic activity in Japanese acatalasemic blood. *Proc Jap Acad* (1966) **42**, 828—832.
- 9) Ogata M, Tomokuni K and Takahara S : Catalatic activity of immature and mature red blood cells in Japanese acatalasemia. *Acta Med Okayama* (1969) **23**, 421—438.
- 10) Ogata M, Tomokuni K and Takahara S : residual catalase in the blood of Japanese acatalasemia. *Tohoku E Exp Med* (1972) **107**, 105—14.
- 11) Feinstein RN, Seahalm Je, Howard JB and Russel WL : Acatalasemic mice. *Genetics* (1964) **52**, 661—662.
- 12) Feinstein RN, Howard JB and Savol R : Heat and area stability of blood catalase of catalase-mutant mouse strains. *Experientia* (1971) **27**, 1152—1153.
- 13) Ogata M, Inove T, Tomokuni K and Takahara S : Catalase activity of immature and mature red cells from acatelasemic mouse mutant. *Acta haemat* (1970) **44**, 11—20.
- 14) Morikofer-Zwez S, Cantz M, Kaufmann H, Jpvon Wartburg and aebi H : Heterogeneity of erythrocyte catalase Correlations between sulfhydryl group content, Chromatographic and electrophoretic properties. *Eur J Biochem* (1969) **11**, 49—57.
- 15) Feinstein RN : Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J Biol Chem* (1949) **180**, 1197.
- 16) Van Assendelft OW : Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives Royal Vangorcum Ltd. Assen Netherland (1970)
- 17) 折田洋造：無カタラーゼ血症におけるヘモグロビンの分解について。人類遺伝学雑誌 (1962) **7**, 163—189.
- 18) Keillin D, Hartree EF : Reactions of methemoglobin and catalase with peroxides and hydrogen donors. *Nature* (1954) **173**, 720.
- 19) Feinstein RN, Howard JB and Savol R : Heat and urea stability of blood catalase of catalase-mutant mouse strains. *Experientia* (1971) **27**, 1152—1153.
- 20) 水垣順子：アカタラセミア、ヒポカタラセミアマウスの赤血球カタラーゼの均一性および SDS, LIS に対する安定性について。岡山医誌 (1978) **90**, 785—793.
- 21) 佐藤征紀：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.

**Acid and alkaline stability of catalase in the erythrocytes
of anemic acatalasemic mice**

Junichi FUJIMURA

**Department of Public Health,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

The acid and alkaline stability of blood catalase in anemic blood was examined with hemolysates and a crude catalase solution prepared by DEAE column from hemolysates. The results obtained follow.

1. The acid stability of catalase in the hemolysates decreased, in order in acatalasemic, heterozygous hypocatalasemic and normal mice. The acid stability of catalase in the crude enzyme solution from the hemolysates of acatalasemic mice was lower than that of normal or heterozygous hypocatalasemic mice.
2. The acid stability of catalase activity in the hemolysates of blood rich in reticulocytes obtained from anemic acatalasemic mice was higher than that of normal mice. In contrast, the acid stability of catalase in the crude enzyme solution from hemolysate of anemic acatalasemic mice was lower than that of normal mice.
3. Methemoglobin formation in acatalasemic mice's hemolysates in acid solution was more than in normal mice hemolysate.
4. From these results, the acid stability of catalase activity in acatalasemic hemolysates of anemic mice appears to be mainly caused by catalase like activity of methemoglobin.
5. The alkaline stability of catalase at pH 8.0 and 9.0 of both the catalase in the hemolysate and its crude catalase solution from non-anemic mouse blood decreased, in order, from normal, heterozygous hypocatalasemic and acatalasemic mice.
6. The alkaline stability of catalase in the hemolysate and its crude catalase solution from anemic acatalasemic mice were lower than that from normal mice.
7. The acid and alkaline stability of catalase in crude catalase solution from anemic blood of normal and acatalasemia mice was compared to those from non-anemic blood. Catalase from anemic blood was more stable than that from non-anemic blood of acatalasemic mice. A similar tendency to acatalasemia catalase was observed in normal catalase mice.