牛赤血球カタラーゼの免疫学的多型性

伊藤 整・阿久澤良造・鎌田信一*

日本獣医畜産大学畜産食品工学科

*同大獣医学科, 武蔵野市 180

(1984. 3. 27 受付)

カタラーゼの生合成機構, 遺伝的支配等を明らかにしてゆくには, 多型性の問題は重要と考えられる。

前報¹⁾で著者らは, 牛乳カタラーゼの多型性を検討し, 牛乳中に, 性状の異なる3種類のカタラーゼ酵素が存在することを報告したが, 牛乳カタラーゼの場合, 血液からの移行も考えられるため, まずこの点を明らかにしておかなければならない。それには, 血液カタラーゼについても多型性を調べ, 酵素特性を明らかにし, 両カタラーゼを比較追求してゆくのが順当と考えられる。赤血球カタラーゼの多型性については, 人間²⁾, 馬³⁾等で明らかにされているが, 牛赤血球カタラーゼで検討した確かな知見が見あらず, 免疫学的に証明した報告例もない。

本報告は, 牛赤血球カタラーゼを, 免疫電気泳動し, 多型性を検討したものである。

材料および方法

酵素標品の調製: 牛赤血球カタラーゼの精製は, BONNICHSEN ら⁴⁾の方法に準じ, 一部 Sephacryl S-300 クロマトグラフィー分画法を加えた。なお得られた精製標品の OD_{405}/OD_{276} 値は 0.80 を示した。また牛肝臓カタラーゼは, 市販の SIGMA 社製再結晶カタラーゼを用いた。

抗カタラーゼ血清の作製⁵⁾: 市販の結晶肝臓カタラーゼ標品 10 mg を, 少量の 0.1 N NaOH で溶解し, 0.9% NaCl 溶液 1 l に対して, 約 20 時間透析したのち, 内容液を 1.0 ml とし, 同量の Freund の complete

adjuvant とよくホモゲナイズして乳化し, 家兎の背部および大腿部の筋肉内, 数カ所に接種した。3週間後, Freund の incomplete adjuvant を用い, 前回と同様の条件下で乳化し, 接種した。さらに2週間後, 1 ml (5 mg) のカタラーゼを静脈内に注入し, 10日後に抗カタラーゼ血清を得た。なおこの抗血清は, 吸収操作⁶⁾後, 抗原として用いた肝臓カタラーゼとの間で, Ouchterlony, 免疫電気泳動を行ない, 明瞭な単一沈降線を得ているため, 純度には問題ないものと思われる。

免疫電気泳動⁵⁾: ペロナル緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を用い, 寒天平板幅 1 cm 当り 2.8 mA で, 15°C, 45 分間通電の後, 溝に抗血清をみだし, 48 時間放置後, アミドブラック 10 B で染色し, 直ちに撮影した。なお沈降線のカタラーゼ活性を調べる目的で, MICHELI ら⁶⁾の方法を用い, 同一条件下で泳動した寒天板を, くり返し生理食塩水で洗浄し, 可溶部分を洗い去ったのち, 不溶の沈降線に 30% 過酸化水素水を滴下し, その発泡状態からカタラーゼ活性の有無を確かめた。

結果および考察

カタラーゼ酵素は, 他種酵素・蛋白とはおもむきを異にし, その抗体は同種動物のみならず, 異種動物の異なる臓器カタラーゼともかなり免疫学的に交差反応をおこすことが知られている。この点に着目し, 抗肝臓カタラーゼ血清を用い, 荷電性, 分子量差異, 免疫反応を利用した免疫電気泳動で, 牛赤血球カタラーゼを分析し, その結果を図 1 の A に示した。また B は, 沈降線のカタ

Immunological Polymorphism of Bovine Erythrocyte Catalase: Osamu Ito, Ryoza AKUZAWA and Shin-ichi KAMATA* (Technology and Foodstuffs of Animal Origin Department, Nippon Veterinary and Zootechnical College, *Department of Veterinary, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Musashino-shi, Tokyo 180)

Fig. 1. Immuno-electrophoretic pattern (A) and catalase activity test (B) of bovine erythrocyte catalase. As: Anti-bovine liver catalase serum.

ラーゼ活性有無を調べたものである。

赤血球カタラーゼを泳動後、抗肝臓カタラーゼ血清と反応させると、陰極側に3本の沈降線が認められる。このうちの2本は、ほぼ同じ移動位置に、また他の1本は、少し離れた部位に現われ、赤血球カタラーゼが免疫学的に異なる3つの成分から成ることが確かめられた。またこの沈降線に過酸化水素を滴下すると、原点近くの同じ移動度を持つ、2本の沈降線上に、1本の太い発泡バンドが認められてくる。これは図1、Aからも明らかなように、2つの沈降線が非常に接近しているため、発生するアワが、2本の発泡線として分離出来ず、1本の太いバンドを示したものである。また抗体槽側にある残りの1本の細い沈降線にはアワが発生せず、カタラーゼ活性が認められなかった。

このような沈降線の酵素活性欠如については、2つの

要因が考えられる。1つは抗原、抗体結合によって、酵素の活性部位がおおわれ、またこの部位の構造に変化が起き、活性がなくなるもので、このような事実は、多くの酵素で観察されている。もう1つは、道源ら⁷⁾、柴田ら⁸⁾が指摘したカタラーゼフラグメントである。道源ら⁷⁾はラットの肝臓、腎臓で、また柴田ら⁸⁾はラットの赤血球を用いて、Ouchterlonyでカタラーゼ活性のない沈降線を認め、カタラーゼ生合成の前駆物質ではないかと考え、カタラーゼフラグメントなる名称で呼び表わしている。本報での牛赤血球カタラーゼについても、今後これらの点を十分考慮した詳細な検討を加えていくつもりであるが、本実験結果から得られた赤血球カタラーゼの免疫学的多型を、牛乳カタラーゼと対比、検討するつもりである。

文 献

- 1) Ito, O. and R. AKUZAWA, J. Dairy Sci., **66**: 2468-2473. 1983.
- 2) MORIKOFER-ZWEZ, S., M. CANTZ, H. KAUFMANN, J. P. VON WARTBURG and H. AEBI, European J. Biochem., **11**: 49-57. 1969.
- 3) BONNICHSEN, R., Arch. Biochem., **12**: 83-94. 1947.
- 4) 蛋白質核酸酵素編集部編, 免疫の生化学 p 39-40 共立出版. 1972.
- 5) 松橋 直・臼井美津子・成内秀雄, 化学と生物, **9**: 193-199. 1971.
- 6) MICHELI, A., F. PEETOOM, N. ROSE, S. RUDDY and P. GRABAR, Ann. Inst. Pasteur, **98**: 694-700. 1960.
- 7) 道源正子・東 恵彦, 生 化 学, **44**: 959-963. 1972.
- 8) 柴田泰生・東 恵彦, 生物物理化学, **11**: 53-60. 1966.