生物試料のカタラーゼ活性測定法

岡崎 太郎 大楠 琢郎 宿谷 良一

日本医科大学第1生化学教室

緒言

カタラーゼ活性の測定には種々の方法が知られている¹⁻¹¹⁾。その中でとくに Beersら⁹⁾による紫外部吸収測定法および von Euler ら⁷⁾による過マンガン酸カリ滴定法はすぐれた方法として広く用いられてきた。しかし、これらの方法も、試料中に蛋白質などの有機物質が混在する場合にはしばしば測定が妨げられ、一般に夾雑物を多く含む生物試料の活性測定には不適である。

今回われわれは諸種の動物組織カタラーゼの活性測定を行なうにあたって、簡易かつ信頼しうる測定法を確立することを目的として下記のごとき検討を行なったので報告する。われわれの方法は、原理的には Pütter ら¹¹⁾が血清カタラーゼ測定に用いた方法と同じく、カタラーゼ反応系の残存 H_2O_2 量を一定時間毎に下記のペルオキシダーゼ反応系によって比色定量するものである。

Pütter の原法は主として呈色が不安定なため広く用いられなかった。本報告では、各反応の至適条件についてすべてあらたに検討を加えるとともに、その結果にもとづいて標準条件を設定した。

実験材料および方法

酵素標品：純カタラーゼ標品としてはウシ結晶肝カタラーゼ (Boehringer-Mannheim 社、分析用) を用い、これを 0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 に溶解した後、12,000 xg で 10 分間遠沈してえた上清を酵素液として使用した。ペルオキシダーゼは西洋ワサビペルオキシダーゼ (Boehringer-Mannheim 社、約 50 単位/mg) を用い、0.01 M 磷酸緩衝液に溶解使用した。

OKAZAKI, TARO. OHKUSU, TAKUO. SHUKUYA, RYOITI: An improved photometric assay of catalase activity in biological materials.

溶血液の調製にあたっては、ヒト、ウサギ、イヌの赤血球は 0.9% NaCl で、またアヒルおよびウシガエル赤血球は amphibian Ringer 液で数回洗浄した後、2 倍ないし 2,000 倍量の水を加えて 0°C, 60 分放置し溶血を行なった。えられた溶血液を 12,000 xg, 20 分遠沈した後、上清をさらに 105,000 xg, 90 分遠沈し、その上清を試料とした。

肝ホモジェネートの調製には 0.25 M sucrose 溶液を用い、Hogeboom の方法¹²⁾にしたがって分画を行なった後、その 105,000 xg 遠沈上清 (可溶性画分) を試料とした。試料中の蛋白質濃度は Lowry の方法¹³⁾により、ウシ血清アルブミン (Sigma 社製) を基準として測定した。

試薬：o-dianisidine・2 HCl は Sigma 製品を用い、0.01 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 に溶解して使用した。溶液は冷暗所に保存し、調製後 1 週間以内に使用した。 H_2O_2 、 NaN_3 、 H_2SO_4 および磷酸塩はすべて市販の特級品を使用した。

方法：分光学的測定は Cary 14 型自記分光光度計により、これに 0~2.0 または 0~0.2 の slide wire を装置して行なった。pH 測定は Beckmann SS-1 型 pH メーターによった。反応に際して、酵素試料の添加には 5~500 μ l のマイクロピペット (Bie & Berntsen 社, Denmark) を使用し、また一定時間毎の反応液の採取には Finn timer (Kemistien Oy 社, Finland) を使用した。

酵素活性は下式によって求めた一次反応の速度恒数 k' (min^{-1}) で表示した。

$$k' = \frac{2.303}{t} \cdot \log \frac{a}{(a-x)}$$

a : H_2O_2 初濃度

$(a-x)$: t 分後の H_2O_2 残存量

結果

1. ペルオキシダーゼ反応系の至適条件についての検討

はじめにペルオキシダーゼ反応系をカタラーゼ活性

図1(A) ペルオキシダーゼ反応による過酸化水素の定量

反応液は全量 2.5 ml で *o*-dianisidine·2 HCl 0.4 mg, peroxidase 25 μ g に種々の濃度の H_2O_2 を加え、0.01 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 中で室温、10分間 incubate し、ついで 2.5 ml の 50% (v/v) H_2SO_4 を加えて室温、5分間放置後 530 nm の吸光度を測定した。横軸は反応液 2.5 ml 中の H_2O_2 終濃度を示す。

図1(B) ペルオキシダーゼ反応の時間経過
 H_2O_2 終濃度 81 μ M においてペルオキシダーゼ反応液の incubation 時間を変え、2~10 分の間で反応経過を観察した。他の条件は(A)と同じである。

図中矢印は、カタラーゼ活性測定に用いた標準条件を示す(後述)。

測定に適用するにあたっての至適条件について諸種の検討を試みた。図1(A)は H_2O_2 濃度とペルオキシダーゼ反応による発色度との関係を示したものである。

反応液は全量 2.5 ml とし、*o*-dianisidine·2 HCl, 0.4 mg, peroxidase 25 μ g, に種々の量の H_2O_2 を加え、0.01 M 磷酸緩衝液 pH 7.0 中で、室温で 10 分間 incubate した。ついでこの反応液に 50% (v/v) H_2SO_4 2.5 ml を加え、室温で 5 分放置後 530 nm の吸光度を測定した。図のごとく、本条件下で H_2O_2 濃度と吸光度との間には直線関係が成立した。図1(B)は同条件で H_2O_2 81 μ M 添加時のペルオキシダーゼ反応の時間経過を示したものである。図のように反応は 2 分以内に完了することが明らかである。

以上の結果から、 H_2O_2 濃度 81 μ M, 反応時間 10 分(図中矢印)を標準条件として、つぎに本反応に対する *o*-dianisidine, peroxidase ならびに H_2SO_4 濃度の影響について検討を加えた。

図2(A)は反応液中の *o*-dianisidine 量と吸光度との関係である。

図のごとく 81 μ M (0.2 μ moles/2.5 ml) の H_2O_2 定量には 0.1 mg/2.5 ml 以上の *o*-dianisidine·2 HCl

が必要であることがわかる。後に述べるように、カタラーゼ活性測定に際しては 0.4 mg/2.5 ml の *o*-dianisidine (図中矢印)を使用した。これは 0.8 μ moles/2.5 ml (=320 μ M) の H_2O_2 を定量するに十分な量である。一方 peroxidase に関しては、図2(B)のごとく、5 μ g/2.5 ml ですでに最高値に達し、また事実上反応はこの酵素量で瞬間的に完了することが確かめられた。

図2(C)は発色におよぼす H_2SO_4 濃度の影響について検討した結果である。図の横軸は添加 H_2SO_4 の濃度を示す。図のごとく、えられる吸光度は H_2SO_4 濃度に依存し、50%以上の H_2SO_4 添加で最大値に達する。この際どの H_2SO_4 濃度でも発色は H_2SO_4 添加後 5 分以内に一定値に達し、以後 24 時間以上安定であった。この結果から発色には 50% (v/v) H_2SO_4 を使用することとした。

表1はペルオキシダーゼ反応系に対する NaN_3 の影響を検討した結果である。

表のごとく、反応液中の NaN_3 が 1×10^{-3} M 以下ではペルオキシダーゼ反応は阻害されない。この事実は

図2 H_2O_2 定量反応に対する *o*-dianisidine (A), peroxidase (B) および H_2SO_4 濃度 (C) の影響

図1(A)と同条件で、目的とする物質の濃度のみを変え測定を行なった。また、 H_2O_2 終濃度はすべて 81 μ M とした。矢印はカタラーゼ活性測定に用いた標準条件を示す(後述)。

表 1 Peroxidase 反応に対する NaN_3 の影響

$[\text{NaN}_3]^*$	O.D. 530nm	% inhibition
$1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	0.750	0
$4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$	0.750	0
$1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	0.750	0
$2.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	0.740	1.3
$4.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	0.640	14.7
$8.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	0.590	21.3

* 終濃度

カタラーゼ反応が同濃度の NaN_3 で完全に阻害されることと対照的である。

以下に述べるカタラーゼ活性測定に際しては、カタラーゼ反応のみを選択的に停止させた後、ペルオキシダーゼ反応による残存 H_2O_2 定量を行なう必要があるが、この目的に終濃度 1 mM の NaN_3 を使用することとした。

2. カタラーゼ活性測定の標準条件についての検討

以上の実験結果にもとづいて、つぎにカタラーゼ活性測定の標準条件を以下のごとく定め、またこれらの条件が反応速度論的に満足すべきものであることをウシ結晶カタラーゼを用いて検討した。

測定法：1) 氷冷した $4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ H_2O_2 溶液 (0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.0) 4.5 ml に 1~500 μl の試料を加え、ただちに混和、氷冷中で反応を進行させる。

2) 反応開始後正確に 20 秒おきに、Finnpipette を用いて反応液 0.5 ml をとり、*o*-dianisidine-peroxidase- NaN_3 2.0 ml 中にふき込みカタラーゼ反応を停止させる。

3) 上記混合液を室温で 10 分間放置する。

4) 50% (v/v) H_2SO_4 2.5 ml を加え、さらに 5 分間放置し発色を完了させる。

5) 530 nm の吸光度を測定し、各時間毎の測定値から反応速度恒数を算出する。

図 3 (A) は種々の濃度のウシ結晶カタラーゼ溶液を用いて、上記の方法で反応の時間経過を観察したものである。

図のごとく、どの濃度でも反応は一次反応の時間経過によく一致して進行する。図から各反応の速度恒数 k' を求めて、カタラーゼ濃度に対して plot すると図 3 (B) がえられる。図のごとく k' と酵素濃度との間にはきれいな直線関係が成立した。また、カタラーゼ反

**o*-dianisidine $\cdot 2 \text{ HCl}$ 20 mg, peroxidase 1.25 mg, NaN_3 8.1 mg を 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml に溶解したもの。

応液にあらかじめ $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の NaN_3 を添加した場合には、反応が完全に阻害された。これらの結果は、本測定法が速度論的に満足すべきものであることを示している。

図 4 はカタラーゼ濃度を一定とし、 H_2O_2 初濃度を $4.1 \times 10^{-3} \sim 4.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の間で変化した場合の反応の時間経過である。

図から明らかなように、各反応からえられる速度恒

図 3 (A) ウシ結晶カタラーゼによる反応の時間経過
ウシ結晶カタラーゼ溶液 (0.1 M 磷酸緩衝液, pH 7.0) 0.5 ml を用い、標準条件 (本文参照) で測定した。カタラーゼ濃度 ($\mu\text{g/ml}$) I, 0.2; II, 0.4; III, 0.8; IV, II + 1 mM NaN_3 。
図 3 (B) k' とカタラーゼ濃度との関係

図 4 種々の基質濃度で測定したカタラーゼ反応の時間経過
一定濃度のウシ結晶カタラーゼ溶液 0.5 ml を用い、 H_2O_2 初濃度を $4.1 \times 10^{-3} \sim 4.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の間で 5 段階に変えて測定を行なった。なお、高 H_2O_2 濃度ではカタラーゼ反応液に *o*-dianisidine-peroxidase- NaN_3 混合液を添加した後、これをさらに同混合液で適宜稀釈してから等量の 50% H_2SO_4 を添加して吸光度を測定した。他はすべて標準条件にしたがった。

表2 カタラーゼ活性測定に対する酵素使用量の影響

relative concentration of catalase	volume of samples used for assay (μ l)	factors of dilution in reaction mixture	k' observed (min^{-1})	k' corrected to samples used for assay (min^{-1})
1.00	1	4.501	1.26	5.76×10^3
0.20	5	901	1.18	1.06×10^3
0.10	10	451	1.19	5.37×10^2
0.02	50	91	1.16	1.06×10^2
0.01	100	46	1.15	5.29×10^1
0.002	500	10	1.08	1.08×10^1

ウシ結晶カタラーゼ溶液を0.1M磷酸緩衝液、pH7.0で稀釈調整し、稀釈後ただちに標準条件でk'を求めた。

数はすべて一致し、本測定法が広範囲の基質濃度で成立することを示している。

ところで今回の方法では、測定に先立っての酵素試料の稀釈を最小限に止めるため、活性に応じて1~500 μ lの間の任意の酵素量を使用することとした。この差異が測定結果にどのような影響を与えるかを検討したのが表2である。すなわち、ウシ結晶カタラーゼ溶液を氷冷下で0.1M 磷酸緩衝液によって種々の濃度に稀釈し、稀釈後ただちにその1~500 μ lを用いて標準条件でk'を求めた。表のごとく、反応液中での酵素の稀釈率を補正すると、えられたk'はいずれもよく酵素濃度と対応する。この結果はここに示した範囲内で酵素量を任意に変えて活性を測定することが技術上支障のないものであることを示している。

つぎに本測定法に対する共存蛋白質の影響について検討した。図5(A)は種々の濃度のウシ血清アルブミン(BSA)存在下でカタラーゼ反応の時間経過を測定した結果である。また、図5(B)は反応0分における吸光度とBSA濃度との関係を示したものである。これらの結果から、BSAが共存した場合、ペルオキシ

図5(A) カタラーゼ反応におよぼすBSAの影響
カタラーゼ反応液に種々の濃度のBSAを加え標準条件で測定を行った。BSA濃度(g/dl): I, 0; II, 1.0; III, 2.0; IV, 3.0。

図5(B) 上記反応0分における吸光度とBSA濃度の関係

ダーゼ反応による発色に若干の影響があり、吸光度の低下をもたらすが、一定BSA濃度における吸光度の低下率は一定であり、したがってk'の測定には影響を与えないことが示された。

3. 生物試料のカタラーゼ活性

上述の方法で、諸種動物の溶血液および肝ホモジェネートの105,000 xg 上清画分についてカタラーゼ活性を測定し、表3に示した。これら生物試料を用いた

表3 各種動物の赤血球および肝カタラーゼ活性

species	catalase activity(k'/min/mg protein)
赤血球	
ヒト 成人	88.2
新生児	99.9
ウサギ	20.4
イヌ	2.3
アヒル	0.4
ウシガエル 成蛙	87.5
幼生	21.3
肝	
ウシガエル 成蛙	196.2
幼生	4.2

場合も反応はウシ結晶カタラーゼの場合と同様にすべて一次反応にしたがって進行した。

表のごとく、赤血球、肝ともにカタラーゼ比活性は種属によりかなり異なることがわかる。アヒルおよびイヌ赤血球カタラーゼ活性がとくに低いことは注目される¹⁴⁾。ウシガエル(*Rana catesbeiana*)およびその幼生の赤血球ならびに肝カタラーゼ活性にも著明な差異がみられたが、これらの詳細についてはすでに報告した¹⁵⁾。

図6はヒトおよびウシガエル赤血球カタラーゼの活性を測定する際に、酵素試料の稀釈が活性にどのような影響を与えるかを検討したものである。

実験方法の項で述べたように、酵素試料としては赤血球に2~2,000倍の水を加え氷冷中で1時間放置して種々の濃度の溶血液を調製し、その105,000 xg 遠沈上清の1~500 μ lをただちに使用して標準条件でk'を測定した。図の横軸には試料濃度の指標として、用いた溶血液中のヘモグロビン濃度を示した。図のごとく、ヒト溶血液ではヘモグロビン濃度 1×10^{-4} Mまで稀釈してもカタラーゼ比活性は低下しないのに反して、カエルでは溶血液の稀釈にともなってカタラーゼ比活性が極度に低下してくることが観察された。同様

図6 ヒトおよびウシガエル赤血球カタラーゼ活性におよぼす希釈の影響

各動物赤血球を2~2,000倍の水で溶血し、その105,000 $\times$ g 遠心上清を試料とした。試料調製後ただちにその1~500 μ l を使用して標準条件で k' を測定し、比活性を求めた。図の横軸には試料濃度の指標として、用いた溶血液中の Hb 濃度を、また縦軸には希釈による比活性の変動を%で示した。—△—, ヒト; —○—, ウシガエル幼生; —●—, 同成蛙。

の事実ウシガエル幼生溶血液でも観察され、カエル赤血球カタラーゼが、ヒトに比べてきわめて不安定であることが明らかになった。また、このようなカエル赤血球カタラーゼの希釈による失活は、10~40%グリセリン添加、あるいは0.5~3% BSA 添加などによっても阻止しえなかった。

考察

カタラーゼは生体各組織に普遍的に存在しその活性も強いが、反面種々の条件によって比較的容易に失活する。今回われわれは諸種の生物試料のカタラーゼ活性を正確に、またできるだけ複雑な操作によらないで測定することを目的として、上述のごとき方法の検討を試みた。この方法は原理的には Pütter ら^{7,8)}の方法にもとづくが、諸種の条件についてはすべてあらたな検討の結果定めたものである。

今回の方法の第1の利点は、活性測定が高濃度の蛋白質存在下でも妨げられないことである。第2の利点は、カタラーゼ反応を比較的低い基質濃度で、低温、短時間内に観察することにより、反応中の酵素の失活をできるだけ防いだ点である。また、反応に使用する酵素試料の量を1~500 μ l の間で任意とし、これによって反応に先立った試料希釈による酵素の失活を防止した。ウシ結晶カタラーゼを用いた検討の結果は、これらの条件設定が、満足すべきものであることを示している。

今回標準条件として用いた基質濃度は410 μ M であり、これは従来多くの方法が 10^{-2} ~ 10^{-3} M の基質を

用いているのに比べるとかなり低濃度である。また、図4の結果から明らかなように、低濃度条件がさらに必要な場合には41 μ M で測定することも可能である。反応時間に関しては、本法では0°C で20秒間隔で測定することを標準条件とした。従来、通常のピペット操作では、この間隔で正確な測定を行なうことは困難と考えられていたが、自動ピペットを用いることによって、上述のごとく良い精度がえられることがわかった。このことは必然的に活性測定において比較的高濃度の酵素試料を用いることを可能にし、したがって希釈による酵素失活を防ぐ結果ともなった。

図5(A, B)に示したごとく、終濃度3%のBSAは、本方法による反応速度定数の測定に影響を与えない。反応液中で酵素試料は基質溶液によって少なくとも1/10に希釈される(基質4.5 ml+酵素1~500 μ l)ので、上記の事実は酵素試料として30%蛋白質溶液が使用可能であることを示唆している。組織内のカタラーゼ活性が低濃度試料を使用しなければならぬとき、あるいは精製段階で夾雑蛋白が多量に共存する分画の活性測定を行なう場合などに、このことは大きな利点となる。

諸種動物のカタラーゼについてその安定性を検討してみると、哺乳動物では比較的安定と思われる条件においても、下等動物では基質濃度、希釈、pH、agingなどの差によって容易に失活する場合がある。ウシガエルおよびその幼生の赤血球カタラーゼは、その典型的なものと考えられる。図6に示したごとく、これら赤血球カタラーゼ活性について正確な測定を行うにあっても、本方法はきわめて有用であるといえる。

結論

生物試料のカタラーゼ活性を正確かつ容易に測定する目的で、Pütterの原理にもとづき、あらたな測定法の検討を行なった。

1) ペルオキシダーゼ反応系における *o*-dianisidine, peroxidase, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ の濃度ならびに反応時間について至適条件の検討を行なった。また、 H_2SO_4 添加による発色の増強および安定化について検討した。

2) カタラーゼ活性測定の標準条件を設定し、ウシ結晶カタラーゼを用いてその妥当性を検討した。その結果本条件下で反応経過は一次反応の速度論に一致し、速度恒数 k' と酵素濃度とは直線関係を示した。また、本法は基質濃度 10^{-3} ~ 10^{-5} M の広範囲で用いることが確かめられた。

3) 測定に用いる酵素量は 1~500 μ l の間で任意とし、反応前の試料希釈を最小限にとどめて、希釈による失活を防いだ。

4) ウシ血清アルブミンを用いて測定値におよぼす共存蛋白質の影響を検討し、終濃度 3 名のアルブミンが活性測定に影響を与えないことを明らかにした。

5) 諸種生物試料についてカタラーゼ活性を測定し、本方法の利点を確かめた。

文献

- 1) Maehly, A.C., and Chance, B.: "Methods of Biochemical Analysis" (D. Glick, eds.), 1, p. 357-408, Interscience Publishers, New York, 1954.
- 2) Chance, B., and Maehly, A.C.: Assay of catalases and peroxidase. "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), 2, p. 764-775, Academic Press, New York, 1955.
- 3) Nicholls, P., and Schonbaum, G.R.: "The Enzymes" (R.D. Boyer, H.A. Lardy, and K. Myrback, eds.), 2nd ed., 2, p. 147-225, Academic Press, New York, 1963.
- 4) Aebi, H.: Catalase. "Methods of Enzymatic Analysis" (H.U. Bergmeyer, eds.), 2nd English ed., 2, p. 673-684, Academic Press, New York, 1974.
- 5) Feinstein, R. N.: Perborate as substrate in a new assay of catalase. J. Biol. Chem., 180, 1197-1202, 1949.
- 6) Beers, R.F., and Sizer, I.W.: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem., 195,

133-140, 1952.

- 7) Pütter, J.: Eine Methode zur Bestimmung der Katalaseaktivität mit kleinen Substratkonzentrationen. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 329, 40-52, 1962.
- 8) Pütter, J., and Strufe, R.: Eine Verbesserung der enzymatischen Bestimmung von H_2O_2 . Anwendung auf die Glucose-Bestimmung. Clin. Chim. Acta, 15, 159-163, 1967.
- 9) Goldstein, D. B.: A method for assay of catalase with the oxygen cathode. Anal. Biochem., 24, 431-437, 1968.
- 10) Haining, J. L., and Legan, J. S.: Improved assay for catalase based upon steady state substrate concentration. Anal. Biochem., 45, 469-437, 1972.
- 11) Sinha, A.K.: Colorimetric assay of catalase. Anal. Biochem., 47, 389-394, 1972.
- 12) Hogeboom, G.H.: Fractionation of cell components of animal tissues. "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), 1, p. 16-19, Academic Press, New York, 1955.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., and Randal, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 14) Feinstein, R. N., Faulhaber, J. T., and Howard, J.B.: Acatalasemia in the dog and duck. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 1051-1054, 1968.
- 15) 大楠琢郎: カタラーゼの比較生化学. ウシカエル赤血球および肝カタラーゼの多様性と変態に伴う活性変化. 日医大誌, 42, 183-191, 1975.

(受付: 1976 年 1 月 20 日)