— 原 著 —

有核赤血球の NADPH 依存性メトヘモグロビン還元酵素*

ウシガエル赤血球酵素の精製と性質

伊藤 敏治

日本医科大学第1生化学教室 (主任: 岡崎太郎教授)

NADPH-dependent methemoglobin reductase in nucleated erythrocytes:
Purification and characterization of the bullfrog erythrocyte enzyme

Toshiharu Ito

The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School

The present paper describes the purification and characterization of NADPH-dependent methemoglobin reductase from the erythrocytes of bullfrog, *Rana catesbeiana*. The results obtained are as follows:

1) Two active protein components having different isoelectric points (pI) of 5.0 and 7.5 were separated and purified to homogeneity.

2) Both components had the same molecular weight of 22,000 upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. pI 5.0 component was faint yellow showing a broad absorption in the range of 400 ~ 450 nm, while pI 7.5 component was colorless showing no absorption in that range.

3) When pI 5.0 component was subjected to the second isoelectric focusing, the protein part of that component was observed to regenerate at pI 7.5, leaving the yellow color at acid pH. This fact strongly implies that the protein moiety of pI 5.0 component is identical to that of pI 7.5 component.

4) Both components catalysed the NADPH-dependent MB (or DCPIP, FMN, FAD) reduction. Kinetic studies revealed that both components were the same in their catalytic properties.

5) These structural and functional properties of the bullfrog enzyme very much resembled those of NADPH-flavin reductase in the human erythrocytes, indicating that the enzyme equivalent to that found in mammalian erythrocytes also exists in amphibian erythrocytes.

Key words: NADPH-methemoglobin reductase, nucleated erythrocyte, enzyme purification, *Rana catesbeiana*

緒 言

ヒト赤血球内には従来から2種 (NADH および NADPH 依存性) のメトヘモグロビン還元酵素の存在が知られている。このうち前者は Hultquist¹⁾ および Sugita ら²⁾ によって NADH-cytochrome b_5

reductase であることが明らかにされた。現在ではこの酵素系がメトヘモグロビン還元の主経路であると考えられており、またこの酵素が肝ミクロソームに存在する同名酵素ときわめて類似していること³⁻⁷⁾、赤血球の成熟に伴って膜成分より可溶化されること⁸⁾ などが報告されている。一方 NADPH 依存性酵素に関しては、Yubisui ら⁹⁾ によって、それがフラビン還元活性をもつことから NADPH-フラビン還元酵素と命名され、前者の欠損時 (遺伝性メトヘモグロビン血症) に役立つものと考えられている¹⁰⁻¹²⁾。また、この酵素活

Present address: The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

性が等電点泳動によって、pI 6 と pI 8 の 2 成分に分離されることが報告¹³⁾されている。しかし、この酵素の反応機構や生理的役割についてはいまだ不明の点が多い。

哺乳動物以外に、鳥類、爬虫類、両棲類、魚類の有核赤血球にも同様に 2 種のメトヘモグロビン還元酵素活性の存在することが報告¹⁴⁻¹⁷⁾されている。しかし、これらの有核赤血球内の酵素が哺乳動物のものと同じ分子種であるか否かは、現在まで全く明らかにされていない。著者は先に、ニワトリおよびウシガエル赤血球内の両酵素活性について検討し、これらの赤血球内では NADH 依存性酵素がすべて膜結合型であり、これに対して NADPH 依存性酵素は可溶性画分に存在すること、ならびにウシガエル幼生の赤血球中には後者の活性が見出せないことを報告¹⁷⁾した。

これらの知見に基づき、著者は有核赤血球におけるメトヘモグロビン還元機構を、哺乳動物赤血球との対比のもとに明らかにしたいと考え、今回成熟ウシガエル赤血球より NADPH 依存性酵素を精製して、その分子特性を検討した。その結果、本酵素がヒト赤血球内の NADPH メトヘモグロビン還元酵素(フラビン還元酵素)と同一の分子種と思われること、しかしながら本酵素の生理的役割が本質的にメトヘモグロビンの還元にあるとは考えにくいことが明らかになった。

実験材料および方法

(1) 実験材料

成熟ウシガエル(200~300 g)は松本実験動物社より購入した。

試薬類は、cytochrome c (ウマ心筋), flavin adenine dinucleotide (FAD), catalase および 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-DPG) を Boehringer Mannheim 社, 還元型 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), および還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を Oriental Yeast Japan 社, flavin mononucleotide (FMN), o-phenanthroline および p-chloromercuribenzoate (PCMB) を和光純薬社, superoxide dismutase (ウシ赤血球) を Sigma 社, methyleneblue (MB) を東京化成工業社, 2,4-dichlorophenolindophenol (DCPIP) を関東化学社, Sephadex G-75 を Pharmacia 社, DEAE-52 cellulose を Whatmann 社, Cellulofine GCL-300-m を生化学工業株式会社, 40% Ampholine (pH 3.5~10) を LKB 社より各々購入し使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

(2) 実験方法

1) 溶血液の調製

成熟ウシガエルを脊髄穿刺した後開胸し、大動脈穿刺によってヘパリン加採血した。採取した血液に 5 倍量の Krebs-Ringer 液を加え、2,500 rpm, 5 分遠心して上清およびパuffyコートを吸引除去した。この操作を 3 回繰り返してその都度注意深くパuffyコートを除き、赤血球を洗浄した後、得られた赤血球を 2 倍量の 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5 (20 mM, MgCl₂, 1 mM EDTA, 5.0 mM DTT, 0.1 mM PMSF を含む) に再浮遊し、アセトンドライアイスバス中で凍結融解を繰り返して完全に溶血させた。次いでこれを 105,000×g, 60 分, 4℃で遠心し、得られた上清を溶血液(可溶性画分)として使用した。

2) 酵素活性の測定

i. メトヘモグロビン還元活性

メトヘモグロビン還元活性の測定は、Agar and Harley の方法¹⁴⁾を部分的に修正し以下のように行った。また反応の基質としては、Hegesck らの方法¹⁸⁾に従って、ヒト赤血球より還元酵素を含まないメトヘモグロビン溶液を調製し使用した。

100 μmol 燐酸カリウム緩衝液, pH 7.0, 1 μmol EDTA, 200 nmol (ヘム当量) ヒトメトヘモグロビン, 適当量の酵素試料, および 25 μmol MB (または 50 nmol DCPIP, 200 nmol FMN, 200 nmol FAD) を含む反応液の全量を 2.0 ml とし、これに 300 nmol の NADPH (または NADH) 20 μl を添加して反応を開始した。反応開始後 3 分間の 576 nm における吸光度変化を記録し、同波長における酸素ヘモグロビンとメトヘモグロビンのミリモル吸光係数の差を 11.9 として¹⁹⁾メトヘモグロビン還元速度を求め、1 mg 酵素蛋白質あたりの活性 (nmol/min/mg protein) として表示した。

ii. cytochrome c 還元活性

上記と同様の条件でヒトメトヘモグロビンの替わりに 200 nmol cytochrome c を用いて還元活性の測定を行った。反応開始後 3 分間にわたって、550 nm における吸光度変化を記録し酸化型および還元型 cytochrome c のミリモル吸光係数の差を 21.1 として²⁰⁾cytochrome c 還元速度を求め、1 mg 酵素蛋白質あたりの活性 (nmol/min/mg protein) として表した。

iii. methylene blue (MB), 2,4-dichlorophenolindophenol (DCPIP) および flavin 還元活性

100 μmol カリウム燐酸緩衝液, pH 7.0, 1 μmol

EDTA, 適当量の酵素試料および 25 μ mol MB (または 50 nmol DCPIP, 200 nmol FMN, 200 nmol FAD) を含む反応液の全量を 2.0 ml とし, これに 300 nmol NADPH (または NADH) 20 μ l を添加して反応を開始した. 反応開始後 3 分間にわたって, 340 nm における吸光度変化を記録し還元型 NAD (P) のミリモル吸光係数を 6.22 として¹⁹⁾NAD (P) H の酸化速度を算出し, 1 mg 酵素蛋白質あたりの活性 (nmol/min/mg protein) をもって還元活性とした.

3) SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

精製酵素の SDS-PAGE は Laemmli の方法²¹⁾に従った. 厚さ 1 mm の slab gel を用い, stacking gel には 3.5%, separation gel には 18% アクリルアミドを使用した. 通常 2% SDS, 5% MSH 中で 100°C 5 分間の処理をした試料 30 μ g をゲル上端にのせ 20 mA, 6 時間の条件で泳動を行った. 染色には Coomassie brilliant blue-R, 脱色には 7.5% (v/v) 酢酸, 25% (v/v) メタノール混合液を使用した.

4) 蛋白質濃度の測定

試料の蛋白質濃度は Lowry らの方法²²⁾に従いウシ血清アルブミンを基準として定量した. 等電点分離後の酵素試料については, アンホラインを除くために約 100 倍量の 5 mM 磷酸カリウム緩衝液, pH 7.0, 0.5 mM DTT 溶液で 4°C 2 時間透析後, Lowry 変法を用いて以下のように蛋白質濃度を測定した. 蛋白質を含む試料 0.1 ml に蒸留水 3.0 ml を加え, 2% デオキシコール酸ナトリウム溶液 25 μ l を加えてよく混和後 15 分間室温に放置した. 次に 24% トリクロロ酢酸溶液 1 ml を加えてよく混和した後, 沈殿を 3,300 $\times$ g, 30 分間遠心して集めた. 得られた沈殿に 0.2 ml の蒸留水を加えた溶液を試料として Lowry 法にて蛋白質濃度を測定した.

なお, 分光学的測定はすべて日立 340 型または 200-1 型自記分光光度計によった.

5) NADPH 依存性メトヘモグロビン還元酵素の精製

前述の方法で調製した溶血液の 105,000 $\times$ g 遠心上清より以下の操作で酵素を精製した. 操作はすべて 0~4°C で行った.

i. Sephadex G-75 によるゲルろ過

溶血液 100 ml (蛋白量 8~9 g) を, あらかじめ 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT によって平衡化した Sephadex G-75 カラム (5 cm $\times$ 100 cm) に負荷し, 同じ緩衝液で

60 ml/h の速度で溶出した. 上記カラムの容量が限られているため, 通常同様の操作を 7~8 回繰り返して, 約 800 ml の溶血液を処理した.

ii. DEAE 52-cellulose カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-75 カラムより溶出した活性分画を集め, Immersible cx-10 (millipore) にて濃縮し, 2 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.2 (1 mM EDTA, 0.5 mM DTT を含む) に対して一夜十分に透析を行った. これを同緩衝液であらかじめ平衡化した DEAE 52-cellulose カラム (5 cm $\times$ 35 cm) に負荷し, 約 6 l の同緩衝液で洗浄した. 次に, 上記緩衝液とこの緩衝液に 0.3 M NaCl を加えた液各々 2,400 ml による直線勾配をかけて溶出を行った. 溶出速度は 60 ml/h で 11.5 ml ずつ分画採取した.

iii. Cellulofine GCL-300-m によるゲルろ過

DEAE 52-cellulose カラムクロマトグラフィーから溶出した活性分画を集め, 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT を含む緩衝液であらかじめ平衡化した Cellulofine GCL-300-m カラム (3.4 $\times$ 92 cm) に負荷し, 同緩衝液で 60 ml/h の速度で溶出した. 6 ml ずつ分画採取し, 活性分画を集め Immersible cx-10 にて約 3 倍に濃縮した後 5 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT を含む緩衝液に対して一夜透析を行った.

iv. 等電点泳動 (第 1 回)

透析後の試料 15 ml を集め, Vesterberg の方法²³⁾に従い LKB 社製 110 ml 垂直カラムならびに carrier Ampholyte (pH 3.5~9.5) を用いて等電点分画を行った. 試料はカラム中央に分割して加え, 通電は 500 V 定電圧で 40 時間とした. この条件下で活性は pI 5.0 および pI 7.5 の 2 成分に分画された.

v. 等電点泳動 (第 2 回)

上記の等電点泳動で得られた pI 5.0 の活性分画を Immersible cx-10 にて濃縮し, その 15 ml を再び同様のカラムを用いて等電点泳動した. ただし, carrier Ampholyte は pH 4~6 のものと pH 3.5~10 のものを 4 対 1 の割合で混合したものをを用い, 通電は 500 V 定電圧, 70 時間とした.

vi. ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

一方, 第 1 回の等電点泳動によって得た pI 7.5 の分画を Immersible cx-10 にて濃縮し, その 19 ml を 100 倍量の 5 mM 磷酸カリウム緩衝液, pH 7.0 (0.5 mM DTT を含む) に対して透析した後, LKB 社製

ULTROCHROM GTi HPLC システムを用いてハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを行った。使用したカラムはヒドロキシアパタイトカラム (7.5 mm×100 mm)(東亜燃料工業株式会社), 溶出液は A 液 : 5 mM 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0, および

B 液 : 500 mM 燐酸カリウム緩衝液 pH 7.0 を用いた。グラジエントは 100%A 液→100%B 液/45 分, 流速は 0.7 ml/min, 温度は室温の条件で行った。試料は 1 回に 0.5 ml (約 1 mg 蛋白質を含む) ずつ注入し, 最終的に 15 ml を処理した。活性分画を集め Immersi-

Table 1 Purification of NADPH-methemoglobin reductase from bullfrog erythrocytes

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (nmol/min)	Specific Activity (nmol/min/mg)	Yield (%)	Purification Factor
1. Hemolysate	76,870	69,183	0.9	100	1
2. Sephadex G-75	8,820	69,378	7.9	100	9
3. DEAE 52-cellulose	1,016	82,689	81.4	120	90
4. Cellulofine GCL-300-m	202	66,554	329	96	365
5. 1st IEF					
pI 5.0	25.6	2,258	88	3.2	98
pI 7.5	44.1	6,628	150	9.5	167
6. 2nd IEF					
pI 5.0	3.2	727	227	1.0	252
Hydroxyapatite(HPLC)					
pI 7.5	5.0	979	196	1.4	218

Enzyme activity was measured by following the reduction of methemoglobin at 576 nm in the presence of 0.15 mM NADPH and 12.5 mM methylene blue as described in Methods, and was expressed in terms of nmole methemoglobin reduced per minutes.

Fig. 1 Elution profile of NADPH-methemoglobin reductase from DEAE-cellulose column

Fractions eluted from Sephadex G-75 (2,400 ml, 8,820 mg protein) was applied to the column (5 cm×35 cm) equilibrated with 2 mM Tris-HCl buffer, containing 1 mM EDTA and 0.5 mM DTT, pH 8.2. After the washing with 6,000 ml of the same buffer, the column was developed with a linear gradient formed between 2,400 ml/ each of 2 mM Tris-HCl buffer containing 1 mM EDTA and 0.5 mM DTT, pH 8.2, and 0.1 M NaCl in the same buffer. The flow rate was 60 ml/h and fractions of 11.5 ml were collected. The enzyme activity was assayed as described in Methods.

ble cx-10 にて約 4 倍に濃縮し、次に使用するまで 4℃ で保存した。

結 果

1. 酵素の精製

従来ヒト赤血球に存在する NADPH 依存性メトヘモグロビン還元酵素は *in vitro* で NADPH を電子供与体として methylene blue の存在下に強いメトヘモグロビン還元活性を示し、また DCPIP を直接還元する強い diaphorase 活性を示すことが知られている。われわれはすでにウシガエル赤血球でもこれと同様の還元活性のあることを報告¹⁷⁾した。したがって、今回のウシガエル赤血球からの本酵素の精製に際しては、全過程を通じて methylene blue 存在下でのメトヘモグロビン還元活性を測定して精製の指標とした。

精製の全過程を Table 1 に示した。また、Fig. 1 は DEAE-52 cellulose カラムクロマトグラフィー (Step 3) の溶出曲線である。Fig. 1 のごとく酵素活性は NaCl 濃度 0.02 M 付近に主ピークとして溶出された。Step 1~4 の過程で夾雑蛋白質 (主としてヘモグロビン) の大部分が除去され、これらの操作はきわめて効

Fig. 2 Isoelectric focusing of NADPH-methemoglobin reductase

The enzyme sample eluted from a Cellulofine GCL-300-m column (33 ml, 202 mg) was subjected to isoelectric focusing performed by using a LKB 8101 column and carrier ampholine, pH 3.5~9.5. Focusing was carried out at 500 V for 40 hs. 1.5 ml fractions were collected and the activity (solid line) and the absorbance at 280 nm (dotted line) were measured. pI 5.0 and pI 7.5 fractions each indicated by bar were pooled separately.

Fig. 3 Elution profile of hydroxyapatite column chromatography (HPLC)

A hydroxyapatite column chromatography was performed for the pI 7.5 fraction separated by the first isoelectric focusing, using a LKB ULTRO-CHROM GTi HPLC system.

Eluent: solution A; 0.005 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0

solution B; 0.5 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.0

Gradient: 100%A-100%B/45 min

Flow rate: 0.7 ml/min

Detection: 0.64 AUSF, 280 nm

Injection volume: 500 μ l

Arrow indicates the enzyme fraction.

果的であった。

Fig. 2は最初の等電点泳動(Step 5)の結果である。図のごとく、酵素活性はこの過程で pI 5.0 と pI 7.5 の 2 成分に分離した。指吸¹³⁾は、ヒト赤血球の NADPH メトヘモグロビン還元酵素にも等電点の異なる 2 成分(pI 6, 8)が存在することを報告しており、今回の事実はこれとよく一致する。pI 5.0 の成分は再度の等電点泳動で、また pI 7.5 の成分はハイドロキシアパタイトカラムを用いた HPLC (**Fig. 3**) で、各々最終的に 258 倍 (pI 5.0), 218 倍 (pI 7.5) に精製した。注目すべきことに、第 2 回の等電点泳動(Step 6)で pI 5.0 の成分は再び pI 5.0 と pI 7.5 の 2 成分に分離した。著者は現在これを何らかの理由により、pI 5.0, 7.5 の両成分が互いに移行する結果と考えている(後述)。

酵素の比活性に関しては、Step 4 から Step 5 への段階でかなりの低下が認められた。これが蛋白質の変性によるものか、あるいは何らかの補助因子が除去されたためかは現在のところ不明である。

2. 精製酵素の電気泳動および吸収スペクトル

Fig. 4は精製酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。両成分とも単一なバンドとして泳動され、これから分子量はともに 22,000 と求められた。この値はヒト赤血球内の酵素と一致する¹⁹⁾。

両成分の吸収スペクトルを **Fig. 5** に示した。図のご

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme (pI 5.0 and pI 7.5)

The purified samples were applied to a 18% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS with 0.05% bromophenol blue as a tracking dye. The markers used were BSA (mol. wt. 64,000), creatine kinase (mol. wt. 40,000), chymotrypsin (mol. wt. 25,700), and lysosome (mol. wt. 14,300). Gels were stained with Coomassie blue; lane 1; markers, lane 2; pI 5.0, lane 3; pI 7.5.

とく pI 5.0 の成分は、可視領域で 420 nm 付近になだらかな低い吸収を示し、紫外領域では 285 nm 付近に肩吸収を、270 nm に吸収極大を示した。一方 pI 7.5 の成分は可視領域に全く吸収を示さず、270 nm に単一なピークを示した。pI 5.0 の成分は肉眼的に淡黄色を呈し、pI 7.5 成分は無色であった。前者の色調は 420 nm 付近の吸収に由来すると思われるが、試料に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加してもスペクトル上に変化は認められなかった。

以上のごとく、精製した pI 5.0 および 7.5 の両酵素成分は可視部吸収スペクトルに若干の差異を示した。しかしながら、以下に述べる反応上の諸特性に関しては、両成分の間にほとんど有意の差が認められなかった。したがって以下の記述には pI 5.0 の成分について得られた結果のみを記載した。

3. 酵素活性の pH 依存性

Fig. 6に NADPH を電子供与体としたときの本酵素 (pI 5.0 の成分) による NADPH-methylene blue-メトヘモグロビン還元活性 (NADPH-MB-metHb 反応) および DCPIP 還元活性 (NADPH-diaphorase 反応) の pH 依存性を示した。NADPH-MB-metHb 反応の測定には、低 pH 領域でクエン酸緩衝液、高 pH 領域で磷酸カリウム緩衝液を用いた。NADPH-diaphorase 反応は、DCPIP が pH 6 以下の酸性領域で不安定なため、磷酸カリウム緩衝液の領域でのみ測定を行った。

Fig. 5 Absorption spectra of the purified enzyme (pI 5.0 and pI 7.5)

The spectra were measured in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.0.

Fig. 6 Effects of pH on the NADPH-MB-methemoglobin reductase and NADPH-diaphorase activity (pI 5.0)

The assay conditions were as described in Methods: solid lines, NADPH-MB-methemoglobin reductase activity (open circle; 50 mM citrate-phosphate buffer, pH 4.5~6.5, closed circle; 50 mM potassium phosphate buffer, pH 5.5~8.0), dotted line, NADPH-diaphorase activity.

結果は図のごとく NADPH-MB-metHb 反応は pH 5.0 に、NADPH-diaphorase 反応は pH 6.5 に至適 pH を示した。Yubisui ら¹⁹⁾はヒト赤血球の NADPH-flavin 還元酵素について、NADPH-FMN 還元反応および NADPH-diaphorase 反応の pH 依存性を報告しているが、今回の結果は Yubisui らの値ときわめて良く一致し、興味深い。

4. 電子供与体および受容体に対する反応特異性

Table 2 に NADH および NADPH を電子供与体として諸種の電子受容体に対する本酵素 (pI 5.0 の成分) の還元活性を pH 7.0 において測定した結果を示した。表に明らかなごとく本酵素は NADH-MB 反応でわずかな活性を示すほかは、明らかに NADPH 依存性を示した。NADPH を電子供与体とした場合、MB および DCPIP の両人工色素に対する還元活性が最も強く、これに対して FMN に対する還元活性は MB の場合の 1/6 であり、FAD に対する活性は 1/40 にすぎなかった。また、フェリサイアナイドに対しては活性を示さなかった。

一方、メトヘモグロビンおよび cytochrome c に対

Table 2 Specificity of NADPH-methemoglobin reductase of bullfrog erythrocytes for various electron acceptors

Electron Acceptors	(mM)	NADH (nmol/min/mg)	NADPH (nmol/min/mg)
MB	(12.5)	6.1	151.6
DCPIP	(0.025)	0	252.8
FMN	(0.1)	0	25.2
FAD	(0.1)	0	4.0
Ferricyanide	(0.2)	0	0
metHb	(0.1)	0	0
cyt. c	(0.1)	0	0

The activity was measured by following the oxidation of NAD(P)H at 340 nm in the assay mixture as described in Methods. Zero means that there was no significant change in the absorbance as compared with control in which the enzyme had been omitted.

する還元活性も全く認められず、これらの蛋白質が直接還元 of 基質にはなりえないことが示唆された。

Fig. 7 に pH 7.0 において、本酵素 (pI 5.0 の成分) の NADPH および FMN に対する K_m 値を測定した結果を示した。図から NADPH に対する K_m 値は 1.2×10^{-6} 、FMN に対する K_m 値は 3.6×10^{-5} と求められた。これらの値はともに Yubisui ら¹⁹⁾がヒト赤血球の酵素について得た値とほぼ一致する。

5. メトヘモグロビンおよび cytochrome c 還元活性

すでに述べたように、本酵素はメトヘモグロビンおよび cytochrome c を直接に還元しないが、特定の色素 (中間電子伝達体) の存在下では両者に対して還元活性を示す。本酵素の生理的機能を検討する目的で MB、FMN、および FAD を中間電子伝達体とした場合の両蛋白質に対する還元活性を測定した。結果を Table 3 に示した。反応はいずれも強い NADPH 依存性を示し、NADH を電子供与体とした場合には MB の存在下でのみ弱い還元活性が認められた。表から、メトヘモグロビンおよび cytochrome c いずれの場合でも、MB を介する反応に比べて生理的物質である FMN または FAD を介した反応速度が著しく低いこと、ならびにすべての場合にメトヘモグロビンよりも cytochrome c に対する還元速度のほうが高いことが指摘される。この事実は本酵素の生理的役割がフラビンを経たメトヘモグロビンの還元にあることに疑義をいだかせるものである。

Fig. 7 Km for NADPH and FMN of NADPH-methemoglobin reductase (pl 5.0) of bullfrog erythrocytes

The enzyme activity was measured in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA, at 25°C, by following the oxidation of NADPH at 340 nm. The Km for NADPH was determined in the presence of 100 μ M FMN and the Km for FMN was in the presence of 150 μ M NADPH, respectively. All reactions were started by the addition of NADPH.

Table 3 Reduction of methemoglobin and cytochrome c by NADPH-methemoglobin reductase of bullfrog erythrocytes in the presence of electron mediators

Reaction	NADH (nmol/min/mg)	NADPH (nmol/min/mg)
MB-metHb	3.5	200.0
FMN-metHb	0	20.0
FAD-metHb	0	6.2
MB-cyt. c	14.9	297.7
FMN-cyt. c	0	74.4
FAD-cyt. c	0	13.2

Assay mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.5 mM EDTA, 0.15 mM NAD(P)H, electron mediators (12.5 mM MB, 0.1 mM FMN or 0.1 mM FAD), 0.1 mM metHb or cytochrome c (cyt.c), and an appropriate amount of enzyme. The reaction was started by the addition of NAD(P)H. The activity was measured by following the reduction of methemoglobin at 576 nm or cyt. c at 550 nm, as described in Methods.

6. 酵素活性に影響を及ぼす諸因子

Table 4 に、本酵素反応に対する諸種阻害剤および金属などの影響を NADPH-FMN-cytochrome c 反応を用いて検討した結果を示した。表に明らかなごとく、反応は pCMB および o-phenanthroline によって強く阻害されたが、KCN、諸種の金属イオンならびに catalase および SOD は反応にほとんど影響を与えな

Table 4 Effects of various reagents on the enzyme activity

Addition	(mM)	Relative activity (%)
None		100
pCMB	(0.5)	12
o-phenanthroline	(0.5)	22.9
KCN	(1.0)	93
Cu ²⁺	(0.1)	112
Zn ²⁺	(0.1)	112
Fe ²⁺	(0.1)	96
catalase	(650 units)	105
SOD	(30 units)	79.5

The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 0.15 mM NADPH, 0.1 mM FMN, 0.1 mM cyt.c, the effectors, and an appropriate amount of the enzyme. The reaction was started by the addition of NADPH and the activity was measured by following the reduction of cyt.c at 550 nm.

かった。また、ここには示さなかったが、本酵素による NADPH-FMN 還元反応および NADPH-diaphorase 反応も、pCMB および o-phenanthroline (ともに 5 mM) によって強く阻害された。これらの結果から、本酵素反応には SH 基が必須であることが示唆される。一方 catalase および SOD に関しては、後者に若干の阻害効果が認められたが、この結果から本酵素反応に本質的に活性酸素が関与するとは考えられない。

考 察

すでに報告¹⁷⁾したように、有核赤血球における NADPH 依存性メトヘモグロビン (metHb) 還元酵素活性は、可溶性画分のみ存在した。したがって今回その精製にあたっては、溶血液の 105,000×g 上清を用いた。精製過程の指標には NADPH-MB-metHb 還元活性を用いたが、NADPH-diaphorase 活性は DCPIP がカエル溶血液中中で非特異的に還元されるため用いなかった。

結果に示したように、酵素活性は等電点の異なる 2 成分、pI 5.0 および pI 7.5 に分離した。これはヒト赤血球の NADPH-フラビン還元酵素が pI 6 と pI 8 に分離する¹⁸⁾ことと対比され、特記すべき事柄である。精製した両成分の分子量は同一であったが、pI 5.0 の成分は淡黄色を示し、pI 7.5 の成分は無色であった。前者は紫外部のほかに 400~450 nm に明らかな吸収を示し、何らかの色素を結合しているものと思われた。興味あることに、pI 5.0 の成分を再度カラムまたはゲルベッドによる等電点泳動にかけると、その蛋白質部分が段階的に色素と分離して pI 7.5 の成分に移行する事実が観察された。しかもこのように新生した pI 7.5 の成分の酵素活性は pI 5.0 と同一であった。この事実から著者らは両成分が同一蛋白質であると考え、現在両者の N 末端アミノ酸配列を解析しているが、これまでに N 末端から 27 の配列が全く等しいことを確認している (阿部靖子、伊藤敏治：未発表)。したがって、両者は同一の蛋白質であり、pI 5.0 の成分は pI 7.5 の成分に何らかの色素が結合したものと結論される。指吸¹⁹⁾はヒト赤血球の pI 6 の成分が黄色の色素を結合していることを報告している。したがって、この事実からもヒトとウシガエル両赤血球のこの酵素は同一の性質を有することが示唆される。色素の同定はいまだ行っていないが、その吸収スペクトルからみて、ヘムの代謝物の可能性が強い。この物質の同定は本酵素の生理的機能を解明する上で重要と考えられる。

前述したように、今回精製した両 pI 成分の諸反応における特性はほとんど同一であった。したがって、反応特性に関しては pI 5.0 の結果のみを記載したが、pI 7.5 の結果もこれと等しい。両者はともに強い NADPH 依存性を示し、これを電子供与体として MB および DCPIP に強い還元活性を示した。また FMN および FAD を還元したが ferricyanide は還元しなかった。metHb および cytochrome c を直接還元しな

かったが、MB またはフラビンを介して両者を還元した。これらの反応における両 pI 成分の比活性はほぼ同じであった。一方、今回測定したすべての反応特性について、これをヒト赤血球内の酵素と比べると、FMN 還元反応の比活性が 25.2 nmol/min/mg (ヒトでは 370 nmol/min/mg)¹⁹⁾と低かった点を除いてヒト酵素の特性ときわめてよく一致した。

以上の知見を総合すると、ウシガエル有核赤血球にもヒトをはじめとする哺乳類赤血球と同一の分子特性をもった NADPH 依存性酵素が存在すること、また反応特性の相似性からも、有核赤血球における本酵素の生理的役割も同一であることが推論される。

Yubisui ら⁹⁾はヒト赤血球における本酵素の生理的機能をフラビン (FMN) の還元にあると考え、フラビン還元酵素と名付けた。この考えによれば、metHb 還元機構は

であり、本酵素はフラビンの還元のみを触媒し、metHb は FMNH₂ によって非酵素的に還元される。また前者の反応 (フラビン還元) が後者に比してきわめて遅く、律速段階と考えられている。ウシガエル酵素についても、その還元活性は低かったが、NADPH および FMN に対する K_m 値はヒト酵素の値とよく一致するので、同様の生理的機能を考えるのが妥当かもしれない。しかしながら、今回ウシガエル酵素について NADPH-FMN-metHb および NADPH-FMN-cytochrome c 反応を測定したところ、cytochrome c 還元反応の速度が metHb 還元反応より約 3.5 倍大きい結果を得た。この事実は本酵素が FMN の還元段階にのみ関与し、またそれが律速段階であるという論議に矛盾しており、本酵素が metHb ないしは cytochrome c 分子とも相互作用を有することを示唆している。そうであるとすれば cytochrome c のほうがよい基質であり、metHb が本酵素の特異的基質とはいえない。これらの考えは、本酵素には未知の基質がありその還元が赤血球内における本酵素の生理的機能である可能性を生じさせるものである。

結 論

1) ウシガエル赤血球の溶血液 105,000×g 上清から、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、等電点泳動によって NADPH 依存性メトヘモグロビン還

元酵素を精製した。

2) 酵素活性は、等電点泳動によって pI 5.0 および pI 7.5 の 2 成分に分離した。pI 5.0 成分の吸収スペクトルは紫外領域の吸収の外に可視領域 (400~450 nm) になだらかな吸収を示した。pI 7.5 成分には可視領域の吸収が認められなかった。しかしながら両者の分子量は SDS-PAGE 上ともに 22,000 であり、反応特性にも差異がなく、両成分は本質的には同一の蛋白質であると考えられ、pI 5.0 成分は pI 7.5 成分に何らかの色素が結合したものと考えられた。

3) 酵素活性は NADPH に強い依存性を示し、至適 pH、諸種電子受容体に対する反応特性、ならびに諸種活性阻害物質に対する反応特性などいずれもヒト赤血球の NADPH-フラビン還元酵素と類似していた。

4) 以上の分子特性から本酵素がヒト赤血球の酵素と同一分子種であると考えられるが、メトヘモグロビン還元速度よりも cytochrome c 還元速度が大きいなど、生理的機能がメトヘモグロビン還元以外にある可能性が示唆された。

稿を終るにあたり、直接御指導いただいた第 1 生化学教室阿部靖子博士、目澤憲一博士(現日本医科大学付属病院小児科)、ならびに教室員各位に深く感謝致します。

文 献

- Hultquist, E.D.: Soluble cytochrome b_5 reductase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 275, 62~73, 1972.
- Sugita, Y., Nomura, S. and Yoneyama, Y.: Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 246, 6072~6078, 1971.
- Mihara, K. and Sato, R.: Partial purification of NADPH-cytochrome b_5 reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J. Biochem.*, 71, 725~735, 1972.
- Spatz, L. and Strittmatter, P.: A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b_5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J. Biol. Chem.*, 248, 793~799, 1973.
- Kuma, F., Prough, R.A. and Masters, B.S.S.: Studies on methemoglobin reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 172, 600~607, 1976.
- Borgese, N., Macconi, D., Parola, L. and Pietrini, G.: Rat erythrocyte NADH-cytochrome b_5 reductase. *J. Biol. Chem.*, 257, 13854~13861, 1982.
- Goto-Tamura, R., Takesue, Y. and Takesue, S.: Immunological similarity between NADH-cytochrome b_5 reductase of erythrocytes and liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 423, 293~302, 1976.
- Slaughter, S.R. and Hultquist, D.E.: Membrane-bound redox proteins of the murine friend virus-induced erythroleukemia cell. *J. Cell Biol.*, 83, 231~239, 1979.
- Yubisui, T., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M. and Yoneyama, Y.: NADPH-flavin reductase in human erythrocytes and the reduction of methemoglobin through flavin by the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76, 174~182, 1979.
- Kaplan, J.C. and Chirouze, M.: Therapy of recessive congenital methemoglobinemia by oral riboflavin. *Lancet*, II(8098), 1043~1044, 1978.
- Matsuki, T., Yubisui, T., Tomoda, A., Yoneyama, Y., Takeshita, M., Hirano, M., Kobayashi, K. and Tani, Y.: Acceleration of methemoglobin reduction by riboflavin in human erythrocytes. *Br. J. Haematol.*, 39, 523~528, 1978.
- Hirano, M., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M., Shimizu, S., Nagamura, Y. and Yoneyama, Y.: Congenital methemoglobinemia due to NADH methemoglobin reductase deficiency; Successful treatment with oral riboflavin. *Br. J. Haematol.*, 47, 353~359, 1981.
- 指吸俊次, 田村実, 竹下正純: 黄色色素を結合したヒト赤血球の NADPH-フラビン還元酵素. *生化学*, 57, 869, 1985.
- Agar, N.S. and Harley, J.D.: Erythrocytic methemoglobin reductase of various mammalian species. *Experientia*, 15, 1248~1249, 1972.
- Board, P.G., Agar, N.S., Gruca, M. and Shine, R.: Methemoglobin and its reduction in nucleated erythrocytes from reptiles and birds. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 57, 265~267, 1977.
- Freeman, L., Beiting, T.L. and Huey, D.W.: Methemoglobin reductase activity in phylogenetically diverse piscine species. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 73, 27~30, 1983.
- Ito, T., Mezawa, K. and Okazaki, T.: NADH- and NADPH-dependent reduction of methemoglobin in the nucleated erythrocytes from hen and bullfrog. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 78, 683~686, 1984.
- Hegesh, E., Calmanovici, N. and Avron, M.: New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, 72, 339~344, 1968.
- Yubisui, T., Matsuki, T., Takeshita, M. and Yoneyama, Y.: Characterization of the purified NADPH-flavin reductase of human erythrocytes. *J. Biochem.*, 85, 719~728, 1979.
- Bassey, V.: The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 255~258, 1959.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685, 1970.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275, 1951.
- Vesterberg, O.: Isoelectric focusing of proteins. *Methods Enzymol.*, 22, 389~412, 1971.

(受付: 1986年12月24日)