結晶性カタラーゼに関する研究

(第5報) 酸處理による不可逆的失活と吸収スペクトルの變化に就て

白 川 正 治

(九州大學農學部農藝化學教室)

昭和24年5月27日受理

Studies on the Crystalline Catalase.

Part V. Irreversible Inactivation and Changes of Absorption Bands of Catalase by Acid Treatment.

by

Masaharu SHIRAKAWA

Laboratory of Agricultural Chemistry, Kyūshū University)

カタラーゼの活性基がヘミンであり、ヘモグロビンとはFeの原子價を異にするものである事はカタラーゼが結晶として分離される前から知られていた。⁽¹⁾⁽²⁾ SUMNER, DOUNCE⁽³⁾によれば数回再結した純粋なカタラーゼ (Kat. f., 32,000) はその1分子に對しヘミン及び青色化合物をそれぞれ2分子宛檢出されるが、併し後者はおそらく酸處理によつてヘミンから二次的に生じたものでカタラーゼの活性には關與しないという。LEMBERG⁽⁴⁾は結晶性カタラーゼを酸性アセトンで處理してビリバーヂンを分離確認し次でカタラーゼ中にはその前驅物質としてバードヘモクロモゲン様の物質が存在し、カタラーゼの酸失活の不可逆性の原因がその不可逆的分解に在るとしている。

ヘミン系活性蛋白質に於てはフラビン酵素やビリヂン酵素と異なり擔體蛋白質と活性基とに可逆的に分離する事は困難であるとされていた。併しヘモグロビンでは ANSON, MIESKY⁽⁵⁾の詳細な研究によつてその可能性が立證されている。チトクローム c 及びカタラーゼ等での試みは何れも成功していない。最近 GJESSING, SUMNER⁽⁶⁾によつて酸處理によつて分離したヘミン及び變性蛋白質からパーオキシダーゼの合成がおこなわれた。AGNER⁽⁷⁾は高純度の馬肝カタラーゼを稀酸に對し透析し2成分に分離しそれ等を再び合する事によりカタラーゼ作用の回復を認めたが SUMNER⁽⁸⁾はそれを否定している。

カタラーゼの可逆的分解が技術的に不可能であるとすればカタラーゼはヘモグロビンやパーオキシダーゼ等と異なる化學構造上の特性をもっている筈である。その特性は活性基に在るか或ひは擔體に在るか或ひは又その兩者に在るか何れかである。

著者は先づ可逆的分解が果して不可能であるか否かを検討するため ANSON, MIESKY 法 (酸性アセトン法) 及び透析法によつてカタラーゼを處理し2成分に分離した後、兩者から再びカタラーゼの合成を試みたが成功しなかつた。ヘモグロビンやパーオキシダーゼの場合と同様な方法ではカタラーゼの失活は全く不可逆的である。

著者等の方法⁽⁹⁾で牛肝から分離精製した結晶性カタラーゼは Kat. f. 30,000~32,000、分子量約 250,000 (擴散、粘度法)⁽¹⁰⁾を有し 0.09~0.12% の鐵を含有している。鐵の含量にはかなりの變動があり、必ずしも Kat. f. と平行しない。酸處理によつて起るカタラーゼの失活は全く不可逆的であつて pH 3.5~2.0 の間で急速に起る。その際ヘミンの一部が析出するがその析出量は失活の割合と類似した傾向を示すけれども比例的ではない。析出したヘミンを除去した殘液は緑青色を帯びその色調は鐵鹽濃度の増加と共に明瞭になる (必ずしも強さを増す訳ではない)。pH 2.5 に於けるカタラーゼの失活速度は單分子的であつて蛋白變性の可能性を暗示している。處理酸度と 407 mμ の Soret 吸收帶の關係を觀察すると pH 6.8~3.7 の間では殆ど變化は認められない。更に酸度を増加するに伴い、吸收は次第に減衰し終には 392 mμ に弱い吸收が現われる。アルカリ側では Soret 帶は pH の増加と共に次第に擴散して不閉鎖になるがその位置を變化しないようである。中性のカタラーゼ溶液は

277 m μ 附近に糖蛋白質の強い吸収を示すが酸性側では殆ど変化せず、アルカリ側では次第に長波長部に吸収し終には Soret 帯を覆ひ蛋白質の顕著な酸性を示す、又アルカリ側では 392 m μ の吸収は全然認められない。

STERN¹²⁾はカタラーゼの Soret 帯以外の可視部に現われる3個の吸収帯(65, 540, 505 m μ)の pH 関係を調査し pH 5~10 では変化なく、アルカリ側で 540, 505 m μ の吸収が消失し、575, 545 m μ に新しい吸収が現われる事を認めている。Soret 帯に就ては記載がないが此の吸収はおそらくポーフリン核に起因するものと考えられヘミンと糖蛋白質の結合関係を問題にする場合には重要である。

酸性側に於ける Soret 帯の変化は恰も 407, 392 m μ の變遷を想像させるが、併し吸収曲線より見て 392 m μ の吸収は始めから存在したものと見做すべきである。407 m μ の強い吸収で覆われていた 392 m μ の弱い吸収が前者の減衰の結果現われたものと考えられる。従つて SUMNER, LEMBERG の云う如く酸處理によるポーフリン環の開裂が起つたと云ふ事實は認められない。アルカリ側に於ける 392 m μ の吸収の消失は一見上述の推定と相反するようであるが、併し酸處理により得られた青色溶液がアルカリ側で淡黄色に変化する事はアルカリ側に於ける 392 m μ の吸収の消失と密接な関係にあり 392 m μ の吸収は青色物質の属性であると思われる。

以上の結果よりすればカタラーゼの不可逆的分解の原因が酸處理によるヘミン分解の不可逆性に在ると云う推定に対する確證は見出せない。更に著者のメトヘモグロビンに就ての實驗¹³⁾によればカタラーゼと同様な處理では青色物質の生成は認められない。此等の事實はカタラーゼがヘミン以外の不安定な第2の活性基を有するか、或はヘモグロビン、パーオキシダーゼに比して著るしく巨大な糖蛋白質が酸により容易に不可逆的に變化するかの何れかによつて説明される。吸収スペクトルに對する限り蛋白質の變性は認められないが併し蛋白質の吸収の本質から見てもわかる様にそれは明らかに絶對的ではない。此の問題に就ては尙大に詳細を論ずる積りである。

實 驗

(I) 酵素の調製並びに定量法

結晶性カタラーゼの調製、再結晶及び Kat. f. の測定は前報¹⁰⁾¹³⁾記載の方法に従つた。鐵の定量には STRAUB 法¹⁴⁾及び STUART 法¹⁵⁾を比較検討して見たが前者では滴定終點不明瞭で微量定量に適しなかつた爲 STUART 法を採用した。標準鐵溶液には正しく調製した 0.1 M. FeCl₃ 溶液(重量法により決定)を測定のために適當に稀釋して用いた。比色には DUBOSC の比色計を使用した。

(II) カタラーゼ分解の不可逆性

4回再結したカタラーゼ(Kat. f., 30,800, Fe, 0.10%)を次の如く處理して蛋白溶液、ヘミン溶液、青色溶

液の3區分に分けた。蛋白溶液の調製に際しては ANSON, MIRSKY の記載を考慮して中和後直ちに使用する事をさせ、豫め pH 6.0 で5時間放置した後 pH 7.0 にした。3區分の最終容積をすべて 10 cc となる如く操作し、それぞれ 5cc 宛をとり (I+II), (I+II+III) の2組に就て作用力を測定した。尚各區分を混じした後小量の 0.1 M KH₂PO₄ を加え pH 7.4 及び 8.0 とし3時間 0°C に保ちたる後定量をおこなつた。結果を Table 1 に示した。表中稀釋後のカタラーゼ原液に對應する測定量を示す。k は測定した單分子反應速度恒數, k₀ はそれを原液 1cc に還元した値である。カタラーゼ原液の 595 單位の値に對し可逆法を施した場合は僅かに 0.03~0.06

* 大塚に發表の豫定

Table I

	Total vol.	Vol. for determination	Degree of dilution	pH	k	k ₀
Original enzyme solution	cc 5	cc 5	0.0002	6.8	0.119	595
I+II	10	5	0.4	8.0	0.020	0.050
				7.4	0.026	0.065
I+II+III	15	5	0.6	8.0	0.018	0.080
				7.4	0.017	0.028

程度の活性しか認められず事實上カタラーゼ作用の回復は認められない。

尚カタラーゼ溶液を 0.01 N-HCl に對して 0~2°C で 24 時間透析すると内外液共に作用力が認められない。透析外液を中和濃縮し中和した内液に加えても作用は回復しない。此の場合膜外に透析されるヘミンは極めて少量であり大部分は膜内に沈殿する様である。青色物質も透析されない。内液の一部をとつて遠心分離すると緑青色の溶液を得る。

(B) 酸處理によるカタラーゼの失活

酸處理によるカタラーゼの失活速度を次の如くして測定した。カタラーゼ (Kat. f., 31,800) の蒸留水懸濁液 (89 mg/cc) 1cc をそれぞれ一定量の鹽酸及び醋酸を含む溶液 19cc (0°C) 中に加える。酸の量は豫備實驗によつて最終溶液が所定の pH になるように定め、更に酵素を加えた後溶液 2cc をとり H₂ 電極法によつて pH を測定した。0°C で 2 時間放置した後各 1cc をとり M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 19cc 中に注下し直ちに作用力

Table II

pH	Residual activity				Residual iron	
	Degree of dilution	k	k ₀	%	mg. Fe per 10 cc	%
7.0	0.01	0.0748	7.08	100	0.098	98
6.1	0.01	0.0711	7.11	101	0.092	92
4.5	0.01	0.0676	6.76	95.3	0.103	103
3.8	0.02	0.1209	6.15	86.5	0.096	96
3.1	0.02	0.0584	2.92	41.9	0.086	86
2.7	0.02	0.0275	1.35	19.0	0.075	75
2.0	0.05	0.0192	0.39	5.6	0.050	56
1.7	1.00	0.0101	0.01	0.1	0.052	52
0.7	1.00	0	0	0	0.048	48

Fig. 1

を測定した。殘液は直ちに遠心分離してヘミン凝沈物を除いた上澄液 10cc に就て鐵を定量した。Table II にその結果を示し、Fig. 1 に失活と殘存ヘミン鐵との關係を顯示した。

pH 3.5 以下で見られる急速な失活は實驗操作から見て明らかに不可逆的性質のものである。殘存鐵量のすべてをヘミン鐵と見做すならば pH-鐵曲線は (カタラーゼ + 糖體蛋白 + ヘミン) の解離曲線を表わすものであつて pK はほぼ 3 に近い値を示す。併し殘存鐵量がすべてヘミンであると云ひ推定には多少疑問がある。併し定性的に見て pH 3.5 以下で急速にヘミンの分離が起る事は認められる。完全に不活性化したカタラーゼ (pH 1 以下) の場合でも約 50% 近くの殘存鐵が檢出される事

は明らかにカタラーゼの不可逆的失活の原因が蛋白とヘミンとの結合關係の不可逆性に存しない事を示すものである。

酸處理によるカタラーゼの失活速度は處理温度によつて多少影響される。pH 2.5 に於ける失活の時間的變化

を 0°, 19°C で測定し結果を Table III に示した。表中 $k'_{(inact)}$ は失活速度を単分子反応速度恒数であらわし

Table III

Time of treatment (min.)	0°C		19°C	
	Activity (%)	$k'_{(inact)}$	Activity (%)	$k'_{(inact)}$
15	74.6	0.0085	67.6	0.0114
30	54.1	0.0087	43.7	0.0120
60	25.8	0.0088	18.5	0.0122
90	11.6	0.0104	8.5	0.0119
120	6.0	0.0102	3.1	0.0127

たものである。0°C に於ける失活速度は単分子的ではなく、反応初期及び末期で k' の値に可成りの差がある。これは 0°C に於ては反応初期の失活の一部 (約 10%) が可逆的であると解釋すれば合理的である。19°C に於ては殆ど単分子反応に従つて失活する。

(V) 吸収スペクトルの pH による變化

カタラーゼの濃厚溶液は中性附近では黒褐色を呈し 625, 542, 505, 407, 277 m μ に吸収を示す。* 277 m μ の吸収は糖蛋白質によるもので最も強い、625, 542, 505 m μ の可視部の 3 個の吸収の pH 變化を觀察したが光源としてタンゲステン電球を使用したためか明瞭な結果が得られなかつた。紫外部の測定には水素放電管を使用し 407 m μ の Soret 帯及び 277 m μ の蛋白の吸収帯を觀察する事が出来た。試料には 4 回再結晶したカタラーゼ (Kat.f. 90,800) を用い、蒸液から沈澱を生じた場合には除去した。Fig. 2 及び 3 に吸収曲線を、Table IV に各 pH に於ける最大吸収の波長を示した。

pH 3.7~6.8 の間では紫外部の吸収 (Soret 帯を含む) には殆ど變化がない。酸性側では 277 m μ の蛋白の吸収は殆ど變化しないが Soret 帯は pH の減少と共に減衰し 392 m μ に弱い吸収が現われるが、これは前述のよう

Fig. 2

Fig. 3

Table IV

pH	Maxima of absorption m μ		pH	Maxima of absorption m μ	
0.9	277	392	9.1	280	407
1.8	277	392	10.4	280	407
2.8	277	392	11.4	290	406
3.7	277	407	11.9	280-285	405(?)
6.8	277	407	12.9	—	—

* ZEILE, HELLSTRÖM⁽¹⁾; 629, 540, 500 m μ .

STERN⁽²⁾; 622, 540, 505, 409 m μ .

KEILIN, HARTREE⁽³⁾; 629.5, 544, 506.5 m μ .

SUMNER, DOUNCE⁽⁴⁾; 627, 536, 502 m μ .

ITHO⁽⁵⁾; 406, 266 m μ .

に吸収帯の變遷によるものではなく Fig. 2. で見られるように始めから存在したものと思われる。Soret 帯が殆ど消失した溶液は緑青色を呈し 630m μ 附近にかなり強い吸収があり 505, 542m μ には吸収を認めない。此の溶液をアルカリ性にすると淡黄色に変化する。アルカリ側に於ける 392m μ の吸収の消失はアルカリによる青色物質の變化と関係があるように思われる。アルカリ側に於ては Soret 帯の位置には殆ど變化なく蛋白の變性が顯著である。酸性溶液に於ける Soret 帯の減衰はヘミンの析出に伴う濃度の減少に起因するものである。もしも酸處理によつてヘミンのポーフリン環が開裂して青色物質を生じたとすれば析出ヘミンを除去した溶液中にはかなりの無機性鐵の存在が推察されるが透析實驗の結果では殆ど認められなかつた。更にメトヘモグロビンに就ての實驗結果から類推して酸處理によるヘミンの分解は考えられない。

結 語

(1) カタラーゼを酸性アセトン法及び透析法によつて糖體蛋白と活性基とに分離し兩者よりカタラーゼの合成を試みたが成功しなかつた。

(2) カタラーゼは pH 3.5 以下の酸性溶液中では急速に失活し、その際ヘミンの一部を徐々に析出する。此の不可逆的失活の原因は主として糖體蛋白の變性に存するようである。

(3) pH 2.5 に於けるカタラーゼの失活反應は大量に於て單分子反應に従い蛋白の變性を想像せしめる。0°C に於ては反應初期に僅少部分が可逆的に失活する事が想像される。

(4) カタラーゼの Soret 吸収帯 (407 m μ) は pH 3.7 以下で減衰し 392 m μ に弱い吸収が現われるが此の吸収は始めから存在したものの酸であり、おそらく青色物質と關係があると思われる。

本研究實施に際し終始御懇篤な指導を賜つた大島康義教授並びに實驗の一部に協力された岡崎悟農博士に感謝する。尙本研究の一部は學術振興會の援助によつて行われたものである。併せて謝意を表する。

- 1) K. ZEILE, H. HELLSTRÖM : *Z. physiol. Chem.*, 192, 171 (1930).
- 2) D. KEILIN, E. F. HARTREE : *Proc. Roy. Soc., B*, 121, 173 (1936).
- 3) K. G. STERN : *J. Biol. Chem.*, 112, 661 (1935).
- 4) J. B. SUMNER, A. L. DOUNCE : *J. Biol. Chem.*, 121, 417 (1937).
- 5) J. B. SUMNER, A. L. DOUNCE : *J. Biol. Chem.*, 127, 439 (1939).
- 6) R. LEMBERG, M. NORRIS, J. W. LEGGE : *Nature*, 144, 551 (1939).
- 7) M. L. ANSON, A. E. MIRSKY : *J. Gen. Physiol.*, 9, 169 (1925), 13, 477 (1930), 14, 577 (1931).
- 8) E. C. GJESSING, J. B. SUMNER : *Arch. Biochem.*, 1, 1 (1943).
- 9) K. AGNER : *Biochem. J.*, 32, 1702 (1938).
- 10) 北川松之助, 白川正治 : *農化*, 22, 115 (1948).
- 11) M. SHIRAKAWA : *J. Fac. Agric., Kyūshū Univ.*, 9, No. 2, 173 (1949).
- 12) K. G. STERN : *J. Biol. Chem.*, 121, 561 (1937).
- 13) J. STRAUB : *Mikrochem.*, 14, 251 (1933-34).
- 14) R. STUART : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 3, 390 (1931).
- 15) R. ITHO : *J. Biochem.*, 22, 139 (1935).

Summary

The experiments on the reversible resolution of beef liver catalase were carried out by both methods, treatment with acid acetone and dialysis, without success (Table I) because of the rapid irreversible inactivation of the enzyme in acid solution, separating a part of the haemin contained (Table II, Fig. 1).

The rate of inactivation of catalase at pH 2.5 is presented in the term of monomolecular reaction, suggesting the denaturation of the carrier protein (Table III).

The absorption band at 407 m μ is gradually faded with increase of the acidity of the solution and a band of 392 m μ appears. But this will rather imply the presence of the "blue substance" in the original preparation of catalase, than its occurrence by the decomposition of porphyrin ring on acid treatment (Table IV, Fig. 2 and 3).