結晶性カタラーゼに関する研究

(第6報) いわゆる青色物質に就て

白 川 正 治

(九州大學農藝化學教室)

昭和 24 年 6 月 22 日受理

Studies on the Crystalline Catalase

Part VI. On the "Blue Substance" in the Catalase Preparations.

By Masaharu SHIRAKAWA

(Laboratory of Agricultural Chemistry, Kyushu University)

前報⁽¹⁾でのべたようにカタラーゼは pH 3.5~2.0 の溶液中ではすみやかに活性を失ひ、pH 2 以上の酸性溶液中では徐々にヘミンの一部を析出し、その濾液は緑青色をおびてくる。又濃厚なカタラーゼ溶液を常法に従い鹽酸アセトンで処理しアセトン溶液を濃縮する際にも SUMNER⁽²⁾⁽³⁾ の謂う青色物質の溶液が得られる。此の青色溶液中には少量の無機鐵が存在する。SUMNER によれば Kat. f. 30,000~35,000 の牛肝カタラーゼ中には全鐵量に對し約 50 % の青色鐵が含まれており、此の青色鐵含量が大きい程 Kat. f. は小さくなる。此の事實から SUMNER⁽⁴⁾ はカタラーゼの化學構造に關して次のような假説を提出した。即ちプロトヘミンはカタラーゼの活性に對する唯一の機能的活性基であり生体内ではカタラーゼ分子中に4個のヘミンが存在しているが化學的處理によりその一部が分解されて青色物質を生ずる。従つてカタラーゼの作用力は分子中のプロトヘミン數の減少(或いは青色鐵の増加)に比例して減少し、1個のプロトヘミンが 15,000 單位の Kat. f. をもつと假定すれば、15,000, 30,000, 45,000, 60,000 の Kat. f. をもつた4個の型のカタラーゼの存在が考えられる。此の假説は AGNER⁽⁵⁾ の馬肝カタラーゼの 55,000~60,000, EULER⁽⁶⁾ 等の 43,000, SUMNER の 30,000~35,000 (牛肝) 等の Kat. f. の相違を了解するのに好都合である。LEMBERG⁽⁷⁾ は結晶性カタラーゼ(牛肝)から青色物質を分離し、それがビリバーヂンである事を證明し、ついで此のビリバーヂンの前驅物質がヘミンから生じたバードヘモクロモーゲン様の色素蛋白質である事を推定した。

著者が分離した最純のカタラーゼ製品は Kat. f. 31,000~32,000, 約 20 % 青色鐵を含有する。これを酸で處理すると青綠色の鐵蛋白化合物が得られる。此のものは明らかに鐵を含有し SUMNER の青色化合物とは區別されるべきものである。おそらくその前驅物質であると思われる。この青色の複合蛋白質から分離される青色色素は膽汁色素の特性を示すがビリバーヂンではないようである。この青色物質が果して生体内のカタラーゼ中にヘミンと共に結合して存在しているかどうかは頗る疑問である。酸處理したカタラーゼ中の鐵分布の關係から考察すると上述の青色化合物はカタラーゼに對して不純物的存在であると見做す方がむしろ妥當のようである。精製したメトヘモグロビンに就ての實驗結果よりの類推もこれを支持するものと思われる。

I. 調製及び測定

カタラーゼの調製及び Kat. f. 測定 :- 前報⁽⁸⁾にのべた方法で牛肝から分離した結晶を再結晶の回数によつて I (1 回再結), II (3 回再結), III (4 回再結) 等々とし、いづれも蒸溜水に對して透析して實驗に供した。V は IV の溶液を更に電氣透析によつて精製したものである。Kat. f. の測定に際しては稀釋による失活を考慮し 0°C に冷却した $\frac{M}{100}$ 磷酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて濃厚なカタラーゼ溶液を稀釋し直ちに定量をおこなつた。Table 1 に各カタラーゼ製品に就ての測定結果を示した。

鐵の定量 :- 大體の操作は STUGART 法⁽⁹⁾に従つた。從來用いた比色定量の代りに Purfrich 光度計により絶対濃度を測定した。豫め S_{50} のフィルターを用いて鐵標準曲線を作成し 0.001~0.011 mg Fe/cc の範圍で正

Table 1

Enzyme Preparation	Dilutn.	k (monomol)	k_0/cc	Dry Matter (mg/cc)	Kat. f.
I	1:10,000	0.0240	240	16.0	15,000
II	19,000	0.0323	581	19.0	30,600
III	15,000	0.0423	635	22.5	31,000
IV	18,000	0.0295	531	17.4	30,400
V	18,000	0.0263	473	15.8	29,900

$$k = \frac{1}{t \text{ (min.)}} \log \frac{a}{a-x}, \quad \text{Kat. f.} = \frac{k_0}{\text{Dry Matter (g)}}$$

しく定量出来る事を確めた。それ以上の Fe 濃度では吸光係数と Fe 量が比例しなくなる。定量誤差は全操作を通じ±3%である。検液を乾燥灰化するには特に細心の注意を要する。試料 1~5 cc をルツボにとり温浴上で乾燥し 20% HCl を 2 滴加え蓋をして加温し再び乾燥する。此の操作を更に 2 回反復した後出来るだけ徐々に灰化する。冷却した後 HCl 2 滴を加えて乾燥し再び加熱する。灰分は 5 cc の蒸溜水を 3 回にわけて分液漏斗中に洗ひ込み 20% HCl 2 cc, $\frac{N}{10}$ KMnO₄ 1 滴, アミルアルコール 5 cc を加えて 30 秒間振盪してアルコール部をとり直ちに光度計で吸光係数を測定する。測定結果の一例を Table 2 に表示した。

Table 2

Fractions	Total Vol. of Solns. (cc)	Solns. analysed (cc)	Extinction Coeff. (e)	Fe found (mg)	Total Fe (mg)
Enzyme Preparation I (Fe : 0.0288 mg/cc)					
Haemin I	10.0	5.0	3.24	0.0130	0.0520
Haemin II	10.0				
Bl. Soln. I	10.5	5.0	2.24	0.0093	0.0185
Bl. Soln. II	5.0	5.0	3.20	0.0127	0.0127
Enzyme Preparation II (Fe : 0.0238 mg/cc)					
Haemin I	10.0	5.0	2.96	0.0118	0.0472
Haemin II	10.0				
Bl. Soln. I	10.0	5.0	1.67	0.0067	0.0134
Bl. Soln. II	5.0	5.0	1.92	0.0078	0.0078
Enzyme Preparation III (Fe : 0.0263 mg/cc)					
Haemin I	10.0	5.0	3.36	0.0135	0.0540
Haemin II	10.0				
Bl. Soln. I	10.0	5.0	1.55	0.0062	0.0124
Bl. Soln. II	5.0	5.0	2.16	0.0089	0.0089
Enzyme Preparation IV (Fe : 0.0181 mg/cc)					
Haemin I	10.0	5.0	2.10	0.0086	0.0172
Haemin II	10.0	5.0	3.22	0.0013	0.0258
Bl. Soln. I	10.0	5.0	0.81	0.0031	0.0031
Bl. Soln. II	5.0	5.0	1.14	0.0045	0.0045

Enzyme Preparation V (Fe : 0.0153 mg/cc)

Haemin I	10.0	5.0	1.72	0.0069	0.0138
Haemin II	10.0	5.0	2.48	0.0104	0.0208
Bl.Soln. I	10.0	10.0	1.17	0.0046	0.0046
Bl.Soln. II	5.0	5.0	1.04	0.0040	0.0040

II. カタラーゼの純度と鐵分布

5 種類のカタラーゼ製品の Kat.f. と鐵分布の關係を Table 3 に、又表中の鐵區分の處理法の概略を Fig.1 に示した。

Fig. 1

の反復によつて恒定値に達すると云う事はその最高の純度の絶對的表現でないのは勿論である。現在廣く採用されている Kat.f. は EULER, JOSEPHSON 法⁽⁶⁾に従つて測定されるものであるが高純度のカタラーゼを定量する場合には酵素液を數萬倍に稀釋する必要がある。このような稀薄溶液中ではカタラーゼが不安定であつて特に室溫に於ては失活速度もかなり大きい事が豫想される。⁽¹⁾ 従つて Kat.f. の測定には實驗操作による必然的誤差を伴い、それが微妙な純度の變化を不明瞭にすることも當然ありうることである。又生體內では組織細胞に結合したデスモ酵素であるカタラーゼが或る未知の鐵蛋白質と結合して分離される事も想像出来るがこのような場合に Kat.f. から少量の不純鐵蛋白質の存在を判定する事は困難であらう。

Table 1 に示したように高純度のカタラーゼは約 20% の青色鐵を含有しており再結晶の反復によつてヘミン鐵は増加し青色鐵は減少する。これはあきらかに不純物としての鐵化合物が主として青色鐵區分に存する事を暗示している。SUMNER 及び LEMBERG の云うようにヘミンが酸の作用で分解して青色化合物を生ずるとすれば酸處理の時間に應じて鐵分布に變化がある事が豫想される。併し酸處理の時間と鐵分布の關係に就ての實驗結果 (Table 4) からみると充分精製したカタラーゼでは上述のような現象は認められない。

Table 4

Enzyme Preparation	Time of Treatment (hrs.)	Fe (mg)		
		Haemin	Bl. Soln. I	Bl. Soln. II
I	3	0.0716	0.0118	0.0124
	6	0.0657	0.0154	0.0131
	9	0.0570	0.0227	0.0143
II	3	0.0589	0.0115	—
	6	0.0570	0.0111	0.0080
	9	0.0630	0.0124	0.0079
V	3	0.0685	0.0101	0.0078
	6	0.0678	0.0112	0.0080
	9	0.0691	0.0104	0.0063 ?

不純なもの (I) では處理時間の増加に伴いヘミン鐵が減少し、逆に青色鐵が増加している。これはヘミン區分の化合物の一部が青色鐵に變化したと考えられる。従つて不純なカタラーゼに伴う鐵蛋白化合物は酸の作用で分解し色素部分がヘミン區分に分離され酸處理の時間が長くなると共に徐々に分解して青色物質を生ずるものであらう。

上述の實驗結果からみてカタラーゼ中のヘミンが酸處理によつて分解して青色物質を生じたとは考えられない。最近 AGNER, THEORELL⁽¹¹⁾ は牛及び馬の肝カタラーゼは 70% のヘミン鐵と 25% の青色鐵を有し血球より分離された結晶性カタラーゼは青色鐵を全然含有しないとのべている。AGNER 等の肝カタラーゼは何れも Kat.f. 60,000~70,000 であつて電気泳動、超遠心分離によつて純粹であることを確認し肝カタラーゼから得られる青色物質は生體內に於けるカタラーゼの構成要素であるとしている。此の見解は著者の推定とカタラーゼの本態に關して相矛盾するものである。電気泳動による純度試験は極めて鋭敏であるとされているが、併しそれは單に電場内に於ける粒子の移動速度に立脚するものであつて青色鐵蛋白質が中性附近の pH でカタラーゼと緩やかに結合している場合には全く無力である。pH 3 以下でも單分散である事が證明されなければならない。超遠心分離法についても同様な事が云へる。實際 THEORELL⁽¹²⁾ は電気泳動的に或いは超遠心的に純粹なチトクロームが 1~2% の不純物 (鐵化合物) を伴う事を認めている。

動植物組織内に見出されるカタラーゼ以外のヘミン系蛋白質例へばヘモグロビン、チトクローム c、パーオキシダーゼ等ではそれらの構成要素として青色鐵を全然含有していない。又結晶として分離された血球カタラーゼ⁽¹¹⁾ 及び細菌カタラーゼ⁽¹²⁾ にも見出されていない。唯肝カタラーゼのみに青色物質が隨伴する事は頗る興味がある。

血液からは WARBURG⁽¹³⁾ の緑色ヘミン或いはブソイドヘモグロビン,⁽¹⁴⁾ コーレグロビン⁽¹⁵⁾ 等の緑青色の鐵蛋白化合物が見出されており、これらが何等かの機作によつてヘモグロビンから生じたと云う説には或程度の根據がある。⁽¹⁶⁾ 又アスコルビン酸の存在でヘモグロビン及びカタラーゼから容易にバードヘモクロモーゲンを生じ⁽¹⁷⁾ 肝中にヘミン分解酵素の存在も認められている。⁽¹⁸⁾ 従つてカタラーゼに随伴する青色化合物は生体内に於て生成したものであり而もカタラーゼに對しては不純物と考えるのが妥當と思われる。

III. 青色蛋白質の二三の性質について

カタラーゼ溶液を pH 1.5, 0°C で1夜放置し生ずる沈澱を除き 20 vol. の HCl アセトンを加えて得られる青色蛋白質は約 0.002 % Fe を有し水に溶解して青緑色を呈する (pH 2.1)。吸収スペクトルをみると 500~600 mμ の間には吸収帯を認めず又 400 mμ 附近の Soret 吸収帯も顯著ではない。PURFRICH 光度計で定性的に檢すると 630~640 mμ にかなり明瞭な吸収がある (Fig. 2, A-曲線)。此の溶液の S₆₁ フィルターに對する吸光係数は鐵含量に比例している (Table 5)。従つて此の溶液の色は鐵化合物の屬性である。

Fig. 2

Table 5

Enzyme Preparatn	mg. Fe/cc	Extinctn. Coeff. (ε per 2cm)	ε/Fe
II	0.0067	0.36	54
IV	0.0031	0.15	49
V	0.0040	0.21	53

此の酸性の溶液に更に強酸を添加すると沈澱を生じ約 60% の鐵が溶液中に残る。又アルカリで中和すれば pH 5 附近で蛋白質の沈澱を生ずるが此の場合には大部分の鐵は蛋白質と共に沈澱してゐる。更にアルカリを加えると pH 7.5 附近で沈澱は溶解し黄色を呈する。此の一連の變化は可逆的である。黄色のアルカリ性溶液では 500 mμ から長波長部にかけて擴散吸収を示し特異的ではない (Fig. 2, B-曲線) 尙 pH 4.5 に於ける青色溶液は KCN, NH₄OH, Na₂S₂O₄ 等により色調に變化を生じない。

青色蛋白溶液 (pH 2.1) から青色結合物を分離するには 35°C に5時間加温し 5 vol. のエチルアルコールを添加, CO₂ 氣流中で振盪し生ずる蛋白質沈澱を除去, 溶液を CO₂ 氣流中で濃縮, 生ずる沈澱を少量のアルコールを含有するクロロホルムに溶解した。溶液は褐青色を呈し, GMELIN の反應陽性, 殆ど Fe を含有せず 610~620 mμ に弱い吸収がある (Fig. 2, C-曲線)。空氣中に放置すると次第に褐色をおびてくる。NH₄OH, Na₂S₂O₄, H₂ 等で還元されずビリバーヂンではないようである。HCl-アセトンを加えると濃褐色に溶解し放置すると白色の沈澱を生ずる。青色溶液 II に就ても同様な性質が觀察され此等はおそらく同一物質であつてカタラーゼの随伴物質から脱鐵されて生じた膽汁色素系統の物質であると思われる。

IV. メトヘモグロビンの酸處理に就て

馬の血液から KEILIN, HARTREE 法⁽¹⁹⁾ によつてカタラーゼを含まないメトヘモグロビンを純粹に分離した。此の溶液を pH 1.0 で1夜室温に放置したが僅かにヘミン様の沈澱を認めるのみで青色を生じなかつた。併し此の溶液を 40°C で數時間放置すると徐々に暗褐色となりヘミンの分解が認められる。メトヘモグロビン及びカタラーゼ中の鐵原子とその6個の配位子との結合は何れもイオン結合である事が磁氣係數の測定から知られており⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ 強い酸性溶液中では兩者のプロトヘミンは酸によつて全く同様な影響を受ける事が考えられる。従つてメトヘモグロビンの pH 1.0 に於ける安定性は同時にカタラーゼヘミンの安定性の側面的證明とみる事が出来る。

總 括

(1) 數種の純度を異にする結晶性カタラーゼについて Kat. f. と鐵含量を測定し、それらの間に並行關係が

成立しない事を示し、その原因がおそらく Kat. f. 測定法の不完全によるものである事を指摘した。

(2) カタラーゼ中の青色鐵の含量はその純度の増加と共に減少し約 20 % (全鐵に對し) となる。不純なカタラーゼ製品では酸處理の時間と共にヘミン鐵が減少し青色鐵が増加するが高純度のものでは不變である。

(3) 青色蛋白質の 2, 3 の化學的性質をのべ、その色素部分が鐵とビリバーヂンと近縁なものとの化合物であることを示した。

(4) 精製したメトヘモグロビンの溶液をカタラーゼの場合と同様に酸で處理しても青色物質を生じない。

(5) 以上の實驗結果よりカタラーゼに隨伴する青色物質はカタラーゼの構成要素をなすものではなく不純物の一種であると推定した。

本研究實施にあたり御指導を賜つた大島康義教授に對し衷心より感謝すると共に、カタラーゼ調製に協力された田中健夫、村井誠吾兩農學士及び粗製馬血ヘモグロビンを分與して戴いた九大醫學部棚橋陽吉助教授に感謝する。尙本研究の一部は文部省科學研究費によつておこなわれたものである事を記し併せて謝意を表する。

- (1) 白川正治：農化，23，124 (昭 24)
- (2) J.B.SUMNER, A.L.DOUNCE : *J.Biol.Chem.*, 121, 417 (1937)
- (3) J.B.SUMNER, A.L.DOUNCE : *J.Biol.Chem.*, 127, 439 (1939)
- (4) J.B.SUMNER, A.L.DOUNCE : *J.Biol.Chem.*, 136, 343 (1940)
- (5) K.AGNER *Biochem.J.*, 32, 1702 (1938)
- (6) H.v.EULER, K.JOSEPHSON *Ann.Chem.*, 452, 158 (1927)
- (7) K.LEMBERG, M.NORRIE, J.W.LEGGE *Nature*, 144, 551 (1939)
- (8) 北川松之助，白川正治：農化，22，115 (1948)
- (9) R.STUGART *Ind.Eng.Chem., Anal.Ed.*, 3, 390 (1931)
- (10) C.OPPENHEIMER, K.G.STERN : *Biological Oxidation*, Hague, 1939, p. 173
- (11) K.AGNER, H.THEORELL : *Arch.Biochem.*, 10, 321 (1946)
- (12) R.CECIL, A.G.OGSTON : *Biochem.J.*, 43, 205 (1948)
- (13) O.WARBURG, E.NEGELEIN : *Ber.*, 63, 1816 (1930)
- (14) G.BARKAN, O.SCHALES : *Z.physiol.Chem.*, 248, 96 (1937)
- (15) R.LEMBERG *Biochem.J.*, 29, 1322 (1935)
- (16) H.VENNDT : *Z.physiol.Chem.*, 263, 162 (1940)
- (17) R.LEMBERG, J.W.LEGGE *Biochem.J.*, 37, 117 (1943) [*Ann.Rev.Biochem.*, 13 (1944)]
- (18) H.T.SCHREUS, C.CARRIE : *Klin.Woch.*, 2, 1675 (1934)
- (19) D.KEILIN, E.F.HARTREE : *Proc.Roy.Soc., B*, 117, 1 (1936)
- (20) C.D.CORYELL, L.PAULING : *J.Amer.Chem.Soc.*, 59, 633 (1933) ; H.THEORELL, K.AGNER *Arch.Chem. Mineral.Geol.*, 16, No.7, 1 (1942), (*Advances in Protein Chemistry*, Vol.4, 1948)

Summary

There exists no parallelism between the purity in term of "Kat.f." and the iron content of several catalase preparations (Table 3). The blue iron content related to the blue compound in the catalase decreases with increasing purity of catalase, finally to about 20 % of total iron. The iron distribution in catalase preparations with comparatively low purity is variable with time of acid treatment, but nearly constant in the case of purer one (Table 4). Some chemical properties of the blue iron proteid were described. The significance of the blue compounds was discussed from the constitutional point of view. It was conclusively postulated that the blue compound which occurs in catalase preparations may not be an essential prosthetic group of catalase, but probably a kind of impurity, which is not detected by the measurement of "Kat.f." and other tests.