

CATALASE COMPONENT IN HUMAN ERYTHROCYTES

ヒト赤血球におけるカタラーゼ成分

AN ANTICATALASE REACTING COMPONENT IN NORMAL, HYPOCATALASIC AND ACATALASIC HUMAN ERYTHROCYTES

正常、低カタラーゼ症および無カタラーゼ症ヒト赤血球
における抗カタラーゼ反応成分

YASUO SHIBATA, M.D. 柴田泰生
TOKUHIKO HIGASHI, M.D. 東 息彦
HIDEMATSU HIRAI, M.D. 平井秀松
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



TECHNICAL REPORT SERIES

業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

CATALASE COMPONENT IN HUMAN ERYTHROCYTES

ヒト赤血球におけるカタラーゼ成分

AN ANTICATALASE REACTING COMPONENT IN NORMAL, HYPOCATALASIC
AND ACATALASIC HUMAN ERYTHROCYTES正常，低カタラーゼ症および無カタラーゼ症ヒト赤血球
における抗カタラーゼ反応成分YASUO SHIBATA, M.D.¹ 柴田泰生
TOKUHIKO HIGASHI, M.D.¹ 東 恵彦
HIDEMATSU HIRAI, M.D.¹ 平井秀松
HOWARD B. HAMILTON, M.D.²

Approved 承認 10 December 1965

ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPANA Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL
and
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFAREwith funds provided by
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 - 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所
と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

(米 国 原 子 力 委 員 会， 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所 お よ び 米 国 公 衆 衛 生 局 の 研 究 費 に よ る)

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Tokyo¹
and Department of Clinical Laboratories, ABCC²東京大学医学部生化学教室¹ および ABCC 臨床検査部²

This paper was presented in part in Japanese at the 9th Annual Meeting of the Japanese Society of Human Genetics, 16 November 1964, Wakayama City, Japan

本論文の一部は、1964年11月16日和歌山市において開催された日本人類遺伝学会第9回年次大会において日本語で発表した。

Also presented in part in English at the 3rd International Congress of Human Genetics, 5-10 September 1966, Chicago, Illinois, U.S.A.

また、一部を1966年9月5-10日米国イリノイ州シカゴにおいて開催された第3回国際人類遺伝学会において英語で発表した。

A paper based on this report has been accepted for publication in the following journal

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された

Archives of Biochemistry and Biophysics Vol 118, January 1967

CONTENTS

目次

Introduction 緒言.....	1
Materials and Methods 材料および方法.....	1
Results 結果	
Immunochemical Analyses of Hemolysates by Anticatalase 抗カタラーゼによる溶血液の免疫化学的分析.....	3
Analyses of Hypocatalasic and Acatalasic Blood 低カタラーゼおよび無カタラーゼ血液の分析.....	4
Separation and Purification of the Minor Component 微量成分の分離および精製.....	6
Testing for an Immunological Relationship between the Minor Component and Catalase 微量成分とカタラーゼの免疫学的な関係の検索.....	9
Discussion 考察.....	9
Summary 総括.....	13
References 参考文献.....	14

CATALASE COMPONENT IN HUMAN ERYTHROCYTES

ヒト赤血球におけるカタラーゼ成分

AN ANTICATALASE REACTING COMPONENT IN NORMAL, HYPOCATALASIC AND ACATALASIC HUMAN ERYTHROCYTES

正常，低カタラーゼ症および無カタラーゼ症ヒト赤血球
における抗カタラーゼ反応成分

INTRODUCTION

A previous paper¹ dealing with immunochemical studies of catalase showed that the amount of immunochemically assayed catalase in normal human hemolysates was proportional to the catalase estimated by enzymatic activity measurements. This seems to indicate that human erythrocyte catalase is of a fully active form. Recently, however, further qualitative analyses using immunological techniques have detected in normal hemolysates an enzymatically inactive minor component, detectable by anticatalase, but clearly distinguishable from active catalase.

In their quantitative precipitin studies of acatalasemic red blood cells, Ogata and Takahara² demonstrated a small but measurable amount of precipitate, upon addition of rabbit antihuman erythrocyte catalase serum to hemolysates from acatalasemic individuals. The present authors have confirmed this finding and further demonstrated that acatalasemic hemolysates contain only the minor component described above.

The present communication describes attempts to purify and characterize this minor component using various immunochemical procedures.

MATERIALS AND METHODS

Crystalline catalase was prepared from pooled normal human blood by the method of Herbert and Pinsent.³ The preparation used as an antigen was homogeneous on electrophoresis and ultracentrifugation. The Kat. f. value was 156,000 and the absorbancy ratio, OD_{407}/OD_{276} , was 1.35.

Catalase antibody was prepared by injecting purified catalase in Freund's adjuvant into rabbits as described previously.¹

緒言

先に報告したカタラーゼの免疫化学的研究¹では、正常ヒト赤血球の溶血液におけるカタラーゼの免疫化学的定量値と酵素活性の測定から求めた値が比例することが認められている。このことは、ヒト赤血球カタラーゼが完全な活性型のものであることを示すように思われる。しかしながら、最近、免疫学的技法を用いてさらに分析を行なった結果、定性的に正常溶血液中に酵素活性を示さない微量成分が発見された。これは抗カタラーゼによって検出されるが、活性なカタラーゼとははっきり区別できる。

緒方および高原²は、無カタラーゼ症の赤血球について定量的沈降反応を行ない、無カタラーゼ症の溶血液にウサギ抗ヒト赤血球カタラーゼ血清を加えて、微量ではあるが測定できる程度の沈降物を認めている。著者らもこの所見を確認し、さらに無カタラーゼ溶血液は前述の微量成分のみを有することを認めた。

この報告では、各種免疫化学的手法を用いてこの微量成分を精製し、その性質を究明しようとした今回の研究について述べる。

材料および方法

結晶カタラーゼは、正常人から集めた血液から、Herbert および Pinsent の方法³ によって調製した。抗原として用いた標品は、電気泳動および超遠心で均一であった。Kat. f. 値は156,000、ヘムと蛋白の吸収比、 OD_{407}/OD_{276} は1.35であった。

抗カタラーゼは、先に報告した方法¹ に従って、精製カタラーゼを Freund adjuvant に混合してウサギに注射して得た。

Agar diffusion tests employed a slight modification of Ouchterlony's technique.⁴ Immunoelectrophoresis was performed using 1.5% agar buffered at pH 8.6 with 0.1 M diethylbarbiturate. Electrophoresis was carried out at 3 mA per cm width for 5 hours. Anticatalase was introduced into the longitudinal troughs, and the precipitin reaction was developed in a refrigerator for 2-3 days.⁵

The quantitative precipitin reaction was carried out as reported by Higashi and Peters.⁶ The washed precipitate was dissolved in 0.15 ml of 0.53 N NaOH. To this solution was added 0.3 ml of bromsulphophthalein reagent, and the mixture was kept at 37 C for 15 minutes. The protein precipitate was removed by centrifugation and 0.25 ml of the supernatant was transferred to a tube containing 4.0 ml of 0.1 N NaOH. After mixing, intensity of purple color was measured by its absorption at 580 m μ .

寒天ゲル内拡散分析は、Ouchterlony 法⁴ の変法を用いて行なった。免疫電気泳動は、0.1 M ジェチル・バルビツール酸緩衝液 (pH 8.6) を用い、1.5% の寒天で行なった。電気泳動は、1 cm 幅当たり 3 mA で 5 時間通電し、抗カタラーゼは、長軸方向の溝に入れ、沈降反応は 2 ないし 3 日間冷蔵庫内において完成させた。⁵

定量的沈降反応は、Higashi および Peters⁶ の報告した方法で行なった。洗浄した沈降物を 0.15 ml の 0.53 N NaOH で溶解し、この溶液に 0.3 ml のブロム・スルフォフタレイン試薬を加え、この混合液を 37 C で 15 分間放置したのち、蛋白沈降物を遠沈除去して、上澄液 0.25 ml を 4.0 ml の 0.1 N NaOH を入れた試験管に取った。混和後、紫色の強さを、580 m μ における吸光度で測定した。

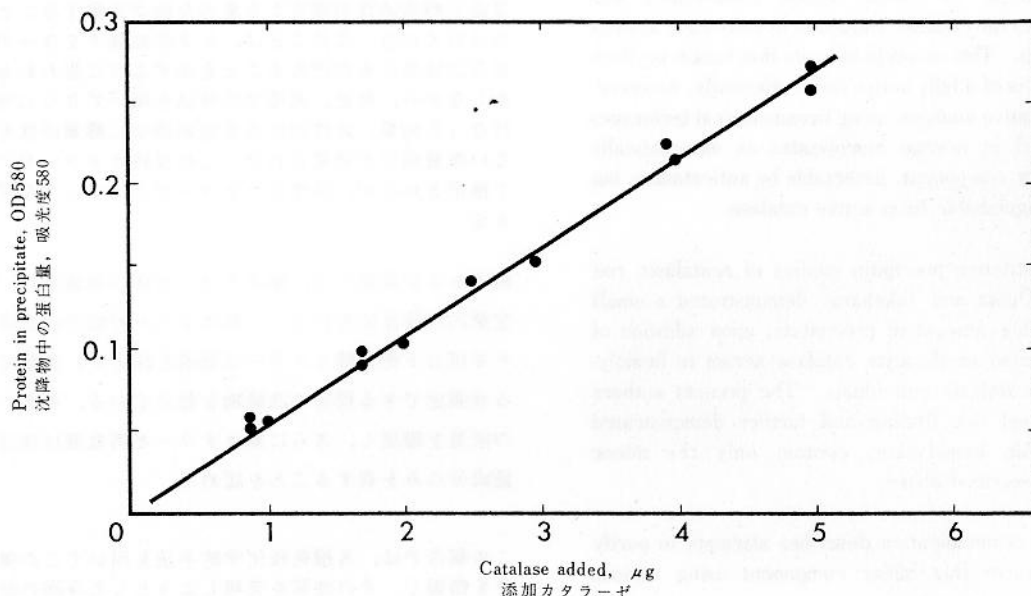


FIGURE 1 Standard quantitative precipitin curve for human erythrocyte catalase

図1 ヒト赤血球カタラーゼに対する標準定量沈降曲線

The decrease in absorbance, compared with the blank, indicates the amount of the catalase-anticatalase complex.^{7,8} A standard precipitin curve is shown in Figure 1.

Enzymatic activity was assayed by a modification of the spectrophotometric method of Beers and Sizer.^{6,9}

Sephadex G-100 gel filtration was performed according to the method of Andrews,¹⁰ using a 2.4 \times 50 cm column equilibrated with 0.05 M, pH 7.5 tris-HCl buffer containing

盲検液と比較した場合の吸光度の減少は、カタラーゼ・抗カタラーゼ複合体^{7,8} の量を示す。標準沈降曲線を図1に示す。

酵素活性は、Beers および Sizer の分光光度測定法^{6,9} の変法によって測定した。

ゲル濾過は、Andrews の方法¹⁰ に従って、0.1 M KCl 含有 0.05 M, tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡したセファデックス G-100 を入れた 2.4 \times 50 cm のカラムを用いて行なっ

0.1 M KCl. A 2 ml sample was applied, the flow rate was 25 ml per hour and 3 ml fractions were collected for analysis. For estimation of molecular weight, the column was calibrated by employing purified preparations of several proteins of well known molecular weight. Among these were human serum γ globulin, bovine serum albumin, rat liver catalase, trypsin inhibitor and cytochrome c.

Venous blood, obtained from previously known hypocatalasemic and acatalasemic individuals, was heparinized and transported in iced containers to the laboratory. Figure 2 shows abbreviated pedigrees of the two families studied. Described in detail elsewhere, the genetic trait in the TE family is the so-called 'classic' type,¹¹ whereas that of the OH kindred is a genetic variant.¹² Normocatalasemic blood samples were obtained from six members of the laboratory group.

た。試料を 2 ml 入れ、流速 25 ml / 時で、3 ml ずつ分集して分析した。分子量の推定のために、分子量のよくわかっているいくつかの精製蛋白質標品を用いて、カラムの校正を行なった。すなわち、ヒト血清 γ -グロブリン、ウシ血清アルブミン、ラット肝臓カタラーゼ、トリプシン抑制剤およびチトクローム c などを用いた。

既知の低カタラーゼおよび無カタラーゼ症例から得たヘパリン添加静脈血を検査室へ冷蔵運搬した。図 2 には、研究の対象とした 2 つの家系を簡単に示してある。TE 家族における遺伝形質は、別の報告で詳しく述べたように、いわゆる典型型である。¹¹ 一方、OH 家族の遺伝形質は、遺伝学的変異を示すものである。¹² 正常カタラーゼ血液標品は、研究室の同僚 6 名から得た。

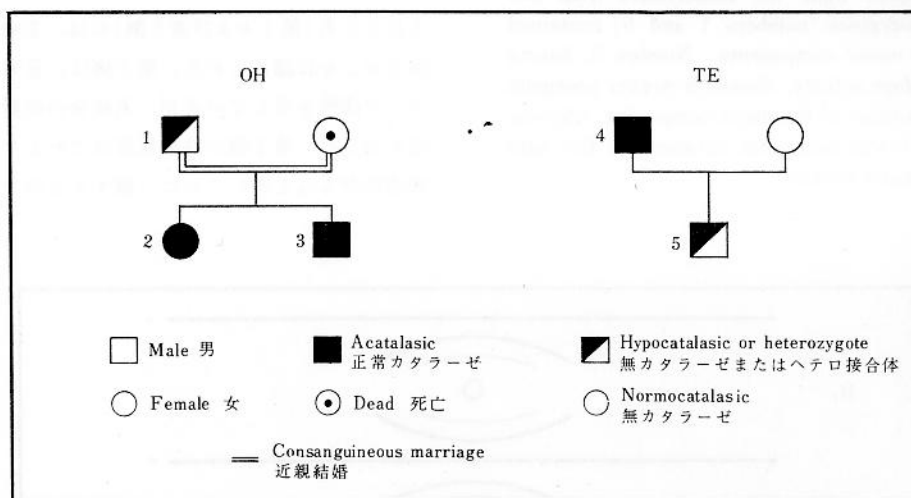


FIGURE 2 Abbreviated pedigrees of OH and TE kindreds. Numbers identify hemolysates referred to in Figure 5, Table 1, and the text

図 2 OH および TE 家族の簡単な家系。数字は図 5、表 1 および本文に述べた溶血液を示す

RESULTS

Immunochemical Analyses of Hemolysates by Anticatalase Immunoelectrophoresis of hemolysates from normal washed human erythrocytes showed the presence of two components reacting with anticatalase (Figure 3). Both migrated with the same mobility as that of purified human erythrocyte catalase. The inner precipitin band exhibited catalase activity with hydrogen peroxide,¹³ while the outer band did not. The former, designated

結果

抗カタラーゼによる溶血液の免疫化学的分析 洗浄した正常ヒト赤血球の溶血液の免疫電気泳動を行なうと、抗カタラーゼと反応する 2 つの成分が認められ(図 3)、いずれも精製ヒト赤血球カタラーゼに等しい易動度を示した。内側の沈降線は過酸化水素でカタラーゼ活性¹³を示したが、一方、外側の沈降線は活性を示さなかった。この報告では、前者を主カタラーゼ成分と呼ぶことにする

as the major catalase component in this paper is apparently catalase itself, and the latter, designated as a minor component, is a protein with serological specificity analogous to the catalase molecule, but without enzyme activity. Both components are found in erythrocytes but not in serum, as shown in Figure 3.

On agar diffusion analysis, hemolysates again showed two precipitin lines (Figure 4). However, in this case, the minor component (inside) gave a rather faint precipitin reaction.

Analyses of Hypocatalasic and Acatalasic Blood The presence of the minor component was investigated in hypocatalasic and acatalasic hemolysates possessing diminished or no catalase activity. Figure 5 demonstrates the results schematically. Although there was no enzymatic activity, the hemolysates from three acatalasics (numbers 2, 3 and 4 in Figure 2) gave one precipitin band corresponding to the minor component in the normal hemolysates, while the hemolysates from two presumed heterozygotes (numbers 1 and 5) contained both major and minor components. Number 5, having half normal catalase activity, showed a weaker precipitin reaction at the position of the major component, whereas that of number 1 was somewhat stronger, in line with the higher enzymatic activity.

が、これはカタラーゼそのものと考えられる。後者は微量カタラーゼ成分と呼ぶことにするが、これはカタラーゼ分子に類似した血清学的特異性を有するが、酵素活性のない蛋白である。これら両成分は、図3に示すように、赤血球に認められるが、血清にはない。

寒天ゲル内拡散分析でも、溶血液は2つの沈降線を示した(図4)。しかし、この場合には、微量成分(内側)はやや弱い沈降反応を示した。

低カタラーゼおよび無カタラーゼ血液の分析 カタラーゼ活性の低い低カタラーゼ溶血液およびカタラーゼ活性のない無カタラーゼ溶血液における微量成分の有無を調査した。図5にその結果を示す。無カタラーゼ症3名(図2の第2, 第3および第4例)の溶血液には、酵素活性はなかったが、正常ヒト溶血液における微量成分に相当する沈降線を1本認めた。一方、ヘテロ接合体と推察される2名(第1および第5例)には、主成分および微量成分がともに認められた。第5例は、正常の半分のカタラーゼ活性を有しているが、主成分の位置に弱い沈降反応を示した。第1例の沈降反応はこれよりやや強く、酵素活性がもっと高いことに一致するものであった。

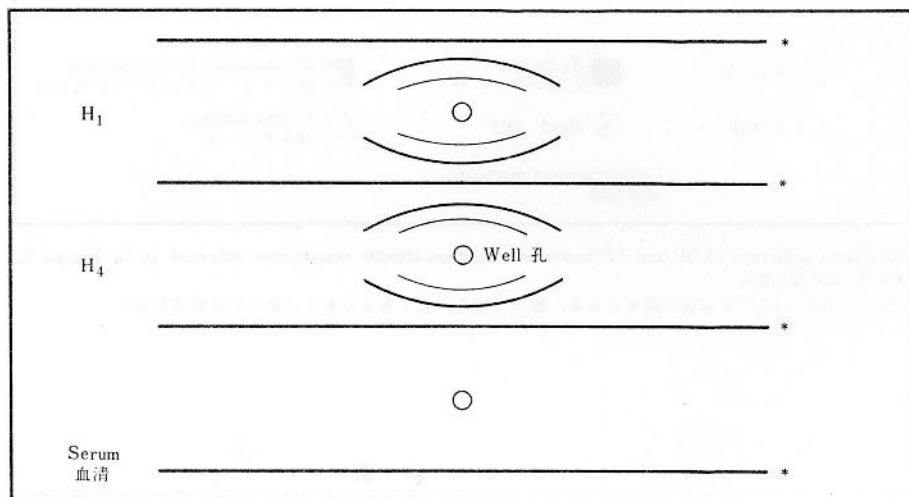


FIGURE 3 Immunoelectrophoresis of human erythrocyte hemolysates. H₁ - hemolysate from erythrocytes washed once; H₄ - hemolysate from erythrocytes washed four times; serum - human serum; * - antihuman erythrocyte catalase in each trough. Precipitin line closest to well shows enzyme activity (major catalase component). Longer precipitin line closer to trough is enzymatically inactive (minor catalase component).

図3 ヒト赤血球溶血液の免疫電気泳動。H₁-1回洗浄した赤血球の溶血液、H₄-4回洗浄した赤血球の溶血液、血清-ヒト血清、*-各溝には抗ヒト赤血球カタラーゼを入れた。中央の孔に最も近い沈降線は酵素活性を示す(主カタラーゼ成分)。溝に近い、長い沈降線は、酵素的に非活性である(微量カタラーゼ成分)。

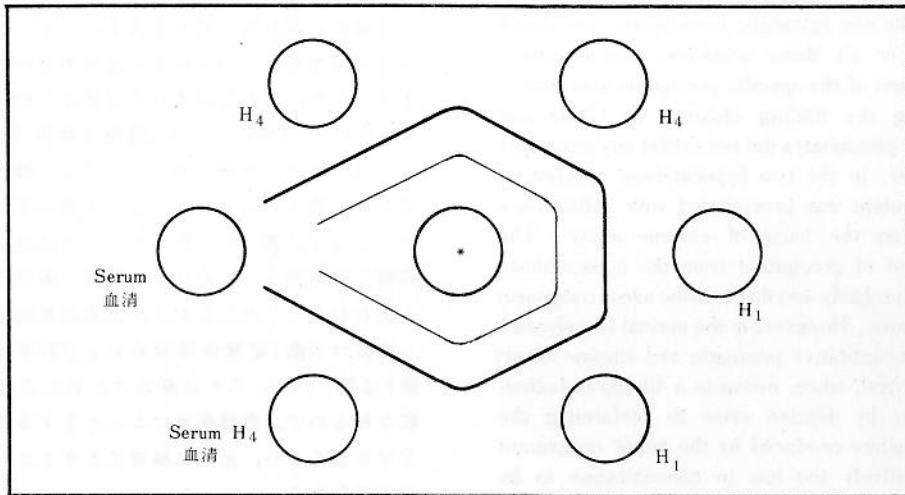


FIGURE 4 Agar diffusion of human erythrocyte hemolysates. H₁ - hemolysate from erythrocytes washed once; H₄ - hemolysate from erythrocytes washed four times; serum - human serum; * - antihuman erythrocyte catalase in central well. The major component in the outer precipitin line has catalase activity. The minor component in the inner line has no catalase activity. Neither component is found in serum.

図4 ヒト赤血球溶血液の寒天ゲル内拡散。H₁-1回洗浄した赤血球の溶血液、H₄-4回洗浄した赤血球の溶血液、血清-ヒト血清、*-中央の孔に抗ヒト赤血球カタラーゼを入れた。外側の沈降線に含まれる主成分はカタラーゼ活性を有する。内側の沈降線に含まれる微量成分はカタラーゼ活性を有しない。血清にはこれら成分はいずれも認められない。

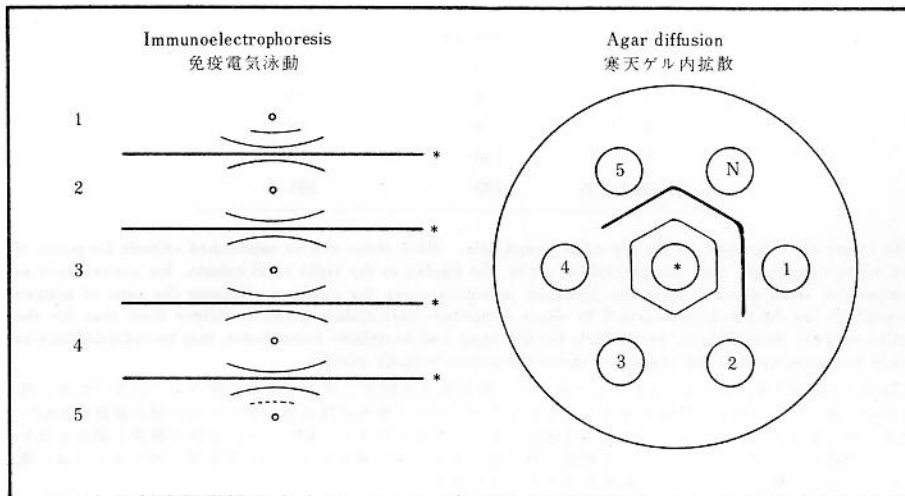


FIGURE 5 Immunoelectrophoresis and agar diffusion analysis of normal, hypocatalasemic and acatalasemic hemolysates. N - normal; 1,5 - presumed heterozygote; 2,3,4 - acatalasemic; * - antihuman erythrocyte catalase. Immunoelectrophoresis: Two precipitin lines (major and minor components) are seen for 1 and 5. Number 5 shows faint major line consonant with reduced erythrocyte catalase activity. Numbers 2, 3 and 4 show only one precipitin line (minor component). Agar diffusion: Inner hexagonal figure is the minor component and exhibits no catalase activity. All six samples have this fraction. The normal and heterozygote hemolysates also show a second precipitin line, the major component, with catalase activity. Fusion of major lines with each other and minor lines with each other indicates immunological identity.

図5 正常、低カタラーゼおよび無カタラーゼ溶血液の免疫電気泳動および寒天ゲル内拡散分析。N-正常。1.5-ヘテロ接合体と思われるもの、2, 3, 4-無カタラーゼ、*-抗ヒト赤血球カタラーゼ。免疫電気泳動: 1および5には2本の沈降線(主成分および微量成分)を認める。5の主沈降線は薄く、これは赤血球カタラーゼ活性が低いことに一致するものである。2, 3および4は1本の沈降線(微量成分)を示す。寒天ゲル内拡散: 内側の六角形は微量成分であり、カタラーゼ活性は示さない。6つの標品はすべてこの分画を有する。正常溶血液およびヘテロ接合体溶血液は第2の沈降線、すなわち主成分を示し、カタラーゼ活性を有する。主沈降線が互いに融合し、また微量沈降線が互いに融合していることは、免疫学的に同じであることを示す。

Results of quantitative precipitin reactions carried out with hypocatalasic and acatalasic hemolysates, are shown in Table 1. For all three acatalasic hemolysates a measurable amount of the specific precipitate was detectable, confirming the finding obtained by Ogata and Takahara.² The precipitates did not exhibit any enzymatic activity, however, in the two hypocatalasic specimens, slightly more protein was precipitated with anticatalase than expected on the basis of enzyme assay. The additional amount of precipitate from the hypocatalasic hemolysates are probably ascribable to the minor component demonstrated above. However, in the normal hemolysates the two values (quantitative precipitin and enzyme assay) in Table 1 are equal, since, owing to a 40-fold reduction in concentration by dilution prior to performing the assay, the precipitate produced by the minor component is probably relatively too low in concentration to be accurately measured.

低カタラーゼおよび無カタラーゼ溶血液について行なった定量的沈降反応の結果を表1に示す。無カタラーゼ症3名の溶血液は、いずれもかなりの量の特異的な沈降物を生じたが、これは緒方および高原²の所見を確認するものである。しかし、この沈降物は酵素活性を示さなかった。低カタラーゼ症2例においては、酵素活性測定の結果から予想されるよりも、少し多量の蛋白が抗カタラーゼによって沈殿した。低カタラーゼ溶血液に認められた過剰の沈降物は、おそらく、前述の微量成分に起因すると思われる。しかしながら、正常溶血液では、表1に示した2つの値(定量沈降反応および酵素活性による測定値)は等しいが、これは測定のために溶血液が40倍に希釈されるので、微量成分によって生ずる沈降物の量がかなり少なくなり、正確に測ることができないからであろうと思われる。

TABLE 1 ASSAY OF HEMOLYSATES FROM HYPOCATALASIC AND ACATALASIC INDIVIDUALS

表1 低カタラーゼおよび無カタラーゼ溶血液の分析

Pedigree number 家族員番号	Catalase カタラーゼ活性	Precipitin reaction 沈降反応
1	260 μ g	265 μ g
2	0	35
3	0	15
4	0	18
5	130	140
Normal 正常	395	395

The values are expressed as μ g per ml of hemolysate. Since there are no established criteria for purity of the minor component, and no precipitin curve, the figures in the right hand column, for convenience in comparison, were derived from the standard precipitin curve for catalase. Because the ratio of antigen to antibody for the precipitate formed by minor component-anticatalase probably differs from that for the active enzyme, these figures, particularly for the hypo- and acatalasic hemolysates, may be regarded only as crude approximations of the amount of minor component actually present.

数値は、溶血液1ml当たりの μ gとして示した。微量成分の純度に対する基準が確立していないため、沈降曲線が得られないので、比較の便宜上、カタラーゼに対する標準沈降曲線を用いて右の欄の数値を求めた。微量成分と抗カタラーゼによってできる沈降物における抗原と抗体との結合比は、活性の酵素の場合とはおそらく相違があるので、ここに示した数値、特に低カタラーゼと無カタラーゼの溶血液に対するものは、微量成分の実際の量のだいたいの近似値とみなすべきである。

Separation and Purification of the Minor Component

Fractionation with ammonium sulfate was first investigated. From immunoelectrophoretic assay (Figure 6) of each supernatant after addition of various concentrations of the salt to hemolysates, it was concluded that the major component, catalase, was precipitated at a concentration as low as 25%, while the minor component remained in solution. Agar diffusion tests, not shown here, confirmed these findings.

微量成分の分離および精製 まず、硫酸アンモニウムによる分画が試みられた。種々の濃度の塩を溶血液に添加して、上澄液の免疫電気泳動を行なった結果(図6)、25%の低濃度でも主成分であるカタラーゼは沈降されるのに対して、微量成分は可溶のまま上澄に残ることが認められた。ここには示していないが、寒天ゲル内拡散分析でもこの所見を確認した。

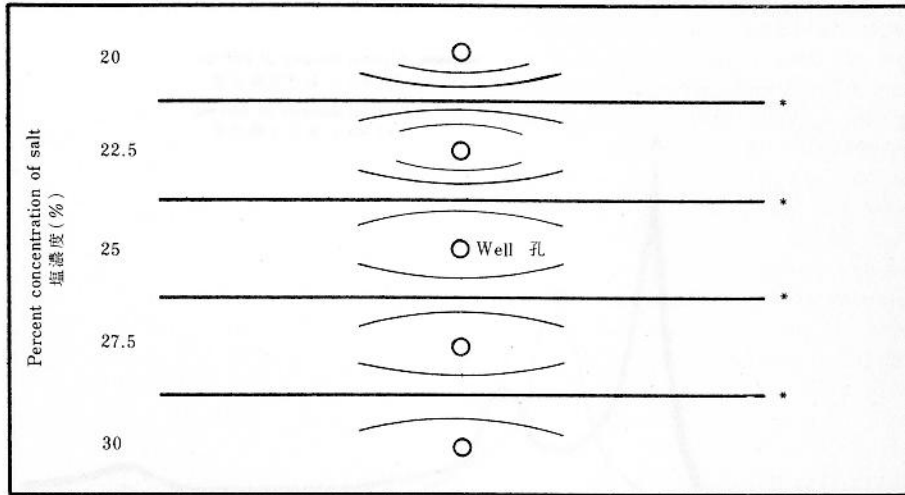


FIGURE 6 Immunoelectrophoresis of supernatant fractions from normal erythrocyte hemolysates after addition of ammonium sulfate. *-Antihuman erythrocyte catalase. Both major and minor components are present at 20% and 22.5% salt concentration. The major component has precipitated at 25% salt concentration, but the minor component remains in solution to 30%, although some has precipitated.

図6 硫酸アンモニウム添加後の、正常赤血球溶血液の上澄分画の免疫電気泳動。*-ヒト赤血球カタラーゼ。主成分も微量成分も20%および22.5%の塩濃度ではともに可溶性である。主成分は25%の濃度の塩で沈降したが、微量成分は30%で1部は沈降するが溶液に残る。

A large quantity of normal hemolysate was treated with ethanol and chloroform to remove hemoglobin, followed by fractionation with ammonium sulfate at concentrations between 25% and 40%. Most of the minor component sedimented at the latter concentration. Further purification was attained on DEAE-cellulose column equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0. Fractions eluted with 0.02-0.05 M NaCl added in stepwise increments to the buffer were collected, concentrated and subjected to Sephadex G-100 gel filtration. Two major fractions absorbing at 280 $m\mu$, labeled as peaks A and B in Figure 7, were obtained. Both reacted with anticatalase: enzyme activity and absorption at 407 $m\mu$ were found in peak A but not in B substance. The material from peaks A and B as well as a normal hemolysate were analyzed by agar diffusion as shown in Figure 8. The precipitin line formed by peak B substance reacting with anticatalase fused completely with that produced by the minor component from the hemolysate; similarly the precipitin line of peak A substance fused with that of the major component. This may be interpreted to indicate that the substances in peaks A and B are probably identical with the major and minor components respectively and that neither contains appreciable amounts of the other. The molecular weight of the minor component, assuming it to be identical with the substance in peak B, was estimated to be 40,000-60,000 from the position of the latter on the elution chromatogram.¹⁰

多量の正常溶血液をエタノールおよびクロロホルムで処理して血色素を除き、ついで25%ないし40%濃度の硫酸アンモニウムで分画を行なった。微量成分の大部分は40%の濃度で沈殿した。0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡した DEAE-セルローズ カラムでさらに精製を行なった。NaCl 濃度を0.02-0.05 M に段階的に上げて緩衝液に添加して溶出した分画を集めて濃縮し、セファデックス G-100 ゲル濾過を行なうと、280 $m\mu$ の吸収を示す2つの主要な分画を得た。これは図7においてAおよびBの峰で示される。これはいずれも、抗カタラーゼと反応した。Aの峰には、酵素活性および407 $m\mu$ における吸収を認めたが、Bの峰には認めなかった。AおよびBから得た物質と正常溶血液を寒天ゲル内拡散によって分析したが、その結果は図8に示す。B峰の物質と抗カタラーゼが反応して生ずる沈降線は、溶血液から得た微量成分によって生ずる沈降線と完全に融合した。同様にA峰の物質の沈降線は、主成分のそれと融合した。このことは、AおよびB峰の物質が、それぞれ主成分および微量成分に等しく、そのいずれもが、他の一方の物質をほとんど含有しないことを示していると解釈できる。微量成分の分子量は、B峰の物質に等しいと仮定して、溶出液のクロモグラムにおけるB物質の位置から考えて40,000ないし60,000であると推定された。¹⁰

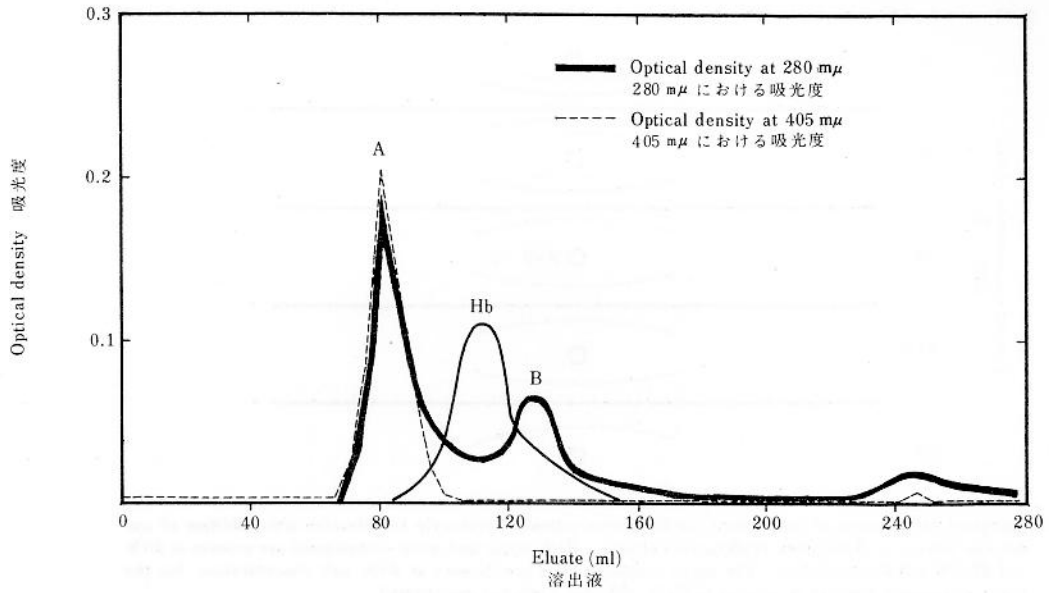


FIGURE 7 Separation of major and minor catalase components by Sephadex G-100 gel filtration. Peak A has catalase activity, peak B has none. Hb: Hemoglobin chromatogram under the same conditions as peaks A and B.

図7 セファデックスG-100ゲル濾過による主成分および微量成分の分離。Aの峯はカタラーゼ活性を有し、Bの峯は有しない。Hb: AおよびBの峯と同じ条件下における血色素クロモグラム。

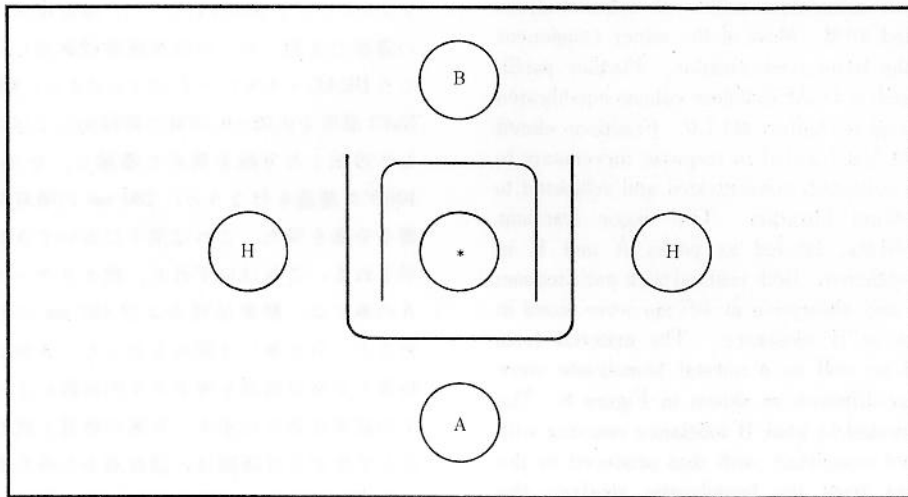


FIGURE 8 Agar diffusion of peaks A and B. A - peak A; B - peak B; H - normal hemolysates; * - antihuman erythrocyte catalase. Normal hemolysates produce two precipitin lines, the outer with catalase activity, the inner with none. Material from peak A (Figure 7) produced only one line with catalase activity that fused with the outer line of the normal hemolysates. Material from peak B produced a single line without catalase activity that fused with the inner line of the normal hemolysates.

図8 AおよびBの峯の寒天ゲル内拡散。A - Aの峯, B - Bの峯, N - 正常溶血液, * - 抗ヒト赤血球カタラーゼ。正常溶血液は2つの沈降線を示す。外側の沈降線はカタラーゼ活性を有し、内側の沈降線は有しない。Aの峯の物質(図7参照)は、カタラーゼ活性を有する1本の線だけを示し、これは正常溶血液の外側の線と融合した。Bの峯の物質はカタラーゼ活性を有しない1本の線を示したが、これは正常溶血液の内側の線と融合した。

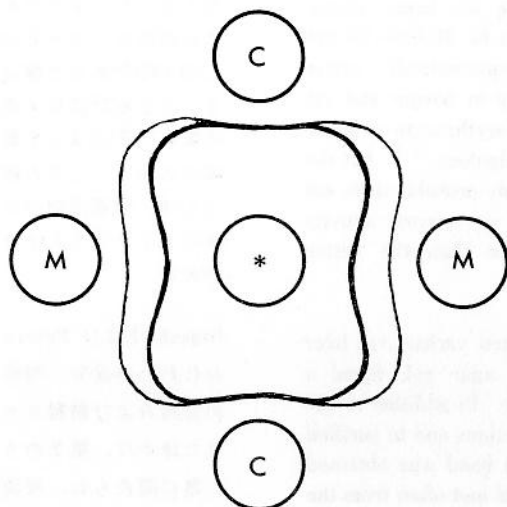


FIGURE 9 Agar double diffusion analysis of catalase and the minor component obtained by ammonium sulfate fractionation. * - Antihuman erythrocyte catalase serum in the central well; C - Fraction containing only the active enzyme; M - Fraction containing minor component and small quantity of active enzyme. The two lines from well M, the outer formed by catalase-anticatalase precipitate and the inner by minor component-anticatalase, have fused completely with the single precipitin line formed by catalase-anticatalase, from well C.

図9 硫酸アンモニウム塩析によって分離したカタラーゼと微量成分の寒天二重拡散分析, * - 中央の孔に抗ヒト赤血球カタラーゼ血清を入れた。C - 活性の酵素だけを含む分画, M - 微量成分と少量の活性酵素を含む分画, 孔Mにおける2本の沈降線, すなわち, カタラーゼ・抗カタラーゼ沈降物によって生じた外側の線と, 微量成分・抗カタラーゼによってできた内側の線は, 孔Cのカタラーゼ・抗カタラーゼの1本の沈降線と完全に融合している。

Testing for an Immunological Relationship between the Minor Component and Catalase

By ammonium sulfate fractionation, as described above, two preparations were obtained: One contained only native active catalase; the other consisted of the minor component and a small amount of active enzyme. Figure 9 shows schematically the results of agar double diffusion testing against anticatalase. A single precipitin line was formed by the material containing only catalase, whereas two lines formed from the material containing the minor component and active catalase. The inner line from the mixture, the product of the minor component and anticatalase, the product of the minor component and anticatalase, has fused completely with the precipitin line formed by catalase-anticatalase. The more rapid diffusion of the minor component is an indication of its lower molecular weight, a fact already demonstrated by Sephadex gel filtration. More important, the complete fusion of the minor component-anticatalase line with the catalase-anticatalase line may be interpreted as evidence that the two substances have a common immunological site between them.

DISCUSSION

The present experiments have demonstrated in human red blood cell hemolysates, a protein, which has some antigenic properties in common with catalase, migrates in an electrophoretic field with the same mobility as catalase, but exhibits no activity with hydrogen

微量成分とカタラーゼの免疫学的な関係の検索 前記の硫酸アンモニウム塩析によって, つぎのような2つの分画を得た。1つは活性のあるカタラーゼのみを含み, 他の方は微量成分と少量の活性な酵素を含んでいる。抗カタラーゼに対するその寒天二重拡散試験の成績を模式的に図9に示した。カタラーゼだけを含んでいる分画では沈降線が1本できるが, 微量成分と活性の酵素を含む分画によっては2本の線が出る。その場合に生ずる内側の線, すなわち, 微量成分と抗カタラーゼによってできたものは, カタラーゼと抗カタラーゼによって生じた沈降線と完全に融合する。微量成分の拡散が早いことは, セファデックスゲル濾過ですでに証明されたように, その分子量が低いことを示す。さらに重要なことは, 微量成分-抗カタラーゼの線とカタラーゼ-抗カタラーゼ線との完全な融合は, この2つの物質が共通した免疫学的部位をもつことの証拠であると解釈できることである。

考 察

今回の実験の結果, ヒト赤血球溶血液に抗カタラーゼと反応する微量成分を証明した。この蛋白は, カタラーゼに共通する抗原性部位をもち, 電気泳動でカタラーゼと等しい易動度をもつが, 過酸化水素で活性を示さず, ヘム

peroxide, and appears to possess no heme group. Its molecular weight is estimated to be 40,000–60,000 compared to about 250,000 for enzymatically active erythrocyte catalase. Heterogeneity in bovine and rat liver catalase as well as in human erythrocyte catalase has been reported by several investigators,¹⁴⁻²¹ but the minor component of the present study probably does not fall into this category since it has no enzyme activity and is considerably smaller in size than the active isoenzymes described by others.

Higashi and Peters,⁶ who investigated various rat liver cell fractions with anticatalase in agar gel, found a component similar to the present one. In addition to the predominant band common to all fractions and to purified catalase, a second weaker precipitin band was obtained consistently from microsomal extracts and often from the soluble fraction. The protein in this second band was soluble in 2.27 M ammonium sulfate at pH 6 and it did not catalyze the decomposition of hydrogen peroxide. In order to compare the antigenic identity of this liver component with the present minor component in erythrocytes, agar diffusion tests were conducted as follows: Human red cell hemolysates and human liver homogenates against antihuman erythrocyte catalase; rat red cell hemolysates and rat liver homogenates against antirat liver catalase.

In all instances two precipitin bands appeared corresponding to the major and minor components described above. Moreover, within each species, both components of one tissue fused with those of the other. Results similar to these have been reported by Ito.²² This evidence seems to indicate that the erythrocyte minor component reported here is very similar to the second component in liver and that all four (e.g.: Red cell major and minor, and liver major and minor fractions) have some antigenic properties in common, as Nishimura et al.¹⁸ have shown for the active isoenzymes from human and rat tissues.

The possibility that our minor component represents a subunit of catalase deserves consideration in light of the immunochemical evidence presented here showing that the two moieties are not only immunologically related but also strongly suggesting they have a common reacting site (or sites). Other laboratories have obtained data suggesting the existence of subunits, largely from studies of bovine liver catalase. Thus, Saha et al.²³ using high urea concentrations, obtained a fraction having a sedimentation coefficient of 2.1S compared to that of 11.2S for the fully active enzyme. Samejima and Shibata²⁴ concluded that the enzyme is made up of six units with a sedimentation constant of 2S. Schroeder et al.,²⁵ in a detailed

基を有しないようである。その分子量は、酵素活性のある赤血球カタラーゼの約 250,000 に対して、40,000 ないし 60,000 であると推定される。ウシおよびラット肝カタラーゼならびにヒト赤血球カタラーゼの多様性が若干の研究者¹⁴⁻²¹ によって報告されているが、われわれの微量成分はおそらくこの範疇にははまらないであろう。なぜならば、酵素活性がなく、他の研究者の報告している活性のアイソザイムよりもその大きさが著しく小さいからである。

Higashi および Peters⁶ は、ラット肝細胞のある分画にわれわれの成分に類似したものを発見している。すべての分画および精製カタラーゼに共通の強い沈降線がみられたほかに、第 2 のうすい沈降線がマイクロゾーム抽出液に常に認められ、可溶性分画にもしばしば認められた。この第 2 の線を与える蛋白は、pH 6 の 2.27 M 硫酸アンモニウム溶液には可溶で、過酸化水素の分解を触媒しない。この肝臓成分の抗原性物質と赤血球中のわれわれの微量成分とを比較するために、寒天ゲル内拡散分析を次のように行なった。すなわち、ヒト赤血球溶血液およびヒト肝ホモジネートに対する抗ヒト赤血球カタラーゼ、ラット赤血球溶血液およびラット肝ホモジネートに対する抗ラット肝カタラーゼである。

いずれの場合にも、前述の主成分および微量成分に相当する 2 本の沈降線が現われた。その上、各動物種において、一方の組織における主成分および微量成分による沈降線は、他方の組織の主成分および微量成分による沈降線とそれぞれ融合した。これに類似した結果を伊藤²² も報告している。この所見は、ここに報告した赤血球の微量成分が肝臓に認められた第 2 の成分にきわめて類似しており、これら 4 つ (すなわち、赤血球の主分画および微量分画、ならびに肝臓の主分画および微量分画) は、いずれも Nishimura ら¹⁸ がヒトおよびラット組織から得た活性のアイソザイムについて証明したように、ある共通の抗原性をもつことを示すと思われる。

ここに示したように、この 2 つの成分が互いに免疫学的に関係があるばかりでなく、共通の反応部位をもっている可能性が強いことは、われわれの微量成分が、カタラーゼ分子の構成単位であるという可能性を考慮すべきであることを示す。他の研究室では、主としてウシ肝カタラーゼの研究から、本酵素の構成単位の存在を示唆する成績を得ている。たとえば、Saha ら²³ は、高濃度の尿素を用いて、完全な活性カタラーゼの沈降定数が 11.2S であるのに対して、沈降定数が 2.1 S の分画を得ている。鮫島および柴田²⁴ は、この酵素の構造が 6 つの単位から成っており、沈降定数 2 S であると結論した。Schroeder ら²⁵

analysis of the amino acid sequence of bovine liver catalase, interpreted their evidence to indicate that the enzyme molecule, weighing about 250,000 is made up of three or four identical chains, in agreement with a similar earlier conclusion of Tanford and Lovrien.²⁶ Nishimura et al¹⁸ interpreted their immunoelectrophoretic studies of highly purified rat erythrocyte catalase as support for the subunit hypothesis, and suggested that their three-component fraction consists of three pairs of subunits, or six components. Assuming a molecular weight between 220,000-250,000 for catalase, their subunit would have a molecular weight of about 37,000-42,000, which is the same order of magnitude as the estimated molecular weight of the minor component reported here. Valentine,²⁷ on the basis of electron studies of crystalline bovine liver catalase, has proposed an ingenious model for the enzyme which is consistent with much of the chemical and physical data previously reported. His model consists of six subunits, four of which contain an iron atom; each subunit has a molecular weight of about 30,000-45,000.

So far, attempts using acid, alkaline or urea denaturation, to induce dissociation of the intact enzyme into smaller units retaining their immunological reactivity, have been unsuccessful. These failures do not necessarily negate our assumption that the minor component might be a subunit of catalase; rather they demonstrate that the methods employed here have compromised the structural integrity of the molecule to the extent that it no longer reacts with anticatalase.

For the identification of the present study minor component with any of the subunits alluded to above, however, further specific structural analysis is required. Suffice it to say that one may expect to find differences between the liver and erythrocyte subunits reflecting the differences between the fully constituted enzymes from the two tissues. Higashi et al have reported that rat erythrocyte catalase differs from liver catalase in the same species in electrophoretic mobility, enzyme activity per unit of protein or heme, heat stability, immunological specificity, amino acid composition and the like.^{16,28} Nishimura et al have demonstrated differences between the two human catalases by immunoelectrophoresis and sucrose gradient centrifugation.¹⁸

Another possibility for consideration is that the minor component is a precursor of catalase; this does not necessarily exclude the possibility that it is also a subunit, as outlined above. Suggestive evidence for this from studies of liver catalase is that the minor component is found only in the microsomes, presumably sites of active synthesis of the enzyme; further, microsomal catalase,

は、ウシ肝カタラーゼのアミノ酸配列の詳しい分析から得た所見から、分子量約250,000のこの酵素が、同一の鎖3ないし4本から成っているものと解釈しているが、これは先に Tanford および Lovrien²⁶ が得た結論と一致している。Nishimura ら¹⁸ は、高度に精製したラット赤血球カタラーゼについて免疫電気泳動的研究を行なったが、その実験結果は構成単位説を支持するもので、その3成分分画は3対の構成単位、すなわち、6つの成分から成っていることを示唆した。カタラーゼの分子量を220,000ないし250,000と仮定すれば、この構成単位の分子量は約37,000ないし42,000となる。これは、われわれの微量成分の推定分子量と同じ程度である。Valentine²⁷ は、ウシ肝カタラーゼ結晶の電子顕微鏡研究の結果、この酵素に対する巧妙なモデルを提案したが、これは、既報の化学的および物理的知見の多くと一致するものである。このモデルでは、6つの構成単位があり、そのうち4つは鉄原子を含み、各単位の分子量は約30,000ないし45,000である。

酸、アルカリおよび尿素による変性を用いて、構造の完全な酵素を免疫学的活性を保有する小単位に分解しようとする試みは現在までのところ成功していない。このことは、この微量成分がカタラーゼの構成単位であろうというわれわれの仮定を必ずしも否定するものではない。むしろ、そのような手法によっては分子構造の統合性が変更されて抗カタラーゼと反応しなくなることを示すものといえよう。

しかし、われわれの微量成分が、上述の構成単位のいずれに相当するかを確認するためには、さらに詳細に構造の研究を行なう必要がある。ここでは、肝カタラーゼと赤血球カタラーゼとの間にみられる相違を反映して、2つの組織の酵素の構成単位の間にも差異の存在する可能性のあることを指摘しておくにとどめる。東らは、ラット赤血球カタラーゼは、同じくラット肝臓カタラーゼとは、電気泳動易動度、蛋白またはヘムの単位当たり酵素活性、熱安定性、免疫特異性、アミノ酸組成、その他が異なると報告している。^{16,28} Nishimura らは、免疫電気泳動および蔗糖密度勾配遠沈法によって人間におけるこれら2つのカタラーゼに相違のあることを証明した。¹⁸

もう1つ考えられる可能性は、この微量成分がカタラーゼの先駆体であるということであるが、これは前述の構成単位であるという可能性を必ずしも否定するものではない。これを示唆すると思われる証拠としては、肝臓カタラーゼの研究において、微量成分がミクロゾーム、すなわち酵素の活発な合成が行なわれると思われる部位にのみみられたことである。その上、抗カタラーゼと反応

precipitates of which with anticatalase include the minor component, was most rapidly labelled with injected C-14 leucine.²⁹

Should the minor component turn out to be a catalase precursor, one might speculate further, with respect to the genetic control of catalase synthesis, that the synthetic gene for the apoenzyme is intact in the acatalasic, as indicated by the presence of the 'precursor.' In this connection, Jensen and Hyde's recent report of the recovery of crystalline 'apocatalase' from catalase deficient bacteria may be pertinent.³⁰ At least two components were thought to be present judging by sedimentation constants; double diffusion assay against anticatalase and 'antiapocatalase' seemed to support the conclusion that the 'apoenzymes' were probably subunits of the intact enzyme and though antigenically similar to it, not identical, a finding with which observations for human erythrocyte catalase by the authors of this report are in accord.

Aebi et al³¹ have demonstrated in acatalasic individuals, studied with methods similar to the present study, a small but measurable amount of residual enzyme activity, about 0.1%-1.3% of normal. Erythrocyte hemolysates purified by Sephadex G-100 gel filtration yielded fractions that on Ouchterlony plates and immunoelectrophoretic analysis reacted with anticatalase in a manner indistinguishable from normal catalase and the precipitin lines fused completely, indicating that the residual activity in the Swiss acatalasic hemolysates is probably ascribable to a protein similar if not identical with the enzyme of normal individuals.* Purified protein from acatalasic hemolysates reported here, on the other hand, though reacting with anticatalase, does not do so in a manner identical with purified catalase from normal individuals, nor does it show any enzyme activity; rather it seems to be an inactive subunit thereof. Takahara et al³² also isolated a protein from acatalasic hemolysates that migrated in the position of active catalase, showed no enzyme activity, but precipitated with anticatalase in the quantitative precipitin reaction similar to that employed in experiments by the authors. Ogata and Takahara have confirmed these findings.² Whether this fraction is identical with the present minor component is not known. Further, skin cell tissue culture lines from two acatalasic individuals (numbers 3 and 4 in Figure 2) showed no catalase activity,^{33,34} in contrast to those of Aebi where slight but definite activity was demonstrable in fibroblasts and lymphoepithelial tissue from their acatalasic subject.³¹

して生ずる沈降物に微量成分が含まれているマイクロゾムカタラーゼは、C-14ロイシンの注射によって最も急速に標識される。²⁹

微量成分がカタラーゼの先駆体であるならば、カタラーゼ合成の遺伝的調節についてさらに次のことが考えられる。すなわち、無カタラーゼ症において「先駆体」が存在することは、アポ酵素に対する合成遺伝子が無傷の状態にあるということである。これに関連して、カタラーゼの欠乏するバクテリアから結晶「アポカタラーゼ」を分離したという Jensen および Hyde の最近の報告がある。³⁰ 沈降定数から判断して少なくとも2つの成分が存在すると考えられ、かつ抗カタラーゼおよび「抗アポカタラーゼ」に対する二重拡散分析の結果は、「アポ酵素」はおそらく完全な酵素の構成単位であり、抗原的には同一ではないまでもそれに類似しているという結論を支持するよう思われた。これは、ヒト赤血球カタラーゼに対するわれわれの観察結果と一致する。

Aebi ら³¹ は、われわれと類似した方法で研究した結果、小量であるが測定しうる程度の残留酵素活性、すなわち、正常の約0.1ないし1.3%の活性を無カタラーゼ症において証明している。赤血球溶血液からセフデックスG-100ゲル濾過によって精製された分画が、Ouchterlony 板上および免疫電気泳動分析において、抗カタラーゼとの反応が正常カタラーゼと等しく、沈降線は完全に融合することを認めている。これは、スイス人の無カタラーゼ溶血液における残余活性がおそらく正常人の酵素と、同一ではないまでも、これに類似した蛋白に起因することを示すものである。*他方、われわれの無カタラーゼ溶血液から得た精製蛋白は、抗カタラーゼと反応するが、その反応の仕方は正常人から得た精製カタラーゼとは同じではなく、また酵素活性も示さない。それは、むしろ酵素の不活性な構成単位であると思われる。高原ら³² も無カタラーゼ溶血液から蛋白を分離しており、この蛋白は電気泳動で活性カタラーゼの位置に移動し、酵素活性を示さなかったが、われわれの実験において行なったと同様の定量的沈降反応においては、抗カタラーゼによって沈降した。緒方および高原は、この所見を確認している。² この分画が、われわれの微量成分と同一のものかどうかはわからない。なお、われわれの無カタラーゼ症2例(図2における第3および第4例)から得た皮膚細胞は組織培養でカタラーゼ活性を示さなかった。^{33,34} これに対して Aebi の実験においては、無カタラーゼ症例から得た線維芽球およびリンパ上皮組織に少量ではあるがはっきりと活性を証明している。³¹

* At the 3rd International Congress of Human Genetics, 5-10 September 1966, in Chicago, USA, Aebi reported that, in fact, the active catalase protein in the Swiss acatalasics is not identical with the active enzyme in normal individuals.

米国イリノイ州シカゴにおいて1966年9月5-10日開催された第3回国際人類遺伝学会において、Aebi は、スイス人の無カタラーゼ症患者の活性カタラーゼ蛋白は、正常人の活性酵素と類似していないと報告した。

Thus, on the basis of the presently available evidence, acatalasemic individuals reported here probably differ slightly from the Swiss; though possibly ascribable to methodological differences, this does not seem to be the whole explanation and there is little reason to doubt that the demonstrated differences are real. That such differences exist is not surprising in view of the heterogeneity of normal catalase enzyme,¹⁴⁻²¹ as well as of the acatalasemic trait itself.¹² This in turn implies different genetic mechanisms at play. Aebi et al³¹ postulate that the genetic defect in their cases may be due to a 'controller gene' disease and not a structural gene deficiency. Though the template for the enzyme is present, for some reason, synthesis is blocked. In acatalasemics of this study, assuming that the minor component represents a precursor of the intact enzyme and that the protein found in the acatalasemic hemolysates is similar, if not identical with it, a different genetic mechanism seems more likely. Though the template for the precursor is apparently either intact or sufficiently similar to normal to permit synthesis of the precursor, conversion to the active enzyme does not follow. At least two alternative explanations come to mind. First, the precursor, though antigenically similar to normal could be structurally different enough so that assembly of the defective subunits into the larger 'apocatalase' molecule cannot occur. Presumably a defect in only one of the three types of subunits postulated by Valentine²⁷ could bring about this result. Here, obviously, we are dealing with a structural gene defect. Alternatively, though the precursor subunits are identical with those in the normocatalasemic, a defective 'coupling' enzyme presumably required for joining the subunits prior to addition of the prosthetic group, could also account for the failure. In this connection it is of some interest that Mizuhara reported an excess of coproporphyrin in the urine of acatalasemic patients.³⁵ This suggests that the tetrapyrrole which would normally join with the catalase apoenzyme is unable to do so and, being in excess, is degraded along the usual metabolic pathway for eventual excretion in the urine.

It is obvious from the foregoing that the relationship of the minor component to the subunits of active enzyme requires further intensive study. Only when the amino acids of these substances have been accurately determined and the sequences are fully known will some of the intriguing puzzles encountered above be solved.

SUMMARY

Quantitative precipitin studies coupled with immunochemical techniques have identified in normal human erythrocytes a minor component of catalase which,

かくて、現在まで入手されている所見からみて、われわれの無カタラーゼ症例はおそらくスイスにおけるものとは少し異なっていると思われる。これはあるいは方法の差異に起因するものかもしれないけれども、これだけでは全体の説明にはならないようである。そしてこの認められている差異が真実のものであるということを疑う理由はほとんどない。しかし、かかる差異が存在することは、正常カタラーゼ酵素に多様性があること¹⁴⁻²¹ならびに無カタラーゼ形質そのもの¹²から考えると驚くにはあたらない。さらにこのことは、異なった遺伝的機構が働いていることを意味する。Aebiら³¹は、これらの症例における遺伝的欠陥は「制御遺伝子」病によるもので、構造遺伝子の欠陥によるものではないと仮定した。すなわち、酵素に対する鑄型はあるけれども、その合成はなんらかの理由で阻止されている。われわれの無カタラーゼ症例では、微量成分が完全な酵素の先駆体であり、無カタラーゼ溶血液中にみられる蛋白が、それと同一あるいは類似したものであると一応仮定すれば、さらに別の遺伝機構が働いている可能性が強いように思われる。つまり、この先駆体に対する鑄型に障害がないか、またはほとんど正常であるために、先駆体の合成は起こるが、続く活性酵素への転換が起こらない。これに対して少なくとも2つの説明が考えられる。まず第1に、この先駆体は、抗原的にはほとんど正常ではあるけれども、構造的には異なっているために、この欠陥のある構成単位が結合して、より大きな「アポカタラーゼ」分子を形成することができない。Valentine²⁷の仮定している3種の構成単位のうち1つだけに欠陥があってもおそらくこの結果をもたらすことができる。この場合には、構造遺伝子の欠陥が問題であることになる。一方、もう1つ考えられることは、この先駆体構成単位が正常カタラーゼの構成単位と同じであるが、配合族の添加に先立って、構成単位が結合するのに必要と思われる「結合酵素」の欠陥によっても、前述の現象が起こりうるであろう。これに関連して、水原³⁵は、無カタラーゼ症の尿にコプロポルフィリンが多量に認められると報告しているのは、いくらか興味のあることである。これは、正常な状態で、通常、カタラーゼのアポ酵素と結合するテトラパイロールが結合できないため過剰となり、普通の新陳代謝経路を経て分解されて、結局、尿中に排泄されることを示唆する。

前述のことから微量成分と活性酵素の構成単位との関係について、さらに綿密な研究を必要とすることは明らかである。これらの物質のアミノ酸が正確に決定され、その配列が十分にわかって、はじめて前述の興味ある諸問題が解決されるであろう。

総括

定量的沈降反応と免疫化学的手法によって正常ヒト赤血球にカタラーゼの微量成分を検出したが、これは、ウサギ抗ヒトカタラーゼ血清と反応するが、酵素活性を有しな

though reacting with rabbit antihuman catalase serum, lacks enzyme activity. Hemolysates from presumed carriers (heterozygotes) of the gene for acatalasia also show the minor component, though the quantity of the active enzyme itself is reduced. Preparations from acatalasic (homozygotic) individuals contain only the minor inactive component. Purification by Sephadex gel filtration shows the minor component to have a molecular weight about 1/6th of the fully constituted active enzyme. There is no Soret absorption. The authors postulate the minor component to be a subunit and/or precursor of catalase. Based on these findings, a possible genetic interpretation of the defect in human hereditary acatalasia is offered.

い。無カタラーゼ症遺伝子の保因者と推察される者(異型接合体)の溶血液には、活性の酵素そのものの量は減少しているけれども、微量成分が含まれていることを認めた。無カタラーゼ症の者(同型接合体)の溶血液には、非活性の微量成分のみが含まれている。セファデックスゲル濾過による精製の結果、微量成分の分子量は完全な構造をもつ活性酵素の約1/6であることがわかった。Soret吸収はない。著者らは、この微量成分がカタラーゼの構成単位ないし先駆体であると仮定する。これらの所見に基づいて、人間における遺伝性無カタラーゼ症における欠陥に対する遺伝学的解釈を述べた。

REFERENCES

参考文献

1. HIGASHI T, YAGI M, HIRAI H: Immunochemical studies on catalase. 1. Assay of catalase in erythrocytes and livers. *J Biochem(Tokyo)* 49:707-12, 1961
(カタラーゼの免疫化学的研究. 1. 赤血球および肝カタラーゼの定量)
2. OGATA M, TAKAHARA S: The catalase protein of acatalasemic and hypocatalasemic red blood cells. 1. Quantitative precipitin studies on hemolysate and acetone extract. *Acta Med Okayama* 18:1-8, 1964
(無カタラーゼおよび低カタラーゼ赤血球のカタラーゼ蛋白. 1. 溶血液およびアセトン抽出液の定量的沈降反応)
3. HERBERT D, PINSENT J: Crystalline human erythrocyte catalase. *Biochem J* 43:203-5, 1948
(結晶ヒト赤血球カタラーゼ)
4. OUCHTERLONY O: Antigen-antibody reactions in gels; types of reactions in a coordinated system of diffusion. *Acta Path Microbiol Scand* 32:231-40, 1953
(ゲル内における抗原-抗体反応, 相互拡散試験における各種の反応)
5. GRABAR P, WILLIAMS CA, Jr: Method immuno-electrophoretique d'analyse des melanges des substances antigenique. *Biochim Biophys Acta* 17:67-74, 1955
(抗原性物質混合物の免疫電気泳動法)
6. HIGASHI T, PETERS T, Jr: Studies on rat liver catalase. 1. Combined immunochemical and enzymatic determination of catalase in liver cell fractions. *J Biol Chem* 238:3945-51, 1963
(ラット肝臓カタラーゼに関する研究. 1. 肝臓細胞分画におけるカタラーゼの免疫化学的および酵素的測定)
7. GLICK D, GOOD RA, et al: Measurement of precipitin reactions in the millimicrogram protein-nitrogen range. *Science* 128:1625-6, 1958
(蛋白-窒素のミリマイクログラムの範囲における沈降反応の測定)
8. PETERS T, Jr: The biosynthesis of rat serum albumin. 1. Properties of rat albumin and its occurrence in liver cell fractions. *J Biol Chem* 237:1181-5, 1962
(ラット血清アルブミンの生合成. 1. ラットアルブミンの性状および肝臓細胞分画におけるその存在)
9. BEERS RF, Jr, SIZER IW: A spectrophotometric method for measuring the break-down of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-40, 1952
(カタラーゼによる過酸化水素分解測定のための分光光度的方法)
10. ANDREWS P: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem J* 91:222-3, 1964
(セファデックスゲル濾過による蛋白分子量の推定)
11. HAMILTON HB, NEEL JV, et al: The frequency in Japan of carriers for the rare recessive gene causing acatalasia. *J Clin Invest* 40:2199-208, 1961
(まれな劣性遺伝症無カタラーゼ血症の遺伝子保因者の日本における頻度)
12. HAMILTON HB, NEEL JV: Genetic heterogeneity in human acatalasia. *Amer J Hum Genet* 15:408-19, 1963
(遺伝学的にみた人間の無カタラーゼ症の異質性)

13. MICHELI A, PEETOOM F, et al: Immunochemical study of hemolysates of human erythrocytes. 2. Identification of the catalase of erythrocytes. *Ann Inst Pasteur* 98:694-700, 1960
(ヒト赤血球溶血液の免疫化学的研究. 2. 赤血球カタラーゼの確認)
14. PRICE VE, GREENFIELD RE: Liver Catalase. 2. Catalase fractions from normal and tumor bearing rats. *J Biol Chem* 209:363-76, 1954
(肝臓カタラーゼ. 2. 正常および腫瘍担体ラットのカタラーゼ分画)
15. 東 恵彦, 柴田泰生, 平井秀松: カタラーゼのアイソザイム. *生物物理化学*. 11: 147-53, 1965年
(HIGASHI T, SHIBATA Y, HIRAI H: Isozymes of catalase. *Seibutsu Butsuri Kagaku-Phys Chem Biol*)
16. HIGASHI T, SHIBATA Y: Studies on rat liver catalase. 4. Heterogeneity of mitochondrial and supernatant catalase. *J Biochem(Tokyo)* 58:530-7, 1965
(ラット肝臓カタラーゼに関する研究. 4. 糸粒体および可溶性分画カタラーゼの多様性)
17. HOLMES RS, MASTERS CJ: Catalase heterogeneity. *Arch Biochem Biophys* 109:196-7, 1965
(カタラーゼの多様性)
18. NISHIMURA ET, CARSON SN, KOBARA TY: Isozymes of human and rat catalase. *Arch Biochem Biophys* 108:452-9, 1964
(ヒトおよびラットカタラーゼのアイソザイム)
19. NAKATANI M: A chromatographical study of crystalline catalase from bovine liver. *Agr Biol Chem* 22:308-13, 1958
(ウシ肝臓結晶カタラーゼのクロマトグラフィ研究)
20. THORUP AO, Jr, CARPENTER JT, HOWARD P: Human erythrocyte catalase: Demonstration of heterogeneity and relationship to erythrocyte ageing *in vivo*. *Brit J Haemat* 10:542-50, 1964
(ヒト赤血球カタラーゼ・多様性の証明および体内赤血球加齢との関係)
21. BAUR EW: Catalase abnormality in Caucasian family in the United States. *Science* 140:816-7, 1963
(米国白人家族におけるカタラーゼ異常)
22. 伊藤一重: カタラーゼの免疫化学的研究. *生化学*35: 711-8, 1963年
(ITO K: Immunochemical studies on catalase. *Seikagaku- J Jap Biochem Soc*)
23. SAHA A, CAMPBELL DH, SCHROEDER WA: Immunochemical studies on liver and erythrocyte catalases from cattle, horse, rabbit and human. *Biochim Biophys Acta* 85:38-49, 1964
(ウシ, ウマ, ウサギおよびヒト肝臓および赤血球カタラーゼに関する免疫化学的研究)
24. SAMEJIMA T, SHIBATA K: Denaturation of catalase by formamide and urea related to the subunit make-up of the molecule. *Arch Biochem Biophys* 93:407-12, 1961
(フォルムアミッドおよび尿素によるカタラーゼ変性と分子の構造単位構成との関係)
25. SCHROEDER WA, SHELTON JR, et al: Some amino acid sequences in bovine-liver catalase. *Biochim Biophys Acta* 89:47-65, 1964
(ウシ肝臓カタラーゼにおける若干のアミノ酸配列)
26. TANFORD C, LOVRIEN R: Dissociation of catalase into subunits. *J Amer Chem Soc* 84:1892-6, 1962
(カタラーゼの構造単位の分離)
27. VALENTINE RC: Subunits of the catalase molecule seen by electron microscopy. *Nature* 204:1262-4, 1964
(電子顕微鏡でみたカタラーゼ分子構造単位)
28. HIGASHI T, SHIBATA Y, et al: Purification and properties of rat erythrocyte catalase: Comparison to rat liver catalase. *J Biochem(Tokyo)* 59:115-21, 1966
(ラット赤血球カタラーゼの精製および性状; ラット肝臓カタラーゼとの比較)
29. HIGASHI T, PETERS T, Jr: Studies on rat liver catalase. 2. Incorporation of ^{14}C -leucine into catalase of liver cell fractions *in vivo*. *J Biol Chem* 238:3952-4, 1963
(ラット肝臓カタラーゼに関する研究. 2. ^{14}C -ロイシンの肝臓細胞分画のカタラーゼへの取りこみ)
30. JENSEN J, HYDE MO: 'Apocatalase' of catalase negative staphylococci. *Science* 141:45-6, 1963
(カタラーゼ陰性ブドウ球菌の「アポ・カタラーゼ」)
31. AEBI H, BAGGIOLINI M, et al: Observations in two Swiss families with acatalasia 2. *Enzymol Biol Clin* 4:121-51, 1964
(スイスにおける無カタラーゼ症2家族の観察)
32. TAKAHARA S, OGATA M, et al: The 'catalase protein' of acatalasemic red blood cells. *Lab Invest* 11:782-90, 1962
(無カタラーゼ赤血球の「カタラーゼ」蛋白)
33. KROOTH RS, HOWELL RR, HAMILTON HB: Properties of acatalasemic cells growing *in vitro*. *J Exp Med* 115:313-28, 1962
(体外培養無カタラーゼ細胞の性状)

34. KROOTH RS: Personal communication
(私信)

35. 水原舜爾: 無カタラーゼ血液症患者についての生化学的研究. 昭和32年度文部省研究費研究報告集録 - 医学および薬学編, 東京, 日本学術振興会, 昭和33年. pp 109-10.
(MIZUHARA S: Biochemical study of blood disease without catalase. In Annual Report of the Co-operative Research-Medicine, Ministry of Education. Tokyo, Japan Science Promotion Society, 1958)