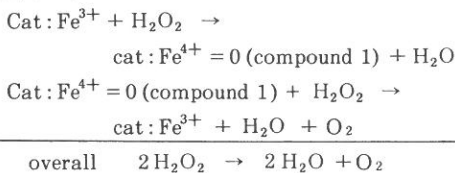


無カタラーゼ血症の成因とカタラーゼの生理的意義

鈴木和彦・緒方正名*

1. カタラーゼ

カタラーゼ (H₂O₂ - H₂O₂ oxidoreductase, EC 1. 11. 1. 6) は分子量約 240,000 で 4 つの ferriprotoporphyrin より成り立っている。そのサブユニットの分子量は約 60,000 で各々には NADPH が強固に結合している。この酵素は動物、植物、微生物の好氣的細胞に広く存在し、動物では赤血球や肝細胞に特に高い活性を示す。肝細胞では主としてペルオキシゾームに酸化酵素と共存している。カタラーゼのサブユニットは細胞の可溶画分の遊離ポリゾームで合成され、ペルオキシゾームに局在化していく。しかしカタラーゼたん白質の cDNA には移入のためのシグナルペプチド (Targeting signal) は確認されていない。²⁾ ペルオキシゾームに入るとヘム鉄が結合し 4 つのサブユニットが集合し活性のあるカタラーゼ酵素となる。²⁾ 植物では主に葉緑体に多くみいだされる。カタラーゼは脱水素酵素などの作用により生じた H₂O₂ を下記のように分解する。⁴⁾



赤血球では特にヘモグロビンの酸化を種々の酸化剤や放射線より生じたラジカルなどから防護しなければならない。赤血球のカタラーゼはこの防御作用を示す酵素系の一つであり生理的に非常に重要な作用を持っている。

2. 無カタラーゼ血症の発見

無カタラーゼ血症 (Acatalsasemia) は、1947 年に高原 (当時岡山大学医学部耳鼻咽喉科教授) によって世界で最初に発見された。

高原は家族的にみられた 3 例の歯性壊疽性顎骨炎患者の症例について報告した。当時、口腔内創面の清拭にはオキシドール (1% 過酸化水素水) が用いられており、患者は正常者のようにオキシドールを塗布しても発泡もせず、創面の血液が瞬時に黒変した。表 1 に示すように患者赤血球中の活性はほとんど測定できなかった。本症はただちに日本耳鼻咽喉科学会雑誌、⁵⁾ Lancet 誌に発表された。⁶⁾ しかしその時代では、生理的に重要な機能を有するカタラーゼが無くて人間が存在することは不可能と考えられていた。

3. 無カタラーゼ血症について

無カタラーゼ血症はその後の研究により常染色体劣性形質の遺伝疾患と判明した。図 1 は無カタラーゼ血症発症の家系図である。^{7,8)} 図 1 に示すように近親結婚

Table 1. The activities of catalases of blood from normal, hypocatalasemia and acatalasemic patients

	Activitiy (PU / gHb)**	
	Japanese	Swiss
Normal	3,384 ± 184	3,142 ± 393
Hypocatalasemia	1,115 ± 1.8	1,955 ± 348
Acatalsasemia	5.5 ± 0.8	5.9 ± 3.1

Values are means + SD. ** Activities are expressed as perborate units (PU) per g hemoglobin.

* 岡山大学医学部公衆衛生学教室

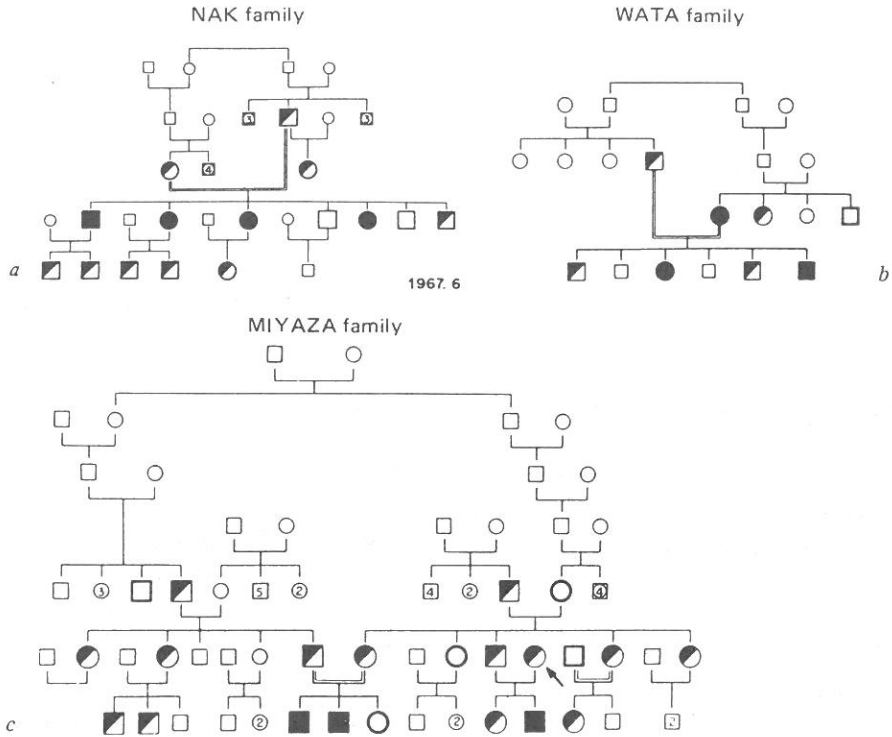


Fig. 1. Pedigrees of three families with acatalasemia. ■ ● acatalasemia ; ◼ ◉ normal (tested) ; ◼ ◉ hypocalasemia ; ◻ ◊ not tested ; || || consanguineous marriage(8).

は無カタラーゼ血症を遺伝する可能性を高くする。現在までに日本人；46家系，90人。在日韓国人；1家系，3人。スイス人；⁹⁾3家系，11人。ペルー人；¹⁰⁾1家系，2人が報告されている。日本人の無カタラーゼ血症とスイス人のそれは少し性状を異にする。スイス人型には歯性壊疽性顎骨炎がみられないが，日本人型にはその半数に歯性壊疽性顎骨炎がみられた。その機序には，口腔内の肺炎双球菌やβ-連鎖状球菌が産生した多量のH₂O₂が直接組織を破壊する場合と毛細管内に浸透したH₂O₂がヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化するためO₂運搬能を失い酸素欠乏による局所壊死をきたすという2つの可能性が考えられる。表1に示すように無カタラーゼ血症のスイス人型と日本人型の違いは，スイス人型が日本人型より血中カタラーゼ活性が高い点である。しかしこの僅かの差が過酸化水素からの害を防ぐのかもしれない。正常人と無カタラーゼ血症との間に生まれた子供は低カタラーゼ血症 (hypocalasemia) と名付けられている。本症は相同染色体のカタラーゼ遺伝子座の一方に正常の遺伝子

を，他方に無カタラーゼ血症のそれを有する異型接合体で，無カタラーゼ血症のキャリアである。低カタラーゼ血症の血中カタラーゼ活性は正常人のその50%を示す。また正常人の血中カタラーゼ活性の分布と低カタラーゼ血症のそれとはほとんど交叉せず，血液カタラーゼ活性の測定により本症は容易に判別できる⁷⁾(図2)。低カタラーゼ血症は日本人の約500人に1人の割合で存在する。低カタラーゼ血症の頻度をマーカーとして，人類遺伝学的な立場より民族，種族のオリジンを推測する試みがなされている⁷⁾(図3)。その頻度は図3にみられるように中国北部から中部，南部の順に低く，また中国北部，朝鮮，対馬，日本の順となっている。これらのことよりこの遺伝子は華北より朝鮮半島を経由して日本，または華中より華南，台湾を経由して日本に到達したと考えられる。わが国で朝鮮半島に近い対馬では，その頻度は中間値を示す。沖縄ではこの頻度は極めて低く沖縄の場合は他の起源をもつかもしれない。

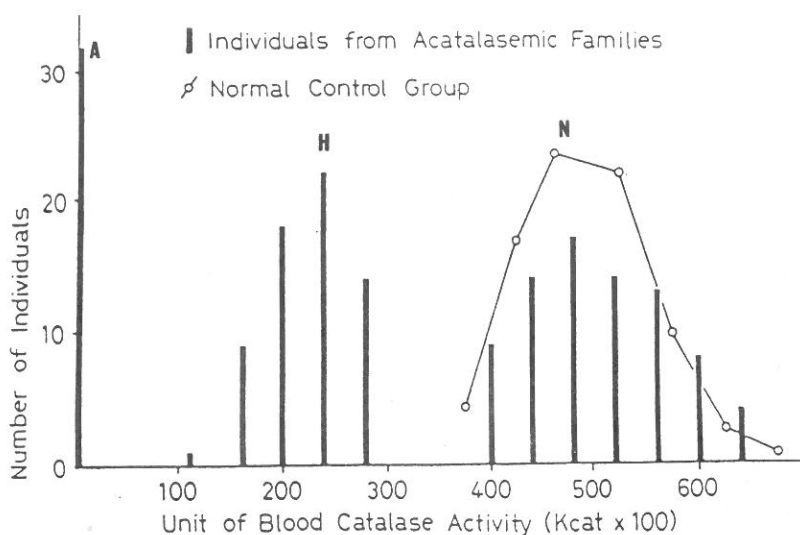


Fig. 2. Frequency distribution of blood catalase activity in the members of 13 acatalasemic families(8).

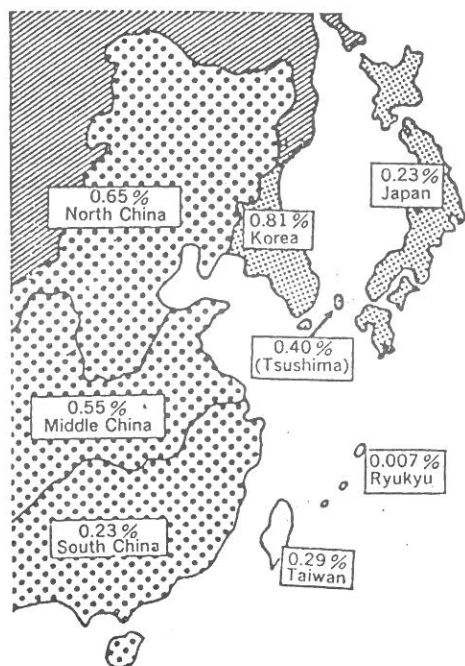


Fig. 3. Distribution of hypocatalasemia in various parts of Eastern Asia(7).

4. 残余カタラーゼの発見

日本人の無カタラーゼ血症の患者血中にも正常人の

約、0.1～0.3%のカタラーゼ活性がある。緒方らはこれをカタラーゼ様物質による活性ではなくカタラーゼタンパク質によるものと結論し、これを残余カタラーゼと名付けた。¹¹⁾この残余カタラーゼの等電点は正常人のカタラーゼと等しく¹²⁾(図4)，またそのサブユニ

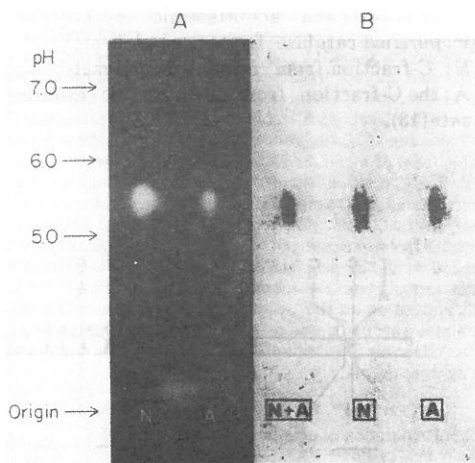


Fig. 4. Agarose gel IEF and enzyme immunoassay of catalase in the C-fraction from erythrocytes of Japanese acatalasemia samples and normal controls. (A)Catalase activity staining by the starch iodine reaction. (B)Detection of catalase by immunoenzymatic method after blotting. N:normal; A:acatalasemia; N+A: mixture of both samples(13).

ットの分子量もウェスタンブロッティング法により正常酵素と差異は認められなかった¹³⁾(図5)。熱安定

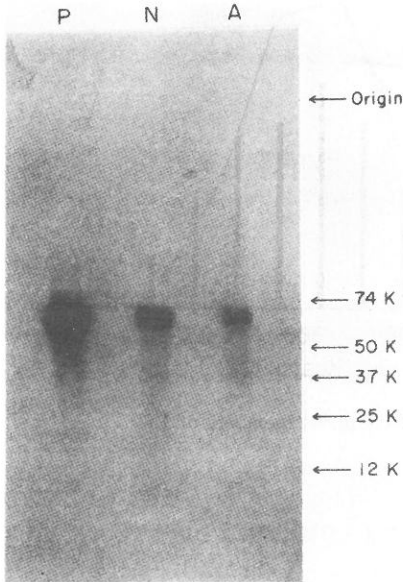


Fig. 5. SDS-PAGE followed by immunoblot analysis of catalase in the C-fraction prepared from normal and acatalasemic erythrocytes. P: purified catalase from normal hemolysate; N: C-fraction from normal hemolysate; and A: the C-fraction from acatalasemic hemolysate(13).

った。最近、大隅らは日本人アカタラセミア皮膚培養細胞中にカタラーゼたん白質のmRNAがほとんど認められないことを報告した^{14, 15)}これらの事実は日本人型のアカタラセミアはごく微量しかカタラーゼを合成しないために活性が低下したと考えられる。しかしその微量合成されたカタラーゼたん白質は正常と同じ性質をもつたん白質である。Quan F. らは最近、カタラーゼたん白質の遺伝子塩基配列を解析し13のエクソンと12のイントロンを持つ約34 kbの遺伝子であることを明らかにした¹⁶⁾またWen J. K.¹⁷⁾らはアカタラセミア患者遺伝子と正常遺伝子との間には7箇所塩基置換を見いだした¹⁷⁾(図6)。またさらにこれらの変異のうち、第4イントロンの5番目の塩基がグアニンからアデニンに置換されるとスプライシングの効率が低下することを確かめた。実験は問題の正常および変異カタラーゼ遺伝子断片を α -グロビン遺伝子の第3エキソン内に挿入した人工遺伝子を作製し、SV40の複製開始部位の配列を含むプラスミドに組み込まれたキメラ遺伝子をCOS細胞(SV40により形質転換させたサル腎臓由来の樹立細胞)に導入し、合成されたmRNAの解析によりスプライシング異常が原因と結論した。しかし現在無カタラーゼ血症患者はほとんど臨床症状がみられず正常人と同じ生活ができる。高原の発見した歯性壞疽性顎骨炎はおそらく環境・栄養因子の関連が大きく関与していたものと予測される。鈴木らは食品中のカタラーゼ活性を調べ葉緑体の多い植物に比較的高い活性のあることを確認したが納豆、しょうがや生食することの多い大根、キャベツ、人參

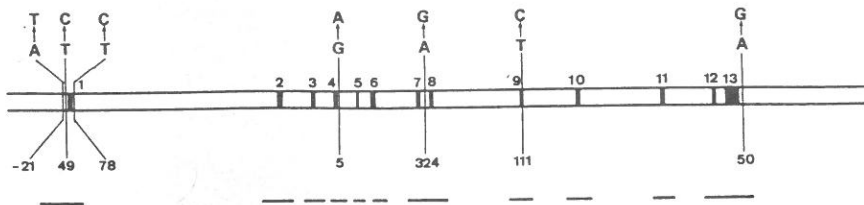


Fig. 6. Base substitutions found in the acatalasemia gene. The catalase exon sequences are shown by filled boxes and are numbered. Base substitutions in acatalasemia gene are indicated by upward arrows, showing the change from the nucleotides in the reported normal sequence to those in acatalasemia sequence(17).

性も日本人型のカタラーゼたん白質は正常人のそれと差は見られなかった。免疫化学的にも無カタラーゼ血症の血中カタラーゼたん白質はほとんど認められな

などの野菜にも高い活性のあることを確かめた。納豆など西日本でかつてはあまり食べられていない食品に高い活性を示す点は、過去の高原氏病の発症の地域差

を考えると興味ある知見と思われる。

5. 無カタラーゼ血症マウス

Feinstein らは600 rads の放射線照射を受けたマウスの子 12,306 匹より低カタラーゼ血症マウスを選びこの変異種の交配をかさね無カタラーゼ血症マウスの開発、純系化を行った¹⁸⁾純系化されたマウスは野ねずみ色で普通のマウスと区別がつかない。しかも成長、大きさなど形態学的に特記すべき異常所見はほとんど認められない。なぜ正常マウスと変わりなく生存できるか、人間の無カタラーゼ血症患者と同様いまだ解明されていない。

6. 無カタラーゼ血症マウスの残余カタラーゼ

無カタラーゼ血症マウスの血中カタラーゼ活性は正常の 1.1 ~ 2.4 % と低い¹⁹⁾しかも温度、尿素、水素イオン濃度などの変化に対し不安定で人のスイス人型の無カタラーゼ血症の残余カタラーゼと類似する^{20, 21)}等電点電気泳動法で正常マウスの血液カタラーゼの等電点と無カタラーゼ血症マウスの血液残余カタラーゼのそれと比べた。無カタラーゼ血症の血液残余カタラーゼの等電点は正常マウスの血液カタラーゼに比べアルカリ側にある¹²⁾(図 7)。

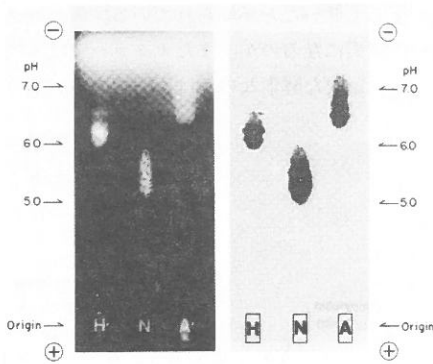


Fig. 7. Agarose isoelectric focusing of catalase in the C-fraction from hemolysates of normal(N), hypocatalasemic(H) and acatalasemic (A) mice.

また無カタラーゼ血症の赤血球カタラーゼの生存期間は短く赤血球の成熟に伴い活性が消失し活性が低下するものと考えられる^{22, 23)}緒方らは正常マウスとアカタラセミアマウスの肝カタラーゼの半減期を求め正常マウス 19.2 時間、アカタラセミアマウス 10.0 時間と結論した。表 2 に示すようにアカタラセミアマウスでは分解速度の亢進がみられた²⁴⁾鈴木らは最近たん白分解阻害剤が 37 °C でのカタラーゼの活性低下を防止す

Table 2. Half life, K_D and K_S of catalase in normal and acatalasemia mouse liver calculated from recovery rate of catalase activity after intraperitoneal injection of aminotriazole (g/kg body weight)

	Half life	K_D	K_S
Normal	19.2 hr	0.036	0.271
Acatalasemia	10.0 hr	0.069	0.168

K_D : Rate of catalase degradation(hr^{-1})
 K_S : Rate of catalase synthesis(PU/mg protein/hr)

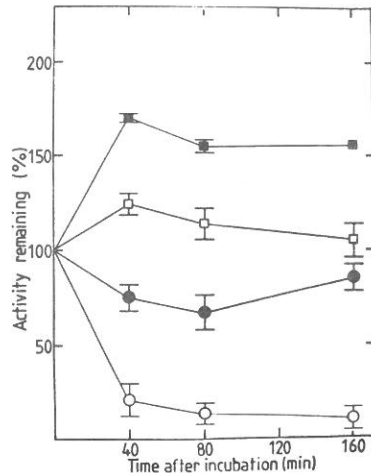


Fig. 8. Changes with time in the activities of catalase in hemolysates from actalasemic and normal mice. The hemolysates were incubated at 37°C, pH 6.8. The activity was measured at 20°C, pH 6.8. ●:actalasemic(+GM); ○:acatalasemic; ■:normal(+GM); □:normal. Gabexate mesilate (GM) was added in the hemolysate at concentration, 1mg/ml.

ることを示した(図 8)。

また無カタラーゼ血症の肝カタラーゼたん白質を肝カタラーゼ抗体を用いて免疫学的に定量すると正常の約 69 % が証明される。無カタラーゼ血症の肝カタラーゼ活性は正常の 20 ~ 28 % である²⁴⁾ので無カタラーゼ血症肝には活性の低いカタラーゼたん白質が多く存在するのかもしれない²⁵⁾しかしアカタラセミアではサブユニットが分解しやすいため分離したサブユニットのため抗原決定基が二倍になったとも考えられる。この問題は慎重な解析が必要である²⁶⁾これらの性質より無カタラーゼ血症の残余カタラーゼのたん白質は正常とは分子構造が異なっていることが推測される。鈴木らは無カタラーゼ血症マウス肝 RNA を抽出し、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法により mRNA のサイズと量を求めた(図 9)。この結果、無カタラ

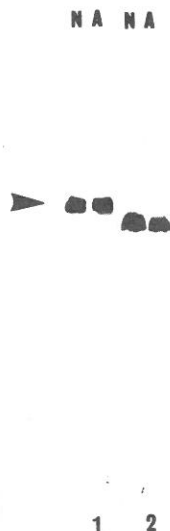


Fig. 9. Northern blotting of liver RNA. Total RNA (50 μ g) was electrophoresed on a 1% agarose-formaldehyde gel. In panels 1 and 2, catalase cDNA probe-B and β -actin probe were used, respectively. Lane A, acatalasemic; lane N, normal. Arrowhead denotes the band of catalase mRNA.

ーゼ血症マウス肝には正常とほぼ同量, 同サイズのカタラーゼmRNAのあることを確認した。従って無カタラーゼ血症マウスのカタラーゼ活性低下の成因は日本人型の場合と異なりカタラーゼmRNAは正常とほぼ同量, 合成されるが, 転写機構の異常か構造遺伝子の変異のため合成された異常カタラーゼ分子がたん白質分解酵素により速やかに分解され, 活性の低下が急速に生じるものと推察される。これらの詳細は今後の無カタラーゼ血症マウスの残余カタラーゼ遺伝子の解析などにより明らかになるものと思われる。

7. カタラーゼの生理的意義

カタラーゼはスーパーオキシドディスムターゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどと並び, 酸化酵素などにより産生された H_2O_2 のラジカルスカベンジャーの一つである⁷⁾ (図10)。カタラーゼは H_2O_2 に対する親和性が低いので H_2O_2 の濃度が低いときにはほとんど働かない。ところがグルタチオンペルオキシダーゼは H_2O_2 に対する親和性が高いので H_2O_2 の濃度が低いときにはこの酵素が働く⁴⁾。しかし先に述べたように無カタラーゼ血症の人およびマウスとがほとんど正常とかわりなく生存できる理由に関して現在ほとんど知られていない。他の動物にもアヒル, ガチョウ, 山鳥, 犬などは正常な動物も血液中のカタラーゼ活性が極めて低いことが知られている⁴⁾。何がカタラーゼ活性酵素になるのか, またカタラーゼは本当に生物にとって重要な酵素なのかは不明である。このた

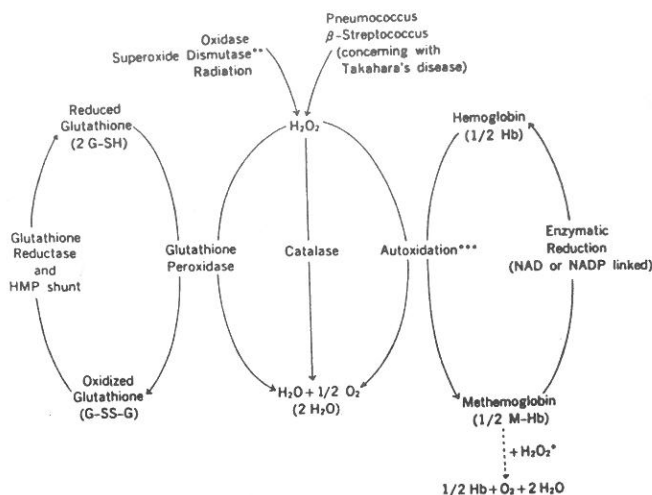


Fig. 10. Alternate pathways for reduced glutathione and hydrogen peroxide in the incubated red cells. *: high concentration of H_2O_2 .

めかつてはカタラーゼは地球上に放射線が降り注いでいた頃に必要酵素の遺伝的残遺と言われたこともあった。しかし最近では生体内でスーパーオキシドデイスムターゼにより産生された H_2O_2 の処理機構としての意義のほか、外来性の NO 、 NO_2 などにより生成された赤血球メトヘモグロビンの自酸化による増量機序の抑制を行っていると考えられている。²⁸⁾

金属水銀のヒト赤血球への取り込みはカタラーゼ活性に依存している。²⁹⁾ 無カタラーゼ血症マウスでは金属水銀は酸化されないため脂肪含量の多い脳や胎児に移行しやすい。³⁰⁾

またクロフィブレイトなど高脂質血症の治療薬は肝のペルオキシゾームのカタラーゼ活性を高めることが

知られている。³¹⁾ エネルギー摂取量を減少させるとマウスなどの寿命を延ばすことが知られている。Koi-zumi A. らは食餌制限(60%)したマウスではカタラーゼ活性が40~60%程度上昇し脂質の過酸化物が13~30%程度減少することを報告している。³²⁾ また、たん白質-エネルギー低栄養状態(PEM)では血中カタラーゼは対照の約2倍に上昇しPEMの診断に応用することが考えられている。³³⁾

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、数々の御指導と御援助を賜りました、岡山短期大学学長、新見嘉兵衛先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Kirkman, H. N. and Gaetani, G. F. : Catalase : A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4343-4347, 1984.
- 2) Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Oosumi, T. and Hashimoto, T. : Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 313-317, 1986.
- 3) Robbi, M. and Lazarow, P. B. : Synthesis of catalase in two cell free protein-synthesizing systems and in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4344-4348, 1978.
- 4) Eaton, J. W. : Acatlasemia In : The metabolic basis of inherited disease. 6th edition (Scriver, C. R. ed), pp1551-1561, McGRAW-HILL Information Services Company, 1989.
- 5) Takahara, S. and Miyamoto, H. : Clinical and experimental studies on the odontogenous progressive necrotic ostitis due to lack of blood catalase. *J. Otorhin. Soc. Jap.*, 51, 163, 1948.
- 6) Takahara, S. : Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (Acatlasemia). *Lancet*, 2, 1101-1104, 1952.
- 7) Takahara, S. and Ogata, M. : Metabolism in Japanese acatlasemia with special reference to superoxide dismutase and glutathione peroxidase. In : *Biochemical and medical aspects of active oxygen*. (eds Hayaishi O. and Asada K.), p.275-292, Univ. of Tokyo Press, 1977.
- 8) Takahara, S. and Ogata, M. : Erythrocyte metabolism against oxidation in Japanese acatlasemia. *Monogr. Hum. Genet.*, 10, 205-211, 1978 (Karger, Basal).
- 9) Aebi, H., Heiniger, J. P., Butler, R. and Hassig A. : Two cases of acatlasemia in Switzerland. *Experientia*, 17, 466, 1961.
- 10) Delgado, A. W. and Calderon, R. : Acatlasemia in two peruvian siblings. *J. Oral Pathol.*, 8, 358-368, 1979.
- 11) Ogata, M., Sadatomo, M. and Takahara, S. : On minimal catalatic activity in Japanese acatlasemic blood. *Proc. Jap. Acad.*, 42, 828-832, 1966.
- 12) Ogata, M. and Satoh, Y. : Isoelectric focusing of catalase from acatlasemic mouse and, human blood and human skin fibroblasts. *Electrophoresis* 9, 128-131, 1988.
- 13) Ogata, M., Suzuki, K. and Satoh, Y. : Characterization of human residual catalase of an acatlasemic patient by isoelectric focusing and sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrophoretic blotting and immunodetection. *Electrophoresis*, 10, 194-198, 1989.
- 14) Wen, J. -K., Osumi, T., Hashimoto, T. and Ogata, M. : Diminished synthesis of catalase due to the decrease in

- catalase mRNA in Japanese type acatalasemia. *Physiol. Chem. and Physics and Med. NMR*, 20, 171-176, 1988.
- 15) Crawford, D. R., Mirault M. -E., Moret, R., Zbinden, I. and Cerutti, P. A. : Molecular defect in human acatalasia fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153, 59-66, 1988.
 - 16) Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B. and Gravel, R. A. : Isolation and characterization of human catalase gene. *Nucl. Acids Res.*, 14, 5321-5335, 1986.
 - 17) Wen, J. -K., Osumi, T., Hashimoto, T. and Ogata, M. : Molecular analysis of human acatalasemia. Identification of a splicing mutation. *J. Mol. Biol.*, 211, 383-393, 1990.
 - 18) Feinstein, R. N., Seaholm, J. E., Howard, J. B. and Russell, W. L. : Acatalasemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 52, 661-662, 1964.
 - 19) Feinstein, R. N., Braun, J. T. and Howard, J. B. : Nature of the heterozygote blood catalase in a hypocatalasemic mouse mutants. *Biochem. Genetics*, 1, 277-285, 1968.
 - 20) Feinstein, R. N., Howard, J. B. and Savol R. : Heat and urea stability of blood catalase of catalase mutant mouse strains. *Experientia*, 27, 1152-1153, 1971.
 - 21) Shapira, E., Ben-Yoseph, T. and Aebi, H. : Nature of residual erythrocyte catalase activity in Swiss-type acatalasemia. *Enzyme*, 17, 307-318, 1974.
 - 22) Ogata, M., Inoue, T., Tomokuni, K. and Takahara S. : Catalase activity of immature and mature red cells from acatalasemic mutant. *Acta Haemat.*, 44, 11-20, 1970.
 - 23) Ogata, M., Mizugaki, J. and Takahara, S. : Recovery of catalase activity after inhibition with aminotriazole in acatalasemia mice. *Tohoku J. Exp. Med.*, 116, 39-43, 1975.
 - 24) 井殿雅子: フェニルヒドラジンを投与したアカタラセミアマウスの血中カタラーゼ活性, 岡山医誌, 102, 789-798, (1990).
 - 25) 緒方正名, 金子順子, 高原滋夫: アカタラセミアマウスの残余カタラーゼ, 日本人類遺伝学会雑誌, 18, 131, (1972).
 - 26) Feinstein, R. N., Suter, H. and Jaroslow, B. N. : Blood catalase polymorphism : Some immunological aspects. *Science*, 159, 638-640, 1968.
 - 27) Srivastava S. K. and Ansari N. H. : The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 633, 317-322, 1980.
 - 28) 石井邦彦: アカタラセミアマウスに一酸化窒素, 二酸化窒素暴露時のメトヘモグロビン生成, 岡山医誌, 101, 473-486, 1989.
 - 29) Ogata, M., Sugata, Y. and Ikeda, M. : In vitro mercury uptake by human acatalasemic erythrocytes. *Arch. Environ. Health.*, 34, 218-221, 1979.
 - 30) Ogata, M. and Ikeda, M. : Mercury uptake by acatalasemia mice and their erythrocytes, lung and liver homogenate. *Int. Arch. Occup. Health*, 41, 87-93, 1978.
 - 31) Hess, R., Staubli, W. and Riss, W. : Nature of hepatomegalic effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature*, 208, 856-858, 1965.
 - 32) Koizumi, A., Weindruch, R. and Walford, R. L. : Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutr.*, 117, 361-367, 1987.
 - 33) Olowookere, J. O. and Adebaw, O. O. : Blood catalase activity as diagnostic and prognostic indices of protein-energy-malnutrition (PEM) syndromes. *Abstracts of the 14th Internatl. Cong. Nutr.* p346, 1989.

平成2年9月21日受付

平成2年10月18日受理