

マウス, アカタラセミア網状赤血球カタラーゼの活性低下機構

鈴木和彦・井殿雅子*・藤井保人**・緒方正名***

The change in catalase activity during maturation of reticulocyte to erythrocyte is greater in acatalasemic mice than in normal mice. The activity of catalase per g hemoglobin of reticulocyte was 12% of that of erythrocyte in acatalasemic mice, while 66% in normal mice. Effects of a protease inhibitor, Gabexate mesilate (GM) ([ethyl-4-(6-guanidino hexanoyloxy) benzoate] methane sulfonate) on the activities of catalase in reticulocytes from acatalasemic mice were examined. Preincubation without GM at 37°C for 40, 80, 160 min showed the rapid decreases in activities of residual acatalasemic catalases in reticulocytes. But preincubation with GM at 37°C delayed these rapid decreases. Further preincubation with GM at 20°C for 80 min, recovered almost completely and significantly the activity of catalase in reticulocytes from acatalasemic mice. But in the absence of GM, the second preincubation at 20°C for 80 min, showed only small recovery. These data suggest that intracellular protease or some factors affected by GM, might be responsible for bringing about the low stability of catalase in the acatalasemic mice.

緒 言

カタラーゼは分子量約240,000で4つのferritoporphyrinより成り立っている。そのサブユニットは分子量約60,000で活性基近傍にはNADPHが強固に結合している(1,2)。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。肝細胞では主にペルオキシゾームに酸化酵素と共存している。赤血球では特に, 種々の酸化剤や放射線より生じたラジカルなどによるヘモグロビンの酸化を防護しなければならない。赤血球中のカタラーゼはこれらの防御作用を示す一連の酵素系の一つであり, その作用機序から生理的に重要な作用をもっていると考えられる(3,4,5)。

一方, 無カタラーゼ血症(アカタラセミア)は1947年, 高原(岡山大学)により世界で最初に発見された血液中にカタラーゼを欠除する先天性遺伝疾患である(6)。緒方らは日本人のアカタラセミアの血液残余カタラーゼは正常人のカタラーゼとたん白質の性質が同じであることを明らかにし, Wenらは日本人のアカタラセミア皮膚培養細胞中のカタラーゼmRNAは正常人に比べほとんど存在しないことを明らかにした(7)。最近, 橋本・緒方らは遺伝子レベルでの無カタラーゼ血症の成因を明かにし, 日本人の無カタラーゼ血症遺伝子と正常遺伝子の間には7箇所の塩基置換のあることを見いだした(8)。

これらの変異のうち, 第4イントロンの5番目の塩基であるグアニンがアデニンに置換され, スプライシングの効率が低下することがその成因であることを確かめた(9)。

マウスのアカタラセミアは1964年, Feinsteinにより放射線照射を受けたマウスより選別, 純系化が行われた(10)。アカタラセミアマウス(変異マウス)の血中カタラーゼ活性は, 正常の1~2%, と低い。変異マウスの網状赤血球中のカタラーゼ活性は, 赤血球の成熟にともなって正常マウスのそれより速やかに減少する(11)。しかも温度, 尿素, 水素イオン濃度などの変化に不安定で(12,13), 等電点は正常マウスのそれに比べアルカリ側にある(14)。従って, このマウスの変異は, 残余カタラーゼが安定性の悪い, スイス人型の無カタラーゼ血症と類似している。アカタラセミアマウスは遺伝毒性学モデルとしても研究に供されている。ShafferらはアカタラセミアマウスのカタラーゼmRNAのサイズと量は, 正常のそれと, 差異のないことを明らかにした。これらの結果はmRNAの転写機能が悪いためか, または合成されたカタラーゼたん白質が不安定で速やかに分解されるため活性の低下が生ずるものと予測した(15)。最近, 彼らは変異カタラーゼの遺伝子のエクソンの変異から, 11番目のアミノ酸が正常のグルタミンからヒスチジンに変異している事を推定している(16)。また緒方ら(17), JonesとMasters(18)は変異マウスのカタラー

*松下電子工業株式会社・健康管理部 **岡山大・医学部・公衆衛生学教室 ***川崎医療福祉大・公衆衛生学教室

ゼの半減期が正常マウスの約1/2であることを明らかにしている。従って本研究では残余カタラーゼの変異と網状赤血球の成熟に伴う活性減少の強いことと関連づけ、たん白質分解酵素の阻害剤が、変異マウスのカタラーゼ活性の低下を抑制するかどうか、種々のセリンプロテアーゼの阻害剤であるガベキサート、メシレート (GM) (19) を添加し、その影響を見た。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物

8~16週齢、体重30g前後の雄のアカタラセミアマウス (C3H/AnL Cs^sCs^s)、と雄、正常マウス (C3H/AnL Cs^sCs^s) の2種のマウスを用いた。

2. 試薬

使用した試薬はすべて特級品を用いた。ガベキサート、メシレート (Gabexate mesilate (GM) ([ethyl-4-(6-guanidino hexanoyloxy) benzoate] methane sulfonate)) は、小野製薬より提供された注射用の粉末を使用した。

3. 実験方法

1) 網状赤血球の調製法

網状赤血球は1% フェニルヒドラジン塩酸塩を体重1gあたり40 μg, 3日間皮下注射し、投与開始日より5日目に下大静脈よりヘパリン存在下で採血した。その後、蒸留水を加えて溶血させ、さらにこれを0℃, 3,000rpmで30分間遠心し、その上清部分を酵素液として使用した。

2) カタラーゼ活性の測定

Feinstein の過ホウ素酸法により、20℃で測定した(20)。リン酸緩衝液 (12.5mM, pH6.8) で、アカタラセミアマウスでは10倍、正常マウスでは125倍に調整した網状赤血球溶血液上清を使用した。GMはプレインキュベーション液と測定液に1mg/mlの濃度で添加した。

3) 網状赤血球および赤血球数の算定

血球数はブリリアントクレシルブルーによる超生体染色を行い、光学顕微鏡を用い15×100倍で検鏡算定を行った。今回の実験では網状赤血球が約60%であることを確認した。

4) ヘモグロビン濃度の測定

Van kampen-Zijlstra 液を用い、シアンメトヘモグロビン法でヘモグロビン濃度を決定した。

結 果

1. 網状赤血球と赤血球の活性低下割合

図1は正常およびアカタラセミアマウスの、網状赤血球および成熟赤血球のヘモグロビン1g当りの活性値を示した。成熟赤血球カタラーゼ活性の網状赤血球のそれ

に対する比は正常マウスでは約66%であったが変異マウスでは約12%であった。アカタラセミアマウスの網状赤血球のカタラーゼ活性値は正常マウスのその約55%であったが、アカタラセミアマウスの成熟赤血球のカタラーゼ活性は正常マウスのその約10%であった。

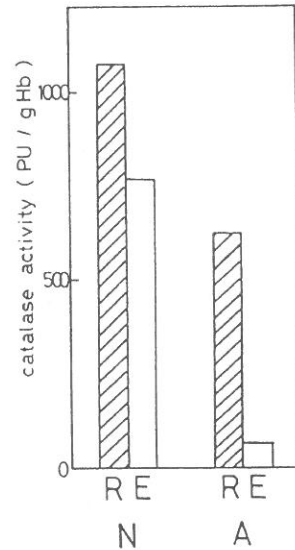


Figure 1: Catalase activities in reticulocytes (R) and erythrocytes (E) expressed as perborate units/g hemoglobin in the blood of acatalasemic (A) and Normal (N) mice.

2. 網状赤血球カタラーゼ活性の経時変化に対するGM添加の影響

アカタラセミアマウス、網状赤血球のカタラーゼをpH6.8, 37℃で0,40,80,160分間プレインキュベーションすると活性は最初の活性の10%に低下する (Fig. 2)。しかし0℃のプレインキュベーションではアカタラセミア網状赤血球のカタラーゼ活性の低下は起こらないので、この活性低下は酵素反応である可能性がある。そこでたん白質分解酵素阻害剤であるGMを添加しそのカタラーゼ活性の経時変化に対する影響をみた。その結果、変異マウスの網状赤血球中カタラーゼは、GM添加により最初の活性の、85%までしか活性低下が生じなかった。

3. 網状赤血球カタラーゼ活性の経時変化とその活性回復度との関連

アカタラセミアマウス、網状赤血球のカタラーゼをpH6.8, 37℃で0,40,80,160分間プレインキュベーションし、ふたたびそれぞれの時点より20℃で80分間、再孵置し、網状赤血球のカタラーゼ活性を測定した。図3に示すように、アカタラセミアのGMを添加した群では20℃

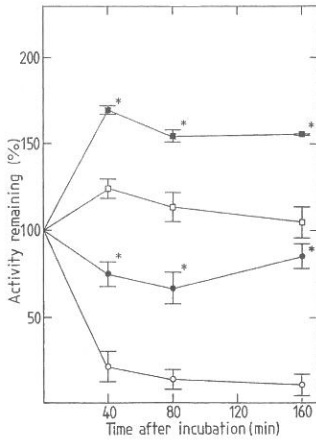


Figure 2: Changes with time in the activities of catalase in reticulocyte lysate from acatalasemic and normal mice. —○—:acatalasemic; —●—:acatalasemic (+GM); —□—:normal; —■—:normal(+GM). Vertical bars show means±SE of four animals. * ; Significantly different ($p<0.05$) from each control (without GM) value.

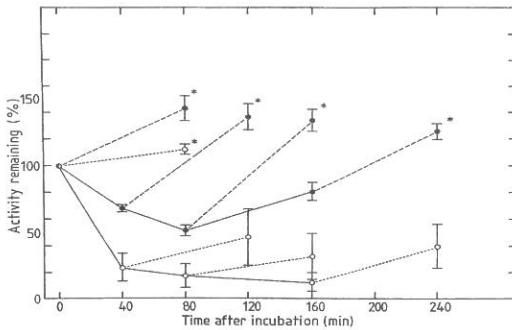


Figure 3: Recovery of the catalase activity in reticulocyte lysate from acatalasemic mice by the second preincubation at 20°C. —○—:acatalasemic at 37°C, —●—:acatalasemic (+GM) at 37°C, —○—:acatalasemic at 20°C, —●—:acatalasemic (+GM) at 20°C. Each point represents means±SE of four animals. * ; Significantly different ($p<0.05$) from each activity of preincubation at 37°C.

で再孵置するとそのカタラーゼ活性は100%以上回復するが、GMを添加しない群では20°Cで80分間、再孵置しても、ほとんどその活性は回復しなかった。図が繁雑になるので対照群は示していないが、対照群ではGM添加、非添加群とも20°Cで再孵置してもほとんど活性に変動は生じなかった。

考 察

Shafferらはアカタラセミアマウスの腎臓と溶血液のカタラーゼたん白質を免疫学的に調べ溶血液にはカタラーゼたん白質がほとんどないことを明らかにした(15)。これは組織のカタラーゼたん白質量または活性の低下が組織により違うことを意味するが、なぜ変異カタラーゼが低下するのかまたはなぜ残余カタラーゼたん白質が不安定であるかを明らかにした訳ではない。変異マウスカタラーゼmRNAはほぼ正常と同量存在するので、この安定性や活性の違いは、mRNAの転写機構の変異、またはたん白質分解酵素に対する脆弱性の差、またはカタラーゼの安定化たん白質の差などから生ずるものと考えられる。ラットの肝臓よりカタラーゼを精製する際たん白質分解酵素阻害剤(ロイペプチン)を添加しないとカタラーゼサブユニットの分子量が少し小さくなるという報告(21,22)があるので、同じセリンプロテアーゼ阻害剤であるGMの変異マウスカタラーゼ活性低下に対する影響をみた。変異マウスの、網状赤血球のカタラーゼはpH6.8, 37°Cで160分間、孵置すると時間とともに活性は減少した。もっとも活性減少の大きな組織は網状赤血球で、GMの添加はこれらの活性減少を遅らせた。この時の変異マウスカタラーゼの20°Cの再孵置による活性回復はGMがないとその回復度は低下しこの活性低下が可逆過程から不可逆過程に変わることを示している。Mullerらのはうさぎ網状赤血球のたん白質分解の速度が27°C以下では37°Cの33-10%であると報告している。またその至適pHは7.6-7.9の間であると報告している(23)。著者らも、カタラーゼ活性低下の至適pHが7.5付近にある結果を得、20°C以下では活性低下がほとんど起こらないことを明らかにした(24)。カタラーゼの活性低下はただ単にサブユニットへの分離により生ずる可能性もある。サブユニットの分離によるカタラーゼ活性の低下について、鮫島らはpH3-4では1/2サイズのサブユニットに分離することを報告している(25)。またpH9.9以上のアルカリでは30分でサブユニットに分離することを報告している(26,27)。アカタラセミア網状赤血球のカタラーゼは正常のそれよりもアルカリで不安定で、酸性側では逆に正常より安定であった。従ってpH6.8付近のカタラーゼ活性低下は一部サブユニットへの分離とたん白質分解のために生じたと考えられる。しかしGM添加群では、20°Cの再孵置により100%以上活性が回復することや、pH8.0では、部分精製した酵素の方が溶血液より安定であるという藤村の報告(27)があるので、GMを添加しない場合のpH6.8の活性低下はサブユニットへ

の分離以外の因子の関与があったものと考えられる。GMを添加した群での20℃の再孵置による活性上昇は、カタラーゼが活性化を受けたのか、実際に潜在的に存在する活性を測定したのかは、明かではない。しかしGMを添加しない群では20℃で再孵置しても元の活性に回復しないことにより、20℃の再孵置により活性化を受ける可能性はより少ないことが予測される。アカタラセミアマウスのカタラーゼの不安定性の理由はもちろん構造遺伝子の変化により生ずるであろう。しかし変異たん白質がなぜ活性を失うかに関する理由は明かではない。本研究はたん白質分解酵素または、その阻害剤により影響をうける因子にもその答の一部がある可能性を示した。

要 約

アカタラセミアマウス(変異マウス)の網状赤血球中のカタラーゼ活性は、赤血球の成熟にもなって速やかに減少する。この残余カタラーゼは、正常マウスのカタラーゼに比べ温度、尿素、水素イオン濃度などの変化に不安定で等電点もアルカリ側に在り、構造上の変異が推定される。本研究は、網状赤血球中のカタラーゼの低下が、たん白質分解酵素に対する脆弱性の差により生ずる可能性について検討した。種々のセリンプロテアーゼを阻害するたん白質分解酵素阻害剤、Gabexate mesilate

(GM), [ethyl-4-(6-guanidino hexanoyloxy) benzoate] methane sulfonateをブレインキューベーション溶液中に添加し、網状赤血球中のカタラーゼ活性低下に対する影響をみた。変異マウスの網状赤血球中カタラーゼは、pH6.8, 37℃で160分間、孵置すると時間とともに活性は減少した。この時、GMを添加すると、これらの活性減少速度を明らかに低下させた。しかしそのカタラーゼを20℃でさらに80分孵置すると活性は阻害剤添加群では100%以上回復し、非添加群では一部しか回復しなかった。従ってアカタラセミアマウス、網状赤血球中の構造に変異をもつカタラーゼでは、たん白質分解酵素の阻害剤があるとほとんどその分解は起こらず活性はほぼ維持されるものと思われる。これらの成績はアカタラセミアマウス網状赤血球カタラーゼではたん白質分解速度が正常カタラーゼより促進されており、その結果生体内においても成熟に伴うカタラーゼ活性減少度のより大きい事が推定される。

謝 辞

ガベキセートメシレートを供与下さいました小野製薬ならびにその労をおとりいただきました日赤病院、出石文夫博士に感謝の意を表します。

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) Kirkman, H. N., Galiano, S. and Gaetani, G. F. : The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.*, 262, 660-666, 1987.
- 3) Takahara, S. and Ogata, M. : Metabolism in Japanese acatalasemia with special reference to superoxide dismutase and glutathione peroxidase. In: *Biochemical and medical aspects of active oxygen* (eds Hayaishi, O. and Asada, K.), p275-292, Univ. of Tokyo Press, 1977.
- 4) Takahara, S. and Ogata, M. : Erythrocyte metabolism against oxidation in Japanese acatalasemia. *Monogr. Hum. Genet.*, 10, 205-211, 1978 (Karger, Basel).
- 5) Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M., and Kirkman, H. N. : Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in Human erythrocytes. *Blood*, 73, 334-339, 1989.
- 6) Takahara, S. and Miyamoto, H. : Clinical and experimental studies on the odontogenous progressive necrotic otitis due to lack of blood catalase. *J. Otorhin. Soc. Jap.*, 51, 163, 1948.
- 7) Ogata, M., Suzuki, K. and Satoh, Y. : Characterization of human residual catalase of an acatalasemic patient by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrophoretic blotting and immunodetection. *Electrophoresis*, 10, 191-198, 1989.
- 8) 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. Physics Med. NMR*, 20, 171-176, 1988.
- 9) Wen, J. K., Osumi, T., Hashimoto, T. and Ogata, M. : Molecular analysis of human acatalasemia. Identifi-

- cation of a splicing mutation. *J. Mol. Biol.*, 211, 383-393, 1990.
- 10) Feinstein, R. N., Seaholm, J. T., Howard, J. B. and Russell, W. L. : Acatalasemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52, 661-662, 1964.
 - 11) Iden, M. : Catalase activity in the blood of acatalasemic mice treated with phenylhydrazine. *Okayama Igakkai Zassi*, 102, 789-798, 1990 (in Japanese).
 - 12) Ogata, M. and Mizugaki, J. : Residual catalase in Japanese-type acatalasemia. *Cell Structure Function*, 3, 279-292, 1978.
 - 13) Aebi, H., Suter, H., and Feinstein, R. N. : Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem. Genetics*, 2, 245-251, 1968.
 - 14) Ogata, M. and Satoh, Y. : Isoelectric focusing of catalase from acatalasemic mouse and, human blood and human skin fibroblasts. *Electrophoresis*, 9, 128-131, 1988.
 - 15) Shaffer, J., Bryan, S. R. and Bewley, G. C. : Isolation of cDNA clone for murine catalase and analysis of acatalasemic mutant. *J. Biol. Chem.*, 262, 12908-12911, 1987.
 - 16) Shaffer, J. B., and Preston, K. E. : Molecular analysis of an acatalasemic mouse mutant. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 173, 1043-1050, 1990.
 - 17) Ogata, M., Mizugaki, J. and Takahara, S. : Recovery of catalase activity after inhibition with aminotriazole in acatalasemic mice. *Tohoku J. Exp. Med.*, 116, 39-43, 1975.
 - 18) Jones, G. L. and Masters, C. J. : On the turnover and proteolysis of catalase in tissues of the guinea pig and acatalasemic mice. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 463-471, 1976.
 - 19) Tamura, Y., Hirado, M., Okamura, K., Minato, Y., and Fujii, S. : Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C₁r, and C₁ esterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 484, 417-422, 1977.
 - 20) Feinstein, R. N. : Perborate as substrate in a new assay of catalases. *J. Biol. Chem.*, 180, 1197-1202, 1949.
 - 21) Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Osumi, 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.
 - 22) Crane, D., Holmes, R. and Masters, C. : Proteolytic modification of mouse liver catalase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 104, 1567-1572, 1982.
 - 23) Muller, M., Dubiel, W., Rathmann, J. and Rapoport, S. : Determination and characteristics of energy-dependent proteolysis in rabbit reticulocytes. *Eur. J. Biochem.*, 109, 405-410, 1980.
 - 24) Suzuki, K. and Ogata, M. : Effect of a protease inhibitor on the stability of catalase in liver and blood from acatalasemic and normal mice. *Acta Med. Okayama*, 45, 363-369, 1991.
 - 25) Samejima, T., Miyahara, T., Takeda, A., Hachimori, A. and Hirano, K. : On the acid denaturation of porcine erythrocyte catalase in relation to its subunit structure. *J. Biochem.*, 89, 1325-1332, 1981.
 - 26) Samejima, T. : Splitting of catalase molecule by alkali treatment. *J. Biochem.*, 46, 155-159, 1959.
 - 27) Inada, Y., Kurozumi, T. and Shibata, K. : Peroxidase activity of hemoproteins. I. Generation of activity by acid or alkali denaturation of methemoglobin and catalase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 30-36, 1961.
 - 28) Fujimura, J. : Acid and alkaline stability of catalase in the erythrocytes of anemic acatalasemic mice. *Okayama Igakkai Zassi*, 101, 233-246, 1990 (in Japanese).

平成3年10月15日受付

平成3年11月7日受理