



Title	凍結融解および凍結乾燥による catalase の変性
Author(s)	花房, 尚史; HANAFUSA, Naofumi
Citation	低温科学. 生物篇, 24, 57-66
Issue Date	1967-02-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17713">https://hdl.handle.net/2115/17713</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	24_p57-66.pdf



## 凍結融解および凍結乾燥による catalase の変性\*

花房尚史

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和41年11月受理)

### I. 緒言

凍結融解によって起る蛋白の変性の機構を明らかにするために、著者は先に筋蛋白の myosin B, myosin A や meromyosin を用いて変性の模様を調べ、これらの fibrous な蛋白は、凍結融解によって、凍結条件に依存して酵素活性の低下と共に蛋白の高次構造が部分的にこわれるということを報告した<sup>1-3)</sup>。この時、G-actin や H-meromyosin などについても調べた結果、globular な蛋白は凍結融解や凍結乾燥に対して、conformation の変化という点で比較的安定であることを示唆するような結果が得られた。

蛋白分子の形状と凍結融解に対する安定性の問題は、凍結による変性の機構を考える上で一つの興味ある問題なので、この点を更に明らかにするために、globular な蛋白の例としてウシ肝臓 catalase を用い、凍結融解による conformation の変化を二・三の物理化学的方法で調べた。catalase が凍結融解によって、その酵素活性を失うことは、小川<sup>4)</sup>、四釜及び山崎<sup>5,6)</sup>等により既に報告されているが、この際 conformational な変化が起るかどうかにについては知られていない。

又、catalase を凍結乾燥すると subunit に解離し、酵素活性を失うことが Tanford 等<sup>7)</sup>によって報告されているが、凍結乾燥の条件との関係は明らかではない。凍結乾燥は溶媒である水の脱水という意味では、凍結と共通する問題であると思われるので、凍結乾燥による変性もあわせて検討した。

### II. 材料および方法

#### 材 料

catalase は、北川と白川との方法<sup>8)</sup>によりウシ肝臓より抽出し、得られる粗結晶から三回再結晶をくり返し精製し、結晶の suspension として 0°C で保存した。使用前に 0.1N NaOH で pH 7.5 に調整して溶解し、12000 r.p.m. 10 分間の遠心で不溶性の部分を除き使用した。

#### 方 法

酵素活性は Beers と Sizer の方法<sup>9)</sup>により、基質である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の減少を波長 240 mμ で photometrical に測定し、その初速から比活性を求めた。反応は直接、分光光度計のセル中で

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第817号

行ない、反応系の組成は終濃度として catalase  $1 \times 10^{-8}$  M,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1 \times 10^{-4}$  M, 1/15 M phosphate buffer pH 7.0 で、 $20^\circ\text{C}$  で測定した。

粘度測定は、流速 50 秒の Ubbelohde 粘度計を用い、蛋白濃度 0.4~0.14% の範囲で温度  $20^\circ\text{C}$  で測定した結果から、還元粘度  $\eta_{sp}/c$  ( $c$  は溶媒 100 ml 中の蛋白の g 数) 及び固有粘度 ( $\lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$ ) を求めた。

差スペクトルは、島津 5 V-50A 型自記分光光度計又は日立・Perkin-Elmer 139 型分光光度計により、1 cm の石英セルを用い、蛋白濃度 0.14% とし、native な試料を対照として測定した。但し、酵素活性の測定にもこれらの分光光度計を使用した。

沈降測定は、日立 UCA-1 分析用超遠心機を用い、沈降図および沈降係数を求めた。

蛋白濃度は、278  $m\mu$  と 405  $m\mu$  の吸収の値から、 $\epsilon \times 10^{-5} = 4.0$ ,  $\epsilon \times 10^{-5} = 3.1$  を用い決定した。

試料の凍結融解はつぎのようにしておこなった。即ち、catalase を濃度 0.5%, 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) に調整し、5 ml を中試験管 (径 16 mm) にとり、liq.  $\text{N}_2$  で冷却した propyl-alcohol の bath に浸した。緩まんに一定の速度で凍結させるために、 $-20$ ,  $-40$ ,  $-60$ ,  $-80$ ,  $-196^\circ\text{C}$  の温度の bath をつくり、順次各 15 分づつ試料を浸したのち低い温度へ移し、必要な温度で凍結した。融解は試験管を  $30^\circ\text{C}$  の bath に入れ振りながら行なった。

凍結乾燥は、径 30 mm, 深さ 10 mm のガラス容器に試料をとり、所要の温度の bath に浸して凍結し、直ちに油回転ポンプの凍結乾燥機にとりつけ、6 時間乾燥した。完全に脱水乾燥するために、その試料を更に油拡散ポンプで 6 時間乾燥した。乾燥した試料は  $0^\circ\text{C}$  で保存し、測定前に 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) で必要な濃度に溶解した。

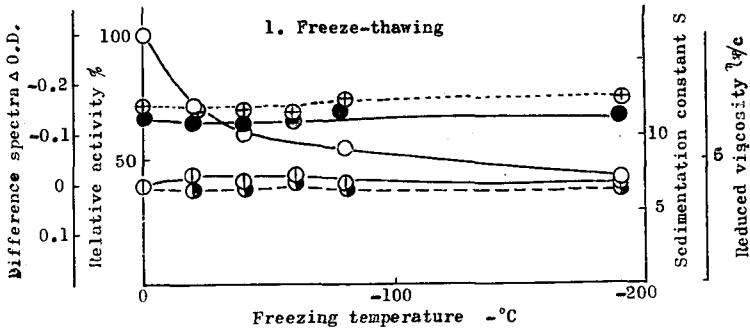
### III. 結 果

#### 1. 凍結融解による変性

濃度 0.5% の catalase 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) 溶液をいろいろな温度で凍結後急速に融解した試料について、その一部をとり  $1 \times 10^{-8}$  M に稀釈し、酵素活性を測定した。第 1 図中に他の結果と共にそれを示す。図にみられるように、凍結温度の低下に対応して酵素活性が低下している。但し  $-196^\circ\text{C}$  でも対照の 40% ほどの活性が残っている。

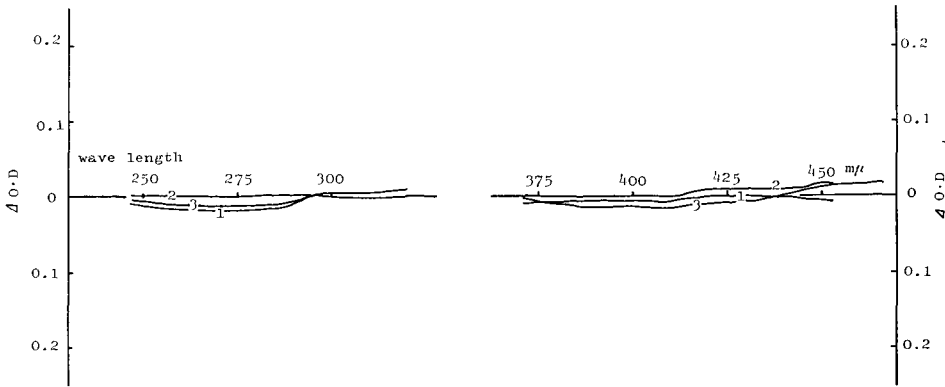
同じ試料について、0.43~0.14% の濃度範囲で、1/5 M phosphate buffer (pH 7.0) を溶媒として粘度を測定した。同じく第 1 図中にその結果が示されている。凍結温度の低下と共に僅かに粘度が増加しているように見えるが、これは myosin 等の凍結による変性と比べ無視し得るほど小さく、catalase の粘度は凍結融解によってはほとんど変化しないと考えてよいと思われる。

又、同じ試料について、未処理の native な試料を対照として、直接差スペクトルを測定した。catalase が 278  $m\mu$ , 405  $m\mu$  (Soret band), 620  $m\mu$  に吸収極大のピークを持つことはよく知られている。前者は主に tyrosine 残基にもとづく蛋白部分の吸収であり、この値の変動は蛋白部分の conformation の変化を反映している。一般に globular な蛋白においては、紫外



第1図 凍結融解した catalase の酵素活性および物理化学的性質の変化

○, 酵素活性; ⊕, 還元粘度  $\eta_{sp}/c$ ; ●, 沈降常数  $S_{20,w}$ ;  
 ⊕,  $\Delta O \cdot D_{405} m\mu$ ; ⊖,  $\Delta O \cdot D_{278} m\mu$ .



第2図 凍結融解した catalase の差スペクトル

凍結温度: (1),  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (2),  $-80^{\circ}\text{C}$ ; (3),  $-196^{\circ}\text{C}$   
 蛋白濃度, 0.14%  
 溶媒, 1/15 M phosphate buffer pH 7.0  
 対照, 未凍結の試料

部の差スペクトルの shift は蛋白分子の conformation の変化を比較的忠実に反映していると考えられる。又後の二つの吸収は, haem group に由来する吸収であり, この変動は活性中心である haem group の状態の変動を示していると考えられる。第2図はその結果で, 又,  $\Delta O \cdot D_{278}$  と  $\Delta O \cdot D_{405}$  の値と凍結温度との関係は第1図中に示されている。この結果から判るように,  $-20 \sim -196^{\circ}\text{C}$  の間で, 紫外部と Soret band の双方にほとんど変化はなく, 吸収の増減や shift は起らない。但し, 双方の波長帯で常に非常にブロードでかすかな山がみられるのみである。

同じく, 凍結融解した試料について, 超遠心法による沈降図形を求め, 沈降定数を測定した。未処理の試料は, 第5図(1)に示すように, 鋭い単一峰を示し,  $S_{20,w}$  は 11.5 で, これまで報告されている値 11.2 とよい一致を示している。第5図(2)は凍結融解した試料の一例で, 対

照より僅かにブロードな単一峰を示している。沈降係数は、僅かの例外を除き、凍結温度の如何に拘らず、11.1~11.5の単一峰で対照とほとんど同じ値を示している。

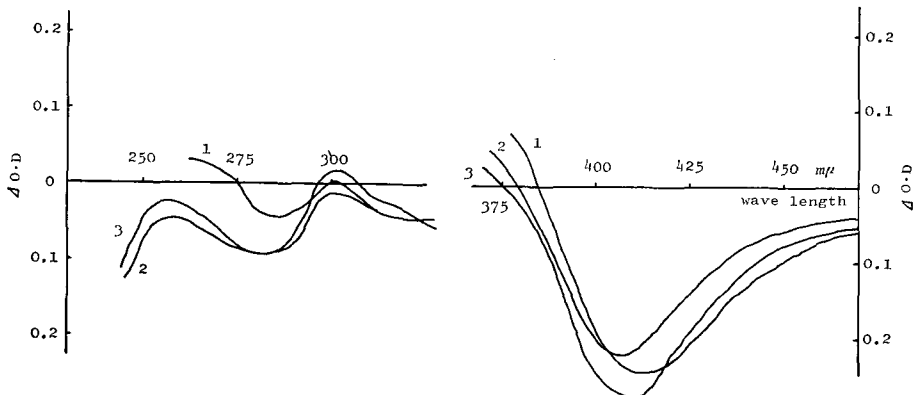
これらの結果は全て第1図に、凍結温度との関係で示されている。この結果から判るように、catalaseは凍結融解によって酵素活性が凍結温度に対応して低下するのみで、粘度、 $40 \cdot D_{278}$ 、 $40 \cdot D_{405}$ の値、沈降定数等の物理化学的性質はほとんど変化しない。このことから、catalase分子のconformationはほとんど変化しないこと、解離会合も起っていないということが判った。

## 2. 凍結乾燥による変性

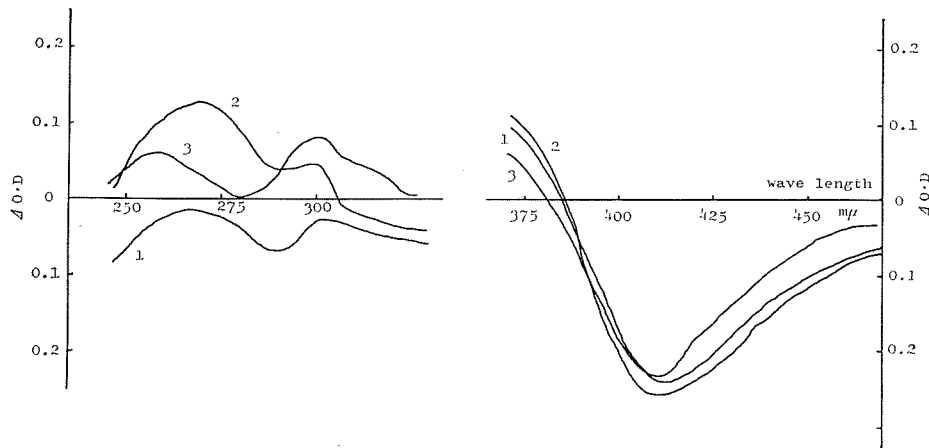
蛋白濃度2.1%、1/15 M phosphate buffer (pH 7.0)の試料を、前に述べた方法で各種の温度で凍結後乾燥した。回転ポンプのみで6時間乾燥した試料(DI)と、それを更に拡散ポンプで6時間乾燥した試料(DII)を、1/15 M phosphate buffer (pH 7.0)で溶解し、蛋白濃度0.5%に調整して以下の測定に用いた。凍結乾燥したcatalaseは、沈澱や濁りを生じることなく、完全に再溶解される。

DIとDIIについて、前と同じ方法で酵素活性を測定した結果は、第6図中に示されている。図に見られるように、DIで既に大部分の活性は失なわれ、僅かに6~3%の残存活性を示しているが、DIIではこれが更に3~2%に低下している。即ち、拡散ポンプでの乾燥(ほぼ完全な脱水)によって、酵素活性はほとんど完全に失なわれる。但し、この数%の残存活性は、凍結融解の時にみられるような凍結温度への依存性を示している。

DIとDIIについて、前と同じく、未処理のnativeな試料を対照として、差スペクトルを測定した。第3図(DI)、第4図(DII)の結果からわかるように、凍結融解の場合と異り、405 m $\mu$ のSoret bandで、負側に大きなピークがみられる。ピークの位置は405 m $\mu$ で、Soret bandのshiftではなく、吸収の減少(hypochromism)であって、haem group附近の構造に大きな変



第3図 凍結乾燥した catalase (DI) の差スペクトル  
 凍結温度: (1),  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (2),  $-80^{\circ}\text{C}$ ; (3),  $-196^{\circ}\text{C}$   
 蛋白濃度, 0.14%  
 溶 媒, 1/15 M phosphate buffer pH 7.0  
 対 照, 未凍結の試料



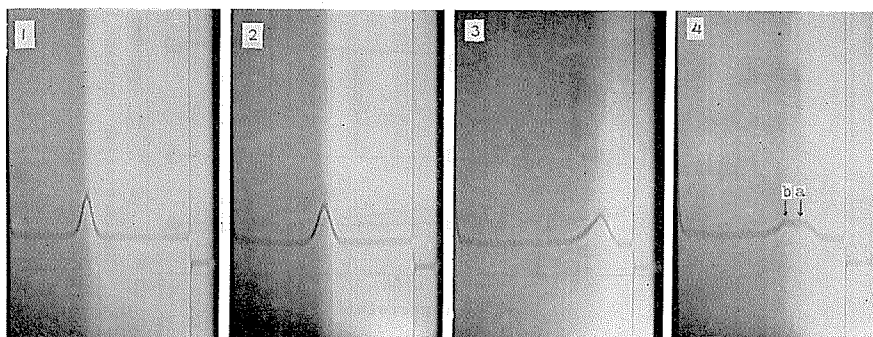
第4図 凍結乾燥した catalase (DII) の差スペクトル

凍結温度: (1),  $-20^{\circ}\text{C}$ ; (2),  $-80^{\circ}\text{C}$ ; (3),  $-196^{\circ}\text{C}$

蛋白濃度, 0.14%

溶 媒, 1/15 M phosphate buffer pH 7.0

対 照, 未凍結の試料



第5図 凍結融解および凍結乾燥した catalase の超遠心図

(1), 対照, 57 分後,  $S_{20,w} = 11.5$

(2),  $-60^{\circ}\text{C}$  凍結融解, 40 分後,  $S_{20,w} = 12.4$

(3), 凍結乾燥,  $-60^{\circ}\text{C}$  凍結, 50 分後,  $S_{20,w} = 3.8$

(4), 凍結乾燥,  $-60^{\circ}\text{C}$  凍結, 50 分後, (a)  $S_{20,w} = 4.3$ ,

(b)  $S_{20,w} = 6.2$

蛋白濃度, 0.42%; 溶媒: 1/15 M phosphate buffer pH 7.0

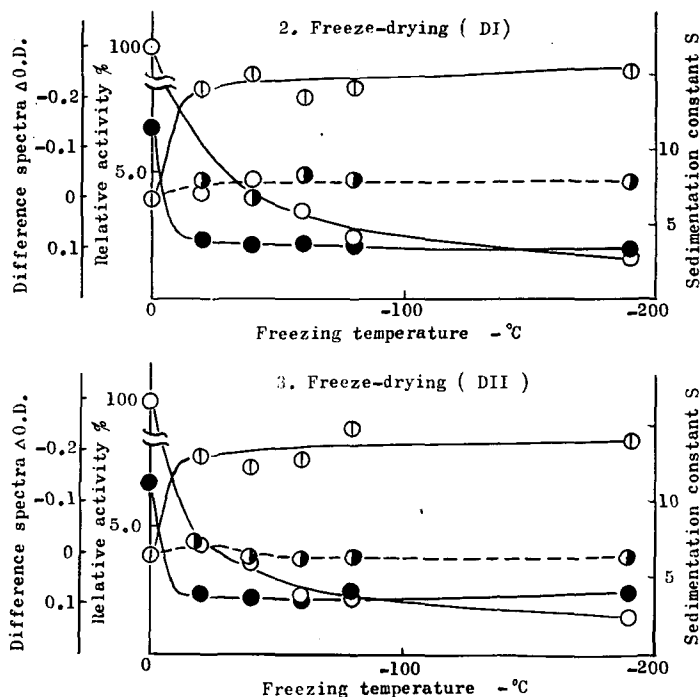
r.p.m., 55430;  $20^{\circ}\text{C}$

化があることが推察される。この、 $\Delta O \cdot D_{405m\mu}$  の値は、第 3, 4 図や第 6 図から判るように、凍結温度や DI, DII の乾燥程度の違いに関係なく、ほとんど一定である。

紫外部、即ち蛋白部分に関しては、blue shift のみられる場合と、red shift のみられる場合があり、凍結乾燥の条件との一定の相関はみられない。従って、蛋白部分の conformation が変化しているか否かは、現在までの結果では明らかではない。

DI 及び DII のそれぞれについて、沈降図形を求め、沈降定数を計算した。第 5 図(3) は、DI の 1 例で、対照と比較してブロードは単一峰を示し、 $S_{20,w}$  は凍結乾燥の条件の如何にかかわらず、3.6~4.1 で大部分が 3.8 の値を示している。これは明らかに凍結乾燥した catalase が subunit に解離した事を示し、後に考察するように、subunit 1 個又は 2 個の、monomer 又は dimer であることを示している。又、 $S_{20,w}$  が 3.8 という値は、酸又はアルカリや尿素などによる解離で得られる subunit の値とよく近似している。唯、二峰性の沈降図が得られ、4.2 S と 6.2 S (第 5 図(4)) や、11.0 S と 6.4 S の成分への解離がみられた例があったが、再現性がなく、凍結乾燥の条件との関係は明らかではない。

これらの結果は第 6 図にまとめて示される。この結果から、catalase は凍結乾燥により、一般に 3.8 S の単一の subunit に解離し、同時にその結果として、Soret band の吸収の著しい減少と、酵素活性のほとんど完全な失活がみられる。これ等の変化は、ここで用いた乾燥条件以前の段階で起るものと思われ、DI と DI の間に差スペクトルや沈降常数の差はみられない。尚、凍結乾燥した試料の粘度については、解離が起っている以上、対照との比較は無意味であるので調べなかった。



第 6 図 凍結乾燥した catalase の酵素活性および物理化学的性質の変化

- , 酵素活性; ●, 沈降常数  $S_{20,w}$   
 ⊙,  $\Delta O \cdot D_{405m\mu}$ ; ⊗,  $\Delta O \cdot D_{278m\mu}$

#### IV. 考 察

凍結融解による catalase の酵素活性の失活について、小川<sup>4)</sup>の報告では凍結温度の低下と共に失活が増加するが、 $-196^{\circ}\text{C}$  では失活が少ないこと、又、四釜等<sup>5,6)</sup>の結果では凍結温度 $-30\sim-80^{\circ}\text{C}$ の範囲で数10%失活するがそれ以外の温度では100%活性を保持していることなどが示されている。著者の実験では、凍結の速度を一定にした時、凍結温度の低下につれて失活が増大した。これは myosin A, B<sup>1-3</sup> などについて得られた結果と同様であり、小川、四釜等の結果は速度を一定にしないためと考えれば容易に説明され、失活の機構に対して凍結の温度と速度の二つの要因が働くという著者の myosin で得られた結果とよく一致する。

このように、酵素活性が凍結温度の低下と共に減少するのに対して、他のいくつかの物理化学的性質は全く変わらないことから、catalase 分子の conformation は凍結融解によっては変化しないこと、解離や会合も起らないことが明らかになった。これは典型的な fibrous な蛋白である myosin や meromyosin の二次構造、三次構造が酵素活性の低下と平行して、凍結の温度と速度に depend して変化するのに対照的である。この事実は、前に報告した G-actin の粘度が凍結融解によって変わらないこと、H-meromyosin の conformation の変化が L-meromyosin に比べ小さいことや、更に一般的に globular な蛋白について凍結融解が試料の調製、保存に経験的に広く用いられていることなどとあわせて考えて、catalase のような globular な蛋白は少なくとも分子の conformation に関する限り、fibrous な蛋白より凍結融解に対して安定であることを示していると思われる。

fibrous な蛋白の conformation が凍結融解によって変化する機構については、前に、蛋白分子の水和水の状態が蛋白の conformation の維持に重要であること、溶媒水の凍結によって水和水の状態が攪乱され、協同現象によって二次的に helix を構成している hydrogen bond や三次構造の形成に寄与している hydrophobic bond が影響されて conformation が変化するという推論を提出した。catalase のように globular な蛋白は、非常に rigid で分子内部には溶媒の水は浸透しないと考えられて居り、溶媒の水に接する領域の面積は比較的小さいと考えられるので、溶媒の水が凍結しても水和水の状態の攪乱と、それによる影響は小さいと考えられる。又 globular な蛋白の conformation の安定性には、hydrophobic bond の寄与が大きく、溶液中では folding した (即ち native な) 状態が熱力学的に安定であると考えられている。従って凍結中に hydrophobic bond がこわれても、融解後は native な状態に復元する可能性が考えられるが、これに対して fibrous な蛋白は hydrogen bond が大きな役割を果して居り、一度その結合が切れると spontaneous な復元はほとんど不可能と思われる。これらの事から、globular な蛋白が fibrous な蛋白より構造的に安定であることは説明出来る。

凍結融解によって conformational な変化はないに拘らず、酵素活性が低下する事実については、catalase では全体の構造は酵素活性の発現に直接寄与せず、活性中心近傍の局所的な構造のみが重要であることを示して居り、凍結融解の場合先に述べたような機作で活性中心附近の構造がわずかに攪乱されるだけで活性が低下すると思われる。このような例は、ribonuclease

の試薬による変性などいくつかの例が知られている<sup>10)</sup>。著者の実験で、第2図の凍結融解した catalase の差スペクトルで、haem group に由来する Soret band で常に極めて僅かな変動がみられるのはあるいは活性中心附近の微小な変化の反映かも知れないが確かではない。

凍結乾燥による catalase の変性について、Tanford 等<sup>11)</sup>は、7.6S と 4.2S の二成分への解離と、酵素活性の失活、278 m $\mu$  と 405 m $\mu$  の吸収の減少がみられることを報告している。著者の場合、酵素活性は DI (回転ポンプ 6 時間) で大部分が失なわれ、DII (拡散ポンプ 6 時間) で残った活性もほとんど失なわれる。尚、残った活性については、凍結時の凍結温度依存性が僅かにみられる。subunit への解離は、Tanford 等と異り、数例を除き 3.8S 単一成分へ解離した。これは Tanford 等のように catalase が 6 個の subunit から成るとすると 1 個の monomer、紫田等のように 12 個とすると 2 個の dimer の単一成分に相当し、他の試薬による解離で得られる subunit の S と近似した値を示している。この解離が、ここで試みた範囲での凍結や乾燥の条件に依存せず全て 3.8S の単一成分への解離であることは、乾燥による解離がより初期の段階で初まるか、又は all or none の機構で起ることを示している。差スペクトルでみられる Soret band の吸収の著しい減少は、subunit への解離によって活性中心である haem group と溶媒との相互作用に著しい変動があったことを示し、酵素活性の失活はその結果であることを示している。又、 $\Delta O \cdot D_{405}$  の値が凍結や乾燥の条件に依存せず一定値を示すことは、超遠心の結果とよく対応している。解離した subunit の蛋白部分の conformation が native な状態とどのように異なるかは、今回の差スペクトルの  $\Delta O \cdot D_{278m\mu}$  の値からのみでは結論し難いが、恐らく unfold した状態と考えられる。

凍結乾燥による解離の機構については、subunit 間の結合の性質が明らかにされていないのでよく判らない。一応、尿素や酸・アルカリなどで容易に解離することから、ionic bond, hydrogen bond, hydrophobic bond 等の協同作用と考えられている<sup>11)</sup>。hydrophobic bond は溶媒の水との関係で始めて形成されるので、乾燥による脱水で解離されることは容易に想像され得る。

catalase は Fe を有する haem 蛋白であるが、Cu を有する haemocyanin も、凍結融解では変性しないが凍結乾燥で容易に変性することが知られている<sup>12)</sup>。他方、一般の globular な蛋白は、尿素やその他の試薬で容易に変性しても、凍結乾燥に対しては安定であることは経験的に知られ、試料の精製等に凍結乾燥はひろく用いられている。これらの事実から、catalase のように重金属を持ち、subunit から構成されている蛋白は、凍結乾燥のように drastic な脱水に対しては非常に不安定な構造であって、その subunit 間の結合に水が何等かの役割を果しているのではないかということが想像される。

## 要 約

先に報告した、fibrous な蛋白である myosin の凍結融解による変性と比較し凍結による変性の機構をより明らかにするために、globular な蛋白の一つとしてウツ肝臓 catalase を用い、凍結融解および凍結乾燥による酵素活性および二・三の物理化学的性質の変化を調べた。

その結果、凍結融解によって catalase の酵素活性は凍結温度の低下と共に減少するが、他の物理化学的性質に変化はなく、蛋白分子の conformation の変化も、解離会合も起らないことが判った。

又、凍結乾燥により 3.8S subunit への解離と、それに基づく Soret band の吸収の減少、酵素活性のほとんど完全な失活がみられ、これらは凍結温度および二つの乾燥段階の差に拘らず一定した値を示した。

以上の結果から、globular な蛋白である catalase は、myosin のような fibrous な蛋白と比較し、凍結融解に対して構造的には非常に安定であることが判った。又、凍結乾燥で 3.7S の単一成分に解離することから、subunit 間の結合に水が何等かの役割を果しているのではないかと考えられる。

## 文 献

- 1) 花房尚史 1962 凍結融解による myosin B の変性. 低温科学, 生物篇 **20**, 81-94.
- 2) 花房尚史 1964 凍結融解による myosin A の変性. 低温科学, 生物篇 **22**, 119-131.
- 3) Hanafusa, N. 1966 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing. *In Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. ASAHINA ed), Inst. Low Temp. Sci., Sapporo, 印刷中.
- 4) 小川忠人 1953 酵母カタラーゼに及ぼす低温の影響. 低温科学, **10**, 175-199.
- 5) Shikama, K. and Yamazaki, I. 1961 Denaturation of catalase by freezing and thawing. *Nature*, **190**, 83-84.
- 6) Shikama, K. 1963 Denaturation of catalase and myosin by freezing and thawing. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, **B**, **29**, 91-106.
- 7) Tanford, C. and Lovrien, R. 1962 Dissociation of catalase into subunit. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1892-1896.
- 8) 白川正治 1956 酵素研究法 II. 朝倉書店, 東京, 323-334.
- 9) Beers, R. and Sizer, I. M. 1952 A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
- 10) 太田隆久 1965 生体高分子. 朝倉書店, 東京, 298-321.
- 11) Tanford, C. 1964 Cohesive forces and disruptive reagents. *In Subunit Structure of Protein*. Brookhaven Natl. Lab., Upton, N. Y. 154-173.
- 12) Litt, M. 1958 Preservation of haemocyanin. *Nature*, **181**, 1075.

## Summary

Some physico-chemical properties and enzymatic activities of frozen and thawed or freeze-dried catalase were examined in an attempt to elucidate the mechanism of protein denaturation by freeze-thawing and freeze-drying.

On freeze-thawing, catalase activity was decreased depending on the freezing temperature, but no change appeared in the values of viscosity,  $40 \cdot D_{.278m\mu}$ ,  $40 \cdot O_{.405m\mu}$  and sedimentation constant. Neither dissociation nor association of the catalase molecule was found. These results suggest that freeze-thawing causes no conformational change in the catalase molecule, except for a decrease of enzymatic activity.

Freeze-drying gave rise to the dissociation of the catalase molecule into 3.8S subunits and the evident decrease of absorbancy in the Soret band. Enzymatic activity was also remarkably affected, but these changes were independent on freeze-drying conditions.

It might be said, therefore, that the molecular conformation is more stable against freeze-thawing in globular protein than in fibrous protein, such as myosin. The mechanism of the denaturation of proteins by freeze-thawing was discussed in relation to the behavior of hydration water during the freezing process.