HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解および凍結乾燥したカタラーゼの高次構造
Author(s)	花房, 尚史
Citation	低温科學. 生物篇, 29, 1-7
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17777
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p1-7.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Naofumi HANAFUSA 1971 The molecular conformation of freeze-thawed and freeze-dried catalase. *Low Temp. Sci. Ser.* ***B, 29.*** (with English Summary p. 6)

凍結融解および凍結乾燥したカタラーゼの高次構造*

花房尚史
(低温科学研究所)

(昭和46年10月受理)

I. 緒　　言

前報[1,2]で，カタラーゼを凍結融解すると，酵素活性は凍結温度の低下に従い減少するが，分子の解離会合は起こらないこと，これに対して，凍結乾燥では酵素活性は極度に低下すると共に，サブユニットへの解離を起こすことを報告した。このとき，カタラーゼ分子の蛋白部分の高次構造の変化は，凍結融解では起こらないが，凍結乾燥で解離したサブユニットではいくらか破壊されているように考えられると報告した。この推論は，近紫外部およびソーレー帯における差スペクトル，粘度の測定と，電顕での観察結果[3]に基づくもので，直接らせん含量を測定したものではなかった。

凍結融解及び凍結乾燥の際に起こる蛋白の高次構造の変化に関して，より正確な情報を得ることは，次の二つの点において非常に有意義であろうと考えられる。即ち，一つは，凍結融解および凍結乾燥による蛋白変性の機構を理解するために，凍結・乾燥に対する蛋白の二次・三次構造の安定性の違いを明らかにするということである。他の一つは，一般に酵素活性，即ち酵素の機能はその構造と密接に関係している場合が多いが，カタラーゼの場合，凍結融解で約50%，凍結乾燥で約90%の活性の失活がみられる[1]ので，高次構造の変化の様子を明らかにすることによって，構造と機能の関係についてより正確な知見が得られるということである。

このような目的から今回，凍結融解および凍結乾燥したカタラーゼについて，遠紫外部に於ける旋光分散 (ORD) と円偏光二色性 (CD) を測定することによって二次構造の変化の様子を調べ，又，近紫外部およびソーレー帯でのCDスペクトルと吸収の差スペクトルを測定することによって三次構造の変化を調べて得た凍結融解および凍結乾燥したカタラーゼの高次構造について述べたい。

II. 材料および方法

材料：使用したカタラーゼは，市販のカタラーゼ2回結晶標品 (シグマ社) を更に2回再結晶をくり返し，0.1M NaOHでpH 7.0に調整して溶解した水溶液を遠心して不溶の不純物を除いたものである。

方法：凍結融解および凍結乾燥の方法についての詳細は前報[1]で述べたのと同様であるが，凍結の場合，履歴を等しくするため，−20°，−30°，−196°Cと段階的に移して必要な温度の凍結を行なった。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1159号

カタラーゼの濃度は，ソーレー帯の吸収から，$E^{\%}_{405}=13.5$[4] の値を用いて決定した。

超遠心分析は，日立 UCA-1 分析用超遠心機を用いて行なった。

ORD, CD および吸収の差スペクトルの測定には，CD 測定装置付 JASCO-ORD/UV-5 自記旋光分散計を使用した。セルは 1 および 10 mm 石英セルを用いた。CD および ORD の測定結果は，それぞれ分子楕円率 $[\theta]$ と還元平均残基旋光度 $[m']$ で表わした。但し，平均残基量としては 129[4] を用い，又，らせん含量は次の式[4] によって $[m']_{233}$ の値から求めた。

$$\text{らせん含量 (\%)}=\left\{[m']_{233}+2000\right\}\times 100/13000$$

差スペクトルは，未処理の試料を対照側に処理した試料を試料側において直接測定した。

III. 結　　果

凍結融解：各温度に凍結した 0.5% カタラーゼ水溶液を融解し，0.075 M 燐酸緩衝液でそれぞれに適当な濃度に稀釈したのち，遠紫外部の ORD および CD，近紫外部とソーレー帯の CD および差スペクトルを測定した。この試料は，前に報告した結果[1] と同様に，超遠心的には対照と全く同様に S=11 の値を示し，解離，会合は起こっていない。

未処理の試料は，遠紫外部では 233 mμ に ORD の極小点，222 mμ に CD の極小点を有し，その値は第 1 表に示したように，$[m']_{233}=-8600°$, $[\theta]=-10000$, らせん含量は約 50% で，Samejima と Kita[4] の結果とよい一致を示している。又，近紫外部およびソーレー帯の CD スペクトルは，第 2 図の対照にみるように，290 mμ に蛋白部分に由来する正のピークと，390 mμ にソーレー帯のヘム部分のコットン効果に起因する負の吸収ピークを示す。

凍結融解した試料についてみると，遠紫外部の ORD，CD スペクトルおよび近紫外部とソーレー帯の CD スペクトルは，どの温度で凍結したものでも対照と全く同じで，第 1 表に示すように $[m']_{233}$, $[\theta]_{222}$ の値もほとんど変わらない。又，近紫外部およびソーレー帯の差スペクトルについても，280 mμ 付近および 405 mμ 付近に極めて僅かな変動がみられるのみで，ほとんど変化は認められなかった。

これらの結果は，カタラーゼの二次および三次構造は，凍結融解によってはほとんど変化しないことを示している。

凍結乾燥：凍結融解の場合と同じ方法で 0.5% カタラーゼ水溶液を各温度に凍結後，直ちに乾

第 1 表　凍結融解したカタラーゼのヘリックス・パラメーター

凍結温度 (°C)	$[m']_{233}$	$[\theta]_{222}$	らせん含量 (%)
対照	−8600	−10000	51
− 20	−8600	−10000	51
− 80	−8500	− 9600	50
−196	−8600	−10000	51

溶媒，0.075 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0)
らせん含量は $[m']_{233}$ の値より求めた

第 2 表　凍結乾燥したカタラーゼのヘリックス・パラメーター

凍結温度 (°C)	$[m']_{233}$	$[\theta]_{222}$	らせん含量 (%)
対照	−8700	−10900	51
− 20	−7100	− 8900	39
− 80	−6900	− 8800	38
−196	−6700	− 8300	35

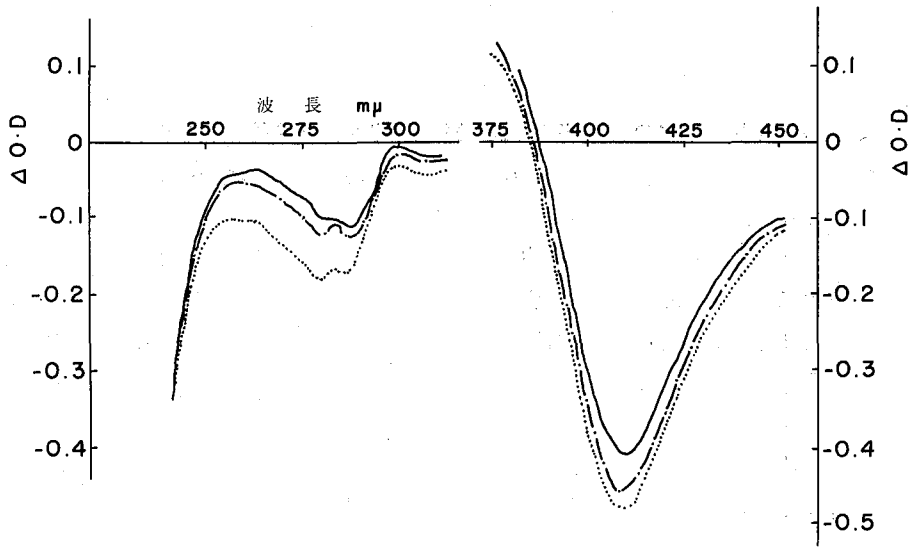
溶媒，0.075 M 燐酸緩衝液 (pH 7.0)
らせん含量は $[m']_{233}$ の値より求めた

燥したのち再び蛋白濃度が0.5%となるように0.075M燐酸緩衝液で溶解し，凍結融解の場合と同様な測定を行なった。

前報[1,2]で報告したのと同様に，この試料も凍結の温度と無関係に，S=4.1の単量体に解離しているが，この単量体のサブユニットの遠紫外部におけるヘリックス・パラメーター $[m']_{233}$ と $[\theta]_{222}$ の値は，第2表に示したように未処理の対照と比較すると明らかに減少し，しかも凍結温度の低下と共に僅かに減少の度合が増加している。−196°C凍結後乾燥の場合，らせん含量は未処理対照の50%から35%に減少し，らせん構造のうち30%ほどが破壊されていることを示している。

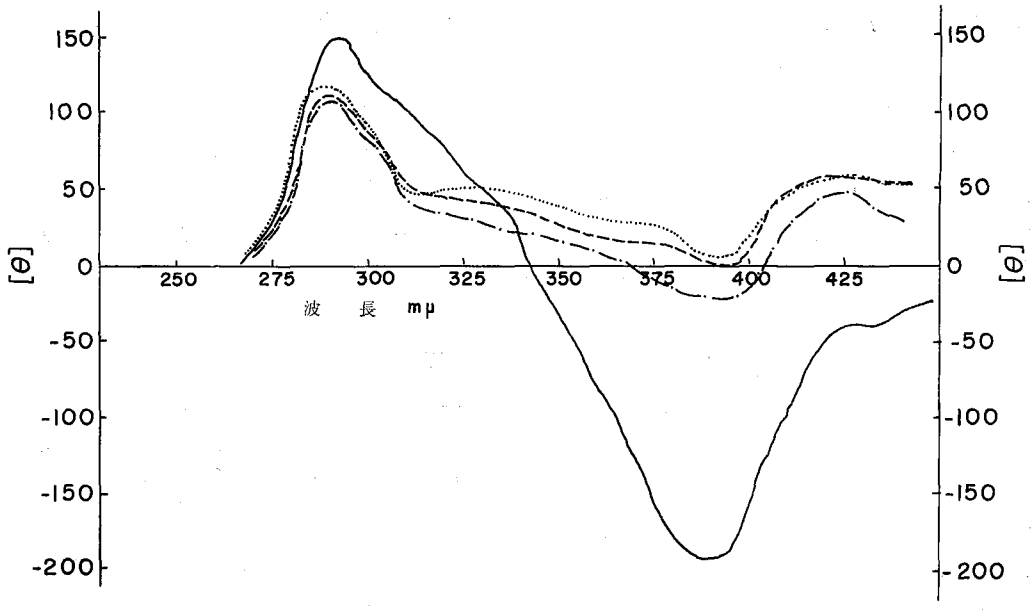
同じ試料について，差スペクトルを測定すると第1図に示すように，ソーレー帯では406 mμに極小点を持つ負の大きな谷と，近紫外部では280 mμと285 mμの二つの極小点を持つ谷が認められる。ソーレー帯に於ける谷は前報[1]で報告したようにヘム部分に起因する吸収の著しい減少を示している。近紫外部における二つの極小点についてみると，チロジン残基の吸収の位置が285～286 mμ付近にあることから，285 mμの極小点はチロジン残基の，溶媒効果による短波長側への吸収帯の移動（青方移動）を示すものであり，280 mμの極小点は，278～280 mμの吸収帯の強度の減少を示していると考えられる。同じ試料での通常の吸収スペクトルで，極めてかすかではあるが，280 mμの吸収帯の青方移動と強度の減少が認められるのはそのことを裏付けている。差スペクトルの変化も，ヘリックス・パラメーターと同様に，凍結温度の低下と共に増大している。

更に又同じ試料のCDスペクトルをみると，第2図にみられるように，凍結乾燥したカタラーゼでは，390 mμのソーレー帯のコットン効果に基づく吸収は著しく減少してほとんど消失し，更に極めて僅かではあるが，長波長側への移動（赤色移動）が認められる。近紫外部の蛋



第1図　凍結乾燥したカタラーゼの差スペクトル

——，−20°C；—·—·—，80°C；·····，−196°C でそれぞれ凍結後乾燥蛋白濃度，0.17%；溶媒，0.075M燐酸緩衝液；対照，未処理の試験



第2図 凍結乾燥したカタラーゼの CD スペクトル
——, 対照; —·—, −20°C; — — —, −80°C; ·····, −196°C でそれぞれ凍結後乾燥。溶媒, 0.075 M 燐酸緩衝液

白部分に由来する 290 mμ の吸収は，強度の減少と共に，数 mμ 程度の青方移動を示している。これらの変化の程度はいずれもヘリックス・パラメーターや差スペクトルと同様に凍結温度の低下と共に増大している。

これ等の結果は，凍結乾燥で単量体に解離したサブユニットの蛋白部分の二次構造，三次構造がある程度破壊されていることを示している。

IV. 考　　察

序論で述べたように前報の実験[1,2]では，凍結融解および凍結乾燥した時のカタラーゼの蛋白部分の高次構造がどんな状態にあるかは定量的にははっきりしなかったが，今回の実験で一応明らかとなった。

凍結融解したカタラーゼでは，前報[1]で報告したように，酵素活性は例えば −196°C で約 50% ほど失活するが四次構造の変化は起こらない。今回の結果で示したように，ヘリックス・パラメーターはほとんど変わらず，近紫外部およびソーレー帯の CD および差スペクトルでもほとんど変化が認められないことから，蛋白部分の二次構造，三次構造は凍結融解ではほとんど影響されず，ヘム部分の構造や環境もほとんど変化を受けないと考えてよい。従って，今回の測定法でみる限り，凍結融解に対してはカタラーゼの高次構造は非常に安定であると思われるので，凍結融解による失活は活性中心近辺の極めて局所的な微少な構造変化であろうと思われる。

一方，凍結乾燥して単量体に解離したカタラーゼのサブユニットについてみると，蛋白部分のらせん構造は，約 20～30% が破壊されていることが判った。二次構造の変化は，当然三次

構造の変化をひきおこすと考えられるが，今回のCDおよび差スペクトルの結果はそれを明らかに示している。前報[1,2]の結果では近紫外部の差スペクトルでは，5 mμ おきに手動で測定したため，280 mμ に極小を持つ比較的ブロードな単一の谷しか観測されなかったが，今回の測定では，第1図の結果に示したように，280 mμ と285 mμ の二つの谷を示している。これは前に述べたように，280 mμ の谷は吸収強度の減少を，285 mμ の谷は，チロジン残基が周辺の環境の変化，即ちアンフォルディングによって溶媒環境に露出したことによる青方移動を示している。今回の実験条件の場合，溶媒は水であり，且つ溶質の変化はないので，pHの変化や溶質の変化による溶媒効果は考える必要はないと思われるからである。カタラーゼは86個のチロジン残基を含むとされている[5]が，このような巨大なX線解析は勿論，一次構造も判っていない蛋白で，現在の結果から何個のチロジン残基が露出したかの論議は今の段階では出来ない。しかしながら差スペクトルの変化が，変性による青方移動と強度の減少であることは，CDスペクトルの結果でも支持される。第2図の290 mμ のCDの山はチロジン残基に起因するとされているが，凍結乾燥によって強度の減少と青方移動を明らかに示している。この現象は，遠紫外部のORD，CDの強度の減少や，のちに述べるソーレー帯でのCDの減少とともに，カタラーゼに尿素を加えた時のCDスペクトルの挙動[4]と定性的には全く同様である。これらの結果は，凍結乾燥によって単量体に解離したサブユニットの蛋白の二次および三次の構造が部分的に破壊され変化していることを明らかに示している。

凍結乾燥したカタラーゼのソーレー帯の吸収が減少することは前報[1,2]でも報告したが，同領域のCDスペクトルでも吸収強度の著しい減少と，数 mμ 程度の赤色移動を示している。ソーレー帯におけるこれらの変化は，サブユニットへの解離と，解離と共に起こる高次構造の変化によって，ヘム部分と溶媒環境との相互作用が変化したためと考えられる。

凍結乾燥したカタラーゼで，解離の程度即ち四次構造の変化は凍結温度とは全く無関係であったが，酵素活性は凍結温度への依存性を示していた[1]。今回の結果に示したように，二次構造および三次構造の変化も又，僅かではあるが凍結温度の低下と共に増大している。一方，凍結融解したカタラーゼは，高次構造は変わらないが，酵素の失活は凍結温度の低下と共に増大している。これらの事から考えて，あるいは実際にはカタラーゼの高次構造の変化は，凍結の過程で起こり，融解の過程で復元するため見掛け上構造の変化を測定出来ないのではないかということも考え得る。活性の低下については，この場合活性中心付近の極めて局小的な変化が完全に戻り得ないのではないか。もしそうなら，凍結乾燥の場合は，凍結状態のまま脱水乾燥されるため，凍結過程の変化に更に乾燥の過程の変化が加わった形での変化を観察しているのではないかと考えることも出来る。一般に，球状蛋白では疎水結合の性質からみて，高次構造がこわれても，構造上の復元性は大きいが，活性は完全にはもとへ戻らない例がいくつか知られているからである。この問題は今後，凍結過程での構造変化を追跡する方法を開発して検討されるべき興味のある問題である。

以上述べたように，今回の実験によって，少なくとも融解後にみる限りは，凍結融解ではカタラーゼの高次構造は変化しないが，凍結乾燥で単量体に解離したサブユニットでは高次構造の変化が起こり，らせん含量で約30%のらせん構造が破壊される。一方，前に報告したミ

オシン[2,6]では，凍結融解で約30%のらせん構造がこわれ，凍結乾燥では約50～60%のらせん構造がこわれることと比較すると，棒状蛋白のミオシンに対して，球状蛋白のカタラーゼの蛋白部分の高次構造は，凍結融解および凍結乾燥に対して比較的安定であるといえる。このカタラーゼの構造の安定性は，ヘム蛋白としてのヘムの蛋白部分への寄与とともに，前報[1,2]で述べたように，球状であることから溶媒の水に接し得る面が小さいという事と，疎水結合の復元性が大きく寄与していると想像される。

V. 摘　要

凍結融解および凍結乾燥に対して，球状蛋白の一つとしてのカタラーゼの高次構造の安定性を明らかにするため，段階的に −20°，−80°，−196°C の各温度に凍結融解したカタラーゼおよび同一条件で凍結し直ちに乾燥したカタラーゼの二次および三次構造の変化を，遠紫外部，近紫外部およびソーレー帯にわたって，吸収の差スペクトル，ORD および CD スペクトルで調べた。

その結果，凍結融解したカタラーゼではこれらの変化は全く認めることは出来なかったが，凍結乾燥して単量体に解離したカタラーゼでは，$[m']_{233}$，$[\theta]_{222}$ の値の減少，近紫外部における CD および差スペクトルの青方移動と吸収強度の減少，ソーレー帯における CD および差スペクトルの著しい吸収強度の減少と赤色移動が観察された。また，これらのパラメーターは僅かではあるが凍結温度の低下と共に増加の傾向を示した。

これらの結果から，カタラーゼの蛋白部分の高次構造は凍結融解ではほとんど影響を受けないが，凍結乾燥で解離するとかなりの変化を受け，最大約30%のらせん構造が破壊されていることが判った。又，この結果から，棒状蛋白としてのミオシンと比較して，凍結融解および凍結乾燥に対して，蛋白の二次および三次構造は比較的安定な事が判った。

文　献

1) 花房高史 1966 凍結融解および凍結乾燥によるカタラーゼの変性. 低温科学, 生物篇, **24**, 57–66.
2) Hanafusa, N. 1968 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing and freeze-drying. *In* Freezing and Drying of Microorganisms. (T. Nei, *ed.*), Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 117–129.
3) 花房尚史・松阪理夫　未発表.
4) Samejima, T and Kita, M. 1969 The conformational changes of catalase molecule caused by ligand molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 24–30.
5) 満田久輝 1963 カタラーゼ. 蛋白質・核酸・酵素, **8**, 82–92.
6) Hanafusa, N. 1967 Denaturation of enzyme protein by freeze-thawing. *In* Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms. (E. Asahina, *ed.*), Inst. of Low Temp. Sci., Sapporo, 33–50.

Summary

Some alterations in the molecular conformation of freeze-thawed and freeze-dried catalase were examined by optical rotatory dispersion (ORD), circular dicroism (CD) and difference spectra in the regions of far ultraviolet, near ultraviolet and Soret band.

No alteration was observed in CD, ORD and difference spectra of freeze-thawed catalase.

In contrast, in freeze-dried catalase, the intensity of CD and ORD spectra in the far ultraviolet region showed a remarkable decrease. The CD and absorption spectra in the near ultraviolet region shifted to a shorter wave length with a slight decrease in intensity. The intensity of CD and absorption spectra in the Soret band showed a remarkable decrease with a slight shift to a longer wave length. The extent of these changes depended slightly on the freezing temperature.

These results suggest that freeze-thawing causes no change in the molecular conformation, such as secondary, teriary and quartanary structure, of catalase. As previously reported, freeze-drying of catalase brought about a dissociation of the molecule into monomer of subunits. The present experiment confirmed that the helical structure of the protein moiety of such dissociated subunits was partially unfolded depending slightly on the freezing temperature and about 30% of the helix in the molecule was destroyed by freeze-drying. It was therefore suggsted that the conformation of catalase, one of the globular proteins, was more stable against freeze-thawing and freeze-drying than rod like protein, such as myosin.