

ウマの筋肉型炭酸脱水酵素(CA-III)に
関する研究

西 田 利 穂

1986

ウマの筋肉型炭酸脱水酵素 (CA-III) に
関する研究

麻布大学獣医学部生理学第一講座

西田利穂

目次

I	緒言	1
II	材料および方法	4
	II-1. 実験材料	4
	II-2. CA-IIIの精製方法	4
	II-3. 酵素活性の測定法	5
	II-4. CA-IIIの結晶化	6
	II-5. 電気泳動法	6
	II-6. CA-IIIの吸収スペクトル	6
	II-7. 吸光係数の測定法	6
	II-8. 分子量の測定法	7
	II-9. CA-IIIの熱安定性試験	7
	II-10. アミノ酸組成の分析法	7
	II-11. 亜鉛の測定法	8
	II-12. 抗血清の作製と免疫化学的分析法	8
	II-13. CA-IIIの化学修飾	10
	II-14. ペプチドマップの作製法	11
	II-15. アミノ酸配列の決定法	12
III	成績	14
	III-1. CA-IIIの精製と結晶化	14
	III-2. CA-IIIの生化学的、物理化学的性質	14
	III-3. CA-IIIの免疫化学的性質	33
	III-4. 各臓器のCA-III含有量と組織局在	38
	III-5. CA-IIIのペプチドマップ	38
	III-6. CA-IIIのアミノ酸配列	52
	III-7. CA-IIIの化学修飾	64
	III-8. ウマ血清中のCA-IIIの定量値	69

IV	考察	72
IV-1.	CA-IIIの精製とその性状	72
IV-2.	CA-IIIのアミノ酸組成	74
IV-3.	CA-IIIのペプチドマップ	77
IV-4.	CA-IIIの一次構造と化学進化	79
IV-5.	CA-IIIの化学修飾	88
IV-6.	CA-IIIの生物学的特性	89
IV-7.	CA-IIIの組織局在と生理的意義	91
IV-8.	CA-IIIの測定意義と臨床応用	92
V	結論	94
VI	謝辞	96
VII	参考文献	97

I 緒言

1933年にMeldrum とRoughton(69)が発見した炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase, E.C, 4,2,1,1,以下CAと略す)は、現在では最もよく研究されている酵素のひとつである。CAは亜鉛を含む金属酵素であり (56)、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の反応を触媒し、生物界には細菌、藻類、酵母類、苔類、植物、無脊椎動物、脊椎動物と広範囲に存在している。

ほ乳類のCAは、低活性型のCA-I(CA-B)と高活性型のCA-II (CA-C)の2種類が遺伝子支配の異なったアイソザイムとして存在している。CA-Iは主に赤血球と胃腸粘膜、CA-IIは赤血球とほぼ全組織に分布しており、 CO_2 の運搬や酸塩基平衡の調節などの役割をになっている。CA-IとCA-IIの性質の差に関しては、免疫学的には交叉反応を示さないことと、CA-IはCA-IIに比べると CO_2 水和活性とエステラーゼ活性が低いこと、サルファマイドに対して親和性が弱いことなどが報告されている(5,11,30,66,82,99,100)。さらに、CA-IとCA-IIの一次構造、三次構造の解析結果から両者にはかなりの類似性が認められ、アミノ酸配列においてはおよそ60%が一致している。酵素の活性中心は両者とも94番目、96番目、119番目のヒスチジン残基であり、この位置に亜鉛が配位することにより金属酵素として活性を発現している (4,45,46,54,55,63,64,65,74,107)。

一方、CAの研究が進むにつれてCA-I、CA-IIの変異型酵素についての報告を、ヒト(31,33,36,40,51,62,64,70,71,75,82,90,)、ヒツジ(97)、ブタ(96)、ネコ(12)、イヌ(13)で見ることができる。しかしながら、それらの変異型はその原因が突然変異、又は後成的修飾であったとしても、それぞれの変異型アイソザイムはCA-I又はCA-IIのいずれかと免疫学的に交叉反応を示すと理解されている(32)。

CAの多形現象についての研究で最もよく取り上げられてきたのがウマのCAである。Sandberg(84)は、スウェーデン産の農耕馬の赤血球中に5種類のアイソザイムを発見している。一方、Funakoshi(35)らとFurth(37)はアメリカ産のウマの赤血球中にはCA-I (D or B)とCA-II (C)が存在し、その2つの中ではCA-IIが主体であり、電気泳動上のザイモグラムは他の動物のそれとは非常に異った特徴的

なパターンを示すと報告した。そして、Deutsch らは日本産農耕馬の赤血球中に6種類のアイソザイムを発見し(20)、これらのアイソザイムのすべての精製と結晶化に成功し、一次構造の決定を行っている(10, 21, 50)。さらに、アメリカ産ポニーの赤血球中に CA-II の変異型を発見し CA-C₂, CA-C₃ と命名した(22)。

CA-II の変異型である CA-C₂ は一次構造の解析結果から、180 番目のアルギニン残基がシステインに変換しており、そして、CA-C₂ の180 番目のシステインにグルタチオンが結合することにより CA-C₃ が形成されることを報告している(23)。

一方、Jabusch (51) らは CA-C₃ の一次構造の研究途上で、CA-II のペプチドに混入したユビキチンを発見し、精製と結晶化に成功したが CA-II との関連性については不明であるとした。

多形現象を示すウマの赤血球中の CA の分析結果からは、ウマの CA を支配する遺伝子は何個存在するかは解決できず(50)、基本的には CA-I と CA-II の2つのアイソザイムが主体となりそれぞれ異った2つの遺伝子に支配されていると考えられ、新しいアイソザイムは発見されていない。

CA-I, CA-II に次ぐ第三のアイソザイムとして発見された CA-III は、Scopes (87) がブタの骨格筋に2%以上存在し電気泳動上最も陰極に泳動される塩基性蛋白質を F 蛋白質と報告したのに端を発した。

一方、Blackburn (9) らは、ウサギの筋肉中のフォスフォグルコースイソメラーゼが CM-Sephadex カラムから溶出された後に、さらに多量に存在する peak X を示したが、F 蛋白質も peak X も酵素活性が存在するか否かは結論づけるには至らなかった。それから5年後、Koester (59,80) らは peak X が炭酸脱水酵素であることを発見し、さらに F 蛋白質とも類似していることを認め CA-I, CA-II に次ぐ第三のアイソザイムである CA-III として報告した。さらに、Holmes もヒツジの赤色筋肉やニワトリの肢筋に CA-III の存在を示唆し(47,48)、さらにヒツジの筋肉を用いて精製を行ない、分析の結果から CA-III であると報告した(49)。ウシの CA-III に関しては、Carter ら(14) と Tashian (102) らの報告がある。Moynihan (72) は、ラットの心筋には存在しないで、骨格筋に存在する CA の活性を測定し報告したが

CA-Ⅲの確認はされなかった。その後 CA-Ⅲは心筋に存在せず骨格筋に存在することが明らかとなり、さらにShima (88)らは骨格筋の中でも特に赤筋 (Type-I 筋線維) に局在することをヒトの筋肉を用いて明らかにした。 ヒト CA-Ⅲの基礎的研究 (14,15, 52) に加えて、近年、血清中に遊出される CA-Ⅲの微量測定法が開発された結果 (41,42,89) 筋ジストロフィー等の筋肉障害患者血清中に正常値よりも高い値の CA-Ⅲが検出されたことにより、臨床診断への意義は急速に認められつつある (16,18,41,42,43,89)。他方、Maren (68)らは、ラットの肝臓中にアセタゾールアミドで阻害されないCAが存在することを示し、King (58) らは雄ラットの肝臓中のみに同様な性状のCAを検出し精製を試みている。さらに、Lal (61), Carter (17)らは、ラットの肝臓中にテストステロンで誘発されるCAを検出し、その性状が骨格筋に存在する CA-Ⅲに類似していることを報告して CA-Ⅲの新たな局在を示した。

今回、著者は赤血球中で興味深い多形現象を示し、分析の進んでいるウマのCAに注目しウマ骨格筋からCA活性を持つ塩基性蛋白を精製した。その分析結果から、ウマではまだ報告されていない CA-Ⅲであることが判明した。そこで、ウマ CA-Ⅲの生化学的、物理化学的、免疫化学的、免疫組織学的な分析結果に加えて、一次構造の解析、化学修飾による影響についての結果を得ることによりウマ CA-Ⅲの特徴を明らかにしたので報告する。さらに、獣医学領域での臨床診断への応用のための微量測定法を開発し、ウマ血清中の CA-Ⅲ濃度を測定し若干の知見を得たのでその成績を加えて報告する。

II 材料および方法

II - 1 : 実験材料

実験に供したウマの筋肉は、ウィスコンシン州立大学獣医学研究部ポニー牧場で飼育したポニー種の雌と麻布大学に搬入されたサラブレッドの雄と雌から採取した。

ウマは、ネンブタールで麻酔後、頸静脈から放血し直ちに骨格筋（中臀筋）を採取し、さらに肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、膵臓、副腎、甲状腺、胸腺、卵巣、精巣、子宮、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸を採取した。ウマの血液はヘパリンで凝固防止をして採血し、遠心分離後赤血球層を採取した。

ウシ、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、ニワトリの骨格筋と肝臓は臓器抽出液作製用として用いた。

ウマのCA-I, CA-IIのアイソザイム精製品はウィスコンシン州立大学の Deutsch 教授から提供を受けた。

ウマの血清は、麻布大学馬術部と西村育成牧場（栃木県）で採血した血液を用いた。

II - 2 : CA-IIIの精製方法

A. 筋肉抽出液の調製

筋肉重量の2倍量の0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）, 4 °C, を加えミキサーでホモジナイズした。ホモジネートは 8,000 g, 30分間, 4 °Cで遠心分離し、その上清をガラスウールで濾過を行い精製用筋肉抽出液とした。遠心分離で得た沈渣は再度上記の方法でホモジナイズし、遠心分離を再度行いその上清も同様に精製に用いた。

B. 酵素蛋白質のアルキル化

システインの保護を目的として、0.01 M のモノヨードアセトアミドを筋肉抽出液に加え攪拌しながら 5 N NaOH で pH 8.0 に調節し15分間反応を行った。筋肉抽出液は0.01M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に対して透析を行ない余分な試薬を除去した。透析外液は1日2回交換を行い3日間続けた。電気伝導度計で透析終了を確認し8,000 g, 30分間, 4 °Cで遠心分離を行ない、上清をカラムクロマトグラフィー用の試料とした。

C. 陽イオン交換クロマトグラフィー

0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化したCM-Sepharose CL-6B（Pharmacia）を3.4 X 34 cm のカラムに充填し、十分な緩衝液を流した後、筋肉抽

出液をカラムに流し、同じ緩衝液にてカラムを十分洗い未吸着蛋白質を完全に洗い流した。吸着した蛋白質の溶出には、塩化ナトリウム濃度を0から0.15 Mへと直線的に上昇させて行った。総溶出液量は3 Lに達し、溶出した溶液はフラクションコレクターで8 mLずつ分取し、分光光度計を用いて波長280nmにて測定を行った。分画した蛋白質は透析チューブに入れ硫酸アンモニウムをふりかけ90%硫酸塩析を行って濃縮した。濃縮後は0.01 M トリス塩酸緩衝液に対して透析を行った。

D. ゲル濾過法による分画

Rickli (82) らは、CAとヘモグロビンの分離に Sephadex G-75を用いて好成績をあげていることから、今回のゲル濾過にも同様に Sephadex G-75 (Pharmacia)を用いた。すなわち、4 X 50 cm のカラムによく脱気した Sephadex G-75を充填し、0.15 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した。試料の量はカラム体積の1%以内とし、流速は20 mL / 時間で行った。

E. カラム等電点電気泳動法

調製用カラム 8001 型 (LKB) を用い、Svenson (95), Deutsch (21) らの方法に準じて行った。pH 勾配の作製にはアンフォライン 8.5~10 (LKB) を用い、試料は蒸留水 (Milli-Q-Millipore) に対し十分透析して塩類を除去した。カラムは4°Cに保ちながら0.5ワット通電し、5時間ごとに0.5ワット上昇させ25時間後に3ワットに上げ、その後35時間3ワットで泳動した。泳動終了後はフラクションコレクターで分取し、直ちにpHメーターを用いpHを室温にて測定した。引き続き、280 nmの波長で吸光度の測定を行った。

F. アフィニティークロマトグラフィー

Whitney (107), Osborne (76) らの方法によりp-アミノベンゼンスルファミドをカップリングした Sepharose 4 B (pharmacia) を0.01 M Na_2SO_4 を含む0.025M トリス塩酸 (pH 8.6) で平衡化した後に筋肉抽出液を流入した。溶出液には0.05 M NaClO_4 を含む0.01 M 酢酸ナトリウム (pH 5.5) を用いた。

II - 3 : 酵素活性の測定法

CA活性の測定には Wilbur & Anderson (108) の方法を用い、酵素1 mg 当りの活性値で表わした。

エステラーゼ活性の測定は Verpoorte (104) らの方法に準じて行い、基質には1 mM p-ニトロフェニールブチレート (p-NPB) を用いて波長415 nmの吸収の変化で

表わした。クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) の測定には、RaBA-Super System (中外製薬) を用いて行った。

II - 4 : CA-III の結晶化

精製した CA-III を 0.05 M トリス塩酸 (pH 8.0) に一昼夜透析し、次いで 60 % 硫酸を含む上記の緩衝液に透析し、6 時間後に外液を交換し一夜静置した。完全に平衡化したところで 15 °C, 8,000 g で遠心分離し、その上清を 61 % 硫酸を含む同上の緩衝液に対し透析を再度行った。同様な操作を繰り返して硫酸濃度が 62 % に達した時点で試料溶液を試験管に取り出し、遠心分離後に上清の温度を室温から少しずつ下げた。試料温度が 4 °C に下がった時点で一夜静置し、結晶は顕微鏡を用いて観察した。

II - 5 : 電気泳動法

A . 澱粉ゲル電気泳動法

Smithis (91) の方法に準じ、LKB バーチカル澱粉ゲル電気泳動装置を用いて行った。澱粉は Electro starch (Electro Starch 社) を用い、泳動用緩衝液には Tris-Versene-Borate (pH 8.6) を用いた。

B . SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

Weber & Osborn (105) の記載に準じ、ゲル濃度を 12.5 % に調整したスラブ型電気泳動法で行った。試料には 2-メルカプトエタノールを加え、100 °C 1 分間加熱し還元を行った。

C . 高圧濾紙電気泳動法

泳動装置は、High Voltage Electrophorator Model D, (Gilson Medical Electric) を用いた。泳動用濾紙は Whatman 3 M chromatograph paper, 46 X 57 cm を用いた。冷媒にはヘキサンを用い、水道水を循環させて冷却した。

II - 6 : CA-III の吸収スペクトル

UV-visible Recording Spectrophotometer UV-240 (島津) を用い、波長を 220 nm から 320 nm まで連続的に変化させて吸収曲線を作成し蛋白質の極大吸収を求めた。試料は 0.01 M トリス塩酸 (pH 7.5) に溶解したものをを用いた。

II - 7 : 吸光係数の測定法

十分に脱塩をした CA-III を用いて適当な濃度に溶解し、その一定量を 105 °C, 20 時間乾燥しその乾燥重量を測定した。水溶液重量と乾燥重量との関係から 10 mg / ml 溶液を作製し波長 280 nm における吸光度を求めた。

II - 8 : 分子量の測定法

0.01 M トリス塩酸 (pH 7.5) に懸濁した Sepharose CL 6B (Pharmacia) を 1.5 X 115 cm のカラムに充填し、分子量測定用カラムとして用いた。分子量マーカーとして、 α -キモトリプシノーゲン (MW. 25,000), オボアルブミン (MW. 45,500), ヒト Ig G (MW. 150,000), ブルーデキストラン (MW. 2,000,000) を用いて検量線を作成し、CA-III の分子量を求めた。

還元した CA-III の分子量測定は、Weber & Osborn (105) の方法に準じ、12.5 % SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で行った。分子マーカーとして、ウシ血清アルブミン (MW. 67,000), オボアルブミン (45,500), α -キモトリプシノーゲン (MW. 25,000), チトクロム-C (MW. 12,400) を用いた。

II - 9 : CA-III の熱安定性試験

1% 酵素溶液を 50 °C, 5 分間, 60 °C, 5 分間, 100 °C, 1 分間加熱し CO₂ 水和水活性とエステラーゼ活性を測定した。

II - 10 : アミノ酸組成の分析法

A. アミノ酸自動分析機による分析法

酵素蛋白質をよく洗浄してあるイグニッションチューブ (パイレックス) にとり、6 N HCl を加え減圧下で封管して 110 °C のオープン内で 20 時間加水分解を行った。加水分解を終えると開封し直ちにエバポレーターで減圧乾固し、0.148 M クエン酸ナトリウムを加え適量を Durrum D-500 アミノ酸自動分析機に注入して分析を行った。チロシンの収量の低い場合は、6 N HCl 中に 0.2 % フェノールを加えて加水分解を行った (7)。

B. システインの測定法

Ellman 法 (26,27) に準じて蛋白質中のシステインの測定を行った。被検酵素を 8 M 尿素を含む 0.05 M トリス塩酸 (pH 8.0) 1.3 ml に溶解し、0.01 M 5,5-ジチオビス (DTNB) 溶液を 30 μ l 加え 30 分間以上反応させて 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の遊離を分光光度計を用いて 412 nm 波長にて測定した。分子吸光係数は 13,600 (26) を用いて算出した。

C. トリプトファンの測定法

Bencze (6) からの分光学的定量法を用いた。すなわち、蛋白質のおよそ 0.5 mg を 0.1 N NaOH に溶解し、波長 274 nm から 294 nm までの吸光度を測定して吸光曲線の傾きを求め、トリプトファンとチロシンのモル比と傾きの関係からトリプトファン

を定量した。

II - 11: 亜鉛の測定法

亜鉛の測定は Atomic Absorption Spectrophotometer SAS / 727 (第二精工舎) を用いて原子吸光分析法で行った。測定条件は波長 213.8 nm, 電流 7 mA, バーナー高さ 0.45 cm, バーナー角度 0°C, C₂H₂流量 3.5ℓ / min, 圧 0.85 Kg / cm², 空気流量 17 ℓ / min, 圧 2.25 Kg / cm² で行った。

II - 12: 抗血清の作製と免疫化学的分析法

A. 抗血清の作製

精製したウマ CA-III をフロイドのコンプリートアジュバントと乳液状にしてウサギ 7 羽に免疫した。免疫は 1 週間隔で行い 2 回目までは 1 羽当たり 0.5 mg の CA-III を免疫し、以後 1 mg を 8 回免疫した。作製した抗血清の抗体価の測定には、ウサギの耳静脈より採血した血液から血清を分離し極小試験管内で抗原と抗体を重ねる重層法で測定した。抗原量は、CA-III の 1 mg / ml, 100 μg / ml, 10 μg / ml, 1 μg / ml を用い、抗原抗体複合物が観察される最少限の抗原量をもって抗体価を表わした。

B. オクタロニー法

1% agar noble (Difco) をシャーレ内で厚さ 1 mm になるように作製し、直径 4 mm の穴を開け室温で抗原抗体反応を行った。

C. エンザイムイムノアッセイ (E I A) による CA-III の測定法

C-1 ペルオキシダーゼ標識抗体の調整

E I A に用いるウサギ抗ウマ CA-III 血清の Ig G 抗体の精製は、硫酸塩析とイオン交換クロマトグラフィーで実施した。すなわち、抗血清に飽和硫酸溶液を加え 35% にし、同じ操作を 2 度行った。35% 塩析画分を 0.017 M リン酸緩衝液 (pH 6.3) に対して透析し、同じ緩衝液で平衡化した DEAE セルロース (Whatman) カラム (2.0 X 25 cm) に流入し素通り画分を得た。Ig G は 0.01 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に透析し、E I A 用の一次抗体とペルオキシダーゼ標識用抗体とした。

Ig G とペルオキシダーゼの結合は Nakane (73) らの方法で実施した。すなわち、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP, Sigma type VI, RZ ≒ 3.0, Sigma Chem. Co.) 4 mg を 1 ml の蒸留水にて溶解し、0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液

0.2ml を加えて室温で20分間攪拌しながら反応させ、HRP の糖部分のジオール基を活性化した。活性化したHRP 溶液を透析チューブに移し、1nM 酢酸緩衝液 (pH 4.4) 4 °C で一夜透析した。透析後、小試験管に試料を移し20 μ l の 0.2 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で pH を 9.5 に上げ、直ちに 1 ml の 0.01 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した 8 mg の Ig G を加え攪拌しながら室温で2時間反応させた。反応終了後、直ちに氷水中にて4 °C に冷やし、0.1 ml の水素化ホウ素ナトリウム (4 mg / ml) 水溶液を加え 4°C で1時間反応させ、その後0.01 M リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.2) で透析した。HRP 標識抗体と未結合の Ig G, そしてHRP の分離を Sephadex G-200 (Pharmacia) カラム (3.5 X 48 cm) を用いて行った。分画した各フラクションは 280nm と 403nm の吸光度を測定して、最初にカラムから溶出されて、さらに両者の波長の吸光度が一致した画分を採取した。プールした標識抗体は、オクタロニー法で抗体価が失われていないことを確認して、ウシ血清アルブミンを最終濃度 1% になるように加えて凍結して保存した。この標識抗体は E I A の第二次抗体用と免疫組織化学用の第一次抗体 (直接法) 用として使用した。

C-2 E I A による CA-III の定量

E I A には Micro-ELISA plate (Dynatech M129A) を用いたサンドイッチ法で実施した。検量線の作成には、標準 CA-III 1.28 μ g/ml, 640 ng/ml, 320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml を用いた。

まず、0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に対して透析した Ig G (抗ウマ CA-III) を 50 倍希釈し、その 100 μ l をプレートの各ウェルに分注し、37°C で2時間、そして 4°C で一夜静置しプレートの底に吸着させた。ウェルの洗浄液には最終濃度 0.05 % の Tween 20 を含む PBS (pH 7.2) を使い、5 分間隔で3回洗浄した。被検試料は、上記の洗浄液に最終濃度 1% のウシ血清アルブミンを加えた溶液で最低 4 倍希釈し、高濃度に CA-III が含まれる試料は検量線内に入るように希釈して、その 100 μ l を抗体の結合しているウェルに注入し 37°C で2時間反応させた。標識抗体は試料希釈液を用いて 5,000 倍に希釈し、その 100 μ l を用いた。

ペルオキシダーゼの基質溶液は、ABTS [2,2'-アジノ 2 アンモニウム塩 (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)] (Sigma) 30 mg を 0.1 M クエン酸 50 ml と 0.2 M リン酸 2 ナトリウム 50 ml の混合液に溶解し、使用直前に 30 % 過酸化水素水 50 μ l 加えて調製した (78) 。この基質溶液を 200 μ l 用い、室温で30分間発色させた。酵素反応の停止にはフッ化ナトリウムを用いた。

被検試料の代わりに試料希釈液を用い、同様の操作で酵素反応を行ったウェルを

ブランクとして、マイクロプレート測定用比色計（イムノリーダーNJ-2000, 日本インターメッド社）を用いて、波長 415 nm で吸光度の測定を実施した。被検試料の CA-III 濃度は、標準 CA-III の濃度と吸光度とから検量線を作成して求めた。

D. 免疫組織化学的方法による CA-III の細胞内局在

サラブレッドの中臀筋は採取して2時間以内にブアン固定し、次にパラフィン包埋を行い、2 μm の組織切片を作製した。組織切片はキシロールで脱パラフィンを行ない、内因性酵素活性の除去の目的で 0.3 % 過酸化水素水を含む 100 % エタノール溶液内に入れ、室温で 20 分間反応させた。反応終了後 PBS で洗浄し、次に正常ウサギ血清と反応させ Fc レセプターをブロックする操作を行った。CA-III の局在を証明するためにペルオキシダーゼ標識抗体（500倍希釈）を直接法で使用し室温で30分間反応させた。対照となる切片には、最初に抗ウマ CA-III ウサギ血清と反応させ、PBS で洗浄後にペルオキシダーゼ標識抗体（500倍希釈）を同様に反応させた。反応終了後、両者の切片の未反応標識抗体を PBS で洗浄し酵素染色を行った。基質溶液には 3-3'-ジアミノベンチジン四塩酸（同仁化学）20 mg を 100 ml の 0.05 M トリス塩酸に溶解し、pH 7.6 に調整した後に 5% 希釈の過酸化水素水を 100 μl 加えた溶液を用いた。およそ30分間反応させ、顕微鏡で確認後 PBS（4 $^{\circ}\text{C}$ ）で反応を停止した。

II - 13: CA-III の化学修飾

A. アセチル化

エステラーゼ活性の測定に用いた p-ニトロフェノールブチレート（p-NPB）を用いて CA-III のアセチル化を行った。すなわち、CA-III 濃度が 0.3 % になるように 0.01 M ジエチルマロン酸緩衝液（pH 8.0）[DEMA] に溶解し、その溶液に 1 mM の p-NPB を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間反応を行った。反応後は Sephadex G-25 で修飾蛋白質と試薬の分離を行った。

B. カルバミル化

0.3 % CA-III 溶液（0.01 M DEMA, pH 8.0）1 ml に 50 mM のカルバミルリン酸 500 μl を 2 時間ごとに合計 9 回加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応を行った。反応後は Sephadex G-25 で修飾蛋白質と試薬の分離を行った。

C. ジニトロフェニル（DNP）化

1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（FDNB）を用い CA-III の DNP 化を行った。CA-III 500 μg を 2% 炭酸水素ナトリウム溶液 450 μl に溶解し、攪拌しながら FDNB 60 μl を加え 3 時間室温で反応を行った。反応終了後塩酸を数滴加え DNP 化 CA-III を沈澱させ、エーテル、アセトン、水でそれぞれ 3 度ずつ沈澱した DNP 化 CA-

Ⅲを洗淨した。DNP化 CA-Ⅲは減圧乾固した後、アミノ酸分析に用いた。

D. シトラコニール化

CA-Ⅲ 10mg を2% 炭酸水素ナトリウム (pH 8.2) 1 ml に溶解し、無水シトラコニール酸 10 μ l を20分間隔で3回加え、その間は2N NaOHで pH 8.2 に合わせた。その後3時間室温で反応させた後に、0.1 M 重炭酸アンモニウムに対して一夜透析を行った。

II - 14: ペプチドマップの作成法

トリプシン分解ペプチドマップの作成には、一次元の展開に濾紙クロマトグラフィーを行い、二次元の展開には高圧濾紙電気泳動法を用いた。

A. 試料の調整

CA-Ⅲ 2 mg 又はシトラコニール化 CA-Ⅲ 2mgを 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 1 ml に溶解し、100 $^{\circ}$ C 1分間加熱変性させた。次いで、1% の L-クロロメチルケトン (TPCK)-トリプシン (Worthington Biochem. Corp.)を加え 37 $^{\circ}$ C 5時間振盪しながら反応を行った。反応後は遠心分離を行い上清を凍結乾燥させた。

B. 濾紙クロマトグラフィー

上記の乾燥試料を 15 μ l の 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) に溶解し、II-5-Cで記載した濾紙に塗布し、ドライヤーで完全に乾燥させた。展開用溶媒には、ブタノール : 酢酸 : 水 (4 : 1 : 5) の混合液を分注ロートでよく攪拌し、分離した上層液を用いた。濾紙はガラスケース内に吊し、上方から溶媒を流して16時間展開した。

C. 高圧濾紙電気泳動

泳動用緩衝液にピリジン酢酸緩衝液 pH 6.5 を用い、II-5-Cで記述した方法で 2,500 V, 60 分間泳動を行った。

D. ペプチドの検出法

ペプチドの検出には、Vandekerckhove (103) の方法を用いた。すなわち、0.001 % フルオレスカミン (Aldrich Chemicals) /アセトン溶液を用い、紫外線ランプ (波長 336 nm) で照射してペプチドを蛍光スポットとして検出した。各スポットのペプチドを同定するために、鉛筆で印をつけたスポットを切り出して0.1 M アンモニア水で抽出し凍結乾燥した。各ペプチドの凍結乾燥標品についてアミノ酸分析を行った。

II - 15 : アミノ酸配列の決定法

A . CA-IIIの還元アルキル化

CA-III 50mg を 8M 尿素と 0.5mMジチオスレイトール (DTT)を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 10 ml に溶解し、37°C 1時間還元した。次いで、モノヨード酢酸をDTT の2倍量加え室温でアルキル化を15分間行った。反応後は、蒸留水に対して一夜透析を行い、次いで凍結乾燥を行った。

B . ブロムシアンによる切断法と分画

ブロムシアンによるメチオニン残基での切断は、Gross (38)の方法に準じて実施した。すなわち、還元アルキル化を行った CA-IIIに 70 % 蟻酸 4mlを加え、次に 50 μ lのブロムシアン (100g / 50ml)アセトニトロ溶液を加えて24時間室温で遮光して反応を行った。反応後 50ml の蒸留水を加えて凍結乾燥を行った。

ペプチドの分画は 6M グアニジン塩酸塩を含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化した Sephacryl S-200 (Pharmacia)を 1.6 X 163 cmのカラムに充填して、流速 3 ml/ 時間/cm²で行った。

C . トリプシン及びキモトリプシン分解によるペプチドの作製と分画

約 40mg の還元アルキル化を行った CA-IIIを 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) 3 ml に溶解し、100 °C, 1 分間加熱変性させた。変性後 2 % (W/W) TPCK-トリプシン又は α -キモトリプシン (Worthington Biochem. Corp.) を用いて 37 °C, 6 時間振盪しながら反応させた。反応後は沈澱を遠心分離で除去し、上清を凍結乾燥した。

ペプチドの分画には、トリプシン分解した試料については Sephadex G-25 (Pharmacia) α -キモトリプシン分解の場合はウルトラゲルAcA-200 (LKB) を用いた。いずれの場合もカラムサイズは 1.6 X 163 cm で緩衝液には 0.1 M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) を用いた。

D . ペプチドの精製法

消化酵素で分解し、カラムクロマトグラフィーで分画したペプチドは、さらに高圧濾紙電気泳動 (II -5-C)と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製を行った。高圧濾紙電気泳動用緩衝液は、蟻酸 : 酢酸 : 水 (87 : 25 : 888) の混合液 (pH 1.9) を用いた。HPLC は、830 Liquid Chromatograph (DUPONT) を用いた。開始緩衝液には0.125 % トリフルオロ酢酸、最終緩衝液には 75 % アセトニトロ、25 % 2-プロパノール、0.1 % トリフルオロ酢酸の混合液を用い、開始 0.4 %

から最終 65 % の混合比の直線勾配で溶出した。分取したペプチドはアミノ酸分析で純度を検定しアミノ酸配列の実験に用いた。

E. シークェンサーによる自動 Edman 分解

Beckman Sequencer 890 model を用いてペプチドの自動 Edman 分解を行った。

Edman 分解法 (24) は、ペプチドの N 末端アミノ基にフェニルイソチオシアネート (PITC) をカップリングさせて、フェニルチオカルバミルペプチドにする反応である。次に酸性の条件下でこのペプチドの末端ペプチド結合を切断し、N 末端アミノ酸の 2- アニリノ-5- チアゾリノン誘導体を形成し、さらにチアリゾノン誘導体を 3- フェニル-2- チオヒダントイン (PTH) 誘導体にする転換反応である。この反応は Edman と Begg (25) が自動化に成功し、その方法を用いて N 末端から切断を行った。

F. PTH アミノ酸の同定

シーケンサーから分取した各アミノ酸試料は、減圧乾固した後、100 μ l の 1N 塩酸を加えよく攪拌し栓をして 50 $^{\circ}$ C, 7 分間インキュベートし PTH アミノ酸に転換した。乾燥させた PTH アミノ酸に 20% アセトニトロを加え、LC/9533 Ternary Gradient Liquid Chromatograph (IBM) を用いて PTH アミノ酸を同定し N 末端からのアミノ酸配列を逐次決定した。

III 成 績

III - 1 : CA-IIIの精製と結晶化

CA-IIIの精製は各精製段階においてCA活性を測定し、活性値の存在する分画を採取することによって進めた。

筋肉抽出液は、筋肉1Kgを用いた場合は全体量がおよそ4ℓになるが濃縮することなく、p-アミノベンゼンスルファミドをカップリングしたセファローズ4Bカラムに流入した。素通りした蛋白溶液中には若干のCA活性が存在したが、溶出した吸着蛋白分画にはCA活性は皆無であった。

アルキル化した筋肉抽出液をCMセファローズ CL-6Bのカラムに流入し、塩基性蛋白質を吸着させて直線的に塩濃度を上げることにより吸着した蛋白質を溶出させた。その結果を Fig. 1 に示した。分画されたピークは6個になり、CA活性はCM Fr. IIIに存在した。後に抗 CA-III血清を作製しオクタロニー法で検索した結果、CM Fr. I とCM Fr. IIIに CA-IIIが存在していた。CM Fr. IIIを90% 硫酸で濃縮し脱塩後セファデックスG-75でゲル濾過を行った結果を Fig. 2 に示した。酵素活性はG Fr. Bに存在した。CM Fr. Iを同様にセファデックスG-75でゲル濾過した結果を Fig. 3 に示した。抗血清と反応した分画はG Fr. Baであった。

G Fr. Bを調製用カラム等電点電気泳動で分画した結果を Fig. 4 に示した。等電点8.9の蛋白画分にCA活性が存在した。G Fr. Baについても同様にカラム等電点電気泳動を行った結果を Fig. 5 に示した。等電点8.1の蛋白画分が抗血清と反応し、CA-III aと命名した。

1 Kgの筋肉を用いて精製したCA-IIIは約300 mgで、CA-IIIaは約15 mgであった。

精製したCA-IIIを澱粉ゲル電気泳動と、12.5% SDS-PAGEを行い単一バンドであることを確認した [Fig. 6, 7]。

CA-IIIの結晶化は、硫酸濃度が62%に達した時点で室温から4℃へと温度を少しずつ下げると、最初は針状の結晶が現われ、さらに4℃に静置すると Fig. 8 の結晶を得ることができた。

III - 2 : CA-IIIの生化学的、物理化学的性質

A. 酵素活性

ウマのCA-I (D), CA-II (C), CA-III, CA-IIIaのCO₂水和活性を測定した結

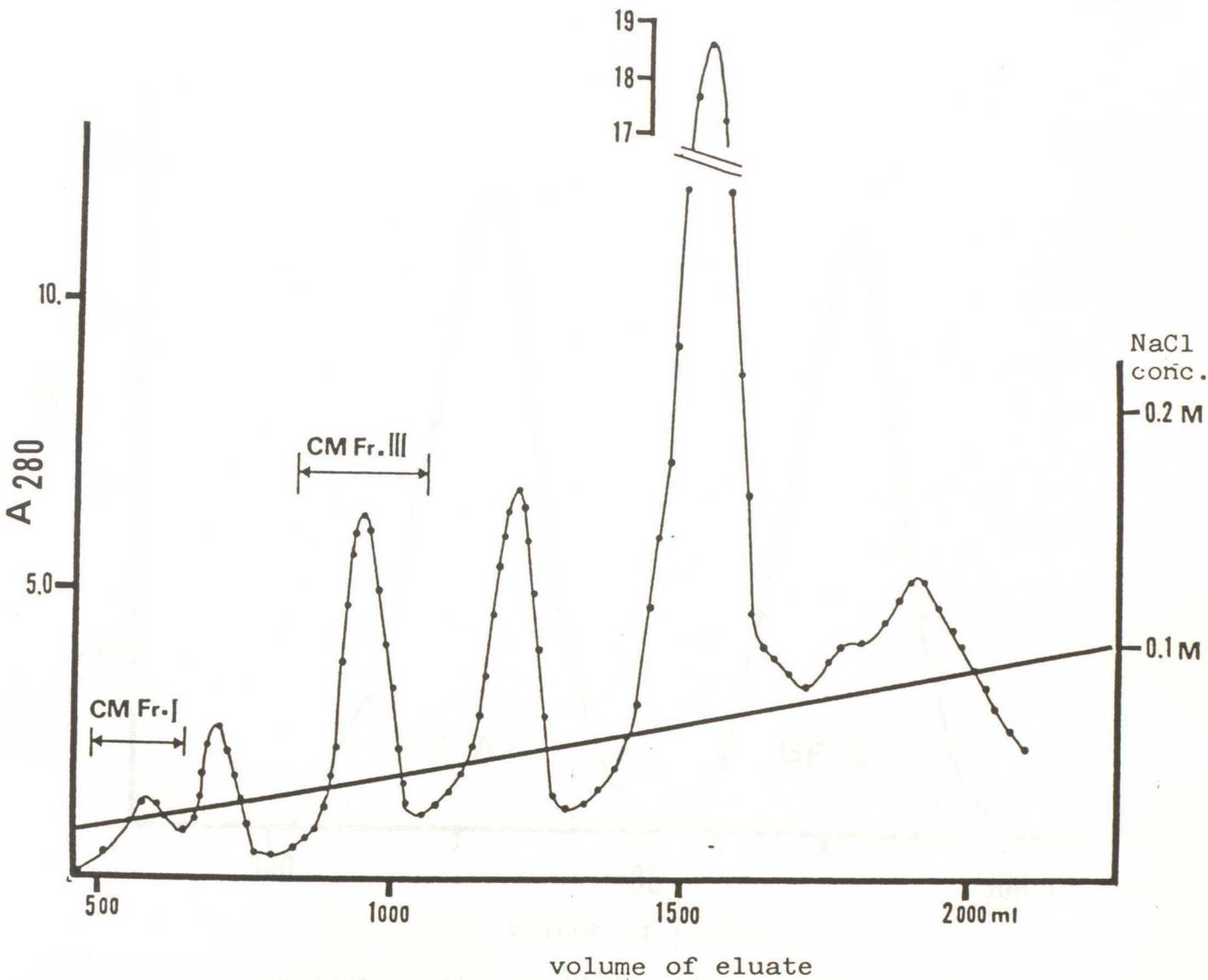


Fig. 1. CM-Sepharose CL-6B column chromatogram of equine muscle extract.

Column : 3.4 X 34 cm

starting buffer : 0.01 M Tris-HCl , pH 8.0

elution : linear gradient from 0 to 0.15M NaCl

elution rate : 20 ml/hr

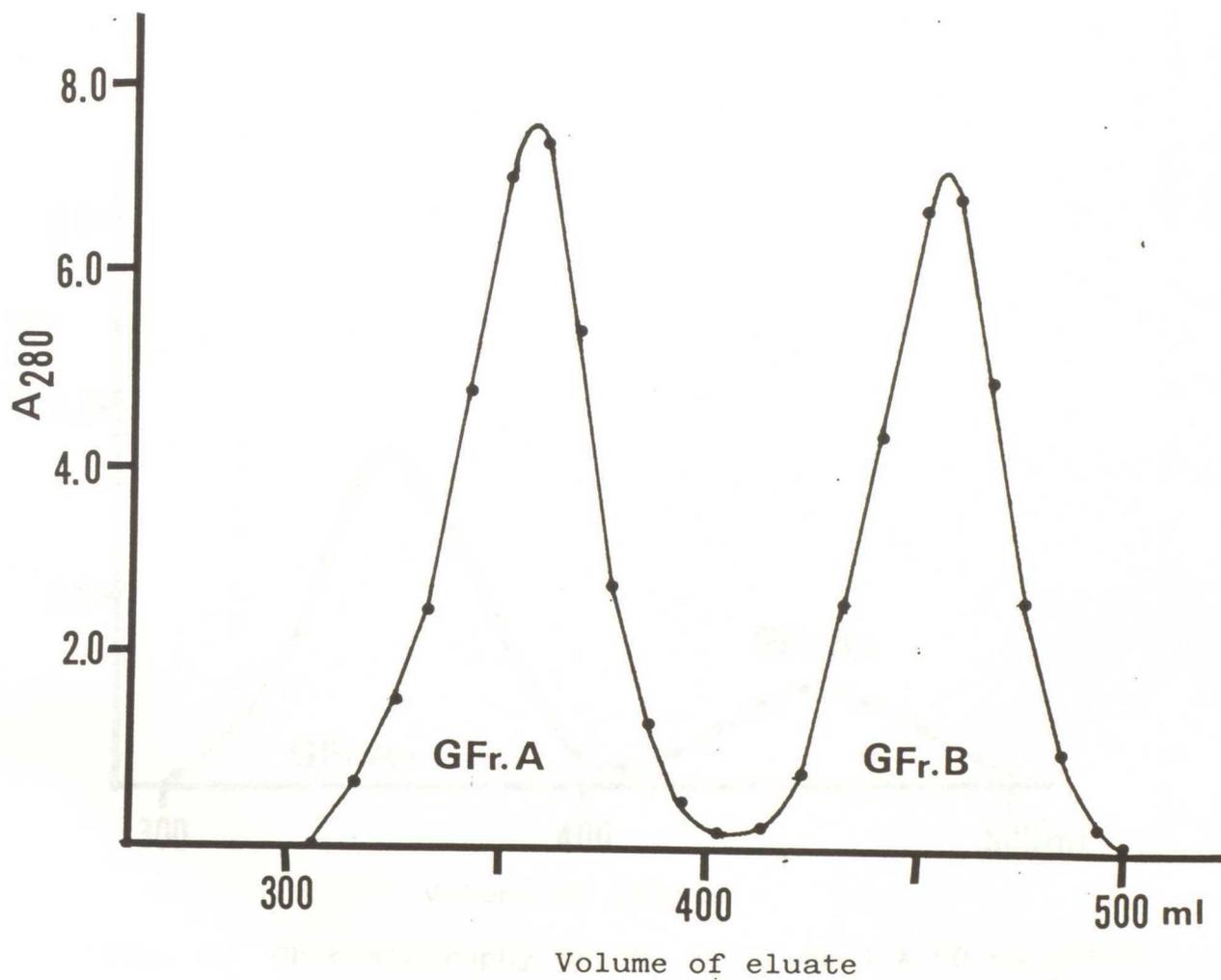


Fig. 2. Chromatography of CM Fr. III on 4 X 50 cm column of Sephadex G-75.

elution rate : 20 ml/hr

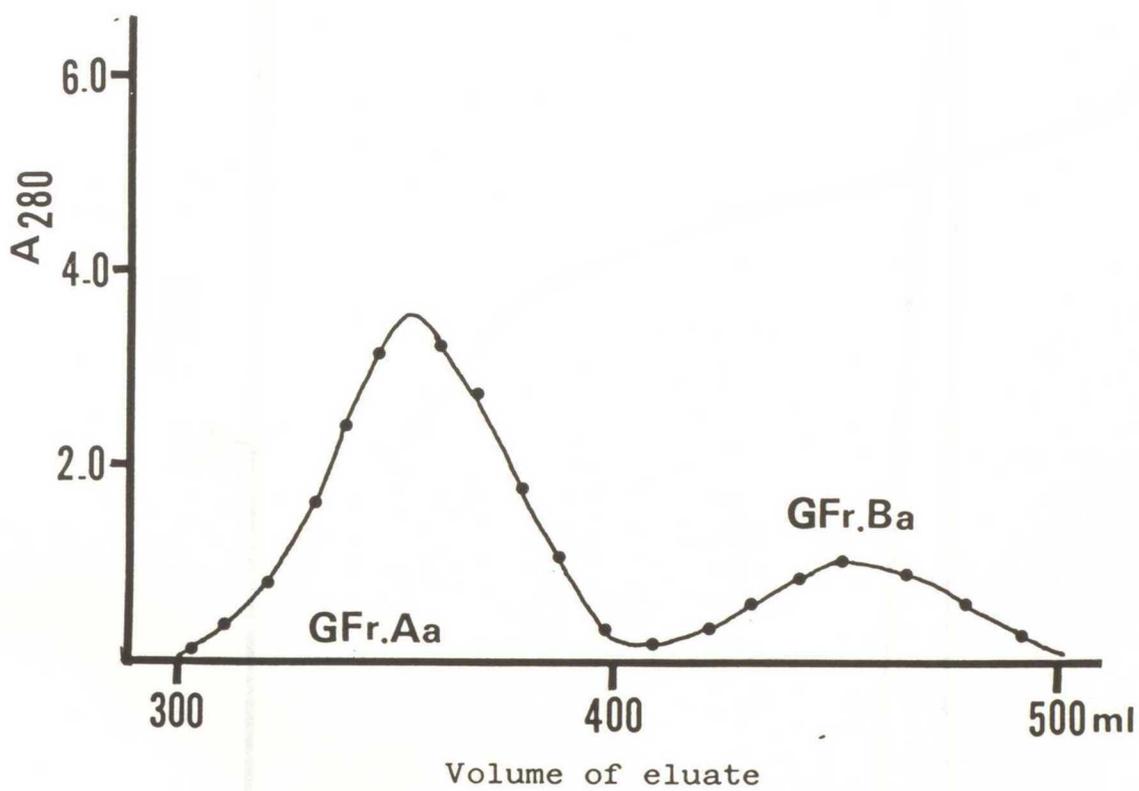


Fig. 3. Chromatography of CM. Fr I on 4 X 50 cm column of Sephadex G-75.
 elution rate : 20 ml/hr

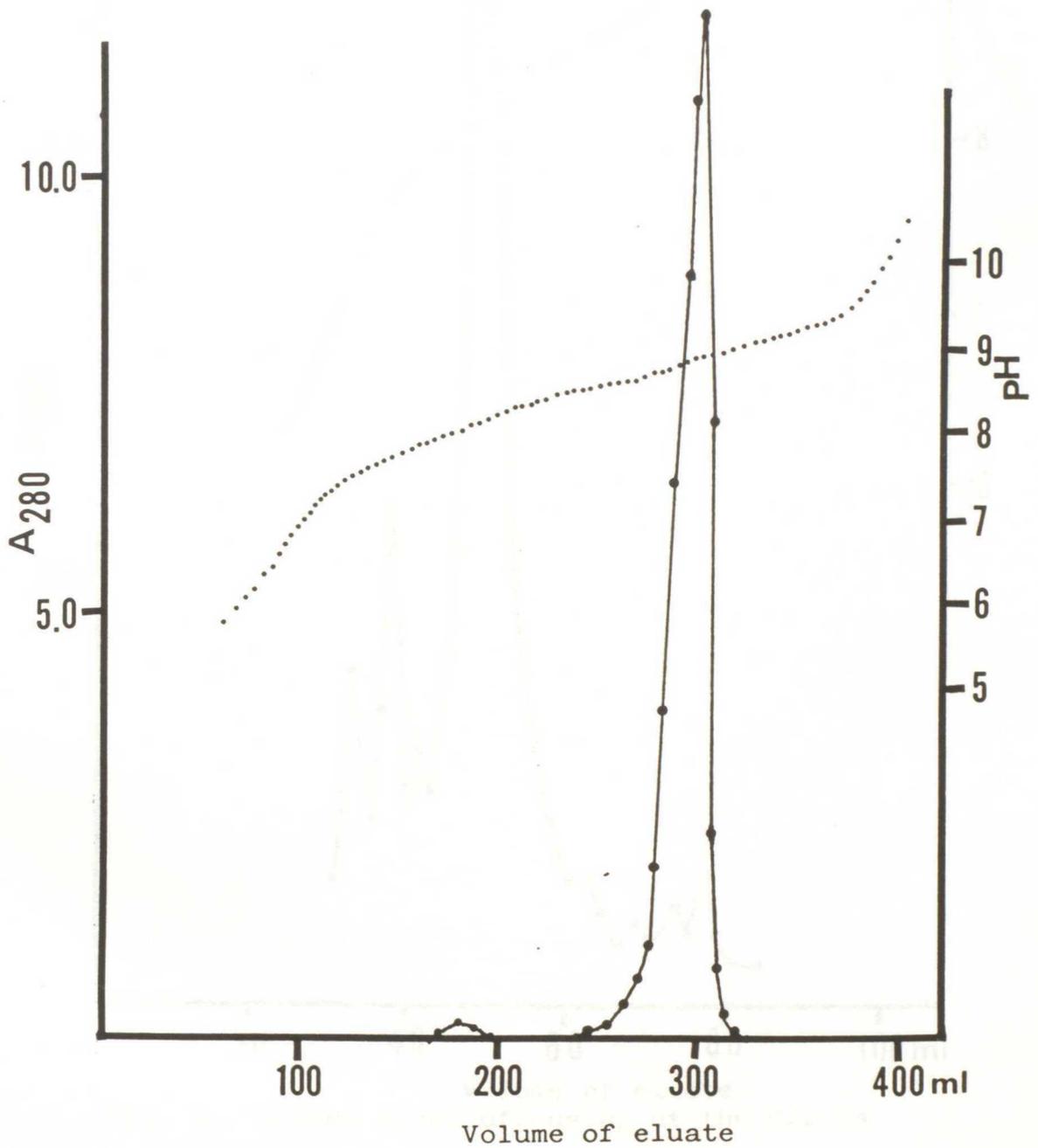


Fig. 4. Column electrofocusing of the GFr.B obtained as shown in Fig.2.

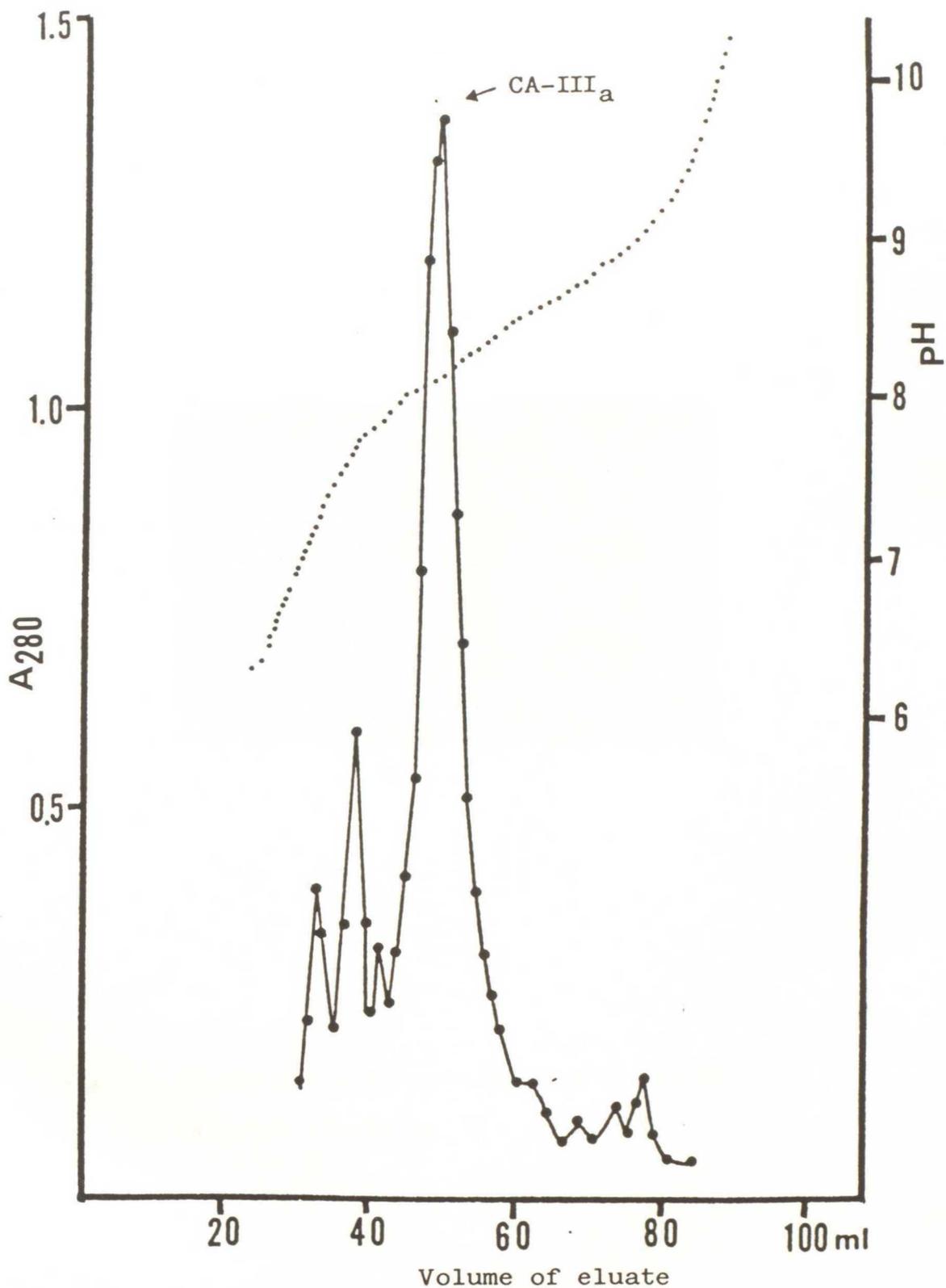


Fig. 5. Column electrofocusing of the GFr.Ba obtained as shown Fig.3.

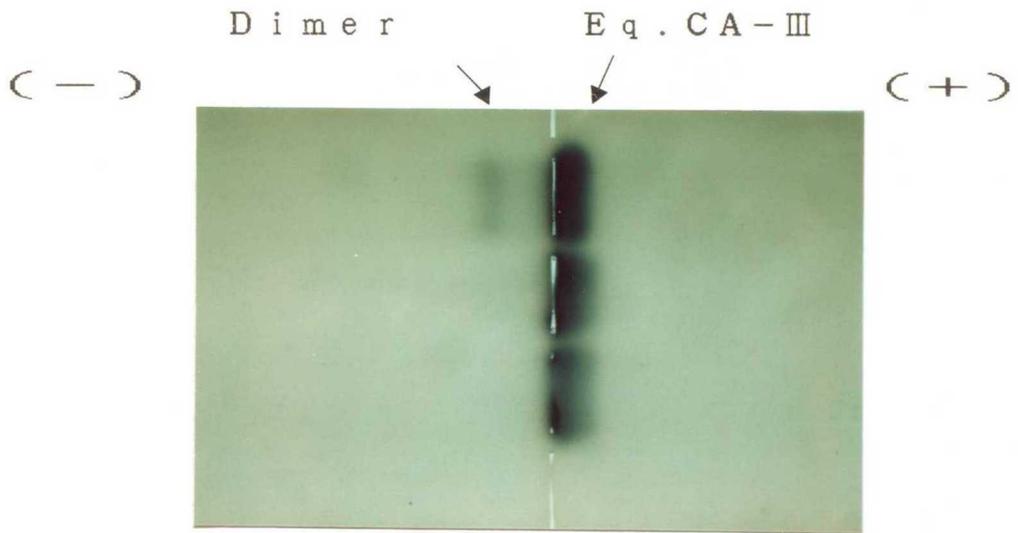


Fig. 6. Starch gel electrophoretogram of equine carbonic anhydrase III.

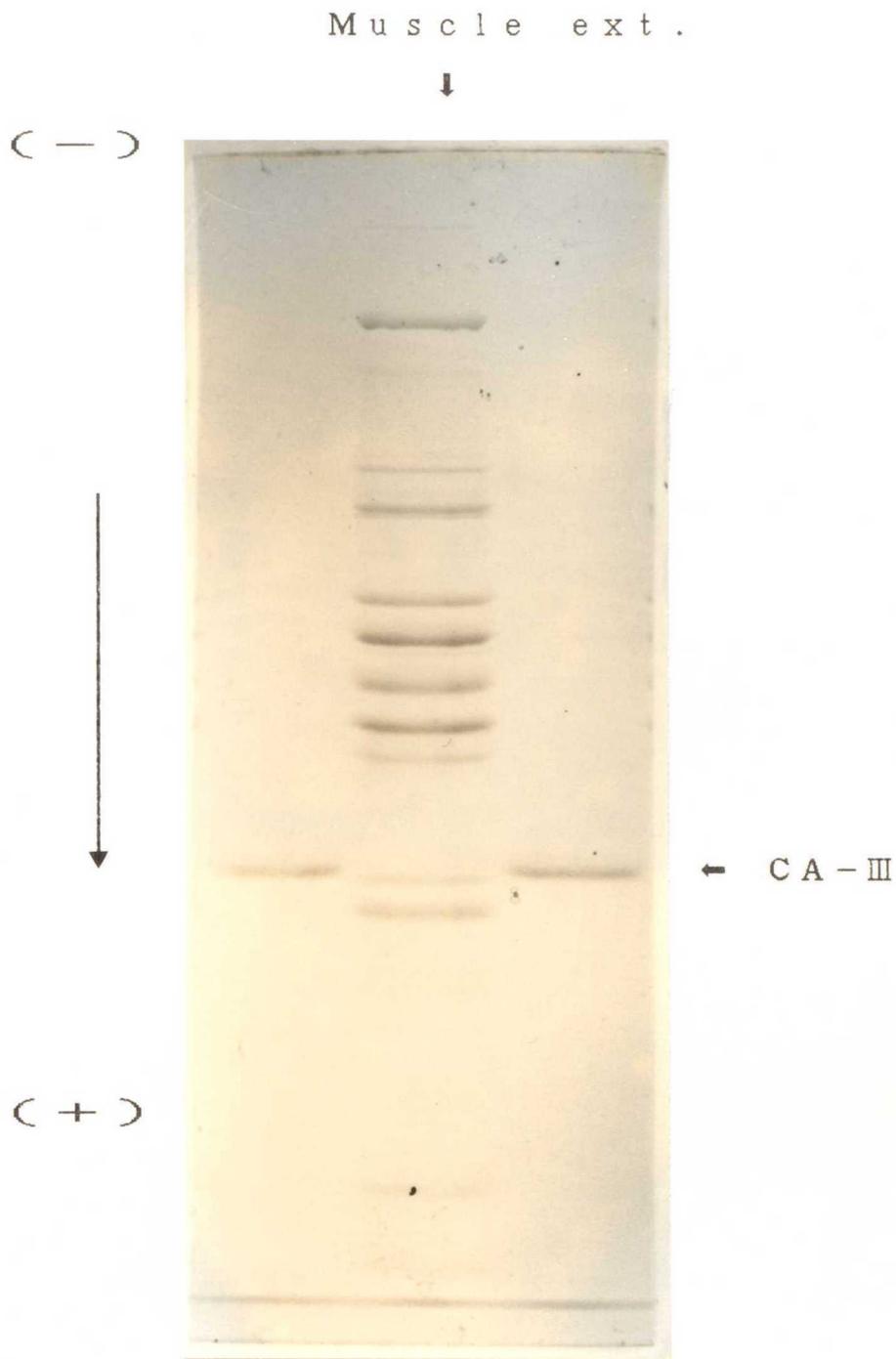
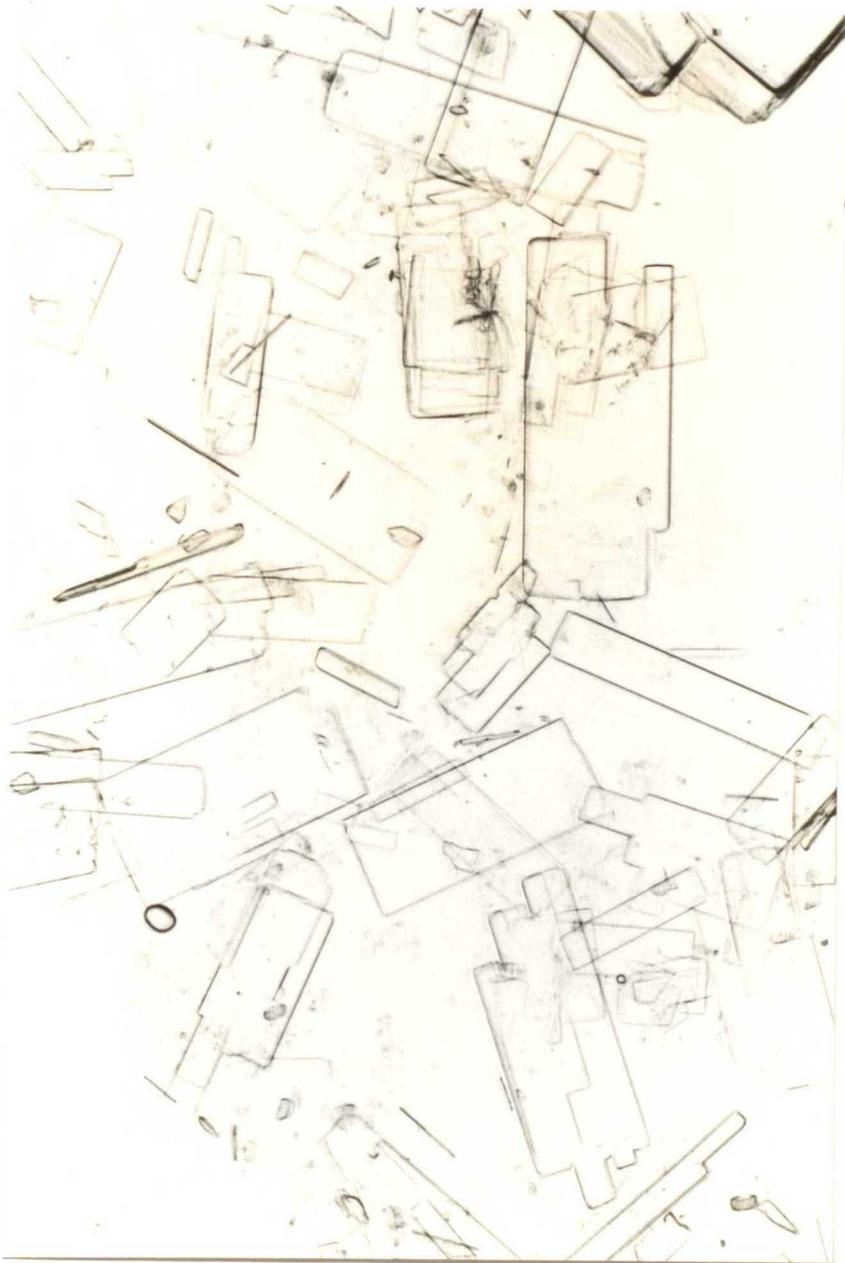


Fig. 7. 12.5 % SDS-PAGE patterns of purified equine CA-III and equine muscle extract.



325X

Fig. 8. Crystallized equine carbonic anhydrase III.

果、1 mg当り CA-I. 3,400単位、CA-II. 36,000単位、CA-III. 485 単位、CA-IIIa. 190 単位であった [Table 1]。

エステラーゼ活性は、p-NPB を基質とした場合 CA-I. 0.173単位、CA-II. 0.495 単位、CA-III. 0.041単位であった。基質に p-NPAを用いると、CA-I. 4.20 単位、CA-II. 6.68 単位、CA-III. 0.065 単位であった [Table 2]。

アルカリフォスファターゼ活性は CA-I. 0単位、CA-II. 0 単位、CA-III. 0.12単位であった。酸性フォスファターゼ活性は、CA-I. 0.136単位、CA-II. 0.15単位、CA-III. 0.143 単位であった [Tble 3]。

B. アミノ酸組成

CA-III及び CA-IIIa のアミノ酸組成の分析結果を Table 4に示した。アルキル化した CA-III、CA-IIIa のカルボキシメチルシステイン (CMC)はそれぞれ2個であった。CA-IIIと CA-IIIa を 6 M尿素中で再度アルキル化した場合、CMC はそれぞれ4個検出された。

Ellman反応でシステインを測定すると CA-IIIは2個、CA-IIIa は1個検出された。

トリプトファンを分光学的に定量すると、CA-IIIでは9個、CA-III aでは8個検出された。CA-IIIのアミノ酸総数は 257残基、CA-III aは 258残基と算出された。

C. CA-IIIの吸光係数

CA-IIIの吸収スペクトルを Fig. 9 に示した。その結果から CA-IIIの極大吸収の波長は280 nmであった。CA-III 1% 溶液の吸光度は 280 nmの波長において 15.5 と算出された [Table 5]。

D. CA-IIIの分子量

ゲル濾過法で分子量を測定すると、ボイド容積 (V_0) は 100.73 で各分子マーカーの溶出容積 (V_e/V_0)は、 α -キモトリプシン 2.235、オボアルブミン2.078、Ig G 1.850、フェリチン 1.669であった。以上の数値から検量線 Fig.10 を作成した。CA-IIIの V_e/V_0 は 2.205であったことから、CA-IIIの分子量は 27.000 と推定した。

12.5 % SDS-PAGE の結果を Fig.11,12 に示した。その結果から、CA-IIIの分子量は 26,500 と計算され、さらに単量体であることが判明した。

E. CA-IIIの亜鉛含有量

亜鉛の標準検量線を 0.01 ppm, 0.2 ppm, 0.3 ppm, 0.4 ppm の値を用いて作成し、5.46 nmolの CA-IIIに含まれる亜鉛の量を測定した結果 3.36 nmolの亜鉛が検出された。

Table 1.

Molecular weight, isoelectric point and activity of equine carbonic anhydrase I, II and III.

Equine CA Isozymes	Molecular weight	Isoelectric point	Activity (Units/mg) ^c
CA-I (D) ^a	28,400	5.67	3,400
(B)	27,700	7.08	2,900
(A ₁)	28,400	6.49	3,100
(A ₂)	29,200	6.22	2,600
(T)	27,900	5.12	2,800
CA-II(C ₁) ^b	27,800	9.63	36,000
(C ₂)	27,800	9.00	36,000
(C ₃)	27,800	8.52	36,000
CA-III	27,000	8.90	485
CA-IIIa	27,000	8.10	190

a) Deutsch et al. (21)

b) Deutsch et al. (23)

c) Willbur and Anderson Units (108)

Table 2. The esterase activity of equine carbonic anhydrase isozymes.

Isozyme	Substrate ^{a)}	Activity ($\Delta 420\text{nm}/\text{min}/\text{mg}$)	Relative activity
III	p-nitrophenyl butyrate	0.041	1X
II	p-nitrophenyl butyrate	0.495	12X
I	p-nitrophenyl butyrate	0.173	4X
III	p-nitrophenyl acetate	0.065	1X
II	p-nitrophenyl acetate	6.680	103X
I	p-nitrophenyl acetate	4.200	65X

a) The substrate concentration was 1 mM.

Table 3. The phosphatase^{a)} activity of equine carbonic anhydrase isozymes.

Isozyme	Conc. Enzyme (mg / ml)	Buffer ^{b)}	pH	$\Delta 420\text{nm}$ ^{c)}
III	1.00mg	DEMA (0.01M)	8.0	0.120
III	2.00mg	NaAc (0.01M)	5.0	0.143
II	0.75mg	DEMA (0.01M)	8.0	0
II	1.50mg	NaAc (0.01M)	5.0	0.15
I	0.50mg	DEMA (0.01M)	8.0	0
I	1.00mg	NaAc (0.01M)	5.0	0.136

a) The initial concentration of the p-nitrophenyl phosphate substrate was 1 mM.

b) The buffers employed were diethylmalonic acid (DEMA) and sodium acetate (NaAc).

c) Absorbance change after 4 hrs at 37°C.

Table 4. Amino acid contents of crystalline equine CA-III and CA-IIIa.

Amino Acid	CA-III		CA-IIIa	
	Residues/ Mole	Integral No. Residues	Residues/ Mole	Integral No. Residues
Cystein ^(a)	3.80	4	3.70	4
Aspartic Acid	28.00	28	26.89	27
Threonine	15.30	15	12.75	13
Serine	15.60	16	16.40	16
Glutamic Acid	20.10	20	19.85	20
Proline	20.01	20	22.35	22
Glycine	19.70	20	21.90	22
Alanine	15.60	16	16.52	17
Valine	14.80	15	14.33	14
Methionine	0.89	1	0.80	1
Isoleucine	8.27	8	8.48	8
Leucine	21.94	22	22.99	23
Tyrosine	8.60	9	9.13	9
Phenylalanine	10.81	11	10.58	11
Histidine	12.43	12	11.00	11
Lysine	17.50	18	17.66	18
Arginine	13.70	14	13.69	14
Tryptophan ^(b)	8.90	9	7.90	8
Total		257		258

(a) Samples of CA-III and CA-IIIa were alkylated at pH 8.5 in the presence of 6M Urea.

(b) Tryptophan was determined by the spectrophotometric method of Bencze and Schmid.(6)

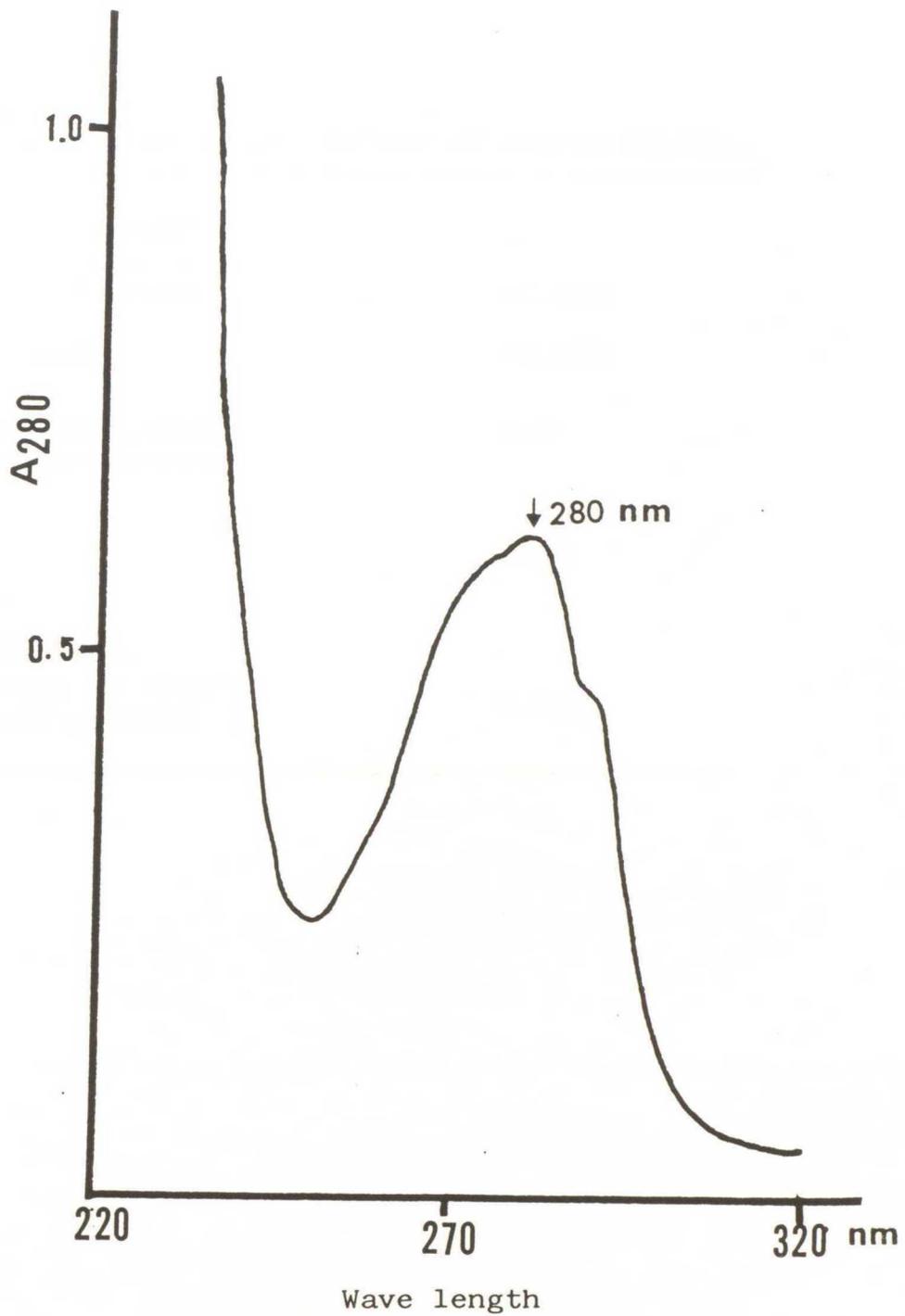


Fig. 9. Ultraviolet spectrum of equine CA-III in the ranges 220-320 nm.

Table 5.
Summary of general properties of equine CA-III.

Molecular weight

Gel filtration 27,000

SDS-PAGE 26,500

Isoelectric point

8.9

1%
E₂₈₀

15.5

Zinc content

(g atoms of zinc/
mole of protein)

0.165

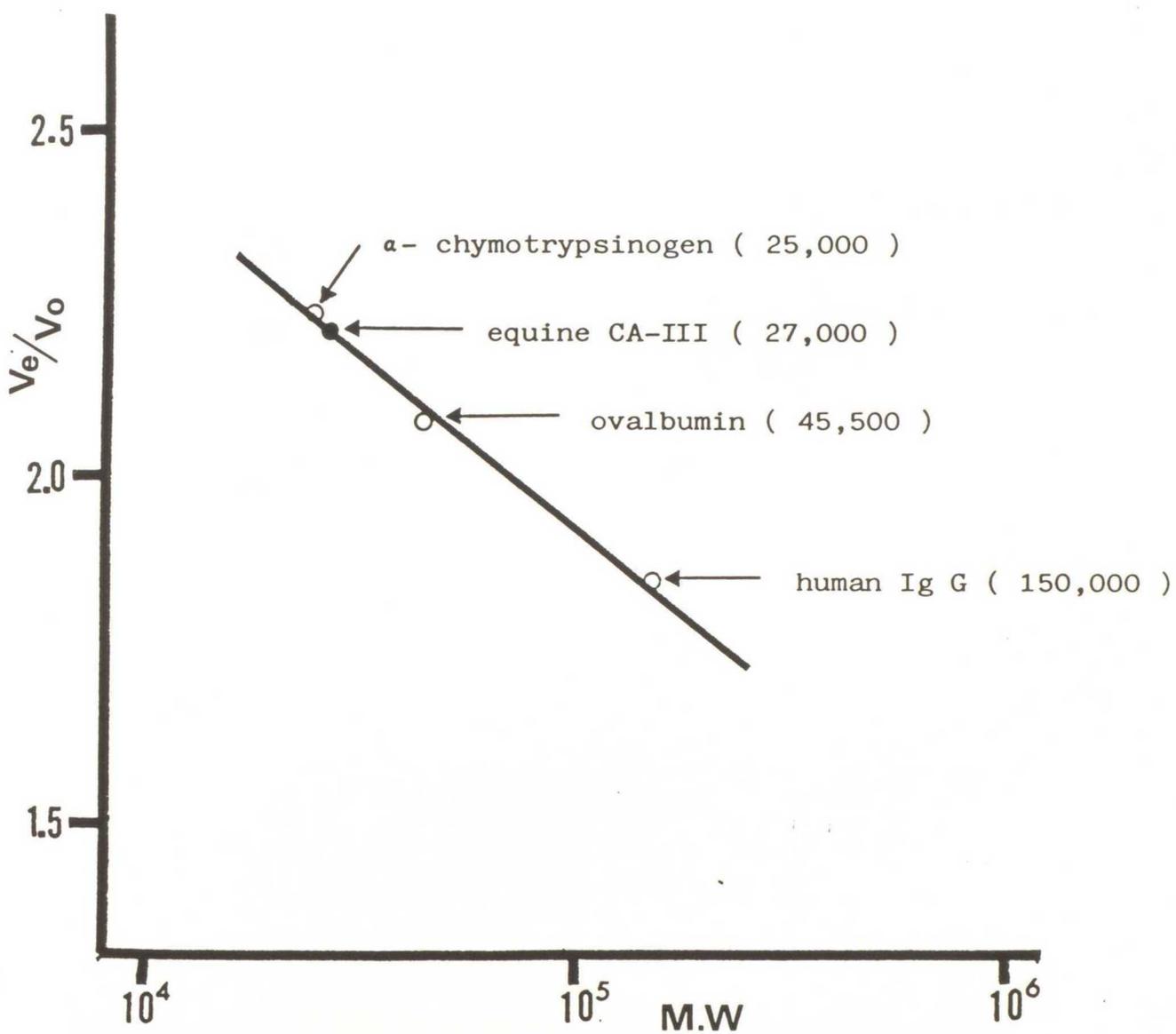


Fig. 10. Estimation of molecular weight from the exclusion volume on Sepharose CL-6B.

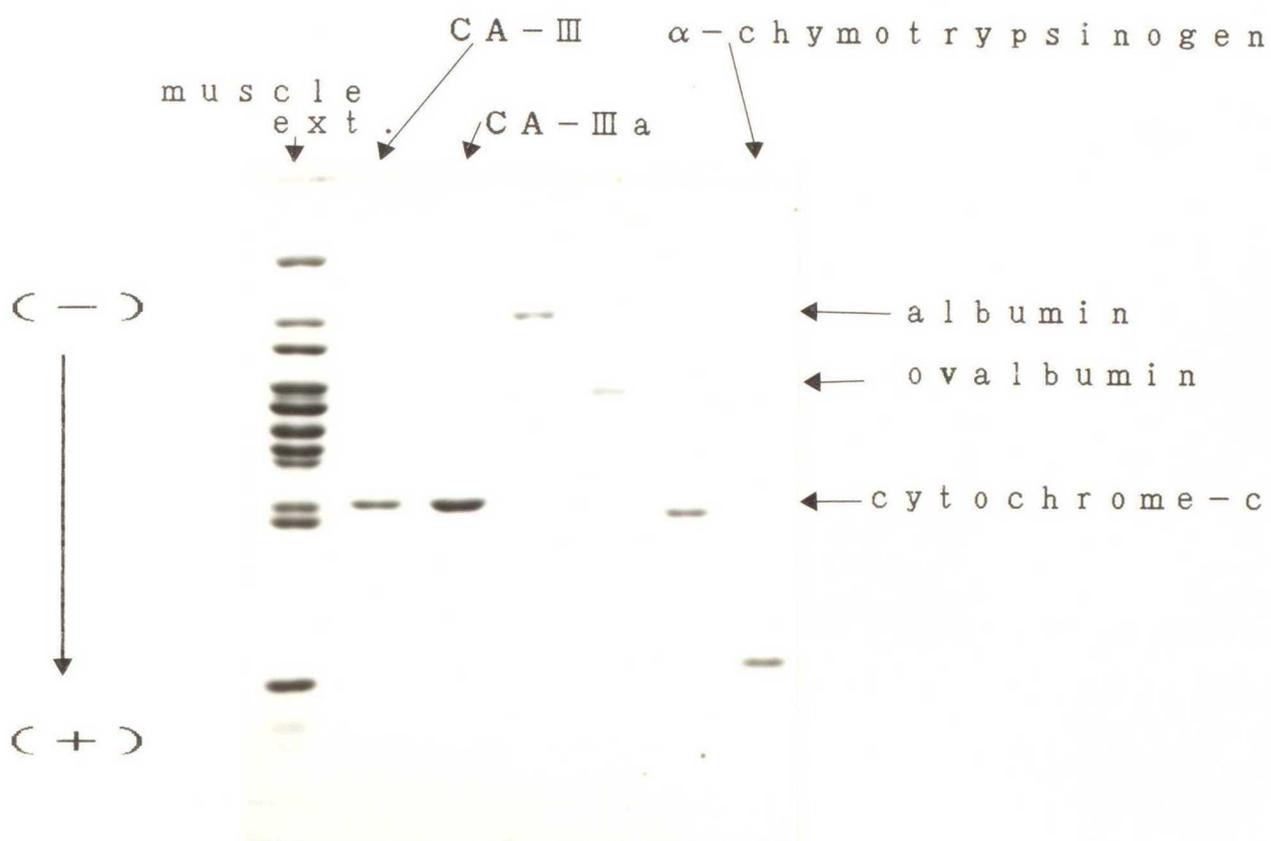


Fig. 11. 12.5 % SDS-PAGE patterns of purified equine CA-III, CA-IIIa, muscle extract and several molecular weight markers.

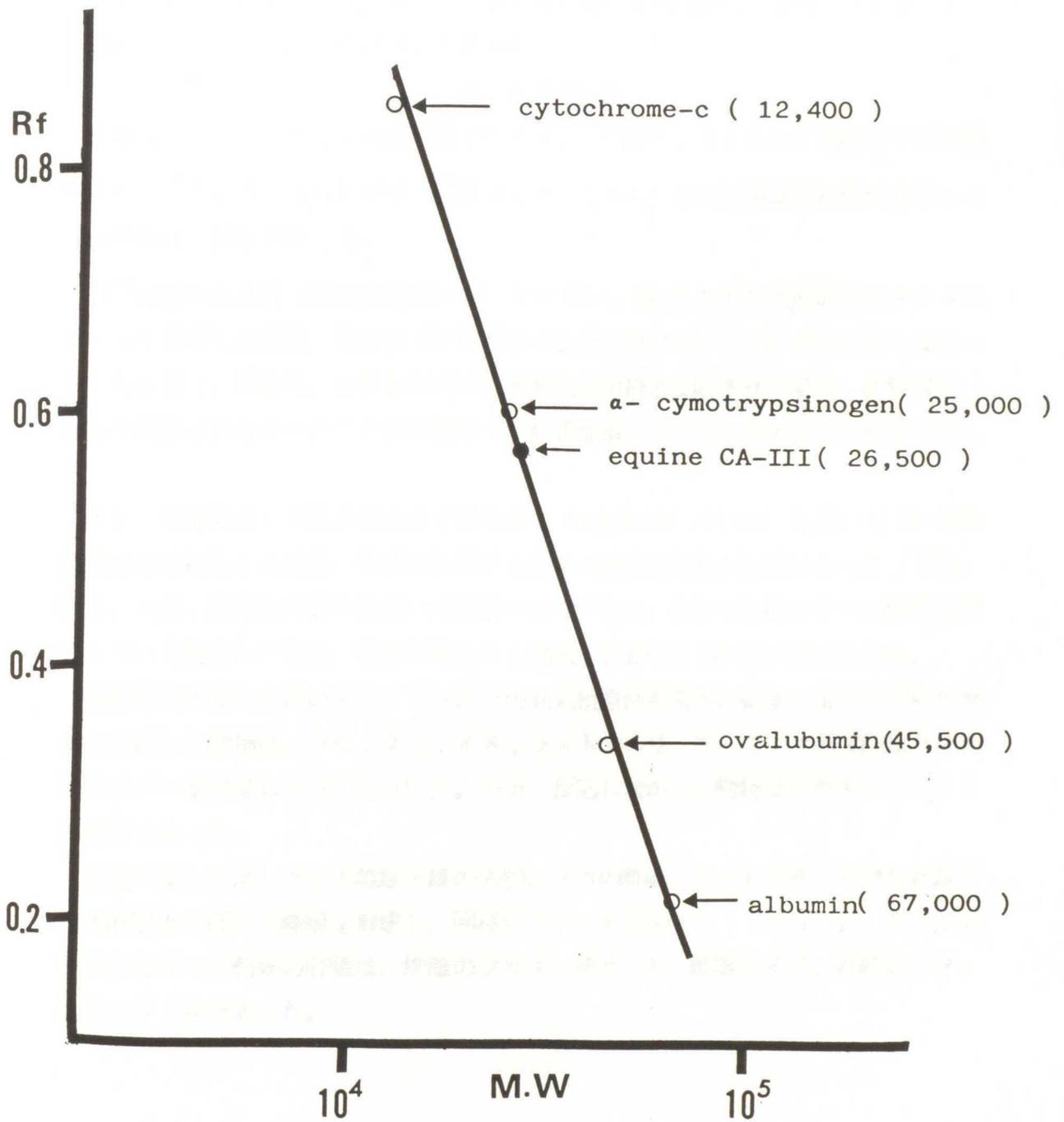


Fig. 12. Molecular weight estimation of equine CA-III (●) by means of SDS-PAGE.

○ : marker proteins.

F. CA-Ⅲの熱安定性

CA-ⅢのCO₂水和活性は50℃、5分間加熱すると145単位に低下し、60℃、5分間で活性は完全に失われた。

エステラーゼ活性は、100℃、5分間の加熱を行っても活性の低下は認められなかった。また、100℃5分間加熱後、変性蛋白質を遠心分離し上清のエステラーゼ活性を測定したところ活性値は皆無であった。

Ⅲ-3 : CA-Ⅲの免疫化学的性質

精製したウマ CA-Ⅲを1週間間隔でウサギに7回免疫したところ1羽のウサギは抗体価が 10^4 となり、他の6羽は 10^5 に達した。しかし、それ以後は追加免疫を行っても抗体価は上昇しなかった。

10^{-5} の抗体価を持つ抗血清を用いて、ウマ CA-I, CA-IIとの交叉反応性をオクタロニー法で検索した結果、抗ウマ CA-Ⅲウサギ血清とウマ CA-I, CA-IIは反応しなかった [Fig.13]。同様に、オクタロニー法で筋肉抽出液と反応させた場合、沈降線は1本しか観察されなかったことから抗ウマ CA-Ⅲ血清の CA-Ⅲに対する特異性を確認した。

次に、23種類のウマ臓器抽出液と赤血球の Tuchiashi extract を用いて CA-Ⅲの臓器分布を検索した結果、明瞭な沈降線を認めた臓器は筋肉と肝臓であった [Fig.14]。一方、胸腺との間には弱い沈降線が検出された。さらに雌雄のウマの筋肉と肝臓について検索した結果、性差に関係なく筋肉と肝臓中に CA-Ⅲが検出された。

他種動物の筋肉を用いてウマ CA-Ⅲとの共通抗原性を調べた結果、抗ウマ CA-Ⅲ血清と反応した動物は、ウシ、ネコ、イヌ、ラットであり、さらにウマの CA-Ⅲとの間にはスパーを形成した [Fig.15]。一方、反応しなかった動物はウサギ、ニワトリの筋肉であった。

肝臓に関しては、ウシの雌雄と雄の去勢、ネコの雌雄、ラットの雄、去勢した雄ブタの肝臓との間に沈降線を形成し、同様にスパーを形成した [Fig.16]。交叉反応を示さなかった動物の肝臓は、雄雌のウサギ、雌ラット、雄雌のイヌ、雄雌のブタ、雄のニワトリであった。

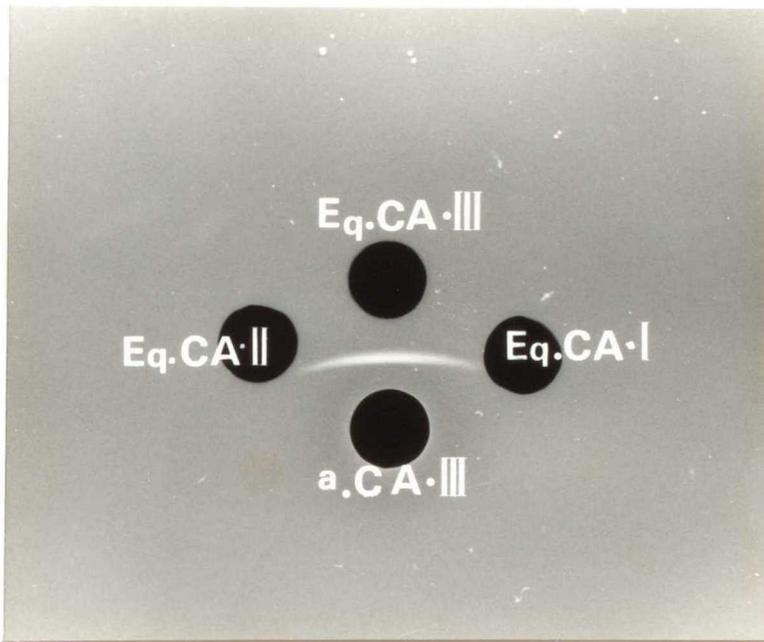


Fig. 13. Agar gel double diffusion experiment.

The antibody raised against equine CA-III produced only one precipitin line against equine CA-III but did not react with either equine CA-I or CA-II.

a : antiserum

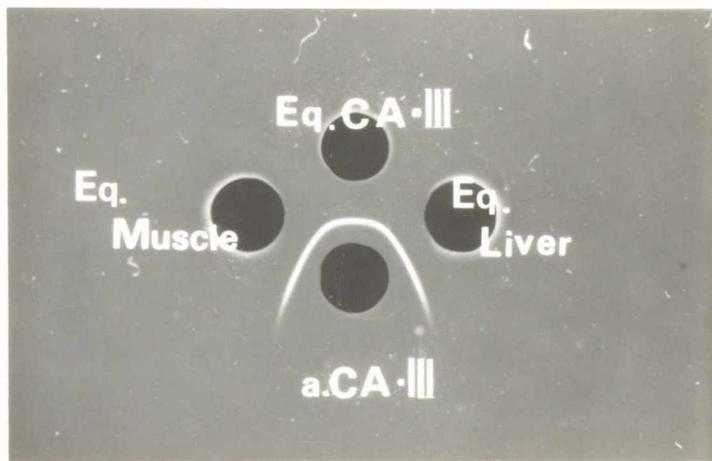


Fig. 14. Agar gel double diffusion experiment.

The antibody raised against equine CA-III produced single one precipitin line against crude equine muscle or liver extract. The two lines fused equine CA-III.

a : antiserum

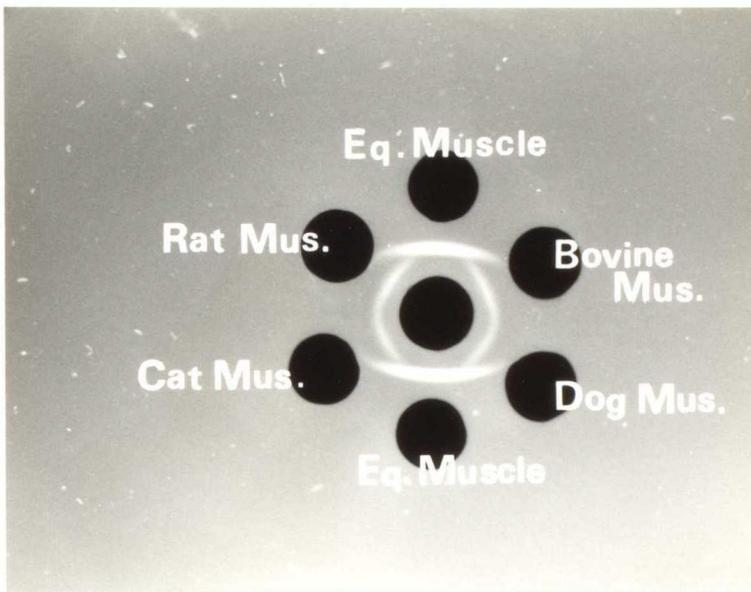


Fig. 15 . Agar gel double diffusion experiment.

The antibody raised against equine CA-III reacted with crude muscle extracts from cow, dog, cat and rat.

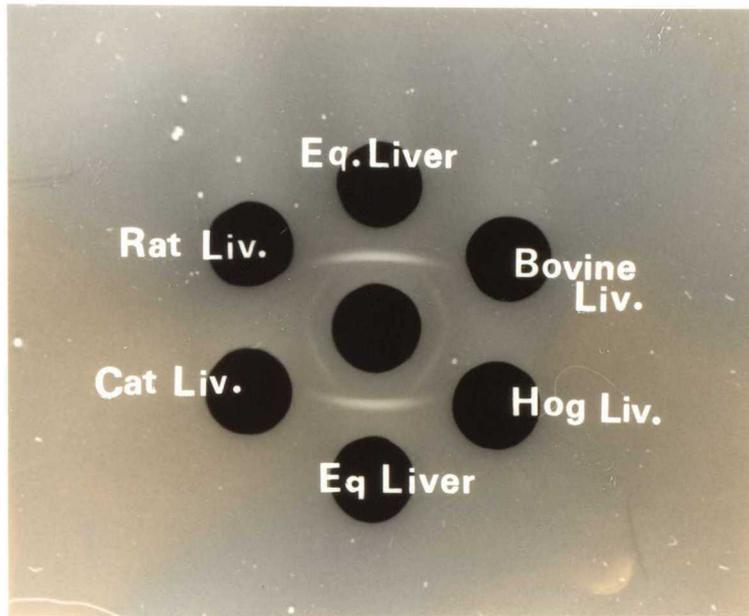


Fig. 16. Agar gel double diffusion experiment.

The antibody raised against equine CA-III reacted with crude liver extracts from cow, dog, cat and rat.

Ⅲ- 4 : 各臓器のCA-Ⅲ含有量と組織局在

A. 各臓器のCA-Ⅲ含有量

ウマの各種臓器中におけるCA-Ⅲの定量はEIA法で行った。既知濃度のCA-Ⅲから検量線を作成し [Fig.17]、被検材料のCA-Ⅲ濃度を算出した [Table 6]。

CA-Ⅲの含有量は、湿重量1gの筋肉中に530 μ g、肝臓中に300 μ g、胸腺中に16.5 μ gであった。その他の臓器については、平均57.3ngと極めて低値であった。

赤血球中には、ヘモグロビン1gが存在する溶血液中に319.2ngのCA-Ⅲが存在した。

B. CA-Ⅲの組織局在

ウマ筋肉の組織切片を用い、ペルオキシダーゼ標識抗ウマCA-ⅢIgGを直接法として用いてCA-Ⅲの筋肉組織の局在を調べた結果をFig.18に示した。筋肉線維は、強く染色される線維とわずかに染色される線維そして染色されない線維の3種類に分類され、ウマの中臀筋では染色されない線維の割合が一番多く存在した。

Ⅲ- 5 : CA-Ⅲのペプチドマップ

熱変性させたCA-Ⅲをトリプシンで分解しペプチドマップを作成すると、各ペプチドの蛍光スポットは26個検出された [Fig 19]。各スポットを抽出し、アミノ酸組成を分析した結果をTable 7に示した。CA-Ⅲをトリプシン分解して得たペプチドのC末端は、アルギニンもしくはリジンであった。アルギニンを含むペプチドは12個、リジンを含むペプチドは13個であった。ペプチドNo.10はリジンとアルギニンがそれぞれ1個ずつ含まれていることから、どちらかが切断されにくい状態にあったと考えられた。CMCが検出されたペプチドはNo.21とNo.4であった。

シトラコニール化したCA-Ⅲを脱シトラコニール化することなく熱変性させ、トリプシンで分解しペプチドマップを作成した。リジンはシトラコニール化され、トリプシンで分解されないことから15個のペプチドが検出された [Fig.20]。各スポットを抽出してアミノ酸分析を行った結果をTable 8に示した。上記の2種類のペプチドマップで、共通したスポットは9個存在した。

アセチル化とカルバミル化をしたCA-Ⅲの各修飾体についてペプチドマップを作成したが、未修飾CA-Ⅲのペプチドマップとの違いは検出できなかった。

CA-Ⅲaをトリプシン分解後、ペプチドマップを作成した結果、No.25が消失した以外はすべて同じであった。

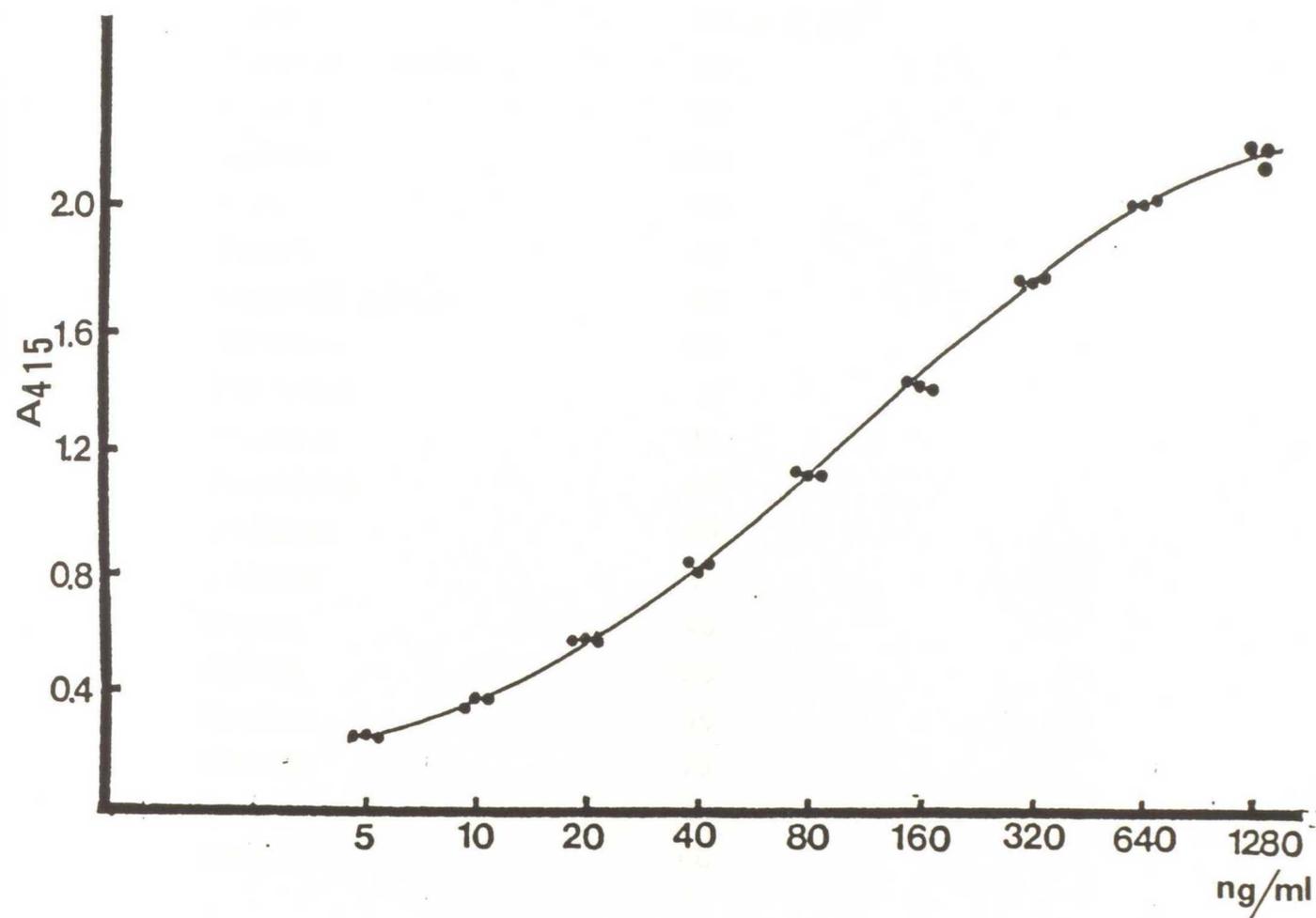
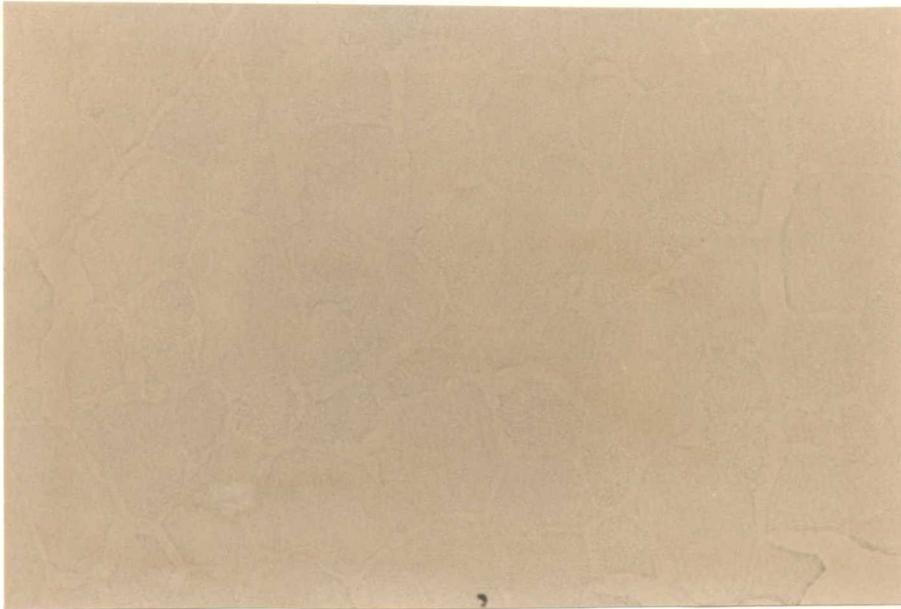


Fig. 17. Standard curve for enzyme immunoassay of equine carbonic anhydrase III.

Table 6. Content of carbonic anhydrase III in several equine tissues.

Tissues	ng / g wet tissue
Skeletal muscle	53 X 10 ⁴
Liver	30 X 10 ⁴
Thymus	16.5 X 10 ³
Cardiac muscle	79
Kidney	39
Spleen	123
Lung	73
Brain	47
Thyroid gland	48
Adrenal	99
Pancreas	0
Stomach	71
Duodenum	43
Jejunum	43
Illeum	37
Cecum	45
Colon	56
Rectum	56
Uterus	79
Ovary	46
Testis	60
Erythrocyte	319.2 ng/ g hemoglöbin



control

Fig. 18. Direct immunohistochemical detection of CA- III in equine skeletal muscle using peroxidase labelled anti CA-III antibody.

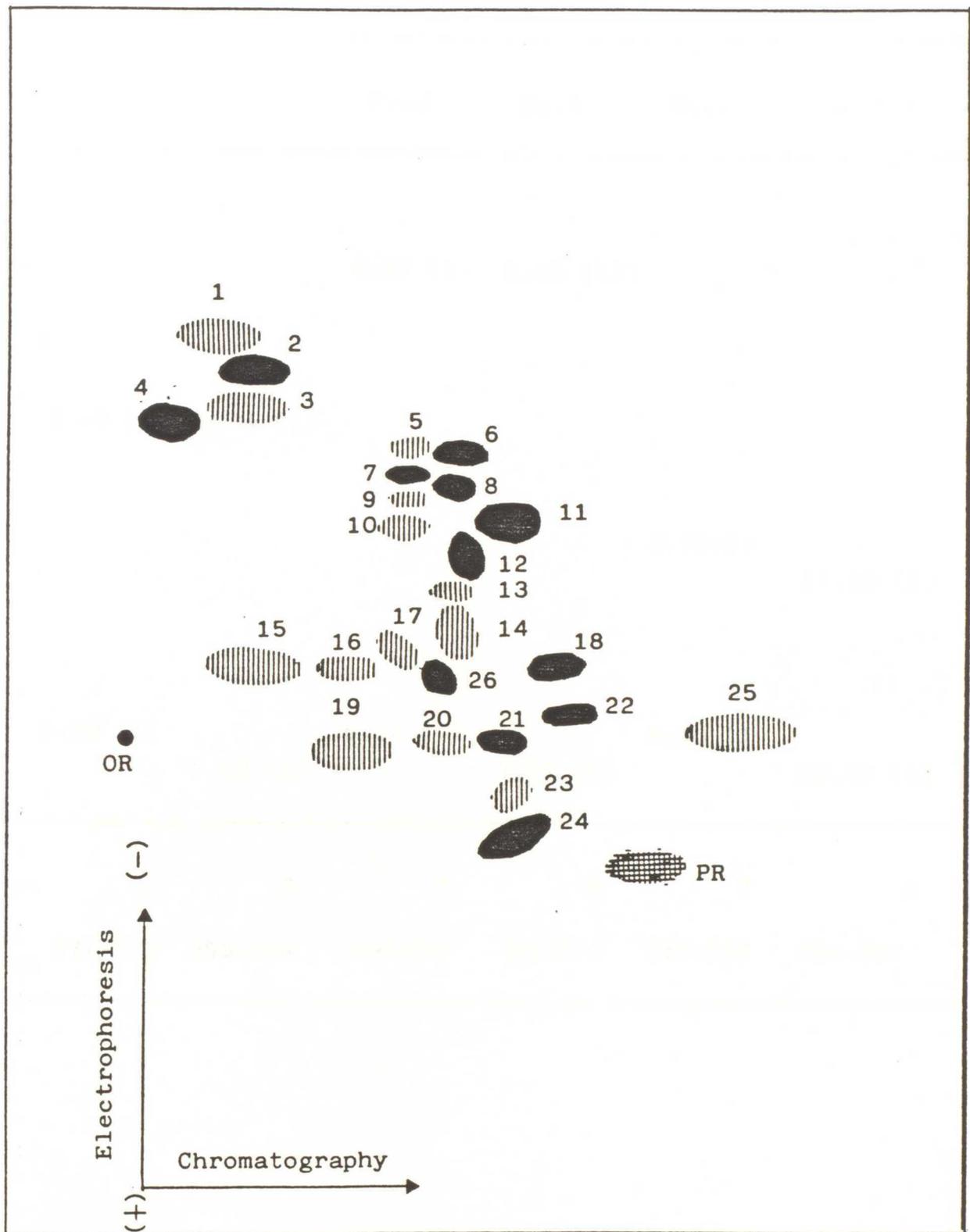


Fig. 19. Typical peptide map of tryptic digests of equine carbonic anhydrase III.

Table 7. Amino acid compositions of soluble tryptic peptides of equine carbonic anhydrase III.

Amino Acid	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
CMC						
ASP						
THR			4.92 (1)	2.35 (1)		
SER						
GLU						
PRO						
GLY	7.49 (1)	6.34 (1)				
ALA						
VAL						
ILE					3.79(1)	
LEU						11.20 (1)
TYR						
PHE						
HIS						
LYS	6.90 (1)		6.12 (1)		4.58 (1)	
ARG		7.03 (1)		3.57 (1)		10.30 (1)
No.of Residues	2	2	2	3	2	2
Residue Position	171-172	253-254	169-170	65-67	167-168	226-227

Table 7. Continued

Amino Acid	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12
CMC						
ASP				2.16 (1)		
THR						5.50(1)
SER			2.54 (1)		3.86 (1)	
GLU				3.24 (1)		
PRO				8.80 (3)		10.30(2)
GLY	2.56 (1)			3.08 (1)		12.11(2)
ALA			1.83 (1)			6.85(1)
VAL		5.98 (1)				
MET					4.40 (1)	
ILE	1.23 (1)					
LEU					5.38 (1)	6.04(1)
TYR						5.27(1)
PHE			1.65 (1)			
HIS						
LYS			1.75 (1)	2.59 (1)		
ARG	1.69 (1)	4.12 (1)		3.07 (1)	5.03 (1)	5.25(1)
No. of Residues	3	3	4	8	4	9
Residue position	150-152	255-257	258-261	244-254	77-80	81-89

Table 7. Continued

Amino Acid	No.13	No.14	No.15	No.16	No.17	No.18
CMC						
ASP	1.62 (1)	3.84 (1)	4.47 (2)	7.70 (3)	2.80 (1)	3.45 (1)
THR	1.32 (1)		1.98 (1)		2.08 (1)	3.86 (1)
SER			2.29 (1)	2.49 (1)	3.09 (2)	
GLU		2.71 (1)	4.89 (2)			
PRO		2.84 (1)	1.99 (1)	2.17 (1)	1.93 (1)	
GLY	3.37 (2)		2.43 (1)		2.88 (1)	
ALA	1.30 (1)	5.57 (2)			5.71 (3)	
VAL		2.11 (1)				
MET						
ILE			1.70 (1)	2.04 (1)		
LEU	1.46 (1)	5.34 (2)	1.92 (1)	2.22 (1)		
TYR	1.52 (1)	3.26 (1)			1.40 (1)	5.72 (1)
PHE						
HIS		5.40 (2)	2.15 (1)	2.37 (1)		
LYS	1.27 (1)	2.66 (1)	2.72 (1)	2.32 (1)	2.92 (1)	
ARG						3.51 (1)
No. of Residues	8	12	12	9	11	4
Residue Position	128-136	114-127	25-36	37-45	46-57	190-195

Table 7. Continued

Amino Acid	No.19	No.20	NO.21	No.22	No.23
CMC			2.22 (1)		
ASP	2.06 (1)	4.71 (3)	5.62 (2)	2.30 (1)	3.09 (2)
THR	1.69 (1)		4.15 (2)		
SER	3.35 (2)		2.21 (1)	4.80 (3)	
GLU	3.76 (2)	3.07 (2)	3.37 (1)	4.14 (2)	3.40 (2)
PRO	1.79 (1)	3.18 (2)	7.49 (3)	5.65 (3)	
GLY		3.66 (2)			1.68 (1)
ALA	1.94 (1)	3.35 (2)	3.20 (1)	2.19 (1)	1.57 (1)
VAL	2.83 (2)			3.28 (2)	3.40 (1)
MET					
ILE	1.58 (1)	1.33 (1)			
LEU			3.19 (1)	3.13 (2)	3.24 (2)
TYR		2.66 (2)			
PHE		1.61 (1)	6.67 (3)	1.58 (1)	2.38 (1)
HIS		3.89 (3)			
LYS	1.81 (1)	1.44 (1)			1.83 (1)
ARG			2.35 (1)	1.85 (1)	
No. of Residues	12	19	16	16	11
Residue Position	214-225	4-24	173-189	228-243	155-166

Table 7. Continued

Amino Acid	No.24	No.25	No.26
CMC			
ASP	6.70 (3)		3.38 (2)
THR	2.28 (1)	1.86 (2)	1.40 (1)
SER		1.38 (1)	
GLU		2.66 (2)	
PRO		2.26 (2)	
GLY			1.87 (1)
ALA			
VAL	3.40 (2)	1.50 (1)	
MET			
ILE		1.00 (1)	1.45 (1)
LEU		2.92 (2)	1.81 (1)
TYR	2.28 (1)		
PHE	2.03 (1)	1.66 (1)	
HIS			
LYS		1.25 (1)	
ARG	2.23 (1)		1.52 (1)
No. of Residues	9	13	7
Residue Position	68-76	196-213	58-64

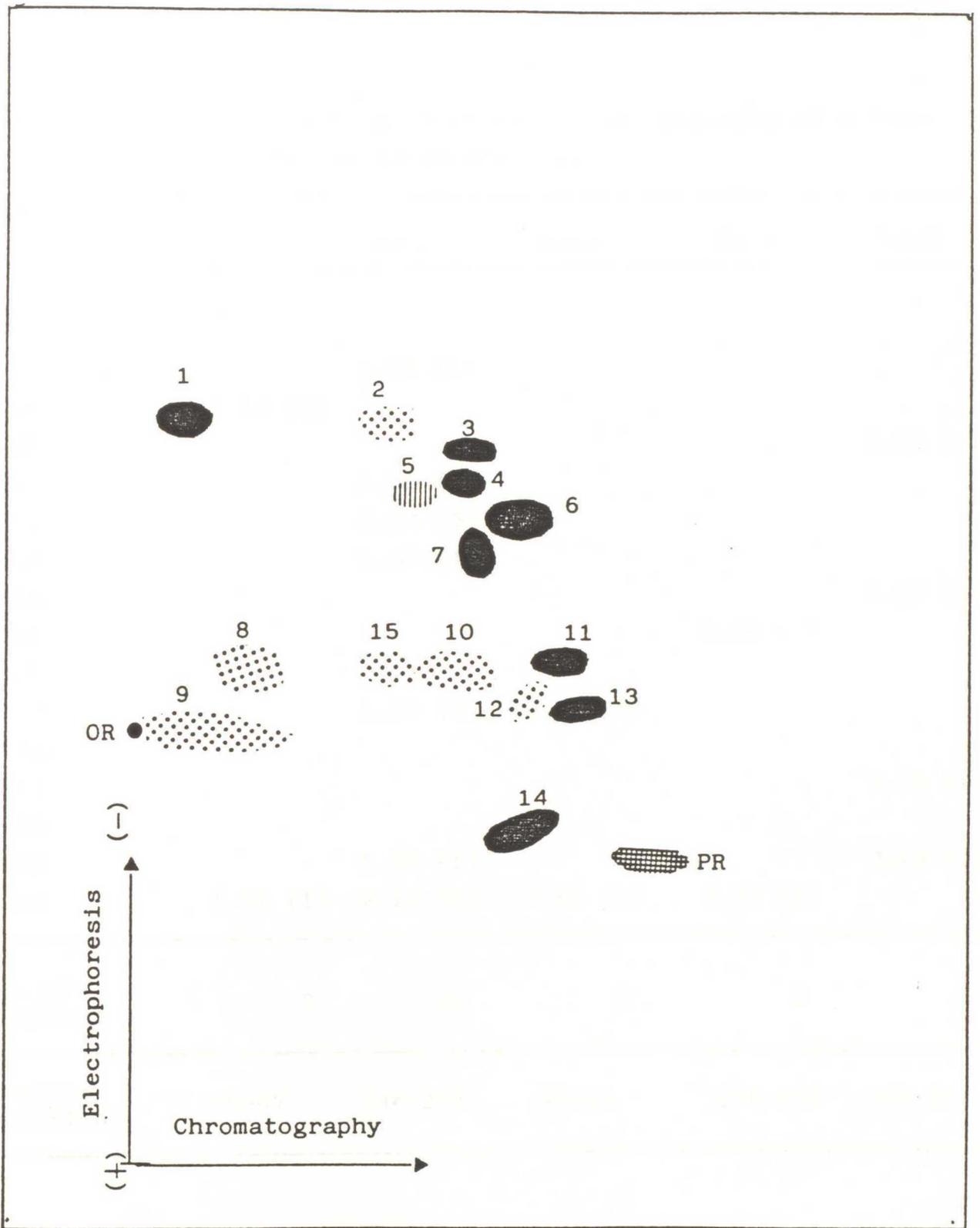


Fig. 20. Typical peptide map of tryptic digests of citraconylated equine carbonic anhydrase III.

Table 8. Amino acid compositions of tryptic peptides of citraconylated equine carbonic anhydrase III.

Amino Acid	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
CMC					
ASP		1.01 (1)			
THR	1.13 (1)				
SER					2.62 (1)
GLU		1.30 (1)			
PRO		3.14 (3)			
GLY		1.40 (1)			
ALA					2.77 (1)
VAL				5.30 (2)	
ILE					
LEU		1.10 (1)	4.17 (1)		
TYR					
PHE					2.78 (1)
HIS					
LYS		1.02 (1)			3.13 (1)
ARG	1.51 (1)	2.12 (2)	4.65 (1)	3.73 (1)	
No. of Residues	2	10	2	3	4
Residue position	65-67	244-254	90-91	255-257	258-261

Table 8. Continued

Amino Acid	NO.6	No.7	No.8	No.9	No.11
CMC					
ASP			5.34(10)	4.50 (6)	3.10 (1)
THR		4.78 (1)	1.44 (3)	1.57 (2)	3.27 (1)
SER	3.41 (1)		1.99 (4)	2.27 (3)	
GLU			2.26 (4)	3.18 (5)	
PRO		11.30 (2)	2.55 (5)	1.59 (2)	
GLY		10.54 (2)	2.78 (5)	5.71 (8)	
ALA		5.08 (1)	2.37 (5)	2.71 (4)	
VAL				3.69 (5)	
MET	4.33 (1)				
ILE			1.70 (4)	1.58 (2)	
LEU	4.77 (1)	5.23 (1)	1.50 (3)	3.80 (5)	
TYR		4.20 (1)	1.15 (2)	1.67 (2)	5.84 (2)
PHE			0.53 (1)	1.41 (2)	
HIS			2.53 (5)	3.46 (5)	
LYS			2.17 (4)	2.54 (4)	
ARG	5.10 (1)	5.56 (1)	0.62 (1)	0.90 (1)	3.90 (1)
No. of Residues	4	9	55	56	4
Residue position	77-80	81-89	4-64	92-152	190-195

Table 8. Continued

Amino Acid	No.12	NO.13	No.14	No.15
CMC				
ASP	1.20 (2)	3.24 (1)	15.00 (3)	5.16 (10)
THR	1.91 (3)		4.70 (1)	1.41 (3)
SER	2.07 (3)	6.87 (3)		1.95 (4)
GLU	3.04 (4)	6.29 (2)		2.32 (5)
PRO	2.17 (3)	8.86 (3)		2.60 (5)
GLY	1.43 (2)			2.71 (5)
ALA	1.00 (1)	2.77 (1)		2.92 (6)
VAL	1.89 (3)	5.64 (2)	8.16 (2)	
MET				
ILE	1.23 (2)			1.71 (3)
LEU	2.90 (4)	6.53 (2)		1.50 (3)
TYR			4.82 (1)	1.19 (2)
PHE	0.84 (1)	2.80 (1)	5.51 (1)	0.70 (1)
HIS				2.57 (5)
LYS	1.60 (2)			2.56 (5)
ARG	0.90 (1)	2.89 (1)	6.35 (1)	0.57 (1)
No. of Residues	31	16	9	58
Residue position	196-227	228-243	68-76	1-64

Ⅲ-6 : CA-Ⅲのアミノ酸配列

A. ブロムシアンによる CA-Ⅲの切断と分画

ブロムシアンにより切断したペプチドをセファクリルS-200 カラムクロマトグラフィーで分画した結果を Fig.21 に示した。分画されたペプチドは3峰の他に、最初に溶出されるブルーデキストランの1峰が存在した。Fr. II (CNBr II)の Edman分解を行って、N末端の測定を行ったがN末端がブロックされているために検出できなかった。CN Br I 峰の左側は分解されなかった CA-Ⅲが含まれている可能性があるのので右側を集め、自動 Edman分解を行った。未分解の CA-ⅢはN末端がブロックされているために、その混入は問題なく CN Br IのN末端からアミノ酸配列を逐次決定できた。CN Br I のアミノ酸配列の分析結果を Table 11 に示した。CN Br I は長鎖のペプチドのために21サイクル目からは自動分析できなかった。第1 サイクルのアミノ酸はロイシンであったが、その前に位置するアミノ酸はブロムシアンによって特異的に破壊されたメチオニンと断定できる。

CN Br IIIは分析できなかったが、CA-Ⅲはメチオニンを1残基しか含まないことからこの切断は非特異的に生じたものと考えられた。

B. トリプシンによる分解とペプチドの精製と分析

TPCK-トリプシンで CA-Ⅲを分解し Sephadex G-25で分画した結果を Fig.22 に示した。溶出された各ピークを8分画 (T I ~ T VIII)し、各ピークを用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でペプチドの精製を行った。精製したペプチドのアミノ酸分析値を Table 9に示した。T I , T IIの画分には長鎖のペプチドが含まれているために HPLC では精製不可能であった。精製されたペプチドについて、自動 Edman法でN末端から逐次決定したアミノ酸配列を Table 11 に示した。

C. α -キモトリプシン分解によるペプチドの精製と分析

α -キモトリプシンで分解した CA-Ⅲを AcA-202ウルトラゲルで分画した結果を Fig. 23 に示した。各画分 (Ch-IV ~ Ch- X)をさらに HPLC で精製することによりトリプシン分解で得ることのできなかったペプチドと、一部がオーバーラップすることにより一次構造決定に有効なペプチドを中心に検索した。精製したペプチドのアミノ酸分析値を Table 10 に示し、Edman自動分解により得た結果を Table 11 に示した。

D. ウマ CA-Ⅲのアミノ酸配列の決定

ウマ CA-Ⅲの各ペプチドのアミノ酸配列の結果をもとに、各ペプチドの組み合わせを作成し [Fig.24]、オーバーラップしないペプチドの順序はウシ CA-Ⅲの一次構

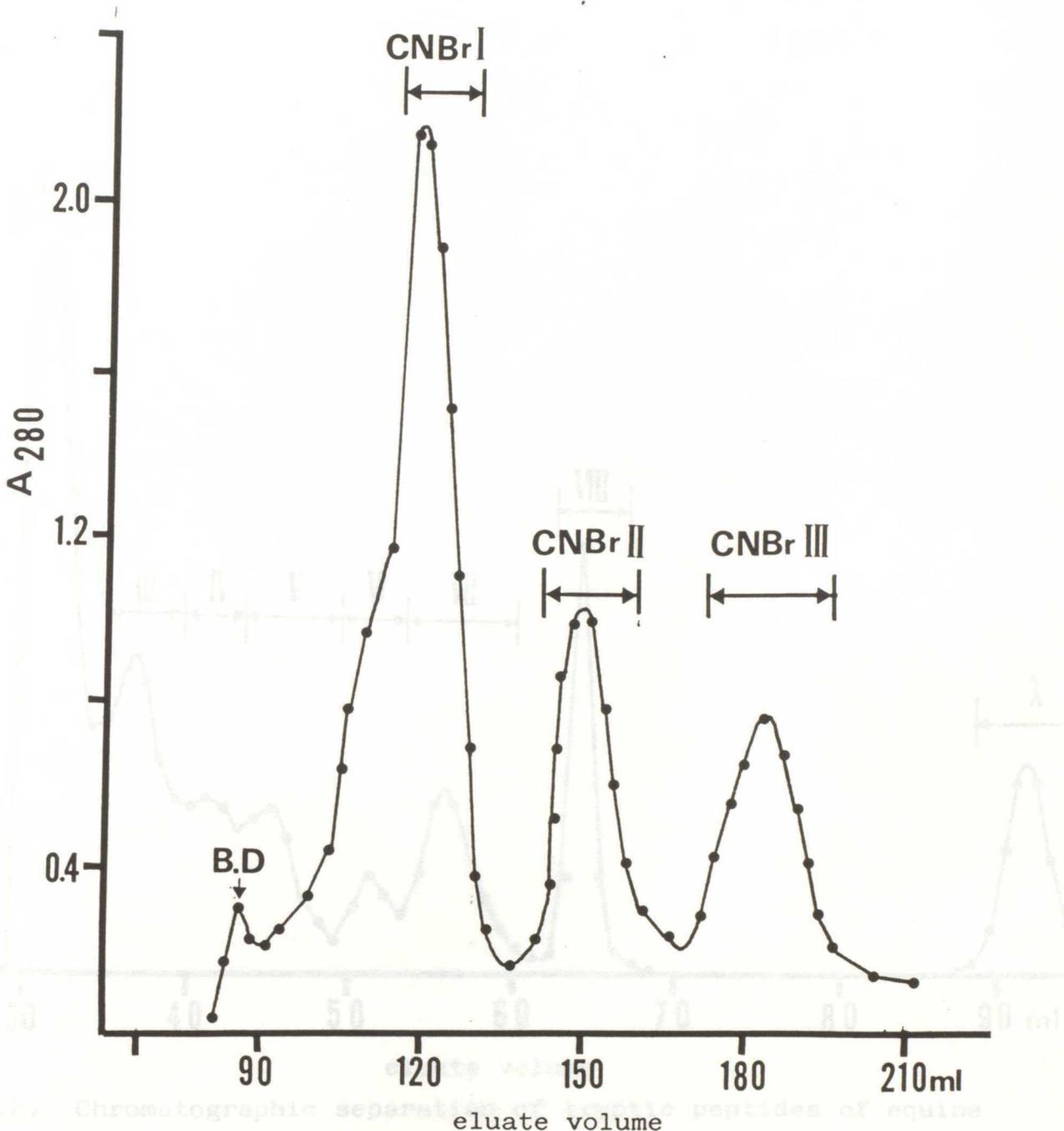


Fig. 21 Chromatographic separation of the cyanogen bromide cleavage products of equine carbonic anhydrase III on a column (1.6 X 163 cm) of Sephacryl S-200. elution rate : 6 ml /hr

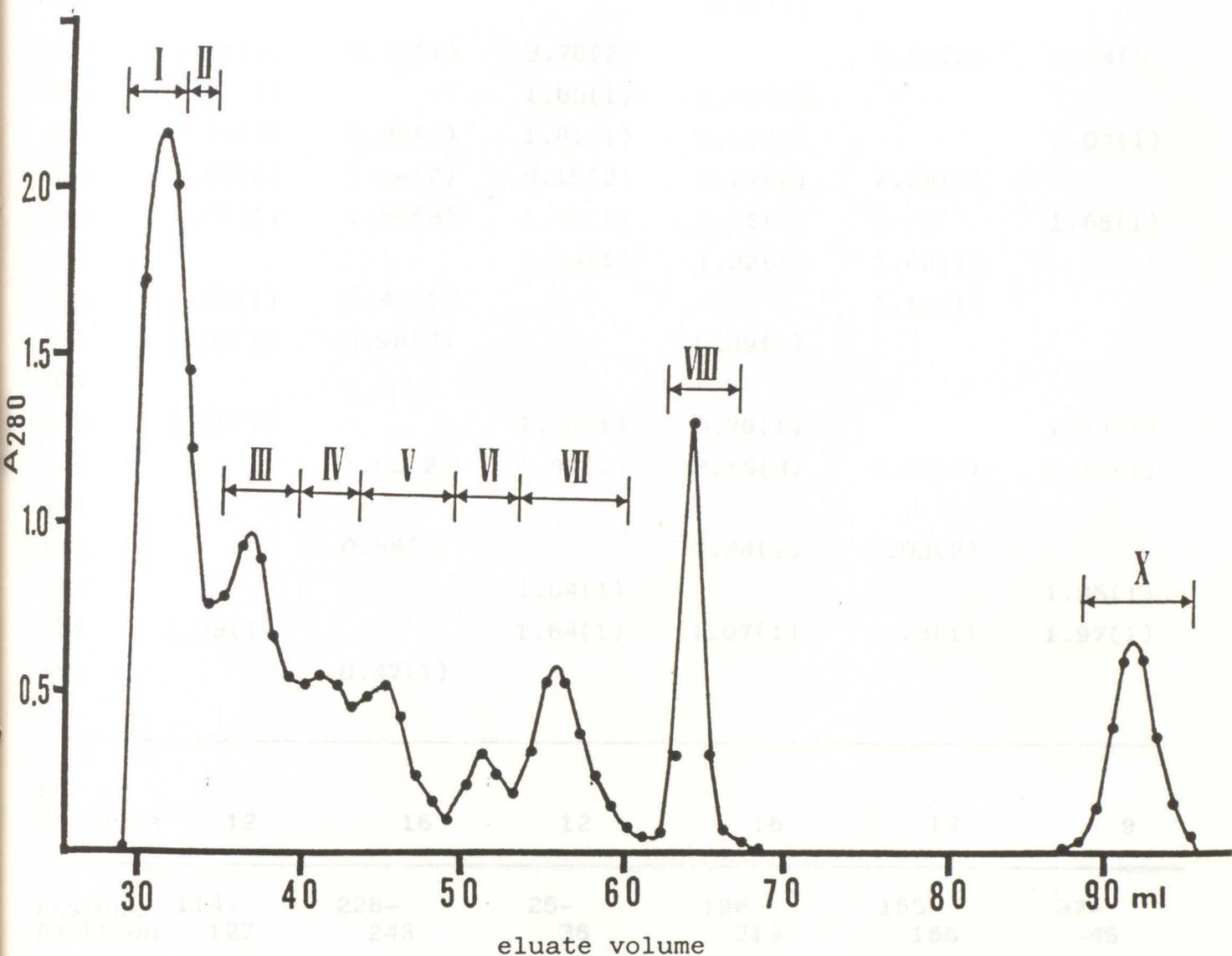


Fig.22. Chromatographic separation of tryptic peptides of equine carbonic anhydrase III on a 1.6 X 163 cm column of Sephadex G-25.

elution rate : 6 ml /hr

Table 9. Amino acid compositions of soluble tryptic peptides from equine carbonic anhydrase III.

Amino Acid	T III-1	T III-2	T III-3	T III-4	T IV-1	T IV-2
CMC				0.31(1)		
ASP	1.59(1)	0.68(1)	3.76(2)		2.06(2)	6.34(3)
THR	1.26(1)		1.65(1)	1.95(2)		
SER	2.10(2)	1.38(3)	1.81(1)	1.17(1)		2.04(1)
GLU	3.00(2)	1.14(2)	4.15(2)	2.27(2)	2.24(2)	
PRO	1.05(1)	1.50(3)	1.70(1)	1.76(2)		1.66(1)
GLY			2.64(1)	1.32(1)	1.42(1)	
ALA	1.47(1)	0.49(1)			1.15(1)	
VAL	2.33(2)	0.98(2)		0.89(1)		
MET						
ILE	1.25(1)		1.79(1)	0.79(1)		1.93(1)
LEU		1.05(2)	1.91(1)	3.15(3)	2.97(3)	2.10(1)
TYR						
PHE		0.58(1)		1.24(1)	2.03(2)	
HIS			1.64(1)			1.95(1)
LYS	1.39(1)		1.64(1)	1.07(1)	1.13(1)	1.97(1)
ARG		0.47(1)				
No. of Residues	12	16	12	16	12	9
Residue position	114-127	228-243	25-36	196-213	155-166	37-45

Table 9. Continued

Amino Acid	T V-1	T V-2	T V-3	T V-4	T VI-1	T VII-1
CMC			0.42(1)			
ASP	5.46(3)	4.16(3)	1.72(2)	1.05(1)	2.79(2)	
THR	1.73(1)	1.32(1)	1.50(2)	0.98(1)	1.23(1)	
SER		3.52(3)	0.91(1)			1.53(1)
GLU		2.93(2)	0.98(1)			
PRO			2.46(3)			
GLY		4.03(3)		1.70(2)	1.66(1)	
ALA			0.81(1)	1.04(1)		2.14(1)
VAL	3.17(2)	2.63(2)				
MET						
ILE					1.31(1)	
LEU		1.51(1)	0.82(1)	1.15(1)	1.69(1)	
TYR	1.15(1)			1.52(2)		
PHE	1.93(1)	1.39(1)	2.46(3)			2.13(1)
HIS		5.56(4)				
LYS		1.43(1)		1.03(1)		2.11(1)
ARG	1.76(1)		0.81(1)		1.41(1)	
No. of Residues	9	21	16	9	7	4
Residue position	68-76	92-113	173-189	128-136	58-64	258-261

Table 9. Continued

Amino Acid	T VII-2	T VII-3	T VII4	T VIII-1	T VIII-2	T X-1
CMC						
ASP	0.91(1)	0.82(1)		1.37(1)	1.95(3)	1.13(1)
THR	0.75(1)					1.08(1)
SER	1.40(2)		1.55(1)			
GLU		0.89(1)		1.36(1)	1.34(2)	
PRO	0.88(1)	2.34(3)		1.21(1)	1.37(2)	
GLY	0.77(1)				1.53(2)	
ALA	2.24(3)			2.73(2)	1.39(2)	
VAL				1.33(1)		
MET			1.36(1)			
ILE					0.63(1)	
LEU		0.90(1)	2.06(1)	2.71(2)		
TYR	0.41(1)			1.19(1)	1.07(2)	1.77(2)
PHE					0.70(1)	
HIS				2.54(2)	1.91(3)	
LYS	0.76(1)	0.91(1)		1.33(1)	0.75(1)	
ARG		0.84(1)	2.33(1)			1.14(1)
No. of Residues	11	8	4	12	19	5
Residue position	46-57	244-257	77-80	114-127	4-24	190-195

elution rate : 6 ml / hr

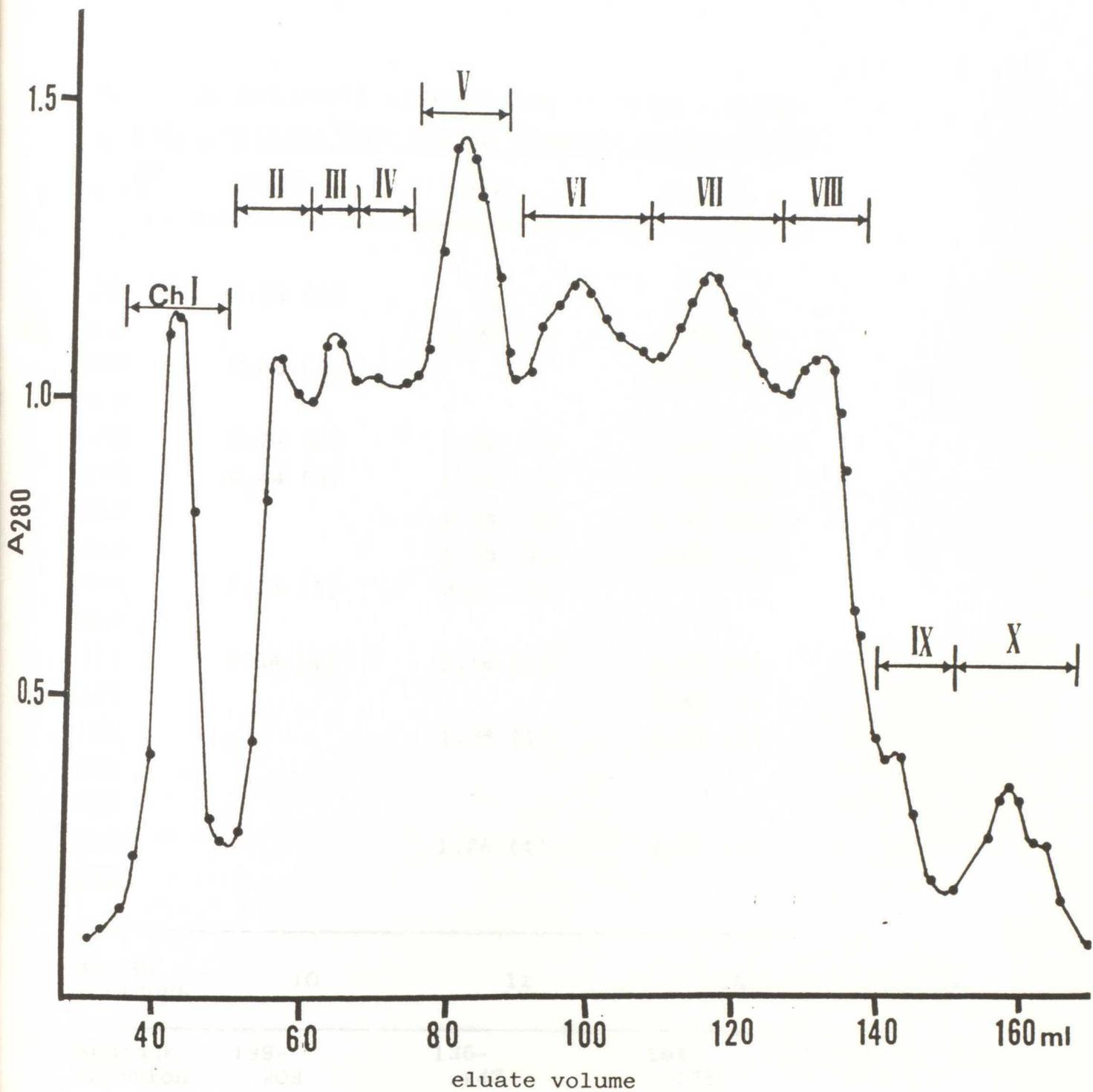


Fig. 23. Chromatographic separation of chymotryptic peptides of equine carbonic anhydrase III on column (1.6 X 163 cm) of Ultra gel AcA-200.

elution rate : 6 ml / hr

Table 10. Aminoacid compositions of soluble chymotryptic peptides from equine carbonic anhydrase III.

Amino Acid	Ch-IV	Ch-V	Ch-VII
CMC	1.69 (1)		
ASP		1.30 (1)	2.79 (2)
THR	3.68 (2)		1.34 (1)
SER			
GLU	3.79 (2)	1.31 (1)	1.48 (1)
PRO	4.44 (3)	1.74 (1)	1.25 (1)
GLY		2.54 (2)	1.49 (1)
ALA		1.55 (1)	2.63 (2)
VAL	1.59 (1)	3.62 (3)	
MET			
ILE	1.64 (1)	1.16 (1)	1.17 (1)
LEU			2.60 (2)
PHE		1.38 (1)	1.21 (1)
TYR			
HIS			
LYS		1.26 (1)	4.71 (4)
ARG			
No. of Residues	10	12	16
Residue Position	199-209	136-147	161-176

Table 10. Continued.

Amion Acid	Ch-VIII	Ch-X 1	Ch-X 2	Ch-X 3
CMC				
ASP			2.39 (1)	
THR				
SER		2.14 (1)		2.00 (1)
GLU	3.72 (2)			
PRO				
GLY	3.85 (2)	2.66 (1)		
ALA				
VAL			2.08 (1)	
MET				
ILE	1.63 (1)			
LEU				2.27 (1)
TYR				
PHE	1.81 (1)	2.41 (1)		2.14 (1)
HIS				
LYS	3.73 (2)			
ARG	1.81 (1)	2.68 (1)	2.36 (1)	2.45 (1)
No. of Residues	9	4	3	4
Residue Position	149-157	227-230	242-245	195-198

not actually sequenced; residues predicted on basis of amino acid composition.

Table 11. Automatic sequencing results of tryptic, chymotryptic and CNBr peptides.

Peptides/	Cycle			
	1	5	10	14
CNBr I	LEU-ARG-GLY-GLY-PRO-LEU-THR-ALA-PRO-TYR-ARG-LEU-ARG-GLN-PHE-HIS-LEU-HIS-TRP-GLY			
T III-1	GLU-PRO-ILE-THR-VAL-SER-SER-ASP-GLN-VAL-ALA-LYS			
T III-2	SER-LEU-PHE-SER-SER-ALA-GLU-ASN-GLU-PRO-PRO-VAL-PRO-LEU-VAL-ARG			
T III-3	GLY-ASP-ASN-GLN-SER-PRO-ILE-GLU-LEU-HIS-THR-LYS			
T III-4	GLY-SER-PHE-THR-THR-PRO-PRO-CYS-GLU-GLU-CYS-ILE-VAL-TRP-LEU-LEU LEU* LYS*			
T IV- 1	GLY-GLU-PHE-GLN-LEU-PHE-LEU-ASP-ALA-LEU-ASP-LYS			
T IV- 2	ASP-ILE-ASN-HIS-ASP-PRO-SER-LEU-LYS			
T V- 1	VAL-VAL-PHE-ASP-ASP-THR-TYR-ASP-ARG*			
T V- 2	GLN-PHE-HIS-LEU-HIS-TRP-GLY-SER-SER-ASP-ASP-HIS-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-GLY-VAL LYS*			
T V- 3	GLU-ALA-PRO-PHE-THR-ASN-PHE-ASP-PRO-SER-CYS-LEU-PHE-PRO-THR-CYS-ARG			
T V- 4	TYR-ASN-THR-TYR-GLY-GLY-ALA-LEU-LYS			
T VI- 1	THR-ILE-LEU-ASN-ASN*GLY*ARG*			
T VII-1	ALA-SER-PHE-LYS			
T VII-2	ALA-TRP-THR-ALA-SER-TYR-ASP-PRO-GLY-SER-ALA-LYS			
T VII-3	ASN-TRP-ARG-PRO-PRO-GLN-PRO-LEU-LYS			
T VII-4	SER-MET-LEU-ARG			

* Not actually sequenced; residue presumed on basis of amino acid composition.

Table 11. Continued.

Petides /	Cycle	5	10	14
	1			
T X -1	ASP-TYR-TRP-THR-TYR-ARG			
T VIII-1	TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-PRO-LYS			
T VIII-2	GLU-TRP-GLY-TYR-ALA-ASP-HIS-ASN-GLY-PRO-ASN-HIS-TRP-HIS-GLU-PHE-TYR-PRO-ILE-ALA-LYS			
Ch IV	THR-THR-PRO-PRO-CYS-GLU-GLU-CYS-ILE-VAL-TRP			
Ch V	LYS-GLN-PRO-ASP-GLY-ILE-ALA-VAL-VAL PHE*			
Ch VII	LEU-ASP-ALA-LEU-ASP-LYS-ILE-LYS-THR-LYS-GLY-LYS-GLU-ALA-PRO PHE*			
Ch VIII	LYS-ILE-GLY-ARG-GLU-LYS-GLY-GLU-PHE			
Ch X-1	ARG-GLY-SER-PHE			
Ch X-2	VAL-ARG-ASN-TRP			
Ch X-3	ARG-SER-LEU-PHE			

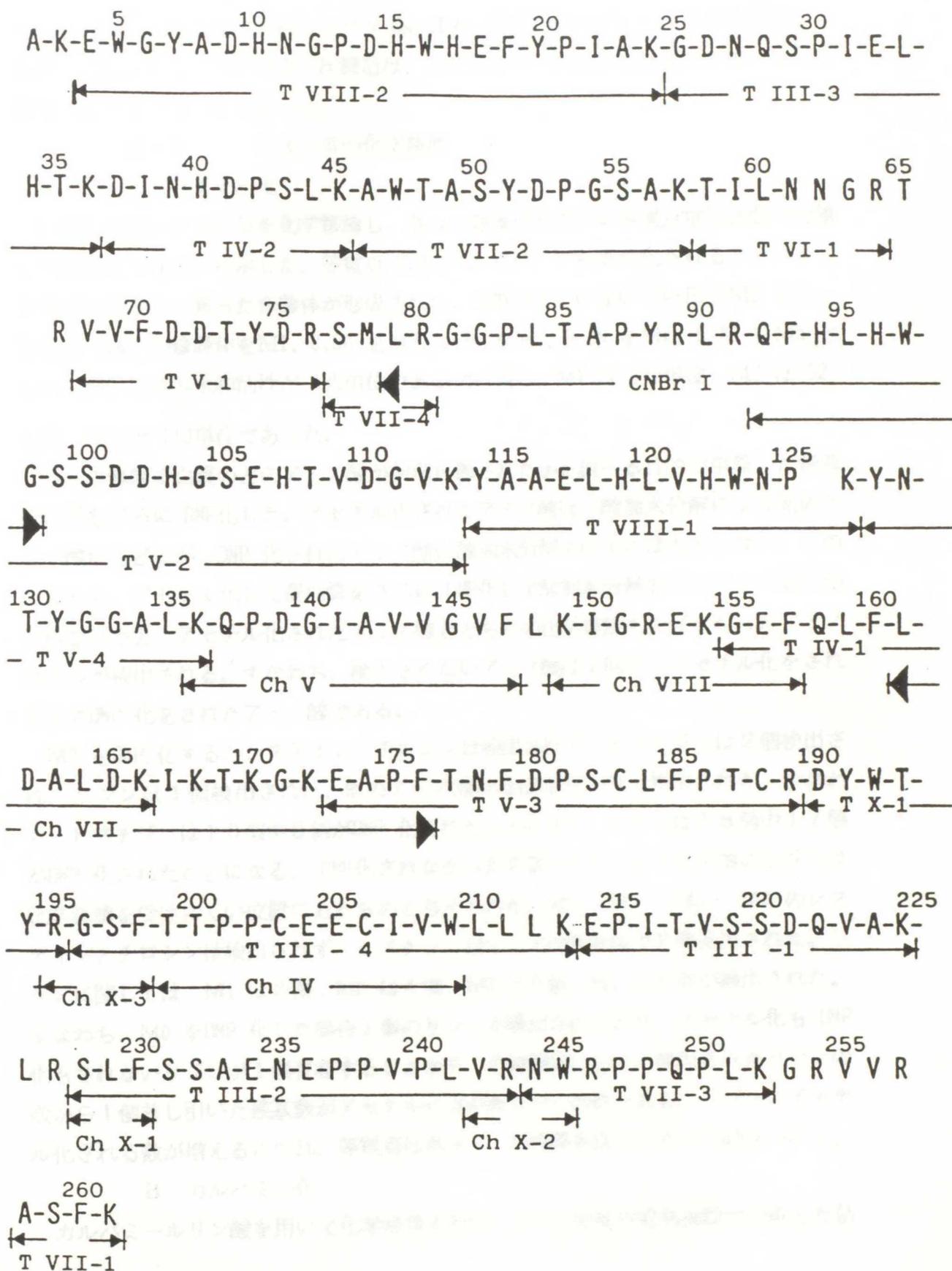


Fig 24. Reconstruction of the primary structure of equine CA-III by rearranging cleaved peptides.

造 (102) との類似性を利用してウマ CA-Ⅲの一次構造を決定した。その結果を Table 12 に示した。CA-Ⅲの一次構造は、259 残基中 21 残基が決定できず、決定されたのは全体の 92 % であった。

Ⅲ-7 : CA-Ⅲの化学修飾

A . アセチル化

p-NPB を用いて CA-Ⅲを化学修飾し、各々の修飾体をカラム等電点電気泳動で分離した結果を Fig.25 に示した。等電点 8.9 の CA-Ⅲは、アセチル化されることにより 5 種類の等電点の異った修飾体が形成された。修飾されていない CA-Ⅲを M0 とし、等電点 7.40 の修飾体を M1, 6.50 を M2, 5.90 を M3, 5.65 を M4, 5.30 を M5 とした。M0 の CO₂水和活性が 485 単位であるのに対し、M1 は 172 単位、M2 は 132 単位、M3 は 113 単位であった。

各々の修飾蛋白質のどのアミノ酸が何個修飾されたかを調べる目的で単離した修飾蛋白質をさらに DNP 化した。アセチル化されたアミノ酸は、酸加水分解により元のアミノ酸にもどるが、DNP 化されたアミノ酸は酸加水分解では元にはもどらない。このことから、アセチル化した蛋白質をさらに DNP 化して酸加水分解を行いアミノ酸自動分析を行うと、アセチル化されたアミノ酸とどちらの化学修飾も受けなかったアミノ酸のみが検出される。すなわち、検出されないアミノ酸は 1 回目のアセチル化をされず次の DNP 化をされたアミノ酸である。

M0 を DNP 化するとシステインとチロシンは検出されず、ヒスチジンは 2 個検出され、リジンは 1 個検出された。他のアミノ酸はほぼ正常の値で検出された。すなわち、ヒスチジンは 10 個中 8 個が DNP 化されたことになり、リジンは 18 個中 17 個が DNP 化されたことになる。DNP 化されなかった 2 個のヒスチジンと 1 個のリジンは化学修飾を受けにくい位置にあるものと考えられた。M1, M2, M3, M4 のシステインとチロシンは検出されず、ヒスチジンはすべての修飾体で 2 個検出された。リジンに関しては、M1 は 3 個、M2 は 4 個、M3 は 5 個、M4 は 6 個が検出された。すなわち、M0 を DNP 化した場合 1 個のリジンが検出されており、アセチル化も DNP 化もされないリジンが 1 個存在することから、各修飾体において検出されたリジンの数から 1 個差し引いた残基数がアセチル化されたリジンの数である。リジンのアセチル化される数が増えるにつれ、等電点は低下し、活性値も低下した [Table 13] 。

B . カルバミル化

カルバミールリン酸を用いて化学修飾を行い、カラム等電点電気泳動で分画した結

Table 12. The primary structure of the equine carbonic anhydrase isozyme III (CA-III)

Ac* ALA*⁵LYS*GLU-TRP-GLY-TYR-ALA-ASP-¹⁰HIS-ASN-GLY-PRO-ASP-¹⁵HIS-TRP-
 HIS-GLU-PHE-²⁰TYR-PRO-ILE-ALA-LYS-²⁵GLY-ASP-ASN-GLN-SER-³⁰PRO-ILE-GLU-
 LEU-HIS-³⁵THR-LYS-ASP-ILE-ASN-⁴⁰HIS-ASP-PRO-SER-LEU-LYS-⁴⁵ALA-TRP-THR-
 ALA-SER-TYR-ASP-PRO-GLY-SER-ALA-LYS-THR-ILE-LEU-ASN ⁶⁰ASN*GLY*ARG*
⁶⁵THR* ⁷⁰ARG*VAL-VAL-PHE-ASP-ASP-THR-TYR-⁷⁵ASP-ARG-SER-MET-LEU-⁸⁰ARG-
 GLY-GLY-PRO-⁸⁵LEU-THR-ALA-PRO-TYR-⁹⁰ARG-LEU-ARG-GLN-PHE-HIS-⁹⁵LEU-HIS-
 TRP-GLY-SER-SER-ASP-ASP-HIS-¹⁰⁰GLY-SER-BLU-HIS-THR-VAL-¹¹⁰ASP-GLY-VAL-
 LYS-TYR-ALA-ALA-¹¹⁵GLU-LEU-HIS-¹²⁰LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-PRO-¹²⁵-LYS-TYR-
 ASN-THR-TYR-GLY-GLY-ALA-LEU-LYS-¹³⁰GLN-PRO-ASP-¹³⁵GLY-ILE-ALA-VAL-VAL
¹⁴⁵GLY*VAL*PHE*¹⁵⁰LEU*LYS-ILE-GLY-ARG-GLU-LYS-¹⁵⁵GLY-GLU-PHE-GLN-LEU-¹⁶⁰PHE-
 LEU-ASP-ALA-LEU-¹⁶⁵ASP-LYS-ILE-LYS-¹⁷⁰THR-LYS-GLY-LYS-GLU-ALA-PRO-¹⁷⁵PHE-
 ILE-ASN-PHE-¹⁸⁰ASP-PRO-SER-CYS-LEU-PHE-¹⁸⁵PRO-THR-CYS-ARG-¹⁹⁰ASP-TYR-TRP-
 THR-TYR-¹⁹⁵ARG-GLY-SER-PHE-THR-²⁰⁰THR-PRO-PRO-CYS-GLU-GLU-CYS-ILE-VAL-
 TRP-LEU-LEU ²¹⁰LEU*LYS*²¹⁵GLU-PRO-ILE-THR-VAL-SER-SER-²²⁰ASP-GLN-VAL-ALA-
²²⁵LYS ²³⁰LEU*ARG*SER-LEU-PHE-SER-SER-ALA-²³⁵GLU-ASN-GLU-PRO-PRO-VAL-²⁴⁰PRO-
 LEU-VAL-ARG-ASN-²⁴⁵TRP-ARG-PRO-PRO-GLN-²⁵⁰PRO-LEU-LYS ²⁵⁵GLY*ARG*VAL*VAL*
²⁶⁰ARG*ALA-SER-PHE-LYS

*) Not actually sequenced; residue presumed on basis of amino acid composition

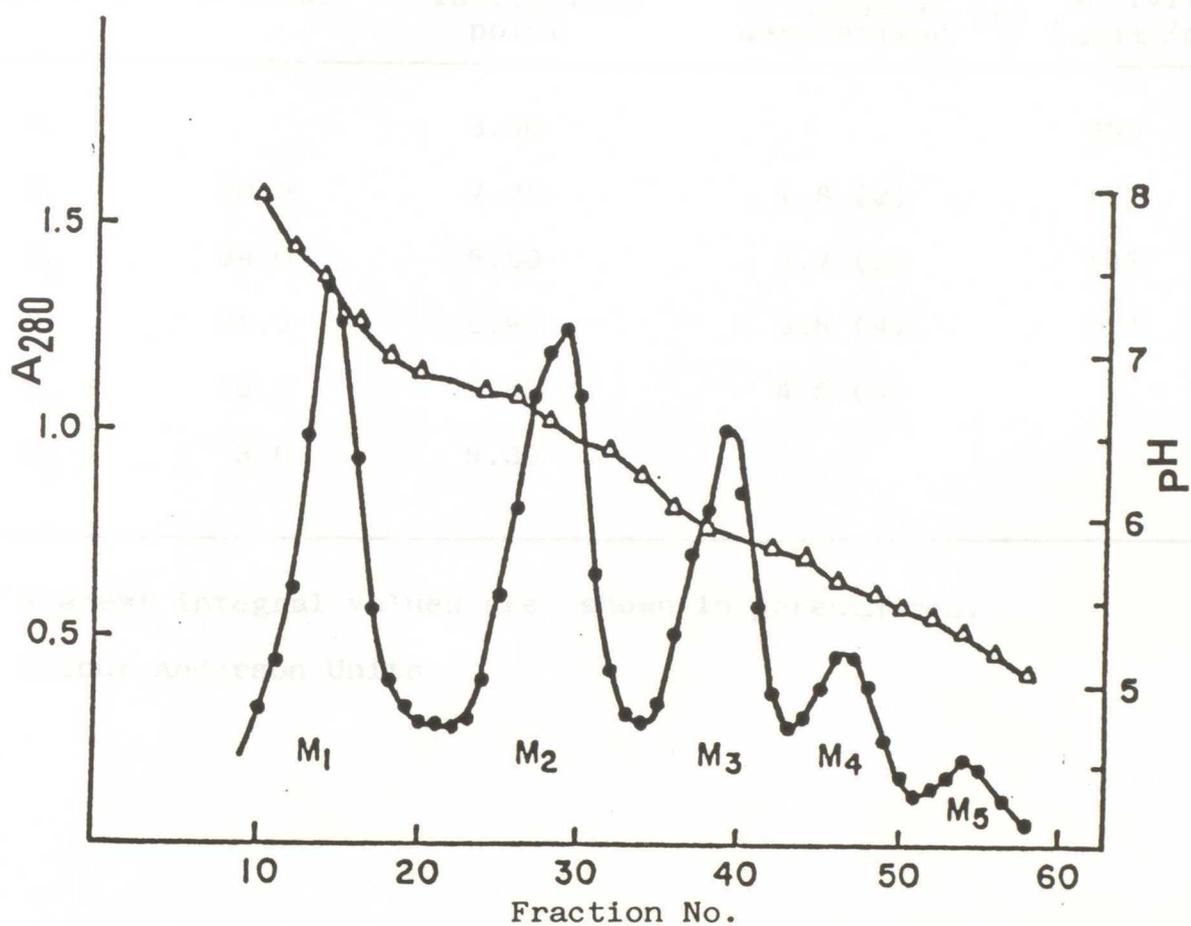


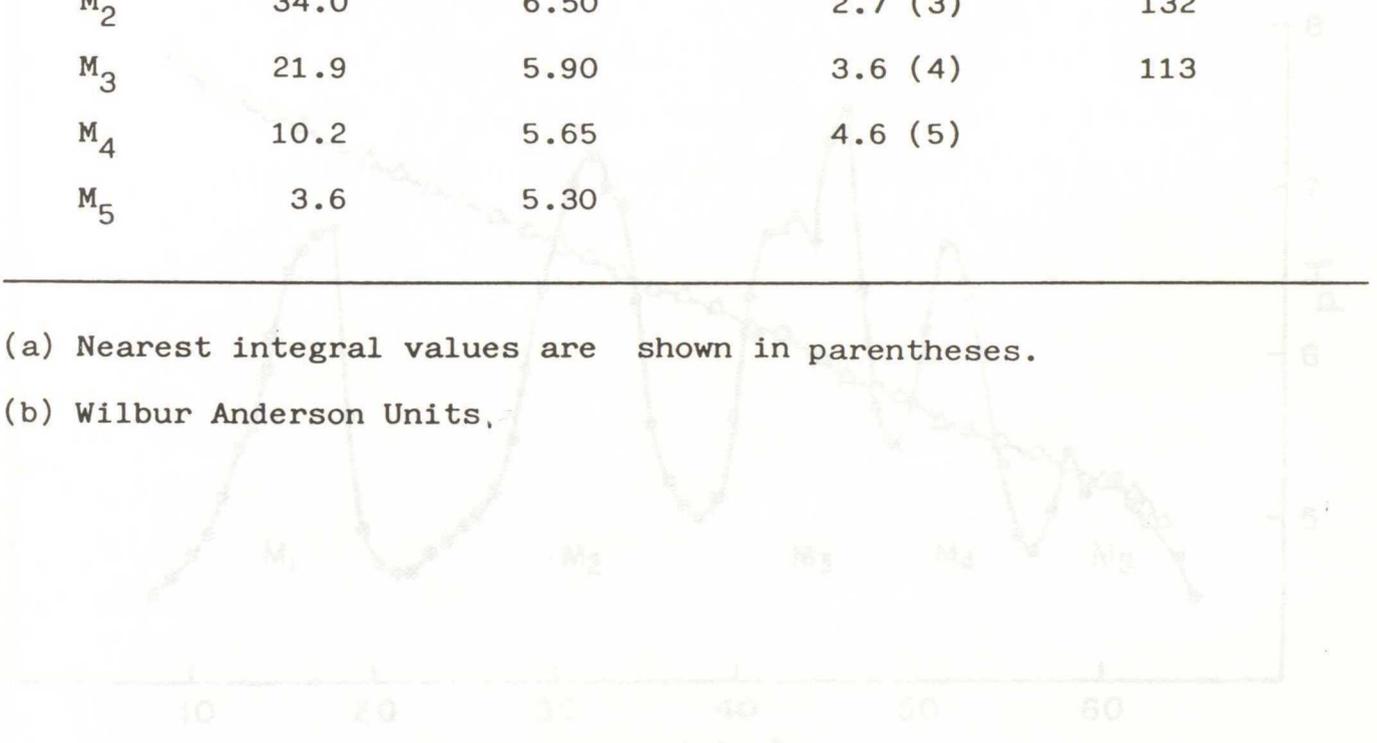
Fig. 25. Electrofocusing of acetylated equine carbonic anhydrase III.

Table 13. Summary of properties of dinitrophenylated CA- III derivatives.

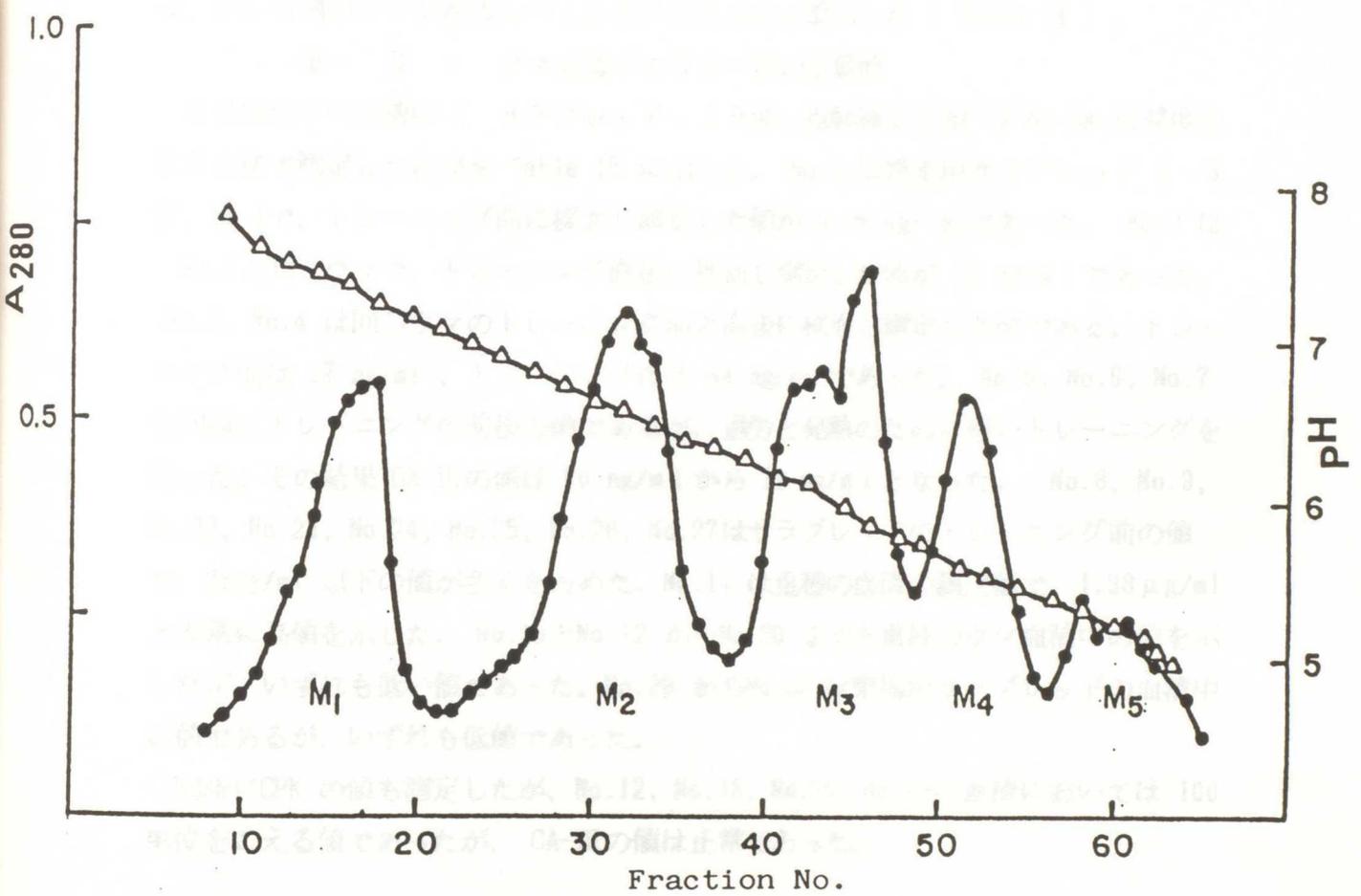
Component	% Total	Isoelectric point	No. lysines derivatized (a)	Activity (units/mg) (b)
M ₀		8.90		485
M ₁	30.3	7.40	1.8 (2)	172
M ₂	34.0	6.50	2.7 (3)	132
M ₃	21.9	5.90	3.6 (4)	113
M ₄	10.2	5.65	4.6 (5)	
M ₅	3.6	5.30		

(a) Nearest integral values are shown in parentheses.

(b) Wilbur Anderson Units,



Isoelectric focusing of carbonylated CA-III and its dinitrophenylated derivatives.



Electrofocusing of carbamylated equine carbonic anhydrase III.

果を Fig.26 に示した。等電点 7.25 の修飾体をM1, 6.55 をM2, 5.85 と 6.10を M3, 5.55 をM4, 5.20 をM5 とした。M1 のCA活性値は 180単位, M2.161 単位, M3. 156単位, M4. 130単位であった。

各々の修飾体を DNP化しアミノ酸分析を行ったが、リジンがカルバミール化されるとホモシトルリンが形成されアミノ酸自動分析機ではバリンと重なって測定されるため正確なホモシトルリン量は測定できなかった。しかし、ホモシトルリンは、6 N 塩酸で20時間加水分解すると 20 ~ 30 %がリジンに再生されることから (79,93) M1, M2, M3, M4 のリジン量からM0 のリジン量を差し引き、その平均 75%がホモシトルリンであると推定した。すなわち、M1 は2個, M2. 3個, M3. 4個~5 個, M4. 6個のリジンがカルバミール化されたものと算出した [Table 14] 。

Ⅲ- 8 : ウマ血清中のCA-Ⅲの定量値

29頭のウマ血清中 (サラブレッド . 18頭, 重軽種 11頭) の CA-Ⅲ濃度を E I A法で測定した結果を Table 15 に示した。No.1 は競走用サラブレッド (3才, 雄) で、トレーニング前に採血し測定した値が 0~5 ng/mlであった。No.2 は No.1と同じウマで、トレーニング直後に採血し測定した値が 18 ng/mlであった。No.3, No.4 は同じウマのトレーニング前と直後に採血し測定した値である。トレーニング前は 27 ng/ml , トレーニング後は 84 ng/ml であった。No.5, No.6, No.7 も同様にトレーニングの前後の値であるが、過労と発熱のために軽いトレーニングを行った。その結果 CA-Ⅲの値は 60 ng/ml から 12 ng/ml となった。No.8, No.9, No.22, No.23, No.24, No.25, No.26, No.27はサラブレッドのトレーニング前の値で、28ng/ml 以下の値が多くを占めた。No.11 は重種の血清の測定値で、1.38 μ g/ml と異常に高値を示した。No.10とNo.12 からNo.20 までも重種のウマ血清中の値を示したが、いずれも低い値であった。No.28 からNo.32 は乗馬用サラブレッドの血清中の値であるが、いずれも低値であった。

同時にCPK の値も測定したが、No.12, No.18, No.25, No.29の血清においては 100 単位をこえる値であったが、CA-Ⅲの値は正常であった。

Table 14. Summary of properties of carbamylated CA-IIIs.

Component	% Total	Isoelectric point	No. lysines derivatized (a)	Activity (units/mg) (b)
M ₀		8.9		485
M ₁	19.5	7.25	1.8 (2)	180
M ₂	2.71	6.55	3.0 (3)	161
M ₃ (c)	26.4	5.85, 6.10	4.4 (4,5)	156
M ₄	17.2	5.55	6.1 (6)	130
M ₅	9.8	5.2		

a) Nearest integral values are shown in parentheses.

b) Wilbur Anderson Units.

c) Isoelectric focusing gave two poorly resolved components.

Table 15. Carbonic anhydrase III (CA-III) and creatine phosphokinase levels in various equine sera.

Horse	CA-III (ng/ml)	CPK (IU/L)
1	0-5	40.92
2	18	37.35
3	27	47.78
4	84	55.10
5	22	38.20
6	60	40.96
7	12	45.15
8	14	48.78
9	10	45.87
10	0-5	48.54
11	1,380	57.79
12	10	124.20
13	10	29.21
14	10	46.66
15	0-5	50.64
16	0-5	59.38
17	6	48.37
18	16	102.80
19	6	35.92
20	0-5	36.96
21	0-5	34.59
22	0-5	23.61
23	20	74.89
24	24	31.49
25	12	196.60
26	0-5	34.83
27	28	25.39
28	0-5	36.79
29	0-5	129.70
30	0-5	14.7
31	0-5	—
32	0-5	—

IV 考察

IV-1. CA-IIIの精製とその性状

炭酸脱水酵素は、筋肉中には存在しないであろうという考えが強くあり、Scopes (87)はブタの骨格筋から塩基性のF蛋白質を精製し6種類の酵素活性を測定した。さらに電気泳動上で比較した酵素は11種類におよんだが、しかしながらCAについては注目せず結局F蛋白質の本体は解明されなかった。

しかし、筋肉中で重要な酵素である phosphoglucose isomerase や phosphoglycerate mutase できえ1%程度しか存在しないのであるから、2%近く存在するF蛋白質は正常な筋肉活動に重要な生理的意義のある酵素であろうと発表した。Scopes (87)はF蛋白質の精製にアセトン分画とイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて精製を行なっているが、F蛋白質の結晶化は失敗に終わっている。さらに、ウシとウサギの筋肉を用いてF蛋白質の精製を同じ方法で試みているが精製は出来ず、動物種により精製方法が異なることを指摘した。

一方、Register (80)らは、ウサギのCA-IIIの精製にジチオスレイオトール (DTT) をすべての緩衝液に入れて用いており、DTT を使用しない場合は2量体が形成されることにより単量体酵素の収量が低下することを報告している。

Deutsch (23)らは、CA-I, CA-IIを精製するにあたり、DTT を使用する代わりにあらかじめ溶血液をアルキル化することにより良好な結果を得ている。そこで、今回ウマのCA-IIIを精製する前段階として、SH基の保護の目的で筋肉抽出液のアルキル化を行った。

CA-I, CA-IIはp-アミノベンゼンスルファミドを固定化したアフィニティークロマトグラフィーで精製できることから(76,107), ウマの筋肉抽出液を同様にアフィニティークラムに流入した。しかし、目的とするCA-IIIは吸着しなかった。このことは、ウマのCA-IIIはスルファミドと親和性がないこと、すなわち阻害作用を受けないことを示唆し、この結果はKoester (59) らのウサギでの結果と一致したのに対し、ヒト、ゴリラのCA-IIIの結果とは反した(14,102)。ウマのCA-IIIは陽イオン交換体に吸着することから一旦吸着させた後に溶出分画した結果、CM Fr. I, CM Fr. IIに抗CA-III血清と反応する蛋白質が存在したことから性質の異なる2種類のCA-IIIの存在を示唆した。さらに、ゲル濾過を行なうと2種類のCA-IIIは同じ位置に溶出されることから分子量はほぼ等しいものと推察した。続いて、カラム等電点電気泳動で分画した結果、等電点8.9と8.1の分画にCA-IIIが存在したので前者をCA-III, 後者

を CA-III a とした。CA-III a は CA-III と分子量がほぼ等しいと推定されたことにより、2量体の形成やフラグメントに分解されたことによって形成されたものではないと理解できた。

カラム等電点電気泳動で精製した CA-III は、ウサギに免疫することにより単一の抗体を作ることと、澱粉ゲル電気泳動、SDS-PAGE で単一バンドを示したことから、さらに結晶化に成功したことから、今回の方法で精製した CA-III は高純度に精製され、なおかつ自然に近い状態で精製されたものと言える。ヒト CA-III においては 25% の収量が報告されており (89)、今回行なったウマ CA-III については約 50% の収率であった。精製した CA-III を溶液の状態に 4°C にて長期間保存しておく、陰極へ泳動されるバンドが出現した。このことは、Register (80)、Scopes (87) らの経験した現象と同様に DTT を加えると陰極側のバンドが消失することから考えて、2量体が形成されたためのものであった。

ウマの CA-I、CA-II 及び変異型の CA はすべて結晶化されており (21)、今回の CA-III の結晶化の成功によってウマの CA に関してはすべてが結晶化されたことになった。なお、CA-III に関しては今回の結晶化が唯一の成功例でもある。

ウマ CA-III の分子量は、SDS-PAGE で 26,500、ゲル濾過で 27,000 と推定されたことにより単量体の酵素であると結論を出した。ウマの各種 CA アイソザイムの性状を比較すると、各アイソザイムの分子量は 27,000 前後でほぼ等しいが、等電点と CO_2 水和活性値については各々のアイソザイムに特徴が見られた (Table 1)。ウマの CA に関しては他の動物の CA と違い、もっとも等電点の高い値を示したのは CA-II (C) であった。CA-III の CO_2 水和活性は CA-I の 1/7、CA-II の 1/74 であり、このような CA-III の活性の低さも CA-III の発見の遅れた原因であったかもしれない。エステラーゼ活性値を比較すると、CA-III は p-NPB よりも p-NPA を若干早く加水分解するが、CA-I、CA-II は明らかに p-NPA を早く加水分解する。このことから、CA の持つエステラーゼ活性は、non-specific esterase の A-esterase と考えられる (2, 3)。p-NPA を基質とした場合、3 者のアイソザイムの差は顕著で CA-III のエステラーゼ活性は CA-II の 1/103、CA-I の 1/65 であった。一方、CA-III はアセチル CoA、パルミチル CoA、アセチルコリン等の生体内物質は分解しなかった。

Koester (60) と Carter (19) らは、ウサギの CA-III にはわずかながら酸性フォスファターゼ活性の存在することを報告したが、アルカリフォスファターゼ活性につ

いては報告していない。ウマの CA-I, CA-II, CA-IIIは酸性フォスファターゼ活性を持ち、アルカリフォスファターゼ活性は CA-IIIのみに存在していた。

熱安定性試験の結果、CA-IIIの CO₂水和活性は 50 °C, 5 分間の加熱で約 2/3の活性を失い、60 °C, 5 分間ですべての活性を失ったことから易熱性であることが判明した。一方、エステラーゼ活性については 100 °C, 5 分間の加熱に対しても活性は失われず、耐熱性を示した。

CA-IIIの亜鉛含有量は、5.46 nmol の CA-IIIを用いて測定した結果 3.36 nmolの亜鉛が測定された。およそ 38 % の亜鉛が失われたことになるが、その原因は分析技術による誤差範囲であるか、精製中に亜鉛が消失したのかは不明であった。Holmes (49)は、ヒツジ CA-IIIの亜鉛含有量を測定し 23 % 近くが消失したことを報告している。CA-IIIは CA-I, CA-IIと同様に 1分子中に1原子の亜鉛を持つことは確実と思われるが、CA-IIIに関しては亜鉛の結合が弱いのかかもしれない。

IV-2. CA-IIIのアミノ酸組成

CA-IIIに限らず、蛋白質のアミノ酸組成の分析値は6N塩酸を用いて、110 °C, 20時間以上の加水分解を行っているので正確な値を得ることは困難といえる。CA-IIIと CA-III aのアミノ酸組成を比較すると、わずかに差が認められるのは分析誤差によるものかもしれない。ウマの筋肉抽出液を直ちにアルキル化を行って精製した CA-IIIと CA-III a は、2残基のシステインがカルボキシメチルシステイン (CMC)として検出された。そして、分析に先立ち変性剤の存在下で還元を行ない再度アルキル化を行なうと CA-IIIと CA-III aの CMC は各々4残基が検出された。すなわち、最初に検出できた2残基のシステインは分子の表面に位置しており容易にアルキル化されるが、残りの2残基は分子内に埋もれた状態で位置しているためにそのままではアルキル化されず、変性剤の存在下で還元を行ない蛋白分子を一本鎖にすることにより初めてアルキル化されたものと考えられる。システインの測定に、Ellmanの S-S交換反応を尿素を用いないで行なった場合は、2-ニトロ-5メルカプト安息香酸の遊離は遅く、そして少量であったのに対し尿素を用いると単時間に反応は終了した。その結果、CA-IIIは2残基、CA-III aは1残基のシステインが検出された。すなわち、精製前にアルキル化されているシステインは S-S交換反応ができず、分子内に埋もれているシステインのみが S-S交換反応を起こしたと理解できる。以上のことから、CA-III aには4残基のシステインが存在し、2残基は分子内に埋もれており、互いにS-S結合することなく

他の1残基は埋もれた形で存在し、もう一方のシステインは何らかの物質と結合しているためにS-S交換反応が起きなかったために、Ellman反応では1残基として検出されたものと考えられた。

さらに、CA-IIIaの等電点が低いことから何らかの酸性物質と結合している可能性を示唆されたことからその同定を試みた。すなわち、CA-IIIaを過燐酸で酸化し48%臭化水素水を加えて凍結乾燥してDowex 50 X 2カラムに流入した。素通り画分を採取してアミノ酸分析を行なった結果、システイン酸 0.63 nmol, グリシン 0.85 nmol, グルタミン酸 1.56 nmolが検出され、トリペプチドであるグルタチオンの存在が示唆された。しかし、CA-IIIaの酵素活性が低下している原因は不明であったが、埋もれた位置のシステイン残基にグルタチオンが結合することによりCA-IIIのコンホメーションに変化が生じ活性が低下したとも考えられる。

ウマのCA-IIの変異型であるCA-II (C_2)は、CA-IIの180番目のアルギニン残基がシステインに変換したことにより形成され、そのシステインにグルタチオンが1:1の割合で結合することによりCA-II (C_3)が形成されるが、活性値については変化はないと報告されている(23)。

Carter (15)らは精製したヒトCA-IIIをメルカプトエタノールで処理しても陽極へ泳動されるわずかな成分が存在することを報告している。Deutsch (23)らは、グルタチオンの結合したCA-II (C_3)を還元するとCA-II (C_2)の易動度にもどることを報告しているが、彼らのザイモグラムを観察すると還元後もわずかに陽極側にバンドが残っている。Scopes (87)もF蛋白のマイナーバンドを報告しており、これらのことからグルタチオンの結合のみにより等電点の低いバンドが出現するのではなく、他に何らかの原因があると考えられる。そのひとつとしては、アスパラギン又はグルタミンの脱アミノ反応も考えられるが(31)、CA-IIIとCA-IIIaのペプチドマップの比較では新しいスポットは検出されなかったことから少なくとも特定のアミノ酸が脱アミノ反応を起こしたものではないと言える。

アミノ酸組成において、CA-IIIと他のCAアイソザイムとの大きな違いはTable 16に示した様にシステイン残基とアルギニン残基の含有量である。CA-I, CA-IIにはおよそ1~2個のシステインが存在しているが(12,13,21,75,97)、CA-IIIに関してはウマでは4残基, ウサギで6残基(80), ヒトで4残基(15), ウシは3残

b) Jabush et al. (50)

Table 16.
Amino acid residues per mole of equine carbonic anhydrase
isozymes.

	CA-I ^{a)}	CA-II ^{b)}	CA-III
Cysteine	1	1	4
Aspartic Acid	30	29	28
Threonine	12	13	15
Serine	34	18	16
Glutamic Acid	24	24	20
Proline	18	16	20
Glycine	19	22	20
Alanine	14	17	16
Valine	17	17	15
Methionine	1	1	1
Isoleucine	8	7	8
Leucine	21	23	22
Tyrosine	10	7	9
Phenylalanine	11	12	11
Histidine	10	11	12
Lysine	19	19	18
Arginine	6	9	14
Tryptophan	8	5	8
Total	263	250	257

a) Deutsch et al. (21)

b) Jabush et al. (50)

基(102)と比較的多く含まれている (Table 17)。しかし、ホ乳類以外ではニワトリのCAは7残基のシステインを有し(8)、サメではトラザメが18残基、メジロザメ科のサメで25残基(67)のシステインが存在している。鳥類やハ虫類のCA-IIIに関するデータはないが、下等脊椎動物にはシステイン残基の数が多い傾向があり、このことからCA-IIIはCA-I, CA-IIの祖先に位置するアイソザイムと言えるかもしれない。

IV-3. CA-IIIのペプチドマップ

同種蛋白質間での化学構造上の差異を検討するには、原理の異なる2種類の分画法を組み合わせたペプチドマップ法が有効な手段として用いられている。

今回の実験では、CA-IIIとCA-III aの差異の検出とCA-IIIの分子表面に位置するシステイン残基と埋もれたシステイン残基の位置を検出するため、そして化学修飾されたCA-IIIの検索のためにペプチドマップを作成して比較した。ウマのCA-IIIをトリプシンで分解して作成したペプチドマップでは、26個のスポットが検出され結果的には4個のペプチドが検出されなかった。蛋白質を酵素分解する場合、未変性の状態よりも変性させた蛋白質の方がよく分解されることからCA-IとCA-IIの酵素分解を行う前に熱変性を行なった結果、不溶化のペプチドが出現したという報告がなされている(64)。このことから、今回の実験で回収できなかった4個のペプチドは同じ原因で不溶化したものと考えられる。

一方、CMCが検出されたペプチドはNo.21であったことから、このペプチドに含まれるシステイン残基が分子表面に位置すると考えられる。No.10のペプチドは、アルギニンとリジンが含まれていることから、どちらかの残基がトリプシンで切断されにくい状態にあると考えられた。後の一次構造の解析結果から246番目のアルギニンの次にプロリンが位置しており、プロリンのイミノ基のためにトリプシンにより分解されないことが判明した。

CA-III aのペプチドマップでは、No.25のペプチドが検出されず、このことはNo.25に含まれるシステインのSH基にグルタチオンが結合することにより、疎水性であるペプチドがさらに疎水性となり不溶化したものと考えられた。

CA-IIIをシトラコニール化すると、リジンの ϵ -アミノ基が修飾されることによりリジンのC末端はトリプシンで分解されなくなり、アルギニン残基の後方のみで切断されるようになる。このような試料で作成したペプチドマップはスポットが15個検出された。No.5のペプチドにはアルギニンが含まれていないでリジンが含まれていることから、CA-IIIのC末端に位置するペプチドであることが推定された。しかし、

Table 17. Comparison of amino acid compositions of carbonic anhydrase from Equine CA-III, Bovine CA-III and Rabbit CA-III.

Amino Acid	Equine CA-III	Bovine CA-III (a)	Rabbit CA-III (b)
Cysteine	4	3	6
Aspartic Acid	28	29	28
Threonine	15	12	11
Serine	16	19	19
Glutamic Acid	20	19	19
Proline	20	20	23
Glycine	20	17	19
Alanine	16	20	14
Valine	15	14	14
Methionine	1	1	2
Isoleucine	8	12	10
Leucine	22	24	20
Tyrosine	9	8	9
Phenylalanine	11	10	12
Histidine	12	12	11
Lysine	18	20	18
Arginine	14	11	13
Tryptophan	8	8	10
Total	257	259	258

a) Tashian et al. (102)

b) Register et al. (80)

No.10 のペプチドは 153~189 番に位置するペプチドであるが、他のアミノ酸の混入があり確定できなかった。シトラコニール化したペプチドの回収率が高いのは、化学修飾により不溶性のペプチドが可溶化されやすくなるためと考えられる。

IV-4. CA-IIIの一次構造と分子進化

蛋白質は20種類のアミノ酸を材料としているため、2個のアミノ酸の並び方は400通りあり、 n 残基の並び方は20の n 乗となる。この様な莫大な並び方の可能性のある蛋白質の共通点は、「遺伝情報に従ったアミノ酸配列において、L-アミノ酸が重合したポリペプチド鎖から成立している」ということだけである。

一次構造は蛋白質の共通性と特性を表わすと考えられているが、配列順序の持つ意味が解読されなければ、蛋白質の本来の性質の解明はなされない。さらに、酵素の活性中心は単にアミノ酸配列の一部特別な並びだけでなく、一次構造上の離れた位置の残基も加わって形成されているので活性中心の詳細は立体構造の分析により初めて解明されることになる。

CAアイソザイムは一次構造、二次構造、三次構造の解析が非常に進んでいる酵素のひとつである。その結果から、ヒトのCA-I及CA-IIは酵素全体としては球状構造をとりその中心に亜鉛が配位している。CAの特徴的な二次構造はねじれた β -シートであり、全アミノ酸の約30%がこの構造に寄与していると言われている。この β -シートから3個のヒスチジン残基が亜鉛に配位結合していることがX線解析の結果から知られている(54,74)。そして、アミノ酸の94番,96番,119番に位置するヒスチジン残基が活性中心であるとし、64番,92番,106番,199番の残基は亜鉛から 8\AA 以内であって活性に関与するものと考えられている(4,74)。CAアイソザイムはそのアミノ酸配列の類似性から同じ様な三次構造を持つものと考えられ、亜鉛は活性部位のくぼみ(直径 10\AA ,深さ 12\AA)の底に位置している。現在までに分析されている動物のCAアイソザイムの一次構造の分析結果から、活性中心の94番,96番,119番のアミノ酸残基はすべてヒスチジンであることが証明されている[Table 18]。今回検索したウマのCA-IIIに関しても94番,96番,119番のアミノ酸はヒスチジン残基であった。すなわち、このことからホ乳類のCAアイソザイムの活性中心は、アイソザイムの種類や動物の種に関係なくすべてがヒスチジン残基から成る可能性が強く、CAアイソザイムの共通性と特性を示すものと理解された。さらに、活性に関与すると考えられているCAアイソザイムの64番,92番,106番,199番のうち92番目に位置するのはグルタミンで106番はグルタミン酸、199番はト

Table 18. Comparison of sequences of equine carbonic anhydrase isozymes with those of bovine, sheep and human carbonic anhydrase isozymes.

Eq CA-I	Ac.	1	5	10	ALA-HIS-SER-ASP-TRP-GLY-TYR-ASP-SER-PRO-ASN-GLY-PRO-
Eq CA-II	Ac.	SER-HIS-HIS-TRP-GLY-TYR-GLY-GLU-HIS-ASP-GLY-PRO-			
Eq CA-III	Ac.	ALA*LYS*GLU-TRP-GLY-TYR-ALA-ASP-HIS-ASN-GLY-PRO-			
Bo CA-II	Ac.	SER-HIS-HIS-TRP-GLY-TYR-GLY-LYS-HIS-ASX-GLY-PRO-			
Bo CA-III	Ac.	ALA-LYS-GLN-TRP-GLY-TYR-ALA-ASP-HIS-ASN-GLY-PRO-			
Sh CA-II	Ac.	SER-HIS-HIS-TRP-GLY-TYR-GLY-GLU-HIS-ASN-GLY-PRO-			
Hu CA-I	Ac.	ALA-SER-PRO-ASP-TRP-GLY-TYR-ASP-ASP-LYS-ASN-GLY-PRO-			
Hu CA-II	Ac.	SER-HIS-HIS-TRP-GLY-TYR-GLY-LYS-HIS-ASN-GLY-PRO-			
Eq CA-I		15	20	25	GLU-GLU-TRP-VAL-LYS-LEU-TYR-PRO-ILE-ALA-ASN-GLY-ASX-ASX-
Eq CA-II		LYS-HIS-TRP-HIS-LYS-ASP-PHE-PRO-ILE-ALA-LYS-GLY-GLN-ARG-			
Eq CA-III		ASP-HIS-TRP-HIS-GLU-PHE-TYR-PRO-ILE-ALA-LYS-GLY-ASP-ASN-			
Bo CA-II		GLX-HIS-TRP-HIS-LYS-ASP-PHE-PRO-ILE-ALA-ASN-GLY-GLU-ARG-			
Bo CA-III		ASP-HIS-TRP-HIS-GLU-LEU-PHE-PRO-ASN-ALA-LYS-GLY-GLU-ASN-			
Sh CA-II		GLU-HIS-TRP-HIS-LYS-ASP-PHE-PRO-ILE-ALA-ASP-GLY-GLU-ARG-			
Hu CA-I		GLU-GLN-TRP-SER-LYS-LEU-TYR-PRO-ILE-ALA-ASN-GLY-ASP-GLN-			
Hu CA-II		GLU-HIS-TRP-HIS-LYS-ASP-PHE-PRO-ILE-ALA-LYS-GLY-GLU-ARG-			
Eq CA-I		30	35	40	GLN-SER-PRO-ILE-ASP-ILE-LYS-THR-SER-GLU-THR-LYS-HIS-ASP-
Eq CA-II		GLN-SER-PRO-VAL-ASP-ILE-ASP-THR-LYS-ALA-ALA-VAL-HIS-ASP-			
Eq CA-III		GLN-SER-PRO-ILE-GLU-LEU-HIS-THR-LYS-ASP-ILE-ASN-HIS-ASP-			
Bo CA-II		GLN-SER-PRO-VAL-ASN-ILE-ASP-THR-LYS-ALA-VAL-VAL-GLN-ASP-			
Bo CA-III		GLN-SER-PRO-ILE-GLU-LEU-ASN-THR-LYS-GLU-ILE-SER-HIS-ASP-			
Sh CA-II		GLN-SER-PRO-VAL-ASP-ILE-ASP-THR-LYS-ALA-VAL-VAL-PRO-ASP-			
Hu CA-I		ASN-SER-PRO-VAL-ASP-ILE-LYS-THR-SER-GLU-THR-LYS-HIS-ASP-			
Hu CA-II		GLN-SER-PRO-VAL-ASP-ILE-ASP-THR-HIS-THR-ALA-LYS-TYR-ASP-			
Eq CA-I		45	50	55	THR-SER-LEU-LYS-PRO-PHE-SER-VAL-SER-TYR-ASP-PRO-ALA-THR-
Eq CA-II		ALA-ALA-LEU-LYS-PRO-LEU-ALA-VAL-HIS-TYR-GLN-GLY-ALA-THR-			
Eq CA-III		PRO-SER-LEU-LYS-ALA-TRP-THR-ALA-SER-TYR-ASP-PRO-GLY-SER-			
Bo CA-II		PRO-ALA-LEU-LYS-PRO-LEU-ALA-LEU-VAL-TYR-GLY-GLU-ALA-THR-			
Bo CA-III		PRO-SER-LEU-LYS-PRO-TRP-THR-ALA-SER-TYR-ASP-PRO-GLY-SER-			
Sh CA-II		PRO-ALA-LEU-LYS-PRO-LEU-ALA-LEU-LEU-TYR-GLU-GLN-ALA-ALA-			
Hu CA-I		THR-SER-LEU-LYS-PRO-ILE-SER-VAL-SER-TYR-ASN-PRO-ALA-THR-			
Hu CA-II		PRO-SER-LEU-LYS-PRO-LEU-SER-VAL-SER-TYR-ASP-GLN-ALA-THR-			

Table 18. Continued.

		60	65
Eq CA-I	ALA-LYS-GLU-ILE-VAL-ASN-VAL-GLY-HIS-SER-PHE-GLN-VAL-LYS-		
Eq CA-II	SER-ARG-ARG* ILE-VAL-ASX-ASX-GLY-HIS-SER-PHE-ASN-VAL-GLU-		
Eq CA-III	ALA-LYS-THR-ILE-LEU-ASN-ASN*GLY*ARG*THR* ARG* VAL-VAL-		
Bo CA-II	SER-ARG-ARG-MET-VAL-ASN-ASN-GLY-HIS-SER-PHE-ASN-VAL-GLU-		
Bo CA-III	ALA-LYS-THR-ILE-LEU-ASN-ASN-GLY-LYS-THR-TYR-ARG-VAL-VAL-		
Sh CA-II	SER-ARG-ARG-MET-VAL-ASN-ASN-GLY-HIS-SER-PHE-ASN-VAL-GLU-		
Hu CA-I	ALA-LYS-GLU-ILE-ILE-ASN-VAL-GLY-HIS-SER-PHE-HIS-VAL-ASN-		
Hu CA-II	SER-LEU-ARG-ILE-LEU-ASN-ASN-GLY-HIS-ALA-PHE-ASN-VAL-GLU-		
	70	75	80
Eq CA-I	PHE-GLU-ASP-SER-ASP-ASN-ARG-SER-VAL-LEU-LYS-ASP-GLY-PRO-		
Eq CA-II	PHE-ASP-ASP-SER-GLU-ASP-LYS-ALA-VAL-LEU-GLU-GLY-GLY-PRO-		
Eq CA-III	PHE-ASP-ASP-THR-TYR-ASP-ARG-SER-MET-LEU-ARG-GLY-GLY-PRO-		
Bo CA-II	TYR-ASP-ASP-SER-GLN-ASP-LYS-ALA-VAL-LEU-LYS-ASP-GLY-PRO-		
Bo CA-III	PHE-ASP-ASP-THR-TYR-ASP-ARG-ALA-MET-LEU-ARG-GLY-GLY-PRO-		
Sh CA-II	PHE-ASP-ASP-SER-GLN-ASP-LYS-ALA-VAL-LEU-LYS-ASP-GLY-PRO-		
Hu CA-I	PHE-GLU-ASP-ASN-ASP-ASN-ARG-SER-VAL-ILE-LYS-GLY-GLY-PRO-		
Hu CA-II	PHE-ASP-ASP-SER-GLU-ASP-LYS-ALA-VAL-LEU-LYS-GLY-GLY-PRO-		
	85	90	95
Eq CA-I	LEU-PRO-GLY-SER-TYR-ARG-LEU-VAL-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
Eq CA-II	LEU-THR-GLY-THR-TYR-ARG-LEU-ILE-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
Eq CA-III	LEU-THR-ALA-PRO-TYR-ARG-LEU-ARG-GLN-PHE-HIS-LEU-HIS-TRP-		
Bo CA-II	LEU-THR-GLY-THR-TYR-ARG-LEU-VAL-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
Bo CA-III	LEU-ALA-ALA-PRO-TYR-ARG-LEU-ARG-GLN-PHE-HIS-LEU-HIS-TRP-		
Sh CA-II	LEU-THR-GLY-THR-TYR-ARG-LEU-VAL-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
Hu CA-I	PHE-SER-ASP-SER-TYR-ARG-LEU-PHE-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
Hu CA-II	LEU-ASP-GLY-THR-TYR-ARG-LEU-ILE-GLN-PHE-HIS-PHE-HIS-TRP-		
	100	105	110
Eq CA-I	GLY-SER-THR-ASP-ASP-TYR-GLY-SER-GLU-HIS-PHR-VAL-ASP-GLY-		
Eq CA-II	GLY-SER-SER-ASX-GLY-GLX-GLY-SER-GLX-HIS-THR-VAL-ASX-LYS-		
Eq CA-III	GLY-SER-SER-ASP-ASP-HIS-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-GLY-		
Bo CA-II	GLY-SER-SER-ASX-ASX-GLN-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-ARG-		
Bo CA-III	GLY-SER-SER-ASP-ASP-HIS-GLY-SER-GLU-HIS-SER-VAL-ASP-GLY-		
Sh CA-II	GLY-SER-SER-ASP-ASP-GLN-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-ARG-		
Hu CA-I	GLY-SER-THR-ASN-GLU-HIS-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-GLY-		
Hu CA-II	GLY-SER-LEU-ASN-GLY-GLN-GLY-SER-GLU-HIS-THR-VAL-ASP-LYS-		
Hu CA-III	LYS-PRO-GLY-LEU-GLN-LYS-VAL-VAL-ASP-VAL-ASP-SER-ILE-		

Table 18. Continued.

		115		120		125
Eq CA-I	VAL-LYS-TYR-SER-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-SER-					
Eq CA-II	LYS-LYS-TYR-ALA-ALA-GLX-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-THR-					
Eq CA-III	VAL-LYS-TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-PRO-					
Bo CA-II	LYS-LYS-TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-THR-					
Bo CA-III	VAL-LYS-TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-SER-					
Sh CA-II	LYS-LYS-TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-THR-					
Hu CA-I	VAL-LYS-TYR-SER-ALA-GLU-LEU-HIS-VAL-ALA-HIS-TRP-ASN-SER-					
Hu CA-II	LYS-LYS-TYR-ALA-ALA-GLU-LEU-HIS-LEU-VAL-HIS-TRP-ASN-THR-					
		130		135		
Eq CA-I	SER-LYS-TYR-SER-SER-PHE-ASP-GLU-ALA-SER-SER-GLN-ALA-ASP-					
Eq CA-II	-LYS-TYR-GLY-ASP-PHE-GLY-LYS-ALA-VAL-GLN-GLU-PRO-ASP-					
Eq CA-III	-LYS-TYR-ASN-THR-TYR-GLY-GLY-ALA-LEU-LYS-GLN-PRO-ASP-					
Bo CA-II	-LYS-TYR-GLY-ASP-PHE-GLY-THR-ALA-ALA-GLN-GLN-PRO-ASP-					
Bo CA-III	-LYS-PHE-ASN-SER-ILE-ALA-THR-ALA-LEU-LYS-HIS-ALA-ASP-					
Sh CA-II	-LYS-TYR-GLY-ASP-PHE-GLY-THR-ALA-ALA-GLN-GLN-PRO-ASP-					
Hu CA-I	ALA-LYS-TYR-SER-SER-LEU-ALA-GLU-ALA-ALA-SER-LYS-ALA-ASP-					
Hu CA-II	-LYS-TYR-GLY-ASP-PHE-GLY-LYS-ALA-VAL-GLN-GLU-PRO-ASP-					
		140		145		150
Eq CA-I	GLY-LEU-ALA-ILE-LEU-GLY-VAL-LEU-MET-LYS-VAL-GLY-GLU-ALA-					
Eq CA-II	GLY-LEU-ALA-VAL-VAL-GLY-VAL-PHE-LEU-LYS-VAL-GLY-GLY-ALA-					
Eq CA-III	GLY-ILE-ALA-VAL-VAL GLY*VAL*PHE*LEU*LYS-ILE-GLY-ARG-GLU-					
Bo CA-II	GLY-LEU-ALA-VAL-VAL-GLY-VAL-PHE-LEU-LYS-VAL-GLY-ASP-ALA-					
Bo CA-III	GLY-ILE-ALA-VAL-VAL-GLY-VAL-PHE-LEU-LYS-ILE-GLY-ARG-GLU-					
Sh CA-II	GLY-LEU-ALA-VAL-VAL-GLY-VAL-PHE-LEU-LYS-VAL-GLY-ASP-ALA-					
Hu CA-I	GLY-LEU-ALA-VAL-ILE-GLY-VAL-ILE-MET-LYS-VAL-GLY-GLU-ALA-					
Hu CA-II	GLY-LEU-ALA-VAL-LEU-GLY-ILE-PHE-LEU-LYS-VAL-GLY-SER-ALA-					
		155		160		165
Eq CA-I	ASN-PRO-LYS-LEU-GLN-LYS-VAL-LEU-ASP-ALA-LEU-ASN-GLU-VAL-					
Eq CA-II	LYS-PRO-GLY-LEU-GLN-LYS-VAL-LEU-ASP-VAL-LEU-ASP-SER-ILE-					
Eq CA-III	LYS-GLY-GLU-PHE-GLN-LEU-PHE-LEU-ASP-ALA-LEU-ASP-LYS-ILE-					
Bo CA-II	ASN-PRO-ALA-LEU-GLN-LYS-VAL-LEU-ASP-ALA-LEU-ASP-SER-ILE-					
Bo CA-III	LYS-GLY-GLU-PHE-GLN-LEU-LEU-LEU-ASP-ALA-LEU-ASP-LYS-ILE-					
Sh CA-II	ASN-PRO-ALA-LEU-GLN-LYS-VAL-LEU-ASP-VAL-LEU-ASP-SER-ILE-					
Hu CA-I	ASN-PRO-LYS-LEU-GLN-LYS-VAL-LEU-ASP-ALA-LEU-GLU-ALA-ILE-					
Hu CA-II	LYS-PRO-GLY-LEU-GLN-LYS-VAL-VAL-ASP-VAL-LEU-ASP-SER-ILE-					

Table 18. Continued.

		170		175		180
Eq	CA-I	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-LYS-ALA-PRO-PHE-LYS-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Eq	CA-II	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-SER-ALA-ASP-PHE-THR-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Eq	CA-III	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-GLU-ALA-PRO-PHE-ILE-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Bo	CA-II	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-SER-THR-ASP-PHE-PRO-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Bo	CA-III	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-GLU-ALA-PRO-PHE-ASN-ASN-PHE-ASN-PRO-				
Sh	CA-II	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-SER-ALA-ASP-PHE-PRO-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Hu	CA-I	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-ARG-ALA-PRO-PHE-THR-ASN-PHE-ASP-PRO-				
Hu	CA-II	LYS-THR-LYS-GLY-LYS-SER-ALA-ASP-PHE-THR-ASN-PHE-ASP-PRO-				
		185		190		195
Eq	CA-I	SER-SER-LEU-LEU-PRO-SER-SER-PRO-ASP-TYR-TRP-THR-TYR-SER-				
Eq	CA-II	ARG-GLY-LEU-LEU-PRO-GLN-SER-LEU-ASX-TYR-TRP-THR-TYR-PRO-				
Eq	CA-III	SER-CYS-LEU-PHE-PRO-THR-CYS-ARG-ASP-TYR-TRP-THR-TYR-ARG-				
Bo	CA-II	GLY-SER-LEU-LEU-PRO-GLU-VAL-LEU-ASP-TYR-TRP-THR-TYR-PRO-				
Bo	CA-III	SER-CYS-LEU-LEU-PRO-ALA-SER-ARG-ASP-TYR-TRP-THR-TYR-HIS-				
Sh	CA-II	SER-SER-LEU-LEU-LYS-ARG-ALA-LEU-ASN-TYR-TRP-THR-TYR-PRO-				
Hu	CA-I	SER-THR-LEU-LEU-PRO-SER-SER-LEU-ASP-PHE-TRP-THR-TYR-PRO-				
Hu	CA-II	ARG-GLY-LEU-LEU-PRO-GLU-SER-LEU-ASP-TYR-TRP-THR-TYR-PRO-				
		200		205		
Eq	CA-I	GLY-SER-LEU-THR-HIS-PRO-PRO-LEU-TYR-GLU-SER-VAL-THR-TRP-				
Eq	CA-II	GLY-SER-LEU-THR-THR-PRO-PRO-LEU-LEU-GLX-CYS-VAL-THR*TRP-				
Eq	CA-III	GLY-SER-PHE-THR-THR-PRO-PRO-CYS-GLU-GLU-CYS-ILE-VAL-TRP-				
Bo	CA-II	GLY-SER-LEU-THR-THR-PRO-PRO-LEU-LEU-GLU-SER-VAL-THR-TRP-				
Bo	CA-III	GLY-SER-PHE-THR-THR-PRO-PRO-ASP-CYS-GLU-CYS-ILE-VAL-TRP-				
Sh	CA-II	GLY-SER-LEU-THR-ASN-PRO-PRO-LEU-LEU-GLU-SER-VAL-THR-TRP-				
Hu	CA-I	GLY-SER-LEU-THR-HIS-PRO-PRO-LEU-TYR-GLU-SER-VAL-THR-TRP-				
Hu	CA-II	GLY-SER-LEU-THR-THR-PRO-PRO-LEU-LEU-GLN-CYS-VAL-THR-TRP-				
		210		215		220
Eq	CA-I	ILE-VAL-CYS-LYS-GLU-ASN-ILE-SER-ILE-SER-SER-GLN-GLN-LEU-				
Eq	CA-II	ILE-VAL-LEU-ARG-GLU-PRO-ILE-SER-VAL-SER-SER-GLU-GLN-LEU-				
Eq	CA-III	LEU-LEU LEU*LYS-GLU-PRO-ILE-THR-VAL-SER-SER-ASP-GLN-VAL-				
Bo	CA-II	ILE-VAL-LEU-LYS-GLU-PRO-ILE-SER-VAL-SER-SER-GLN-GLN-MET-				
Bo	CA-III	LEU-LEU-LEU-LYS-LEU-PRO-ILE-THR-VAL-SER-SER-ASP-GLN-ILE-				
Sh	CA-II	VAL-VAL-LEU-LYS-GLU-PRO-THR-SER-VAL-SER-SER-GLN-GLN-MET-				
Hu	CA-I	ILE-ILE-CYS-LYS-GLU-SER-ILE-SER-VAL-SER-SER-GLU-GLN-LEU-				
Hu	CA-II	ILE-VAL-LEU-LYS-GLU-PRO-ILE-SER-VAL-SER-SER-GLU-GLN-VAL-				

Table 18. Continued.

		225		230		235
Eq	CA-I	SER-GLN-PHE-ARG-SER-LEU-LEU-SER-ASN-VAL-GLU-GLY-GLY-LYS-				
Eq	CA-II	LEU-LYS-PHE-ARG-SER-LEU-ASN-PHE-ASX-ALA-GLX-GLY-LYS-PRO-				
Eq	CA-III	ALA-LYS LEU* ARG* SER-LEU-PHE-SER-SER-ALA-GLU-ASN-GLU-PRO-				
Bo	CA-II	LEU-LYS-PHE-ARG-THR-LEU-ASN-PHE-ASN-ALA-GLU-GLY-GLU-PRO-				
Bo	CA-III	ALA-LYS-LEU-ARG-THR-LEU-VAL-SER-SER-ALA-GLU-ASN-GLU-PRO-				
Sh	CA-II	LEU-LYS-PHE-ARG-SER-LEU-ASN-PHE-ASN-ALA-GLU-GLY-GLU-PRO-				
Hu	CA-I	ALA-GLN-PHE-ARG-SER-LEU-LEU-SER-ASN-VAL-GLU-GLY-ASP-ASN-				
Hu	CA-II	LEU-LYS-PHE-ARG-LYS-LEU-ASN-PHE-ASN-GLY-GLU-GLY-GLU-PRO-				
		240		245		250
Eq	CA-I	ALA-VAL-PRO-ILE-GLN-HIS-ASN-ASN-ARG-PRO-PRO-GLN-PRO-LEU-				
Eq	CA-II	GLX-ASX-PRO-MET-VAL-ASX-ASX-TRP-ARG-PRO-ALA-GLN-PRO-LEU-				
Eq	CA-III	PRO-VAL-PRO-LEU-VAL-ARG-ASN-TRP-ARG-PRO-PRO-GLN-PRO-LEU-				
Bo	CA-II	GLU-LEU-LEU-MET-LEU-ALA-ASN-TRP-ARG-PRO-ALA-GLN-PRO-LEU-				
Bo	CA-III	PRO-VAL-PRO-LEU-VAL-ARG-ASN-TRP-ARG-PRO-PRO-GLN-PRO-ILE-				
Sh	CA-II	GLU-LEU-LEU-MET-LEU-ALA-ASN-TRP-ARG-PRO-ALA-GLN-PRO-LEU-				
Hu	CA-I	ALA-VAL-PRO-MET-GLN-HIS-ASN-ASN-ARG-PRO-THR-GLN-PRO-LEU-				
Hi	CA-II	GLU GLU LEU MET VAL ASP ASN TRP ARG PRO ALA GLN PRO LEU				
		255		260		
Eq	CA -I	LYS-GLY-ARG-THR-VAL-ARG-ALA-PHE-PHE				
Eq	CA-II	ASN-ASN-ARG-GLN-ILE-ARG-ALA-SER-PHE-LYS				
Eq	CA-III	LYS GLY* ARG* VAL* VAL* ARG* ALA-SER-PHE-LYS				
Bo	CA-II	LYS-ASN-ARG-GLN-VAL-ARG-GLY-PHE-PRO-LYS				
Bo	CA-III	LYS-GLY-ARG-ILE-VAL-LYS-ALA-SER-PHE-LYS				
Sh	CA-II	LYS-ASN-ARG-GLN-VAL-ARG-VAL-PHE-PRO-LYS				
Hu	CA-I	LYS-GLY-ARG-THR-VAL-ARG-ALA-SER-PHE				
Hu	CA-II	LYS-ASN-ARG-GLN-ILE-LYS-ALA-SER-PHE-LYS				

Eq : equine

Bo : bovine

Hu : human

Sh : sheep

- References :
- Eq CA-I : Jabush and Deutsch (50)
 - Eq CA-II : Jabush and Deutsch (Personal communication)
 - Bo CA-II : Sciaky (85)
 - Bo CA-III : Tashian (102)
 - Hu CA-I : Lin and Deutsch (63)
 - Hu CA-II : Lin and Deutsch (65)
 - Sh CA-II : Tains (98)

レオニンである。この三者に関しては現在まで報告されている動物のすべてのCAアイソザイムにおいて同じ位置に同じアミノ酸が存在している。しかし、64番のアミノ酸に関してはCA-Ⅲ以外のアイソザイムではすべてヒスチジン残基であったのに対し、ウシとヒト(101)のCA-Ⅲではリジン残基であり今回検索したウマのCA-Ⅲではアルギニン残基であった。この64番の活性に関与するアミノ酸残基がヒスチジンではなく、アルギニン又はリジンになっていることがCA-Ⅲの特徴であり、他のアイソザイムに比べてCO₂水和活性やエステラーゼ活性が低い原因であるのかもしれない。Tashian(81)らは、ヒトCA-Iの67番目の残基はヒスチジンでヒトCA-IIではアスパラギン、91番目はCA-Iではフェニールアラニン、CA-IIではバリンであるのに対し、ウシやヒトのCA-Ⅲでは67番と91番の両方ともアルギニン残基であるとした。これらのアルギニンは2-3-ブタンジオンで化学修飾するとCA-Ⅲの活性が上昇することが報告され、両者のアルギニン残基がCA-ⅢのH₂CO₃脱水活性の低い原因であることが示唆された(81)。さらに、Whitney(106, 107)は、ヒトCA-Iの67番目のヒスチジン残基を修飾すると活性が低下することを報告している。しかし、67番目がヒスチジン残基であるのはヒトCA-Iのみであった。

ウマのCA-Ⅲに関しては、91番目はアルギニン残基であり67番目は確定はできなかったがアルギニン残基であることはほぼ確実であり、64番目のアルギニンと同様にウシとヒトのCA-Ⅲで報告されているような酵素活性を低下させている残基である可能性が強い。

CAに対して非常に強い阻害剤であるアセタゾールアミドのCAとの結合についてX線解析を行なった結果、ヒトCA-Iでは91番目のフェニールアラニン残基、121番目のアラニン残基、131番目のロイシン残基の疎水性残基にアセタゾールアミドが結合していると報告されている(29,55)。ウマのCA-Ⅲにおいては、91番目はアルギニン残基、121番目がバリン残基、131番目がチロシン残基というように親水性残基が多いことがウマCA-Ⅲの阻害剤に対する親和性の少ない原因と言える。

一方、アデニルキナーゼは、その三次構造の解析から1個のリジン残基、1個のヒスチジン残基、6個のアルギニン残基がATPとAMPのリン酸と結合しているか、又は接していると報告されている(86)。さらに、Riordan(83)らは、9種類の解糖系酵素とアルカリフォスファターゼそしてアデニルキナーゼの活性中心であるアルギニン残基は負荷電の基質又は補酵素の結合部位として働く陽荷電の残基である

とした。これらのことと、CA-IIIにはアルギニン残基が多く、そしてアルカリフォスファターゼ活性を持つことから64番、67番、91番のアルギニン残基は陰性荷電のリン酸を中和してその輸送に役立っているものと考えられる。

他方、芳香族アミノ酸は蛋白質の三次構造の維持に役立ち、活性中心腔の安定性の維持に働くと考えられている(100)。各々のCAアイソザイムを比較すると、アミノ酸配列番号で5、7、16、51、70、88、93、97、123、128、176、179、191、192、194、209の位置に存在するアミノ酸残基はすべてのアイソザイムにおいてトリプトファン、チロシン、フェニールアラニンであり、CAの持つ共通性と特性を良く示した。

8種類のCAアイソザイムの一次構造を比較してみると[Table 18]、同じ位置に同じアミノ酸が位置しているのは260残基中85残基(32.7%)であった。しかし、ひとつひとつを比較した場合、ウマCA-IIIとウマCA-Iの一次構造のホモロジーは55.3%、ウマCA-IIIとウマCA-IIは57.3%、ウマCA-IとウマCA-IIは62.1%であった。すなわち、ウマCA-IとウマCA-IIのホモロジーはCA-IIIに対してよりも高い割合を示した[Table 19]。ウシCA-IIIとウマCA-IIIのアミノ酸配列は86.6%と高いホモロジーを示した。ウシCA-IIとウマCA-IIは81.2%、ヒトCA-IとウマCA-Iは80%、ウマCA-IIとヒトCA-IIは86.2%のホモロジーを示した。

すなわち、アイソザイムの種類が異なった場合、また、それが動物の種類が異なっている場合でも約50~60%のホモロジーを示し、同一機能を持つ酵素内で非常に良く配列順序が保存されていた。さらに、動物の種類が異なってもアイソザイムの種類が同じ場合、ホモロジーはおおよそ80~87%とさらに高率に保存されていることが示された。また、同じタイプのアイソザイム間での比較ではCA-IIIどうしのホモロジーが一番高かった。ウマに関しては、CA-IIIとのホモロジーよりもCA-IとCA-IIのホモロジーの割合が高いことから、CA-IIIはCA-IとCA-IIの祖先に位置するアイソザイムである可能性を強く示唆した。

蛋白質のアミノ酸配列を決定する情報はDNAの塩基配列に含まれており、この情報がメッセンジャーRNAに移されて蛋白質合成の際に一次構造上に反映されている。

DNAには4個の塩基、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルが存在し、そのうちの3個の塩基配列が1つのアミノ酸に対応する情報となっている。すなわち、点突然変異が起こりDNAの1塩基対が変化し、他の塩基対に置換されたりすると、蛋白質のアミノ酸配列にも変化を生じることがある。このような1塩基対置換は、祖先を同じくする蛋白質では最も普通にみられる変化で、2塩基対置換は比較的少なく、3塩基

Table 19. Homology between the amino acid sequences of mammalian carbonic anhydrase isozymes.

Eq CA-III	:	Eq CA-I	55.3 %
Eq CA-III	:	Eq CA-II	57.3 %
Eq CA-I	:	Eq CA-II	62.1 %
Eq CA-III	:	Bo CA-III	86.6 %
Eq CA-III	:	Bo CA-II	55.3 %
Eq CA-III	:	Sh CA-II	54.9 %
Eq CA-III	:	Hu CA-I	53.7 %
Eq CA-III	:	Hu CA-II	57.3 %
Eq CA-II	:	Bo CA-II	81.2 %
Eq CA-II	:	Hu CA-II	86.2 %
Eq CA-I	:	Hu CA-I	80.0 %
Bo CA-III	:	Bo CA-II	54.6 %
Hu CA-I	:	Hu CA-II	59.2 %

4-5

蛋白質の化学修飾は、分子機能に與りするアミノ基を修飾する目的や、細胞内におけるアミノ酸の存在状態の調節にも與りされている。

蛋白質のアミノ基のアセチル化に用いられる試薬に酢酸酐がよいといわれている(57)。今回の実験ではエステラーゼ活性の測定に用いた、 $\text{pH} 9.0$ が高いが、

Eq CA-II は高エステラーゼ活性を持ち、 $\text{pH} 9.0$ によってアセチル化されず、Eq CA-I は若くアセチル化された。Eq CA-III はエステラーゼ活性が低い。特に高 pH によりアセチル化されている。このうち三者のアイソザイムの大きな違いである。Eq CA-II のリンのメーアミノ基がアセチル化されると酵素活性は低下している。2 個のリン基

対置換となるとまれであるとされている。

ウマ CA-II と CA-III のアミノ酸配列が一致していない部位は約 43 % であり、その一致しないアミノ酸の塩基配列を比較すると、87個のアミノ酸において1塩基対置換が起っており、残りの22個のアミノ酸には2塩基対置換が起っており、3塩基対置換は存在しなかった。

2塩基対置換が存在したアミノ酸残基番号は、19、27、38、39、50、53、67、80、111、112、129、130、133、155、159、166、173、175、187、204、224、230番であった。さらに、ウマの CA-I と CA-II との間にも3塩基対置換は存在しなかった。

蛋白質の進化の過程で非常に重要な役割を果たしているのが遺伝子の重複という現象である。進化の過程で蛋白質の活性中心に変化が起り、本来の生理機能を失うような突然変異は自然選択により除去されてしまう。そこで同じ蛋白質を作る遺伝子が偶然にいくつか出現し、その中のいくつかの変化は生物の機能にとっては不利なものとなりその存在価値を失ってしまっても他の遺伝子が必要な蛋白を作り生体の生理機能が維持できると考えられている。このような余分な重複遺伝子の中での変異が蓄積し、さらに変異を繰り返すうちに新しい機能を備えるに至ると考えられている。CA アイソザイムに関しては、活性中心であるヒスチジン残基は動物種やアイソザイム型の違に関係なくすべて同じで、非常によく保存されている。すなわち、これらのことからまず活性値の低い CA-III を合成する遺伝子が確立し、進化の過程で遺伝子の重複が起り、それに続いて点突然変異が 64 番、67 番のアミノ酸を支配する DNA の塩基対に生じ、ヒスチジンに変換したことにより高活性型の CA-I と CA-II を合成する遺伝子が出現したと考えられる。

IV-5. CA-III の化学修飾

蛋白質の化学修飾は、分子機能に関与するアミノ酸残基を同定する目的や高次構造におけるアミノ酸残基の存在状態の識別にも利用されている。

蛋白質のアミノ基のアセチル化に用いられる試薬には無水酢酸がよく用いられているが(57)、今回の実験ではエステラーゼ活性の測定に用いた p-NPB を用いた。

ウマ CA-II は高エステラーゼ活性を持ち p-NPB によってはアセチル化されず、CA-I は若干アセチル化された。CA-III はエステラーゼ活性は低く、逆に基質によりアセチル化されている。この点も三者のアイソザイムの大きな違いである。CA-III のリジンの ϵ -アミノ基がアセチル化されると酵素活性は低下している。2個のリジン残基

がアセチル化されると、 CO_2 水和活性は 65 % 失われ、3個修飾されるとさらに 8 % の活性が失われ、4個修飾されるとさらに 4 % の活性が失われた。

すなわち、最初の2個のリジンがアセチル化されることにより活性は急激に低下し、それ以後は修飾されるリジンの数が増えても活性値は急激には低下しなかったことから、最初に修飾されるリジンがより重要な意味を持つものと考えられた。しかしながら、この2個のリジンのアミノ酸配列中の位置はペプチドマップ法では決定できなかった。

一方、Carter (19) らはスルファミドは CA-I、CA-II を阻害するが CA-III は阻害しないのに対し、カルバミールリン酸は3種類のアイソザイムをすべて阻害する唯一の生体内物質であることを報告した。今回、カルバミールリン酸を用い CA-III の阻害について実験を行った結果、CA-III のリジンがカルバミール化されホモシトルリンを形成することを見出した。アセチル化と同様にリジン残基の修飾により活性値は低下し等電点も低下した。CA-I と CA-II については実験は行なわなかったが同様にカルバミール化されると考えられる。

IV-6. CA-III の生物学的特性

ヒト CA-II をウサギ、ヤギ、ウマに免疫した場合、これらの動物では抗体価の高い抗血清を作らないことが報告されている (32)。今回の実験においても、一羽のウサギでは 10^4 と低い値の抗血清が作出され、他の3羽では 10^5 とわずかに高い値を示したが満足いく抗体価ではなかった。さらに3羽のウサギを用いてアジュバントを Bacto Adjuvant complete H37 Ra に変えて免疫を行ったが結果は前回と同じであった。このことは、この抗血清がウサギの筋肉抽出液や肝臓抽出液と反応しないことから考えて、自己抗体を作らないために抗体価が上がらないものと思われる。

ヒト CA-I と CA-II の一次構造は約 60 % が類似しているが、免疫学的には交叉反応を示さないことから各々のアイソザイムは免疫化学的に定量が可能で臨床診断にも応用されている (32, 34)。今回作成した抗ウマ CA-III 血清はウマ CA-I 及び CA-II とは寒天ゲル内で交叉反応をしないことから、この抗体を用いれば CA-III の定量が可能であることを示した。

しかし、一方では Erickson (28) らのようにモノクローナル抗体を用いた免疫沈降反応の抑制試験の結果、CA-I と CA-II は強い交叉反応を示し、CA-III と CA-I、

CA-IIIと CA-IIは弱い反応を示したという報告もある。

CA-IIIの臓器分布を検索するために、オクタロニー法でまず赤血球の Tuchihasi extract を検査した。赤血球との間には沈降線は形成されなかったことから各臓器中に含まれる赤血球は影響を及ぼさないことが分かり、各臓器は完全には血液を除去しなかった。次に、21種類のウマ臓器を用いて検索した結果、筋肉と肝臓および胸腺中に CA-IIIを検出した。CA-IIIの臓器分布について、Heath (44) らはヒトの筋肉以外では赤血球中に存在することを示し、Carter (17) らは雄ラットの肝臓中に CA-IIIを検出している。Shima (89) は、ヒトの筋肉の湿重量 1g 中に 5 mg の CA-III が存在し、心筋、赤血球、胸腺、肝臓、脊髄、末梢神経中には約 10 ng/g の CA-III が存在することを報告している。

ウマ CA-IIIの臓器含量を EIA法で定量した結果、ウマ筋肉の湿重量の 1g 中に 530 μ g の CA-III が存在し、肝臓 1g 中には 300 μ g、胸腺では 16.5 μ g が存在していた。他の臓器は、Table 6 に示したように平均で 57.3 ng/g であった。ウマの筋肉中に存在する CA-III は 1g 当りでは、ヒトの約 1/10 量である。しかし、ウマの肝臓中にはヒトの約 30 倍も含まれていた。Carter (15) はヒト筋肉抽出液から得た蛋白質の 10% は CA-III であるとし、Shima (89) らは 15%、Jeffery (52) は 16% 存在すると報告した。一方、ブタ (87)、ウサギ (80) の筋肉中では、2~3% 存在すると言われていることから、ヒト筋肉中には非常に多く含まれているものと言える。雄のラット肝臓中に存在する CA-III は、雌には存在しないが (17) ウマ、ウシ、ネコの場合、雄と雌の肝臓に存在していた。Carter (17) らは、ラットの筋肉から精製した CA-III と肝臓から精製した CA-III の一次構造の比較を行い、現在まで 78 番から 92 番までの 15 残基の結果はすべて同じアミノ酸が位置しているとしさらに免疫学的にも両者は一致しているとした。

肝臓に存在する CA-III は赤血球中に含まれる CA-III の影響が動物の種類によっては考えられるが (88,44)、ウマの場合赤血球中のヘモグロビン 1g 中に 319.2 ng 存在しており、この量はヒトの赤血球中の CA-I が約 13.3 mg/g ヘモグロビン、CA-II は約 1.77 mg/g ヘモグロビンであることから (32)、1/5550 から 1/4170 と極めて少ない値でありその影響は考えられない。

Shima (89) の結果と、ヒトの赤血球中の CA-III とウマの赤血球中に存在する CA-III の比較は明らかに少なかった。また、ヒトの赤血球中の CA-III の量に比べて 1/10 も少ないことが説明できる。

IV-7. CA-IIIの組織局在と生理的意義

骨格筋は生後の機能分化に伴って、速く収縮する筋肉すなわち白筋線維 (Type II) と遅く収縮する筋肉の赤筋線維 (Type I) に分化し、この両者はエネルギー源である ATP の生産様式が異なっており、それに適応した酵素が分布している。白筋線維は迅速な収縮、弛緩を行なうために筋形質や多糖体に富み嫌氣的解糖系酵素が強力であるのに対し、赤筋線維はミトコンドリアにある TCA 回路から産生される ATP を利用し、脂質に富み一般に酸化還元酵素活性が強く、多くのミオグロビンも含み酸素に対する親和性が強く、筋肉内で酸素の貯蔵系として働くと言われている (77)。Guth (39) らは、白筋線維のミオシン ATP ase 活性はアルカリ (pH 10.4) に安定であるが、酸性 (pH 4.5) に対しては不安定であるのに反し、赤筋線維の Ca-ATP ase はアルカリ性に対して不安定で、酸に対しては相対的に安定であることを示した。

ウマの骨格は、ミオシン ATP ase (pH 9.4) とコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性の分布に従って 3 つの線維型、すなわち fast twitch fiber (速筋線維)、fast twitch high oxidative fiber (中間筋線維)、slow twitch fiber (遅筋線維) に分類されている (92)。Stull (94) らは、3才馬の大腿二頭筋は、サラブレッドが一番多くの遅筋線維を含んでおり、3種類の線維含量の比率は遅筋線維 36 %、中間筋線維 40%、速筋線維 24 % であると報告している。しかし、成獣になると、サラブレッドの中臀筋では、遅筋線維 12.5 %、中間筋線維 50.7 %、速筋線維 36.8 % であり、ポニーでは遅筋線維 22.5 %、中間筋線維 40.4 %、速筋線維 37.1 % であると報告されている (92)。CA-III は赤筋線維に含まれていると報告されてきたが (47, 48, 72)、免疫組織学的に CA-III の局在を明確にしたのは Shima (88, 89) らによってである。すなわち、ヒト CA-III はミオシン ATP ase の染色される白筋線維には局在せず逆にミオシン ATP ase の染色されない赤筋線維に CA-III を検出している。そして、用いた大腰筋では CA-III の染色された線維が非常に多く示された。サラブレッドの中臀筋を用いた免疫組織化学の結果からは、他の酵素の染色が不可能であったことから、染色された CA-III の局在する線維の種類は断定できないが CA-III の局在する線維が非常に少ないことから考えて明らかに遅筋線維 (赤筋線維) であると考えられる。Shima (88, 89) らの結果と、今回のウマの結果を比較するとウマ筋肉に存在する遅筋線維の比率は明らかに少なかった。このことから CA-III の含有量がヒトのそれに比べ 1/10 も少ないことが説明できる。

Aickinと Thomas (1) は、赤筋線維は白筋線維よりも CO_2 緩衝作用は3倍も強いことを示し、そして、赤筋線維の膜電位は白筋線維のそれよりも CO_2 量の変化に対してより敏感であることを明らかにし赤筋線維においては CO_2 の調節が強く要求されることを報告した。以上のことから、ウマの筋肉においても、遅筋線維内では、 CO_2 濃度と pH の調節のために CA-III が作用していると考えられる。

IV-8. CA-III の測定意義と臨床応用

ヒトの CA-III は、骨格筋に圧倒的に多く存在し、主として可溶性画分に存在することから各種筋疾患のマーカー蛋白となる可能性が考えられている。Shima (89), Cater (16, 18), Heath (41, 43) らは、ヒト血清中の CA-III の定量を行ない、正常値は約 60 ng / ml 以下とし、デュシエンヌ型筋ジストロフィーの患者血清には平均 900 ng / ml と高い値を示し、さらに多発性筋炎、肢帯型筋ジストロフィー等で 400 ~ 800 ng / ml と高い値を示すことを報告している。特に、CA-III が Type I fiber に局在することから、Type I fiber の異常が主病変である筋疾患では CPK よりも良いマーカー蛋白となることが期待されている。

ヒトの CA-III の微量測定には、ラジオイムノアッセイ (RIA) が主体であるが (97)、アイソトープは半減期、廃棄物、使用施設等の制約があるため、今回は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた酵素イムノアッセイ (EIA) の測定系を開発した。CA-III の EIA については今だ報告はなく、さらにヒト以外では血清中の CA-III を測定した報告もない。今回、EIA でウマ血清中の CA-III を測定した結果、乗馬用のウマ血清中には 5 ng / ml 以下とほとんど CA-III は存在せず、競走馬では 5 ~ 20 ng / ml であった。例数は少ないが競走馬ではトレーニングの前後で値が変動する傾向が認められた。さらに、肉用馬 (重種) では 1 例について 1.38 μg / ml と非常に高値を示す症例を発見した。CPK も同時に測定したが、その値は CA-III とは相関せず、Shima (89) らのヒトでの報告と一致した。しかし、ウマの場合 CA-III は肝臓にも存在することから肝疾患と筋疾患の類症鑑別が必要である。

しかしながら、興味ある点は競走馬を育成する過程でトレーニング行なうと、CA-III の濃度が変化する可能性が示唆されたことである。Snow (92) らは、ウマの

筋肉組織を ST (遅筋線維)、FTH (中間筋線維)、FT (速筋線維)、の3種類の線維に分類し、STの多い筋肉を持つ馬は持久力走に適していることを示唆し、競走能力と筋線維との関係について研究を進めている。このように、運動生理学的にも筋線維と運動能力とは高い相関が示されていることから、遅筋線維 (ST) に局在する CA-III を血清中で測定することは、疾患の診断のみならず競走馬のトレーニング状態や、競走能力の判定や、筋肉の疲労度の判定に意義があると考えられる。

V 結 論

ウマの筋肉から炭酸脱水酵素を精製し結晶化に成功した。精製された炭酸脱水酵素は分析結果から、第三のアイソザイムである CA-III であると結論し、各種分析の結果次の成績を得た。

1. CA-IIIの CO_2 水和活性は、CA-I の 1/7、CA-IIの1/74であった。CA-IIIのエステラーゼ活性は、CA-IIの1/103、CA-Iの1/65であった。さらに、酸性フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼ活性も存在した。
2. CA-IIIの分子量は、ゲル濾過法で 27,000、SDS-PAGEで 26,500 の単量体酵素であった。
3. CA-IIIの等電点は 8.9で、グルタチオンがシステインに結合することにより等電点 8.1の CA-III aが形成されたと推察した。
4. CA-IIIのアミノ酸総数は 259残基で、システイン残基とアルギニン残基の数が他のCAアイソザイムに比べて多かった。
5. CA-IIIの極大吸収は 280 nmにあり、 $E_{280}^{1\%}$ は 15.5 であった。
6. CA-IIIは亜鉛を含有する金属酵素であった。
7. CA-IIIは易熱性酵素であった。
8. CA-IIIは筋肉 (530 $\mu\text{g/g}$ wet tissue)と肝臓 (300 $\mu\text{g/g}$ wet tissue)に多く存在し、筋肉組織においては遅筋線維に局在していた。
9. 抗ウマ CA-III血清は CA-I と CA-IIとは反応しないで CA-IIIのみと反応した。
10. 抗ウマ CA-III血清はウシ、イヌ、ネコ、ラットの筋肉抽出液と反応し、肝臓に関しては、ウシの雌雄と雄の去勢、ネコの雌雄、ラットの雄、去勢した雄のブタの肝臓抽出液であった。
11. CA-IIIをトリプシン分解して作製したペプチドマップでは26個のスポットが検出された。シトラコニール化した CA-IIIにおいては、15個のスポットが検出された。
12. CA-IIIの一次構造を決定した結果、CA-I とは 55.3%、CA-IIとは 57.3%の相似性があり、ウシ CA-IIIとは 86.6%の相似性があった。CA-IIIの活性中心は、他のCAアイソザイムと同様 94番、96番、119番に位置するヒスチジンであった。

13. 64番、67番、91番目の活性に關与するアミノ酸がアルギニン残基であることが CA-IIIの活性の低い原因と考えられた。
14. CA-IIIのリジンはアセチル化された結果、等電点は低下し活性も低下した。
15. カルバミール化された CA-IIIは等電点が下り活性値も低下した。
16. CA-IIIのE I Aの測定系を開発し、ウマ血清中の CA-IIIを定量し臨床診断への応用の可能性のあることを見出した。

VI 謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導御校閲を賜りました麻布大学獣医学部生理学第一講座、藤岡富士夫教授、実験に際し御指導を賜りました、ウイスコンシン州立大学、H.F.Deutsch 教授、麻布大学獣医学部生理学第一講座、松下博治助教授に対し深く感謝の意を表します。また、実験材料を提供していただいた関係各位に感謝いたします。さらに、麻布大学獣医学部生理学第一講座の教室員各位に感謝いたします。

参 考 文 献

- (1) Aickin, C.C., and Thomas, R.C. 1977. Micro-electrode measurement of the intracellular pH and buffering power of mouse soleus muscle fibers. *J. Physiol.* 267 : 791-810.
- (2) Aldridge, W. N. 1953. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate , propionate and butyrate , and a method for their determination. *Biochem. J.* 53 : 110-117.
- (3) Aldridge, W. N. 1953. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 53 : 117-124.
- (4) Anderson, B., Nyman, P.O., and Strid, L. 1972. Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48 : 670-677.
- (5) Armstrong, J. M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., and Edsall, J. T. 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 241 : 5137-5149.
- (6) Bencze, W.L., and Schmid, K. 1957. Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. Chem.* 29 : 1193-1196.
- (7) Benisek, W.F., Raftery, M.A., and Cole, R.D. 1967. Reductive cleavage of acrylproline peptide bonds. *Biochemistry* 6 : 3780-3790.
- (8) Bernstein, R. S., and Schraer, R. 1972. Purification and properties of an avian carbonic anhydrase from the erythrocytes of gallus domesticus. *J. Biol. Chem.* 247 : 1306-1329.
- (9) Blackburn, M. N., Chirgwin, J. M., James, T., Kempe, T. D., Parsons, T.F., Register, A.M., Schnackerz, K.D., and Noltmann, E. A. 1972. Pseudoisoenzymes of rabbit muscle phosphoglucose isomerase. *J. Biol. Chem.* 247 : 1170-1179.
- (10) Bray, R.P., and Deutsch, H.F. 1977. Primary structural studies of equine low activity carbonic anhydrases. *Fed. Proc.* 36 : 739.
- (11) Carter, M.J., 1972. Carbonic anhydrase : isozymes, properties, distribution and functional significance. *Biol. Rev.* 47 : 465-513.

- (12) Carter, N.D., and Auton, J. A. 1975. Characterization of carbonic anhydrases from tissues of the cat. *Biochim. Biophys. Acta* 410 : 220-228.
- (13) Carter, N.D., and Auton, J.A. 1976. Evidence for high (CA-II) and low activity (CA-I) carbonic anhydrase isoenzymes in the dog. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B : 461-464.
- (14) Carter, N.D., Shiels, A., and Tashian, R.E. 1978. Carbonic anhydrase III isoenzyme from human and bovine muscle. *Biochem. Soc. Trans.* 16 : 552-553.
- (15) Carter, N.D., Jeffery, S., Shiels, A., Edwards, Y., Tipler, T., and Hopkinson, D.A. 1979. Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochem. Genet.* 17 : 837-854.
- (16) Carter, N.D., Heath, R., and Jeffery, S. 1980. Serum carbonic anhydrase III in duchenne dystrophy. *Lancet* 2 : 542.
- (17) Carter, N.D., Hewett-emmett, D., Jeffery, S., and Tashian, R.E. 1981. Testosterone-induced, sulfonamide-resistant carbonic anhydrase isozyme of rat liver is indistinguishable from skeletal muscle carbonic anhydrase III. *FEBS Letters* 128 : 114-118.
- (18) Carter, N.D., Heath, R., and Jeffery, S., and Rodeck, C. 1982. Fetal plasma carbonic anhydrase III in duchenne dystrophy. *Lancet* 2 : 39-40.
- (19) Carter, N.D., Shiels, A., Jeffery, S., Chegwidden, W.R., Hewett-Emmett, and Tashian, R.E. 1983. Similar inhibition of carbonic anhydrase isozymes I, II and III by carbamyl phosphate. *Fed. Proc.* 42 : 1664.
- (20) Deustch, H.F., Taniguchi, N., Funakoshi, S., and Hirai, H. 1972. Distribution of erythrocyte carbonic anhydrase B-type alleles in Japanese farm horses. *Biochem. Genet.* 6 : 255-262.
- (21) Deutsch, H.F., Funakoshi, S., Fujita, T., Taniguchi, N., and Hirai, H. 1972. Isolation in crystalline form and properties of six horse erythrocyte carbonic anhydrases. *J. Biol. Chem.* 247 : 4499-4502.
- (22) Deutsch, H.F., and Bary, R.P. 1975. Carbonic anhydrase isozymes in

- American ponies and riding horses : A new polymorphic high-activity type isozyme. *Biochem. Genet.* 13 : 643-649.
- (23) Deutsch, H.F., Jabusch, J.R., and Lin, K.D. 1977. Purification and properties of a polymorphic high activity equine erythrocyte carbonic anhydrase . *J. Biol. Chem.* 252 : 555-559.
- (24) Edman, P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4 : 283-293.
- (25) Edman, P., and Begg, G. 1967. A protein sequenator. *Europe. J. Biochem.* 1: 80-91.
- (26) Ellman, G.L. 1958. A colorimetric method for determining low concentration of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74 : 443-450.
- (27) Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 : 70-77.
- (28) Erickson, R.P., Kay, G., Hewett-Emmett, D., Tashian, R. E., and Claflin, J. L. 1982. Cross-reactions among carbonic anhydrase I, II, and III studied by binding tests and with monoclonal antibodies. *Biochem. Genet.* 20 : 809-819.
- (29) Fridborg, K., Kannan, K.K., Liljas, A., Lundin, J., Strandberg, B., Strandberg, R., Tilander, B., and Wiren, G. 1967. Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase C.III. Molecular structure of the enzyme and of one enzyme-inhibitor complex at 5.5A° resolution. *J. Mol. Biol.* 25 : 505-516.
- (30) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1963. Human carbonic anhydrases. I. Isolation and demonstration of isozymes in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 243 : 6474-6481.
- (31) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1969. Human carbonic anhydrases. II. Some physicochemical properties of native isozymes and of similar isozymes generated in vitro. *J. Biol. Chem.* 244 : 3438-3446.
- (32) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1970. Human carbonic anhydrases. III. Immunochemical studies. *J. Biol. Chem.* 245: 2852-2856.
- (33) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1970. Human carbonic anhydrases. IV. Properties of mutant B type isozyme. *J. Biol. Chem.* 245: 4913-

4919.

- (34) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1971. Human carbonic anhydrases. V. Levels in erythrocytes in various states. *J. Lab. Clin. Med.* 77: 39-45.
- (35) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1971. Animal carbonic anhydrase isozymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 489-498.
- (36) Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1971. Human carbonic anhydrases. VI. Levels of isozymes in old and young erythrocytes and in various tissues. *J. Biol. Chem.* 246: 1088-1092.
- (37) Furth, A. J. 1968. Purification and properties of horse erythrocyte carbonic anhydrases. *J. Biol. Chem.* 243: 4832-4841.
- (38) Gross, E. 1967. The cyanogen bromide reaction. pp. 238-255. In : *Methods in Enzymology*. 11. (Hiss, C.H.W. ed.) Academic Press, New York.
- (39) Guth, L., and Samaha, F. J. 1967. Qualitative differences between actomyosin ATP-ase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.* 25 : 138-145.
- (40) Headings, V., and Tashian , R.E. 1971. Isoenzymes of carbonic anhydrase I from primate red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 236: 353-359.
- (41) Heath, R., Brown, I., Jeffery, S., and Carter, N.D. 1982. Radioimmunoassay of carbonic anhydrase III levels in plasma as an index of tissue damage. *Biochem. Soc. Trans.* 10 : 109-110.
- (42) Heath, R., Jeffery, S., and Carter, N.D. 1982. Radioimmunoassay of human muscle carbonic anhydrase III in dystrophic states. *Clinica Chimica Acta* 119 : 299-305.
- (43) Heath, R., Schwartz, M., Brown, I., and Carter, N.D. 1983. Carbonic anhydrase III in neuromuscular disorders. *J. Neurol. Sci.* 59 : 383-388.
- (44) Heath, R., Carter, N.D., Hewett-Emmett, D., Fincanci, E., Jeffery, S., Shiels, A., and Tashian, R. E. 1983. Human erythrocytes contain a protein with properties indistinguishable from skeletal muscle

- carbonic anhydrase III. Fed. Proc. 42: 2467.
- (45) Henderson, L.E., Henriksson, D., and Nyman, P.O. 1973. Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52 : 1388-1394.
- (46) Henriksson, D., Tanis, R.J., and Tashian, R.E. 1980. The amino acid sequence of carbonic anhydrase I from the rhesus macaque. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96 : 135-142.
- (47) Holmes, R.S. 1976. Mammalian carbonic anhydrase isozymes : evidence for third locus. J. Exp. Zool. 197 : 289-295.
- (48) Holmes, R.S. 1977. A comparative electrophoretic analysis of mammalian carbonic anhydrase isozymes : Evidence for third isozyme in red skeletal muscles. Comp. Biochem. Physiol. 57B: 117-120.
- (49) Holmes, R.S. 1977. Purification, molecular properties and ontogeny of carbonic anhydrase isozymes. Evidence for A, B and C isozymes in avian and mammalian tissues. Eur. J. Biochem. 78 : 511-520.
- (50) Jabusch, J.R., Baray, R.P., and Deutsch, H.F. 1980. Sequence of the low activity equine erythrocyte carbonic anhydrase and delineation of the aminoacid substitutions in various polymorphic forms. J. Biol. Chem. 255: 9196-9204.
- (51) Jabusch, J.R., and Deutsch, H.F. 1983. Isolation and crystallization of ubiquitin from mature erythrocytes. Preparative Biochem. 13: 261-273.
- (52) Jeffery, S., Edwards, Y., and Carter, N.D. 1980. Distribution of CA-III in fetal and adult human tissue. Biochem. Genet. 18: 843-849.
- (53) Kageoka, T., Hewett-Emmett, D., Stroup, S.K., Yu, Y.L., and Tashian, R.E. 1981. Amino acid substitution and chemical characterization of japanese variant of carbonic anhydrase I: CA I Hiroshima-I (86 Asp -Gly). Biochem. Genet. 19: 535-548.
- (54) Kannan, K.K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lovgren, S., Ohlsson, A., and Petef, M. 1975. Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B. Three-dimensional structure at a nominal 2.2-A resolution. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 51-55.

- (55) Kannan, K.K., Vaara, I., Notstrand, B., Lovgren, S. Borell, A., Fridborg, K., and Petef, M. 1977. Structure and function of carbonic anhydrase: comparative studies of sulphonamide binding to human erythrocyte carbonic anhydrase B and C. pp. 73-91. In: The drug action at the molecular level. (Roberts, G.C.K. ed.) Univ. Park Press, Baltimore.
- (56) Keilin, D., and Mann, T. 1939. Carbonic anhydrase. *Nature*. 144: 442-443.
- (57) Kim, H.S., Abe, T., and Tamiya. 1980. The acetylation of the amino groups of laticauda semifasciata III, a sea snake venom component. *J. Biochem.* 88: 889-893.
- (58) King, R. W., Garge, L.C., Huckson, J., and Maren, T.H. 1974. The isolation and partial characterization of sulfonamide resistant carbonic anhydrases from the liver of the male rat. *Mol. Pharmacol.* 10: 335-343.
- (59) Koester, M.K., Register, A.M., and Noltmann, A. 1977. Basic muscle protein, a third genetic locus isozyme of carbonic anhydrase ? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 196-204.
- (60) Koester, M.K. 1979. Is carbonic anhydrase III also an acid phosphatase ? *Fed. Proc.* 38: 727.
- (61) Lal, C. G. 1974. The effect of sex hormones on rat liver carbonic anhydrase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 189: 557-562.
- (62) Lin, K.D., and Deutsch, H.F. 1972. Human carbonic anhydrases. VIII. Isolation and characterization of a polymorphic form of a C type isozyme. *J. Biol. Chem.* 247: 3761-3766.
- (63) Lin, K.D., and Deutsch, H.F. 1973. Human carbonic anhydrases. X.
- (75) Preparation of large peptide fragments of carbonic anhydrase B used for sequence studies. *J. Biol. Chem.* 248: 1881-1884.
- (64) Lin, K.D., and Deutsch, H.F. 1973. Human carbonic anhydrases. XI.
- (78) The complete primary structure of carbonic anhydrase B. *J. Biol. Chem.* 248: 1885-1893.
- (65) Lin, K.D., and Deutsch, H.F. 1974. Human carbonic anhydrases. XII.

- The complete primary structure of the C isozyme. *J. Biol. Chem.* 240: 2329-2337.
- (66) Lindskog, S., Henderson, L.E., Kannan, K.K., Liljas, A., Nyman, P. O., and Strandberg, B. 1971. Carbonic anhydrase . pp. 587-665. In : *Enzyme*, (Boyer, P.D. ed.) Academic Press, New York.
- (67) Maynard, J.R., and Coleman, J.E. 1971. Elasmobranch carbonic anhydrase. Purification and properties of the enzyme from two species of shark. *J. Biol. Chem.* 246. 4455-4464.
- (68) Maren, T.H., Ellison, A.C., Fellner, S.K., and Graham, W.B. 1966. A study of hepatic carbonic anhydrase. *Mol. Pharmacol.* 2 : 144-157.
- (69) Meldrum, N.U., and Roughton, F.J.W. 1933. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.* 80: 113-142.
- (70) Moore, M.J., Funakoshi, S., and Deutsch, H.F. 1971. Human carbonic anhydrases. VII. A new C type isozyme in erythrocytes of American negroes. *Biochem. Genet.* 5: 497-504.
- (71) Moore, M.J., and Deutsch, H.F., and Ellis, F.R. 1973. Human carbonic anhydrases. IX. Inheritance of variant erythrocyte forms. *Amer. J. Hum. Genet.* 25: 29-35.
- (72) Moynihan, J.B. 1977. Carbonic anhydrase activity in mammalian skeletal and cardiac muscle . *Biochem. J.* 168: 567-569.
- (73) Nakane, P.K., and Kawaoi, A., 1974. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1084-1091.
- (74) Nostrand, B., Vaara, I., and Kenman, K.K. 1975. Structural relationship of human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes B and C. pp. 575-599. In: *Isozymes*, 1. (Markert, C.L. ed.) Academic Press, New York.
- (75) Nyman, P., and Lindskog, S. 1964. Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochim. Biophys. Acta* 85: 141-151.
- (76) Osborne, W.R.A., and Tashian, R.E. 1975. An improved method for the purification of carbonic anhydrase isozyme by affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 64: 297-303.

- (77) Pearson, C.M. 1967. Basic and clinical aspects and illustrative new disease. *Ann. Int. Med.* 67: 614-650.
- (78) Persijin, J.P., and Jonker, K.M. 1978. A terminating reagent for the peroxidase-labelled enzyme immunoassay. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16: 531-532.
- (79) Plapp, B. V., Moore, S., and Stein, W.H. 1971. Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified aminogroups. *J. Biol. Chem.* 246: 939-945.
- (80) Register, A.M., Koester, M. K., and Noltmann, E.A. 1978. Discovery of carbonic anhydrase in rabbit skeletal muscle and evidence for its identity with " Basic muscle protein " *J. Biol. Chem.* 253: 4143-4152.
- (81) Richard, E., Tashian, J.T., Johansen, T., and Christiansen, E. 1980. Activation of muscle carbonic anhydrase III by modification of arginyl residues. *Fed. Proc.* 39: 1855.
- (82) Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., and Edsall, J.T. 1964. Carbonic anhydrases from erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 239 : 1065-1078.
- (83) Riordan, J.F., Mcelvany, K.D., and Borders, C.L. 1977. Arginyl residues : Anion recognition sites in enzymes. *Science* 195 : 884-886.
- (84) Sandberg, K. 1968. Genetic polymorphism in carbonic anhydrase from horse erythrocytes. *Hereditas.* 60 :411.
- (85) Sciaky, M., Limozin, N., Filippi-Foveau, D., Gullan, J., and Laurent-Tabusse, G. 1976. Structure primaire de L'anhydrase carbonique erythrocytaire bovine CI. *Biochimie.* 58: 1071-1082.
- (86) Schulz, G.E., Elzinga, M., Marx, F., and Schirmer. 1974. Three-dimensional structure of adenyl kinase. *Nature* 250 : 120-123.
- (87) Scopes, R.K. 1966. Isolation and properties of basic protein from skeletal muscle sarcoplasm. *Biochem. J.* 98 : 193-197.
- (88) Shima, K., Tashiro, K., Hibi, N., Tukada, Y., and Hirai, H. 1983. Carbonic anhydrase-III immunohistochemical localization in human

- skeletal muscle. *Acta Neuropathol.* 59: 237-239.
- (89) Shima, K. 1984. Human muscle carbonic anhydrase III (CA-III). Purification, immunohistochemical localization in the human skeletal muscle and its clinical application to the neuromuscular diseases. *Hokkaido, J. Med. Sci.* 59 : 98-116.
- (90) Shows, T.B. 1967. The amino acid substitution and some chemical properties of a variant human erythrocyte carbonic anhydrase : Carbonic anhydrase Id michigan. *Biochem. Genet.* 1: 171-195.
- (91) Smithies, O. 1965. Disulfide-bond cleavage and formation in proteins. *Science* 150 :1595-1598.
- (92) Snow, D.H., and Guy, P.S. 1980. Muscle fiber type composition of a number of limb muscles in different types of horse. *Res. Vet. Sci.* 28: 137-144.
- (93) Stark, G.R., and Smyth, D.G. 1963. The use of cyanate for the determination of NH_2 - terminal residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 238 : 214-226.
- (94) Stull, C.L., and Albert, W.W. 1981. Comparison of muscle fiber type from 2-year-old fillies of the belgian, standardbred, thoroughbred, quarter horse and welsh breeds. *J. Anim. Sci.* 51: 340-343.
- (95) Svenson, H. 1961. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta. Chemica. Scand.* 15: 325-341.
- (96) Tanis, R.J., Tashian, R.E., and Yu, Y. 1970. Properties of carbonic anhydrase isozymes isolated from porcine erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 245: 6003-6009.
- (97) Tanis, R.J., Tashian, R.E. 1971. Purification and properties of carbonic anhydrase from sheep erythrocytes. *Biochemistry* 10 : 4852-4858.
- (98) Tanis, R.J., Ferrell, R.E., and Tashian, R.E. 1974. Amino acid sequence of sheep carbonic anhydrase C. *Biochim. Biophys. Acta*

371 :534-548.

- (99) Tashian, R.E., Douglas, D.P., and Yu, Y. 1964. Esterase and hydase activity of carbonic anhydrase-I from primate erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 256-261.
- (100) Tashian, R.E., Goodman, M., Tanis, R.J., Ferrell, R.E., and Osborne, W.R.A. 1975. Evolution of the carbonic anhydrase isozymes. pp. 207-241. In: *Isozymes*, 4. (Markert, C.L. ed.), Academic Press, New York.
- (101) Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M. 1980. Evolutionary diversity in the structure and activity of carbonic anhydrase. pp. 153-156. In : *Protides of the biological fluids, Colloquium 28.* (Peeters, H. ed.) Pergamon press, Oxford.
- (102) Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Stroup, S.K., Goodman, M., and Yu, Y.S. 1980. Evolution of structure and function in the carbonic anhydrase isozymes of mammals. pp. 164-176. In: *Biophysics and physiology of carbon dioxide.* (Bauer, C., Gros, G., and Bartels, H. eds.), Springer- verlag, Heidelberg, (Berlin).
- (103) Vandekerckhove, J., and Montagu, M.V. 1974. Sequence analysis of fluorescamine-stained peptides and proteins purified on a nanomole scale. *Eur. J. Biochem.* 44 : 279-288.
- (104) Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. *J. Biol. Chem.* 242: 4221-4229.
- (105) Weber, K., and Osborn, M. 1975. Proteins and sodium dodecyl sulfate : Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. pp. 179-223. In : *Proteins*, 1. (Neurath, H., and Hill, R.L. eds.), Academic Press, New York.
- (106) Whitney, P.L., Nyman, P.O., and Malmstrom, B.G. 1967. Inhibition and chemical modifications of human erythrocyte carbonic anhydrase B. *J. Biol. Chem.* 242 : 4212-4220.
- (107) Whitney, P.L., Folsch, G., Nyman, P.O., and Malmstrom, B.G. 1967. Inhibition of human erythrocyte carbonic anhydrase B by chloroacetyl

sulfonamides with labeling of the active site. J. Biol. Chem. 242.
4206-4211.

- (108) Wilbur, K.M., and Anderson, N.G. 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem. 176 :
147-154.