

学位申請論文

ウマの筋肉型炭酸脱水酵素  
(C A - III) に関する研究

[ 要 旨 ]

西 田 利 穂

麻布大学獣医学部  
生理学第一講座

1986

炭酸脱水酵素（以下CAと略す）は1933年、Meldrum 及びRoughton によって発見された、亜鉛を含み  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  の可逆反応を触媒する金属酵素である。CAは  $\text{CO}_2$  の運搬や酸塩基平衡に役立っている酵素であり、ウマにおいては、Deutsch らにより赤血球中から CA-I と CA-II の二種類のアイソザイムが精製され報告されている。CAの第3番目のアイソザイムである CA-III に関する研究は、Koester らが 1977 年にウサギの筋肉から精製した peak X が CA 活性を持つことを報告したの一端を発した。現在までにウマの CA-III に関する報告はなされておらず、本論文ではウマの筋肉からの CA-III の精製方法と結晶化方法について報告した。そして、精製した CA-III の生化学的、物理化学的、免疫化学的、免疫組織化学的性状の分析結果に加え、一次構造の解析、化学修飾による影響について検討を行い CA-III の性状を明確にした。更に、CA-III の微量測定法を開発し獣医臨床領域への応用を試みた。それらの結果について要約すると下記のごとくである。

### 1. CA-III の精製と結晶化

精製にはポニーの中臀筋を用い、トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）を加えてホモジネートを作成した。遠心分離後、上清をヨードアセトアミドを用いてアルキル化を行った。次に、CMセファローズ CL-6Bを用いて筋肉抽出液の陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着した蛋白質は塩濃度を直線的に上昇させることにより溶出した。そして、CA活性の存在する溶出分画をセファデックスG-75でゲル濾過を行い、つづいてカラム等電点電気泳動を行なった。その結果 CA-III は等電点 8.9 の分画で精製された。精製した CA-III は澱粉ゲル電気泳動、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一の蛋白質であることを証明した。精製した CA-III をウサギへ免疫することにより CA-III に対する抗体のみを作成することができ

た。上記の方法で精製した CA-III は 60 % 硫酸を含む 0.05 M トリス緩衝液 ( pH 8.6 ) で平衡化し、硫酸濃度を 62 % に上昇させ温度を室温から 4 °C へ徐々に下げることにより結晶を得た。CA-III の多形である CA-IIIa は、同じ方法で精製することができた。1 Kg の筋肉を用いて CA-III は約 300mg, CA-IIIa は約 15mg が精製された。CA-III は CA-I, CA-II と異なり、サルファマイドをリガンドとしたアフィニティークロマトでは精製されなかった。

## 2 . CA-III の物理化学的性状

CA-III, CA-IIIa の分子量は共にゲル濾過法で 27,000、SDS-PAGE で 26,500 と推定され、単量体の酵素蛋白質であった。

CA-III の極大吸収は 280 nm にあり、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。等電点は、CA-III が 8.9, CA-IIIa は 8.1 であった。亜鉛の含有量を測定した結果、およそ 1 分子の CA-III 中に 1 原子の亜鉛が存在した。

## 3 . CA-III の生化学的性状

ウマの CA-I, CA-II, CA-III, CA-IIIa の CO<sub>2</sub> 水和活性を測定し比較した結果 CA-III の値は CA-I の 1/7, CA-II の 1/74 であった。CA-IIIa は CA-III の 1/2.6 であった。エステラーゼ活性については、活性の高い順に CA-II, CA-I, CA-III であった。酸性フォスファターゼ活性は、3 種のアイソザイムにおいてはほぼ等しく、アルカリフォスファターゼ活性は CA-III のみ存在した。CA-III の CO<sub>2</sub> 水和活性は 60 °C, 5 分間の加熱で活性を失ったが、エステラーゼ活性については 100 °C, 5 分間の加熱でも失活しなかった。

アミノ酸分析の結果、CA-III のアミノ酸総数は 257 残基であった。システインは 4 残基含まれており、その内の 2 残基は分子表面に存在し残りの 2 残基は分子内に埋もれた状態で存在していた。CA-IIIa に関してはアミ

ノ酸組成は CA-III に非常に類似しており、4 残基のシステインのうち内部に埋もれた 2 つのシステイン残基の一方にグルタチオンが結合していることを示唆した。CA-III のアミノ酸組成の特徴は、システインとアルギニンの数において CA-I は 1 個と 6 個、CA-II は 1 個と 9 個であるのに対し、CA-III では 4 個と 14 個とそれぞれの数が多いことであった。

#### 4. CA-III の免疫化学的性状

抗ウマ CA-III 血清を用いたオクタロニー法では、ウマの CA-I、CA-II とは沈降線を形成せず CA-III のみと一本の沈降線を形成した。更に、CA-IIIa と一本の沈降線を形成した。ウマの各種臓器抽出液を用いてオクタロニー法を行った結果、CA-III と同一の明瞭な沈降線を形成したのは筋肉と肝臓の抽出液であった。更にウマの胸腺とは弱い沈降線を形成した。

CA-III の種特異性を検索した結果、ウシ、イヌ、ネコ、ラットの筋肉抽出液と抗ウマ CA-III 血清との間にスパーを形成する沈降線が観察された。一方、肝臓ではウシ、ブタ、ネコ、ラット（雄）の間にもスパーが出現する沈降線を認めた。ウサギ、ニワトリの筋肉と肝臓とは沈降線を形成しなかった。

#### 5. ウマの各種臓器の CA-III 含有量

サンドイッチ法による酵素免疫測定法を確立し CA-III の定量を行った結果、臓器湿重量 1 g 当りの筋肉では 530  $\mu$ g、肝臓では 300  $\mu$ g、胸腺で 16.5  $\mu$ g であった。その他の臓器では、平均 57.3 ng と極めて低値であった。赤血球中には、ヘモグロビン 1 g 当り 319.2 ng 存在した。この値は、赤血球中に存在する CA-I の 1 / 41,692、CA-II の 1 / 5,549 であった。

#### 6. CA-III の組織局在性

ウマ筋肉の組織切片を作製し、ペルオキシダーゼ標識抗ウマ CA-III 血清を用いる直接法で筋線維中の CA-III を染色した。その結果、強く染色される線維と淡く染色される線維、そして染色されない線維が確認された。強く染色される線維の割合が少ないことから CA-III は赤筋線維に局在すると

考察した。

#### 7. CA-IIIのペプチドマップ

CA-IIIをトリプシンで分解し、ペプチドマップを作製すると26個のペプチドが検出された。各ペプチドを抽出してアミノ酸分析を行った結果、リジンを含むペプチドは13個、アルギニンを含むペプチドは12個であった。1個のペプチドは両者を含んでいた。CA-IIIをシトラコニール化しトリプシンで分解した場合、リジンのC末端が切断されないため15個のペプチドが検出された。CA-IIIaのペプチドマップは、グルタチオンが結合していると推定されるペプチドの1個が消失した以外はCA-IIIと同じであった。

#### 8. CA-IIIのアミノ酸配列

アミノ酸配列の決定は、CA-IIIをペプチドに分解し、精製したペプチドをシーケンサーにより自動Edman分解を行い、N末端からのアミノ酸の同定はHPLCで行った。CA-IIIの分解は、ブロムシアン、トリプシン、キモトリプシンを用いて行った。その結果ウマのCA-IIIの一次構造は259残基中の92%を決定することができた。ウマCA-IIIのアミノ酸配列は、CA-Iと55.3%、CA-IIとは57.3%の類似性があり、ウシCA-IIIとは86.6%が等しかった。CA-IIIの活性中心は、他のCAアイソザイムと同様に、94番、96番、119番に位置するヒスチジンであることを推察した。さらに、64番目の活性に関与するアミノ酸がアルギニンであることがCA-IIIの活性の低い原因と考察した。

#### 9. CA-IIIの化学修飾

p-ニトロフェノール プチレートを用いてCA-IIIをアセチル化した結果リジン残基のみが修飾された。アセチル化されるリジンが増えるにつれ等電点は低下し、酵素活性も低下することが認められた。CAの阻害剤として報告されたカルバミルリン酸を用いるとCA-IIIのリジンがカルバミル化されることを認めた。カルバミル化されるリジンが増加するにつれ、等電点が低下し酵素活性も低下した。

## 10. ウマ血清中の CA-III 値

酵素抗体測定法でウマ血清中の CA-III を測定した。今回用いたウマ血清中の値は、安静時においては 0~27 ng/ml であった。競走用サラブレッドにおいては、トレーニング後には最高で 84 ng/ml に上昇したのも認められた。一頭のウマについては、安静時においても 1,380 ng/ml と非常に高い値を示したことから、なんらかの筋疾患の存在を推察した。これらのことから、CA-III の測定は運動生理学の領域や筋疾患の診断に興味ある成績を与えるものと考察した。