第４節　酵素活性測定

タンパク質の中には酵素活性を示して生体触媒反応に関わるものが少なくない. ここではβ-アミラーゼやPEPCの活性測定法を学ぶ.

4.1　β-アミラーゼの活性検出

【目　的】　アミラーゼは，澱粉やグリコーゲンなどを基質とする加水分解酵素である．α-アミラーゼは，αアノマー型の生成物を遊離するのに対し，β-アミラーゼは，βアノマー型の生成物（マルトース）を遊離する．ダイズ種子より精製したβ-アミラーゼを用いて澱粉を加水分解し，分解によりヨウ素澱粉反応がなくなることを利用して，β-アミラーゼの活性を確認する.

【試　薬】　ダイズ粗抽出液，精製したβ-アミラーゼ溶液（チューブ番号3，4および6），可溶性澱粉(0.3%の澱粉溶液)，KI(ヨウ化カリウム)，ヨウ素，蒸留水，0.5Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.4)，0.2MNaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液pH8.0，1NのHCl.

【器　具】　37度の恒温水槽，試験管，試験管たて，分光光度計（島津UV-1200V），ピペットマン(1mLと200μL)とそのチップ.

【安全上の注意】　実験の6）で反応を停止させるため1NのHClを使うときに注意すること。また，ヨウ素は塩酸と同様に劇物で，ヨウ素をアセチレン，アンモニア（溶液あるいは無水），水素などと混合すると爆発する危険性がある．さらにヨウ素は皮膚刺激性，金属腐食性が強いため秤量時にこぼさないよう注意する.

【実　験】

1）0.3%の澱粉溶液を作製する．可溶性澱粉30mgと蒸留水9mLを試験管に入れ，煮沸して溶かす．溶かした後室温でしばらく放置し，ある程度温度が下がってから10mLにメスアップする.

2）ヨウ素溶液を作製する．KIを120mgとヨウ素を12mg，蒸留水で溶かし，6mLメスアップ.

3）試験管を5本用意して次の組成で調製する.

　注意！酵素溶液以外を試験管に入れて混ぜてから,酵素溶液を入れることで反応を開始すること.また酵素溶液添加のタイミングの時間差を 30 秒つくって全ての試験管で反応時間が一定になるようにすること.

澱粉溶液（0.3%）	500μL
0.5M　酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.4)	200μL
蒸留水	250μL
（酵素溶液）{4）を参照}	50μL
合計1mL	

4）酵素溶液は，粗抽出液，βアミラーゼ画分（チューブ番号3，4および6），そしてブランクとして，0.2MNaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液pH8.0を入れる.

5）酵素溶液を入れて直ぐに，37度で保温する.

6）10分間保温後，直ちに1NのHClを0.5mL入れて反応を停止させる.

7）1mLのヨウ素液と蒸留水7.5mLを入れて，700nmの吸光度を測定する.

4.2　経時的吸光度変化を利用した酵素活性の測定

【目　的】　基質と生成物が何らかの方法で区別できれば酵素活性の測定が可能となる。本項では，ブタ心筋より精製された市販のリンゴ酸脱水素酵素(Malate dehydrogenase; MDH)を材料として，分光光度計で吸光度の経時変化をとらえた酵素活性測定法を用い，酵素学の初歩を学ぶ.

【試　薬】　0.5M Tris-HCl (pH 8.0)，2mM オキサロ酢酸，1mM NADH，MDH（市販品を教官が水で希釈したもの)，2mM ケトマロン酸，2mM フマル酸，蒸留水.

【器　具】　分光光度計（島津 UV-1200V)，キュベット，ピペットマン（P-1000，P-200，P-20)，チップ，エッペンドルフチューブ，キムワイプ，パラフィルム，アイスボックス，試験管，試験管たて.

【リンゴ酸脱水素酵素の反応】　MDH は下記の反応を触媒する.

$$HOOCCH_2CH(OH)COOH + NAD^+ \longleftrightarrow HOOCCH_2COCOOH + NADH + H^+$$

L-リンゴ酸(L-malic acid)　　　　オキサロ酢酸(oxaloacetic acid)

なお，試験管内における平衡はかなり左に片寄っているが，生体内ではオキサロ酢酸が（クエン酸を生成するために）どんどん消費されるので，主として右向きの反応が進行する.

【実　験】　（リンゴ酸生成反応の活性測定）

1)　キュベットに標準反応液（全容 1ml）を入れる.

┌ 698 μl　　H_2O
│ 100 μl　　0.5M Tris-HCl（pH 8.0）
│ 100 μl　　2mM オキサロ酢酸（最終 200 μM）
│ 100 μl　　1mM NADH
└ 2 μl　　MDH（市販品を教官が水で 100 倍希釈したもの）

酵素以外の試薬を上記の順に入れ，最後に MDH を添加したらパラフィルムと親指の腹でキュベットを押さえて手ばやく倒立撹拌し（このとき反応液をキュベットの外側にこぼさないよう注意)，分光光度計には計時機能も内在するので，これを用いて NADH による 340nm における吸光度(第１章参照)の変化を記録する.

2)　特に反応初期に注目し，１分間あたりの NADH の消費速度（$V = -\Delta A/t$）を求める. この絶対値はリンゴ酸生成速度と同じはずである.

3)　上記の MDH 標品 2 μl 中には，何ユニットの MDH が存在していたか計算せよ。

※　特定の条件下（今回の場合は室温，上記の標準反応液組成）において１分間に 1 μmol の生成物を産生するために必要な酵素量を 1 unit と定義する. なお，NADH の 340nm における $\varepsilon = 6.22 \times 10^3$ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$] $= 6.22$ [$mM^{-1} \cdot cm^{-1}$] である. すなわち，仮に $-\Delta A/t = 6.22$/min であったとすると，NADH の減少速度（すなわちオキサロ酢酸からリンゴ酸が生成する速度）は 1mM/min. 反応液は 1ml なので，1 μmol/min である. すなわち，反応液 1ml の中に酵素は 1unit 存在していたことになる.

4)　配布した MDH には 5ng/μl（すなわち 10ng/2 μl）の酵素タンパク質が存在していた。MDH の比活性を求めよ。

※　ある条件において１分間に 1μmol の基質を生成物に変えるために必要な酵素量が 1unit である．また，酵素試料タンパク質 1mg あたりに含まれる酵素量を比活性と呼び，その単位は unit/mg である．生体材料から酵素を精製するときは，比活性の増加をめやすにして，「何倍に精製された」と称することが多い．

【実　験】　(酵素量に依存した活性変化)

1)　MDH の量を 1μl 次いで 4μl（水の量は 699μl と 696μl）に変更して活性測定を行う．かなり手ばやい操作が必要である．酵素量にほぼ比例して，活性が約 0.5 倍，2 倍になっていることを確認せよ．

【実　験】　(基質特異性の検討)

1)　オキサロ酢酸($HOOCCH_2COCOOH$)の代わりに，同濃度のケトマロン酸(HOOCCOCOOH)やフマル酸(HOOCCH:CHCOOH)を基質として加え，NADH による還元が行われるか否か確認する．

【実　験】　(熱変性による酵素の失活)

1)　新しいエッペンドルフチューブに MDH を 5～10μl とり，70℃の湯に５分間以上浮かべておく．
2)　この熱処理した酵素 2μl を用いて，標準反応条件で活性測定を行う．多くのタンパク質は上記の条件で変性する（ただし例外もある)．MDH もタンパク質であるらしい，ということを感じてほしい．

【実　験】　(オキサロ酢酸に対する基質飽和曲線)

1)　MDH を２μl ずつ用い，オキサロ酢酸の量を 50μl(最終 100μM)，20μl（40μM)，さらに 10μl (20μM)に変えて上記と同様に酵素活性を求める．このとき，全容が正確に 1ml となるように，加える蒸留水の量を適当に変化させるのはいうまでもない．実験時間中に酵素が失活している恐れがあるのでもう一度オキサロ酢酸 100μl の（最終 200μM）結果を確認し，それと合わせて基質飽和曲線を作成せよ．横軸はオキサロ酢酸の最終濃度［μM]，縦軸は $-\Delta A/t$ の値［min^{-1}］でよい．

※　基質濃度をＳとすると，酵素反応速度（生成物を産生する速度）は

$$V = Vmax \cdot S/(Km + S) \quad —— (c)$$

で近似されることが多い．(c)をミカエリス － メンテン(Michaelis-Menten)の式という．ここで，
V は基質濃度Ｓのときの反応速度，単位はμmol/min など．Km はミカエリス定数(Michaelis constant)，単位は M，mM など．Vmax は大過剰の基質で飽和させたときの最大反応速度である．ミカエリス － メンテンの式は酵素反応速度を解析するときの基礎である．Km は酵素の活性中心と基質との親和性の指標になる．
なお，(c)式の導き方はどんな生化学の教科書にも載っているので，省略する．
ただし，$S \gg Km$ のとき $V = Vmax$
　　　　$S = Km$ のとき $V = Vmax/2$　ということは記憶に値する．

ところで，(c)式の逆数をとると

$$1/V = 1/Vmax + (Km/Vmax) \cdot (1/S) \quad —— (d)$$

すなわち横軸に 1/S，縦軸に 1/V をとると，理論的には傾き Km/Vmax の右上がりの直線が得られる．この直線と横軸との交点は -1/Km で，縦軸との交点は 1/Vmax となる．酵素反応速度を(d)式に基づい

てグラフ化したものをラインウェーバー – バーク(Lineweaver-Burk)プロットと呼ぶ (図). Km [mM] と Vmax (−ΔA/t [min-1])は, このプロットからもとめることが多いが, 今回は基質飽和曲線からもとめることにする.

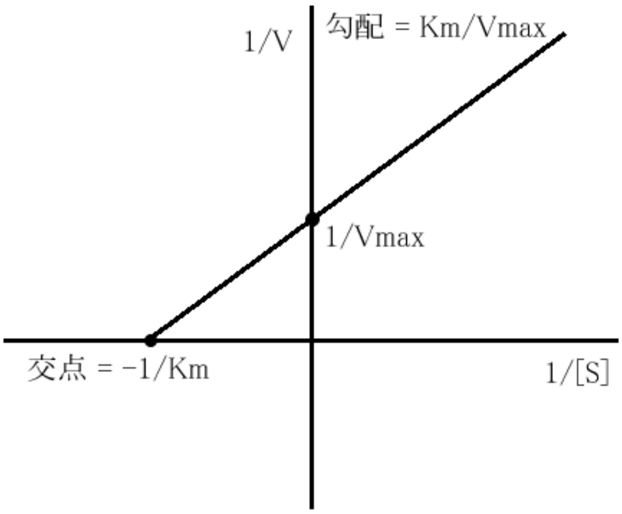

図 ラインウェーバー – バークプロット