

酵素反応における活性剤の影響について

化学班:津田 歩風

Abstract

Enzymes are one of protein which function as catalysts in the body. There are a lot of enzymes which have reached maximum speed of be able to be expected from diffusion control. However, sometimes such as enzymes impose reins on there's ability. I researched if enzyme reaction by lactic acid dehydrogenase adds in activator, the speed of enzyme reaction will be quicker. The result is enzyme reaction was quicker.

要約

酵素は生体内で触媒として働くタンパク質であり、拡散律速から予想される最大速度 ($1 \times 10^{6-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) にまで進化した酵素が多く存在する。しかし、そのように高度な能力を備えた酵素でも、生体内の環境下では、必要とされる活性のみを発揮し、活性を抑制していることがある。本研究では、乳酸脱水素酵素は活性化剤を加えると反応速度が上がり、拡散律速の衝突回数に近づくのか検証した。今回は、乳酸脱水素酵素の酵素反応の基質の一つであるNADHが生成物NAD⁺に変化する時のNADHの減少量を測定することで反応速度を求めた。その結果、反応速度は活性剤FBPを添加することで拡散律速の衝突回数から期待される値 ($1 \times 10^{6-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) に近づいた。

1. はじめに

酵素は生体内で触媒として働くタンパク質である。また、ほとんどの酵素反応の速度は、ミカエリス・メンテンの関係 ($v = k_{\text{cat}} [E]_0 [S] / ([S] + K_m)$) ¹⁾ によって決まる。このミカエリス・メンテンの関係は、 $v = (k_{\text{cat}} / K_m) [E][S]$ とも表すことができ、また (k_{cat} / K_m) は二次反応速度定数である。酵素の中には拡散律速の衝突回数から期待される最大速度 (k_{cat} / K_m) が ($1 \times 10^{6-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) にまで進化した酵素が多く存在する。²⁾ しかし、そのように高度な能力を備えた酵素でも、生体内の環境下では、必要とされる活性のみを発揮し、活性を抑制していることがある。そのような酵素の場合には、反応溶液のpH変化や温度変化、活性剤の添加によって、反応速度を上げ、活性を促進させることができる。その酵素の例として、乳酸脱水素酵素³⁾が挙げられる。乳酸脱水素酵素は、ピルビン酸、NADH、H⁺を基質とし、乳酸とNAD⁺を生成物とする反応を可逆的に触媒する(図1)が、その活性調節は4量体の構造(図2)によって可能となっている。本研究では、乳酸脱水素酵素は活性剤を加えると反応速度が上がり、拡散律速速度の衝突回数に近づくのか検証した。

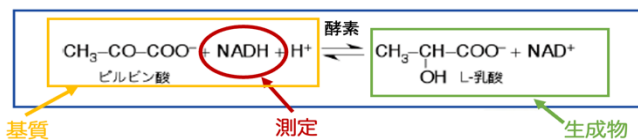


図1. 乳酸脱水素酵素を触媒とした反応式

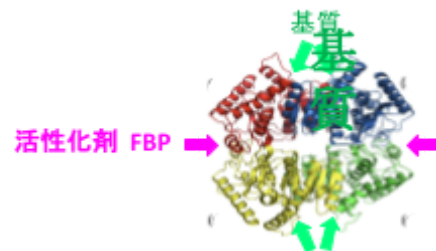


図2. 乳酸脱水素酵素の立体構造³⁾

2. 研究手法

乳酸脱水素酵素の酵素原液67.1 μM を0.5 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で100倍希釈し、671 nMの酵素液を作成した。1 mM 水酸化ナトリウム水溶液27 mlとNADH57 mgを混合させ、3 mM NADHを作成した。

《実験1》活性剤が入っていない時の酵素反応の速度式の確認

0.5 Mリン酸緩衝液100 μL 、3 mM NADH 50 μL 、50 mMピルビン酸ナトリウム溶液、蒸留水をプラスチックセルに添加し、溶液を混合させた(表1)。セルホルダー内を25 $^{\circ}\text{C}$ 一定に保っている吸光度計にセルをセットし、酵素を添加していない時のNADHが NAD^+ に変化する時の波長340 nmの吸光度変化を確認した。吸光度が変化していないことを確認した後、吸光度計からセルを取り出し、671 nM 乳酸脱水素酵素50 μl (終濃度: 3.4 nM)を添加し、溶液を混合させた。再びセルを吸光度計にセットし、吸光度変化を確認した。ピルビン酸ナトリウム溶液の濃度を変えて、この操作を繰り返し行い、吸光度の変化を測定した(表2)。この吸光度変化の酵素を添加してから10秒間を酵素反応の初速度として算出した。その初速度を用いて酵素分子が1秒間あたりに働く回数である「見かけの速度定数(k_{app})」を計算した。この初速度とミカエリス-メンテンの関係 ($v = k_{\text{cat}}[\text{E}]_0[\text{S}]/([\text{S}]+K_m)$) を用いて、酵素分子が単位時間あたりに基質を生成物に変換する分子数 ($k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$) とミカエリス定数 ($K_m = [\text{E}][\text{S}]/[\text{ES}]$) とを算出した。その結果から、それらの数値から k_{cat}/K_m の値を計算し、酵素反応速度を拡散律速の反応速度と比較した。

ピルビン酸濃度 (mM)
0.00
0.25
1.00
2.00
4.00
5.00
8.00

リン酸緩衝液	100 μL
3 mM NADH	50 μL
乳酸脱水素酵素	50 μL
ピルビン酸	
水	
計	1.0 mL

表1. 混合溶液の表

表2. ピルビン酸の濃度

《実験2》活性剤の活性速度の測定

実験1の基質溶液のピルビン酸ナトリウム溶液の添加量40 μl (終濃度: 2 mM)の一定に保ち、活性化剤fructose-1,6-bisphosphate (FBP)の添加量を変え、実験1と同様の実験を行った。

《実験3》活性剤を添加した時の活性速度の測定

実験2の結果をもとにして、FBPの濃度を1 mM、5 mMの2点に設定し、ピルビン酸ナトリウム溶液の濃度を変え、実験1と同様の実験を行った。

3. 結果

《実験1》活性剤が入っていない時の酵素反応の速度式の確認

実験結果から見かけの速度定数 (k_{app}) を算出し、図3に■でプロットした。 k_{app} は、基質の濃度を上げると大きくなり、さらに基質の濃度を上げると一定の値に近づいた。ミカエリス・メンテンの理論曲線に代入すると K_m の値は 2 mM、 k_{cat} の値は 16 (1/s)、 k_{cat}/K_m の値は $8.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。

《実験2》活性剤の活性速度の測定

実験結果から見かけの速度定数 (k_{app}) を算出し、図4にプロットした。結果より、FBPの濃度が 1 mM になった時、見かけの速度定数は最大まで近づくことが確認された。そこで、今回添加するFBPの濃度を 1 mMと5 mMに設定した。

《実験3》活性剤を添加した時の活性速度の測定

実験結果から k_{app} を算出し、図3に◆でプロットした。FBPを 1 mM添加すると、FBPを添加していない時の k_{app} と比較して、FBPを添加した時の方が k_{app} の値が大きくなった。ミカエリス・メンテンの式より、 K_m の値は 0.05 mM、 k_{cat} の値は 16 (1/s)、 k_{cat}/K_m の値は $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。また、FBPが5 mMを添加した時の k_{app} を算出し、図4にプロットした。 K_m の値は 0.01 mM、 k_{cat} の値は 16 (1/s)、 k_{cat}/K_m の値は $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。さらに基質濃度を大きくすると、見かけの速度定数が小さくなるという新たな現象が見られた。そこで、図4を基質濃度が0.1 mMまでの実験結果を図5に示した。 K_m の値は 0.03 mM、 k_{cat} の値は 21 (1/s)、 k_{cat}/K_m の値は $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。

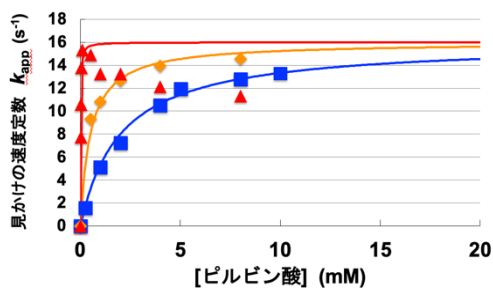


図3. 酵素の反応速度
青:FBPなし
黄:FBP1mM
赤:FBP5mM

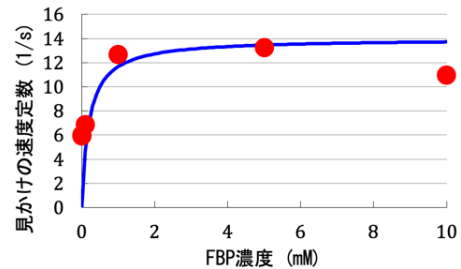


図4. FBP濃度変更時の反応速度

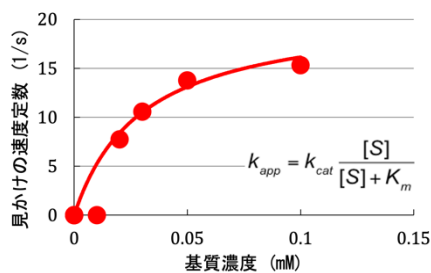


図5. FBP 5mM時の酵素反応速度
(基質濃度0.1 mMまで)

4. 考察

実験1より、活性剤が入っていない時の乳酸脱水素酵素の反応速度は、基質濃度が濃くなると、見かけの速度定数も大きくなり、またミカエリス・メンテンの理論曲線に沿って大きくなるため、ミカエリス・メンテンの式 ($v = k_{cat}[E]_0[S]/([S]+K_m)$) が成り立つと考えられる。その時の k_{cat}/K_m の値は $8.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、拡散律速から期待される値 ($1 \times 10^{6-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)²⁾ と比較して遅いことがわかつ

た。実験3より、FBPを1 mM添加した時にも実験1と同様に、ミカエリス・メンテンの式が成り立つと考えられる。その時の k_{cat}/K_m の値は $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、実験1でのFBPなしのものと比較すると、大きくなることがわかった。FBPを5 mM添加した時は、基質濃度が薄い時(0.1 mMまで)では、ミカエリス・メンテンの式が成り立つと考えられる。その時の k_{cat}/K_m の値は $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、FBP 1 mMの時と比較する(図4)と、拡散律速から期待される値に近づくことがわかった。

実験3のFBPを5 mM添加した時、基質濃度が濃くなると、反応速度が遅くなり、ミカエリス・メンテンの式が成り立たなくなった理由は、FBPを多量に添加し、基質濃度も上げたことで、酵素の形が変形し、基質が結合しにくくなったのではないかと考える。

5. 結論

乳酸脱水素酵素は、活性剤であるFBPを添加すると、拡散律速から期待される値に近づくことがわかった。

6. 参考文献ならびに参考Webページ

- 1) 高校の教科書“化学”, p 366-381, 第一学習社
- 2) Radzicka, A. and Wolfenden, R. (1995) *Science* **267**, 90-93
- 3) Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

7. 謝辞

本研究に当たり大阪大学のseeds プログラムの一環として倉光成紀教授にお世話になった。この場を借りて厚く御礼申し上げる。