

## 短期大学における生化学実験の実践レポート

### ～「酵素」の働きを理解するための試み～

Practical reports to facilitate biochemical experiments in a junior college of  
medical technology: An attempt to understand enzyme function in cells

築瀬 澄乃

Sumino Yanase

Key words: 生化学実験, 短期大学, 酵素の働き,  $K_m$  値, Lineweaver-Burk プロット

#### はじめに

大学等における生化学の教科書としては余りにも有名な「ハーパー・生化学」によると、生化学は細胞や生物体内の各種の分子と、それらの化学反応を研究する学問とある(上代監訳, 1991)。医学およびその周辺領域を学ぶ学生にとって、生化学の知識は、我々の体で健康がどのように維持されているか、また多くの疾患の原因とその治療法を理解するために必須であり、基礎学問として多くの保健医療系大学や短期大学において比較的低年次から講義や実験・実習が時間割に組み込まれている。特に、短期大学の課程では大学とは修業年限が異なることから、より低年次から生化学の講義や実験・実習が始まることはやむを得ない。しかしながら、より低年次からの学習に際して、時に煩雑な実験装置や器具・機器の使用、高価で微量な試料や試薬の取り扱いなどを必要とする生化学実験や実習の過程において、学生の知識や技術的な経験不足から十分に内容を理解できなかつたり、失敗してしまつたりといったリスクも高くなる。そこで、それらを防いで学生が十分な学習効果を得るためには、担当教員による実験・実習内容や時間配分について十分な理解と入念な計画が必要とされる。

筆者が以前(1992～2004年)所属していた公立の保健医療系短期大学<sup>注1</sup>では、看護師および臨床検査技師等の養成課程を有し、生化学の講義および実習共に一年次

から開講されていた。当時筆者は実習助手として、一年次後期に開講されていた生化学実習の補助業務に十年以上関わった経験をもつ。ここで、当時の生化学実習の項目中で特に学生にとってより理解し難く苦手意識の高い(と思われる)「酵素」の性質や働きを理解するため、講義に対する実習授業の有効性や実施にあたっての工夫について当時の実験ノート<sup>注2</sup>を開いてみる。

酵素の  $K_m$  値(ミカエリス定数とも呼ばれる)を実験的に求める方法にはいくつかの解析法があるが、本稿で紹介する Lineweaver-Burk プロットは古典的な線形解析法の一つでグラフ用紙上でも解析が可能なことから、酵素の基質特異性や酵素活性の反応速度論を理解するために、現在も学生実験や実習に普遍的に取り入れられている項目である(吉村, 2017; 知名他, 2014年)。そして、酵素の  $K_m$  値は先述した「ハーパー・生化学」にも酵素反応速度論として重要な次に示される Michaelis-Menten の式、

$$v_1 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

と共に必ず記載がある。その説明として、「ミカエリス定数 ( $K_m$ ) は最大速度 ( $V_{\max}$ ) の 1/2 の反応速度を与える基質濃度とあり、モル濃度の次元をもつ」とあるものの、その抽象的な概念は、初めて教科書を読んだだけあ

るいは講義を受講しただけの学生（学部学生時代の筆者も含め）にとって十分理解することはなかなか難しい。まして、それが何に利用できるのかイメージすることはさらに困難であるように感じられた。しかしながら、当時の短期大学生、特に衛生技術科に所属する学生が受験および合格を目指していた臨床検査技師国家試験にも  $K_m$  値および  $V_{max}$  という語句や数値は比較的好く出題されていた。この出題傾向は今日もそれほど変わりなく、生化学の分野においては現在でも普遍的で、学生が学ぶべき最も重要な内容の一つである。本稿では、学部初年次に酵素の反応速度論や  $K_m$  値などのような定数の概念に対する理解を深めるために、生化学実験や実習が補助的ではあるが重要な役割を果たしていたか、「 $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $K_m$  値の測定」を一例に概説する。

### 実験内容の概要

$\beta$ -ガラクトシダーゼ（系統名： $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23, 別名：lactase）は細菌や動植物に広く分布し、基質の非還元末端にある  $\beta$ -ガラクトシドを分解する酵素である。大腸菌等の腸内細菌では誘導酵素であり、乳糖等の誘導物質がなければほとんど作られない。哺乳動物では乳糖を加水分解する酵素として、小腸の刷子縁膜に存在する。この「 $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $K_m$  値の測定」では、基質として  $\sigma$ -nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside (ONPG) を用いて  $\beta$ -ガラクトシダーゼの反応速度を測定し、基質濃度および酵素の反応速度の実測値を用いた Lineweaver-Burk プロットから  $K_m$  値を求める。本実験の原理としては、ONPG の水溶液はほぼ無色透明であるが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによって加水分解されると黄色の  $\sigma$ -nitrophenol (ONP) を生じるので、この反応生成物の量を分光光度計で吸収極大波長 420 nm における吸光度を測定することによって算出する。実際には、市販の試薬 ONP で調製した標準液を用いて作成した検量線から、酵素反応液中の ONP 生成物量を求める。

### 予備実験

学生実験の前に、使用する市販の酵素の溶液濃度を定める。すなわち、学生が実際に酵素反応速度を測定する際に、測定開始からおおよそ3分間程度で反応速度を求めるのに十分な生成物の量が得られるように酵素溶液の濃度を決めておく必要がある。市販の  $\beta$ -ガラクトシダーゼは、活性や形状などさまざまなものがあるので適したものを選択すればよいが、本実験では和光純薬工業株式

会社（現在は、富士フィルム和光純薬株式会社）で製造・販売の生化学用の粉末タイプの試薬を用いた。学生実験に必要な酵素溶液の調製において、試薬メーカー推奨の保存方法に従っていても時間と共に酵素活性は徐々に低下し、また補充等のために新たに購入した酵素のロット番号によっては活性に変化が生じていたりするので、厳密にはその都度最適の濃度を定めることが必要である。

以前の実験ノートを開いてみると、予備実験として  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素溶液の濃度の決定するために、試験的に酵素濃度約 1 mg/mL（メーカー提示の活性 500 units/mg 以上）となるように 1/15 M PBS (pH7.4) に溶解したものをを用いて後述の酵素反応速度の測定を行ったところ、基質濃度の異なる No.0~5 の反応液いずれもすぐに反応してしまい、酵素濃度が濃すぎることが判明した。この酵素溶液を 20 倍まで希釈すると、反応時間 180 秒の間に、最も基質濃度の高い No. 5 の反応系においても吸光度の上昇が 1 以内に収まった。したがって、学生実験に用いる  $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素溶液の濃度は、0.05 mg/mL 程度が適しているとした。

この酵素溶液を用いて、実際に後述の Lineweaver-Burk プロットによって  $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $K_m$  値を求めたところ、約 1.2 mM であった。生化学データブック（日本生化学会編，1989）によると、大腸菌由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $\sigma$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside を基質とした場合の  $K_m$  値は  $9.5 \times 10^{-4}$  M であり、基質や用いた酵素の分子量も若干異なるものの近似値が得られた。

### 学生実験の内容

#### 1. ONP 検量線の作成

試薬として、1/15 M リン酸緩衝液 (PBS) (pH7.7) は教員側で準備し、4 mg/dL ONP 溶液は学生が調製した。具体的には、直示天秤で ONP（分子量 139.11 g/mol）を正確に計り採り、PBS (pH7.7) で溶解してメスフラスコ中で 100 mL とした。表 1 の手順で ONP 溶液を希釈し、No. 0 を対照として分光光度計を用いて測定波長 420 nm における吸光度を測定し、検量線を作成した。

表 1. ONP 検量線作成のための試薬と分量（吸光度記入表）

	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
ONP溶液 (mL)	0	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0	3.0
PBS (pH7.7) (mL)	5.0	4.9	4.7	4.5	4.0	3.0	2.0
$A_{420}$							

#### 2. $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素反応速度の測定

酵素溶液として、予備実験で求めた濃度になるように、β-ガラクトシダーゼを 1/15 M PBS (pH7.4)で調製した。酵素溶液は、実験当日に教員側で準備した。他に基質原液として、0.03M ONPG 溶液を 1/15 M PBS (pH7.7)に溶解して作製、試薬として実験 1 と同様に、1/15 M PBS (pH7.7) 、0.03M MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 水溶液、3.36M メルカプトエタノール (ME) をそれぞれ教員側で準備しておいた。学生は、酵素反応速度の測定前に、基質原液を表 2 のように希釈して、基質溶液 No. 0~5 を用意した。

表 2. 基質溶液の組成

	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
0.03M ONPG (mL)	0	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50
PBS (pH7.7) (mL)	5.40	5.25	5.20	5.10	5.00	4.90
0.03M MgCl <sub>2</sub> (mL)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
3.36M ME (mL)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20

以下の手順で学生は酵素反応を行った。上記の各基質溶液 5.8 mL に酵素溶液 0.2 mL を加え、この時を 0 秒とした。よく混合してから素早くセルに移し、分光光度計にセットした。セルをセットしたまま、1/15M PBS (pH7.7)を対照として、ストップウォッチを見ながら 30 秒毎に 180 秒まで波長 420 nm における吸光度を測定した。測定した吸光度は、下記の表 3 に記入した。

表 3. 波長 420 nm における吸光度の測定結果 (記入表)

反応時間 (秒)	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
30						
60						
90						
120						
150						
180						

上記の表 3 の結果を用いて、学生はそれぞれの基質濃度 [S] (No. 0~5) について、反応時間 (秒) と生成した ONP 濃度 (mol/L) をグラフ用紙にプロットし、それぞれの初速度  $v$  (mol/L・秒) を求めた。

### 3. β-ガラクトシダーゼの $K_m$ 値の算出

学生が上記の表 3 の結果から得た、それぞれの基質濃度 [S] および初速度  $v$  について、計算によって  $1/[S]$  および  $1/v$  を求めた (表 4)。

表 4. Lineweaver-Burk プロットのための数値の算出 (記入表)

	No. 0	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
[S] (mol/L)						
$1/[S]$ (L/mol)						
$V$ (mol/L・秒)						
$1/V$ (L・秒/mol)						

表 4 で求めた  $1/[S]$  および  $1/v$  の値を用いてグラフ用紙に Lineweaver-Burk プロット (図 1) を行い、交点から  $K_m$  値 (単位: 濃度 mol/L = M) を算出した。

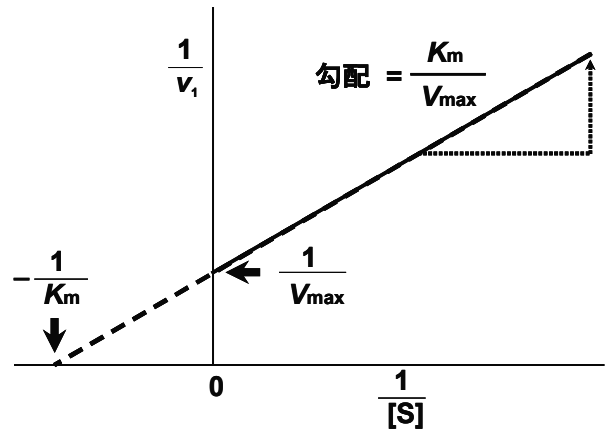


図 1. Lineweaver-Burk プロットの概略図 (「ハーバー・生化学」より改変)。 $1/[S]$  に対する  $1/v$  の二重逆数プロットで、 $K_m$  値は負の  $x$  軸上の交点から求められる。

### 予備実験および学生実験に対する考察

「ハーバー・生化学」において、Lineweaver-Burk プロットにより実験的に  $K_m$  値を測定しようとするとき、低濃度の基質を用いて得たデータ (反応速度) が大きな影響を  $K_m$  値に及ぼすという事態にしばしば遭遇する、と説明されている。さらに、本稿で用いたように基質濃度の増加幅が等間隔という条件を選んで実験を行うと  $K_m$  値に生じる誤差が大きくなる (表 2) (上代監訳, 1991)。他にも、Lineweaver-Burk プロットについて注意すべき点は、[S] を等間隔に置くのではなく、 $1/[S]$  を等間隔に置くことであり、これにより誤差の影響が少々緩和されるとある (知名他, 2014; 小川他, 2014)。本実験では表 2 のように、基質溶液調製の際  $1/[S]$  ではなく [S] を等間隔として希釈系列を調製したため、Lineweaver-Burk プロットを用いて  $K_m$  値を測定した場合、その値に大きな誤差が含まれることが懸念された。ただし、先述のように予備実験において、β-ガラクトシダーゼの  $K_m$  値をこの等間隔の希釈系列の基質濃度で測定した結果、文献値とそれほど変わらないデータが得られた。したがって、本稿で紹介したように学生実験にも [S] を等間隔とした基質の希釈系列で測定させているが、今後より正確な  $K_m$  値を得るためには、学生実験においても  $1/[S]$  を等間隔となるような基質の希釈系列を用いるべきと思われる。その際には、学生の理解を助けるため、学生実験前の説明において、一般に直感的にイメージしやすい [S] を等間隔とした希釈系列でなく、なぜ  $1/[S]$  を等間隔

としているのか理由を簡単に説明する方がよいと思われる。このように、Lineweaver-Burk プロットによる  $K_m$  値の測定は、用いる基質濃度に制限があることや本来誤差が生じやすい解析法ではあるが、生化学の教科書にも必ず記載があるような古典的な線形解析法の一つであり、現在においても学生が最初に酵素の反応速度論を学ぶ上で、先述の Michaelis-Menten の式を最も直感的に理解しやすい優れた方法であるともいえる。

上記の Lineweaver-Burk プロットの欠点を改善した方法もいくつか開発されており、発展型学習として紹介するのもよいかも知れない (知名他, 2014)。現代では  $V_{max}$  と  $K_m$  の値は Michaelis-Menten の式をもとに非線形回帰分析によるカーブフィッティングから容易に求めることができ、マイクロソフト Excel のような汎用の解析ソフトでも行うことが可能とある (知名他, 2014)。酵素反応論の応用や演習授業としてそれらを取り入れることも可能であり、今後の授業の展開にも期待できる。

酵素の  $K_m$  値が何に利用できるのかということについて利用方法の一つは、同一酵素かどうかを判断するために用い、他には酵素を試薬として用いる場合にどれだけの使用量が必要か知ることができる (小川他, 2014)。すなわち、「ハーバー・生化学」にもあるように、多くの酵素はそれぞれの基質の生理的濃度にほぼ等しい  $K_m$  値を持っていることに基づく (上代監訳, 1991)。また、 $K_m$  値は酵素に固有な定数であり、酵素と基質の親和性において指標となるものであり、 $K_m$  値が小さいほど親和性が高く、その逆は低いことを示す (知名他, 2014)。個々の酵素に固有な  $K_m$  値を求めることは、酵素と基質の双方の性質を知るだけでなく、特に生体外で酵素反応を利用してそれに関わる物質や活性の定量を行いたい場合、特定の条件下においてどの酵素がどの基質に最も適しているかを定めることができ、最も効率のよい酵素反応を選出することに役立つ。

このように、大学や短期大学学部等でよく用いられる生化学の教科書の中ではいわゆる机上の理論であったものが、学生自身に実際に酵素の  $K_m$  値を測定してもらうことによってより身近に感じられるものとなり、その意味や利用法について改めて理解する助けになるものと思われる。本稿で紹介した実験方法も、市販の酵素を用いることで準備にかかる時間や労力も無理のない範囲で行える上に、実習の受講生が多い場合にも比較的対応が可能である。筆者が数十年前に実施していた方法ではあるが、当時の実験ノートを拾い起こせば多少の改善点が望まれるものの、PC や Excel のような簡単な統計解析ソ

フトを利用した解析方法に応用が可能で、今後も学生実験の一項目としてさまざまな利用価値が見込まれる。

#### 注釈

注 1. 神奈川県立衛生短期大学は、昭和 42 年 (1967 年) に看護婦養成のために設置され、二年制の衛生看護科 (看護および養護コース) から始まり、2 年後に衛生検査技師養成のために二年制の衛生技術科を増設。その後、臨床検査技師養成のため修業年限が三年制となり、さらに養護コース廃止後に保健婦および養護教諭養成課程として専攻科が新設された。平成 16 年 (2004 年)、県内の保健医療関係の人材育成機関再編に伴い、閉学 (県立衛生短期大学記念誌編集ワーキンググループ, 2004)。

注 2. 本稿で紹介した生化学実習に関する実験ノートは、衛生技術 (生化学) 担当助手少なくとも 3 代に渡って引き継がれていたものである。

#### 謝辞

執筆にあたり、記念誌「閉学によせて-神奈川県立衛生短期大学のあゆみ-」を大変参考にさせていただき、当時編集に関わられた先生方に深謝いたします。また、当時の実験ノート引継ぎいただいた田中かづ子先生、川瀬祐子先生に改めて感謝いたします。本稿は、筆者に当短期大学における勉学および教育の機会を与えていただいた亡き白戸四郎先生、尾藤朋子先生のお二人に捧げたいと思います。

最後になりましたが、本稿執筆の機会をいただいた大東文化大学中井睦美先生に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- ハーバー・生化学, 原著 22 版 (1991) 上代淑人監訳, 丸善.
- 閉学によせて-神奈川県立衛生短期大学のあゆみ- (2004) 県立衛生短期大学記念誌編集ワーキンググループ編集, 神奈川県立衛生短期大学.
- 吉村徹 (2017) 書評: 初めての酵素化学, 生化学, 第 89 巻, 第 3 号, p. 483.
- 知名秀泰, 岡田豊 (2014) 原典からの酵素反応速度論, 生物学, 第 92 巻, 第 1 号, pp. 20-25.
- 小川善資, 沼上清彦 (2014) 酵素反応の基礎 - $K_m$  値はどの様に求められるのか、何に利用できるのか-, 生物試料分析, 第 37 巻, 第 3 号, pp. 228-240.
- 生化学データブック [II], 第 1 版 (縮刷版第 5 刷) (1989) 日本生化学会編, 東京化学同人.