

2008 年度 酵素化学実験 後半：酵素反応の性質（旧 進化生命システム学領域）

2008.10.27.～2007.10.30.

実習

2008.10.31.

レポート作製用予備日

2008.11.7.

レポート提出日

[実習内容]

実習内容:グルコシダーゼを用いた酵素反応の性質

[実習期間のおおよその流れ]

10月27日	13:00 から	実習内容に関連する講義と酵素活性の測定
10月28日	13:00 から	Linweaber-Bulk plot の作製
10月29日	13:00 から	酵素反応の性質に関する実験
10月30日	10:00 から	酵素反応の性質に関する実験 後片付けとまとめ、レポートの注意事項

[班分け]

前半の班のままをお願いします。

[レポートの提出]

生物工学コース事務室に前日より箱を置きますので、その中に入れてください。

[採点方法]

実習(全)出席 50%、レポート採点 50%

実習: α -グルコシダーゼを用いた、酵素反応の性質

触媒活性を有するタンパク質を酵素という。この実習では α -グルコシダーゼの酵素反応を題材として選び、反応速度論的アプローチによる理解を目指す。また、酵素の活性(機能)と物性の関係を調べる。本実習では活性を指標にした酵素の熱安定性を採り上げ、タンパク質分子の熱安定性分析を実際に行う。

《各溶液の組成》

α -グルコシダーゼ(酵素液はすべて、常に氷冷で扱うこと。)

50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解

希釈は、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

比活性 120 unit / mg

分子量 52,000

基質: 20 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside

分解産物の *p*-nitrophenol の 410 nm における分子吸光係数は、 $10,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

水で希釈

室温

緩衝液: 150 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

酵素の希釈には、この緩衝液を水で 3 倍希釈して用いる。

阻害剤: 100 mM Tris-HCl pH 7.0

水で希釈する。

《活性測定》

150 mM リン酸緩衝液	1 ml
---------------	------

水	900 μ l
---	-------------

基質	1 ml
----	------

酵素	100 μ l
----	-------------

(1) 上記 3 ml を試験管内で手早く混合し、光度計のセルに全量をすばやく移し、410 nm の吸光度の増加を分光光度計で測定する。

(2) 酵素反応の Tris による阻害実験のときは、水 900 μ l の代わりに水 800 μ l + Tris 100 μ l を加える。

《酵素の単位》

1分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を分解する酵素量を 1 unit とする。

実習2-1 酵素活性の測定

一定の基質濃度[S]で酵素濃度[E]を 10 倍から 100 倍の間に希釈し、それぞれの希釈率での反応速度 v を測定し、反応速度が、酵素濃度に比例することを観察する。このグラフから酵素活性(unit / ml)を求める。さらに、酵素の分子量と比活性の値を用いて酵素濃度(M)を求める。各班に配られた酵素溶液は、まず 10 倍希釈し、そこから 100 倍までの希釈倍率の酵素液を作製するとデータが揃いやすい。

横軸に酵素の希釈率の逆数、縦軸に反応速度をプロットすれば、希釈倍率が 1 倍のときの反応速度が求められる。酵素の活性の単位 unit は、反応速度によって決められるので、希釈倍率 1 倍での酵素活性が求められる。

実習2-2 Lineweaver-Bulk plot の作成

基質濃度を変化させて反応速度を測定し、基質濃度[S]に対し反応速度 $v / [E]$ をプロットする。そのグラフから K_m の値を大まかに推定する。基質濃度が $1/2 K_m \sim 4 K_m$ に入るような範囲で基質濃度を変化させて反応速度を測定し、Lineweaver-Bulk plot ($1 / [S]$ に対し $[E] / v$ をプロットする)を描く。

グラフより k_{cat} と K_m を求める。単位も明記すること。

実習2-3 酵素反応の Tris による阻害の観察

実習2-2において用いた最も薄い基質濃度を選択して、酵素反応液にいろいろな濃度の Tris を加え反応速度を測定する。Trisの希釈は $\times 10$ 倍、 $\times 20$ 倍、 $\times 40$ 倍、 $\times 80$ 倍、160 倍希釈を試みると良い。その中に、酵素反応の速度が Trisを加えていないときの $1/2 \sim 1/3$ 倍になる Tris の濃度が含まれているであろう。上記の各希釈倍率のTris を加えた場合の反応速度を、実習2-2でL-B plot作製に用いた基質濃度(5-6種類)において測定する。Trisを加えない場合の速度は実習2-2で既に調べられているが、再度測定する。これらの結果をLineweaver-Bulk plotとして描く(結果として、各基質濃度に尽き、Trisの濃度を変えたときの反応速度データが得られる)。この測定結果を、横軸にTris濃度、縦軸に各Tris濃度における傾きの値($K_m \{1 + [I]/K_i\} \cdot k_{cat}^{-1}$)をプロットしたグラフを作製する。グラフの切片などから阻害の形式ならびに K_i を求める。

ここまでは酵素反応とその阻害剤の効果を、反応速度解析の手法で調べた。酵素の反応様式を理解するための典型的なアプローチであり、是非ともよく理解して欲しい。

以下では、タンパク質としての酵素分子の性質について調べる。耐酸性、耐圧性、耐変性剤、・・・など多くの性質があり、いずれも興味深いのが、今回は最も代表的な耐熱性について調べる。反応させる温度を変える(反応速度の温度依存性)のではなく、酵素を熱処理した結果どのような活性になったか、を調べる点に注意。

実習2-4 耐熱性の観察

酵素液 1 ml を試験管に採り 30, 35, 40, 45 °Cに 20 分間保つ。20 分の熱処理の後、直ちに試験管を氷につけるとともに氷冷した 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を1 ml 加え、しばらく氷冷する。酵素活性を測定し、熱処理していない酵素液サンプルの活性値を 100 % とした相対値で表示する。

実習2-5 熱失活の経時変化の観察

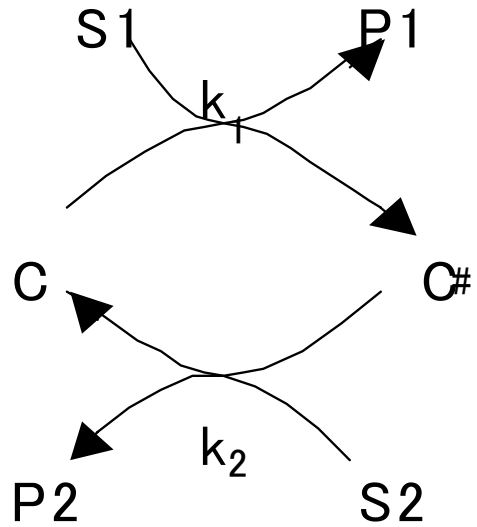
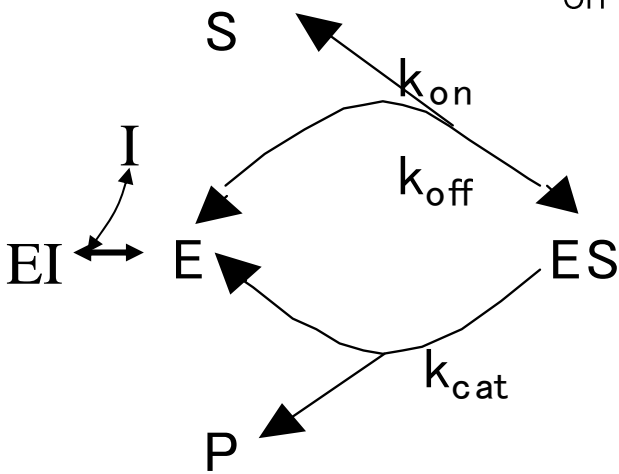
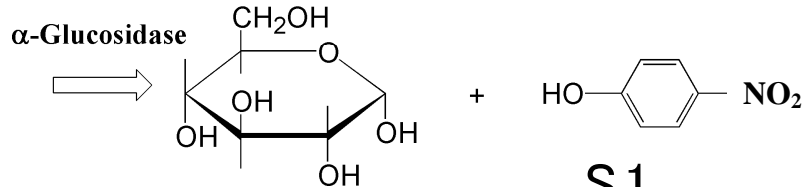
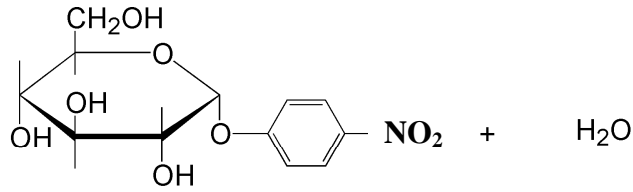
酵素液 1 ml を試験管5本に採り 45 °Cのインキュベーターに入れる。試験管を入れてから 2、5、10、15、20 分後に1本ずつ取り出し、直ちに氷につけるとともに氷冷した 50mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を 1 ml 加え、しばらく氷上に保つ。

酵素活性を測定し、熱処理2分間のサンプルを 100 % とした相対値で活性の減少を片対数グラフに表示し、その傾きからそれぞれの熱処理における熱失活速度係数 k_d を求める。

40°Cでは、2、15、30、45、60 分後

50°Cでは、1、5、10、15、20 分後

55°Cでは、1、2、4、6、8、10 分後



$$V = k_{cat}[ES] = k_{on}[S][E] \frac{k_{cat}}{k_{cat} + k_{off}}$$

$$V = k_1[S1][C] = k_2[S2][C^\#]$$

$$K_I = \frac{[I][E]}{[EI]}$$

$$[C]_0 = [C^\#] + [C]$$

$$[E]_0 = [ES] + [E] + [EI]$$

$$= [ES] + [E] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$= \frac{V}{k_{cat}} + \frac{V(k_{cat} + k_{off})}{k_{cat}k_{on}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$= \frac{V}{k_2[S2]} + \frac{V}{k_1[S1]}$$

$$\frac{[E]_0}{V} = \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_m}{k_{cat}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$\frac{[C]_0}{V} = \frac{1}{k_2[S2]} + \frac{1}{k_1[S1]}$$

$$V = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

$$V = \frac{k_2[C]_0[S1][S2]}{[S1] + k_2[S2]/k_1}$$

酵素化学実験(進化生命システム学領域)

学生実習レポート(後半)の手引き

1) 各班のデータは班員で統一し、下記の項目をもらさないこと。有効数字に気を配ることを忘れないように。

<後半の実習>

タイトルと軸の名前と単位が明記されたグラフ、
求められた酵素活性と、求めた計算の考え方、
 k_{cat} 、 K_m の値、求めた計算の考え方、
Tris による酵素反応阻害の様式と K_i

2) その他、下記の項目は加点要素となるかもしれない。

1. 実習の目的や背景の理解度。実習で用いた計算法などの背景の勉強成果。
2. レポートをまとめる上でのオリジナルな工夫。図の見易さや、データの扱い。
3. 科学的に妥当な考察(感想文は不要)。

実習2-6 Arrhenius plotの作製と熱失活反応における活性化エネルギー (Option)

酵素液 1 ml を試験管5本に採り 45 °C のインキュベーターに入れる。試験管を入れてから 2、5、10、15、20 分後に1本ずつ取り出し、直ちに氷につけるとともに氷冷した 50mM リン酸緩衝液(pH 7.0) を 1 ml 加え、しばらく氷上に保つ。

酵素活性を測定し、熱処理2分間のサンプルを 100 % とした相対値で活性の減少を片対数グラフに表示し、その傾きからそれぞれの熱処理における熱失活速度係数 k_d を求める。

40°Cでは、2、15、30、45、60 分後

50°Cでは、1、4、8、12、16 分後

55°Cでは、1、2、4、6、8、10 分後

縦軸 $\log k_d$ 、横軸に処理した温度(絶対温度)の逆数をとってグラフを作製する。得られるグラフの傾きから熱失活過程の活性化エネルギー E_A を求める。 $R=1.98 \text{ cal/mol/deg}$ とする。

Arrheniusの式を以下に示す。Tは絶対温度、Rはガス定数、 E_A は活性化エネルギー。

$$\frac{d}{dT}(\ln k_d) = \frac{E_A}{RT^2} \therefore \frac{d(\ln k_d)}{d(\frac{1}{T})} = \frac{E_A}{R} \quad \text{または、} \quad k_d = Ae^{-\frac{E_A}{RT}}$$