













な部分 5 点のみを取り出し作図したものが図 5 B で、この 5 点を LB plot したのが図 6 です。基質濃度の高い部分の LB plot は明らかに上方に外れます。このため、高濃度の結果を除外し、阻害が発生しない基質濃度の低い部分のデータから、 $K_m$  値を求めます。また、LB plot から得られた  $K_m$  値と  $V_{max}$  を図 5 A に記述しました。

基質濃度が高いと反応速度が阻害されているため、阻害反応が生じていない基質濃度の低い方から 5 points で LB plot すると、基質の希薄な 3 points のデータは直線に乗ったので、この直線を延長し  $K_m$  値を求めると、 $2.2 \times 10^{-3}$  mol/L と演算できます。この結果を図 5 A に作図しようとする、明らかに異常で、 $K_m$  値の 1/2 濃度で大きな阻害が発生していて、実験上の最も高い活性と最大反応速度を比較するととてもない高活性となります。このことは基質濃度の希薄な 3 points から得た  $K_m$  値であっても、基質阻害の影響を受けて、大きめの  $K_m$  値を推定してしまったことになります。

フランス臨床化学会のデータを「誤っている」といっているのではありません。 $K_m$  値を求めるために私が勝手に使用しただけです。この様に簡単に  $K_m$  値は求められないし、解析法を複数使用することで、得られた  $K_m$  値の信憑性を確認できることを見ていただきたいだけです。

#### 2.4. $K_m$ の利用法

具体的にどの様な利用法があるかを勉強しましょう。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ます。第 2 には酵素を試薬として用いる時、どれほどの使用量が必要かを知るためです。

どの様な酵素を調べる時も、最も大切な方法は基質特異性です。次いで電気泳動です。国際生化学連合 (IUB) は基質特異性が同一で、電気泳動上分離できる酵素を isoenzyme と呼ぶと定義しているからです。それでも区別できない場合、 $K_m$  値によって相同性をチェックします。

2 番目の酵素を試薬として用いる時です。酵素は過剰量加えておけば良いと考えてられる方が多いかもしれませんが、過不足なく加える必要があります。理由は常に不純酵素を含まない酵素を使用できるとは限りません。過剰量添加すると、ブランク反応が生じたり、特異性を失わせたりします。必要不可欠な添加量にする必要があります。物質定量法と酵素活性測定法に分けて、必要不可欠な酵素量の計算方法を考えましょう。

##### ① ピルビン酸定量に必要な酵素量の算出

酵素反応速度で演算するための式が MM 式です。分母に変数の入った微分方程式の代数解を求めることが出来ないため、MM 式を直接演算したい場合はコンピューターを用いるしかありません。興味のある方は著者らの記述した方法があるので参照して下さい<sup>29)</sup>。ここでは一次速度定数に従う反応として、酵素量を求めます。

一次速度定数  $k$  は次式で表すことができます。

$$k = \frac{\text{酵素添加量}}{K_m \text{ 値}} \text{ ----- 式 1}$$

試薬として乳酸菌由来の LD を用い ( $K_m$  値は  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L)、反応を阻害するものはないものとし、ピルビン酸の分子量を 96 とし、測定反応を 3 分以内に終了させるために必要な LD 添加活性を計算します。

(1) 反応終了時間は基質濃度に関係しません (ピルビン酸の場合は基質阻害があるため若干相違します)。

(2) 反応終了点は 99% 反応が終了する点とします。数学上、LD 反応の速度が ALT の反応速度に 100% に達するまでの時間は無限大の時間が必要です。

(3) 単位を統一します。時間は分、物質濃度が mmol/L とします。このため、酵素活性表現は U/mL (= mmol/L/分) とします。

以上に基づいて、3 分以内に 99% 終了させるために必要な LD 活性を求めます。

一次反応速度にて反応が進行する時の基質 (A)、生成物 (B)、時間 (t) と一次速度定数の関係は次式にて表せます。

$$B = A(1 - e^{-kt}) \text{ ----- 式 2}$$

ここで反応が終了した時点とは  $B = 0.99A$  となる時間のことなので、式 2 に代入すると

$$0.99A = A(1 - e^{-kt})$$

となり、両辺を A で割り、整理すると、次式となります。

$$e^{-kt} = 0.01 \text{ ----- 式 3}$$

3 分後にこの状態にしたいことより、式 3 に  $t = 3$  を代入し  $k$  を求めると

$$k = -\frac{\ln 0.01}{3} = \frac{4.605}{3} = 1.535$$

となり、この結果を式 1 に代入し、 $K_m$  値 ( $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L) を代入すると次のようになります。

$$\text{酵素添加量 (U/mL)} = 1.535 \times 2.0 \times 10^{-4} \text{ U/mL} = 0.307 \text{ U/L}$$

すなわち、LD は終濃度にて 0.307 U/L 存在すれば良いこととなります。

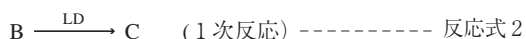
## ② ALT 活性測定試薬に添加すべき LD の必要量

ALT 活性を正しく測定するためには、ALT 反応にて生じたピルビン酸を瞬時に反応させ、NADH 変化に続けなければなりません。適切でない酵素量しか添加されていないと測定誤差を生じさせます。では、適切な酵素量を計算してみましょう。なお、AST および ALT 活性測定勧告法では、ここで示す計算法とほぼ同じ計算方法にて添加すべき共役酵素量 (LD 活性) が演算されています。

(1) サンプルの総反応液量に占める割合は 10% とします。

(2) ALT は 500 U/L まで、希釈することなく測定したい。

(3) 1 基質・1 生成物反応としなければならないため、ALT 反応は 0 次反応に従い、LD 反応は 1 次反応に従うものとします。



A: アラニン、B: ピルビン酸、C: NAD

この連続した 2 つの酵素反応を、 $v_1$  を ALT 活性、 $k$  を LD の一次速度定数として速度式で表すと次のようになります。

$$-\frac{dA}{dt} = v_1 \text{ ----- 式 4}$$

$$\frac{dB}{dt} = v_1 - k \times B \text{ ----- 式 5}$$

$$\frac{dC}{dt} = k \times B \text{ ----- 式 6}$$

この式 4 ~ 式 6 の連立微分方程式を解くと次ようになります。

$$A = A_0 - v_1 \times t \text{ ----- 式 7}$$

$$B = \frac{v_1}{k} (1 - e^{-kt}) \text{ ----- 式 8}$$

$$C = v_1 \times t - \frac{v_1}{k} (1 - e^{-kt}) \text{ ----- 式 9}$$

ここで、式 9 を微分すると活性 (反応速度) を求めることができます。

$$\frac{dC}{dt} = v_1 (1 - e^{-kt}) \text{ ----- 式 10}$$

共役酵素 (LD) の反応速度が反応開始の 1.0 分後に ALT 活性の 99% になるよう (ラグフェイスを 1



分) にするためのLD添加活性を求めるには、まず、式10に $t=1.0$ を代入し、

$$\frac{dC}{dt} = v_1 (1 - e^{-k}) \text{ ----- 式11}$$

次に、この時、式11の速度が式1の速度の99%に達するので、

$$\frac{\frac{dC}{dt}}{v_1} = 0.99 \text{ ----- 式12}$$

$$(1 - e^{-k}) = 0.99 \text{ ----- 式13}$$

$$e^{-k} = 0.01 \text{ ----- 式14}$$

となり、式14を $k$ について解くと

$$k = -\ln 0.01$$

となり、式1にこの $k$ と $K_m$ 値 ( $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L) を代入すると

$$\text{添加すべき共役酵素量} = 4.6 \times 2.0 \times 10^{-4} \times 10^3 \text{ U/mL} = 0.92 \text{ U/mL}$$

となります。この演算ではラグフェイスはALT活性に関係なく、反応式2のLDの1次速度定数にて決定することとなります。これは2つの反応が0次反応と1次反応にしたがうとしたためで、実際はALT活性が高いほどラグフェイスは大きくなります。しかし、少なくともLD反応をMM式にしたがうと設定しなければ演算できません。なお、日本臨床化学会勧告法においては500 U/L ALTを正しく測定するためにはピルビン酸に対する $K_m$ 値が $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L以下のLDを2,000 U/L添加することを勧告しており、この条件でラグフェイスは1.0分以内に終了するとしています。

## 2-5. まとめ

LDの場合、速度論解析をするためには、いくつかの規制のあることを示しました。しかし、使用出来る場所を限定すれば、 $K_m$ 値を求められるし、この数値の利用ができることも記述しました。これはLDが「NADやNADHに対する $K_m$ 値がとて小さく、かつ、高濃度に添加しても阻害を起さない。」というすばらしい性質を有しているからです。NAD(P)やNAD(P)Hを補酵素とする各種デヒドロゲナーゼは同様な性質を有するものが多いため、MM式という簡単な演算式で解析することができました。しかし、他の酵素はこの様に扱い易い性格ではありません。ASTは2基質反応ですが、一方の基質（アスパラギン酸もしくは2-オキソグルタル酸）を大過剰添加し、どちらかを無視して、

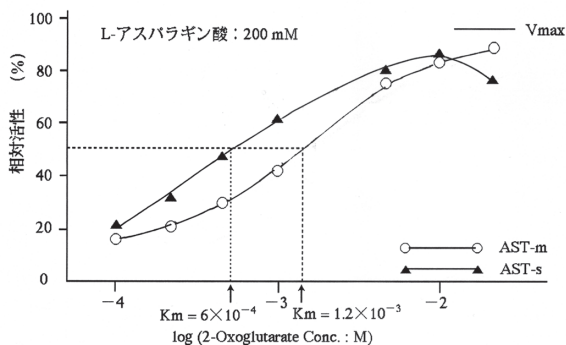


図7 ASTアイソザイムの活性と2-オキソグルタル酸濃度との関係<sup>10)</sup>

MM式に適応させたくとも難しい面があります。これは基質濃度と反応速度の関係見れば分かります (図7)。NADHのように直線的にはなりません。

また、酵素活性測定において、 $K_m$ 値の「何倍添加したら正しい酵素活性が測定できるか。」という質問が出されますが、酵素によって選択すべき濃度は全く相違します。LD活性測定の際のピルビン酸濃度は $K_m$ 値のせいぜい3~4倍しか添加されていません<sup>10)</sup>。この理由は基質阻害が発生するからです。また、粘性の強い基質の場合、濃度を上昇させると反応液の粘性が上昇し、反応は低下します (酵素反応も化学反応の一つで、酵素と基質の衝突によって反応が始まるが、粘性が強まると分子運動が抑制されて反応速度が低下する)。

結論としては、酵素の性質を十分検索し、その酵素に最も高い活性を与える条件を設定する必要があります。この意味では速度論解析も無力で、大まかな性質の掌握や基本的考え方の理解には力を発揮しますが、実際に発生する詳細な問題の解析には向かないことが多いと言えます。速度論解析の利点は「この酵素はこの部分が他の酵素と相違する」という、酵素の特徴を掌握し易くなることだと思います。

### 3. $K_m$ 値の使えない酵素

MM式を利用できない部分のあることを記述してきましたが、それより先に知っておかなければならないことは $K_m$ 値を用いてはならない酵素があることです。有名な酵素は次の3つです。

- ① ペルオキシダーゼ (POD)、カタラーゼなど、 $K_m$ 値がとても小さい酵素
- ② アミラーゼ (AMY) のように1モルから1モルの生成物とは限らない酵素
- ③ リパーゼのように、水溶性のほとんど無い基質に作用する酵素

どうして使えないのかを理解して下さい。

#### 3-1. $K_m$ 値が小さすぎる場合

$K_m$ 値が小さすぎるとどうして使えないのか考えます。実験的に求める時の方法を考えます。求め方は幾つかありますが、LB plotを用いる方法が一般的なので、この方法にしたがうものとします。実験的には $K_m$ 値をまたいだ基質濃度で実験する必要があることを前述しました。

$K_m$ 値が低い場合、実験が大変困難になります。具体的には $K_m$ 値が $10^{-4}$  mol/Lであったとします。そして、NADHの減少速度で活性を求めるものとします。 $1 \times 10^{-5}$  mol/Lの基質濃度を実験すると、最大の吸光度差 (NADHのモル吸光係数を $6.3 \times 10^3$  L/mol/cmとする) は0.063となります (図8)。さら

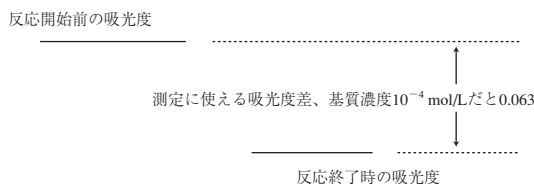


図8 低基質濃度 ( $10^{-4}$  mol/L以下) における反応速度測定の可能性

検出物質のモル吸光係数が $6.3 \times 10^3$  l/mol/cmで、基質濃度が $10^{-4}$  mol/Lとすると、基質が完全に反応史、end pointに達した時と反応開始前の吸光度差は0.063となる。さらに、反応開始液混和時間、混和後溶液の揺らぎなくなるまでの時間を待たなくてはならず、測定に利用できる有効吸光度差はますます小さくなる。これよりさらに低濃度基質にすれば測定できない。よって、 $1.0 \times 10^{-4}$  mol/Lの $K_m$ 値を実験的に測定することは極めて困難である。

に、反応液の混和時間、反応液の揺らぎ解消時間と反応のラグフェイズなどに時間を要するため、この吸光度差の中で吸光度変化速度を求めることは極めて困難です。これよりさらに低濃度になるとさらに困難です。

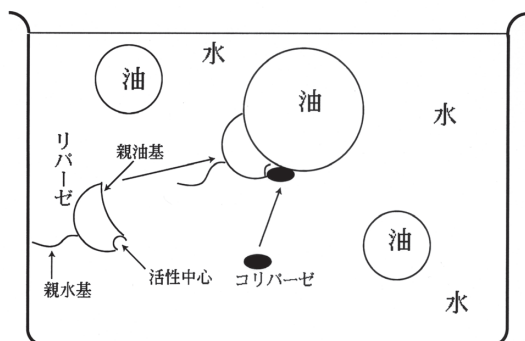
PODやカタラーゼは、さらに低濃度でないかと考えられています。このため、実験的にKm値を求めることができません。Km値としての表示を目にしたことがないと思います。

### 3-2. 基質 1 モルから 1 モルの生成物が産生されない場合

通常基質 1 モルから生成物 1 モルの生成することが一般的です。ところが基質 1 モルから何モルの生成物が産生されるか分からない場合、モル計算ができなくなります。具体的にはグルコース100分子が結合しているデンプンにアミラーゼが作用し、グルコース重合度40分子のデンプンと60のデンプンに分かれたとします。基質 1 モルから、生成物 2 モルができたこととなります。基質がどの様に変化したのか解析できなければ、アミラーゼが作用したかどうか理解できません。α-アミラーゼはグルコース重合度が数百分子結合したデンプンの中心部に繰り返し作用し、小分子のグルコース重合体（オリゴ糖）を産生するため、正確な速度論的解釈はできませんでした。近年、グルコースの重合度が3、4、5と限定された基質を入手できるようになり、Km値を求めることが出来るようになったのです（著者らは自動分析装置によりアミラーゼ活性測定を可能にするため、グルコース重合度の明確なオリゴ糖を探していたところ、貝沼らが各種リミットデキストリンを生産するアミラーゼを見出したので、これを利用した測定法を作成しました）。しかし、重合が6以上の場合、アミラーゼが基質に2回アタックすることがあるので、Km値に対する解釈が大変難しくなります。例えば、グルコース重合度が7のオリゴ糖（マルトヘptaオース）にアミラーゼが作用し、重合度5（マルトペンタオース）と重合度2（マルトース）が出来たとします。この生成物であるマルトペンタオースに対するアミラーゼの反応速度と単独で存在するマルトペンタオースに対する反応速度は相違します。アミラーゼがどのような反応メカニズムであるかは著者らが明確にしているもので、参考にさせていただきたいが、反応メカニズムを正しく理解するにはとても難しい酵素です。

### 3-3. 水に溶解しない基質に対する反応

水に溶解しない基質に対する場合もKm値は使えません。具体的にはリパーゼが代表です。リパーゼは水と油の界面で作用します。リパーゼの頭部は親油基が有り、水中に存在するリパーゼは油



リパーゼの頭部は親油基があり、その一部に活性中心がある。親油基はミセル（油と水の界面）を認識し、結合する。この結合部にコリパーゼも結合し、加水分解反応が生じる。このためリパーゼは水と油の界面面積と活性の間にMM式が成立すると考えられて居る。界面面積は計算できないが、界面が多いということは濁りが強いと考えられる。ミセルが上手にできると濁りが強くなる。濁りの強さと活性が関係すると考えられている。ところが、吸光度測定においては濁りは禁物で、しかも、酵素活性の新長により、油が減少し、ミセルが解消すると、比色法にてリパーゼ活性を求めることには問題が多い。

図9 リパーゼの構造と作用点

層表面に結合します。この親油性部の直ぐそばに活性中心が存在し、酵素作用が起こると考えられています (図9)。このため、基質濃度より、水と油の界面面積の広さが酵素反応速度に関与します。分かり易く言えば、基質を水に完全に溶解させたとするときリパーゼは反応し難くなります。反対に油だけの中で基質を反応させると反応速度がとても低くなります。水と油を最適に混ぜ合わせた状態がミセルを形成した時 (濁度が最も強くなった時) で、酵素反応が最も速くなります。しかし、次のような理由で、吸光度測定から酵素活性を求めることが困難です。

- ① 濁度が存在する溶液の吸光度は測定できない。
- ② リパーゼ反応が進行すると濁度が解消され、吸光度測定に影響する。
- ③ 各種エステラーゼ (アリアルエステラーゼ、カルボシリックエステラーゼ) がリパーゼの基質に作用する。
- ④ コリパーゼと呼ばれるタンパクが必要。
- ⑤ ミセルを安定化させ難い。

リパーゼやエステラーゼの測定は他の酵素とは比較にならない困難さがあります。リパーゼの項で詳細を記述します。

### 3-4. $K_m$ 値の使えない場合、何を代用する

$K_m$ 値が利用できない場合に代わりとなる指標が速度定数です。 $K_m$ 値よりも利用し易い面もあります。POD、カタラーゼなどでよく利用されていますので、ご存じの方も多と思います。ただ、PODの場合、反応が早すぎるので、計算するまでもないかもしれません。PODについては干渉反応の項で詳細を記述します。

アミラーゼおよび関連酵素 ( $\alpha$  グルコシダーゼ、グルコアミラーゼやインベルターゼなど) は反応解析の難しい酵素で、未だ十分に解析できていない状態です。この他、解析できない酵素が多くあります。少しでも解析できない酵素反応があれば、「どうして?」と考え、勉強して下さい。理解できた時の喜びは大変なものです。

### 3-5. まとめ

今回取り上げたLD反応の一方の基質である補酵素 (NADもしくはNADH) は大変扱い易い性質であったため、ほぼMM式に適応できましたが、AST、ALTなど、多くの酵素は適応し難い部分があります。また、最大反応速度に到達して直ぐに阻害反応が生じる酵素もあります。Ping-Pong Bi-Bi mechanismの速度式を用い、 $K_m$ 値を求める方法が報告されています。上級編の解析で取り上げたいと考えています。

基質濃度と反応速度の関係を表す図が本当に様々なことを教えてくれます。まずはこの作図を作成し、酵素の性格を十分に知ることが大切です。その上で、様々な解析に挑戦し、何が言えるのかを見て下さい。「MM式で解析できない」と考えた場合は反応メカニズム毎の速度式を使って下さい。さらなる解析法は次の高等編に続きます。

### 引用文献

- 1) 中村隆雄: 酵素反応速度論—定常状態・酵素—反応速度論と機構, 87-139, 学会出版センター, 1977.
- 2) Alan Fersht著: 今堀和友, 川崎誠一訳, 酵素—構造と反応機構. 酵素反応速度論における基本式, 80-97, 東京化学同人, 1986.
- 3) E Zeffren, P L Hall 著: 田伏岩夫訳 酵素反応機構. 速度論 I, 57-76, 学会出版センター, 1982.
- 4) Commission enzymologic de la socitte francaise de biologic Clinique: Recommendation for determining the catalytic concentration of lactate dehydrogenase in human serum at 30°C, Ann Biol Clin, 40: 160-162, 1982.
- 5) A Vassault, I Maire, L Sebillé et al.: An improvement for the determination of total lactate dehydrogenase catalytic activity whatever the isoenzymes. 3rd International Congress for Clinical Enzymology, Salzburg, 1981.

## 生 物 試 料 分 析

- 6) 赤堀四郎監修, 北原覚雄, L-Lactate: NAD oxidoreductase. 酵素ハンドブック, 28, 朝倉書店, 1970.
- 7) Z Ogawa, M Kanashima, C hayashi, H Itoh: Computer simulation of coupling enzyme reaction (laying stress on the ALT activity assay using LDH as coupling enzyme), 20-32, 1989.
- 8) Z Ogawa, A Morita, K Numagami, H Itoh: Computer simulation of coupling enzyme reaction II (the Michaelis-Menten constant ( $K_m$  value) of malate dehydrogenase in consideration of the reaction velocity of NADH)
- 9) Z Ogawa, M Kanashima, S Watanabe, K Numakami, H Itoh: Computer simulation of coupling enzyme reaction III (laying stress on the aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) assay using malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) as coupling enzyme), 208-216, 1993.
- 10) 酵素委員会: ヒト血清中酵素活性測定の勧告法ーアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ. 臨床化学, 16a-37a, 2004.