

吸着剤表面における酵素の動態

宇佐美 昭次・白崎 春海

(早稲田大学理工学部応用化学科)

Kinetics of Enzyme Adsorbed on Adsorbent

Shoji Usami and Harumi Shirasaki

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering,
Waseda University, Nishiokubo, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

Glucosylase was adsorbed on an adsorbent in order to obtain insoluble enzyme. Through the reaction catalyzed by the enzyme-adsorbent complex, a part of the adsorbed enzyme eluted from the adsorbent, but the rest still remained on the surface of the adsorbent. The activity of both parts of enzyme decreased in comparison with that of native one. Moreover, about the kinetic constants, an increase in the Michaelis constant and a decrease in the maximum velocity were observed. Although it is reasonable that the activity of the enzyme adsorbed on the surface of the adsorbent should decrease, varying its dimensional structure, it was found that the eluted enzyme was also slightly denaturated. The behaviors of both adsorbed and native enzymes were almost the same in case they were inhibited by mercuric acetate. It was assumed that the mechanism of inhibition of the adsorbed enzyme was similar to that of the native one. With a decrease in molecular weight of the substrate, the Michaelis constant increased, but the maximum velocity remained constant. The difference in kinetic constants between the adsorbed enzyme and the native one became smaller with a decrease in molecular weight of the substrate. It was assumed that the influence of the steric hindrance by the adsorbent on the smaller substrate was insignificant.

緒 言

酵素は一種の触媒であるが、その反応は一般の化学触媒の場合とは著しく異なっている。すなわち触媒である酵素を水に溶解した状態で基質に作用させて反応を行っており、そのために反応ごとに酵素を変性失活させてしまわなければならない。そこで酵素を触媒活性を保持したままで水不溶性とし、酵素反応を連続化するとともに、従来とは異なる新しい酵素の利用面を開発する試みが、近年注目されてきている¹⁾。

酵素の不溶化を行なう場合に、重要な不溶化条件と

して、不溶化された酵素が活性を有すること、およびその酵素が反応液中に溶離しないこと、の2点があげられる。これらは一般に相反する条件であるため、不溶性酵素の利用に関してその優位性が広く認められながら、実用化されているものがまだ少ないというのが現状のようである。

筆者らは物理吸着剤に酵素を吸着させることによって不溶化する方法を試みてきている²⁻⁵⁾。これは従来酵素の分離精製的手段として使用されてきたものであり、その操作がきわめて簡単であるとともに、条件が穏和であるため、酵素活性は低下しながらも保持され

ているという利点をもっているが、反応に際して酵素が担体から離れてしまう欠点を有し、固体触媒としての酵素利用においては不利である。しかし物理吸着のような弱い結合による、酵素の立体構造の変化およびその結果として生ずる反応性の変化を検討することは、単に不溶化の一方法としてのみでなく、酵素反応機作の解明にもつながると思われる。以下にその研究経過の諸点を報告する。

実験方法

1. 酵素 市販グルクアミラーゼ（長瀬産業製）の2%水溶液を使用した。
2. 基質 可溶性デンプンの水溶液を使用した。この可溶性デンプン溶液 10 ml に緩衝液 2 ml を加えたものを、酵素と反応させる基本基質とした。
3. 酵素反応および活性の測定 基本反応条件としては、酵素液 0.5 ml（またはこれと同量の酵素相当分の酵素～吸着剤 complex）に基質～緩衝液 12 ml を加え、pH 4.8（この酵素の最適 pH）、40°C とした。反応生成物であるグルコースを Somogyi 法によって定量し、反応初期におけるグルコース生成速度をもって酵素活性とした。

実験結果

1. 物理吸着による不溶性酵素の調製 まずはじめに酵素を吸着させる吸着剤の選択を行なった。この際、a) 吸着剤が酵素を良好に吸着すること、b) 反応生成物であるグルコースを吸着しないこと、が選択条件である。そこで、種々の吸着剤と酵素液とを接触させ、吸着後の残液の活性を測定することによって吸着力を調べた。吸着前後の酵素液の活性の比から酵素吸着率を求めたところ、酵素を100%近く吸着するものとして、活性白土、酸性白土、活性炭、骨炭などがあり、このうち白土類はグルコースの吸着をほとんど行なわないことがわかった。活性炭はグルコースをかなり吸着するが、酵素をその吸着能力いっばに吸着した complex はグルコース吸着性が小さいという結果が出ており、また後に述べるように、活性炭の場合、反応に際して complex から溶離する割合も小さいので、吸着剤として、離性白土および活性炭をとりあげることとした。

ここで酸性白土は通液性が悪いので、濾過助剤として酵素を若干吸着するけれどもグルコースの吸着能をもたないケイソウ土を使用することとした。その混合割合と酵素およびグルコースの吸着率との関係を Fig. 1 に示す。混合吸着剤量は一定としてあるから、酸性

白土の使用量はケイソウ土の混合割合がきくなるほど少なくなる。図から明らかなように、ケイソウ土の混合率が80%になっても酵素は十分に吸着される。この

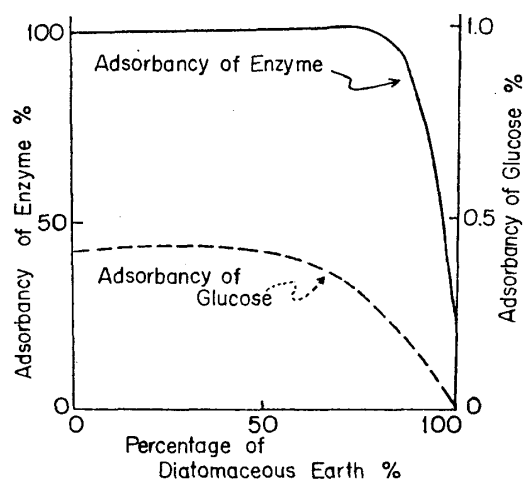


Fig. 1. Adsorption by mixed adsorbent.

混合比の吸着剤について、吸着時間と吸着率との関係を調べてみたところ、きわめて短時間で吸着平衡に達し、その吸着率も100%になることがわかった。そこで以後吸着剤として酸性白土を用いる場合には、4倍量のケイソウ土を加えた混合吸着剤とすることにした。

2. 酵素と吸着剤の量比について Fig. 2 に示すように、酵素量を一定にして吸着剤量を変化させると、吸着率は吸着剤量の増加とともに増大してゆき、100

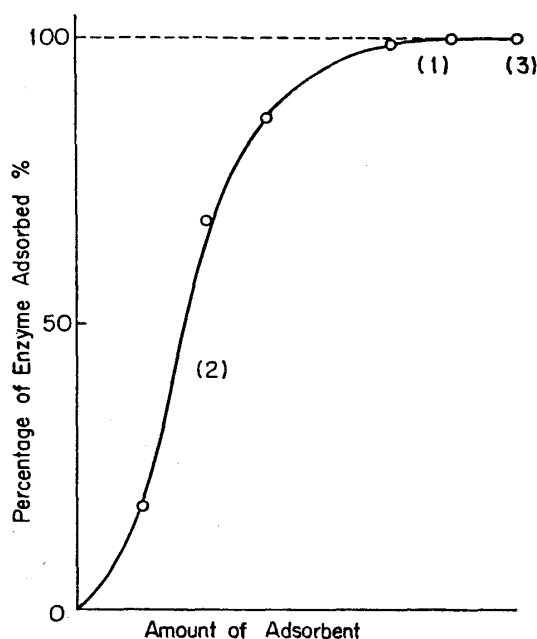


Fig. 2. Adsorption of enzyme by adsorbent.

％に達する。吸着率が100％に達した点（図中(1)）は吸着能と酵素の量が等しいところ、100％以下（(2)）では吸着能いっぱいには吸着し、酵素が残っているところ、100％の点を越えた部分（(3)）では吸着能が余っていると考えてよい。（2）の部分で飽和吸着状態、（3）の部分で不飽和吸着状態と称することにする。吸着剤の酵素飽和度と活性の関係を調べたものがTable 1である。ここで飽和度とは、吸着剤が吸着し得る最大酵素量に対する、吸着された酵素の割合である。これによると、飽和度の大きいものほど、すなわち酵素量に対する吸着剤量の少ないものほど、活性が

Table 1. Relation between saturation degree of adsorbent with enzyme and activity.

Saturation degree of adsorbent with enzyme (%)	Activity	
	Glucose mg	/ ml Enz. soln. adsorbed
6.7		0.59
13.3		0.51
36.7		0.57
40.0		0.61
53.3		0.84
66.7		0.82
100		0.95

大きいことがわかる。また不飽和吸着の活性炭 complex では反応生成物であるグルコースの吸着性も大きいことがわかっている。これらの事実より、以下の実験においては、飽和吸着 complex を使用することとした。

3. 被吸着酵素の活性 Table 2 に示す方法にしたがって、酵素～吸着剤 complex を、飽和吸着になるようにあらかじめ定めた量比にして調製する。これを基質と反応させると、時間の経過とともに生成物が増加するわけであるが、一定時間経過後この反応系より遠心沈殿分離または濾別によって complex を除去した後も生成物の増加が見られることから、吸着剤より溶離した酵素が存在し、それによって反応が進むと考えられる。この反応の進行状態を簡単に表わすと、Fig. 3 のようになる。complex の反応系においては、吸着剤表面に存在する酵素と溶離している酵素の活性の和として活性が現われており、complex を除去した後の活性は溶離した酵素のみによるものである。以後、吸着剤に吸着されたまま作用する酵素を表面酵素、溶離して作用する酵素を溶離酵素と称することにする。表面酵素の活性を知るには、complex 全体の活性から溶離酵素活性、すなわち complex 除去後の活性を

差し引けばよいわけである。

このようにしてえた表面酵素 および 溶離酵素の活性画分を Table 3 に示す。ここで活性は native 酵素の活性に対する比で表わしている。この結果から

Table 2. Determination of adsorbed enzyme activity.

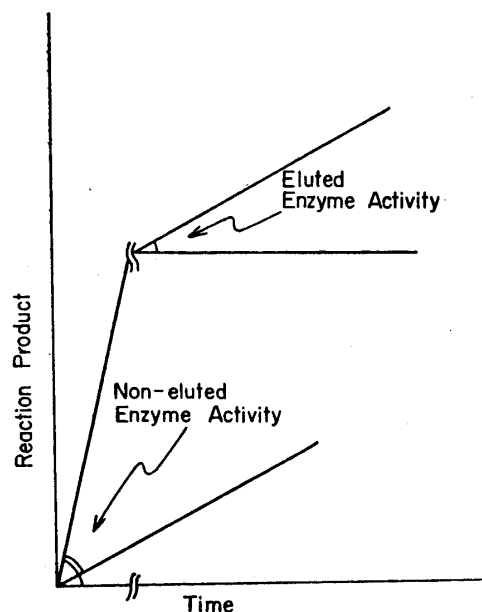
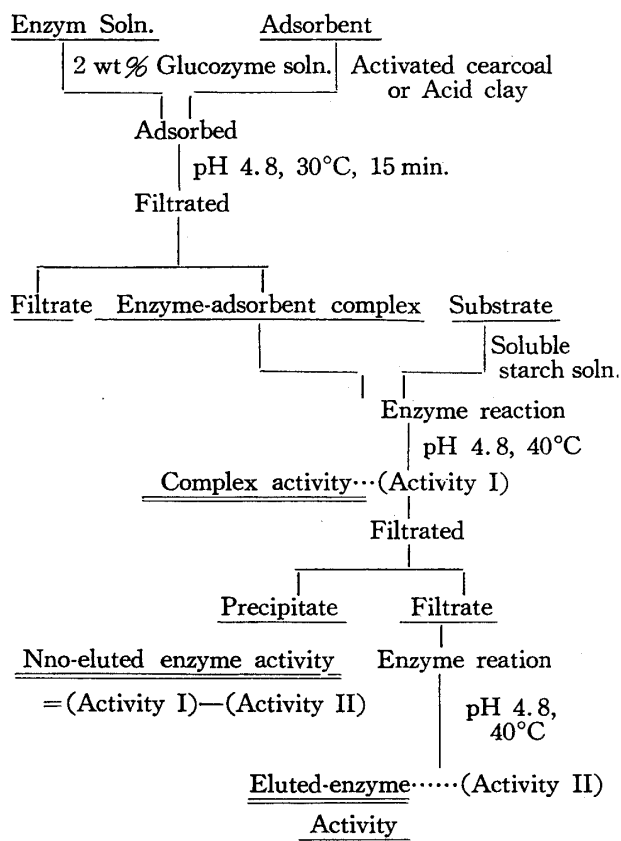


Fig. 3. Typical pattern of adsorbed enzyme reaction.

わかるように、酸性白土においては溶離酵素画分が大きいものに対して、活性炭 complex ではそのほとんどが表面酵素画分として存在し、溶離酵素画分は全活性の7%程度しか見出されない。しかし活性炭 complex の全活性は酸性白土にくらべてかなり低い。酸性白土 complex の二つの画分の活性を、それぞれの画分の窒素含有率から補正すると、native の酵素活性 1 に対して、溶離酵素活性は0.61, 表面酵素活性は0.48という値が得られた。溶離した酵素は均一系で反応が行なえるという点で native 酵素と同様であろうと考えられるが、その活性は native 酵素の61%しか見出されない。表面酵素画分ではその反応は不均一系であり、酵素が吸着剤表面に拘束されていることを考えれば、この結果は当然であるといえる。またこの表面酵素の活性について、活性炭 complex の活性をほとんど吸着剤表面の酵素によるものと考え、酸性白土の方が活性炭の場合より若干高い活性をもつということがいえる。

Table 3. Activity of adsorbed enzyme.

Adsorbent	Activity* of complex	Ratio of eluted or non-eluted enzyme activity	
		Eluted (%)	Non-eluted (%)
Acid clay	0.55	63.6	36.4
Activated charcoal	0.31	6.9	93.1

* Activity of adsorbed enzyme
Activity of native enzyme

4. 被吸着酵素の動力学定数 吸着剤表面における酵素の動態を知る手段の一つとして、被吸着酵素について Michaelis 定数および最大速度の測定を行なった。基質として種々の濃度の可溶性デンプン溶液を用い、それぞれ反応初速度を求め、Lineweaver-Burk 法によって算出した両定数 ($\bar{V}$, $\bar{K}_m$) を Table 4 に示す。ここではそれぞれ native 酵素の最大速度および Michaelis 定数 (V , K_m) との比で表わしてある。まず最大速度は native 酵素に比していずれも低下しており、被吸着状態における酵素タンパク質の高次構造をはかなり変化していること、また酸性白土系においてみられる溶離酵素も、被吸着時に何らかの影響を受け、それが回復していないことが推測される。他方、Michaelis 定数はいずれも native 酵素よりもかなり増大しており、吸着によって基質との親和性が減少したということになる。これは吸着による高次構造の変

化、あるいは立体障害的な束縛によると考えられるが、この K_m 値は最大速度の1/2の速度を示す基質濃度であることから、もし何らかの理由で、反応液中における基質の偏在現象が生じるならば、この実測値は酵素本来の K_m 値と異なった値をとることもあろう。酸性白土系では基質との反撓が起り、被吸着酵素付近の基質濃度が液系全体よりも低くなるということが考えられ、見かけの K_m が大きく出ると解釈することもできる。

Table 4. Maximum velocity ($\bar{V}$) and Michaelis constant ($\bar{K}_m$) of absorbed enzymes.

—Ratio to V and K_m of native enzyme—

Enzyme		$\bar{V}/V$	$\bar{K}_m/K_m$
Activated charcoal	Non-eluted	0.25	6.3
	Eluted	0.88	1.4
Acid clay	Non-eluted	0.53	5.3
	Eluted	0.88	1.4

このように吸着剤の電荷状態が complex 活性に大きな影響を与えていることは、Fig. 4 に示すように種々の pH 値における complex 活性を比較した結果からも推測される。しかし、電荷の影響のみであるならば、pH~活性曲線は単にアルカリ側に平行移動された形になるはずであるのに、実際にはアルカリ側でも native のものより先に低下しており、担体の電荷による基質の偏在のほかにも、安定 pH 範囲を減少させる何らかの理由があるものと思われる。

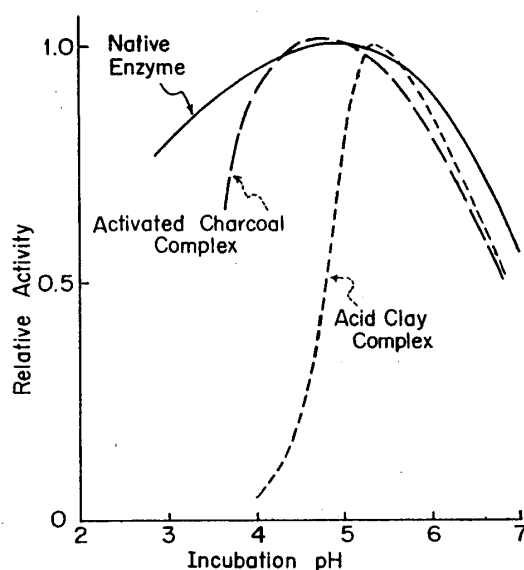


Fig. 4. Activity at various pH values.

先にも述べたように、一度吸着された後溶離した酵素は、native 酵素と同じように均一系の反応を行なうことができるにもかかわらず、活性は低下し、最大速度の減少および Michaelis 定数の若干の増加が認められる。この場合は、吸着剤による立体障害ということは考えられない。そこで吸着剤に酵素が吸着するときに、吸着剤表面の水素イオンによる変性が行なわれたということが考えられる。これについて検討するために、native 酵素を水素イオン処理し、この際の最大速度および Michaelis 定数の変動を調べ溶離酵素の場合と比較してみた。native 酵素液を酸性に調節し、30°C、30分保持した後、最適 pH である 4.8 にもどし、 V および K_m を求めて無処理のものとの比で表わしたのが Table 5 である。これを Table 4 の溶離酵素における値と比較すると、最大速度の減少、Michaelis 定数の若干の増加という点で類似していることがわかる。すなわち、溶離酵素の活性減少は吸着時の酸変性に起因していると考えられる。

Table 5. Maximum velocity ($\bar{V}$) and Michaelis constant ($\bar{K}_m$) of native enzyme preincubated in various pH.

—Ratio to V and K_m —		
Preincubation pH	$\bar{V}/V$	$\bar{K}_m/K_m$
3.0	0.96	1.7
2.5	0.93	1.9
1.8	0.41	1.8

5. 被吸着酵素に対する阻害剤作用 阻害剤に酢酸第2水銀を用い、native 酵素の阻害状況と、complex のそれとを比較して、被吸着時の動態を考察してみた。阻害剤を加えた場合の反応速度を阻害剤量 0 の場合の速度に対する比で表わしたものが Table 6 である。この結果をみると、活性炭 complex ではその表面酵素はいずれの場合も native 酵素に比して比活性が高く、被阻害度の低下がおこっている。酸性白土表面酵素では、阻害剤濃度が低い場合には、阻害剤が存在しないときより活性が若干高くなる現象が見られるが、その後著しく阻害が進む。この結果より、活性炭表面酵素は吸着による阻害剤に対する保護作用といった現象が見られるのであるが、これが酵素の活性基と吸着剤との結合様式に関連するものかどうかは、今後さらに研究を深めてゆく必要がある。活性炭の表面酵素は Table 3 に示したようにかなり活性を失っており、これに対して阻害剤が作用しても阻害率が大きくなら

ないとも考えられる。酸性白土系では、活性炭の場合と比較してその結合力は弱く、活性も高いので、阻害率がいくらか大きく現われること、またその酵素の可動性からも阻害を受けやすいこと、が考えられる。

Table 6. Inhibition of enzymes by mercuric acetate.

(CH ₃ CO ₂) ₂ Hg Conc. mol / ml enz. soln.		Activity Ratio to that of non-inhibited		
		2.5 × 10 ⁻⁶	5.0 × 10 ⁻⁶	10.0 × 10 ⁻⁶
Enzyme				
Native enzyme		0.92	0.79	0.50
Activated charcoal	Non-eluted	1.01	0.98	0.63
Acid clay	Non-eluted	1.05	0.57	0.24

つぎに被吸着酵素における阻害現象を解析するために、阻害剤存在下でのこれらの酵素の最大速度 (V') および Michaelis 定数 (K'_m) を測定し、阻害剤 0 の場合との比を求めたものが Table 7 である。最大速度は阻害剤濃度の増大につれて、いずれの酵素系においても減少しているが、Michaelis 定数は一度減少した後増加するという傾向が見られる。このように、native 酵素と被吸着酵素の両者において、阻害の本質的機構は変わらないことがわかる。

Table 7. Maximum velocity (V') and Michaelis constant (K'_m) in the presence of inhibitor.

—ratio to $\bar{V}$ and $\bar{K}_m$ —					
Inhibitor Conc. × 10 ⁶ mol/ml Enz. Soln.		$V'/\bar{V}$		$K'_m/\bar{K}_m$	
		5	10	5	10
Enzyme					
Native enzyme		0.82	0.69	0.75	1.62
Activated charcoal	Non-eluted	0.75	0.53	0.45	1.64
Acid clay	Non-eluted	0.72	0.34	0.24	1.84

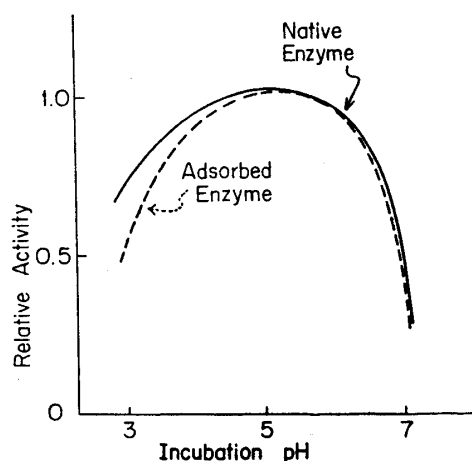
6. 被吸着酵素の基質特異性 活性炭 complex について、分子量の異なるデキストリンおよびマルトースを作用させ、その基質特異性における変化を検討した。基質としてのデキストリンには、デンプンを α -アミラーゼによって分解し、エタノール沈殿法で分画を行なったものを用い、分子量を 3,5-ジニトロサリチル酸法で測定した。グルコース生成量はデキストリンの

場合 Somogyi 法を, マルトースの場合グルコースオキシダーゼ・カタラーゼ法を用いて測定した. これらの基質について, native 酵素および活性炭表面酵素の最大速度および Michaelis 定数を測定した結果を Table 8 に示す. まず native 酵素については, 基質分子量が低下するにつれて, Michaelis 定数が増大するが, 最大速度はマルトースの場合を除きほとんど一定である. すなわち基質との親和性は重合度が減少するにつれて減少している. マルトースにおいてみられる最大速度の著しい差違は, マルターゼ活性の呈し方に差異があることを意味しているものと思われる. 活性炭に吸着された酵素はそれぞれの基質について, native 酵素に比して K_m 値が大きく, 基質との親和性は吸着によって減じることが明らかである. しかし native 酵素の K_m との差すなわち親和性の差は基質分子量が減少するにつれて小さくなる傾向がある. これは活性炭に酵素が吸着されているために立体障害り, 基質が

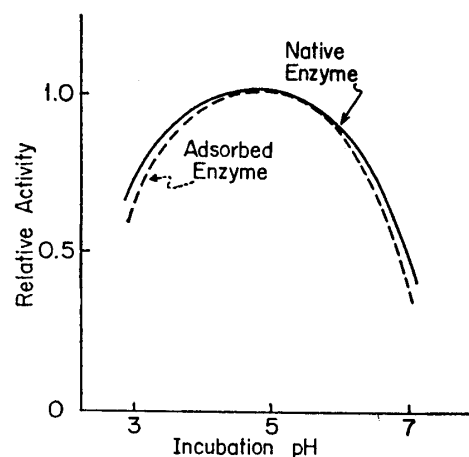
あ分子の小さなものほど可動性が大きく, native 酵素と変わらぬ親和性を示すことが可能になるものと解釈される.

Table 8. Maximum velocity and michaelis constant of native (V , K_m) and adsorbed ($\bar{V}$, $\bar{K}_m$) enzyme on various substrates.

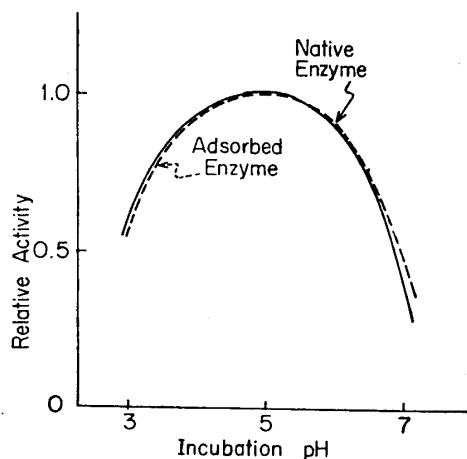
Molecular weight of substrate	Native enzyme		Adsorbed enzyme —Ratio to V and K_m —	
	V (U)	K_m (M)	$\bar{V}/V$	$\bar{K}_m/K_m$
80×10^3	1.1	7.9×10^6	0.25	6.3
7.0×10^3	1.2	83×10^6	0.20	2.9
5.0×10^3	1.4	170×10^6	0.16	1.4
2.5×10^3	1.4	370×10^6	0.18	1.1
1.0×10^3	1.2	940×10^6	0.24	1.1
342 (Maltose)	0.21	2100×10^6	0.42	1.2



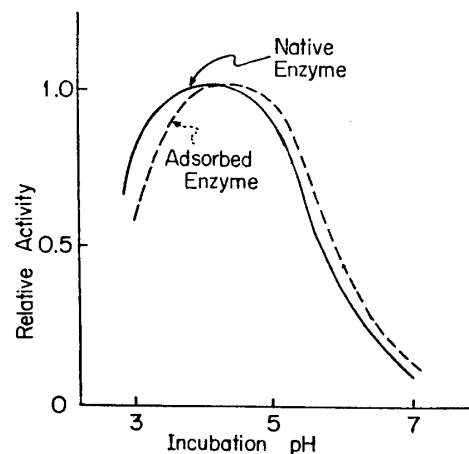
a) Molecular weight of substrate: 7×10^3



b) Molecular weight of substrate: 5×10^3



c) Molecular weight of substrate: 1×10^3



d) Substrate: Maltose

Fig. 5. Activity at various pH values on various substrates. (Adsorbent: activated charcoal)

最大速度については、被吸着酵素における値と native 酵素における値との比は、マルトースの場合を除き、ほぼ一定の値を示している。そこでマルトースについてはその値が他の約2倍となっているのであるが、これは基質分子が小さいために吸着の影響が減じているとも考えられるし、マルターゼ活性の一特異性のためとも考えられる。ここではおそらく後者が原因であろう。また溶離酵素の画分を各基質について比較してみたところ、マルトースを基質とした場合には溶離酵素画分が非常に少ないという結果が得られた。

各種水素イオン濃度における活性について、native 酵素と被吸着酵素を比較したものが Fig. 5 であるが、活性炭に吸着されたことによる影響は非常に小さい。マルターゼ活性についてはその中性 pH 領域での活性低下という現象が他の基質の場合に比して顕著であり、これは活性炭に吸着された酵素においても特異的に見られる。

さらにそれぞれの基質との反応に際しての阻害剤作用の影響について検討した結果が Table 9 である。前述したように、分子量の大きい基質では、被阻害の結果生じる活性低下が被吸着酵素の場合小さいのであるが、分子量が小さくなると、そういった現象は見られなくなる。この保護作用は、酵素が活性炭に吸着していることによる立体的なものであると考えれば、基質分子量の低下という立体的な変化が、このような保護作用に変動を与えることも無理はないといえる。

Table 9. Relative activity of enzyme on various substrates in the presence of inhibitor.

Molecular weight of substrate	Enzyme	Relative activity ($(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Hg}$ (mol/ml enz. soln.))		
		2.5×10^{-6}	5×10^{-6}	10×10^{-6}
80×10^3	Native	0.92	0.79	0.50
	Adsorbed enzyme	1.06	0.98	0.63
5×10^3	Native	0.92	0.86	0.70
	Adsorbed enzyme	0.68	0.67	0.38
1×10^3	Native	0.97	0.93	0.81
	Adsorbed enzyme	0.70	0.81	0.77
342 (Maltose)	Native	0.83	0.78	0.65
	Adsorbed enzyme	0.78	0.57	0.36

本報文は昭和44年度日本醸酵工学会大会不溶化酵素シンポジウムにおいて講演したものであり、本研究は昭和44年度文部省科学研究費による研究の一部である。

文 献

- 1) 干畑, 土佐: 化学と生物, **7**, 147 (1969).
- 2) 宇佐美, 武富: 醸協誌, **23**, 267 (1965).
- 3) 宇佐美, 山田, 木村: 醸協誌, **25**, 513 (1967).
- 4) 宇佐美, 木村: 水処理技術, **9**, 11 (1968).
- 5) 木村, 白崎, 宇佐美: 工化, **72**, 489 (1969).