

## QCM 法を用いたトリプシンの活性評価

### Estimation of Trypsin Activity by the Use of QCM Method

鈴木まりの<sup>†</sup>, 釘宮 慎一<sup>†</sup>  
Marino SUZUKI, Shin-ichi KUGIMIYA

#### Abstract

Trypsin activity has been studied by use of  $\alpha$ -casein as a substrate. Enzymatic hydrolysis has been investigated with the quartz crystal microbalance (QCM) method. The results obtained showed a good agreement with reported values in previously.

#### 1. はじめに

水晶発振子マイクロバランス (QCM)<sup>1)</sup> を用いてタンパク質の物理吸着と分解反応を確認した。水晶発振子とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加するとある一定の周波数 (共振周波数) で振動する性質を示す。金属薄膜上にナノグラム程度の物質が吸着すると物質の質量に比例して共振周波数が減少するため微量天秤として利用することができる。静的な分子間相互作用のみならず、生体内で起こる動的な反応、たとえば酵素反応の解析に用いることができ、標的分子を標識することなしに分子間相互作用をリアルタイムに観測できるのが QCM 法の特徴である。今回の実験では 1Hz 減少する毎に 30pg の物質が吸着する装置を使用した。

従来は、酵素反応は ES 複合体を追跡することが困難であったために、生成物の定量から、ミカエリスメンテン式を用いて  $K_m$  値と  $k_{cat}$  値を求めてきた。 $K_m$  値は  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $k_{cat}$  の 3 つのパラメータを含むために解析が困難であった。しかし QCM 法では、ES 複合体の生成と分解速度を質量変化として追跡できるために  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $k_{cat}$  の 3 つの値を個別に求めることができ、酵素反応の各過程を定量的に論議することができる。今後は QCM 法が酵素反応の反応解析の新しい基準となり、さらに複雑な反応解析まで拡張できることが期待される。

本研究ではカゼイン (乳製) を QCM 基板上へ吸着させトリプシンを滴下することにより、プロテアーゼ反応を

確認した。滴下するトリプシンの濃度やバッファー溶液であるトリス緩衝溶液の pH を変化させる、金属イオンや陽イオンをトリプシンに混ぜ合わせるなど条件を変え、酵素活性を評価した。カゼインとトリプシンを用いた実験の前例は多いが、QCM を用いた実験例はあまり多くない。QCM を使うことにより溶液中で酵素反応をリアルタイムに観測し、分解量と速度定数を同時に算出することが可能となった<sup>2)</sup>。

#### 2. 実験

QCM 測定装置 (図.1) として、株式会社イニシウム 27MHzQCM を使用した。

測定条件は測定チャンネル数 1、設定温度 25°C、攪拌子の回転数 1000、データ取り込み速度 1.0 で行った。測定条件は統一して QCM 測定を行った。



(図 1. QCM 装置)

##### 2・1 バッファー溶液のトリス緩衝溶液調整

- ① 100ml ビーカーに電子天秤で量り取ったトリスヒドロキシメチルアミノメタン 0.7g と、トリスヒドロキ

<sup>†</sup>愛知工業大学 工学部 応用化学科 (豊田市)

シメチルアミノメタン塩酸塩 3.0g を加え、蒸留水 50ml で溶解しトリス緩衝溶液とした。

- ② このトリス緩衝溶液を 500ml メスフラスコに移し、標線まで蒸留水を加え、pH7.5、0.05M のトリス緩衝溶液 500ml を調製した。
- ③ 同じ手順で実験の必要に応じ、pH5、6、7、7.5、8、8.5、9、10 のトリス緩衝溶液を調製した。

## 2・2 トリプシンによるカゼイン分解の pH 依存性

- ① 金基板のチップを行う。綿棒に 1%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を浸けて洗浄し、エアーを吹き付けて乾燥させる。ピランハ溶液 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{SO}_4=1:3$ )  $2\mu\text{l}$  を金基板に置いて、5 分間洗浄した。大量の水で洗い流し、エアーで吹き付けて乾燥させた。繰り返し同様にピランハ溶液で洗浄後、1%SDS 溶液で洗浄した。QCM で用いるカップを蒸留水で洗浄した。
- ② 最終濃度  $78.1\mu\text{g/ml}$  のカゼインを金基板上に滴下し、湿潤状態で 30 分静置した。トリス緩衝溶液で洗い流し QCM 装置にセットした。カップに pH5 のトリス緩衝溶液 8ml 入れ、15 分間安定化させた。
- ③ トリプシンをトリス緩衝溶液で溶かした溶液を滴下した。トリプシンがカゼインを分解し終わり、グラフが安定したら測定を終了した。
- ④ 同様の手順で pH6、7、7.5、8、8.5、9、10 のトリス緩衝溶液を使い実験を行った。

## 2・3 2価金属イオンを用いた酵素活性評価

### 2・3・1 塩化マグネシウムの効果

- ① 金基板のチップを行った。綿棒に 1%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を浸けて洗浄し、エアーを吹き付けて乾燥させた。ピランハ溶液 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{SO}_4=1:3$ )  $2\mu\text{l}$  を金基板に置いて、5 分間放置した。大量の水で洗い流し、エアーで吹き付けて乾燥させた。繰り返し同様にピランハ溶液で洗浄後、1%SDS 溶液で洗浄した。QCM で用いるカップを蒸留水で洗浄した。
- ② 最終濃度  $78.1\mu\text{g/ml}$  のカゼインを金基板上に滴下し、湿潤状態で 30 分静置した。トリス緩衝溶液で洗い流し QCM にセットした。カップに pH8.5 のトリス緩衝溶液 8ml 入れ、15 分間安定化させた。
- ③ 塩化マグネシウム、トリプシンをそれぞれトリス緩衝溶液で溶かした溶液を滴下した。カゼインを分解し終わり、グラフが安定したら測定を終了した。トリプシンの最終濃度は  $12.5\sim 16.0(\mu\text{g/ml})$  を使用した。

### 2・3・2 塩化カルシウムの効果

- ① 金基板のチップを行う。綿棒に 1%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を浸けて洗浄し、エアーを吹き付けて乾燥させた。ピランハ溶液 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{SO}_4=1:3$ )  $2\mu\text{l}$  を金基板に置いて、5 分間放置した。大量の水で洗い流し、エアーで吹き付けて乾燥させた。繰り返し同様にピランハ溶液で洗浄後、1%SDS 溶液で洗浄した。QCM で用いるカップを蒸留水で洗浄した。
- ② 最終濃度  $78.1\mu\text{g/ml}$  のカゼインを金基板上に滴下し、湿潤状態で 30 分静置した。トリス緩衝溶液で洗い流し QCM にセットした。カップに pH8.5 のトリス緩衝溶液 8ml 入れ、15 分間安定化させた。
- ③ 塩化カルシウム、トリプシンをそれぞれトリス緩衝溶液で溶かした溶液を滴下した。カゼインを分解し終わり、グラフが安定したら測定を終了した。トリプシンの最終濃度は  $12.5\sim 16.0(\mu\text{g/ml})$  を使用した。

## 3. 結果および考察

### 3・1 トリプシンによるカゼイン分解の pH 依存性

#### 3・1・1 トリス緩衝溶液 pH5 を用いた実験

トリプシン滴下後より周波数が下がり続けていることから、トリプシンが分解反応を行っておらずカゼイン上に付着してしまい周波数が減少したことが考えられる。周波数グラフも波立つグラフが多く数値が安定しなかった。トリプシンは pH5 のトリス緩衝溶液中ではタンパク質分解酵素として機能しないことがわかった。

#### 3・1・2 トリス緩衝溶液 pH6 を用いた実験

緩やかに周波数グラフは上昇していることから、トリプシンによる分解反応が行われていることが分かる。他の結果と比較すると速度定数は約半分程小さい数値だが分解量はほぼ同量であった。トリプシンは pH6 からタンパク質分解酵素として機能することが分かった。

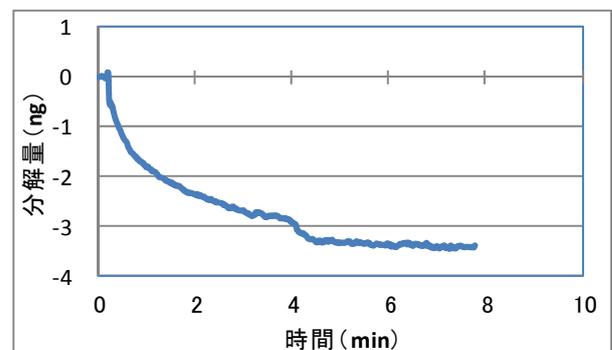


図-1 トリス緩衝溶液 pH5 トリプシン最終濃度 ( $15.5\mu\text{g/ml}$ )

## QCM 法を用いたトリプシンの活性評価

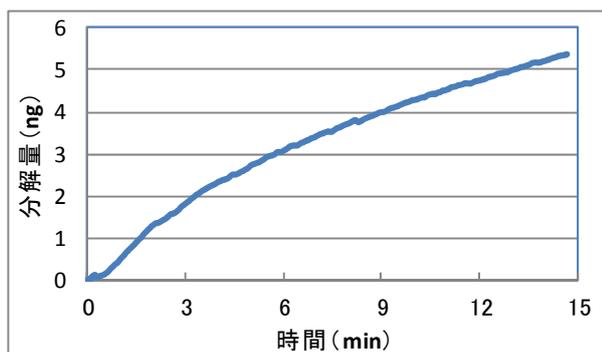


図-2 トリス緩衝溶液 pH 6 トリプシン最終濃度 (11.8  $\mu\text{g/ml}$ )

## 3・1・3 トリス緩衝溶液 pH7 を用いた実験

トリス緩衝溶液 pH6 の周波数グラフと比較すると、グラフの上昇する角度が少し急になっていることがわかるが、速度定数はほぼ同じ数値になった。

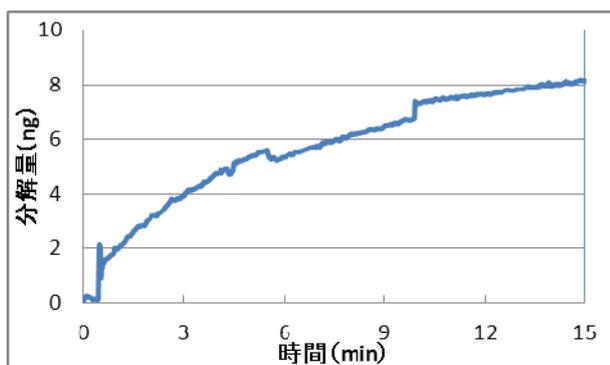


図-3 トリス緩衝溶液 pH7 トリプシン最終濃度 (15.5  $\mu\text{g/ml}$ )

## 3・1・4 トリス緩衝溶液 pH7.5 を用いた実験

トリス緩衝溶液 pH7 の周波数グラフと同じ形になったが、分解量は減少し、速度定数は増える結果となった。速度定数が増えた理由とし、至適 pH8 へ向かっているからだを考える。

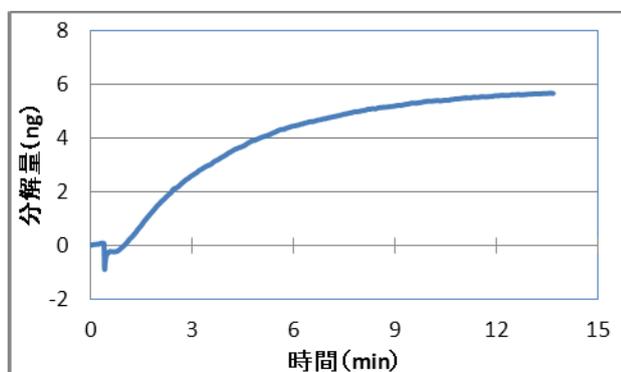


図-4 トリス緩衝溶液 pH7.5 トリプシン最終濃度 (14.0  $\mu\text{g/ml}$ )

## 3・1・5 トリス緩衝溶液 pH8 を用いた実験

トリス緩衝溶液 pH8 以後の周波数グラフはトリプシン滴下時に周波数グラフが減少し、その後上昇する形となった。これはトリプシン滴下時に一時的にカゼイン上にトリプシンが付着してしまい、その後分解反応が行われ基板上的重量が変化したためと考えられる。分解量は最も少ない数値となったが、速度定数は最も高い数値となった。速度定数を見ると pH8 が至適 pH<sup>2)</sup> ということがわかる。

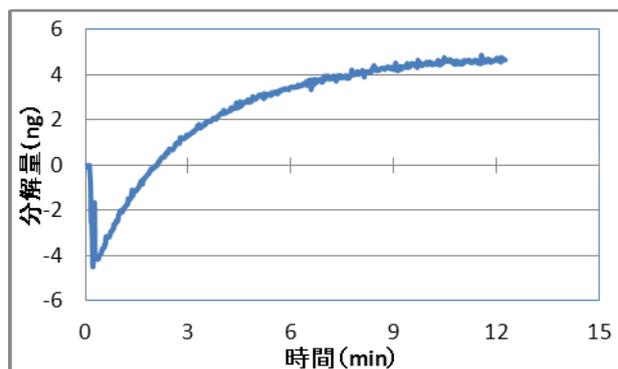


図-5 トリス緩衝溶液 pH8 トリプシン最終濃度 (15.0  $\mu\text{g/ml}$ )

## 3・1・6 トリス緩衝溶液 pH8.5 を用いた実験

速度定数は大きな数値が得られ、分解量は平均よりやや低めの数値となった。周波数グラフはトリス緩衝溶液 pH8 と同じ形になった。分解反応が最も起こりやすい (速度定数が大きい) pH は 8 ということがわかったが、速度定数が大きい=分解量が多い、と考えてよいのだろうか。速度定数が早くなり、その後カゼインの分解量が多くなっていくと考え、pH8、8.5 より pH9 の分解量が多くなるのが予想できる。

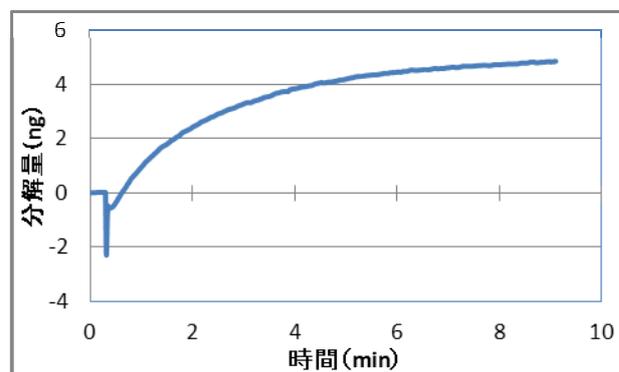


図-6 トリス緩衝溶液 pH8.5 トリプシン最終濃度 (16.0  $\mu\text{g/ml}$ )

## 3・1・7 トリス緩衝溶液 pH9 を用いた実験

分解量は最も大きな数値となったが速度定数は減少した。この結果よりトリプシンは pH8 付近で最も活性し始

め、その後分解量が増えていくことが分かった。

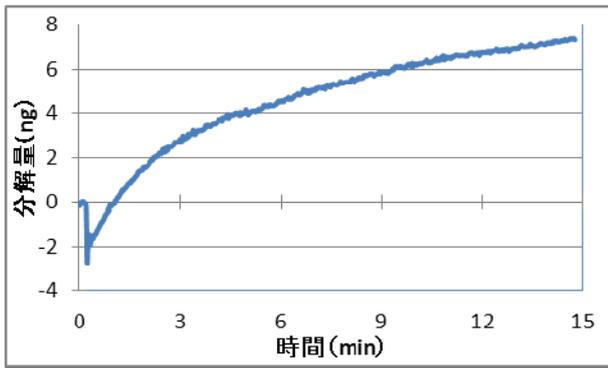


図-7 トリス緩衝溶液 pH9 トリプシン最終濃度 (15.5 μg/ml)

3・1・8 トリス緩衝溶液 pH10 を用いた実験

トリプシン滴下後より急激に周波数が下がり続けていることからトリプシンが分解反応を行っておらず、カゼイン上に付着してしまい周波数が減少したことが確認できる。周波数グラフも波立つグラフが多く数値が安定しなかった。トリプシンは pH10 のトリス緩衝溶液中ではタンパク質分解酵素として機能しないことがわかった。

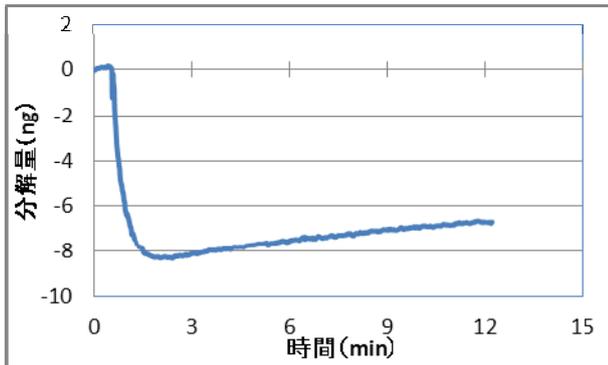


図-8 トリス緩衝溶液 pH10 トリプシン最終濃度 (16.3 μg/ml)

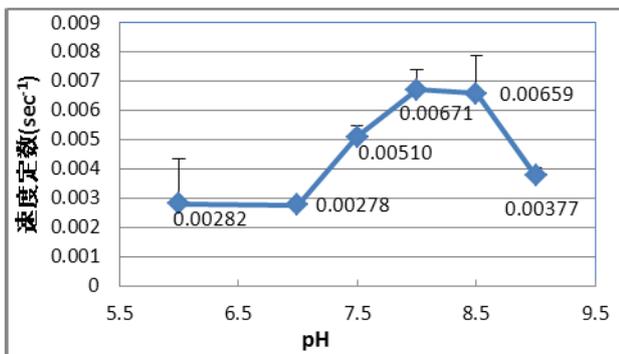


図-9 トリプシンによるカゼイン分解の速度定数の pH 依存

表 1. 分解量と速度定数の平均

pH	5	6	7	7.5	8	8.5	9	10
分解量 (ng)	-2.0	8.9	9.4	5.7	4.9	7.1	11.0	-7.1
速度定数 (sec <sup>-1</sup> )	0.00035	0.00282	0.00278	0.00510	0.00671	0.00659	0.00377	

トリス緩衝溶液 pH 別実験よりトリプシンの至適 pH は 8 であるということ、トリプシンは pH6~9 の間のときにタンパク質分解酵素として機能するということがわかった。

3・2 2価金属イオンを用いた酵素活性評価

3・2・1 塩化マグネシウムの効果

少量の阻害効果が確認できたが、完全に反応を抑制することはできなかった。また、阻害効果確認も分解量から読み取れるものであり、速度定数の数値は変わらなかった。より正確な結果を出すために、滴下するトリプシンの溶液に塩化マグネシウム、塩化カルシウムを混ぜ合わせ実験を行った。

3・2・2 塩化カルシウムの効果

3mM では速度定数は 0.02262 と高い数値になったが、5mM、25mM ではトリス緩衝溶液 pH8 の速度定数と比較すると小さな数値になった。5mM から 25mM にかけて少量速度定数が増量した。3mM では濃度が薄すぎて阻害効果を表さなかった。

2 価金属イオンの効果を試した実験より、2 価金属イオンは阻害剤と言われているが一緒に滴下するものや濃度により活性を高める効果があるということがわかった。また、トリプシンにはカルシウム結合部位がありトリプシンの構造を安定してしまうため、必ずしも活性を阻害する場合だけではない。塩化カルシウムの実験では 10mM、25mM の濃度では阻害効果を確認することができた。

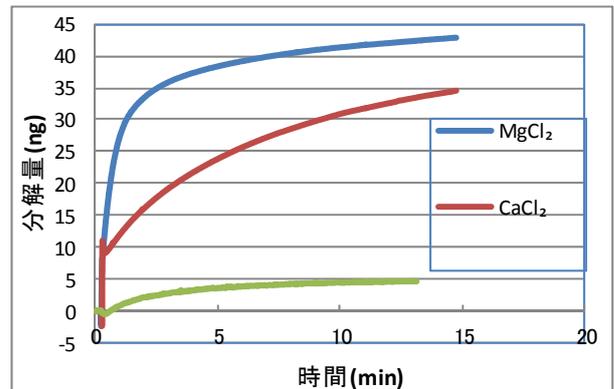


図-10 カゼイン分解量の 2 価金属イオンの効果

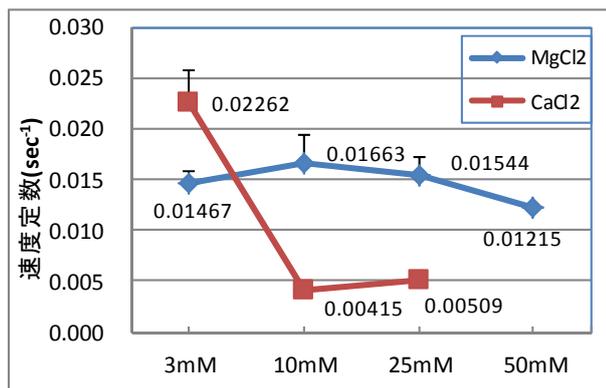


図-11 速度定数の2価金属イオン濃度依存

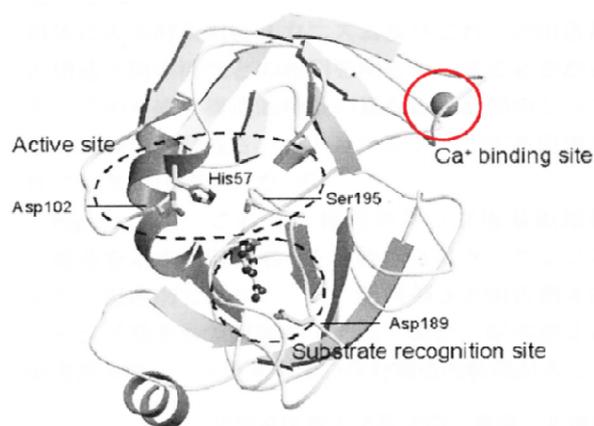


図-12 トリプシンのカルシウム結合部位

#### 4. 結論

##### 1) トリプシンによるカゼイン分解の pH 依存性

トリス緩衝溶液の pH を 8 段階に分けて実験を行った結果、速度定数は pH8 に向かって増えていき pH8 を超えると減少することから、最も活性が盛んなのは pH8 だとわかった。また pH5、10 の時は分解反応が行われなかったことより、トリプシンの分解機能が働くのは pH6~9 の間ということがわかった。

##### 2) 2 価金属イオンを用いた酵素活性評価

2 価金属イオンは阻害剤とされているが、濃度によって反応は抑制されない場合もあり、トリプシンのみで測定を行う時と比べ反応の活性は上がった。トリプシンには Ca<sup>2+</sup> 結合部位があり、Ca<sup>2+</sup> イオンを結合することでトリプシンの構造が安定化され、活性が増す結果となったと考えられる<sup>3)</sup>。

#### 5. 参考文献

- (a) Okahata, Y.; Matsunobu, Y.; Ijiro, K.; Mukai, M.; Murakami, A.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4, 8299-8300. (b) Okahata, Y.; Kawase, M.; Niikura, K.; Ohtake, F.; Furusawa, H.; Ebara, Y. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1288-1296.
- 岡畑恵雄, 三原久和: 酵素・タンパク質をはかる・とらえる・利用する, p. 1~18, 工学図書株式会社, 東京都, 2009.
- DOI:10.22210/pdb2ptc/pdb

(受理 平成 24 年 3 月 19 日)