デフォスフォピリデン・ヌクレオチドを助酵素とする脱水素酵素の基質および助酵素との複合体形成について

山口県立医科大学医化学教室 指導中村正二郎教授

辻 岡 嗣 郎

Proof of the formation of enzyme-substrate complex between DPN-specific dehydrogenases and coenzymes as well as their substrates.

S. Tuzioka

Institute for Medical Chemistry, Yamaguchi Medical School, Ube.

Proof the formation of enzyme-substrate complex between DPN-specific dehydrogenases and coenzymes as well as their substrates were carried out by the method of "crossing paper electrophoresis".

The enzymes used were lactic dehydrogenase (LDH), malic dehydrogenase (MDH), alcohol dehydrogenase (ADH), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GDH). On a filter paper, an enzyme solution was applied on a line drawn in parallel to the direction of the electrical field and a solution of substrate or coenzyme was applied on a line perpendicular to the former. After the electrophoresis the line of the substrate or coenzyme became hollow at the point of crossing with the line of enzyme. Thus the direct interaction and therefore the formation of complex between the enzyme and substrate as well as coenzymes were demonstrated with all the enzymes tested.

In regard to the substrates, lactic and pyruvic acids were applied to LDH, and malic acid to MDH, but to ADH and GDH no substrate was applied. On the other hand the preparation used of MDH was not pure, so that the proof in this case can not be regarded as complete.

酵素の作用機構については Michaelis-Menten¹⁾ の酵素基質複合体生成の仮説がひろく認められている。これは酵素反応の速度が Michaelis-Menten の速度式によつて極めてよく説明されるからであり、従つてこの理論の基礎とされた酵素基質複合体の生成がこれによつて間接的に証明されたものと考えられるからである。しかし酵素反応の速度は他の理論によつても同様に説明される可能性がある。Michaelis の反応速度式が実験によく一致することは、必ずしもその根拠となつた複合体形成が事実であることを保証しない。むしろ Michaelis の理論の完成されるために複合体の直接証明が求められて来たといふことができる。

酵素基質複合体の直接証明は現在までのところ、ただ一二の酵素について例外的に試みられているにすぎない。すなわちカタラーゼ²⁾、過酸化酵素³⁾ 等について複合体形成に伴う光吸収の変化にもとづき光学的に行われ

たに止る。しかもこの方法はこれらの例外的な一二の酵素に適用されうるにすぎず、他の酵素に応用することはほとんど不可能というほかはなかつた。この意味で酵素基質複合体の証明は根本的な困難に直面したものといえるが、中村ら⁵⁾ はついに交叉濾紙泳動法を応用することによつて一般的に複合体を証明することに成功した。これによつて酵素基質複合体の証明は方法論的には完了したといふことができる。ただ中村らの使用した酵素は加水分解酵素に限られていたが、交叉濾紙泳動法による証明は脱水素酵素の場合にもまったく同様に行れうはずである。ここには乳酸脱水素酵素 (LDH)、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)、アルコール脱水素酵素 (ADH)、グリセリンアルデヒド 燐酸脱水素酵素 (GDH) について行つた Apoenzyme と基質との複合体、および Apoenzyme と Coenzyme の複合体形成の証明についてのべる。(以下、単に脱水素酵素と記したのは助酵素をふ

くまぬ Apoenzyme である。)

実験条件

試薬: LDH, MDH, ADH, GDH は Sigma chemical Co. のものである。MDH 以外はいずれも結晶品である。製品番号は LDH, 118-62; MDH, 108-631, 1 mg 当り 10 万単位; ADH, 108-672; GDH, G 19-064. いずれも水にとかして, LDH は 0.25%, その他は 2% 溶液とした。

Diphosphopyridine nucleotide (DPN) およびその還元型(DPNH)はいずれも Sigma Chemical Co. 製。水にとかして 1% 溶液とした。

發酵乳酸リチウム塩, 焦性ブドー酸, およびリンゴ酸は 0.2M の水溶液。

実験方法: 交叉濾紙泳動法についてはすでに中村⁵⁾, 上田⁷⁾によつてのべられている。泳動法そのものは通常の方法とまったく同一である。ただ物質を泳動によつて分離させるのではなく, 反応させる点がことなるにすぎない。すなわち反応させようとする二物質を単に点状にぬるのでなく一定の角を見込む二直線の上にぬる。泳動によつて二直線は平行移動するから二物質の泳動速動がことなれば交叉して反応することになる。

緩衝液: 磷酸緩衝液, pH 7.0 および pH 7.5, イオン強度 0.05。

泳動条件: 定電圧, 200V 前後, 電流 5~10 mA 前後, 泳動時間, 5~10時間。

装置: 水平型。一次元の場合にも中村等による二次元用の装置を利用した。

濾紙: Whatman No. 1. 他の濾紙では DPNH の変化する場合があつた。

発色法: DPN, DPNH は竹尾⁹⁾の重クローム酸銀染色法によつて検出した。すなわち泳動後濾紙を 110°C でかわかした後, 2%の硝酸銀溶液にひたし, ついでこれを 0.5%の重クローム酸カリ溶液にひたす。DPN および DPNH は暗赤褐色の下地に対しやや黄色をおびた灰白色に現われる。

乳酸, 焦性ブドー酸およびリンゴ酸は濾紙を乾燥後 chlorphenol red (CPR) を 0.04% の割合にエタノールに溶かして pH 7.0 に調整したものをふきつけて検出した⁹⁾。これらの酸は紫色の下地に対し黄白色に現われる。

実験結果および考察

まずここにあげた実験条件の下ではどの脱水素酵素も極めてわずかに陽極に向つて泳動するだけで DPN ないし基質の泳動に対し無視しうる程度であることを確かめた。

1. 乳酸脱水素酵素 (LDH)

a) 乳酸脱水素酵素と基質との複合体形成

第 1 図 乳酸脱水素酵素と乳酸との泳動による交叉

0.25% の LDH を XY 線上に 0.02 ml/10 cm にぬり, 直ちに 200V で 1.5 時間泳動。ついで AB 線上に 0.2mol の乳酸を 0.04 ml/4 cm にぬり 200V で 1 時間泳動。磷酸緩衝液, pH=7.5 イオン強度 = 0.05。室温。

使用濾紙, ワットマン No. 1

染色法: クロール・フェノール・レッドによつて酸のみを染色。

図 1 に示したように, まず XY 線上に LDH をぬり, 酵素溶液に含まれている硫安をのぞくために, 基質をぬる前に 1.5 時間電流を通ずる。この間の LDH の泳動は無視しうる程度である。ついで AB 線上に基質, 乳酸をぬつて泳動させる。乳酸は (+) 極に向つて泳動するが LDH はほとんど動かない。したがつて泳動の経過とともに乳酸は LDH の線と交叉しこの上を動く。図に見るように, 乳酸の線は LDH との交点でくぼみを作つている。このくぼみはこの部分に存在する乳酸が LDH の線の上を泳動し, その間に LDH と直接反応したために他の部分の乳酸よりおくれたものとするほかはない。したがつて LDH が基質の乳酸と直接反応すること, すな

わち複合体を作ることはいくによつて証明されたものといえる。

LDH は DPN の存在で乳酸を脱水素して焦性ブドー酸とする。また DPNH の存在下では焦性ブドー酸を還元して乳酸とする。

LDH+乳酸+DPN=LDH+焦性ブドー酸+DPNH

すなわち、焦性ブドー酸も乳酸と同様に LDH の基質であり、乳酸と同様に LDH と複合体を作ることが予想される。第2図には乳酸の場合とまったく同じように、

第2図 乳酸脱水素酵素と焦性ブドー酸との泳動による交叉。

0.25%のLDHをXY線上に0.04 ml/10 cm にぬり、200Vで1.5時間泳動。ついでAB線上に0.2molの焦性ブドー酸を0.6 ml/8 cm にぬり、1.5時間200Vで泳動。

その他の条件は第1図の場合と同じ。

焦性ブドー酸を電場に垂直な線に、LDHを電場に平行な線にぬつて交叉させたものである。この場合にも焦性ブドー酸の線はLDHの線との交点でくぼみを作っている。したがつて焦性ブドー酸もLDHと直接反応すること、すなわち複合体を作ることが証明できたものといえる。

b) 乳酸脱水素酵素と助酵素(DPN)との複合体形成

アポ酵素は助酵素と結合してホロ酵素となるとされる。したがつて両者の結合は当然であるかのように考えられるが、すでにのべたように直接証明は一二の例外的な場合に行われているにすぎない。ここでは交叉濾紙泳動法を利用して始めにあげたLDH, MDH, ADH, GDHとDPNとの複合体形成を証明した。

第3図 乳酸脱水素酵素と助酵素 DPN および DPNH との泳動による交叉。

0.25%のLDH 0.03 ml/10 cm をXY線上にぬり、200Vで1時間泳動した後、1%のDPNとDPNH 0.01 ml/8 cm をそれぞれAB線およびBC線の上にぬつて200Vで3時間泳動。重クロム酸銀法により助酵素のみを染色。

磷酸緩衝液 pH=7.0

その他の条件は第1, 2図に同じ。

第3図に示したのはLDHとDPNおよびDPNHの反応である。第1, 2図の場合と同様、電場に平行な直線XY上にLDHをぬり、硫酸を予備泳動によつてのぞいた後、AB線上にDPN、BC線上にDPNHをぬつて泳動させたものである。図に見るように、DPNの線もDPNHの線もLDHと交叉した点でくぼみを作っている。これはDPN, DPNHがLDHと直接反応したことを示している。またDPNHがDPNに比して泳動速度が大きいことが明であるが、LDHとの交点のくぼみはDPNHの方がDPNよりはるかに深い。LDHに対しDPNHの方が強く結合することを示すものといえる。

c) 助酵素(DPN, DPNH)と焦性ブドー酸および乳酸との反応

DPNを助酵素とする脱水素酵素では助酵素は等しくアポ酵素すなわち酵素蛋白だけがことなるのはもちろん

(14) 生物物理化学

である。したがって基質特異性を示すのは酵素の蛋白部分であると考えられる。このことからみて基質は酵素蛋白に結合して複合体を作ると考えられたが助酵素は必ずしも直接酵素蛋白に結合すると考える必要はなかつた。すなわち助酵素は基質を介して酵素蛋白に結合しているとも考えることも不可能ではない。実際このようなモデルにもとづいて作用機構を考えた人もある¹⁰⁾。しかし現在では脱水素酵素が助酵素に対し立体特異性を示すこと¹¹⁾から、助酵素も酵素蛋白に結合するものと考えられている。しかしこれは特異性から行つた推論であつて直接証明ではない。助酵素が基質を介して酵素蛋白に結合するのでないことは、DPN と基質とが直接結合を行わないことを示すことによつて証明できる。

第4図 DPN と焦性ブドー酸との泳動による交叉

XY 線上に 1% DPN を 0.04 ml/10 cm にぬり、AB 線上に 0.2 mol 焦性ブドー酸 0.02 ml/8 cm をぬつて、2 時間泳動。

その他の条件は第 1 図に同じ。

第 4 図に示したのは DPN と焦性ブドー酸の泳動交叉である。図では XY 線上に DPN をぬり、AB 線上に焦性ブドー酸をぬつて交叉させてあるが、焦性ブドー酸の線は DPN と交叉してもくぼみを作らない。すなわち

DPN と焦性ブドー酸とはこの方法で検出される程度の反応は行はないといえる。これと同じことは DPN と乳酸についても証明できた。このことからみて、LDH の場合 DPN が酵素蛋白に結合するのは基質を介してではないといえる。

2. リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)

a) リンゴ酸脱水素酵素と基質との複合体形成

乳酸脱水素酵素の場合とまったく同様にしてリンゴ酸脱水素酵素の場合にも基質および助酵素との複合体形成を証明することができる。第 5 図は MDH とリンゴ酸と

第 5 図 リンゴ酸脱水素酵素とリンゴ酸の泳動による交叉。

2% の MDH 0.02 ml/10 cm を XY 線上にぬり 200V で 1.5 時間泳動、ついで AB 線上に 0.2 mol のリンゴ酸 0.02 ml/8 cm をぬつて 1.5 時間 200V で泳動。

その他の条件は第 1 図に同じ。

の複合体形成を示す。電場に垂直にぬつたリンゴ酸の線は、MDH の線の上を泳動し交点に当る部分でくぼみを作っている。MDH とリンゴ酸が直接反応して複合体を作り、このためにリンゴ酸の線はこの部分でおくれたものといえる。

第8図 グリセリンアルデヒド3リン酸脱水素酵素と
DPN および DPNH との泳動による交叉。

2% GDH 0.02 ml/13 cm をXY線上にぬり、200Vで2時間、予備泳動。ついで1% DPN および DPNH 0.01 ml/8 cm を、それぞれ AB 線および BC 線上にぬって 200V で4時間泳動。

その他の条件は第3図に同じ。

考える。しかし生じた複合体の泳動速度は一般に不明であるから簡単な比例関係が成立するとみるのは早計であろうが、他の条件が等しければある程度比例するとみてよいであろう。したがって DPN および DPNH と脱水素酵素との結合に関しては LDH, MDH, ADH, GDH のいずれの場合にも DPNH との結合がつよいと判定してよい。

現在までに測定されている脱水素酵素と助酵素とのお互の解離恒数は、反応速度の測定によつて求めた Michaelis-constant, K_m , であつて厳密には解離恒数と異なる。ただ ADH については Theorell, Bonnicksen¹²⁾ Chance¹³⁾ が肝の ADH を用い DPN, DPNH との解離恒数を別々に測定することに成功している。すなわち肝 ADH では DPNH を加えると DPNH の 340 mμ の吸収が 325 mμ へずれる。したがつてこれから ADH と DPNH との結合したこと、およびその結合速度から解離恒数を測定することができる。

また Velick¹⁴⁾ は超遠心機を用い DPN および DPNH を含む酵母菌の ADH を遠沈して、上澄と沈澱との間の助酵素の分布から、ADH-DPN 複合体および ADH-DPNH 複合体の解離恒数 K_s を算出している。

すなわち

$$K_s(\text{DPN}) = 2.6 \times 10^{-4} \text{M}$$

$$K_s(\text{DPNH}) = 1.3 \times 10^{-5} \text{M}$$

その他 Velick らは GDH についても同様の研究を試みたが、この場合には DPNH が変化するために十分な結果はえられていない。筋からえられた GDH は3分子の DPN を強く結合していて解離恒数は $2 \times 10^{-7} \text{M}$ 程度であつた。酵母の GDH では DPN との結合はそれほどよくなく、解離恒数はその5~10倍であるという。

交叉濾紙泳動法による結果は ADH, GDH, LDH, MDH いずれの場合にも、交叉によつてできるくぼみは DPNH の方が DPN より深く、したがつて DPNH が DPN より強く反応することを示している。これは上にのべたように Theorell, Velick らの ADH について得た結果と一致する。しかし Velick が GDH について、不確

第9図A 脱水素酵素 LDH, MDH, ADH, GDH
と DPN との泳動による。

LDH は 0.25%, その他の酵素はいずれも 2%. X_1Y_1 線上に LDH, X_2Y_2 線上に MDH, X_3Y_3 線上に ADH, X_4Y_4 線上に GDH をいずれも 0.02 ml/14cm にぬる。200V で 1.5 時間、予備泳動。ついで第9図Aでは AB 線上に 1% DPN 0.02 ml/16 cm をぬって 2 時間泳動。第9図Bでは AB 線上に 1% DPNH 0.02 ml/16 cm をぬって 6 時間泳動。

その他の条件は第3図に同じ。

第9図B 脱水素酵素, LDH, MDH, ADH, GDH
と DPNH との泳動による交差。

実験条件：第9図Aに同じ。

実ながら DPNH の結合が強いらしいと推定していることと一致しない。ただ交差泳動法の場合には DPNH の方が DPN よりはるかに泳動速度が大きく、したがって交点のくぼみの差がどの程度解離恒数と比例するかはもちろん今後の研究にまっほかはない。

第9図AおよびBにはそれぞれ DPN および DPNH と LDH, MDH, ADH, GDH の交差泳動図を示した。交点のくぼみの深さからみればあたかも MDH が最も強く反応しているようにみえる。しかし MDH は充分に純粋でなく酵素以外の蛋白質と助酵素との反応によつて交点が強く変形しているのかもわからない。

Chance ら¹⁵⁾によれば LDH-DPNH 複合体の解離恒数は 7×10^{-6} 程度。また分子量は約 135,000。1 分子に対し 1 個の DPN を結合する。ADH ではすでにのべたように $K_s = 1.3 \times 10^{-5} M$, 分子量 150,000 で 2 個の DPNH を結合する。したがってこれらの数値をそのまま適用すれば両者の場合 DPNH に対する結合力はほぼ等しくなるであろう。

$$LDH: ADH = \frac{2 \times 7 \times 10^{-6}}{135} : \frac{1.3 \times 10^{-5}}{150} = 1 : 0.9$$

第9図Bに示した結果では DPNH の線は ADH および LDH と交差してほぼ同様のくぼみを作っているが、これはこれらの結果と一致するものといえよう。た

だくりかえしてのべたように交差法による結果を定量的に説明するにはなお充分の根拠付けが必要であり、見かけ上の一致から定量的一致を推定することは必ずしも妥当でない場合もあることを注意せねばならない。

要 約

交差濾紙泳動法によつて脱水素酵素と基質および助酵素の複合体形成を証明した。

乳酸および焦性ブドウ酸を電場に垂直にぬり、電場に平行にぬつた乳酸脱水素酵素と泳動によつて交差せしめると、酸の線は交点でくぼみを作る。すなわち両者は直接反応する。まったく同様にしてリンゴ酸とリンゴ酸脱水素酵素の複合体形成をも証明した。

助酵素と脱水素酵素との複合体形成については Di-phosphopyridine nucleotide (DPN) および DPNH を電場に垂直にぬり、脱水素酵素を平行にぬつて泳動交差せしめ、両者の直接反応することを証明した。

用いた酵素は乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グリセリンアルデヒド 3 磷酸脱水素酵素である。いずれの場合にも DPNH の方が強く反応した。このことはアルコール脱水素酵素の場合にすでに明にせられている事実と一致する。

DPN, DPNH は乳酸および焦性ブドウ酸とは反応しなかった。

文 献

- 1) L. Michaelis and M. L. Menten: *Biochem. Z.*, **49** 333 (1913)
- 2) K. G. Stern: *J. Biol. Chem.*, **114** 473 (1936)
B. Chance: *ibid.*, **151** 553 (1943)
- 3) D. Keilin and T. Mann: *Proc. Roy. Soc. B*, **122** 119 (1937)
H. Theorell: *Enzymologia* **10** 250 (1941)
- 4) M. Dixon and E. C. Webb: "Enzymes" P. 118, Longmans, Green and CO., London (1958)
- 5) 中村正二郎, 細田勉, 上田務: *Proceeding of Japan Academy* **34** 742 (1958)
中村正二郎, 竹尾和典, 村田正人, 佐々木石根: *Nature*, **184** 638 (1959)
中村正二郎, 竹尾和典, 田中一成, 上田務: *Z. Physiol. Chem.*, 印刷中
- 6) 中村正二郎: *日本臨床* **17** 588 (1959)
- 7) 上田務: *山口医学* **7** 737 (1958)
- 8) 竹尾和典: 未公表
- 9) R. J. Block, E. L. Durrum and G. Zweig: "A

- Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis" P.169, Academic Press, New York (1955)
- 10) N. O. Kaplan: "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action", Ed. W. D. McElroy and B. Glass: P.386, Johns Hopkins Press, Baltimore, (1954)
- 11) B. Vennesland: Discussion Faraday Soc., 20 240 (1955)
- 12) H. Theorell and R. Bonnichsen: Acta Chem. Scand., **5** 1105 (1951)
- 13) H. Theorell and B. Chance: ibid, 1127(1951)
- 14) J. E. Hayes, Jr. and S. F. Velick: J. Biol. Chem., **207** 225 (1954)
- 15) B. Chance and J. B. Neiland: J. Biol. Chem., **199** 383 (1952)

AUTOMATIC SCANNER

濾紙電気泳動用

濃度曲線自動記録器

●試料濾紙の大きさ; 5cm×17cm

●記 録 時 間; 3分以内

(呈カタログ)

英国エバンス社日本総代理店

朝日通商株式会社 営業第2部
機 械 課

東京都千代田区平河町2-2 電話(301)4321番(代表)

旧住所 東京都中央区宝町3-1