

## F I A を利用したロダネーゼのミカエリス定数の測定

出口俊雄, 深浦康一, 田中明, 實政勲  
熊本大学理学部 〒860 熊本市黒髪2-39-1

---

### Application of Flow-Injection Analysis to Measurement of Michaelis Constant of Rhodanese

Toshio DEGUCHI, Kouichi FUKAURA, Akira TANAKA and Isao SANEMASA  
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University,  
2-39-1 Kurokami, Kumamoto 860, Japan

An approach for measurement of the Michaelis constant ( $K_m$ ) is proposed. A simple and convenient curve fitting method is proposed for a flow injection system. The  $K_m$  value, obtained by the present method, of rhodanese (thiosulfate : cyanide sulfurtransferase, EC 2.8.1.1) for cyanide is 2.1 mM, whereas the value by a Lineweaver-Burk method is 0.59 mM. Simultaneous variations of cyanide and thiocyanate concentrations as a function of incubation time have been able to be observed by flow-injection analysis based on a modified König reaction and spectrofluorimetric detection; the conversion of cyanide into thiocyanate has been shown explicitly.

---

#### 1. 緒言

ミカエリス定数 ( $K_m$ ) は酵素と基質の親和力を反映する速度論上重要なパラメーターであり, この値が小さいほど酵素と基質の親和力は大きい. 通常, 酵素のミカエリス定数を求めるには, 基質濃度  $[S]$  の異なるサンプルを幾つか準備し, それぞれのサンプルについて反応速度  $v$  を測定し, Lineweaver-Burk プロット ( $1/v$  に対する  $1/[S]$  に対するプロット) を適用して  $K_m$  を求める. しかし, この方法は各種濃度の基質サンプルを調製してその各々について反応速度を測定しなければならず, 時間と手間がかかる点が問題となる. 本研究では, フローインジェクション分析法 (F I A) を用いた新しいミカエリス定数の測定法を提案する.

酵素反応の速度を表すミカエリス-メンテンの式は,

$$v = -\frac{dC}{dt} = \frac{V \cdot C}{K_m + C} \quad (1)$$

であり、ここでCは基質濃度、tは反応時間、Vは反応の最大速度である。この微分方程式の解は、

$$t = -\frac{1}{V}C - \frac{2.3}{V} \frac{K_m}{V} \log C + A \quad (A: \text{積分定数}) \quad (2)$$

となる。F I Aを適用すると、容易に反応過程をモニターできる。そこで、反応時間tを基質濃度Cに対してプロットすると、(2)式は、任意関数

$$y = a x + b \cdot \log x + c \quad (a, b, c: \text{任意パラメーター}) \quad (3)$$

に対応する曲線となる。従って、実験により得られたプロットに(3)式をフィットさせるのに必要なパラメーター a及びbの値より、次のパラメーターが求められる。

$$V = -\frac{1}{a}, \quad K_m = \frac{b}{2.3 a} \quad (4, 5)$$

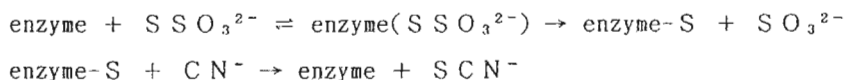
この方法を用いることで、簡便にミカエリス定数の測定ができる。

本研究では、このカーブフィッティング法を用いてロダネーゼ (thiosulfate : cyanide sulfurtransferase, E C 2.8.1.1) のミカエリス定数を測定した。ロダネーゼは各種動物の肝臓や腎臓などに広く分布しており<sup>1)</sup>、下記の反応に触媒として作用する酵素である。



この生体内での働きは、主にシアン化物の解毒化の触媒であると考えられている<sup>2)</sup>。

ロダネーゼがシアン化物とチオ硫酸塩の反応に触媒として作用するときの反応機構は次のように考えられている<sup>3)</sup>。



このように、2基質反応において酵素-基質三者複合体が形成されず、酵素が転移担体として作用するピンポン機構ならば、ミカエリス-メンテンの式は次のようになる<sup>4)</sup>。

$$v = \frac{V}{1 + (K_m)_{s_1}/[S_1] + (K_m)_{s_2}/[S_2]} \quad (6)$$

ここで、 $(K_m)_{s_1}$ 、 $(K_m)_{s_2}$  はそれぞれ基質 $S_1$ 及び $S_2$ に対するミカエリス定数である。もし基質 $S_2$ の濃度が $(K_m)_{s_2}$  よりもはるかに高ければ、(6)式は次のように簡略化できる。

$$v = \frac{V}{1 + (K_m)_{s_1}/[S_1]} \quad (7)$$

このように、2基質反応でも一方の基質濃度を高くすれば形式上1基質反応のような取り

扱いをすることが可能となり、前述のカーブフィッティング法を適用してミカエリス定数を求めることができる。

また、シアン化物イオンからチオシアン酸イオンへの変換の様子を観察するために、König反応に基づく蛍光定量法を利用して、基質のシアン化物イオンと生成したチオシアン酸イオンの濃度の時間変化を同時にモニターした<sup>5)</sup>。

## 2. 実験

### 2.1. 装置

#### 2.1.1. ミカエリス定数の測定

測定に使用したフローインジェクション系の概略図をFig. 1に示す。ポンプは島津高速液体クロマトグラフ用送液ユニット LC-6A (島津製作所)、サンプル注入にはオートサンプラー KMT-60A-II (協和精密、注入量 100  $\mu$ l) を使用した。吸光度の測定には紫外-可視分光光度検出器 SPD-6AV (島津製作所) を使用し、波長 460 nm で測定した。

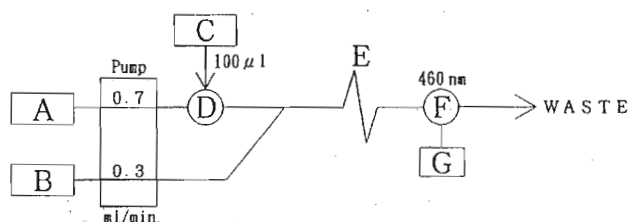


Fig. 1. Flow diagram for measurement of Michaelis constant of rhodanese : A, water ; B, 10 mM iron(II) nitrate solution (2 M HNO<sub>3</sub>) ; C, enzyme reaction solution ; D, auto-injector ; E, reaction coil (0.5 mm i.d., 2 m length) ; F, spectrophotometer ; G, recorder.

#### 2.1.2. シアン化物とチオシアン酸塩の濃度変化の同時測定

測定に使用したフローインジェクション系の概略図をFig. 2に示す。ポンプは島津高速液体クロマトグラフ用送液ユニット LC-6A (島津製作所) とプランジャー型4連送液ポンプ 4P2M-4016 (サヌキ工業)、サンプル注入にはオートサンプラー KMT-60A-II (協和精密、注入量 100  $\mu$ l)、イオンクロマトグラフィーカラムはTSK gel IC-Anion-SW (東ソー) を使用した。蛍光強度の測定にはFP-770型 分光蛍光光度計 (日本分光) を使用し、励起波長 607.6 nm、発光波長 622.0 nm で測定した。

### 2.2. 試薬

ロダネーゼ (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase, EC 2.8.1.1, Type I: From Bovine Liver, 11-13 units/mg solid) はSIGMA社より購入した。その他の試薬は全

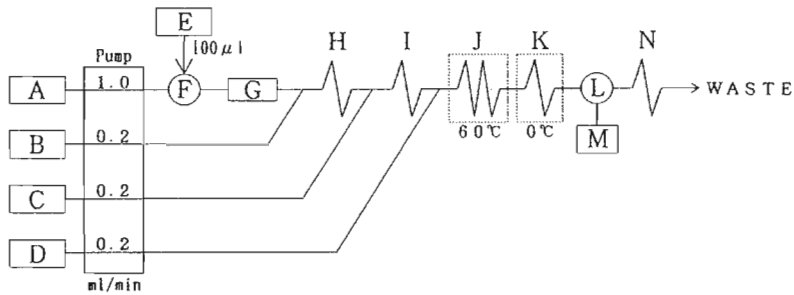


Fig. 2. Flow diagram: A, 5 mM potassium hydrogen phthalate solution (pH 5.5); B, 0.5 M phosphate buffer solution (pH 3.0); C, 0.2 % chloramine-T solution; D, isonicotinic acid-barbituric acid solution; E, enzyme reaction solution (pH 8.6); F, injector; G, ion chromatograph column; H, mixing coil (0.5 mm i.d., 30 cm length); I, reaction coil (0.5 mm i.d., 1 m length); J, reaction coil (0.5 mm i.d., 30 m length); K, cooling coil (0.5 mm i.d., 2 m length); L, spectrofluorometer; M, recorder; N, back-pressure coil (0.3 mm i.d., 2 m length).

て試薬特級品を使用した。水はMilli-Q超純水製造装置（日本ミリポア）で製造したものをを使用した。

## 2.3. 操作

### 2.3.1. カーブフィッティング法によるミカエリス定数の測定

Fig. 1で示したフロー系で、シアン化物イオンが酵素触媒下で転換されて生成するチオシアン酸イオンの濃度の時間変化をモニターした。この時注入する溶液は以下のようにして調製した。0.5 M トリス緩衝溶液(pH 8.6)(7 ml), 40 mM シアン化カリウム(0.1 M NaOH) 溶液(1 ml) 及び 0.8 M チオ硫酸ナトリウム溶液(1 ml) の混合溶液に 0.5 mg/ml ロダネーゼ・0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 6.0)(1 ml) を順次加えた。混合溶液のpH値は、ロダネーゼの最適pH 8.6である。この混合溶液を約2.7分おきにオートインジェクターでフロー系に注入した。反応時間は、注入する反応溶液を調製した時点から、この溶液の注入ゾーンがフロー系内で鉄(III)溶液と合流するまでの時間とした。測定温度は 25 °Cに設定した。

一方、各種濃度のチオシアン酸イオンを含む混合溶液（ロダネーゼは含まない）を同一条件で注入して検量線を作成し、これを用いて各反応時間で生成したチオシアン酸イオンの濃度を求めた。各反応時間における基質濃度は、生成したチオシアン酸イオンの濃度を基質の初濃度から差し引いた値とし、基質濃度に対する反応時間をプロットした。それに基づいて、カーブフィッティング法によりミカエリス定数を求めた。コンピューターによるカーブフィッティングには、Origin™ (Microcal Software, Inc.) を使用した。

### 2.3.2. Lineweaver-Burk の方法によるミカエリス定数の測定

各種濃度の基質サンプルにおける反応速度は、一定の反応時間におけるチオシアン酸イオンの生成量を求めることにより測定した<sup>9)</sup>。0.5 M トリス緩衝溶液(pH 8.6)(7 ml),

各種濃度 シアン化カリウム (0.1 M NaOH) 溶液 (1 ml) 及び 0.8 M チオ硫酸ナトリウム溶液 (1 ml) の混合溶液に 0.3 mg/ml ロダネーゼ・0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 6.0) (1 ml) を加え、反応を開始させた。1分後、15%ホルムアルデヒド(5 ml)を加えて反応を停止させ、この溶液をFig. 1 (但し、フロー系には 30 mM硝酸鉄(III) (1 M HNO<sub>3</sub>)溶液を使用した)のフロー系に注入してチオシアン酸塩の生成量を求めた。測定温度は 25 °Cに設定した。こうして求められたデータについて、 $1/[S]$  に対する  $1/v$  をプロットし、シアン化物イオンに対するミカエリス定数を求めた。ここで得られる直線の横軸との切片は、 $1/[S] = -1/K_m$  である<sup>7)</sup>。

### 2.3.3. シアン化物とチオシアン酸塩の濃度変化の同時測定

König 反応に基づく蛍光定量法により、Fig. 2に示すフロー系を使用して、基質であるシアン化物イオンと生成したチオシアン酸イオンの濃度の時間変化を同時にモニターした<sup>5)</sup>。注入する溶液は以下のようにして調製した。0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 8.6)、シアン化カリウム (0.1 M NaOH) 溶液及びチオ硫酸ナトリウム溶液の混合溶液にロダネーゼ・0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 6.0)を加えた。混合溶液のpH値は、ロダネーゼの最適pH 8.6である。この混合溶液を一定の時間間隔で、オートインジェクターでフロー系に注入した。反応時間は、注入する反応溶液を調製した時点から、これがフロー系内でイオンクロマトグラフィーカラムに到着するまでの時間とした。測定温度は 25 °Cに設定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. ミカエリス定数の測定

シアン化物イオンに対するロダネーゼのミカエリス定数 ( $K_m$ )<sub>CN-</sub>を測定するため、0.05 mg/ml ロダネーゼ溶液、4 mM シアン化物 及び 80 mM チオ硫酸塩の反応溶液を約2.7分おきにFig. 1のフロー系に注入した。生成するチオシアン酸塩濃度の時間変化はFig. 3に示すように明瞭に観察できた。Fig. 4に、シアン化物濃度に対する反応時間のプロットを示す。カーブフィットの結果、

$$y = -2.55x - 12.50 \cdot \log x + 18.66$$

の曲線によくフィットした。得られた3つのパラメーターの標準偏差は、それぞれ 0.23、0.88 及び 0.33 であった。解析の結果、( $K_m$ )<sub>CN-}=2.1 mM、 $V=0.39$  mM/minと算出された。</sub>

一方、Lineweaver-Burkの方法を用いて( $K_m$ )<sub>CN-</sub>の値を測定した。0.03 mg/ml ロダネーゼ溶液、3.2-0.69 mM シアン化物 及び 80 mM チオ硫酸塩の反応溶液において( $K_m$ )<sub>CN-}=0.59 mMと算出された。Lineweaver-BurkプロットをFig. 5に示す。こ</sub>

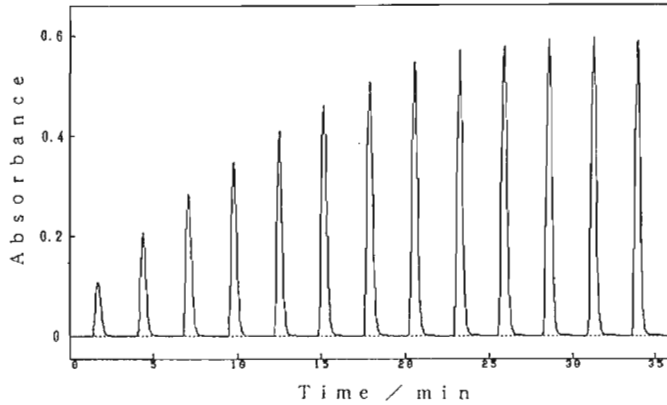


Fig. 3. FIA absorbance-time profile for the rhodanese-catalyzed reaction. Initial concentrations were 4 mM  $\text{CN}^-$  and 80 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

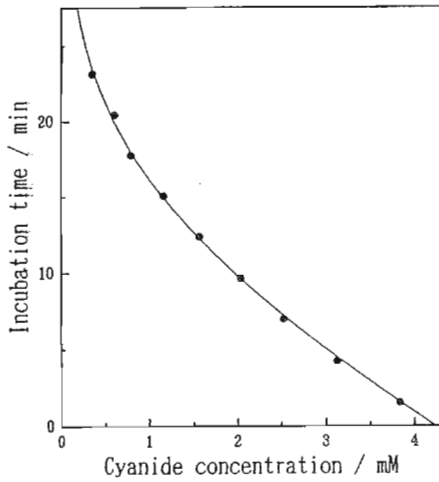


Fig. 4. Incubation time vs.  $[\text{CN}^-]$  plot for the rhodanese-catalyzed reaction. Initial concentrations were 4 mM  $\text{CN}^-$  and 80 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

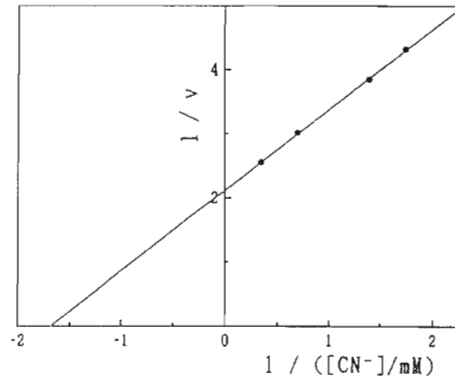


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the rhodanese-catalyzed reaction to determine the  $K_m$  value for  $\text{CN}^-$ . The concentration of  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  was 80 mM.

ここで得られた  $(K_m)_{\text{CN}^-}$  の値はカーブフィッティング法により得られた値より小さくなった。この理由として以下のことが考えられる。ミカエリス定数は、(1)式から分かるように、最大反応速度の  $1/2$  の反応速度  $V/2$  を与える基質濃度を表す。ログネーゼは  $25^\circ\text{C}$  の条件においても比較的失活しやすく、もし時間と共に失活したとすると、反応時間が短いうちに  $V/2$  を与える。すなわち反応溶液の基質濃度が高いうちに  $V/2$  を与えることになり、 $V/2$  を与える基質濃度を  $K_m$  とするカーブフィッティング法では、見かけのミカエリス定数は高い値となる。

また、Lineweaver-Burk の方法により、本実験と同様に牛の肝臓から精製したロダネーゼを用いてミカエリス定数が測定されており、 $(K_m)_{CN^-} = 1.2 \text{ mM}$ と報告されている<sup>9)</sup>。但し実験条件は異なり、1.4 M グリシンを含むトリス-酢酸緩衝溶液(pH 8.5)、イオン強度 0.5 の溶液中、0 °Cで行われている。この報告された値は、実験条件は異なるが、本研究で求められた値と近いものである。一方、抽出源の異なるロダネーゼに関する $(K_m)_{CN^-}$ の値も既に報告されており、以下のとおりである；Rp. palustris(バクテリア)：3.7 mM<sup>9)</sup>，rat liver：0.65 mM<sup>10)</sup>，guinea pig：0.22 mM<sup>11)</sup>。

チオ硫酸イオンに対するロダネーゼのミカエリス定数 $(K_m)_{S_2O_3^{2-}}$ を測定するため、チオ硫酸塩に対して高濃度のシアン化物溶液を用いて実験を行った。4 mM チオ硫酸塩、80 mM シアン化物の反応溶液をFig. 1のフロー系に注入したが、ロダネーゼが短時間で失活し、約5分後には生成物であるチオシアン酸塩の濃度変化が見られなくなった。これは、シアン化物イオンが過剰量存在するため、ロダネーゼがチオ硫酸イオンと反応する前にシアン化物イオンと結合して不活性となったためと考えられる。ロダネーゼが反応に触媒として作用するには、まずチオ硫酸イオンと結合することが不可欠である<sup>9)</sup>。またシアン化物イオンは、ロダネーゼを阻害することが知られている<sup>12)</sup>。従って、シアン化物イオンをチオ硫酸イオンより過剰量存在させて $(K_m)_{S_2O_3^{2-}}$ を測定することは不可能であった。

### 3. 2. シアン化物とチオシアン酸塩の濃度変化の同時測定

Fig. 2のようなフロー系で、シアン化物イオンと生成したチオシアン酸イオンの濃度の時間変化を同時に観察した。0.2 mg/ml ロダネーゼ溶液、0.38 mM シアン化物及び 29 mM チオ硫酸塩の混合溶液を12分おきに注入した結果、Fig. 6に示すように、シアン化物イオンがチオシアン酸イオンへと変換している様子が明瞭に観察された。この方法は適応濃度範囲が狭いため、ミカエリス定数を測定するには適当とは言えないが、この反応過程を観察するには有効であることが確かめられた。定量的にこの転換反応を評価するために、この方法によるシアン化物イオンの定量上限 50  $\mu\text{M}$ 以下の濃度で実験を行った。0.01 mg/ml ロダネーゼ溶液、40.7  $\mu\text{M}$  シアン化物及び 1 mM チオ硫酸塩の混合溶液を9分おきに注入した。この結果を用いて反応時間に対する濃度をプロットすると、Fig. 7のようになる。シアン化物イオンとチオシアン酸イオンの濃度変化を示す曲線は対称形とはならず、シアン化物イオンの初濃度の半分の位置よりやや下方で交わっている。即ち、チオシアン酸イオンの定量値は予想よりやや小さいが、その原因はロダネーゼとチオシアン酸イオンの結合体が生成しているためではないかと考えられる。これは、ミカエリス定数の測定において、カーブフィッティング法の結果が Lineweaver-Burk の方法の結果と異なっていることの一因となり得る。Lineweaver-Burk の方法では、チオシアン酸イオンの生成率が低い時点で反応を停止させているためロダネーゼとチオシアン

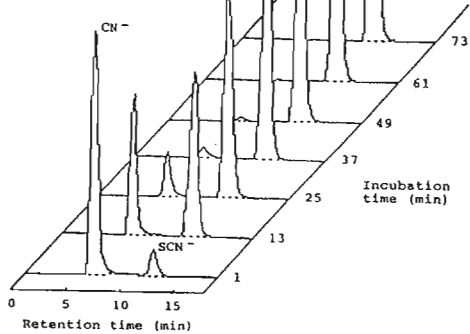


Fig. 6. Variations of the concentrations of  $\text{CN}^-$  and  $\text{SCN}^-$  as a function of incubation time. Initial concentrations were  $0.38 \text{ mM CN}^-$  and  $29 \text{ mM S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

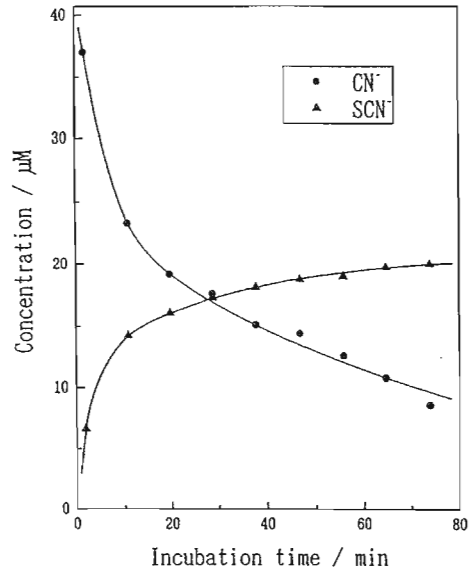


Fig. 7. Variations of the concentrations of  $\text{CN}^-$  and  $\text{SCN}^-$  as a function of incubation time. Initial concentrations were  $40.7 \text{ μM CN}^-$  and  $1.0 \text{ mM S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

酸イオンの結合体の生成はほとんど無いと考えられるが、カーブフィッティング法では、チオシアン酸イオンの生成率がより高い領域の測定値は、両者の結合体の生成による影響が考えられる。

以上のように、FIAを利用し、新しく考案したカーブフィッティング法を用いて、シアン化物イオンに対するロダナーゼのミカエリス定数の測定が可能であった。この方法は、各種濃度の基質サンプルを調製してその各々について反応速度を測定する必要はなく、非常に簡便な方法である。また、他の酵素についても至適フロー系を利用して適用が可能であり、広く応用できる有効な方法であると思われる。

#### 謝辞

FIAを用いた酵素反応の解析法についてご助言をいただきました九州大学の与座範政先生に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) L. Weng, J. Russell and R. L. Heinrikson: J. Biol. Chem., 253, 8093(1978).
- 2) 田辺信三: 明治薬科大学研究紀要, 20, 13(1990).
- 3) R. Mintel and J. Westley: J. Biol. Chem., 241, 3381(1966).



- 4) 山羽力, 早川堯夫, 谷本剛 訳: “酵素分析法”, p. 38(1981), (廣川書店); G. Michal : in “Principles of Enzymatic Analysis”, Edited by H. U. Bergmeyer, (1978), (Verlag Chemie, Weinheim).
- 5) A. Tanaka, K. Deguchi and T. Deguchi : Anal. Chim. Acta, 261, 281(1992).
- 6) S. -F. Wang and M. Volini : J. Biol. Chem., 243, 5465(1968).
- 7) 廣海啓太郎: “酵素反応解析の実際”, (1978), (講談社).
- 8) J. Westley and David Heyse : J. Biol. Chem., 246, 1468(1971).
- 9) E. S. Vazquez, A. M. Buzaleh, E. A. Wider and A. M. del C. Batlle : Int. J. Biochem., 19, 1199(1987).
- 10) A. J. Nok, S. M. Nasir and Y. Sa' Adatu : J. Biochem. Toxicology, 8, 57(1993).
- 11) K. Alexandar, L. R. Procell, S. D. Kirby and I. B. Stephen : J. Biochem. Toxicology, 4, 29(1989).
- 12) H. Zollner : “Handbook of enzyme inhibitors”, p. 207(1989), (VCH, Weinheim).

(Received January 12, 1996)

(Accepted February 1, 1996)