

微量拡散法による炭酸脱水酵素の測定

清水千秋・福原忠信

A Microdiffusion Analytic Estimation of Carbonic Anhydrase

Chiaki SHIMIZU and Tadanobu FUKUHARA

We estimated the measurement of CO_2 for the determination of carbonic anhydrase by the microdiffusion analysis.

The absorbing time of the CO_2 by the $\text{Ba}(\text{OH})_2$ is short in the little quantity of CO_2 (Fig. 2), thin stratum of CO_2 solution (Fig. 1), continual shake of unit (Fig. 1) and large quantity of $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (Fig. 2) but is constant through $0\sim 37^\circ\text{C}$. (Fig. 3), and absorbing velocity is more rapid under the higher partial pressure of CO_2 (Fig. 1 & 2).

The measurement method of carbonic anhydrase by the microdiffusion analytic method is as accurate as manometric method (Fig. 4) and is simpler than the latter.

緒 言

炭酸脱水酵素はその酵素作用 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$ からわかるように CO_2 , H_2CO_3 いずれかの増減を知ればその活性が測定できるので従来多くの測定方法がある。特に直接 CO_2 を測定する検圧法は MELDRUM, ROUGHTON¹⁾ によって始められて以来標準方法として多くの研究に使用されており, KREBS, ROUGHTON²⁾ は同様目的のためにワールブルグ検圧計を使用している。しかしこれらの方法はいずれも装置が高価になるばかりでなく多数の試料を測定する時には色々と不便を感ずる。他方指示薬あるいは電気的な方法で pH の変化を測定して間接に酵素活性を測定する方法がある。BRINKMAN, MARGARIA³⁾ あるいは WILBUR, ANDERSON⁴⁾ 等によって行われた電気的な測定方法は特別な装置を作る必要があるのであまり簡易な測定方法とは言えない。しかし phenol red⁵⁾ や brom thymol blue⁶⁾ を指示薬に使用して pH の変化を知る方法は装置、測定方法等が簡単であり多数の試料を測定するにも適しているが反面 activator, inhibitor の測定には不適である。なお最近になって CONWAY⁷⁾ は微量拡散法で CO_2 を測定する方法が本酵素の簡易な測定方法として容易に適用できることをのべているが、これら各種の測定方法を比較した結果、多数の試料を簡易にしかも正確に測定するためには微量拡散法が比較的的目的によくかなうように考えられるので CONWAY 法を基礎に色々検討し、有為な結果をえたのでこれらについてのべる。

実 験 方 法

1. 微量拡散法で CO_2 を測定する場合の 2, 3 の問題

CO_2 の吸収率と時間の関係 良く洗った柴田化学器械工業製微量拡散用 B 型 unit の内室に N/7 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.15ml を入れて蓋をし、その中の適当数には外室に 0.2% NaHCO_3 0.4ml, N H_2SO_4 0.25ml を加え半数は 5 秒間よく振盪して後静置、他の半数は連続振盪して各々一定時間後残っている $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を水平マイクロピュレットを使用して N/25 HCl (1ml は CO_2 0.88mg に相当) で滴定した。なお他の適当数の外室

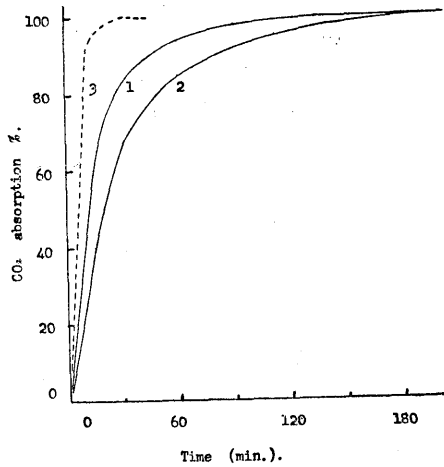


Fig 1. Relation of the CO₂ absorption rate to the time in the microdiffusion analysis.

unit : Shibata Chemical Apparatus Type B.

experimental temperature : 15°C..

inside part : N/7 Ba(OH)₂ 0.15 ml..

outside part : line 1 and 3 (0.2% NaHCO₃ 0.4 ml., N H₂SO₄ 0.25 ml.), line 2 (0.114% NaHCO₃ 0.7 ml., N H₂SO₄ 0.25 ml.).

line 1 and 2 : state of repose after 5 sec. shake.

line 3 : state of shake.

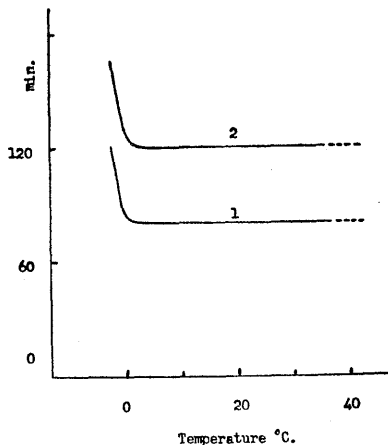


Fig 3. Relation of the perfect absorption

of CO₂ to the reaction temperature.

inside part : N/7 Ba(OH)₂ 0.15 ml..

outside part : NaHCO₃ 0.8 mg., line 1 (reaction solution 0.5 ml.),

line 2 (reaction solution 0.65 ml.).

state of repose after 5 sec. shake.

には 0.114% NaHCO₃ 0.7ml, N H₂SO₄ 0.25 ml を加え 5 秒間振盪後静置して測定した。結果は Fig. 1 に示す。なお容器と蓋の接着剤には冬季は白色ワセリン 夏季は黄色ワセリンを使用した。

CO₂量と完全吸収に要する時間 外室に色々の濃度の NaHCO₃ 0.4ml を加えその 中半数は

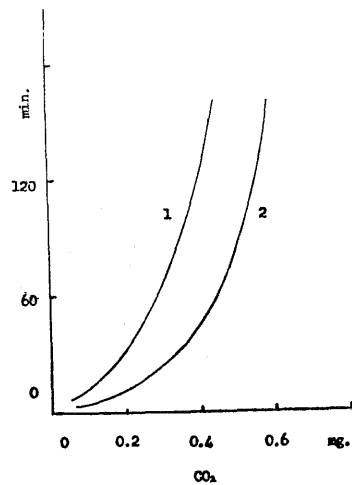


Fig. 2. Relation of CO₂ quantity to the perfect absorption of CO₂.

inside part : line 1 (N/7 Ba(OH)₂ 0.15 ml.), line 2 (N/5 Ba(OH)₂ 0.15 ml.).

outside part : NaHCO₃ (various density) 0.4 ml., N H₂SO₄ 0.25 ml..

state of repose after 5 sec. shake.

内室に N/7 Ba(OH)₂ 0.15ml, 他の半数は N/5 Ba(OH)₂ 0.15ml を加え N H₂SO₄ 0.25 ml を外室に加えた後 5 秒間良く振盪して静置し, 一定時間後 N/25 HCl で滴定した。結果は Fig 2. に示す。

CO₂ の吸収におよぼす 温度の影響 内室に N/7 Ba(OH)₂ 0.15ml を加え, その半数は外室に 3.5% NaHCO₃ 0.25ml 他の半数は 2% NaHCO₃ 4 ml を加え, 各々に N H₂SO₄ 0.25 ml を加え 5 秒間振盪後静置し一定時間後滴定した。結果は Fig 3. に示す。

2. 微量拡散法によるヤリイカの 鰓および コイの血液中の炭酸脱水酵素の測定

色々の濃度の血液および磨碎した鰓の稀釈溶液 0.5ml と M/4 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 2 ml とを混ぜた溶液 0.2ml を 20°C に調節した恒温槽

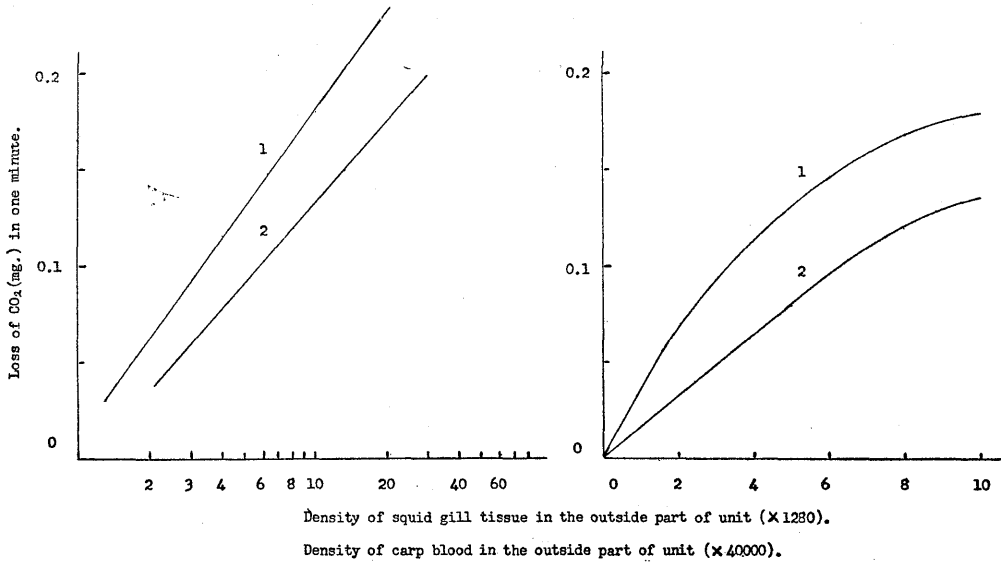


Fig 4. Relation of the loss of CO₂ in one minute to the density of carbonic anhydrase, at 20°C..

inside part : N/7 Ba(OH)₂ 0.15 ml..

outside part : crude enzyme solution (pH 6.8) 0.2 ml. and 0.4% NaHCO₃ 0.2 ml..

line 1 : gill tissue of squid.

line 2 : carp blood.

中の unit の外室に入れ、10分後外室に 0.4% NaHCO₃ を含んだ N/200 NaOH 溶液 0.2ml を加え10秒間良く混ぜた後連続 振盪する。45秒後水平 ミクロビュレット から指示薬 (phenolphthalein, thymolphthalein) を含んだ N/7 Ba(OH)₂ 0.15ml を内室に加え、0.4% NaHCO₃ を加えてから丁度1分後に蓋をする。次に N H₂SO₄ 0.25ml を外室中に入れ5秒間良く混ぜた後1.5時間静置し、N/25 HCl で滴定する。対照として酵素液の代りに 蒸溜水を使用して測定した結果と上記の結果との差が 0.4% NaHCO₃ 溶液が1分間に酵素の作用で失った CO₂ の量になる。測定結果はFig.4に示す。なお本実験に使用した恒温

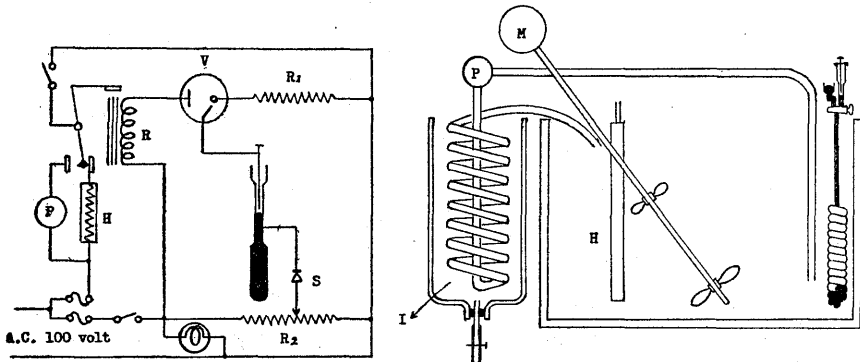


Fig 5. Diagram of apparatus to fix the temperature.

P : pump. H : heater (200w). V : OA4G. R : 900Ω. R₁ : 210Ω

R₂ : 500KΩ. I : ice water. S : 12F substitute selen.

M : 1/16 HP motor.

装置は安価にできしかも比較的良い成績をえたので参考のため Fig 5. に示す。

3. 比色法による酵素の測定

Fig 6. に示す装置を使用して測定した。即ち試験管 R に N の中の CO_2 飽和溶液 (0.0263M NaHCO_3 含有) 10 ml, 適当濃度に稀釈した酵素液 2 ml, bromthymol blue 液 10 滴, octyl alcohol 1 滴を加え CO_2 を通しながら 2 分後 0.3M Na_2CO_3 (0.206M NaHCO_3 含有) 1 ml を加え丁度色調が S と同じ (pH 7.0) になるまでの時間を測定する。

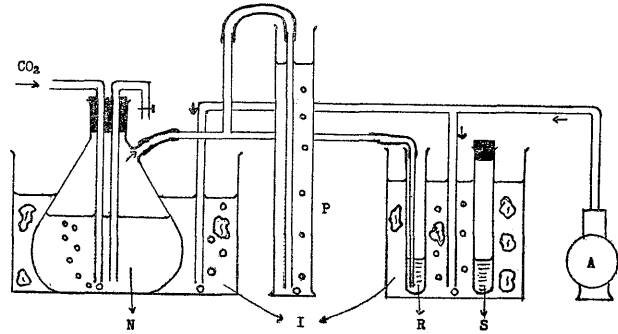


Fig 6. Diagram of apparatus of changing-pH method. N : 0.0263 M NaHCO_3 . P : pressure regulator. I : ice water. R : reaction vessel. S : colour standard vessel. A : air compressor.

結果の考察および結論

微量拡散法を利用して炭酸脱水酵素を測定するには 2 の実験でも明らかのように、該酵素の作用で基質 NaHCO_3 が 1 分間に失う CO_2 量を測定して酵素活性の強弱をきめるため先ず CO_2 の測定方法を種々検討してみた。

unit の外室内の NaHCO_3 に H_2SO_4 を加え発生する CO_2 を内室の $\text{Ba}(\text{OH})_2$ に吸収させて CO_2 を測定した結果、その吸収速度はその時の条件によってかなりの差が認められた。即ち Fig 1. に示すように 80% 程度までは吸収がかなり早く行われるが、 CO_2 の濃度が薄くなるとその吸収速度がおそくなり、95% 以上を吸収するにはかなりの時間が必要である。また容器を連続振盪した時の吸収速度は静置した時の 4 倍程である。なお CO_2 の絶対量が等しくてもその溶液量が多い時は吸収がおそくなる。

CO_2 , $\text{Ba}(\text{OH})_2$ の濃度を色々変えてその吸収をしらべた結果 Fig. 2 に示すように CO_2 が微量の時、即ち CO_2 の分圧が低い時は Fig 1. の結果と同じようにその吸収がおそくなる。なお $\text{Ba}(\text{OH})_2$ の濃度が高い時は低い時に比べ CO_2 の吸収速度が早い。またこの吸収速度は Fig. 3 に示すように $0 \sim 37^\circ\text{C}$ の間では温度に無関係である。即ちこの操作は 0°C 以下の日を除けば室温の変化による差がない。

以上の予備実験で色々な条件での $\text{Ba}(\text{OH})_2$ による CO_2 の吸収が明らかになったのでこれを考慮に入れ、ヤリイカの鰓およびコイの血液の炭酸脱水酵素の活性を測定した結果、酵素濃度と基質が 1 分間に損失する CO_2 量との関係は、Fig. 4 に示すようにその関係曲線は酵素濃度の低い時は直線をなすが、高濃度の時は双曲線をなす。他方酵素濃度を対数で表わすと、高濃度の時は濃度と CO_2 損失量の関係は直線関係となるが、これらはすでに検圧法で測定されている結果と同じである。即ち微量拡散法による炭酸脱水酵素の測定は予備実験の結果に従つて CO_2 を完全に吸収させれば誤差も少なく、また非常に再現性に富んだ結果をえる。

Fig. 6 に図示したような装置を利用して比色法で酵素の活性を測定した結果、反応時間が 20 秒程度になるように酵素濃度を調節した時は比較的有為な結果をえたが微量拡散法にくらべて再現性が乏しい上に緒言でものべたように inhibitor, activator の研究に不都合な点が多い。

恒温水槽を作るにあたり有益な助言をいただいた本学部林助教に深謝する。

文 献

- 1) N. U. MELDRUM and F. J. W. ROUGHTON : *J. Physiol.* 80, 143 (1933).
- 2) H. K. KREBS and F. J. W. ROUGHTON : *Biochem. J.* 43, 550 (1948).
- 3) R. BRINKMAN and R. MARGARIA : *J. Physiol.* 72, 6p (1931).
- 4) K. WILBER and N. G. ANDERSON : *J. Biol. Chem.* 176, 147 (1948).
- 5) R. BRINKMAN : *J. Physiol.* 80, 170 (1934).

- 6) J. PHILPOT and J. St. L. PHILPOT : *Biochem. J.* 30, 2191 (1936).
- 7) E. J. CONWAY : *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error.*
Croshy Lockwood and Son LTD. London. 226 (1950).