

## 資 料

### *Lipomyces starkeyi* の酵素活性 測定のための反応液組成

——解糖系およびその周辺の酵素——

長沼孝文・兎束保之・田中健太郎・植月節義  
三森 哲・久保田昌幸・小泉 哲

#### Practical Assay Procedures of Glycolytic and Related Pathways in *Lipomyces starkeyi*

TAKAFUMI NAGANUMA, YASUYUKI UZUKA, KENTARO TANAKA, SETSUYOSHI  
UETSUKI, SATOSHI MITSUMORI, MASAYUKI KUBOTA, and SATOSHI KOIZUMI

*Department of Fermentation Technology, Faculty of  
Engineering, Yamanashi University, Kofu 400*

微生物の細胞内代謝活性を調べる重要な生化学的手法の一つとして、無細胞系で酵素活性を測定する方法がよく用いられている。我々は、これまで、油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の脂質蓄積メカニズムに関する研究の一環として、脂質蓄積能の発現・抑制と細胞内代謝活性の関係を無細胞系の酵素実験により検討してきた<sup>(1)</sup>。これらの検討をおこなうには、まず細胞から酵素を抽出し、次に所定の反応系を用いて定量する必要がある。既に、細胞を破碎して酵素を取り出すことに関しては、従来法よりも小規模で、かつ簡便な方法を開発した<sup>(2)</sup>。一方、酵素活性測定用の反応液組成については、各々の酵素に関して研究論文、書籍、カタログ等に記載されているが、これらをまとめて記述している例はなく、一連の基礎的代謝経路に関与する多数の酵素の反応液組成を簡単に知るには不便であった。

この不便さを我々自身も体験したことから、反応液組成をまとめたものがあれば、効率の良い実験を望む人達の参考になると考え、我々がこれまで対象として

きた酵素に関して、一覧出来る資料を作成した。

但し、ここに記載した反応液組成は、報文や参考書に記述された組成を基本として、*Lipomyces starkeyi* から調製した粗酵素液用へと改変したものである。従って、研究対象となる微生物の種類が異なる場合には最適 pH、基質濃度、活性化剤等についてそれぞれに適應するよう再検討を加える必要があると考えられる。なお、本報では、Glycolytic pathway, Pentose-phosphate cycle, Glycerol 3-phosphate pathway 上の 13種の酵素について記載した。

また、以下の Table に示す酵素の測定は、Hitachi Model 200-20 double-beam temperature-controlled (25°C) spectrophotometer を用いて、波長 340nm、石英セル光路長 1 cm の条件下で行った。

本報で反応液作製に使用した試薬は、和光純薬、メルク、P-L バイオケミカル、ペーリンガー・マンハイム山之内、シグマ、オリエンタル酵母、協和醸酵、同仁化学の製品である。

Table 1. Composition of assay mixtures for enzymes on the glycolytic pathway. Common abbreviations used in all tables are as follows: triethanolamine, triethanolamine hydrochloride-NaOH buffer; R., reference; B., blank; S., sample.

1-1. Hexokinase (E C 2.7.1.1)<sup>(3,4)</sup>

|                               | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|-------------------------------|---------------------------|------|------|
|                               | R.                        | B.   | S.   |
| 0.2 M Triethanolamine(pH 8.0) | 1.5                       | 1.5  | 1.5  |
| 0.56 M Glucose                | 1.0                       | 1.0  | 1.0  |
| 10 mA ATP                     |                           |      | 0.15 |
| 10 mM NADP                    |                           | 0.15 | 0.15 |
| 70 IU/ml G6P-DH <sup>a</sup>  | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Distilled water               | 0.3                       | 0.15 |      |
| Crude extract                 | 0.05                      | 0.05 | 0.05 |
| Final volume                  | 2.87                      | 2.87 | 2.87 |

<sup>a</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase1-2. Phosphoglucose isomerase (E C 5.3.1.9)<sup>(5)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine(pH 8.5)               | 2.6                       | 2.6  | 2.6  |
| 43 mM Fructose-6-P <sup>a</sup>             |                           |      | 0.1  |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.1                       | 0.1  | 0.1  |
| 10 mM NADP                                  |                           | 0.1  | 0.1  |
| 70 IU/ml G6P-DH <sup>b</sup>                | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Distilled water                             | 0.2                       | 0.1  |      |
| 1/4 Crude extract                           | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| Final volume                                | 2.93                      | 2.93 | 2.93 |

<sup>a</sup> Fructose-6-phosphate disodium salt<sup>b</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase1-3. Fructose-6-phosphate kinase (E C 2.7.1.11)<sup>(6)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 8.0)              | 2.2                       | 2.2  | 2.2  |
| 30 mM Fructose-6-P <sup>a</sup>             |                           |      | 0.1  |
| 91 mM Glucose-6-p <sup>b</sup>              |                           |      | 0.1  |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.1                       | 0.1  | 0.1  |
| 3.2 M NH <sub>4</sub> Cl                    | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| 14.5 mM ITP                                 | 0.2                       | 0.2  | 0.2  |
| 10 mM NADH                                  |                           | 0.05 | 0.05 |

|                              |      |      |      |
|------------------------------|------|------|------|
| 90 IU/ml Aldolase            | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 100 IU/ml TIM <sup>c</sup>   | 0.1  | 0.1  | 0.1  |
| 80 IU/ml G3P-DH <sup>d</sup> | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Distilled water              | 0.25 | 0.2  |      |
| Crude extract                | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Final volume                 | 2.98 | 2.98 | 2.98 |

<sup>a</sup> Fructose-6-phosphate disodium salt<sup>b</sup> Glucose-6-phosphate sodium salt<sup>c</sup> Triosephosphate isomerase<sup>d</sup> Glycerol-3-phosphate dehydrogenase1-4. Aldolase (E C 4.1.2.13)<sup>(7,8)</sup>

|                                      | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|--------------------------------------|---------------------------|------|------|
|                                      | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 8.0)       | 2.8                       | 2.8  | 2.8  |
| 24 mM Fructose-1,6-di-P <sup>a</sup> |                           |      | 0.1  |
| 10 mM NADH                           |                           | 0.05 | 0.05 |
| 100 IU/ml TIM <sup>b</sup>           | 0.1                       | 0.1  | 0.1  |
| 80 IU/ml G3P-DH <sup>c</sup>         | 0.1                       | 0.1  | 0.1  |
| Distilled water                      | 0.15                      | 0.1  |      |
| Crude extract                        | 0.05                      | 0.05 | 0.05 |
| Final volume                         | 3.20                      | 3.20 | 3.20 |

<sup>a</sup> Fructose-1,6-diphosphate sodium hydrate<sup>b</sup> Triosephosphate isomerase<sup>c</sup> Glycerol-3-phosphate dehydrogenase1-5. Triosephosphate isomerase (E C 5.3.1.1)<sup>(9)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.25 M Triethanolamine(pH 7.6)          | 2.5                       | 2.5  | 2.5  |
| 13.2 mM Glyceraldehyde 3-P <sup>a</sup> |                           |      | 0.5  |
| 10 mM NADH                              |                           | 0.05 | 0.05 |
| 80 IU/ml G3P-DH <sup>b</sup>            | 0.05                      | 0.05 | 0.05 |
| Distilled water                         | 0.55                      | 0.5  |      |
| 1/5 Crude extract                       | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| Final volume                            | 3.11                      | 3.11 | 3.11 |

<sup>a</sup> DL-Glyceraldehyde-3-phosphate<sup>b</sup> Glycerol-3-phosphate dehydrogenase1-6. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (E C 1.2.1.12)<sup>(10)</sup>

|                                  | Pipette into cuvette (ml) |     |     |
|----------------------------------|---------------------------|-----|-----|
|                                  | R.                        | B.  | S.  |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 7.2)   | 2.5                       | 2.5 | 2.5 |
| 93 mM Glycerate-3-P <sup>a</sup> |                           |     | 0.2 |

|   |      |      |      |
|---|------|------|------|
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 50 mM ATP                                   | 0.1  | 0.1  | 0.1  |
| 10 mM NADH                                  |      | 0.05 | 0.05 |
| 4,500 IU/ml PGK <sup>b</sup>                | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Distilled water                             | 0.25 | 0.2  |      |
| Crude extract                               | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Final volume                                | 2.90 | 2.90 | 2.90 |

<sup>a</sup> Glycerate-3-phosphate trisodium salt

<sup>b</sup> 3-Phosphoglycerate kinase

1-7. 3-Phosphoglycerate kinase (E C 2.7.2.3)  
(11,12,13)

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 7.6)              | 2.5                       | 2.5  | 2.5  |
| 93 mM Glycerate-3-P <sup>a</sup>            |                           |      | 0.2  |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.03                      | 0.03 | 0.03 |
| 50 mM ATP                                   | 0.1                       | 0.1  | 0.1  |
| 10 mM NADH                                  |                           | 0.05 | 0.05 |
| 800 IU/ml GAP-DH <sup>b</sup>               | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| Distilled water                             | 0.25                      | 0.2  |      |
| 1/10 Crude extract                          | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Final volume                                | 2.91                      | 2.91 | 2.91 |

<sup>a</sup> Glycerate-3-phosphate trisodium salt

<sup>b</sup> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1-8. Phosphoglycerate mutase (E C 2.7.5.3)<sup>(14,15)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 7.6)              | 2.5                       | 2.5  | 2.5  |
| 93 mM Glycerate-3-P <sup>a</sup>            |                           |      | 0.15 |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.05                      | 0.05 | 0.05 |
| 94 mM ADP                                   | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| 10 mM NADH                                  |                           | 0.05 | 0.05 |
| 2,500 IU/ml LDH <sup>b</sup>                | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| 400 IU/ml Pyruvate kinase                   | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| 400 IU/ml Enolase                           | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Distilled water                             | 0.2                       | 0.15 |      |
| Crude extract                               | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| Final volume                                | 2.84                      | 2.84 | 2.84 |

<sup>a</sup> Glycerate-3-phosphate trisodium salt

<sup>b</sup> Lactate dehydrogenase

1-9. Enolase (E C 4.2.1.11)<sup>(16,17)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 7.6)              | 2.5                       | 2.5  | 2.5  |
| 24 mM Glycerate-2-P <sup>a</sup>            |                           |      | 0.1  |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.05                      | 0.05 | 0.05 |
| 94 mM ADP                                   | 0.04                      | 0.04 | 0.04 |
| 10 mM NADH                                  |                           | 0.05 | 0.05 |
| 2,500 IU/ml LDH <sup>b</sup>                | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| 400 IU/ml Pyruvate kinase                   | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Distilled water                             | 0.15                      | 0.1  |      |
| Crude extract                               | 0.01                      | 0.01 | 0.01 |
| Final volume                                | 2.79                      | 2.79 | 2.79 |

<sup>a</sup> Glycerate-2-phosphate trisodium salt

<sup>b</sup> Lactate dehydrogenase

1-10. Pyruvate kinase (E C 2.7.1.40)<sup>(18,19,20)</sup>

|   | Pipette into cuvette (ml) |      |      |
|---|---------------------------|------|------|
|   | R.                        | B.   | S.   |
| 0.1 M Triethanolamine (pH 7.6)              | 2.6                       | 2.6  | 2.6  |
| 10.7 mM PEP <sup>a</sup>                    |                           |      | 0.15 |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.04                      | 0.04 | 0.04 |
| 0.2 M KCl                                   | 0.15                      | 0.15 | 0.15 |
| 94 mM ADP                                   | 0.15                      | 0.15 | 0.15 |
| 10 mM NADH                                  |                           | 0.05 | 0.05 |
| 2,500 IU/ml LDH <sup>b</sup>                | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Distilled water                             | 0.2                       | 0.15 |      |
| Crude extract                               | 0.02                      | 0.02 | 0.02 |
| Final volume                                | 3.18                      | 3.18 | 3.18 |

<sup>a</sup> Phosphoenolpyruvate monocyclohexyl ammonium salt

<sup>b</sup> Lactate dehydrogenase