

LC-MSによる酵素活性測定法

松本謙一郎

酵素活性を測定することは、数ある生物工学分野の実験の中でも、とくに基礎的かつ重要なものの一つであろう。しかし、酵素活性測定系を立ち上げるのはかなり大変な場合もあり、論文の査読者に「酵素活性を測定せよ」と一行書かれたおかげで、大変な苦勞をしたという読者もいるのではないだろうか？

酵素活性を知るためには、酵素と基質が必要なのももちろんであるが、加えて、反応が起こっていることを検出する何らかの方法が必要である。反応によって吸光度（または濁度）が変わる場合は、適切な波長の吸光度変化を測定することで比較的容易に反応速度を算出できる。反応を吸光度の変化で直接検出することが難しい場合は、呈色試薬との反応により生成物を検出可能な化合物へと変換する方法がある。たとえば、コエンザイムAはエルマン試薬と反応して黄色く呈色するため、可視領域の吸光度によって濃度が測定できる。

現在はさまざまな呈色試薬が販売されているが、使用できる試薬がない場合、複数の酵素反応を組み合わせ、検出可能な化合物まで誘導する方法（カップリング法）が用いられる。たとえば、光合成関連酵素RuBisCOの活性測定では、リブロース-1,5-ビスリン酸と二酸化炭素を基質として3-ホスホグリセリン酸が生成するが、この反応を吸光度変化により直接検出することはできないため、さらに二段階の酵素反応により生成物をグリセルアルデヒド-3-リン酸へと変換し、この過程でNADHがNAD⁺に酸化される際の吸光度変化を計測する。本手法では、測定対象の酵素と基質に加えて、さらに4つの酵素と2つの基質が使用される。これはかなり賑やかな例ではあるが、新規に測定系を立ち上げる場合、必要な酵素の種類が多いと敷居が高く感じるかもしれない。また、複数酵素を使用した測定法では、カップリングさせる酵素の活性を、測定対象の酵素活性に対して十分に高く設定する必要があるため、酵素の品質管理にも注意を要する。

このような複雑な複合反応を用いずに、酵素活性をサンプルに検出できる方法の一つにLiquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) 法がある。ご存知の通り、LC-MSはHPLCの検出器として質量分析計を備えた装置である。LC-MSでは、たとえば代表的な手法であるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を検出器に適用

した場合、リン酸化糖、有機酸など、顕著なUV吸収を持たない分子の多くを高感度で検出できる。LC-MS法による酵素活性の測定では、酵素反応液を一定時間ごとに一定量を分取して反応を停止したうえで、基質・生成物の濃度を測定し、濃度の変化速度を算出する。呈色反応・誘導体化を経ずに基質・生成物を直接検出できるため、反応系内に酵素反応と直接関係のない分子を持ち込む必要が減る。また、糖や有機酸の検出に用いられる示差屈折率 (RI) 検出器より格段に感度が高いため、低濃度のサンプルで実験できる。これは基質が高価な場合、とくに重要になる。

また、LC-MSを用いると、複数の化合物を同時に検出できる利点がある。溶出時間、質量電荷比 m/z のいずれかが異なっていれば、基質と生成物の濃度変化を同時に測定でき、補酵素などが関与する場合その濃度変化も測定できる。さらに、複数基質が競合的に反応する系の場合でも分析が可能である。一例として、ポリエステルの重合酵素を対象に、二種類のモノマーが同時に反応する共重合の速度を測定したケースでは、二基質の相対重合速度が単独重合と共重合条件で逆転するなど、興味深い結果が得られている¹⁾。

LC-MS法のデメリットをあげてみよう。検出にクロマトを用いた分析は、リアルタイム測定はできないため、細かい時間変化の追跡には向いていない。また、多数のサンプルを一検体ずつ分析することになるため、クロマト分析だけで数日かかることもある。呈色法では96穴プレートなどを用いたハイスループット化が可能であるが、クロマトを使用する場合は当然ながらそれは困難である。また、LC-MSはカラムの選定とキャリアなどの分析条件の設定が通常のHPLCより難しい。これらの情報が無い場合、測定条件を見つけるのに時間がかかる場合がある。装置自体も高価であり、メンテナンスにかかる経費も軽視できない。

このように、LC-MS法には確かに面倒なことも多いが、適用範囲が広く、うまく活用すれば他法では得られない情報も得られる。酵素活性を測定したいがよい検出系がない、あるいはカップリング系が複雑になりすぎる、という場合などに検討してみてはいかがだろうか？

1) Matsumoto, K. *et al.*: *Biomacromolecules*, **19**, 2889 (2018).