

反応スキームを眺めて簡単に解ける酵素反応速度論

多比良和誠*¹・二村泰弘*²・加藤 卓*²*1 東京福祉大学 心理学部 (王子キャンパス)
〒114-0004 東京都北区堀船2-1-11*2 東京福祉大学 教育学部 (池袋キャンパス)
〒171-0022 東京都豊島区南池袋2-47-8

(2016年8月25日受付、2016年10月13日受理)

抄録：生体内で働く触媒である酵素は、化学反応の起こる速度を飛躍的に高めることができる ($10^{12} \sim 10^{15}$ 倍もしくはそれ以上の加速効果)。本稿では、酵素が関与する化学反応についての反応速度論を解説する。前半では、一般的な解説書やウィキペディアの「ミカエリス・メンテン式」の説明にも載っている方法を復習するが、実は、この方法だと複雑な酵素反応を解くことは非常に困難である。そこで、本稿後半では、一般書に載っていない簡単な解き方を教示する。例えば、T大学の学生に従来の方法で図13の酵素反応式を導かせようとしたが、授業時間内に解けた学生は一人もいなかった。ところが、後半の「手抜き手法」、つまり「酵素反応スキームを眺めるだけで解く方法」を教えたところ、全員が10～30分程度で図13の酵素反応式を導くことができた。

(別刷請求先：多比良和誠)

キーワード：酵素反応、ミカエリス・メンテン式、迅速平衡法、定常状態法、簡略法

緒言

酵素反応が起こるためには、まず基質 (酵素によって化学反応を起こす物質) が酵素の基質結合部位 (ポケット) に入り込まなくてはならない。このプロセスを酵素 (以下 **E**) が基質 (以下 **S**) と結合して酵素基質複合体 (以下 **ES**) を形成するという (小宮山・八代, 1996)。

E と **S** から **ES** が形成される反応速度 v_{+1} は、出発材料である **E** と **S** の濃度 (それぞれ $[E]$ 、 $[S]$ と表記) の積に反応速度定数 k_{+1} を乗じて表すことができる。

$$v_{+1} = k_{+1} [E][S]$$

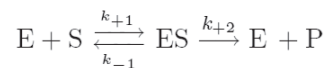
一方、その逆反応、すなわち **ES** から **E** と **S** に解離する (ポケットに取り込まれた基質が次の反応を起こすことなくポケットから漏れ出す) 反応速度 v_{-1} は

$$v_{-1} = k_{-1} [ES]$$

で表される。

いったん形成された **ES** が **E** と **S** に逆戻りするか、次の高い山を越えて反応生成物 (以下 **P**) に向かうかは、図1に示すような山の高さ (反応速度定数 $\{k_{-1}, k_{+2}\}$ の大小) によって決まる。

この一連の反応は以下のように表される。



2番目の山が高い場合は、反応生成物 (**P**) ができる前に、基質 (**S**) は酵素のポケットに何度も出入りするので、 $E + S \rightleftharpoons ES$ の間に「迅速な平衡」が成り立っている」という。反応全体は $E + S \rightleftharpoons ES$ と $ES \rightarrow E + P$ の2つの反応過程からできているが、2番目の山が高いので (速度定数 k_{+2} が k_{-1} より小さいので)、後者の反応が律速段階 (全体で一番登りにくい山) になる。

本稿では図1のエネルギー図を基本とした酵素反応を始めとして、もっと一般的な酵素反応やさらに複雑な酵素反応について議論し、全ての酵素反応に対して、簡単に反応速度式を導く手法を教示する。

1. 従来の迅速平衡法による導出

図1のエネルギー図に従う「迅速な平衡」が成り立っている」酵素反応について、反応速度式を解いてみる。

$E + S \rightleftharpoons ES$ の反応は迅速な平衡に達しているので、基質 (**S**) が酵素のポケットに出入りする割合 (“フリーな基質 **S** およびフリーな酵素 **E**” と “基質を取り込んだ酵素 **ES**” の

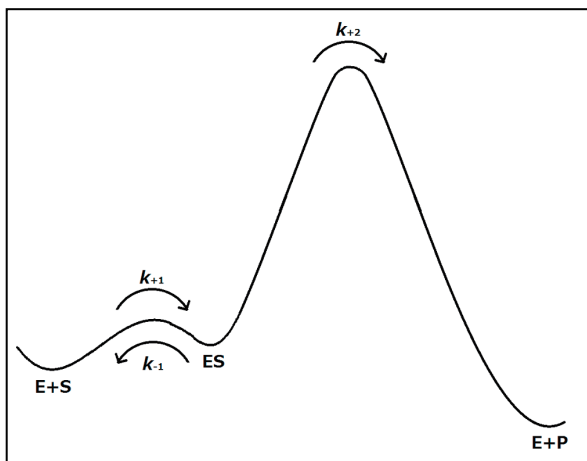


図1. 迅速な平衡を示すエネルギー図

割合)が一定(つまり $v_{+1}=v_{-1}$)となり、

$$k_{+1}[E][S]=k_{-1}[ES]$$

の式が成り立つ。

解離定数 $K_s (= k_{-1}/k_{+1})$ を設定すると、

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \dots (1)$$

と表される。

この反応系に存在する酵素種は、基質と結合していないフリーな酵素 **E** と、基質 **S** と結合した酵素複合体 **ES** の2種類のみなので、全酵素濃度(基質を加える前の{タイム・ゼロ“0”の}全酵素濃度) $[E]_0$ は両者の濃度の和に等しくなる。

$$[E] + [ES] = [E]_0 \quad \dots (2)$$

反応産物 **P** がどれくらいの速度 (v) で生成されるかは、図1の「一番高い山を登る準備ができている酵素複合体 **ES** がどれくらい存在するか」と「どれくらいの速度でその山を登れるか (k_{+2})」で決まる。つまり、酵素複合体の濃度 $[ES]$ と k_{+2} の積で決まる。

$$\left(v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \right)$$

この速度式を完結させるのに必要な $[ES]$ を未知数として、(1)、(2)の連立方程式を解くと、最終的な酵素反応式が求まる。

(1)式より

$$[E] = \frac{K_s[ES]}{[S]} \quad \dots (1')$$

(2)式より

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad \dots (2')$$

(1') = (2') なので、

$$\frac{K_s[ES]}{[S]} = [E]_0 - [ES]$$

$$\frac{K_s[ES]}{[S]} + [ES] = [E]_0$$

$$\frac{K_s[ES] + [ES][S]}{[S]} = [E]_0$$

$$[ES](K_s + [S]) = [E]_0[S]$$

となり、(3)式が導かれる。

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad \dots (3)$$

単位時間あたりに産生される反応産物 **P** の量は酵素基質複合体 **ES** と速度定数 k_{+2} の積で与えられるので、前述したように (4)式が成り立つ。

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad \dots (4)$$

(3)を(4)に代入すると(5)式になる。

$$v = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad \dots (5)$$

(4)式にも示されているように、反応速度 v は $[ES]$ の濃度に比例して増大する。ここで、 $[ES]$ の最大(可能)値は、全ての酵素のポケットに基質 **S** が取り込まれたときの濃度、つまり全酵素濃度 $[E]_0$ である。したがって、(4)式の反応速度 v の最大値 V_{max} は(6)式ようになる。

$$V_{max} = k_{+2}[E]_0 \quad \dots (6)$$

すると、(6)を(5)に代入して、(7)式が導かれる。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad \dots (7)$$

この(7)式が、基本的な酵素反応式である。酵素の反応速度論に大きな業績を残したレオノーラ・ミカエリスとモード・レオノーラ・メンテンにちなんでつけられた“ミカエリス・メンテン式”と呼ばれる基本式(7)に、酵素それぞれに特有なパラメーターを当てはめると、後述する

図4のような図形(プロット)が得られる。つまり、(7)式から明らかなように、基質濃度[S]が高くなると、反応速度vは、最大値 V_{max} に近づく(漸近線を描く)。

2. 定常状態法による導出

前節で説明した「迅速平衡法」では、 $E + S \rightleftharpoons ES$ が迅速に平衡に達すると仮定されているため、 $ES \rightarrow E + P$ の速度定数(k_{+2})が $ES \rightarrow E + S$ の速度定数(k_{-1})よりもはるかに小さい反応、つまり図1のように、2番目の山が高いような酵素反応でしか成り立たない。そこで、本節では、もう少し汎用性のある酵素反応式を導いてみる。

一般的には、基質に対して酵素は少量しか存在しないため、不安定な酵素基質複合体ESの濃度は、基質濃度と比べるとはるかに低い。そのため、反応の初期段階においては[ES]濃度は短時間で一定値に達する(定常状態になる)と考えることができる(図2のように、基質濃度[S]変化に比べると、酵素基質複合体の濃度[ES]の変化は“比較的”一定とみなせる)。

実験室で反応速度を求めるときには、酵素Eと基質Sを混ぜた直後に初速度(v_0)を測るので、初速度(v_0)は生成物Pの影響をうけない(図3)。混ぜた直後(数ミリ秒)は、「前定常状態」とよばれ、酵素濃度などの変化が見うけられるが、すぐに落ち着いて、[E]濃度や[ES]濃度が(“大過剰である”基質[S]濃度の経時変化と比較して)「一定」とみなせる「定常状態」に達する(図2)。

定常状態の間は(生成物Pの影響をうけないので)反応速度が一定である(図3)。この“定常状態法”によって速度式を求めると、もっと一般的な反応条件下でも、前節“1節の(7)式”が成り立つことが証明できる。

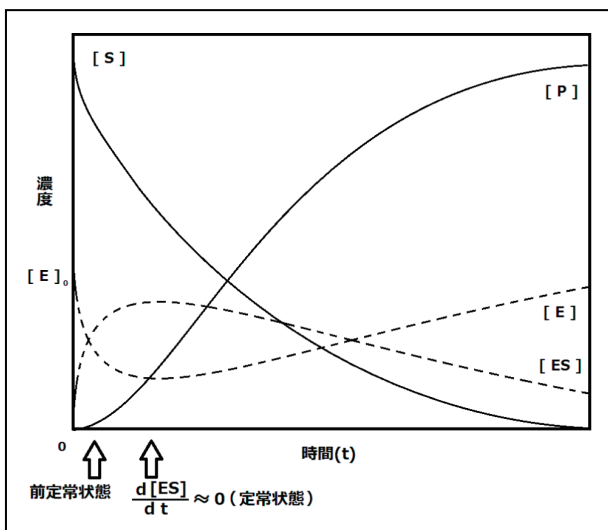


図2. 反応初期の濃度変化

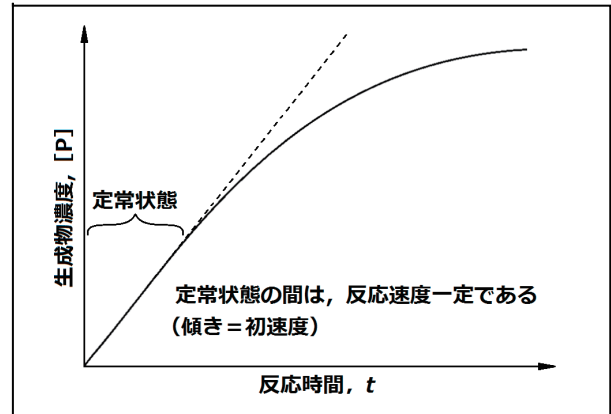


図3. 生成速度変化

反応機構は前節と同様で、 $E + S \rightleftharpoons ES$ について右向き速度定数を k_{+1} 、左向き速度定数を k_{-1} とする(図1参照)。定常状態においては、酵素濃度[E]と複合体濃度[ES]が一定なので(図2)、次の(1)式と(2)式が成立する。ここで、フリーな酵素の濃度[E]は、ES複合体からの基質の解離(k_{-1})と生成物の形成(k_{+2})で増し、逆に、基質がEに結合すると(k_{+1})減る{(1)式}。

一方、[ES]複合体は、基質の結合(k_{+1})で増し、基質の解離(k_{-1})と生成物の形成(k_{+2})で減少する(式2)。

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_{+2})[ES] - k_{+1}[E][S] = 0 \quad \dots (1)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] = 0 \quad \dots (2)$$

前節“1節の(2)式”と同様に、この反応機構でもEとESしか酵素種が存在しないので、全酵素濃度(タイム・ゼロ“0”の全酵素濃度 $[E]_0$)を表わす(3)式が成り立つ。

$$[E] + [ES] = [E]_0 \quad \dots (3)$$

また、“1節の(4)式”と同様に、反応産物は複合体ESより k_{+2} の速度で生成されるので、

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad \dots (4)$$

となり、(1)または(2)式と(3)式を連立方程式とみなして[ES]を求めると、(5)式になる。

つまり、(1)より、

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_{+2})[ES]}{k_{+1}[S]} \quad \dots (1')$$

または、(2)より、

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_{+2})[ES]}{k_{+1}[S]} \quad \dots (2')$$

(1')を(3)に代入すると、

$$\frac{(k_{-1} + k_{+2})[ES]}{k_{+1}[S]} + [ES] = [E]_0$$

$$\left(\frac{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}[S]}{k_{+1}[S]}\right)[ES] = [E]_0$$

となり、(5)式が導かれる。

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_0[S]}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}[S]} \quad \dots (5)$$

(5)式を(4)式に代入して速度 v を得た後、右辺の分子・分母を k_{+1} で割ると、(6)式になる。

$$v = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} \quad \dots (6)$$

最後に、速度パラメーターとして $V_{\max} = k_{+2}[E]_0$ 、および $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ と定義すれば、(6)式は汎用性の高いミカエリス・メンテン式(7)になる。

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \dots (7)$$

ここで、 K_m はミカエリス・メンテン定数と呼ばれ、 $v = V_{\max}/2$ (最大速度の半分の速度)のときの基質濃度を表す(図4)。 V_{\max} は、前節“1節の(6)式”でも定義された、

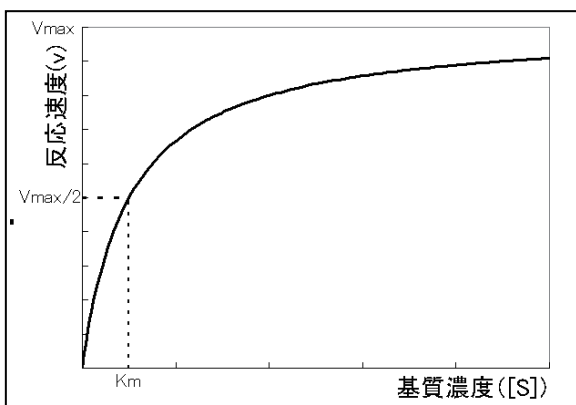


図4. ミカエリス・メンテン式の $v/[S]$ プロット

“基質濃度 $[S]$ が無限大のとき”の反応速度である(図4上の横軸で示された漸近線)。

この一般式(7)により、反応速度 v は次のような特徴を示すことが分かる。

- 基質濃度が極めて低い ($[S] \ll K_m$) のときは、 $v = (V_{\max}/K_m)[S]$ となって、基質濃度 $[S]$ に比例して増大する(図3の定常状態)
- 基質濃度が極めて高い ($[S] \gg K_m$) のときは、 $v = V_{\max}$ となって、基質濃度 $[S]$ に無関係な、最大値 (V_{\max}) になる(図4上の横軸で示された漸近線)

また、一般的なミカエリス・メンテン式(7)のミカエリス・メンテン定数 K_m ($K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$) は、図1のような迅速な平衡が成り立つ (k_{+2} が k_{-1} と比較して無視できるくらい小さい: $k_{-1} \gg k_{+2}$) 場合は、解離定数 K_s ($= k_{-1}/k_{+1}$) と等しくなる。

最後に特筆すべきことがある。2節の定常状態法により導出した(7)式の方が、1節の迅速平衡法により導出した“1節の(7)式”よりも一般的な反応式であるが、実験で求められるパラメーターは、 K_m と V_{\max} の2つだけなので (k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} などの個々の速度定数を求めることはできないので)、複雑な酵素反応式を導く際は、より簡単に導ける1節の迅速平衡法を奨励したい。

なお、 k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} などの個々の速度定数を求めるためには、図2の「前定常状態」の領域で、ストップ・フロー(stopped-flow)法などの、概ねミリ秒程度を上限とする速い反応の速度を観測することができる特殊な手法・装置を使う必要があるので、ここでは割愛する。

3. K_m と V_{\max} の求め方

ミカエリス・メンテン式(7)から求まる2つのパラメーター、つまり、一般的な実験で求めることができる2つのパラメーターは、 K_m と V_{\max} のみである。

大まかには、(i) K_m は基質との親和性を表していて、その値が小さいほど基質が酵素のポケットに入り易いことになる。(ii) V_{\max} は、“1節の(6)式”で定義されているように、 k_{+2} を代表していて、酵素がいかに速く生成物をつくるかを表している。

したがって、特定の酵素と基質の組み合わせにおいては、 V_{\max} が大きくて、 K_m が小さいほど、酵素反応の効率 (V_{\max}/K_m) が良いことになる。

図4に示されているように、 v と $[S]$ をそれぞれ縦軸と横軸にとってグラフを描くと、直線関係にはならない。 $[S]$ が小さいうちは線形だが、 $[S]$ が大きくなると飽和しながら (V_{\max} の漸近線に近づきながら) 曲線を描く。

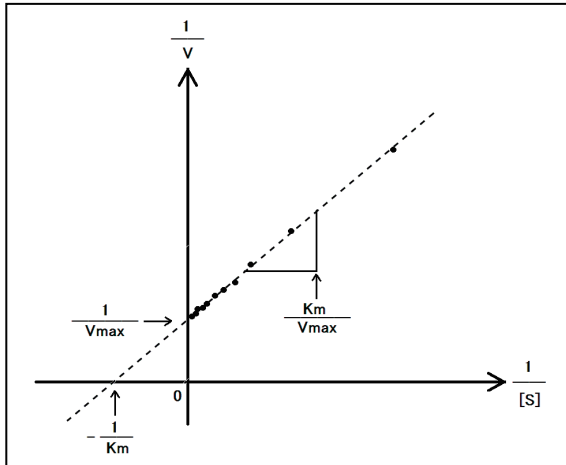


図5. Lineweaver-Burkプロット

コンピュータで非線形回帰分析ができるようになる前は、この非線形性のために K_m と V_{max} を正確に読み取ることが困難であった。筆者が解析していた古い時代には、Lineweaver-Burkプロット（別名：二重逆数プロット）といった線形化手法が使われていた（図5）。

この図5の表現法は、データを表示するには有用であるが、速度係数を求める目的ではもはや使われていない。非線形回帰によってより正確に K_m と V_{max} を求めるソフトウェアが出現したためである。

しかし、Lineweaver-Burkプロットは、データ表示には有効であり、速度データを示しながら酵素活性の阻害機構を解析する目的では、現在も使われている。この線形プロットは、ミカエリス・メンテン式の両辺の逆数をとることにより得られる（二重逆数プロット）。(7)式の両辺の逆数をとると、(8)式になり、 $y=ax+b$ 型の直線関係から、 y 切片は $1/V_{max}$ に等しく、 x 切片は $-1/K_m$ になる。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots (8)$$

したがって、図5のLineweaver-Burkプロットから、実験で求めることができる2つのパラメーターである、 K_m と V_{max} が求まる。繰り返しになるが、現在は図4のプロットから直接、コンピュータによる非線形回帰分析で K_m と V_{max} の2つのパラメーターが算出されている。

4. 一連の酵素反応を眺めるだけで“簡単に”解ける酵素反応速度式

1節から3節までで、従来の酵素反応式の解き方を復習した。本節では、従来の教科書に載っていない“簡単に解く”ユニークな方法を紹介する。ミカエリス・メンテン式

の2つのパラメーターである K_m と V_{max} を簡単に導出する方法である。

この方法では、(i) 分母に全酵素種を集め、(ii) 分子に生成物に導く反応速度 (v) を集める。また、前述したように、酵素反応式で求まるのは K_m と V_{max} の2つのパラメーターだけなので、全ての酵素種と基質の関係を平衡定数 (1節の K_S のような解離定数) で表す。

(a) 基本形

最も単純な反応の場合は、 $E + S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P$ なので、「(i) 分母に全酵素種 (E と ES) を集め、(ii) 分子に生成物に導く反応速度 ($v=k_{+2}[ES]$) を集める」と次の(1)式のようなになる。“1節の(2)および(4)式”からも確認できる。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{+2}[ES]}{[E] + [ES]} \quad \dots (1)$$

ここで、不安定な中間体 ES を、安定な酵素 E や基質 S で置き換える。

つまり、 $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$ の平衡関係から、 $[ES] = \frac{[E][S]}{K_S}$ となり、これを(1)式に代入すると、

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{+2} \times \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S}}$$

となる。次いで、右辺の分子・分母に $\frac{K_S}{[E]}$ をかけて整理すると、基本式(2)が求まる。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_{+2}[S]}{K_S + [S]} \quad \dots (2)$$

$k_{+2}[E]_0 = V_{max}$ なので (“1節の(6)式”参照)、基本式(2)はミカエリス・メンテン式に相当する。つまり、 $v = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]}$ が簡単に導出されたことになる (白石文秀, 1997)。

(b) 競争阻害

競争阻害とは基質と阻害剤 (以下、 I) が酵素の同じ活性部位に結合する場合に起こる阻害のことで、反応機構は図6のようなになる。

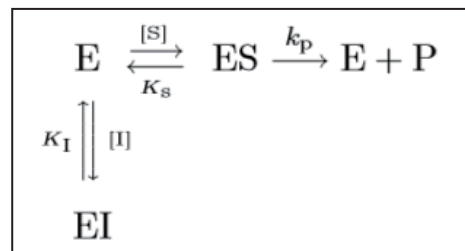


図6. 競争阻害

ここで、**E**から**ES**を形成する矢印の上に[S]を乗せているが、これは、**E+S**→**ES**のことである。同様に、阻害剤(**I**)が酵素に結合する過程、**E+I**→**EI**も**EI**に向かう矢印の横の**[I]**で示している。図6を眺めながら、本節の最初に述べたように、分子に速度、分母に酵素種を集めると、(3)式が簡単に導ける。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES] + [EI]} \dots (3)$$

ここでも、前セクション(a)と同様に、不安定な中間体(ESやEI)を、安定な**S**や**I**で置き換える。つまり、 $K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$ 、 $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$ なので、これらを(3)式に代入すると、

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][I]}{K_I}}$$

となる。

この右辺の分子・分母に $\frac{K_S}{[E]}$ をかけると、

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[S]}{K_S + [S] + \frac{K_S[I]}{K_I}}$$

が求まる。

$k_p[E]_0 = V_{max}$ なので、競争阻害の最終式(4)が、簡単に導出できたことになる。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S(1 + \frac{[I]}{K_I}) + [S]} \dots (4)$$

(4)式の両辺の逆数をとって(5)式を導き、Lineweaver-Burkプロットで解析すると、図7のようになる。

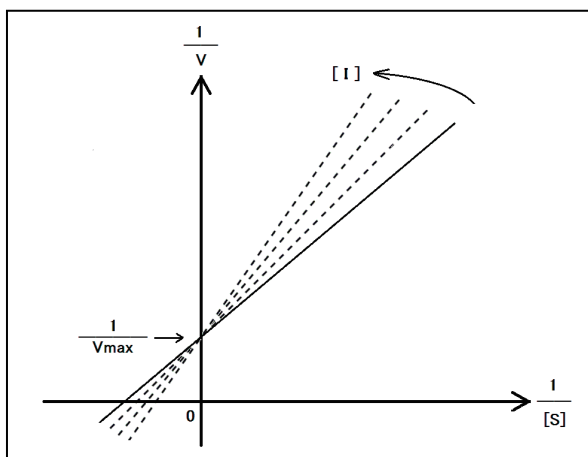


図7. 競争阻害のLineweaver-Burkプロット

(5)式から、y切片は阻害剤(**I**)の濃度を増やしても変わらず(1/V_{max}の一定値)、阻害剤の濃度**[I]**と共に傾きが増大することがわかる。これが競争阻害の特徴である。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_{max}}(1 + \frac{[I]}{K_I})\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \dots (5)$$

上の(4)式と基本的なミカエリス・メンテン式{“1節や2節の(7)式”}を比べると、上の(4)式ではミカエリス・メンテン定数(K_m)が $K_S(1+[I]/K_I)$ になることがわかる。つまり、Lineweaver-Burkプロットで、「阻害剤の濃度**[I]**と共に傾きが増大する」と、言い換えると、「見かけ上のミカエリス・メンテン定数 $K_S(1+[I]/K_I)$ が増大する」ことが理解できる。

「ミカエリス・メンテン定数は、小さいほど酵素の効率が良い」ことを思い出していただきたい。図6の阻害剤(**I**)が作用すると、阻害剤の濃度**[I]**に比例して、酵素の働きが悪くなる(見かけ上のミカエリス・メンテン定数 $K_S(1+[I]/K_I)$ が増大する)のである。

重要なのは、この手法(分母に全酵素種を集め、分子に生成物をつくる反応速度を集める手法)を用いると、連立方程式を解くよりも簡単に反応式(ミカエリス・メンテン式)を導くことができることである。

(c) 不競争阻害

前セクション(b)の競争阻害では基質と阻害剤が競争して、酵素の同じ活性中心(ポケット)に入り込もうとした。阻害剤の形が基質に似ていない場合は、酵素の同じ活性中心(ポケット)には入れず、酵素複合体の異なる部位(新たなポケット)に結合することがある。つまり、阻害剤は遊離の酵素(フリーな酵素**E**)には結合できず、酵素基質複合体(**ES**)のみに結合できる場合であり、このような阻害作用を「不競争阻害」という。

反応機構は次の図8の通りである。

阻害剤は、**E**には結合できずに**ES**のみに結合するので、**ESI**の3量体ができる。

本節(4節)で何度も強調しているように、分子に速度、分母に酵素種を集めると、「(6)式、(7)式を経て」、簡単に(8)式が導ける。

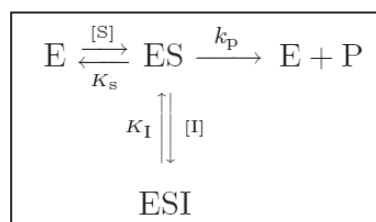


図8. 不競争阻害

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES] + [ESI]} \quad \dots (6)$$

(6)に $[ES] = \frac{[E][S]}{K_S}$ と $[ESI] = \frac{[E][S][I]}{K_S K_I}$ を代入して、

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p \frac{[E][S]}{K_S}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_S} + \frac{[E][S][I]}{K_S K_I}} \quad \dots (7)$$

全ての項に $[E]$ が含まれていることに注目して、ミカエリス・メンテン式の形にするために、右辺に $\frac{K_S}{[E]}$ をかけて整理すると、最終的な (8) 式になる。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[S]}{K_S + [S] + \frac{[S][I]}{K_I}}$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S](1 + \frac{[I]}{K_I})} \quad \dots (8)$$

本節の (a)～(c) を通して、1 節と 2 節で説明した従来の“連立方程式”を解く一般的な方法よりも、簡単に反応式を導けることに気付いてもらえたと思う。

この方法でいくつかの反応機構に対する酵素反応式を導くと、反応機構を眺めるだけで酵素反応式が導出できるようになる。例えば (7) 式で少し触れたように、最終式の右辺の (i) 全ての項に酵素 $[E]$ が含まれるようになること、さらに、(ii) それぞれの酵素種の最終的な項では、酵素に結合した基質 $[S]$ や阻害剤 $[I]$ の濃度積が分子にきて、その解離定数が分母にくること、に気付くことがミソである。

すると、反応機構を眺めて、(キーポイント①) 酵素 $[E]$ に相当するところに数字「1」を置き、(キーポイント②) それぞれの酵素種には「結合した基質 $[S]$ や阻害剤 $[I]$ を分子に、また、その解離定数を分母に置く」だけで酵素反応式が導ける。なお、 $V_{max} = k_p[E]_0$ であることにも注意していただきたい。具体的には、図8を眺めて、上述のキーポイント①と②に従うと、(7)式の代わりに直接 (9)式が書ける。(9)式から最終的な (8)式を導くのはワンステップである。

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[S][I]}{K_S K_I}} \quad \dots (9)$$

図8の反応機構を眺めて、直接 (9)式を書き、すぐに最終的な (8)式を導く方法が、筆者らがバイオ系の読者に教示したい手法である。ただし、慣れるまでは、図8の反応

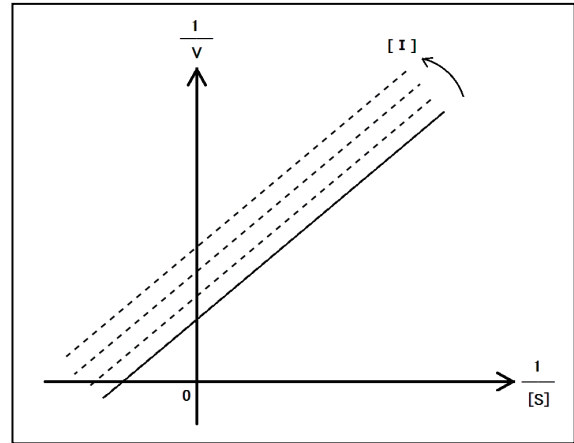


図9. 不競争阻害のLineweaver-Burkプロット

機構を眺めて、まず (6) 式を書き、そこから (9) 式、次いで (8) 式を導出する方が無難かもしれない。

最終式 (8) が求まったので、この両辺の逆数をとって、Lineweaver-Burk プロットで阻害パターンを解析することができる{(10)式、図9}。(10)式から、阻害剤の濃度 $[I]$ とともに、y切片は増大するが $(1/v)$ の増加、“傾き (K_S/V_{max}) ” は一定であることがわかる (K_S は図5のミカエリス・メンテン定数 K_m に対応する)。図9の平行線を描くパターンが不競争阻害の特徴である。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \quad \dots (10)$$

この傾き (K_S/V_{max}) が一定の平行線を描く理由は、阻害剤が遊離の酵素 E の“基質用ポケット”に入らないので(基質と競争しないので)、③節で説明した「基質のポケットへの入り易さ(ミカエリス・メンテン定数 K_m 、ここでは K_S)」が阻害剤 $[I]$ の影響を受けないからである。一方、阻害剤は活性種 ES に作用するので(阻害剤が増すにつれ、 ES が減るので)、阻害剤の濃度が高くなるに従い“見かけの最大速度”が落ちる(最大速度の逆数である $1/v$ が増加する)のである。

一般的には、最終的なミカエリス・メンテン式において、(a) 阻害剤の効果がミカエリス・メンテン定数 K_m (または K_S) の項に係る場合{(4)式}は、“傾き”に影響が出、(b) 基質 S の項に係る場合{(8)式}は、“速度”に影響が出る。つまり、阻害剤は、遊離の酵素に作用してポケットへの基質の侵入を妨げたり{(4)式}、活性種 ES に作用して反応を妨げたり{(8)式}するのである{(11)式参照)。次のセクション (d) で紹介するように、両者に同時に作用することもある。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S(\text{阻害剤効果}) + [S](\text{阻害剤効果})} \quad \dots (11)$$

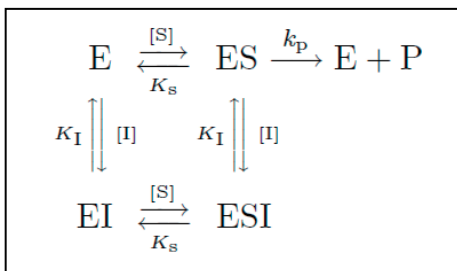


図10. 非競争阻害

(d) 非競争阻害

基質と阻害剤が酵素の異なる部位にそれぞれ結合し、両者が互いに他の結合に影響を及ぼさない場合を非競争阻害という。反応機構は図10のように表わす。

この反応機構を眺めて、3段階で反応速度式を完結させよう。前セクション(c)の簡略法(キーポイント①と②)を思い出して、(13)式から始めて2段階で完結させてもよい。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]} \quad \dots (12)$$

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S][I]}{K_S K_I}} \quad \dots (13)$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{[S]}{K_S + [S] + \frac{K_S}{K_I}[I] + \frac{[S]}{K_I}[I]} \\
 v &= \frac{V_{max}[S]}{\underbrace{K_S(1 + \frac{[I]}{K_I})}_{K_m} + [S](1 + \frac{[I]}{K_I})} \quad \dots (14)
 \end{aligned}$$

ここで、“見かけ上の”ミカエリス・メンテン定数 (K_m) が $K_S(1 + \frac{[I]}{K_I})$ になることに気づいていただきたい。簡単に求めたミカエリス・メンテン式(14)を用いて、前セクション(c)の(11)式で説明したことを復習しておく。この(14)式では、阻害剤の効果がミカエリス・メンテン定数の項と基質Sの項の両者に係っているため、“傾き”と“速度(タテ軸)”の両方に影響がでることがわかる。

いつものように、最終式(14)の逆数をとって(式15)、Lineweaver-Burkプロットで確かめてみよう(図11)。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_{max}}(1 + \frac{[I]}{K_I}) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}(1 + \frac{[I]}{K_I}) \quad \dots (15)$$

阻害剤が遊離の酵素Eと活性種ESの両者に作用するので、(5)式で見られた“傾き”の増大と、(10)式で見られた

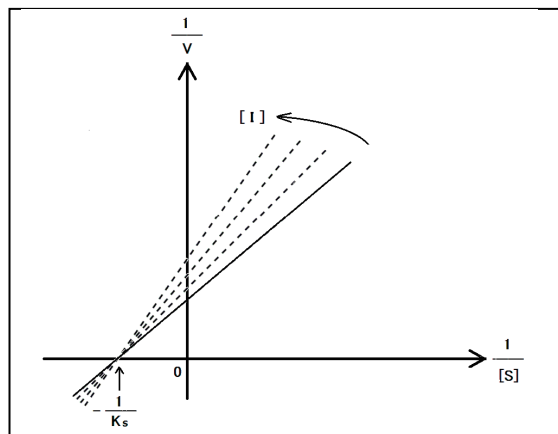


図11. 非競争阻害のLineweaver-Burkプロット

“y切片”の増大の、両方の効果がLineweaver-Burkプロットで観察される。つまり、この阻害剤はポケットへの基質の侵入を妨げるとともに、活性種ESを抑制するので反応速度も落とすのである。

なお、“見かけ上”のミカエリス・メンテン定数 K_m は、 $K_S(1 + \frac{[I]}{K_I})$ となるので阻害剤の濃度上昇とともに(図7と同様に)“傾き”が大きくなるものの、x切片は $-1/K_S$ なので一定値(基質の解離定数で決まる値)を示し、固定される(タテ軸 $1/v=0$ を(15)式に代入して確かめていただきたい)。

(e) 続・非競争阻害

基質と阻害剤が酵素の異なる部位に結合し、両者が互いに他の結合に影響を及ぼさない場合(図10)の非競争阻害について議論してきた。このセクションでは、両者が互いに他の結合に影響を及ぼす場合でも反応式が簡単に導出できることを示す。反応機構は図12のようになり、影響の度合いをアルファ(α)で表す。なお、遊離の酵素EからESI三量体を形成する際に、ESを経由しても、EIを経由しても、全エネルギー(解離定数の積)は同じでないといけなないので、アルファ(α)は図12のように両経路の解離定数につく。

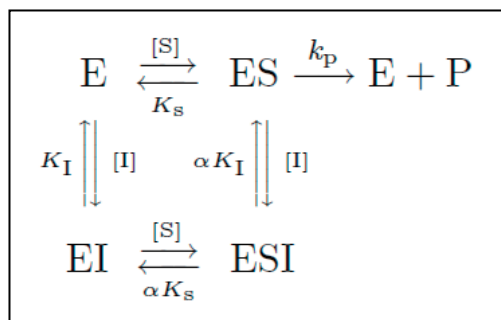


図12. より一般的な非競争阻害

すると、簡略法により、最終式(14')が求まり、二重逆数にした(15')式に基づくLineweaver-Burkプロットも図11と同じ形になることが分かる。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]} \quad \dots (12')$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S][I]}{\alpha K_S K_I}} \quad \dots (13')$$

$$= \frac{[S]}{K_S + [S] + \frac{K_S}{K_I}[I] + \frac{[S]}{\alpha K_I}[I]}$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_S(1 + \frac{[I]}{K_I}) + [S](1 + \frac{[I]}{\alpha K_I})} \quad \dots (14')$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_{\max}}(1 + \frac{[I]}{K_I}) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}(1 + \frac{[I]}{\alpha K_I}) \quad \dots (15')$$

(f) 複雑な酵素反応式

最後に、T大生が解けなかった複雑な酵素反応式を眺めてみる。従来の手法では授業時間内には誰も解けなかったが、これまで述べてきた“眺めて解く”簡略法を教えたところ、ほぼ全員が10~15分程度で解けるようになった。

ここでとりあげる反応機構は図13のように複雑なものである。

ここで注目すべきは、(16)式の分子が3項あること、つまり、生成物に導く活性種が3種類あることである。I(例えば、阻害剤)の存在下でもA(例えば、活性化剤)の存在下でも生成物ができると仮定されているからである。

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES] + bk_p[EAS] + ak_p[EIS]}{[E] + [EA] + [EI] + [ES] + [EAS] + [EIS]} \quad \dots (16)$$

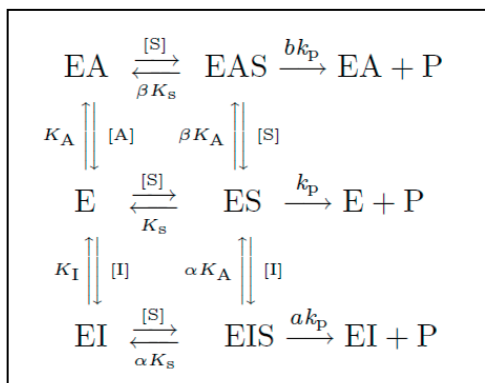


図13. 複雑な酵素反応

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_S} + \frac{b[A][S]}{\beta K_A K_S} + \frac{a[I][S]}{\alpha K_I K_S}}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[A][S]}{\beta K_A K_S} + \frac{[I][S]}{\alpha K_I K_S}} \quad \dots (17)$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\frac{[S]}{K_S}(1 + \frac{b[A]}{\beta K_A} + \frac{a[I]}{\alpha K_I})}{(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[I]}{K_I}) + \frac{[S]}{K_S}(1 + \frac{[A]}{\beta K_A} + \frac{[I]}{\alpha K_I})} \\
 &= \frac{[S]}{K_S(1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[I]}{K_I}) + \frac{[S](1 + \frac{[A]}{\beta K_A} + \frac{[I]}{\alpha K_I})}{(1 + \frac{b[A]}{\beta K_A} + \frac{a[I]}{\alpha K_I}) + (1 + \frac{b[A]}{\beta K_A} + \frac{a[I]}{\alpha K_I})}} \quad \dots (18)
 \end{aligned}$$

(18)式から明らかに、速度式が

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_S(Const) + [S](Const)}$$

の形になるので、Lineweaver-Burkプロットは図11と同じになる。

結論

4節で説明した簡略法を習得すると、図13のように“一見複雑”な反応機構であっても、10分程度の時間で酵素反応式が解ける。是非、バイオ系の研究者・学生にはこの手法を利用していただきたい。

文献

小宮山 真・八代盛夫(1996): 生命化学I:天然酵素と人工酵素. 丸善, 東京.
 白石文秀(1997): 固定化酵素反応のコンピュータ解析法 - 反応速度論から反応器設計法まで -. コロナ社, 東京.

参考資料

ウィキペディア「ミカエリス・メンテン式」:
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%9F%E3%82%AB%E3%82%A8%E3%83%AA%E3%82%B9%E3%83%BB%E3%83%A1%E3%83%B3%E3%83%86%E3%83%B3%E5%BC%8F> (2012年4月15日検索)

Practical Enzyme Kinetics Based on Visualization of Reaction Schemes

Kazunari TAIRA^{*1}, Yasuhiro FUTAMURA^{*2} and Takashi KATO^{*2}

^{*1} School of Psychology, Tokyo University of Social Welfare (Oji Campus),
2-1-11 Horifune, Kita-ku, Tokyo 114-0004, Japan

^{*2} School of Education, Tokyo University of Social Welfare (Ikebukuro Campus),
2-47-8 Minami-ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-0022, Japan

Abstract : Cells contain extraordinarily efficient catalysts known as “enzymes”, which can accelerate chemical reactions by factors ranging from 10^{12} to 10^{15} , or even more. In this article, we review various enzyme-catalyzed reactions and at first solve enzyme kinetics by conventional methods that are described in any textbooks, including Wikipedia. However, it is not easy to solve complicated enzymatic reactions, such as the one described in Figure 13, by the conventional method. We thus report here a unique method that enables one to solve complicated enzymatic reactions by merely “visualizing the reaction scheme”.

(Reprint request should be sent to Kazunari Taira)

Key words : Enzymatic reactions, Enzyme kinetics, Steady-state, Rapid equilibrium