

## 酵素反応における反応速度解析と動力学定数の算出

### [概説と予習]

#### 1. 目的

デンプンのグルコアミラーゼによる糖化反応実験を通して、酵素反応における反応の速度論について理解する。

#### 2. 酵素反応

##### 2-1. 酵素反応の特徴

生命維持のために生体中では様々な生化学反応が起きているが、そのほとんどは生体触媒として機能するタンパク質により媒介される。この生体触媒として機能するタンパク質のことを酵素という。酵素は化学触媒と異なるいくつかの特徴をもつ。

##### 1. 酵素反応は穏やかな条件下で進む

酵素反応が起こる条件は多くの場合 100°C以下、大気圧、ほぼ中性の pH であるのに対し化学触媒の場合は高温、高圧、極端な pH がふつうである。

##### 2. 特異性が高い

##### 2-2. 酵素反応の基質特異性

基質が酵素に非共有的に結合する力はタンパク質のコンホメーションを支配する力と同じで、van der Waals 力、静電力、水素結合、疎水作用などである。一般に酵素の基質結合部位は分子表面のへこみまたは割れ目にあり、基質に相補的な形をしている。そして結合部位にあるアミノ酸残基は基質と特異的に引き合う (図 1) ようになっている。基質分子と異なる型または官能基を持つ分子はうまく結合できない。

酵素は結合、反応いずれもキラルな基質の一方にだけ作用する。この立体特異性は酵素自身がかつともキラルで (タンパク質は L-アミノ酸でできている) 活性部位も不斉だからである。たとえばトリプシンは L-アミノ酸のポリペプチドを加水分解するが D-アミノ酸のポリペプチドには作用しない。またグルコース代謝に関与する酵素は D-グルコースにしか働かない。

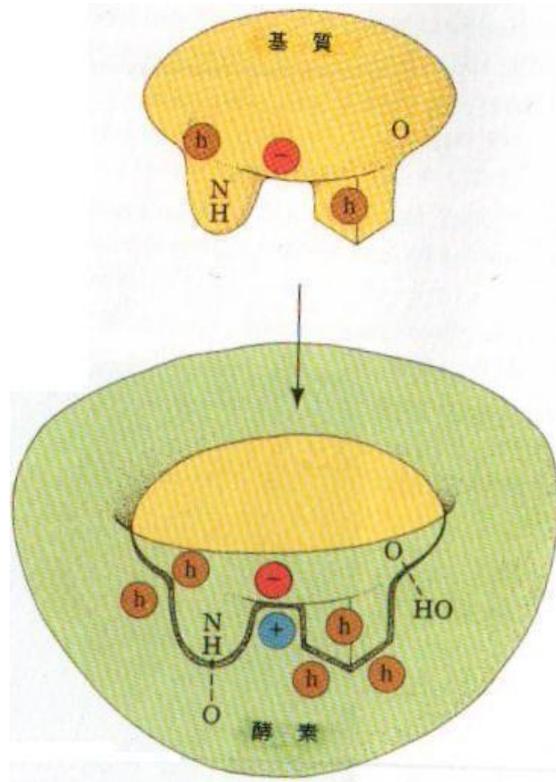
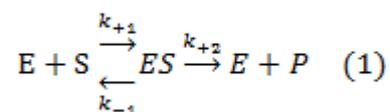


図1 酵素の基質結合部位。結合部位は形も物理的性質も基質に相補的。疎水的な基は茶色のhで、水素結合は点線で示す

### 2-3. 酵素反応速度論

基質 S と酵素 E が反応し、生成物 P を生ずるような酵素反応における反応速度を考える。まず基質 S は酵素 E と共有結合によらない酵素-基質複合体 ES (ES 複合体) という活性な反応中間体を形成する。このとき基質が結合する酵素の部位を触媒部位と呼ぶ。触媒部位に結合した基質は酵素による作用を受ける前に遊離するか、または酵素の作用を受けて生成物 P となって遊離する。生成物 P を生じるような反応後、酵素は変化せずに再び系の中に戻る。このような反応において、基質と酵素が結合して ES 複合体を形成する時の反応速度定数を  $k_{+1}$ , ES 複合体から基質が酵素の作用を受けずに遊離する時の反応速度定数を  $k_{-1}$ , ES 複合体から生成物が生成する時の反応速度定数を  $k_{+2}$  とする。



反応開始後 ES 複合体の濃度が速やかに定常状態になると仮定する。すなわち

ES 複合体の濃度は時間によって変化しない。E, S, ES に対するそれぞれのモル濃度をそれぞれ  $e, S, c$  とすると

$$\frac{d(eS)}{dt} = k_{+1}eS - (k_{-1} + k_{+2})c = 0 \quad (2)$$

(2)式より

$$\frac{eS}{c} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_m \quad (3)$$

ここで  $K_m$  は ES 複合体の解離定数で、ES 複合体の E と S への解離のしやすさ(結合の困難さ)の程度を表す。

生成物の生成速度  $v$  [ $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ] は ES の濃度に比例するから

$$v = k_{+2}c \quad (4)$$

反応液中に存在する酵素の全濃度  $e_0$  は一定であるから

$$e_0 = e + c \quad (5)$$

(3)式と、(5)式より

$$c = \frac{e_0 S}{K_m + S} \quad (6)$$

(6)式を(4)式に代入すると

$$v = \frac{k_{+2} e_0 S}{K_m + S} = \frac{V_m S}{K_m + S} \quad (7)$$

ここで  $V_m = k_{+2} e_0$  である。この  $V_m$  を最大反応速度と呼ぶ。(7)式は Michaelis-Menten (ミカエリス-メンテン) 式といい、 $K_m$  をミカエリス定数と呼ぶ。

## 2-4. 酵素活性

一定条件下で 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の基質を変化させる酵素量を 1 酵素単位とし、1 U (unit) と表す。また 1 秒間に基質 1 g を変化させる酵素量として 1 katal (kat) と表すこともある。

単位時間内に 1 分子の酵素によって触媒しうる基質の最大分子数をターンオーバー数(turnover number)といい、一般に  $10^3 \sim 10^6 \text{ mol-基質} \cdot \text{mol-酵素}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  程度の値をとる。

## 3. 吸光光度分析

本実験ではデンプンのグルコアミラーゼによる分解によって生じたグルコースの濃度を、市販のグルコース定量キット、グルコース CII テストワコーにより測定する。同キットを用いることでグルコースを含む溶液は赤色に着色する。そこで同キットを用いた後の溶液の吸光度を測定することでグルコース濃度を求める。

試料溶液の色の濃さを標準溶液のそれと肉眼で比較して目的成分の量を決定する比色法は古くからおこなわれてきた。今日では光電管によって着色溶液からの透過光の強さを光電流として読み取る光電光度法が用いられる。またフィルターやプリズムを用いて狭い波長範囲の光束を取り出すことにより、感度が向上する一方、利用される光の波長領域も近紫外部から近赤外部にまで及ぶようになった。

### 3-1. Lambert-Beer (ランバート・ベール) の法則

#### 3-1-1. Lambert の法則 (溶液中の光路長と光吸収との関係)

図3のように、濃度  $c$  の呈色溶液を液層の長さ  $b$  の容器 (吸収セル) に入れ、これを光が透過した時に吸収が起こったとし、入射光束の強さを  $I_0$ 、透過した後、すなわち透過光束の大きさを  $I$  とする。

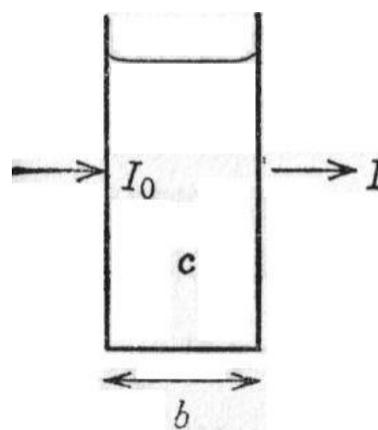


図2 光の吸収

液層  $b$  を同じ長さの仮想的な薄い層に分けて考えると、溶液が均一であるならば光が透過した時各層は同じ割合だけ光を吸収する。言い換えれば同じ割合だけ光の強さを減じると考えることができる。たとえば、第1の層が入射光の  $1/2$  だけ吸収したとすれば、透過後ははじめの光の強さの  $1/2$

となり、第2層ではさらにその  $1/2$  を吸収、すなわち第2の層を透過後は、はじめの光の強さの  $1/4$  になる。以下同様にして第3、第4、…の層を透過後は  $1/8$ 、 $1/16$ 、…となる。これをグラフに描けば指数曲線となり、 $I = I_0 e^{-k_1 b}$  または  $-\ln(I/I_0) = k_1 b$  で表すことができる。常用対数に直せば、

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = k_1 b \quad (1)$$

となる。すなわち、透過光の強さは溶液中の光路長の長さが増加するにつれて指数関数的に減少する。

#### 3-1-2. Beer の法則 (溶液濃度と光吸収との関係)

図3において媒質が均一ならば光束の単位断面積については溶質分子の数  $n$  は液層の長さ  $b$  に比例するから式(1)は  $-\log(I/I_0) = k_2 n$  と書くことができる。また  $b$  が一定の時には、分子間に相互作用の生じない程度の希薄溶液では  $n$  は溶液の濃度  $c$  に比例するから、

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = k_2 c \quad (2)$$

となる。すなわち、透過光の強さは溶液濃度が増加するにつれて指数関数的に減少する。

### 3-1-3. Lambert-Beer の法則

Lambert と Beer の法則は、 $-\log(I/I_0)$ が溶液中の光路長の長さ  $b$  にも、溶液濃度  $c$  にも比例することを示している。したがって $-\log(I/I_0)$ は、それらの積  $bc$  にも比例し、 $-\log(I/I_0) = kbc$  と書くこともできる。ここで  $k$  は比例定数で吸光係数と呼ばれる。  $c$  を mol/L で表した時には  $k$  の代わりに特に  $\epsilon$  を用い、モル吸光係数と呼ぶ。また  $I/I_0$  を透過度といい  $T$  で表し、これを%で表した時には透過率といい  $T\%$  と書く。さらに $-\log(I/I_0)$ を吸光度と呼び  $A$  で表す。したがって式 (2) は

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = kbc = \epsilon bc_{\text{mol/L}}$$

のようになる。

### 3-2. 吸光光度分析に用いられる測定装置

図4に本実験で使用する分光光度計を示す。分光光度計を用いた吸収測定では、毎回試料と、吸光度の基準となる参照について測定しこれらの測定結果を比較する。この時測定をおこなうところが一つしかないものをシングルビーム方式(図4)といい、測定波長を変えるごとに試料と参照を入れ替えて0補正を行う必要がある。シングルビーム方式では小形で安価な装置構成が可能だが、光源の変動を補正することができない。また、測定をおこなう場所が試料専用と参照専用の2つあるものをダブルビーム方式(図5)という。参照側のエネルギーも検知器に入射しているため光源の変動を補正することができ、長時間安定した測定ができる。本実験で用いる装置はシングルビーム方式である。



図3 分光光度計

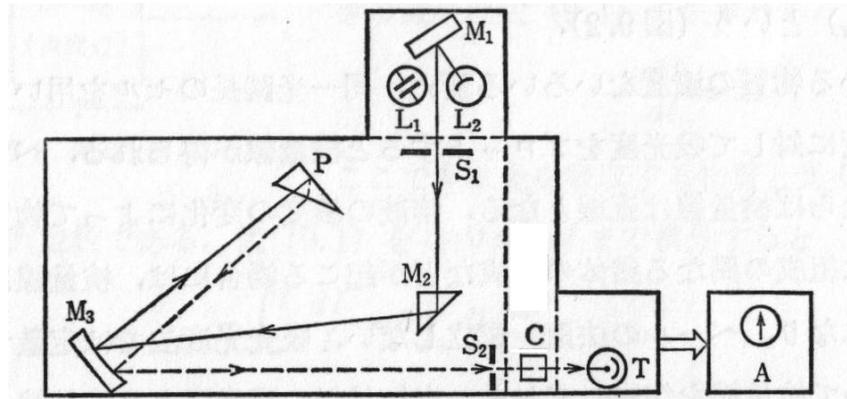


図4 シングルビーム方式の装置構成

$L_1, L_2$  : 紫外および可視光源、 $S_1, S_2$  : 入射および出射スリット、 $M_1 \sim M_3$  : 反射鏡、 $C$  : 試料室、 $P$  : 分光器  
 $T$  : 受光部、 $A$  : 増幅器およびメーター

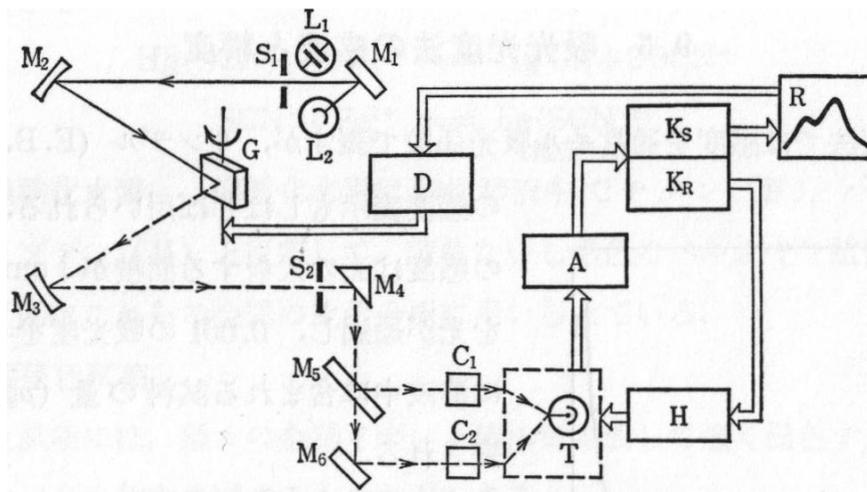


図5 ダブルビーム方式の装置構成

$L_1, L_2$  : 紫外および可視光源、 $S_1, S_2$  : 入射および出射スリット、  
 $M_1 \sim M_4$  : ミラー、 $M_5$  : 回転ミラー、 $C_1, C_2$  : 対照側および試料側セル、 $T$  : 受光部、 $A$  : 増幅器、 $K_R, K_S$  : 対照側および試料側信号分離回路、 $R$  : 記録計、 $D$  : モーター、 $H$  : 高圧コントロール回路

分光光度計の構造はつぎのような4つの部分の組み合わせから成っている。

### 1) 光源

可視部を中心に、近紫外部、近赤外部(波長範囲 330~1000 nm)にわたって連続スペクトルを与えるもっとも一般的な光源はタングステンフィラメントの白色ランプであり、また紫外部測定用の連続スペクトル光源としては水素放電管が使用され、

200～500 nm の波長域測定に適する。本実験で使用する分光光度計も同様である。

## 2) 分光装置(モノクロメーター)

フィルターまたはプリズムとスリットのいずれかを用いて、なるべく単色光に近い光束を取り出す。このうち単色の 1 枚のフィルターを通過した光の波長範囲は 30～50 nm の幅を持つので、精密な吸収スペクトルの作製などの目的には使用できないが、通常の比色定量の目的には大体間に合う。プリズムは光の分解能がよく、単色光に近い光束が得られるという特徴がある。ガラスプリズムは可視部および近紫外部に適し、水晶プリズムは紫外部、可視部および近紫外部にわたって使用することができる。また赤外吸収用には岩塩の単結晶などが使われる。

## 3) 試料容器(セルまたはキュベット)

測定すべき試料を入れる透明な容器。試験管が用いられることもあるが、精密な測定をおこなうには角形の容器が使用される。可視部用にはガラス製のものがよいが、紫外部用には石英製のものが必要である。いずれも、材料は光学的に均質で、光路に当たる面は平行でなければならない。貼り合わせは溶接によるものが標準であるが、有機接着剤で張り合わせたものもある。このようなものは、酸、アルカリ、酸化剤、有機溶媒などによって侵されて破損しやすいことからなるべく使用しない方がよい。セルは加熱や衝撃に対して弱い上に、高価なものであるから、その取扱いには細心の注意が必要である。

セルを洗浄するには、濃硝酸、塩酸などに浸して水洗する。また清潔なキムワイプの小片を多数用意しておいて光路に当たる外側はこれで拭くとよい。特に紫外部測定の際は、手の油のような肉眼には見えないよごれも光の吸収を示し良いので十分注意することが必要である。このようなおそれのある時は純エタノールで拭くとよい。

## 4) 受光部

セルを通過した光束を受けて、その強度を測定する装置の部分である。光電管による光電流は吸光光度法に用いる程度の強さの光では比較的微弱であるが、疲労が少ない。最近では光電子増倍管が出現したので、極めて弱い光も正確に数十万倍に増幅して測定できるようになった。なお赤外分光光度計の受光部としては、熱電対やボロメーターなどが使用されている。

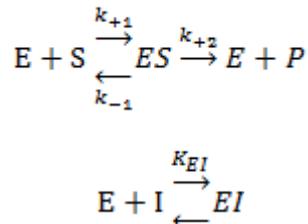
### [前試問]

1. Lambert-Beer の法則について説明せよ。
2. 酵素分子と可逆的に結合することで反応速度を低下させる可逆的阻害剤が存在する場合の反応速度は Michaeli-Menten 式と同様に

$$v = \frac{V_p S}{K_p + S}$$

と表すことができる。この時、拮抗型と呼ばれる様式によって阻害が起こるとしたときの  $V_p$ 、 $K_p$  をそれぞれ  $V_m$ 、 $K_m$ 、 $k_{+2}$ 、 $e_0$ 、 $i$  (阻害剤の濃度) および阻害剤と酵素間の解離定数  $K_{EI}$  を用いて表せ。

拮抗型の阻害では、阻害剤が酵素と結合する部位と基質が酵素と結合する部位が同じである。基質と阻害剤は酵素の結合する部位について競争関係にある。阻害剤が酵素に結合すると ES 複合体は形成されない。



3. Lineweaver-Burk プロットについて説明せよ。

4. 本実験におけるグルコース濃度測定で利用されている酵素反応の式を示せ。

[実験]

### 1. 実験概要

グルコアミラーゼはデンプンを構成する糖鎖の非還元末端において 1,4- $\alpha$  結合を加水分解し、グルコースを生産する酵素である。本実験では基質であるデンプンと酵素であるグルコアミラーゼの反応で生成するグルコースの濃度を経時的に測定することで酵素反応速度を求める。

### 2. 方法

#### 2. 1 溶液調整

##### ・グルコース標準溶液

予め用意されている 100 mg / L グルコース水溶液をメスフラスコ中にて蒸留水と混合、希釈し、0, 10, 30, 50 mg / L の溶液を各 50 mL 調整する。

##### ・0.1 M 酢酸緩衝溶液 (pH 5.5)

0.1M 酢酸水溶液および 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液を調整後、0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液に 0.1M 酢酸水溶液を少しずつ加えながら pH を 5.5 に合わせることで調整する。実験では予め調整済みのものを用いる。

・酵素溶液

酵素はグルコアミラーゼ（和光純薬）を用いる。

予め用意されている 1.0 mg / mL の濃度の溶液を用いる。

・可溶性デンプン溶液

可溶性でんぷん（和光純薬）を蒸留水に入れ、加熱しつつ攪拌して完全に溶解し、さらにメスフラスコを用いてメスアップすることで 1.0% (wt / vol) の溶液を調整する。さらに調整した 1.0% の溶液を蒸留水で適宜希釈し、0.05, 0.01, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80% (wt / vol) の溶液を調整する。

実験では予め用意されている溶液を使用する。

## 2. 2 グルコアミラーゼ活性の測定

- 1) 濃度の異なる 7 つの可溶性デンプン溶液 0.5 mL にそれぞれ 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1.0 mL を混合し、予めウォーターバス中にて 40°C に加温する。酵素溶液 50  $\mu$ L を可溶性デンプン溶液と 0.1M 酢酸緩衝液の混合液に添加後ウォーターバス中にて 40°C で反応させる。
- 2) 5 分後にサンプル回収し、沸騰湯浴中で 5 分間置いて酵素を失活させた後、ヒートブロック上で 37°C に保温する。
- 3) CII テストワコー（和光純薬）を用いてグルコース濃度を測定する。発色試薬 3 mL と試料 0.02 mL を試験管中で良く混合し、37°C で 5 分間加温後、波長 505 nm における吸光度を測定する。このとき試料を添加しない発色試薬 3 mL の吸光度についても測定し、ブランクとして差し引く。

### [後試問]

1. 横軸にグルコース濃度、縦軸に吸光度  $ABS_{505}$  をプロットして検量線を作成する (グラフ 1)。また得られた検量線をもとに、吸光度からグルコース濃度を算出するための式を求めよ。
2. 横軸に基質濃度、縦軸にグルコース生産濃度のグラフを描く (グラフ 2)。また各基質濃度におけるグルコース生産速度を算出せよ。
3. 得られた結果を基に Lineweaver-Burk プロットをおこないミカエリス定数および最大速度を求めよ。
4. この酵素反応の活性化エネルギーが 80 kJ/mol としたときに温度が 10°C 上昇すると反応速度は何倍になるか求めよ。