

酵素反応速度論

1. 酵素反応速度論的解析で明らかになること

- ・ 反応の生理的な意味づけ
- ・ 基質の種類や阻害剤などの影響
- ・ 酵素反応の触媒機構
- ・ 代謝経路における酵素の役割
- ・ 酵素や基質の定量手段

2. 反応の表現方法



酵素 (Enzyme)

- ・ 生体内における化学反応の触媒。
- ・ 酵素は活性化エネルギーを下げるにより、反応速度を高めている。

基質 (Substrate)

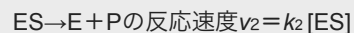
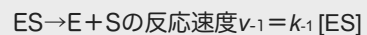
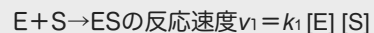
- ・ 酵素によって化学反応を触媒される物質のこと。

反応産物 (Product)

- ・ 酵素反応の結果、基質からできたもの。

反応速度 (v_1 、 v_{-1} 、 v_2)、反応速度定数 (k_1 、 k_{-1} 、 k_2)

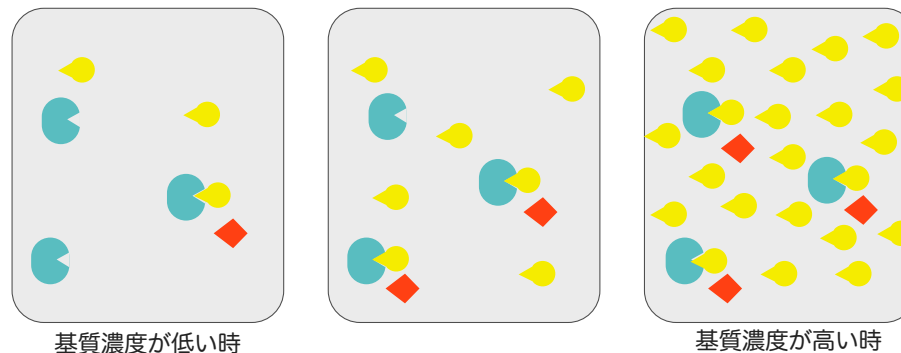
- ・ 酵素の濃度を[E]、基質の濃度を[S]、酵素-基質複合体の濃度を[ES]、反応産物の濃度を[P]と書く。
- ・ 反応速度とは単位時間当たりの濃度変化である。
- ・ 一般に、反応速度 v は基質の濃度に比例する。



ここで、 k_1 、 k_{-1} 、 k_2 はそれぞれ反応速度 v_1 、 v_{-1} 、 v_2 の速度定数である。

3. 酵素反応速度論

酵素の反応速度と基質濃度の関係

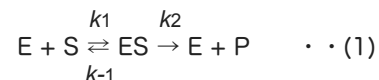
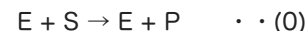


酵素は繰り返し反応できるため、時間が経過すれば基質濃度が減る。

基質濃度が充分高い時 = 酵素がフル稼働 = 定常状態 ([ES]が一定)

ミカエリス・メンテンによる酵素反応の取扱い法

酵素反応は、二つの素反応に分けられる



但し、E：酵素、S：基質、ES：酵素-基質複合体、P：生成物

k_1 、 k_{-1} 、 k_2 はそれぞれの反応速度の速度定数。

酵素は触媒であり濃度は不変である。反応系の酵素の総濃度を $[E_t]$ と書くとき、



以下の2つの仮定の下、酵素反応速度論的な解析を行なう。

平衡の仮定

酵素反応の第一段階は $k_1 \gg k_2$ で平衡に達する。すなわち、 k_2 が律速段階となる。従って、反応速度 v は



[S]が高値をとり1段目の平衡が右に傾くと、基質濃度は反応速度に影響しなくなる。
(反応速度は基質濃度に対して飽和性を示し、0次反応となる)

定常状態の仮定

酵素-基質複合体の濃度が一定となる。

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \dots (4)$$

酵素反応を三段階に分ける

- ・ EがSと結合しESが出来る
- ・ [ES]が一定（定常状態）
- ・ [ES]が減少し反応速度が低下

反応初速度

定常状態の反応速度を、反応初速度という。

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \dots (5)$$

ミカエリス・メンテンの式を導く

定常状態の仮定より

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_2 + k_{-1})[ES] = 0 \quad \dots (6)$$

酵素の濃度は（酵素の総濃度[E]_tとする）

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

(6)、(2)を変形し、[E]を消去する。

$$[E] = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \frac{[ES]}{[S]} = [E]_t - [ES] \quad \dots (7)$$

[ES]について解く。

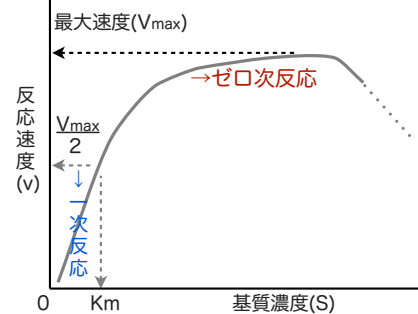
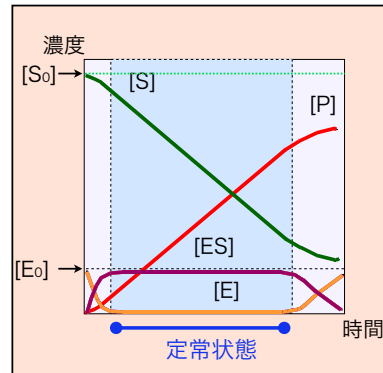
$$[ES] = \frac{[E]_t}{1 + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \frac{1}{[S]}} \quad \dots (8)$$

K_m（ミカエリス定数）を次のように定める。

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \dots (9)$$

式(5)、(8)、(9)から、反応初速度、基質濃度、ミカエリス定数の関係が求まる。

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_t}{1 + K_m \frac{1}{[S]}} \quad \dots (10)$$



式(10)において、[E]_tは酵素濃度の取り得る最大値であることから、分子(k₂[E]_t)は最大反応速度(V_{max})となる。

$$v = \frac{V_{max}}{1 + K_m \frac{1}{[S]}} \quad \dots (11)$$

酵素反応の速度は酵素の初濃度と基質の濃度に依存する。

整理するとミカエリス・メンテンの式となる。

$$v = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad \dots (12)$$

ミカエリス定数の意義

- ・ ミカエリス定数の次元は濃度である。
- ・ 酵素反応速度が最大反応速度の半分となる時の基質濃度に一致する。
- ・ k₁ >> k₂ のとき、K_m値は解離定数(K_s)に等しく、酵素と基質の親和性を表す。

ミカエリス定数の測定法

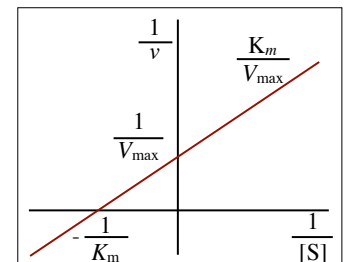
- ・ 基質濃度を変化させて酵素反応速度を測定する。
- ・ 基質濃度と反応速度の関係をグラフにする。

Lineweaver-Burk（ラインウィーバー・バーク）の式

基質濃度[S]と反応速度vの関係をわかりやすくするため、ミカエリス・メンテンの式(12)の逆数を取る。

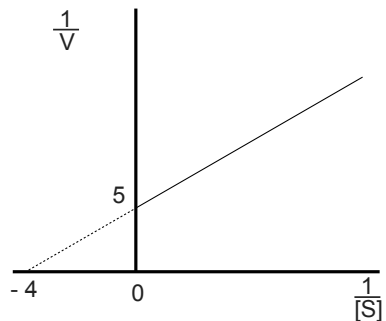
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \dots (13)$$

- ・ 1/vと1/[S]が一次関数（Y = aX + bの形）
- ・ 傾きがK_m/V_{max}、Y切片が1/V_{max}、X切片が-1/K_m
- ・ 直線と座標軸の交点としてK_mとV_{max}を決定することが出来る。



課題

1. 酵素反応における基質とは何か。説明せよ。
2. ミカエリス・メンテンの式を書け。
3. ミカエリス定数 K_m が小さい時は、酵素と基質の親和性はどうなるか答えよ。
4. ミカエリス・メンテンの式の逆数を取り、ラインウィーバー・バークの式を書け。
5. ある酵素反応について実験を行い、ラインウィーバー・バークの式に当てはめてグラフを描いた（ラインウィーバー・バークプロットをおこなった）。この酵素反応のミカエリス定数（ K_m ）と最大反応速度（ V_{max} ）を求めよ。



4. 阻害剤と作用機構

酵素反応阻害剤とは

酵素反応に共存し、酵素の反応速度を低下させる薬剤。

阻害剤が酵素反応に与える影響を調べることで、酵素の基質結合部位の化学構造や立体構造、触媒機構を知る手がかりとなる。

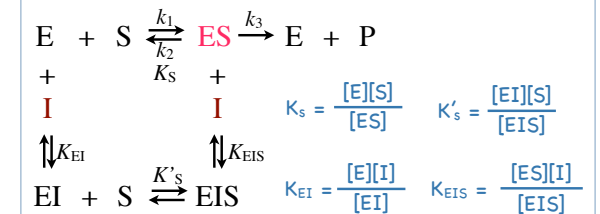
化学療法剤として広く臨床応用されている。

阻害剤の分類

不可逆的阻害：阻害作用は次第に増加。やがて完全な阻害になる。

可逆的阻害：阻害剤を除くことで活性が回復する。

- ・ 拮抗的（競合的）阻害
- ・ 非拮抗的阻害
- ・ 反拮抗的阻害
- ・ 混合型阻害



酵素反応阻害剤の反応速度論的考察

Michaelis-Mentenの理論を適用し、平衡の仮定を前提として一般式を導き出す。

平衡の仮定（ $k_3 \ll k_1$ ）より、

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_s + \frac{k_3}{k_1} \approx K_s \quad \dots (15)$$

反応速度（ v ）を $[S]$ 、 $[I]$ 、 $[E_0]$ で表現する。

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad \dots (6)$$

酵素濃度 $[E_0]$ の関係式から $[E]$ 、 $[EI]$ 、 $[EIS]$ を消去し、 $[E_0]$ と $[ES]$ の関係を導く。

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [EIS] \quad \dots (16)$$

平衡定数を変形して(16)式に代入する。

$$[E_0] = \frac{K_s[ES]}{[S]} + [ES] + \frac{K'_s[ES][I]}{[S]K_{EIS}} + \frac{[ES][I]}{K_{EIS}} \quad \dots (17) \quad [E] = \frac{K_s[ES]}{[S]} \quad [EI] = \frac{K'_s[EIS]}{[S]} \quad [EIS] = \frac{[ES][I]}{K_{EIS}}$$

$[ES]$ で式を括り、反応速度式（6）に代入する。

$$v = k_3[ES] = k_3 \frac{[E_0][S]K_{EIS}}{K_S K_{EIS} + [S]K_{EIS} + K_S[I] + [I][S]} \quad \dots (18)$$

両辺の逆数を取って変形し、一般式を得る。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_3[E_0]} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EIS}} \right) + \frac{K_S}{k_3[E_0]} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EI}} \right) \frac{1}{[S]} \quad \dots (19)$$

阻害作用の一般式が導かれる。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EIS}} \right) + \frac{K_S}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EI}} \right) \frac{1}{[S]} \quad \dots (20)$$

酵素の初濃度 $[E_0]$ 、阻害剤濃度 $[I]$ は実験条件から与えられる。

各々の平衡定数が分かれば、反応速度は基質濃度から計算できる。

阻害の一般式を元にした速度論的な考察

阻害剤が存在しないとき

$[I] = 0$ の場合、一般式はLineweaver-Burkの式そのものとなる。

グラフの傾きは $K_m/V_{\max}$ 、Y切片が $1/V_{\max}$ 、X切片が $-1/K_m$ の直線となる。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_S}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

競合型阻害剤（拮抗型阻害剤）

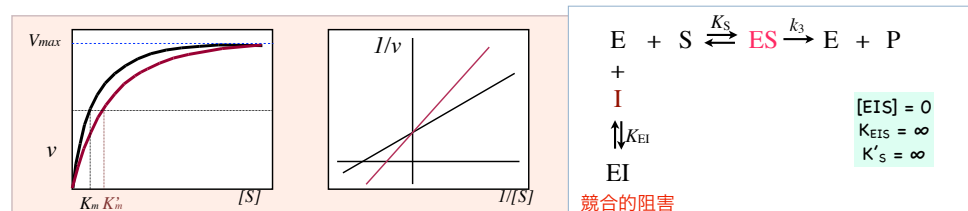
基質に似た構造を持つ阻害剤が基質と競り合って酵素の活性中心に結合する。

基質と阻害剤が同時に酵素に結合することはない。

$[EI]$ が増加する分 $[ES]$ は低下し、反応速度が低下する。

k_1 , k_2 の平衡は左に傾くため、 K_m 値は大きくなる。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_S}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EI}} \right) \frac{1}{[S]}$$



反拮抗的阻害

阻害剤は酵素基質複合体に結合しEISを作る。阻害剤が単独で酵素と結合することはない。 $([EI] = 0)$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EIS}} \right) + \frac{K_S}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

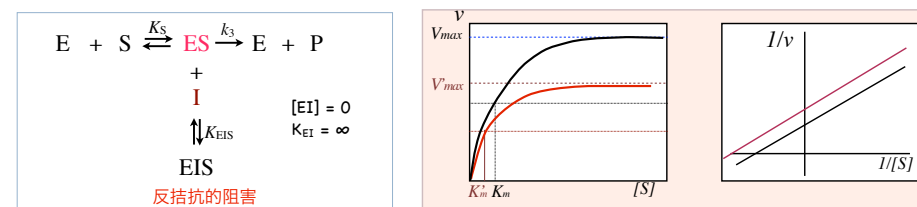
酵素基質複合体から酵素が再生するのを妨げる。

1段階目の平衡は右に移動し、 K_m 値は見かけ上小さくなる。

K_{EIS} は $V_{\max}$ を半分ににする阻害剤の濃度に一致する。

グラフの傾きは変わらないが、 K_m 、 $V_{\max}$ 双方に影響する。

基質濃度増加で阻害作用は解除されない。



非拮抗的阻害

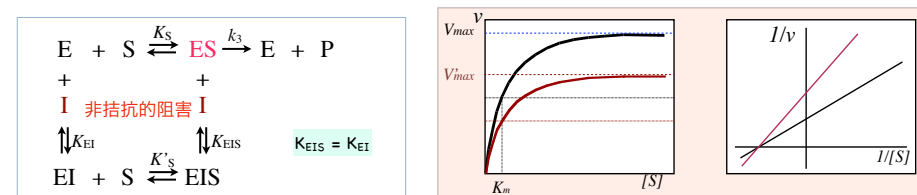
阻害剤は酵素の活性中心以外に結合し K_S の平衡に影響せずEI、EIS両方が出来る混合阻害の特殊なタイプをいう。

阻害の程度は基質濃度に関係ない。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{EI}} \right) \left(1 + \frac{K_S}{[S]} \right)$$

$V_{\max}$ のみに影響する。x切片は不変。 $(K_m$ 値は変わらない)

K_{EIS} (K_{EI})は $V_{\max}$ を半分ににする阻害剤の濃度に一致する。



混合型阻害

非拮抗阻害で、 K_{EI} と K_{EIS} が一致しない場合など、上記の要素が混在する場合である。

$V_{\max}$ は低下する。

6