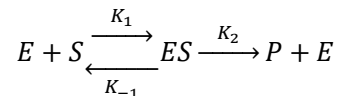


1 目的

酵素反応速度論は、20 世紀初頭に Adrian Brown による酵母インベルターゼによるスクロース(ショ糖)の加水分解の研究に始まり、Leonor Michaelis と Maude Menten により体系化された。本実験では、これらの研究に使用されたインベルターゼを用いて、酵素の反応速度論の基礎について学ぶ。

2 原理

酵素の活性部位 E が基質 S との反応により、エネルギー状態の高い酵素基質複合体を ES 形成する。この状態から E は生成物 P へと化学形を変え S から離れる。それと同時に逆反応も起こる。これらの反応機構を反応速度定数 K_1, K_2, K_{-1} を用いて仮定すると、



と表せる。

反応速度 V は P の生成速度で表され、各物質の濃度を $[]$ を用いて表すと、

$$V = d[P]/dt = K_2[ES]$$

となる。定常状態においては ES の生成速度と分解速度が等しく、さらに ES の生成には平衡が存在しその濃度が時間によって変化しないという仮定から、

$$d[ES]/dt = K_1[E][S] - (K_{-1} + K_2)[ES] = 0$$

が成立する。しかし、測定可能なのは E の全濃度であるので、

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

とおくと、先述の反応速度の式より、 $[ES]$ は

$$[ES] = [E]_T[S]/\{(K_{-1} + K_2)/K_1\} + [S]\} = [E]_T[S]/(K_m + [S])$$

である。なお

$$K_m = (K_{-1} + K_2)/K_1$$

は Michaelis 定数という。

また、反応の初速度は時間 $t=0$ の反応速度なので、

$$v_0 = (d[P]/dt)_{t=0} = K_2[ES] = K_2[E]_T[S]/(K_m + [S])$$

である。

$[E]_T$ の酵素が基質で飽和して全て ES 複合体を形成し、基質初濃度 $[S]_0$ が十分高くなった時の速度が、最大速度 V_{max} である。

$$V_{max} = K_2[E]_T$$

この時 $[S] \gg K_m$ であるので、

$$[S]/(K_m + [S]) \cong 1$$

したがって初速度は

$$V_o = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

と導出され、これが Micaelis-Menten の式である。さらに変形すると、

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

となり、この $1/V_o$ と $1/[S]$ の関係を示したプロットを Lineweaver-Burk プロットまたは両対数プロットという。

3 実験操作

3.1 実験器具

- ・ 煮沸用温浴
- ・ 分光光度計
- ・ メスピペット
- ・ 30°Cの恒温水槽
- ・ 小試験管
- ・ ピペットマン

3.2 試薬類

- ・ ジニトロサリチル酸試薬 10 ml
 - …1%3,5-ジニトロサリチル酸、30%(w/v) ロッセル塩(酒石酸カリウムナトリウム)、0.4M 水酸化ナトリウム
- ・ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) 4 ml
- ・ 標準液 1.5 ml
 - …10 mM グルコース、10 mM フルクトース、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液
- ・ 0.3 mM スクロース溶液 1.5 ml
 - …0.3 M スクロース、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液
- ・ 0.03 mM スクロース溶液 3 ml
 - …0.03 M スクロース、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液
- ・ 酵素溶液 1.5 ml
 - …インベルターゼ、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液
- ・ 脱イオン水 100 ml

3.3 操作

3.3.1 検量線の作成

- ①表 1 のように標準液と 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を、ピペットマンを用いて小試験管にそれぞれの濃度に希釈した。

表 1. 希釈液の組成とグルコースのモル数

試験管	標準液 / μmol	酢酸ナトリウム緩衝液 /ml	グルコースモル数 μmol
1	0	0.4	0
2	0.05	0.35	0.5
3	0.1	0.3	1
4	0.2	0.2	2
5	0.3	0.1	3
6	0.4	0	4

- ②各希釈標準液 0.4 ml に 0.4 ml のジニトリロサリチル酸を加え、振盪した。
③沸騰水中で 5 分間加熱後、10 分間放冷させた。
④③の各試験管に 4 ml の脱イオン水を加え、振盪した。
⑤分光光度計で濃度が低い順に 540nm の吸光度を測定した。そして横軸にグルコースモル数、縦軸に吸光度 $\text{OD}_{540\text{nm}}$ を取った検量線を作成した。

3.3.2 酵素反応の経時変化

- ⑥0.03 M スクロース 30°C 恒温水槽で予温した。
⑦0.1 ml の酵素溶液を小試験管に入れ、30°C の恒温水槽に入れた。
⑧表 2 のタイムテーブルに従い、決められた時間ごとに酵素溶液が入っている試験管へ予温されている 0.03 M スクロースを 0.3 ml またはジニトリロサリチル酸 0.4 ml を、各試験管に加えた。
ただし、反応時間 0 分の試料に限り、ジニトリロサリチル酸を加えた後すぐにスクロース溶液を加えた。
⑨酵素溶液にジニトリロサリチルを加えた後、恒温槽から取り出し振盪させ、3.3.1 の③、④と同様に測定を行った。そして、横軸に反応時間、縦軸に吸光度 $\text{OD}_{540\text{nm}}$ を取ったタイムコースのグラフを作成し、リニア領域から初速度 V_0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) を求めた。

表 2. 酵素反応の経時変化計測のタイムスケジュール

試験管 No.	反応時間 /min	スクロース 添加時間	ジニトロサリチル酸 試薬添加時間	煮沸終了 時間	放冷終了&脱イオン 水添加時間
1	0	t=10'	t=10'	t=15'	t=25'
2	1	t=5'	t=6'	t=11'	t=21'
3	3	t=4'	t=7'	t=12'	t=22'
4	5	t=3'	t=8'	t=13'	t=23'
5	10	t=2'	t=16'	t=21'	t=31'
6	15	t=1'	t=16'	t=21'	t=31'
7	20	t=0'	t=20'	t=25'	t=35'

3.3.3 基質の初濃度と反応速度の関係

⑩小試験管 9 本に酵素溶液を 0.1ml ずつ加えたものと、緩衝液とスクロース溶液を表 3 に示された量加えたもの(スクロース希釈液)を 30℃恒温水槽で予温した。

表 3. スクロース希釈液の濃度の組合せ

試験管	酵素溶液 /μl	緩衝液 /μl	スクロース溶液 /μl	スクロース濃度 /mM
1	100	300	0.03M 60	3.75
2	100	270	0.03M 90	5.63
3	100	240	0.03M 120	7.5
4	100	120	0.03M 240	15
5	100	0	0.03M 360	22.5
6	100	300	0.3M 60	37.5
7	100	240	0.3M 120	75
8	100	120	0.3M 240	150
9	100	0	0.3M 360	225

⑪基質の初濃度が薄いものから吸光度測定できるよう、表 4 のタイムテーブルに従い、酵素溶液の入っている試験管へ各濃度のスクロース希釈液を加えていった。

⑫恒温槽から取り出し後ジニトリロサリチル酸を 0.4ml 加え振盪し、3.3.1 の③、④と同様に測定を行った。そして初速度を求め、基質初濃度との関係をグラフ化した。

表 4. 反応速度測定の実験スケジュール

試験管 No.	スクロース 添加時間	ジニトロサリチル酸 試薬添加時間	煮沸終了 時間	放冷終了 & 脱イオン水 添加時間
1	t=0'	t=3'	t=8'	t=18'
2	t=1'	t=4'	t=9'	t=19'
3	t=2'	t=5'	t=10'	t=20'
4	t=3'	t=6'	t=11'	t=21'
5	t=4'	t=7'	t=12'	t=22'
6	t=5'	t=8'	t=13'	t=23'
7	t=6'	t=9'	t=14'	t=24'
8	t=7'	t=10'	t=15'	t=25'
9	t=8'	t=11'	t=16'	t=26'

4 実験結果

4.1 検量線の作成

グルコースモル濃度が低い溶液は透明の黄色を示し、高くなればなるほどその色は濃く変化し、一番濃いものでは透明な茶色になった。

操作⑤より、測定できた吸光度を下の表にまとめた。

表 5. グルコースモル濃度による吸光度変化の測定結果

試験管 No.	グルコースモル濃度 / μmol	吸光度 OD _{540nm}
1	0	0.0610
2	0.05	0.2654
3	0.1	0.4985
4	0.2	0.9391
5	0.3	1.3243
6	0.4	1.7045

また、これに基づき Excel にてグラフを作成し、近似曲線すなわち検量線をひいた。

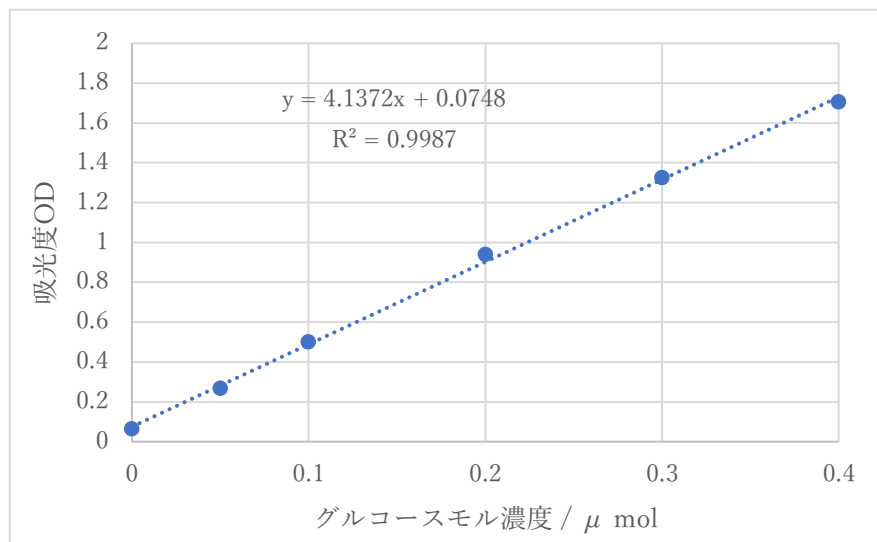


図 1. 検量線

図 1 に示すように、近似曲線すなわち検量線の式は、 $y = 4.1372x + 0.0748$ となった。

この結果より、 $1 \cdot \text{OD}_{540\text{nm}}$ は $0.2236 \mu\text{mol}$ のグルコースに相当する

4.2 酵素反応の経時変化

測定結果は下の表にまとめた。

表 6. 反応速度の違いによる吸光度の測定結果

試験管 No.	反応時間 /min	吸光度
1	0	0.0653
2	1	0.0963
3	3	0.2113
4	5	0.3489
5	10	0.6716
6	15	0.9229
7	20	1.4255

これより、Excel によりプロットし、近似曲線をひいた。

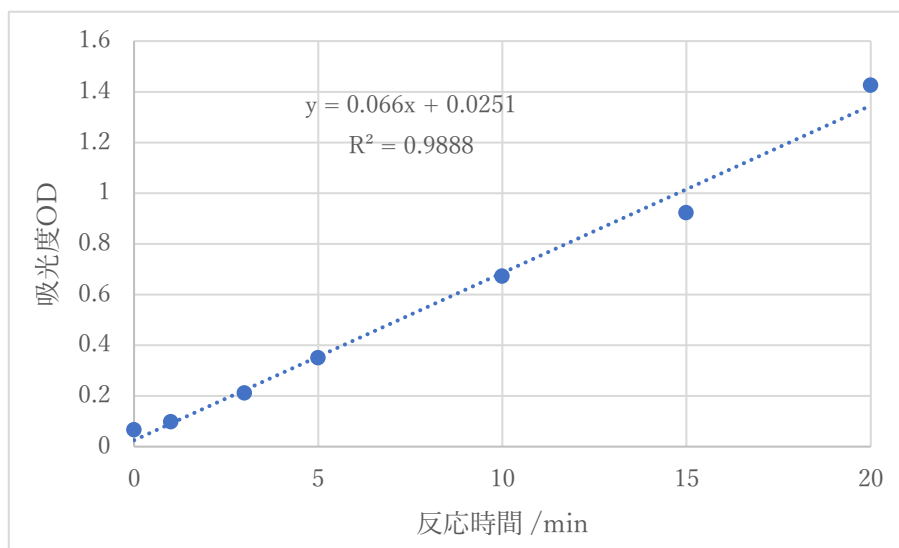


図 2. 反応時間変化による吸光度の変化

図 2 より、グラフの傾きは、0.0660である。

この傾きに、前節で求めた $1 \cdot \text{OD}_{540\text{nm}}$ あたりのグルコースモル数 $0.2236 \mu\text{mol}$ をかけると、

$$0.0660\text{min}^{-1} \times 0.2236\mu\text{mol} = 1.476 \times 10^{-2}\mu\text{mol}/\text{min}$$

したがって初速度 $V_0 \mu\text{mol}/\text{min}$ (1 分間に生成されるグルコースモル数=1 分間に加水分解されるスクロースモル数)は、 $V_0 = 1.476 \times 10^{-2}\mu\text{mol}$ と求められた。

4.3 基質の初濃度と反応速度の関係

先述した操作により得られた実験結果を、下の表にまとめた。

初速度は、4.1 節で求めた $1 \cdot OD_{540nm}$ あたりのグルコースモル数 $0.2236 \mu\text{mol}$ をかけて、反応時間 3 分で割ることによって求めた。

表 7. 基質初濃度の違いによる吸光度の変化とその初速度

試験管 No.	ジニトロサリチル 酸試薬添加時刻	スクロース 初濃度	吸光度	初速度 $\mu\text{mol}/\text{mm}$
1	t=3'	3.75	0.1140	0.850×10^{-2}
2	t=4'	5.63	0.1278	0.953×10^{-2}
3	t=5'	7.5	0.1476	1.100×10^{-2}
4	t=6'	15	0.2403	1.791×10^{-2}
5	t=7'	22.5	-	-
6	t=8'	37.5	0.3580	2.668×10^{-2}
7	t=9'	75	0.3717	2.770×10^{-2}
8	t=10'	150	0.4451	3.318×10^{-2}
9	t=11'	225	0.4197	3.128×10^{-2}

No.5 に関しては、小試験管を班員が割ってしまったため測定結果は得られていない。
この測定結果より、Excel にてプロットを行った。

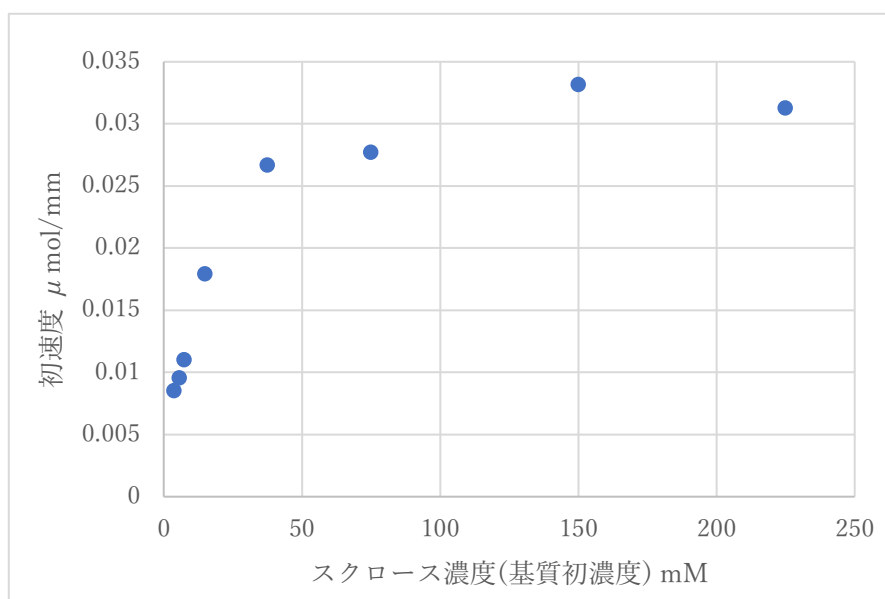


図 3. 基質の初濃度と反応時間

また、初速度と基質初濃度のそれぞれの逆数をとると、次の表の値が求められた。

表 8. スクロース初濃度の逆数値と初速度の逆数値との関係

試験管 No.	スクロース初濃度の逆数	初速度の逆数
1	0.266667	117.6914
2	0.17762	104.9829
3	0.133333	90.89984
4	0.066667	55.83361
5	-	-
6	0.026667	37.47714
7	0.013333	36.09582
8	0.006667	30.14337
9	0.004444	31.96763

これらの関係をグラフ化した。

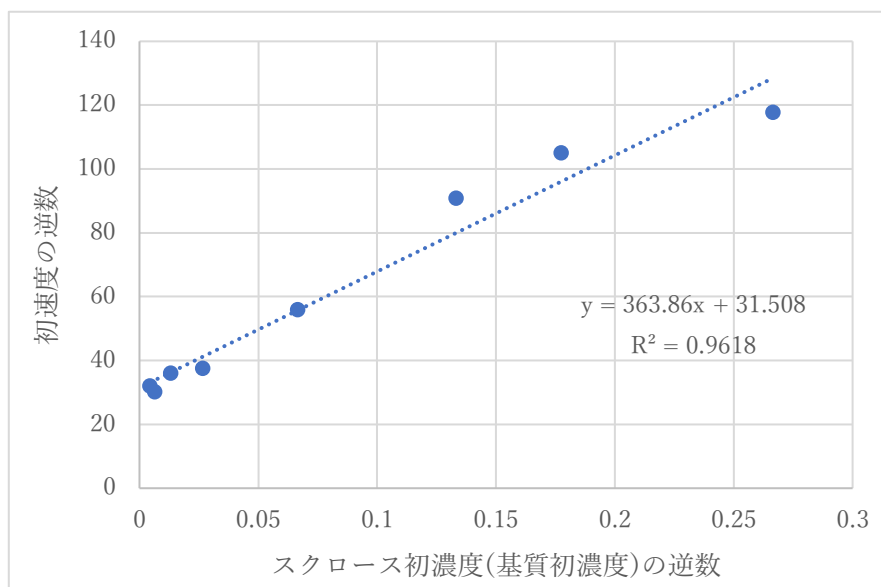


図 4. Lineweaver-Burk プロット

図 4 より、このプロットの近似式は

$$\frac{1}{V_0} = 363.86 \frac{1}{[S]} + 31.508$$

となり、傾きは K_m/V_{\max} 、切片は $1/V_{\max}$ にあたる。

したがって最大速度 V_{\max} は、

$$\frac{1}{V_0} = 31.508$$

$$V_{max} = 1 \div 31.508 \\ = 0.0317 \mu\text{mol}/\text{min}$$

と求められる。Michaelis 定数 K_m は、

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 363.86 \text{ mM} \cdot \frac{\text{min}}{\mu\text{mol}} \\ K_m = 363.86 \text{ mM} \cdot \text{min}/\mu\text{mol} \times 0.0317 \mu\text{mol}/\text{min} \\ = 11.53 \text{ mM}$$

であると導けた。

5 考察

5.1 Michaelis 定数の意味

$$K_m + [S] = V_{max}/V \times [S]$$

$$K_m = V_{max}/V \times [S] - [S]$$

$$K_m = [S](V_{max}/V - 1)$$

これより、 $V = V_{max}/2$ のとき、 $K_m = [S]$ となるので、Michaelis 定数 K_m は、反応速度 V が最大速度 V_{max} の半になるときの基質濃度を示している。

基質に対する酵素の親和性が高いと K_m は小さくなる。つまり、 K_m が小さいと、反応速度が最大になる基質濃度が低い。そのため、酵素と基質の結合が起こりやすく、酵素基質複合体の解離が起こりにくい。 K_m が大きいと、酵素と基質の結合は起こりにくく、酵素基質複合体は解離されやすい。

5.2 Michaelis-Menten の式の導入にあたっての定常状態の仮定

定常状態の仮定とは、酵素基質複合体 ES の生成速度と分解速度が等しく、その上 ES の生成には平衡が存在し、その濃度は時間によらず変化しない、という仮定のことである。

6 参考文献・HP

[1] 酵素の化学

URL : <http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochem/biochem5.htm>