

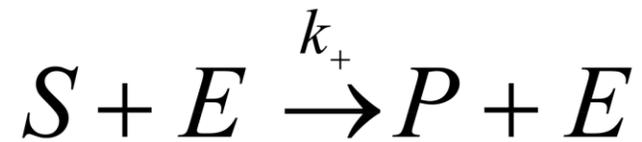
物理化学概論

動力学

九州工業大学 竹中繁織

酵素反応

- 酵素Eによって基質Sから生成物Pが生成されることを考える。



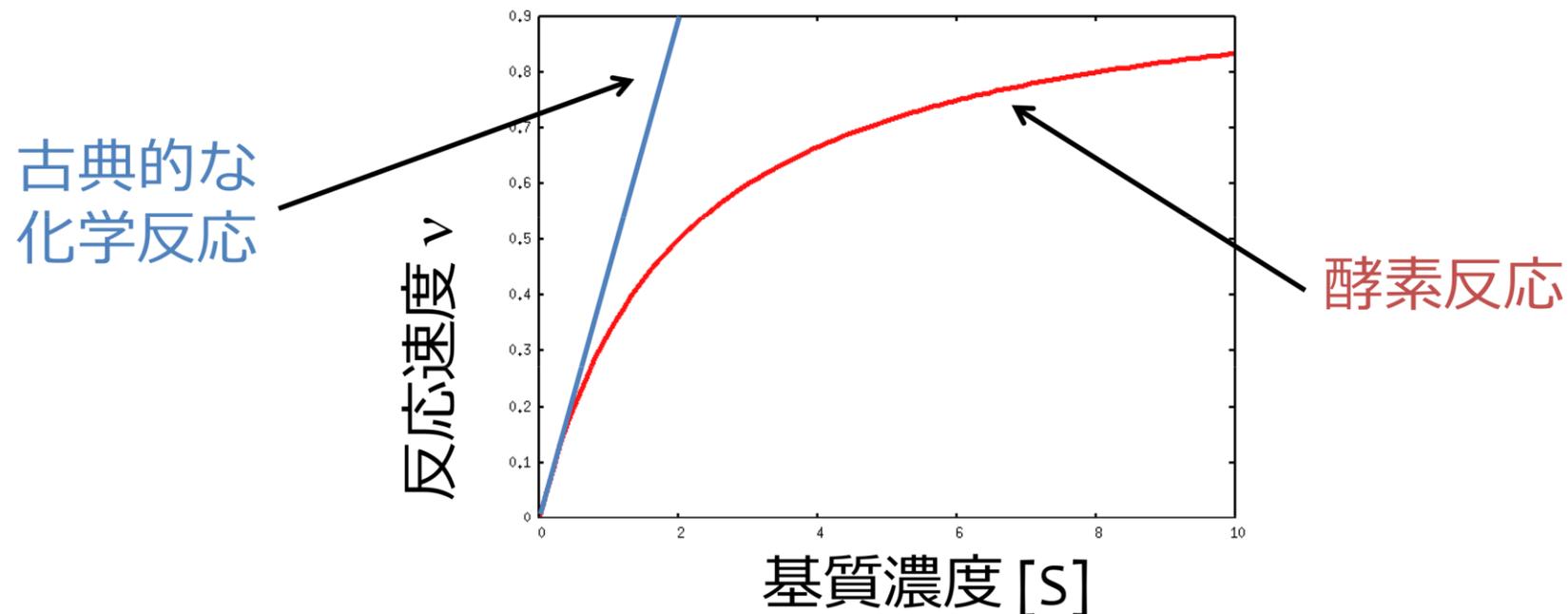
酵素濃度が一定なら

$$\frac{d}{dt}[P] \propto [S]$$

- これでいい? → ダメ
- 反応速度($d[P]/dt$)は基質濃度 $[S]$ の増加とともに頭打ちになる。
 - 基質濃度に比例しない。

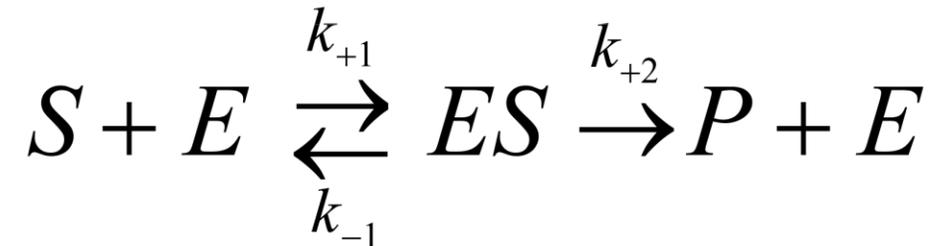
酵素反応の特徴

- 基質濃度[S]が一定のときは[E]に比例
- 基質濃度[S]が低い時は[S]に比例
- 基質濃度[S]が高い場合は一定



ミカエリス・メンテン(MM)モデル

- 反応中間体ESを考慮



- 迅速平衡法での導出

- これは多段階反応

- $ES \Rightarrow P + E$ を反応の律速段階と考える。

- $S + E \rightleftharpoons ES$ の速度は $d[P]/dt$ に影響しないと考える

- 迅速に平衡状態に達していると考ええる。

$$\frac{d}{dt}[P] = k_{+2}[ES]$$


迅速平衡法による導出

- $S + E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES$ は平衡状態なので

$$k_{+1}[S][E] = k_{-1}[ES] \quad \text{これより} \quad \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[S][E]}{[ES]} = K_S \quad \text{解離定数}$$

また $[E] + [ES] = [E]_0$ なので $[E]_0$: 酵素の初期濃度

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

$$\text{つまり} \quad \frac{d}{dt}[P] = k_{+2}[ES] = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{K_S + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{K_S + [S]}$$

ミカエリス・メンテン式

定常状態法による導出

- 多段階反応を考慮する。 $S + E \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \xrightarrow{k_{+2}} P + E$
- ただ、酵素種濃度([E]と[ES])の時間変化はない(定常状態にある)と考える。

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

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

$$\text{また } [E] + [ES] = [E]_0$$

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

$$\text{ここで } K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

$$\text{これより } \frac{d}{dt}[P] = k_{+2}[ES] = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

ミカエリス・メンテン式

ふたつのモデルの比較

- 式の形は同じだがミカエリス定数の意味が異なる。

迅速平衡法の場合

定常状態法の場合

$$\frac{d}{dt}[P] = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

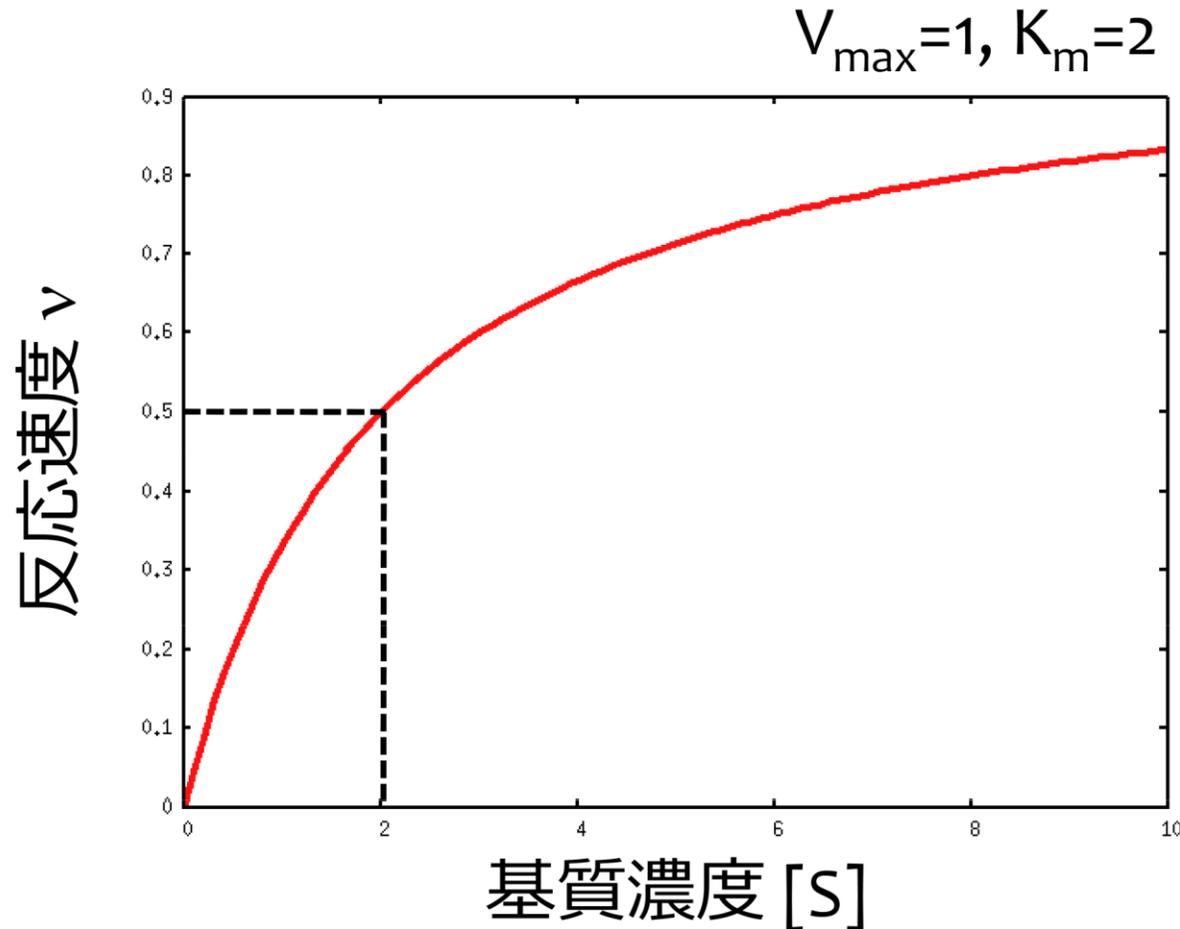
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

定常状態法由来のモデルの特別な場合

($k_{+2} \ll k_{-1}, k_{+1}$) が迅速平衡法由来のモデル

- 定常状態法由来のモデルが一般的

ミカエリス・メンテン(MM)式



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

K_m : 最大速度 V_{\max} の
半分の速度を与える
基質濃度

基質 S と酵素 E の
解離の程度

実験データからの V_{\max} と K_m の推定

ラインウィーバー-バークプロット

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

他にもプロットの方法は幾つかある

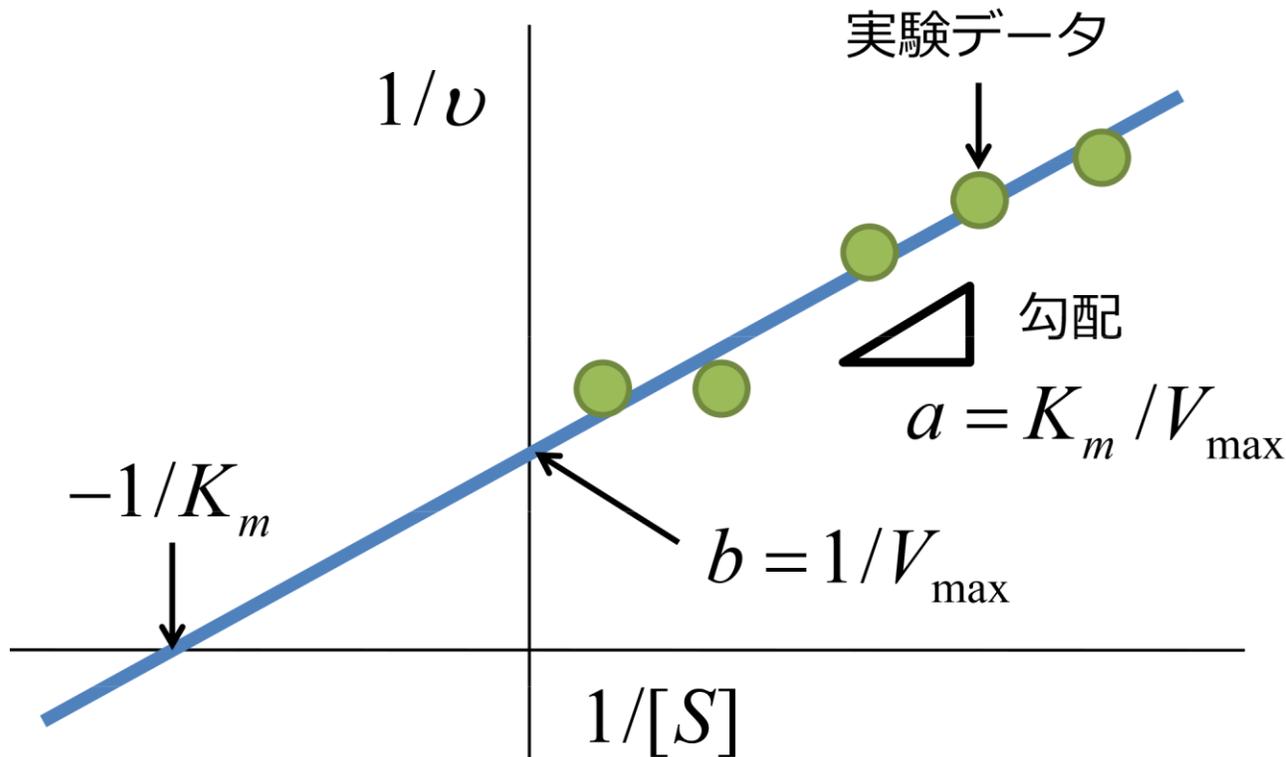
なので

$$x = 1/[S], y = 1/v$$

として、最小二乗法等で

$$y = ax + b$$

を求める。



欠点：

逆数を使うので $[S]$ が小さい時の誤差が推定の結果に強く影響する。

3. 阻害剤と酵素活性への影響

3-1 阻害の形式

拮抗阻害(Competitive Inhibition)

- ・阻害剤は活性部位に結合する阻害形式である。
- ・基質と阻害剤が活性部位を競って結合するため、 K_m 値は大きくなるが、 V_{max} は変化しない。

非拮抗阻害(Non-competitive Inhibition)

- ・阻害剤が活性部位とは異なる部位に結合して酵素の立体構造を変え、基質が生成物に変わるのを抑える阻害形式である。また、酵素基質複合体

(ES)にも結合して阻害するため、基質濃度を高くしても阻害は解消されない。

- ・ V_{max} が低下するが、阻害剤は直接活性部位に結合しないため基質の親和性に変化がなく、 K_m 値は変化しない。

不拮抗阻害(Uncompetitive Inhibition)

- ・阻害剤が遊離の酵素とは結合せず、酵素基質複合体(ES)とだけ結合するような阻害形式である。
- ・ K_m 値と V_{max} は両方とも変化する。

これらの阻害をモデル的に表わすと、次のようになる。

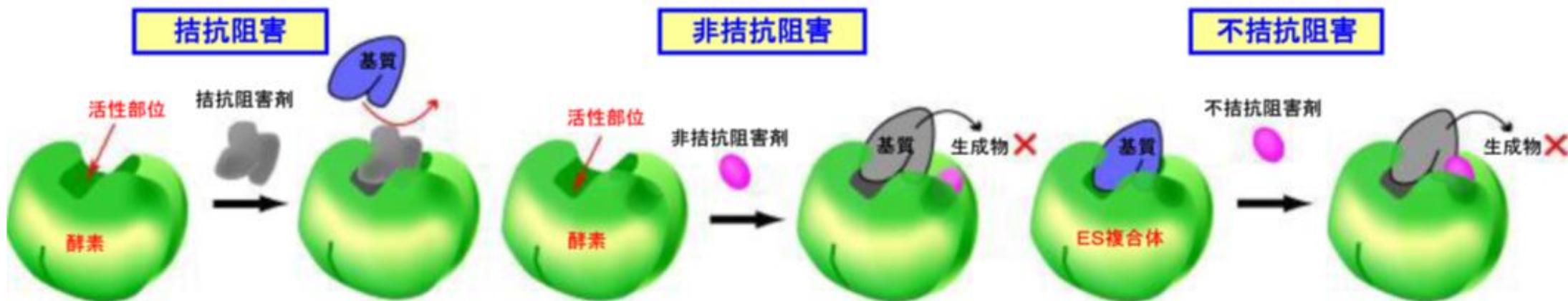


図3 酵素の阻害の仕組み

3-2 Lineweaver-Burkプロットによる阻害様式の決定——弱い阻害剤に適用

阻害剤が存在するときの Lineweaver-Burk の式は次のようになる。阻害形式はこのプロットで区別できる。

$$\begin{array}{ll}
 \text{拮抗阻害} & \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\max}} \\
 \text{非拮抗阻害} & \frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \\
 \text{混合型} & \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)
 \end{array}$$

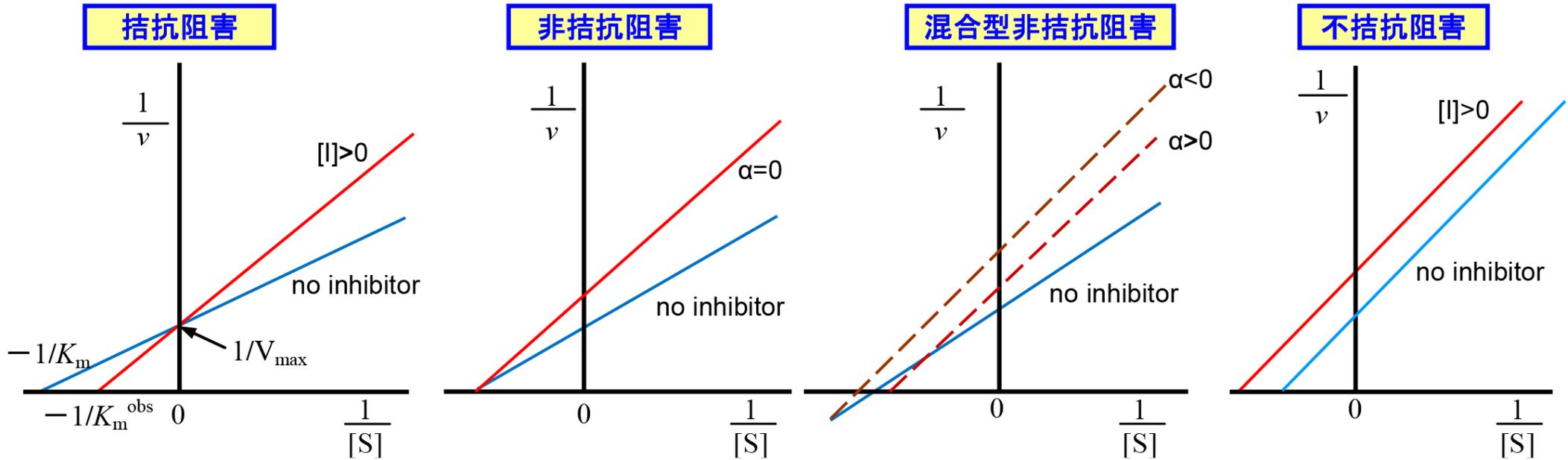


表1. Lineweaver-Burkプロットによる阻害様式の判定基準

拮抗阻害	非拮抗阻害	混合非拮抗阻害		不拮抗阻害
	$\alpha=0$	$\alpha>0$	$\alpha<0$	
Y軸上	X軸上	X軸の上方	X軸の下方	平行

表 2 反応速度論の研究に使われる実験法¹⁾

方 法	時間スケール [秒]
超高速分光法	$10^{-15}\sim$
蛍光減衰測定	$10^{-10}\sim 10^{-6}$
超音波吸収法	$10^{-10}\sim 10^{-4}$
電子スピン共鳴法	$10^{-9}\sim 10^{-4}$
電場ジャンプ法	$10^{-7}\sim 1$
温度ジャンプ法	$10^{-6}\sim 1$
りん光減衰測定	$10^{-6}\sim 10$
核磁気共鳴法	$10^{-5}\sim 1$
圧力ジャンプ法	$10^{-5}\sim$
ストップトフロー法	$10^{-3}\sim$

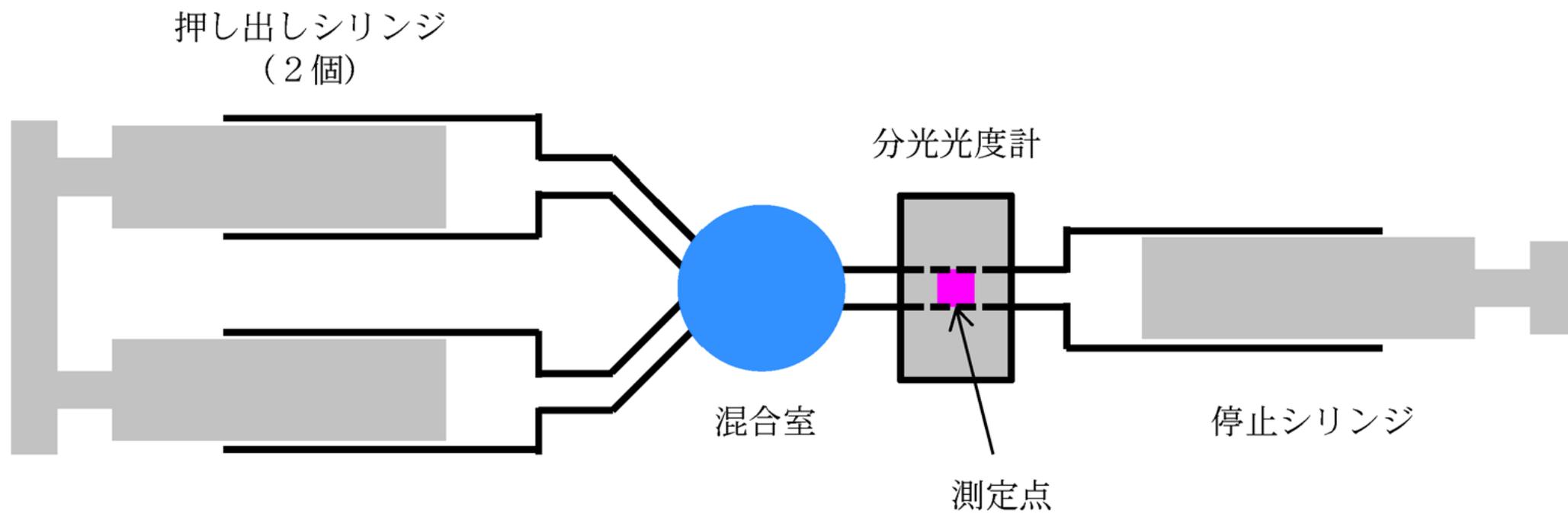
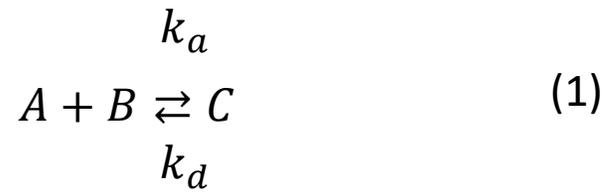


図1 ストップフロー法の測定設備¹⁾



A: intercalator; B:DNA, C: DNA-intercalator complex

When [B] is sufficiently large ([B] >> [A]),



The kinetic equation is thus
$$-\frac{dC_A}{dt} = k_a C_B^0 C_A - k_d C_C \quad (3)$$

From mass balance,
$$C_A^0 = C_A + C_C \quad C_C = C_A^0 - C_A \quad (4)$$

Substitution of (3) in (4) gives rise to

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_a C_B^0 C_A - k_d (C_A^0 - C_A) = (k_a C_B^0 + k_d) C_A - k_d C_A^0 \quad (5)$$

At equilibrium
$$-\frac{dC_A}{dt} = 0 \quad (k_a C_B^0 + k_d) C_A^\infty = k_d C_A^0 \quad (6)$$

Substitution of (6) in (5) gives rise to

$$-\frac{dC_A}{dt} = (k_a C_B^0 + k_d) (C_A - C_A^\infty) \quad -\frac{dC_A}{C_A - C_A^\infty} \frac{1}{dt} = k_a C_B^0 + k_d$$

$$(k_a)_{app} - \frac{d(C_A - C_A^\infty)}{dt} = k_a C_B^0 + k_d$$

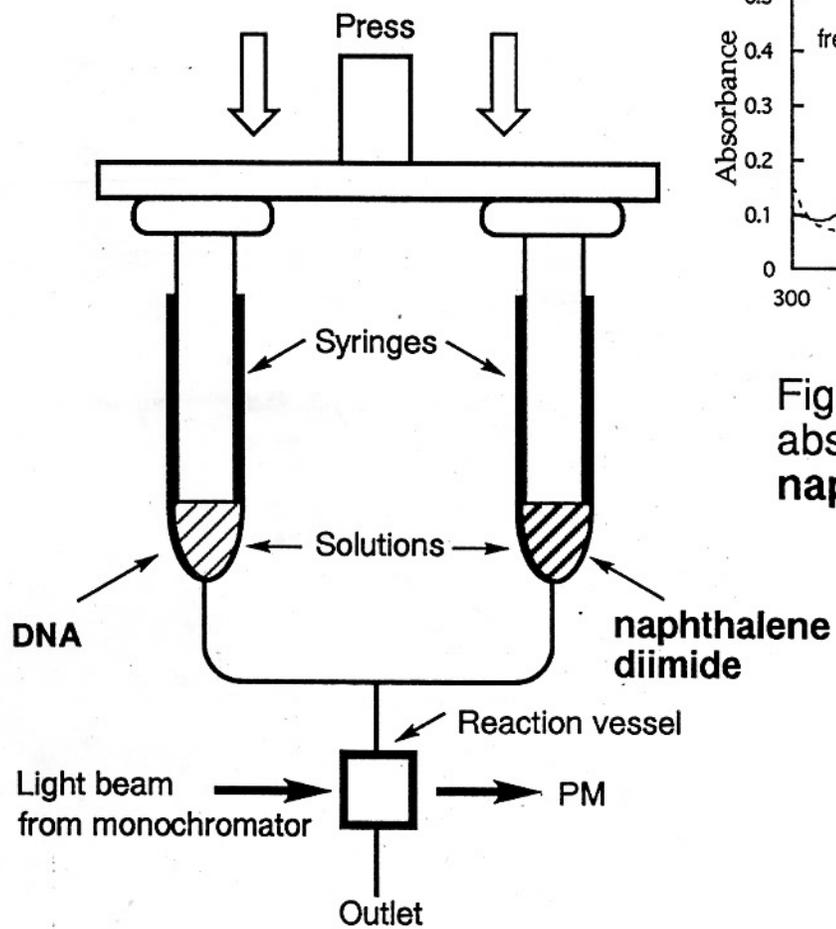


Fig. The stopped-flow technique

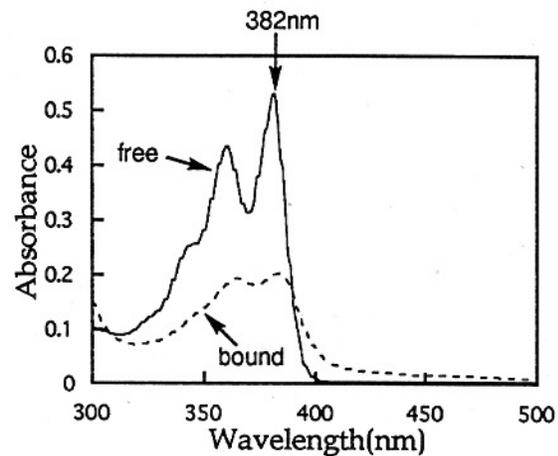


Fig. Effects of DNA on the absorption spectrum of naphthalene diimide

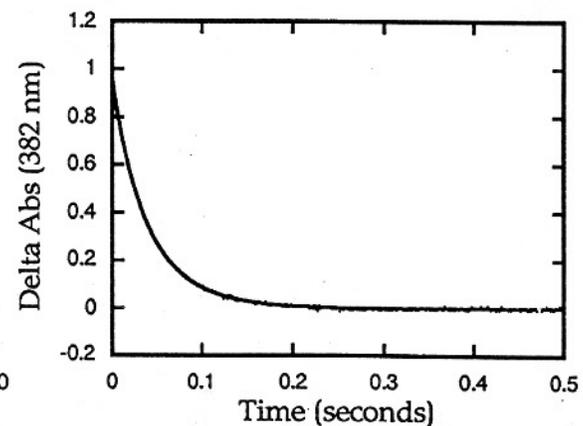
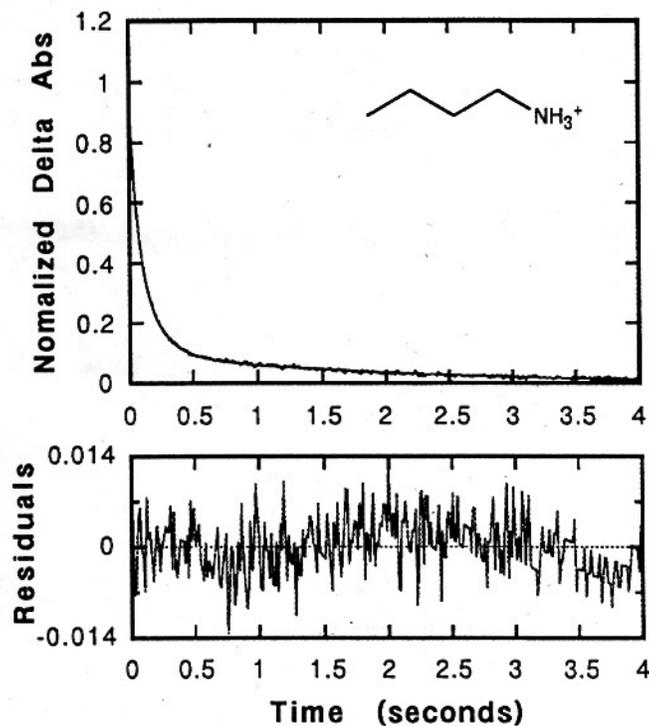


Fig. Stopped-flow kinetic traces association reaction for naphthalene diimide with DNA

$$A = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}$$

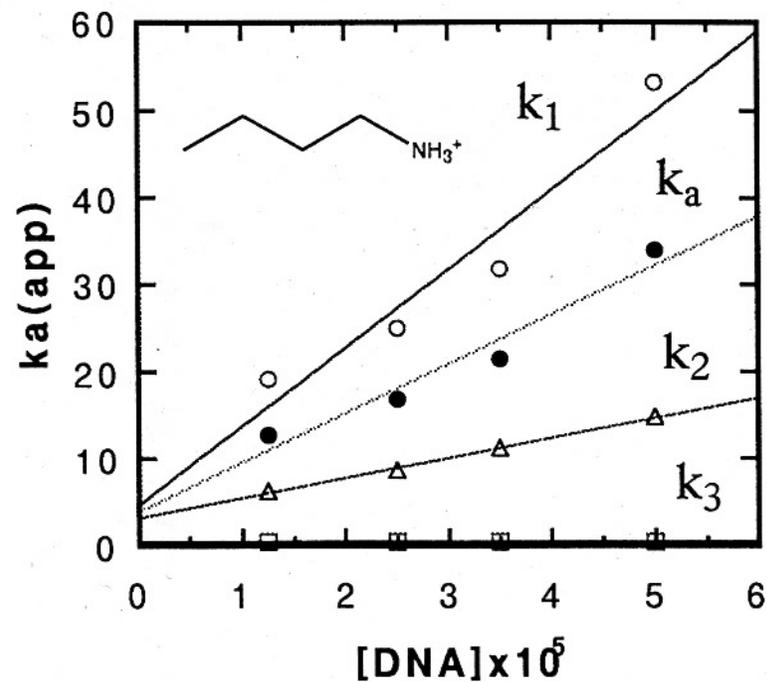
$$k = 1/\tau = \frac{(A_1 k_1 + A_2 k_2)}{(A_1 + A_2)}$$

Stopped-flow kinetics association reaction for compounds 2 with calf thymus DNA



Total concentrations after mixing were 1.25×10^{-5} M for DNA (base pair) and 1.25×10^{-6} M for 2 in MES buffer with 0.2 M NaCl at 20°C. The smooth line is the three-exponential fits to the experimental data. A residual plot is shown under experimental plot.

Plot of k as a function of calf thymus DNA concentration in base pairs for 2



The slopes of the lines k_1 , k_2 and k_a represent the observed second-order association rate constants. Experiment was conducted in MES buffer with 0.2 M NaCl in the manner described before

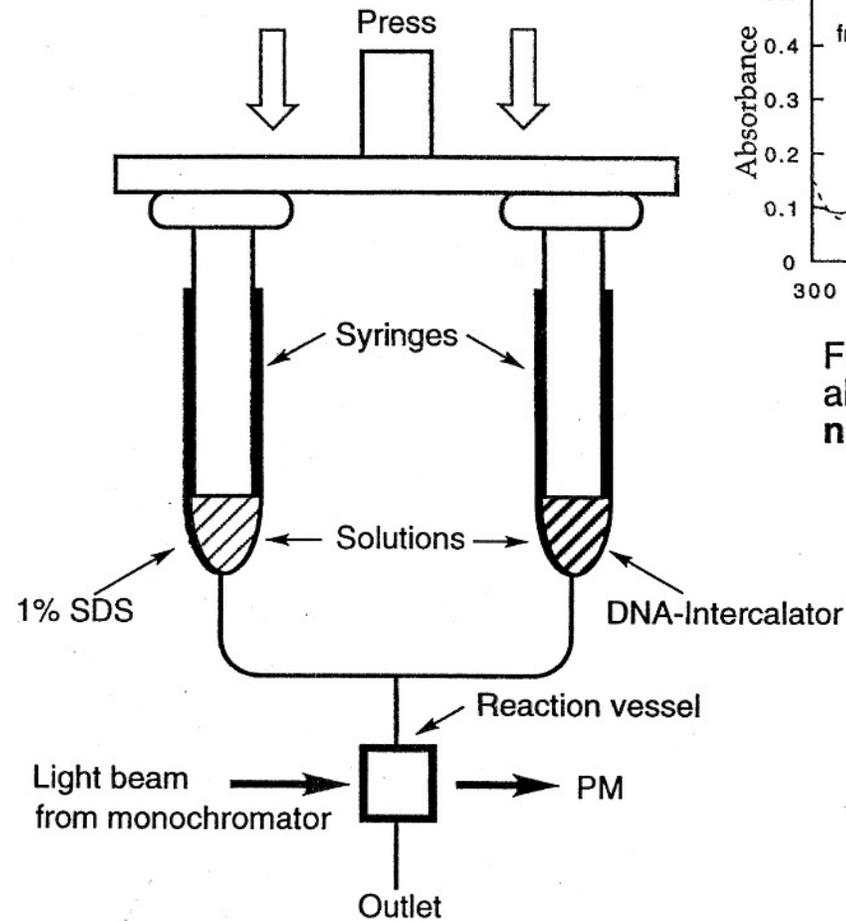


Fig. Stopped-flow technique

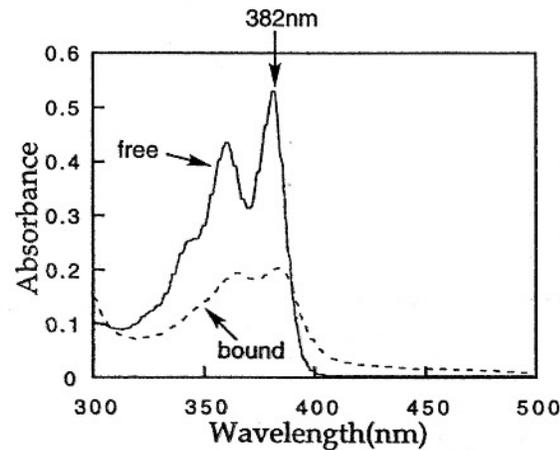


Fig. Effects of DNA on the absorption spectrum of naphthalene diimide

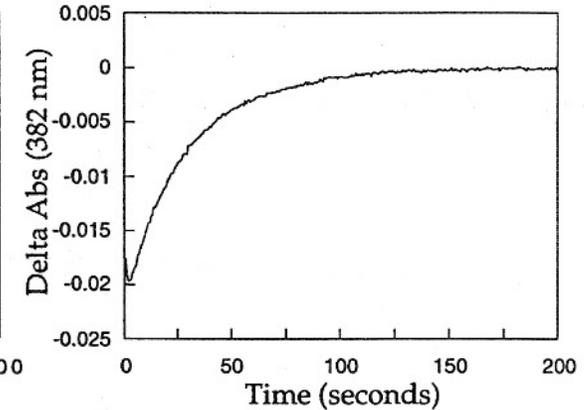
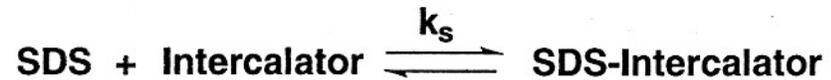
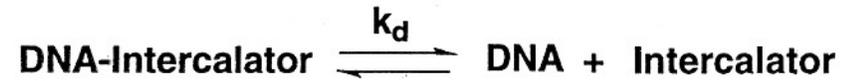


Fig. Stopped-flow kinetic trace for SDS-driven dissociation of naphthalene diimide from DNA



k_d : first order dissociation rate constant

k_s : sequestering of Intercalator with SDS (diffusion controlled process)

$$A = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}$$

$$k_d = 1/\tau = (A_1 k_1 + A_2 k_2) / (A_1 + A_2)$$

課題レポート

$A + B \longrightarrow P$ の二次反応速度式を導出せよ。

ただし、反応物質 A, B の初濃度をそれぞれ a, b とし、時間 t 後の生成物質 P の濃度を x とする。