

問題36：カタラーゼの酵素反応速度

緒言

触媒反応は、化学および生物学における中心的概念であり、生命および工業プロセスにおいて本質を成すものである。酵素は生化学反応の触媒である。この実験ではジャガイモ中のカタラーゼによる過酸化水素の分解($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)のミカエリス・メンテン型の反応速度を調べる。カタラーゼはその非常に速い反応速度で有名である。カタラーゼ1分子は1秒間に4000万個の過酸化水素分子を分解することが出来る。このような速い反応速度は活性酸素種の除去および酸化環境における細胞成分の保護に必要である。下に示した図はX-線構造解析で決められた大腸菌から得られたカタラーゼ3次元構造である。



発生した酸素ガスの物質量はビュレットを用いた体積測定あるいは密閉された反応容器中の圧力変化から決定出来る。反応速度は単位時間に発生する酸素の物質質量として表される。酵素(E)は基質(S)と結合し速度定数 k_1 で酵素-基質結合体(ES)を形成する。ESは速度定数 k_2 で解離しEとSに戻るか、速度定数 k_3 で生成物(P)になる。定常状態のESは以下の速度式に従って決定することが出来る。

$$d[\text{ES}]/dt = k_1([\text{E}]_{\text{tot}} - [\text{ES}])[\text{S}], \quad \text{where } [\text{E}]_{\text{tot}} = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

$$-d[\text{ES}]/dt = k_2[\text{ES}] + k_3[\text{ES}]$$

$$[\text{S}]([\text{E}]_{\text{tot}} - [\text{ES}])/[\text{ES}] = (k_2 + k_3)/k_1$$

$$d[\text{ES}]/dt = k_1([\text{E}]_{\text{tot}} - [\text{ES}])[\text{S}], \quad \text{ここで } [\text{E}]_{\text{tot}} = [\text{E}] + [\text{ES}]$$

$$-d[\text{ES}]/dt = k_2[\text{ES}] + k_3[\text{ES}]$$

$$[\text{S}]([\text{E}]_{\text{tot}} - [\text{ES}])/[\text{ES}] = (k_2 + k_3)/k_1$$

$(k_2 + k_3)/k_1$ はミカエリス・メンテン定数 K_M と定義される

[ES]の最後の式を解くと $[\text{ES}] = [\text{E}][\text{S}]/(K_M + [\text{S}])$ が与えられる。

v を酵素の発生の初速度とする： $v = k_3[\text{ES}]$

もし酵素が全てESで存在すると、 v は最大値 $V_{\max} = k_3[E]_{\text{tot}}$ に近づく
 これらの式から、ミカエリス-メンテンの式が得られる。

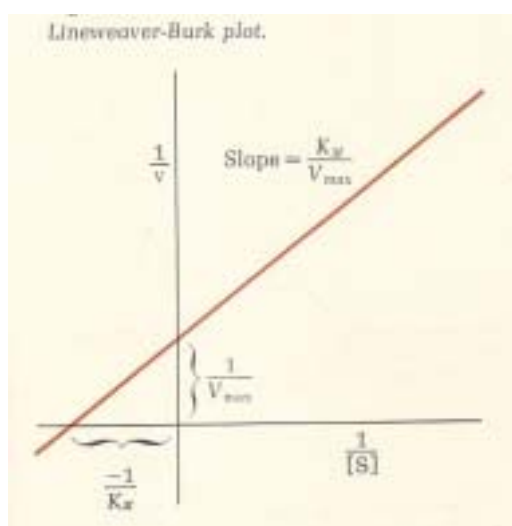
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

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

K_M が $v = V_{\max}/2$ における $[S]$ であることは明確である。ミカエリス-メンテンの式の逆数
 を取るとよく知られているラインウイーバー-バークの式を得ることが出来る。この式
 は化学で最もよく使われる式の一つである。

$$1/v = (K_M/V_{\max})(1/[S]) + 1/V_{\max}$$

$$1/v = (K_M/V_{\max})(1/[S]) + 1/V_{\max}$$

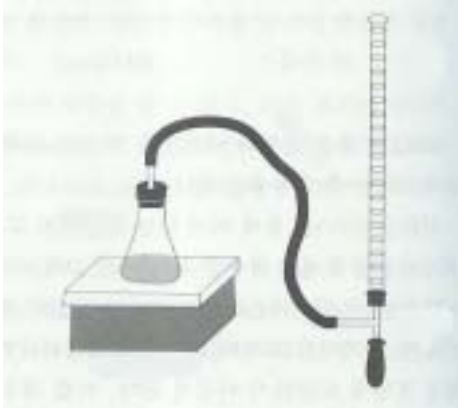


試薬

過酸化水素(R 34, S 28-36/39-45), 新鮮なジャガイモ, カタラーゼ

器具

ミキサー、氷浴、沸騰した湯浴



手順

1. 30%の過酸化水素水を脱イオン水で薄めて0.5、1、2、3、4、6%の過酸化水素を調製する。
2. ジャガイモ数切れをほぼ同じ重さの水と混ぜてジャガイモジュースを作る。チーズクロスを使いジュースを絞る。その後氷浴にジュースを入れたままにする。
3. 1.で用意した希釈過酸化水素水30mLにそれぞれ2mLのジャガイモジュースを加え振る。比較対照として30mLの脱イオン水を用いる。
4. 以下に示された装置（上の図）を使用して、発生した酸素の体積を測定する。ゴム球でシャボン玉を作り、室温である体積(例えば20 mL)の酸素ガスを作るのに必要な時間を測定する。
5. 酵素を変性されるために沸騰した温浴で10分間加熱したジャガイモジュースを用い、6%過酸化水素水溶液で同じ実験を行う。
6. もし純粋なカタラーゼが用意できれば、既知濃度(例えば1ミリモル)のカタラーゼを使用して、全ての実験を繰り返す。

問題

- 36-1. 過酸化水素 [S]の濃度を計算せよ。
- 36-2. それぞれの[S]に対し与えられた時間で生成した酸素の物質を計算せよ。
- 36-3. それぞれの[S]における v を計算せよ。
- 36-4. [S]に対して v をプロットして極大値に極大値に近づくか確認せよ。
- 36-5. K_M と V_{max} を求めるためにラインウィーバー-バークプロットを作成せよ。
- 36-6. もし $[E]_{tot}$ が分かれば $V_{max} = k_3 [E]_{tot}$ から k_3 が計算できる。カタラーゼの1秒あたり代謝回転数はいくらか。