

## 問題 10 酵素の反応速度論

酵素の反応速度の特徴を明らかにすることは、薬剤の開発にとって重要である。天然の基質があるときに酵素がどのように振る舞うかをよく理解することが、可能性を秘めた薬剤の効果を評価する前に必要である。酵素は二つのパラメータ  $V_{\max}$  と  $K_m$  で特徴づけられ、これらのパラメータは基質の濃度を変えながら反応の初速度の変化を解析することで、決定できる。

多くの酵素反応が次の機構を使ってモデル化できる。



ここで **E** は基質と結合していない酵素、**S** は基質、**ES** は酵素と基質が反応してできた複合体であり、**P** は生成物である。

a) 系が定常状態にあり、 $[S] \gg [E]$  として、次のものを表せ。

i) **ES** の生成速度を  $[E]$ 、 $[S]$ 、 $[ES]$  と適切な速度定数を用いて。

ii) **P** の生成速度を  $[ES]$  と適切な速度定数を用いて。

実験を行うとき  $[E]$  は知られていない。しかし反応を通して酵素の全量は一定である。そこで、

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

となる。ここで  $[E]_0$  は酵素の初濃度である。

また酵素の反応速度論ではミカエリス定数  $K_m$  が次のように定義される。

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

b)  $[ES]$  を表す式を  $[S]$ 、 $[E]_0$  および  $K_m$  を使って求めよ。

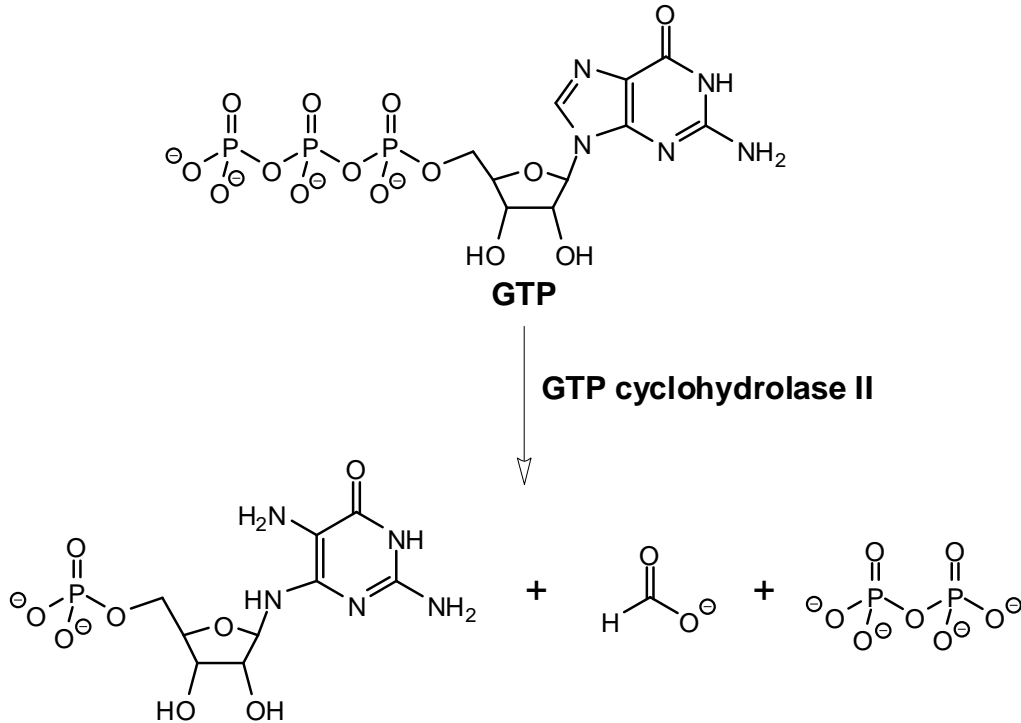
c) 上記の結果を使って、**P** の生成速度を表す式を  $[E]_0$ 、 $[S]$  および適切な定数を用いて示せ。

最大の反応速度  $V_{\max}$  となるのは、酵素分子がすべて基質と結合したとき、つまり  $[ES] = [E]_0$  のときである。そこで、

$$V_{\max} = k_2 \times [E]_0$$

d) Pの生成速度を表す式を  $V_{max}$ 、[S]および適切な定数を用いて示せ。

酵素 GTP シクロヒドロラーゼ II は、バクテリアでのリボフラビンの生合成の第 1 段階を触媒する。



高等生物ではこの酵素は存在しないので、GTP シクロヒドロラーゼ II は抗菌剤の標的となりえる。

タンパク質(酵素)試料をいろいろな濃度の GTP と手早く混合した。時間経過にともなう吸光度の変化を光路長 1 cm、1 mL のセルを用いて 299 nm で測定した。精製した生成物の 100  $\mu\text{M}$  溶液の光路長 1 cm、299 nm での吸光度は 0.9 であった。

Time 時間 / s	GTP concentration GTP 濃度						
	200 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	80 $\mu\text{M}$	60 $\mu\text{M}$	40 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$
6	0.00514	0.00469	0.00445	0.00393	0.00377	0.00259	0.00197
7	0.00583	0.00547	0.00477	0.00454	0.00388	0.00253	0.00247
8	0.00708	0.00639	0.00568	0.00506	0.00452	0.00309	0.00253
9	0.00698	0.00703	0.00639	0.00591	0.00521	0.00325	0.00295
10	0.00818	0.00800	0.00709	0.00645	0.00574	0.00387	0.00302
11	0.00901	0.00884	0.00752	0.00702	0.00638	0.00445	0.00352
12	0.0103	0.00922	0.00849	0.00771	0.00707	0.00495	0.00386

- e) 各 GTP 濃度における反応の初速度を計算せよ。
- f) (d)で求めた式を  $y = mx + c$  の形の式で表せ。
- g) 上記の結果を使って、この酵素の  $V_{\text{max}}$  と  $K_m$  を決定せよ。始めに示した反応機構がこの酵素に成り立つとしてよい。