



## 原典からの酵素反応速度論

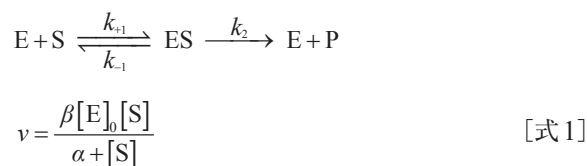
知名 秀泰・岡田 豊\*

酵素反応速度論で我々が最初に思い浮かべるのは、やはり Michaelis-Menten の式ではないだろうか。この式なしではこれまでの酵素化学の発展は考えられない。L. Michaelis と M. L. Menten (図1) が歴史的な原典<sup>1-3)</sup>を報告してかれこれ一世紀を経過したが、我々はこの式の重要性をどれぐらい理解しているだろうか。また近年の酵素反応速度論はどのような進歩を遂げているのだろうか。分子レベルで詳細な機構解明が求められている現代において、速度論の利用は定量的な情報を得るための有効な手段であり、酵素を取り扱う上で特に重要な位置づけとなるだろう。そこで今回、歴史的な背景を踏まえ改めてこの式と向き合い、酵素反応速度論を深く理解したい。

### (Henri)-Michaelis-Menten 式の成り立ち

化学反応速度論の初めての研究は、1850年のスクロース酸加水分解の報告<sup>6)</sup>にまで遡る。一方、これより40年遅れて C. O'Sullivan と F. W. Tompson により酵素反応に対する速度論の研究が始まった<sup>7)</sup>。彼らは酵母インベルターゼを用いたスクロースの転化反応が通常の化学反応とは速度論的観点から異なることを示し、生成物 (P) が生じる過程で酵素 (E) と基質 (S) の複合体 (ES) の形成を提案した。当時、酵素反応においても通常の化学反応の速度式が用いられていたが、酵素反応の律速段階が  $ES \rightarrow E + P$  の過程にあるという A. J. Brown の提

案<sup>8)</sup>が報告された同年に、V. Henri は中間体 ES を仮定して酵素反応の速度式を与えた<sup>9-10)</sup>。しかし、Henri の実験は測定上の pH や P の影響を考慮していなかった点で不完全なものであった。O'Sullivan と Tompson の実験からも酵素活性における酸塩基の影響は明らかであったが、実は Henri の実験は pH の概念が登場する以前<sup>11)</sup>のものであるため、当時はまだ活性測定に緩衝剤が用いられていなかった。また反応の追跡が旋光計を用いた連続法で行われていたことから、P の変旋光や阻害作用の影響が考慮されていなかった。このことから Henri は正確な論理的解釈ができず、未知の定数  $\alpha$  と  $\beta$  を残した [式1] の報告に留まった。



そこでこれらを考慮した Michaelis は、酵素活性が比較的狭い pH の範囲に制限されることを示し<sup>12)</sup>、助手の Menten と共に Henri の追試実験を行った。彼らは同様な酵素反応を一定の pH 条件下で行い、不連続法 (アルカリ条件下で反応と変旋光を停止させた後に反応を追跡する方法<sup>13)</sup>) を導入することでより正確な測定系を構築した。また Henri の実験から知られていた P の阻害作用も初速度の解析から回避されている。これらが正確な論理的解釈を可能とし、E と S の解離定数を  $K_s (= k_{-1}/k_{+1})$  としたとき、ES の形成過程を迅速な平衡状態と仮定することで  $\alpha = K_s$  および  $\beta = k_2$  を導いた。

Michaelis と Menten により導かれた式は、ES の形成過程が迅速平衡であるという制約に基づいており、これを実験的に確かめることは困難である。そこで G. E. Briggs と J. B. Haldane は ES の形成過程を定常状態と仮定することで  $\alpha = (k_{-1} + k_2)/k_{+1} = K_m$  (ミカエリス定数) を導き、上記の制約を取り払った一般的条件で成立する形に改良した<sup>14)</sup>。世に知られる  $\alpha = K_m$  および  $\beta = k_2$  を代入した [式1] は正式には Briggs-Haldane の式であるが、今日では我々の多くがこれを (Henri)-Michaelis-Menten の式と呼んでいる。いずれにせよこの式は Henri の実験がおもなきっかけとなり、Michaelis と Menten に続く Briggs と Haldane による式の改良によってもたらされた

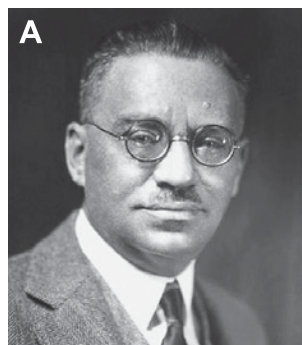


図1. (A) Leonor Michaelis (1875-1949) と (B) Maud Leonora Menten (1879-1960)<sup>4)</sup>。L. Michaelis はドイツ生まれの医学博士であり、新設の愛知医学専門学校 (現・名古屋大学医学部) の教授として生化学の振興にも貢献した<sup>5)</sup>。M. L. Menten はカナダでは初の女性医学博士であり、当時の母国では女性研究者は認められなかったため、ドイツやアメリカをおもな研究拠点とした。

\* 著者紹介 立命館大学生命科学部応用化学科 (教授) E-mail: ygvector@sk.ritsumei.ac.jp

のである。

ところで、MichaelisとMentenの報告の翌年にD. D. Van SlykeとG. E. Cullenによって類似の式が導き出されていた<sup>15,16</sup>ことをご存知だろうか。彼らはウレアーゼを用いた尿素加水分解において酵素反応速度論を展開していたが、MichaelisとMenten同様、彼らもESの形成を仮定していた。ただしESの形成過程においては、定常状態の基で不可逆的なものと仮定した点異なる。彼らの結論は、 $\alpha = k_2/k_{-1}$ および $\beta = k_2$ となるものであったが、ESの形成過程が不可逆的である点は、この結論を導く上であまり重要ではない。実際に可逆か否かを決定することは、現代の科学技術をもってしても容易ではなく、たとえどちらを仮定しても、 $\beta = k_2$ に対し $\alpha$ は保証されない仮定に基づいた速度定数比となる。つまり、可逆と不可逆の両方の場合を反映するミカリエス定数が誕生するまでは、 $\alpha$ が意味する速度定数比は原理的に信憑性に欠けたものでしかなかった。むしろ注目すべきことは、酵素反応速度論においてもっとも重要な概念である定常状態の仮定を彼らがBriggsとHaldaneよりも先駆的に取り扱っていたことである。またその結論は、MichaelisとMentenの先行研究を知らずに導きだされていたことにも驚かされる<sup>10</sup>。このような事実がありながら、Van SlykeとCullenの名は現在でもあまり広く浸透していないが、このことは論文報告のスピードが研究者にとってきわめて重要であることを意味しているのかもしれない。

### 式が成り立つ条件

前述の通りMichaelis-Menten式が成り立つには、ESの形成過程が迅速平衡、あるいは定常状態である必要がある。迅速平衡とはESからPが生じる反応が律速段階であるときESの形成反応が迅速に平衡に達する状態( $k_{-1}, k_{+1} \gg k_2$ )を言うが、これを観測から示すことは困難である。一方、定常状態とは基質濃度([S])が酵素濃度([E])に比べて十分大きい([S]  $\gg$  [E])場合に反応速度( $v$ )の速度因子である基質酵素複合体濃度([ES])が見かけ上変化しない状態( $d[ES]/dt = 0$ )を言い、これは観測から示すことができる。具体的に $d[ES]/dt = 0$ の状態は、Pの生成速度( $d[P]/dt$ )やSの消費速度( $-d[S]/dt$ )が一定、つまり $v$ が見かけ上変化しない状態から間接的に判断することが一般的である。これは定常状態の必要条件が、Pの生成過程が律速段階の基で[ES]が飽和状態であることに起因している。なお、非常に緩やかに[ES]が減少している場合を準定常状態と言い、[S]  $\gg$  [E]であれば[ES]の変化は無視でき( $d[ES]/dt \approx 0$ )、定常状態とほぼ同様な扱いとなる。(準)定常状態は、通常であればSとEを混合した瞬間に達成される(図2A)。

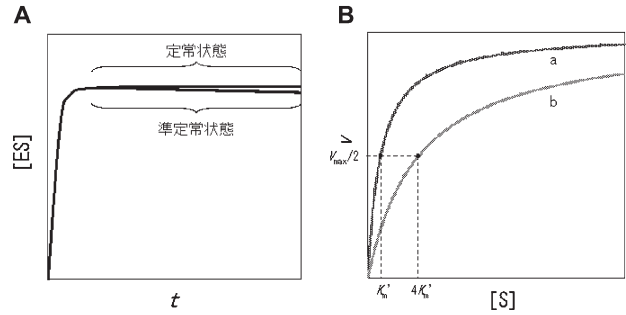


図2. (A) 酵素反応における $t$ -[ES]グラフと(B) Michaelis-Menten型の[S]- $v$ グラフ。aとbの $K_m$ の差は4倍とした。

### 式から何を読み取る？

Michaelis-Mentenの式を $v$ と[S]のグラフで表すと直角双曲線となる(図2B)。このときの最大反応速度 $V_{max}$ (= $k_2[E]_0$ )はすべてのEがESを形成したときのような極限状態の $v$ である。 $V_{max}$ はこれ以上[S]を増やしても $v$ は増加しない酵素の触媒限界を表す値であり、近づくことはできてもとうてい到達できない特別な点である。また $V_{max}$ は定数ではなく全酵素濃度([E]<sub>0</sub>)に依存するパラメータであることから相対的な意味合いしかもたないことも強調しておく。 $V_{max}$ の状態は理論的に実現困難であるから仮にその99%を $V_{max}$ とみなすならば、実測上でもっともらしい $V_{max}$ は添加物が非存在下で0次反応( $v = V_{max}[S]/[S] = V_{max}$ )になるくらい[S]が十分大きい条件下([S]  $\gg K_m$ )で求まるはずである。しかし高い[S]の条件下では、SによるEの変性やSの溶解度、およびアロステリック効果などの問題が生じる可能性があるため、安易に $V_{max}$ をこの方法で求めることは得策ではなく、後ほど述べる解析法により算出することが望ましい。 $V_{max}$ が求めれば分子活性 $k_{cat}$ も求めることが可能となる。 $k_{cat}$ はもう一つの $V_{max}$ の表し方であり、[E]<sub>0</sub>に依存しないことから酵素の回転数、すなわち単位時間あたりに酵素1モルによって変換される基質の物質質量を表している。[E]<sub>0</sub>は酵素の分子量が未知の場合は不明であることから、暫定的に $V_{max}$ を代用することも少なくない。単純なMichaelis-Menten機構であれば、 $k_{cat}$ は $k_2$ に等しく、 $k_{cat}$ は活性化エネルギーの算出や触媒能の比較などの際に用いられる。一方、 $K_m$ は酵素に固有な定数である。これはEとSの親和性において指標となるものであり、 $K_m$ が小さいほど親和性が高く、その逆は低いことを示す。特に $K_m$ は細胞内基質レベルの推定、同種酵素間の比較、生理活性物質の探索、および酵素反応機構の解明などを行う上で重要な意義がある。ただし、 $K_m$ はpHによって変化するので注意したい。これは酵素活性部位付近の側鎖の $pK_a$ が影響している場合<sup>17</sup>とSの $pK_a$ が影響している場合<sup>18</sup>があり、両者とも電荷状態の変化が主要因であ

る。したがって、異種間で $K_m$ を比較する際はpHを揃えて測定する必要がある。なおペルヒドロラーゼやラッカーゼなどの酸化酵素のように、メディエーターを介し $S \rightarrow P$ の反応が酵素外で起こる場合はESが形成されないため、このとき算出された $K_m$ に本来の意味はなく、見かけの $K_m$ として扱われることがある。一方、 $k_{cat}$ と $K_m$ が求めれば特異性定数または触媒反応効率と呼ばれる $k_{cat}/K_m$ も求めることができる。2次反応 ( $v = k_2[E]_0[S]/K_m$ ) になるくらい[S]が非常に小さい条件下 ( $[S] \ll K_m$ ) では、 $v$ の速度定数は $k_{cat}/K_m$ となる。 $k_{cat}/K_m$ は異なるSにおける特異性を比較する際に用いられる定数であり、値が高いほど特異性が高いことを示す。非常に触媒活性の高いEでは、Sが活性部位や溶液中へ拡散する速度が律速となり(拡散律速)、 $k_{cat}/K_m$ を用いて比較できる。このようにMichaelis-Mentenの式は $V_{max}$ や $K_m$ を中心に重要な情報を含んでいる。

### 解析法

現代では $V_{max}$ と $K_m$ はMichaelis-Mentenの式を基に非線形回帰分析によるカーブフィティングから容易に求まる。しかしコンピュータの発達していなかった時代にこれは非常に厄介な問題であったろう。この証拠に古くからさまざまなMichaelis-Mentenの式の変形式が用いられている。これは非線形型のグラフを線形化してプロット解析するものであり、グラフ用紙上でも解析が可能となる。古典的な線形解析法の特徴を以下に列挙した。

**Lineweaver-Burkプロット**<sup>19-20)</sup> x軸の交点 ( $-1/K_m$ ) とy軸の交点 ( $1/V_{max}$ ) から $V_{max}$ と $K_m$ を求める(図3A)。x軸 ( $1/[S]$ ) とy軸 ( $1/v$ ) の両方が逆数の関数であるため、プロットに誤差が生じやすく、特に[S]や $v$ が比較的低い場合では $K_m$ に誤差が生じやすい。注意すべき点は、[S]を等間隔に置くのではなく $1/[S]$ を等間隔に置くことであり、これにより誤差の影響は少々緩和される。一方、[S]や $v$ が比較的高い場合は、プロットが原点に近づくため $K_m$ を高く見積もってしまう。プロット解析の中ではもっとも誤差が生じやすい解析法として知られている。

**Eadie-Hofstee(Woolf-Augustinsson-Hofstee)プロット**<sup>19)</sup> 直線の傾き ( $-K_m$ ) とy軸の交点 ( $V_{max}$ ) から $V_{max}$ と $K_m$ を求める(図3B)。x軸 ( $v/[S]$ ) とy軸 ( $v$ ) の両方に $v$ の関数を含むため、 $v$ の誤差がプロットに強く影響する。広領域の[S]において測定できることが最大の利点であり、比較的高い[S]の領域で短いプロット間隔になるというLineweaver-Burkプロットの欠点が改善されている。しかし、 $v$ の測定においては高い精度が求められ、また比較的高い[S]での利用が望ましい。Eadie-ScatchardプロットはEadie-Hofsteeプロットの軸を反転させたものであり、基本的に大差はない。

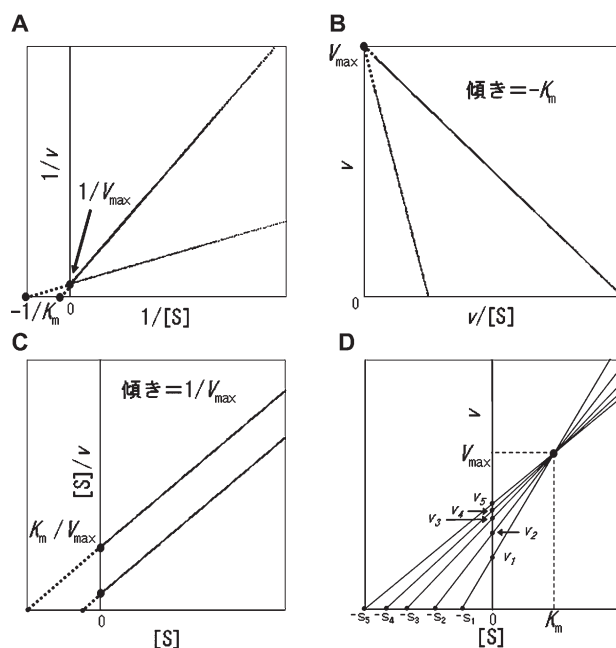


図3. 変形式のプロット図。(A) Lineweaver-Burk, (B) Eadie-Hofstee, (C) Hanes-Woolf, および(D) Cornish-Bowdenプロット。2種のプロット間における $K_m$ の差は4倍とした。

**Hanes-Woolfプロット**<sup>19)</sup> 直線の傾き ( $1/V_{max}$ ) とy軸の交点 ( $K_m/V_{max}$ ) から $V_{max}$ と $K_m$ を求める(図3C)。x軸 ([S]) とy軸 ([S]/v) の両方に[S]の関数を含むため[S]の誤差がプロットに影響する。しかし[S]の誤差は慎重な試料調製で幾分抑えられるため、 $v$ の測定において高い精度が求められるEadie-Hofsteeプロットよりは使いやすいだろう。またプロットのばらつきが偏らないことが最大の利点であり、 $v$ の測定は $K_m$ に近い[S]で行うことがより重要になってくる。

**Cornish-Bowdenプロット**<sup>19-20)</sup> これまでのプロット法とは形式がまったく異なる。 $-[S]$ をx軸上に、 $v$ をy軸上に置いたとき、両者の点を通る前方補外した直線を引く(図3D)。複数の条件で同様な操作を行うと理想的には1点の交点が得られるはずだが、実際には $v$ の誤差のため複数の交点が得られる。このとき、もっとも中央付近に存在する交点がもっとも信頼性の高い交点となり、全体の交点が奇数個ならば1点のみを選び、偶数個ならば2点を選び平均値をとる。このようにして得られた交点のx座標が $K_m$ となり、y座標が $V_{max}$ となる。統計的に優れた方法として知られており、線形解析法の中ではもっとも信頼性が高い。また、座標から直接的に $K_m$ と $V_{max}$ を読み取ることができることから利便性に優れている。ただし、作図によっては直線の交点が見づらいことがある。

**Cleland-Wilkinson法**<sup>20-21)</sup> プロット解析に非線形最小二乗計算を初めて取り入れた方法である。この

方法ではHanes-Woolfプロットで $V_{max}$ と $K_m$ を見積もった後に判定基準として非線形最小二乗計算を行う。しかし初期パラメータ推定値が乏しいため困難な方法とされていた。

**Tseng-Hsu 法**<sup>20)</sup> この方法はCleland-Wilkinson法にランダム検索技術を導入したものである。まず、ある検索範囲で $K_m$ における10通りの推定値と $V_{max}$ における50通りの推定値をHanes-Woolfプロットを用いて選び出す。ここで $V_{max}$ と $K_m$ をランダムに掛け合わせて得られる500通りの対において最小二乗計算を行い10通りの対まで絞り込む。さらに検索範囲を変化させ対の再評価を100回あるいはパラメータ推定値が変化しなくなるまで行うことによりもっともらしい $V_{max}$ と $K_m$ が得られる。古典的な解析法の中では非常に正確性の高い方法で知られているが、プロット数が25点以上になった場合に、1989年当時に発表されていたコンピュータでは能率が悪くフィッティングが困難であったようである。

現代で上述のような変形式を用いた線形分析を行う場合、手動での解析は誤差を招きやすいため、少なくとも最小二乗法による回帰分析を行うことが推奨される<sup>20,22)</sup>。しかしコンピュータを用いて線形回帰分析を行ったとしても、逆数の関数を用いるため $v$ や $[S]$ の小さな誤差が比較的大きな誤差を招くことがあり、適切な変形式の選択も要する。

このような問題に対し非線形回帰分析は、 $[S]$ や $v$ を逆数としないため $[S]$ や $v$ で生じる誤差を最小限に留めることができる。非線形回帰分析はExcelでも行うことはできるが、SYSTAT, FlexPro, EnzFitter, Origin, SigmaPlot, IGORおよびGraphPad Prismなどの解析ソフトが便利であり、Levenberg-Marquardt法のアルゴリズムが標準装備されている。またこの中にはSimplex法, 準Newton法, および全Newton法などのアルゴリズムが装備されているソフトもあり、これらはLevenberg-Marquardt法でカーブフィッティングができなかった場合に優利である。

いずれの方法を採用するにせよ $K_m$ と $V_{max}$ を決定する際に $[S]$ の範囲の選択は重要である。一般にはおおよその $K_m$ を適当な方法で求め、 $[S]$ を少なくとも $0.2 K_m \sim 2 K_m$ の範囲で再測定することが望ましい。

### 更なる式の改良

きっかけはF. Kargiによる1報の論文であった<sup>23)</sup>。前述の通りMichaelis-Mentenの式は、本来、 $[S] \gg [E]$ の条件下で成立するはずだが、彼の主張はこれとはまったく正反対の $[S] \ll [E]$ の条件下にて成立するというものであった。彼は、実際に適用させる速度式はEとSの初期濃度比 ( $[E]_0/[S]_0$ ) に依存することから $[E]_0/[S]_0 \ll 1$ の条件下では $v$ は $[S]$ よりも $[E]$ に強く依存すると説明し、

このとき適用させる式を[式2]とした。また、 $[E]_0/[S]_0 = 1$ の条件下ではSとEを混合するやいなやこれらすべてはESを形成すると仮定し、一般化した速度式 [式3]を与えた。

$$v = \frac{k_2 [S]_0 [E]}{K_m + [E]} \quad \text{[式2]}$$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \frac{[E]}{K_m + [E]} \quad \text{[式3]}$$

しかし彼が与えた速度式は、準定常状態が成立していない場合も含んでいたため、Ž. BajzerとE. E. Strehlerによりひどく不十分な近似の基にあると激しく否定された<sup>24)</sup>。彼らは数学的な観点からMichaelis-Mentenの式の正しさを証明するとともに、式の時間依存性を明確にする意味で[式3]の濃度項を初期濃度表示で表し[式4]とした。この[式4]においてはMichaelis-Mentenの式との相対誤差の評価が行われ、比較的酵素濃度が高い $[E]_0 \geq 10[S]_0$ と $[S]_0 = [E]_0$ の条件下で準定常状態の成立が示された。さらに彼らは、準定常状態の $[E]$ ,  $[S]$ および $[ES]$  ( $[E]_s$ ,  $[S]_s$ および $[ES]_s$ ) で表示された関係式 [式5-8] と $[E]_s \approx [E]_0$ および $[S]_s \approx [S]_0$ の近似から[式9]を導いた。[式9]は[式4]よりもやや複雑であるが、 $[E]_0 \geq 10[S]_0$ ,  $[S]_0 = [E]_0$ および $[S]_0 \geq 10[E]_0$ という広領域の条件下で成立し、またMichaelis-Mentenの式よりも正確であることが示された。しかし、[式4]と[式9]の両方で使用可能な $[E]_0 \geq 10[S]_0$ の条件下は、準定常状態が短い時間のため実際の測定にはあまり向かないとされている。彼らは準定常状態が比較的長い $[S]_0 \geq 10[E]_0$ の条件下で[式9]の使用を推奨している。

$$v = \frac{V_{max} [S]_0}{K_m + [S]_0} \frac{[E]_0}{K_m + [E]_0} \quad \text{[式4]}$$

$$v = k_2 [ES]_s \quad \text{[式5]}$$

$$K_m [ES]_s = [E]_s [S]_s \quad \text{[式6]}$$

$$[E]_s = [E]_0 - [ES]_s \quad \text{[式7]}$$

$$[S]_s \approx [S]_0 - [ES]_s \quad \text{[式8]}$$

$$v = \frac{2k [S]_0 [E]_0}{[S]_0 + [E]_0 + K_m + \sqrt{([S]_0 + [E]_0 + K_m)^2 - 4[S]_0 [E]_0}} \quad \text{[式9]}$$

### 添加物の影響

添加物は酵素活性に何らかの影響を及ぼすことも少な

くない。一般に酵素活性を増加させる添加物を活性化剤、低下させる添加物を阻害剤 (I) と呼ぶ。なお、酵素の立体構造を変化させ反応速度に影響を及ぼす小分子をエフェクターと呼び、活性化を引き起こすものを正のエフェクター、阻害作用を引き起こすものを負のエフェクターと呼ぶ。これらは活性部位とは異なる部位で結合し、活性化定数 ( $K_a$ ) と阻害定数 ( $K_i$ ) は活性部位との結合に関与する  $K_m$  とは物理的意味で異なる。これらの定数は共通して結合部位の立体構造に関する知見を与える。阻害機構は不可逆的阻害と可逆的阻害に大別され、さらに可逆的阻害は拮抗阻害 (競争阻害)、非拮抗阻害 (非競争阻害)、不拮抗阻害 (反競争阻害) および混合阻害に分類される。これらの特徴を以下に示す。

**拮抗阻害 (competitive inhibition)** IがEの活性部位のみに結合する形式であり、活性部位との結合をSと競う。[S]を増加させると阻害作用は減少する。 $K_m$ は増加するが  $V_{max}$  は変化しない。

**非拮抗阻害 (noncompetitive inhibition)** エフェクターの影響による酵素の立体構造の変化がSからPへの変換を阻害する形式であり、EとESの両者を阻害する。 $K_m$ は変化せず  $V_{max}$  は減少する。

**不拮抗阻害 (uncompetitive inhibition)** IがESのみに結合する形式であり、2種のSをもつ酵素に多いタイプである。 $K_m$ と  $V_{max}$  の両方が同じ割合で減少する。

**混合阻害 (mixed inhibition)** 拮抗阻害と非拮抗阻害の混合型や非拮抗阻害と不拮抗阻害の混合型が存在する。Sが高濃度になるとS自身が負のエフェクターとなることがあり、これを基質阻害という。 $K_m$ の増加と伴に  $V_{max}$  は減少する。

$K_i$ を求めるには、まず阻害様式を決定する必要がある、一般的にLineweaver-BurkプロットやHendersonプロット (図4A) で識別できる<sup>25)</sup>。後者のプロットによる阻害様式の判定はI存在下で[S]の増加と伴に直線の傾きが増加するのであれば拮抗阻害、逆に減少するのであれば不拮抗阻害、一方変化しないのであれば非拮抗阻害となる。

強い阻害剤 ( $[I] \approx [E]$ ) の  $K_i$  の具体的な算出には、線形型のHendersonプロット、あるいはMorrisonの式 [式10]<sup>25)</sup>を用いた非線形回帰分析を行う。ただし、HendersonプロットやMorrisonの式から求まるものは見かけの  $K_i$  ( $K_i^{app}$ ) であり、[式11-13]を用い  $K_i$  への変換を要する。このとき [式12] の  $\alpha$  は複合体ESIの形成過程に反映されるファクターであり、 $\alpha = 1$  であれば  $K_i^{app} = K_i$  となる。HendersonプロットはMorrisonの式を変形したものであり、I存在下の活性 ( $v_i$ ) と非存在下の活性 ( $v_0$ ) の比を酵素活性比 ( $v_i/v_0$ ) とする。 $K_i^{app}$  は  $v_i/v_0$  (x軸) と  $[I]/(1 - v_i/v_0)$  (y軸) の直線プロットの傾き ( $K_i^{app}$ ) から求まるが<sup>8)</sup>、可能であればMorrisonの式を用いて非線形回帰分析を行うことが望ましい。

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_0 + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E]_0 + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E]_0[I]}}{2[E]_0} \quad \text{[式10]}$$

$$\text{拮抗阻害: } K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad \text{[式11]}$$

$$\text{非拮抗阻害: } K_i^{app} = \frac{\alpha K_i (K_m + [S])}{\alpha K_m + [S]} \quad \text{[式12]}$$

$$\text{不拮抗阻害: } K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad \text{[式13]}$$

一方、弱い阻害剤 ( $[I] \gg [E]$ ) の場合は、Dixonプロット (図4B)<sup>25-26)</sup>を用いて算出する。Dixonプロットでは、[I] (x軸) が及ぼす  $v$  の影響を  $1/v$  あるいは  $[S]/v$  (y軸) でプロットしたとき、異なる二つ以上の[S]の検討において得られてくる直線の交点から求める方法であり、その交点のx座標 ( $-K_i$ ) から  $K_i$  が求められる。拮抗阻害では  $[I]-1/v$  のプロットが用いられ、不拮抗阻害では  $[I]-[S]/v$  のプロットが用いられる。非拮抗阻害ではどちらのプロットでも良い。

### 中間体の実証

これまでの酵素反応速度論は[S]や[P]の化学量論的な関係により成立していたため、これらの計測が注目される一方で中間体ESの存在は計測上では無視されていた。Henriが[式1]を与えたときにESの形成を仮定したことはすでに述べたが、実際にはESが必須の産物でなく無用の産物であったとしてもMichaelis-Mentenの式は成立する。これは[ES]の変化が無視できる時間域で測定を行っているためであり、酵素自身の変化はブラックボックスの状態にある。ESの存在はX線結晶構

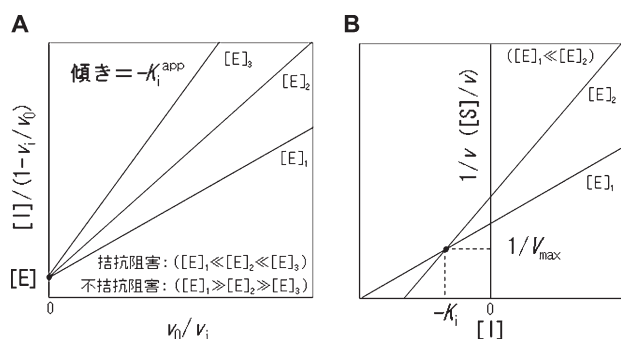


図4. (A) Hendersonプロットと(B) Dixonプロット

造解析などで証明できるが、ESが必須の産物であることを証明するには、[ES]と[P]の変化において相関関係を得る必要がある。これまでのように寿命の長い化合物を測定対象とした定常状態の速度論ではこれ以上の情報を得ることができないため、ESのように寿命がきわめて短い中間体を追跡する遷移相の速度論が展開される。一般にはストップフロー法などの高速反応測定法が利用されるが、近年ではNMR測定法も盛んに利用されている。NMRでは追跡物質が原子レベルで識別されるため広範囲の物質に利用でき、多段階反応過程におけるさまざまな中間体をSやPと同時にリアルタイムで追跡できる<sup>27-29</sup>。測定には<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>Pおよび<sup>19</sup>Fなどの原子が指標となり、糖類、補酵素、ATPなどのリン酸塩類および含フッ素誘導体などに用いられる傾向がある。また速度論解析に加え多次元NMR解析を併用することで、遷移状態にある酵素の詳細な構造変化も捉えられてきた<sup>30-31</sup>。現在の酵素反応速度論は、古典的な定常状態の速度論から遷移相の速度論に移行していく傾向にある<sup>32</sup>。

#### おわりに

速度論解析から正しい結論を導き出すには、少なくとも適切な測定法に基づいた条件設定が配慮されなくてはならない。これまでに述べた解析法はあくまでも数学的手法によるデータ解析であり、常に正確な測定値が前提にある。やはり歴史的観点から酵素反応速度論を考察しても、速度論の根本には測定法や条件設定の問題が付随しており、これらが結論を揺るがす要因になりえることは明白である。本稿では特にこれらの点には触れなかったが、活性測定を行う際は基質、酵素、緩衝剤および溶媒などの性質を念頭に置き、安定性やpHには特に注意を払っていただきたい。

Michaelis-Mentenの式の誕生を振り返るにあたり、Henriの過ちを見抜き追試実験を行ったMichaelisとMentenの心意気には感銘を受ける。実に正確で豊富なデータを取り揃え、約40頁にわたって詳細に論じている。他を否定し己を肯定するためには多大な労力を要し、その労力は追試実験による正確かつ豊富なデータの蓄積に他ならない。また、「pHの概念が存在した時代にもHenriの実験があったなら……」などといふ考えが生まれるが、このことは一つの研究においても他の多くの研究や技術に支えられていることを物語っており、研究には幅広い視野が必要であること示しているのではないだろうか。

Michaelis-Mentenの式はすべてMichaelisとMentenによって作られたものと思われがちだが、その誕生譚は実に興味深い。このように式一つとっても最終的に理論が完成されたあかつきには、根底にあった不確かな仮説、前提および手法などのさまざまなプロセスは削ぎ落とさ

れ、普段は科学の美しい部分ばかりを目の当たりにするが、泥臭く思える改良のプロセスがいかに重要であるかを我々はこの歴史的事実から学ぶことができるだろう。先人らの恩恵を再確認する意味も含め、本稿が読者の研究に少しでも貢献できれば幸いである。

#### 文 献

- 1) Michaelis, L. and Menten, M. L.: *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913).
- 2) Michaelis, L. and Menten, M. L.: *FEBS Lett.*, **587**, 2712 (2013).
- 3) Johnson, K. A. and Goody, R. S.: *Biochemistry*, **50**, 8264 (2011).
- 4) Colquhoun, D.: *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 149 (2006).
- 5) Nagatsu, T.: *FEBS Lett.*, **587**, 2721 (2013).
- 6) Wilhelm, L.: *Ann. Phys. Chem.*, **157**, 413 (1850).
- 7) O'Sullivan, C. and Tompson, F. W.: *J. Chem. Soc.*, **57**, 834 (1890).
- 8) Brown, A. J.: *J. Chem. Soc.*, **81**, 373 (1902).
- 9) Henri, V.: *C. R. Biol.*, **329**, 47 (2006).
- 10) Cornish-Bowden, A.: *FEBS Lett.*, **587**, 2725 (2013).
- 11) Myers, R. J.: *J. Chem. Educ.*, **87**, 30 (2010).
- 12) Michaelis, L. and Davidsohn, H.: *Biochem. Z.*, **35**, 386 (1911).
- 13) Hudson, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **30**, 1160 (1908).
- 14) Briggs, G. E. and Haldane, J. B.: *Biochem. J.*, **19**, 338 (1925).
- 15) Van Slyke, D. D. and Cullen, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **19**, 141 (1914).
- 16) Falk, K. G.: *J. Biol. Chem.*, **28**, 389 (1917).
- 17) Kasserra, H. P. and Laidler, K. J.: *Can. J. Chem.*, **47**, 4022 (1969).
- 18) Jones, D. D. and Miller, W. G.: *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.*, **159**, 411 (1968).
- 19) Cornish-Bowden, A.: *Principles of enzyme kinetics*, p. 14, Butterworth (1976).
- 20) Berges, J. A. et al.: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **114**, 175 (1994).
- 21) Cleland, W. W.: *Adv. Enzymol.*, **29**, 1 (1967).
- 22) Eienthal, R. and Danson, M. J.: *Enzyme Assays: A practical approach*, p. 277, Oxford (1992).
- 23) Kargi, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 157 (2009).
- 24) Bajzer, Ž. and Strehler, E. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 982 (2012).
- 25) Copeland, R. A.: *Enzyme. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, p. 305, Wiley-VCH (2000).
- 26) Cornish-Bowden, A.: *Biochem. J.*, **137**, 143 (1974).
- 27) Okar, D. A. et al.: *Biochem. J.*, **308**, 189 (1995).
- 28) Mulquiney, P. J. et al.: *Biochem. J.*, **342**, 567 (1999).
- 29) Papeo, G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5665 (2007).
- 30) Haupt, C. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11154 (2011).
- 31) Kern, D. et al.: *Methods Enzymol.*, **394**, 507 (2005).
- 32) Johnson, K. A.: *FEBS Lett.*, **587**, 2753 (2013).