

酵素作用機序

The Mechanism of Enzyme Action

(昭和 21 年 12 月 第 5 回 大學講演會 演說要旨)

千葉醫科大學醫化學教室

教授 赤 松 茂

Akamatsu-Shigeru

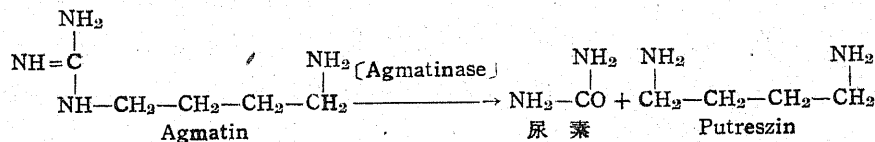
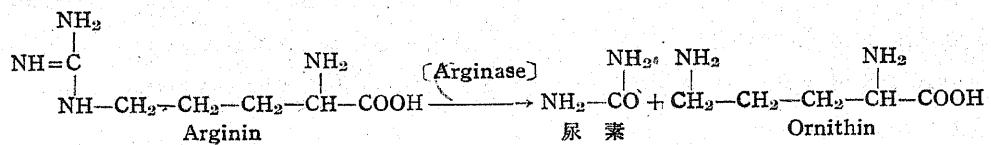
酵素の作用機序，即ち酵素は如何にして作用するかにつき私共の實驗を材料として述べる。酵素が示す嚴格なる特殊性と各酵素固有の至適酸度の發現とは酵素研究の根本問題で，これにつき以下私は論ずるが，それに先ち述べたいのは酵素が觸媒であり，觸媒は化學反應速度を大にするが，化學平衡の位置をば變ぜざるもの故に，酵素は非酵素的に自然に進行する反應を單に促進するといふ原則の證明である。これは Kreatino-mutase 實驗で明かにされた。

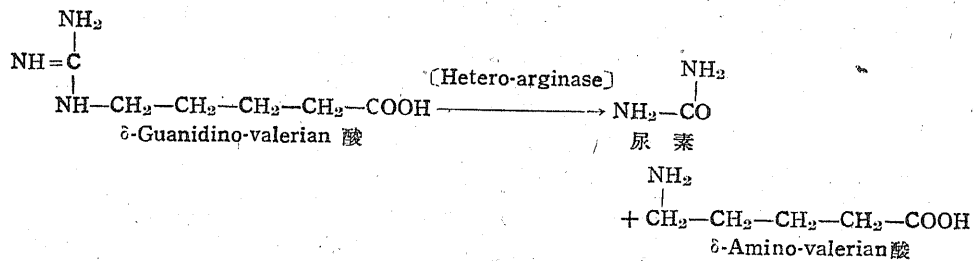
Kreatinin と Kreatin とは酸，Alkali 作用で相互に移行する。この可逆反應を觸媒する酵素の存在は疑問視されて居たが，Gram 陽性の 1 土壤菌にある私共の Kreatino-mutase は至適酸度 pH 7 でこの反應を營み，Kreatinin から或は Kreatin から出發しても Kreatinin/Kreatin = $^{42.5}/_{57.5}$ の比で相互移變が止まる。その所要時間は 2-3 日で，酵素なしでは 11 月を要する。Kreatinin 又 Kreatin 液が pH 7 で非酵素的に長時間後に到達すべき Kreatinin/Kreatin の比率 (Q) は溫度によりて相違する。

	25°	50°	70°	100°
Q	0.540	1.02	1.59	2.89

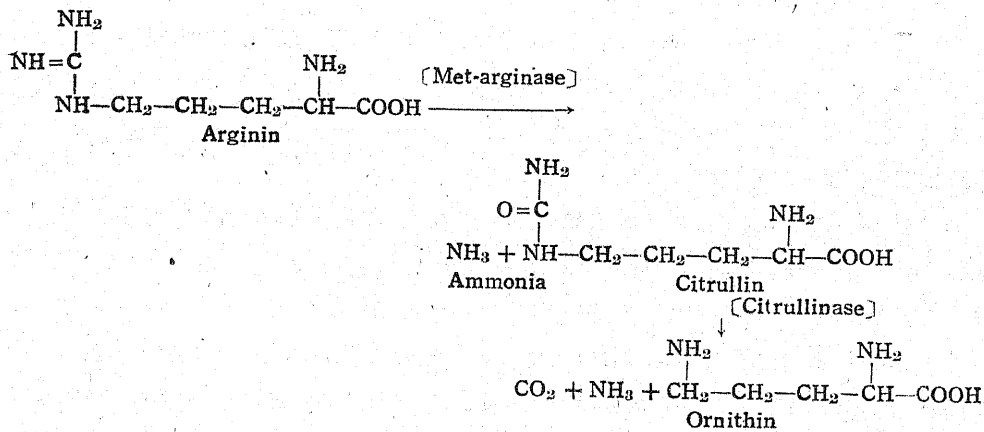
van't Hoff の恒壓平衡式にこの數値を代入して得られる次式 (T は絕對溫度) から， $\log Q = \frac{-1084}{T} + 3.3652$ 37°C の Q 値を求めると $^{42.5}/_{57.5}$ を得て，酵素實驗成績と一致する。なほ 50°C の Q 理論値は 1 で，酵素試驗でも $^{50}/_{50}$ で平衡に到達する。

さて酵素特殊性の問題を要約すれば基質化學構造と特殊性との關係及び特殊性發現の機因となる。前者について私共は磷酸酵素で多くの實驗をして居るが，茲には Arginin 分解に関する實驗成績を述べる。





Agmatin は Arginin の脱 CO_2 化されたもの、Guanidino-valerian 酸は脱 NH_2 化されたものであるが、いずれも Arginase で侵かされない。Agmatin は大腸菌にある酵素 (Agmatinase と命名する) で水解され、この酵素は Arginin も Guanidino-valerian 酸も侵かさぬ。家兎小腸粘膜にある酵素 (Hetero-arginase と命名する) は Guanidino-valerian 酸を水解するが、Arginin, Agmatin に作用せぬ。これらがみな Arginase で水解されるとの従來の報告は誤りである。この様に Guanidino 基を侵かす酵素も基質他部分の構造變化により相異なる。Strept. foecalis にある私共の Met-arginase なる酵素は上述の Arginin に作用して、Guanidino-基を侵しながら 1 分子 Ammonia を生ずる。



故に Strept. foecalis が Arginin から Ornithin を產生すると外国の報告は Met-arginase と他酵素 (Citruilinase と命名する) との協同作用結果といふことになる。

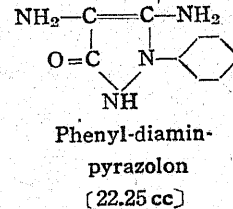
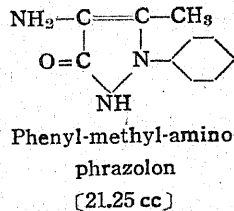
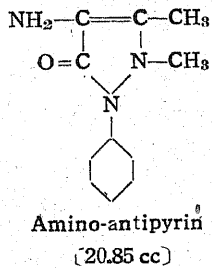
なほ Hetero-arginase で水解される Guanidino-valerian 酸の同族列に對するこの酵素の態度から側鎖 C 数がまた特殊性を支配するを知る。

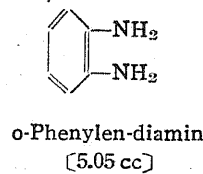
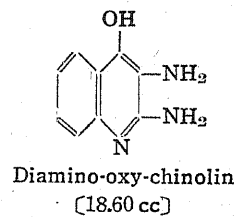
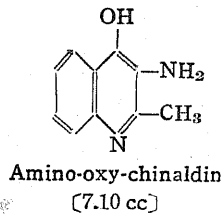
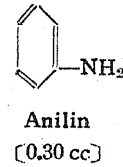
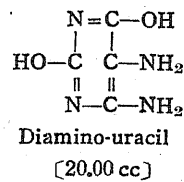
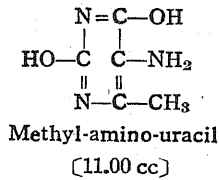
上述の諸酵素による Guanidino-化合物の水解は Arginin の代謝を新たなる觀點から見直ほさせるが、こゝには省略する。これら酵素の基質特殊性に關して得られた新實驗例は酵素の分子内に基質と甚しく近似なる原子團の存在を想定しなくては説明し得ない。これを私共は酵素模型研究で明かにし得た。

Guanidino-脂酸	Hetero-arginase による水解
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ <p>Guanidino-capron 酸</p>	(-)
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ <p>Guanidino-valerian 酸</p>	+
$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ <p>Guanidino-酪酸</p>	+
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ <p>Guanidino-propion 酸</p>	(-)
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}=\text{C} \\ \\ \text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$ <p>Guanidino-醋酸</p>	(-)

Acet-醋酸の脱 CO₂ 反応が Anilin により接觸的に促進され、その至適酸度 pH 4 たるは夙に知られて居た。

Acet-醋酸 1 m 液 1 cc から、 $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$ により 37° にては CO₂-Gas 25 cc を生ずべきである。觸媒として Amino-化合物^{m/10} 液 0.5 cc を加へたが、Anilin の力は甚だ弱い (下表に附記の cc は 10 分後の發生 CO₂ 容である)。種々の化合物を供試したが皆弱い。たゞ o-Phenylene-diamin が稍々強い。但し m-及び p-體は Anilin 程度。處が Amino-antipyrin が甚だ強力なるを發見したが、その強作用能發見原因は結局その分子内に基質 Acet 醋酸と近似なる原子團の存在に求めらるべきで、Phenyl-methyl-amino-pyrazolon, Methyl-amino-uracil, Amino-oxy-chinaldin の有効たるはこれを實證する。これらの化合物の作用能は丁度 Anilin が o-Phenylene-diamin となりて強力となる様に Diamino-體となりて一層強くなる。





これら酵素模型が何故に至適酸度を pH 4 に示すか。私共は磷酸酵素研究に際し或種化合物の非酵素的自家水解速度が専らそれらの解離状態により左右されるを観察したが、この考へを Acet 醋酸が Amino-化合物例へば Anilin により脱 CO₂ される反應に適用しつゝ、Acet 醋酸と Anilin の結合體たる Schiff-鹽基がその非解離分子型で不安定のため自家分解して CO₂ を發生し、他方かの結合體生成量は非解離 Anilin 濃度に比例するとせば、CO₂ 發生速度 (V) 並にその極大値を示す pH は次式により與へられる。

$$V = K \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_A}{h} + \frac{K_B}{K_W} \cdot h + \frac{K_A \cdot K_B}{K_W}} ; \quad \text{pH} = \frac{\text{p}K_A + \text{p}K_W - \text{p}K_B}{2}$$

Acet 醋酸の pK_A を 3.5, Anilin の pK_B を 9.34 として算出される至適 pH 4.1 は實驗値と一致した。酵素反應にても酵素と基質との結合體生成及びその自家崩壊が pH により左右されるために至適酸度が發見すると云ふべきである。しかしそれに先驅して、酵素反應の基質特殊性を決定すべき酵素・基質結合が行はれねばならぬ。これを論ずるため私共の β-Hexosidase 實驗成績を見やう。

この實驗に p-Nitrophenol-β-glucosid 及び同 Galactosid が供せられた。それは磷酸酵素、硫酸酵素試驗にて成果を擧げた私共の p-Nitrophenol 法の應用で、甚だ稀薄なる基質液で實驗し得るし、還元性また旋光性物質多量添加試験も可能である。供試兩基質を Takadiastase 及 Emulsin が水解する反應を諸糖誘導體が抑制する關係から、β-Hexosidase には Taka 型と Emulsin 型とがあるを知つたが、各型の β-Glucosidase と β-Galaktosidase との天然獨自的存在をも確認し、この兩酵素は相等しからずとの證明をなすを得た。(次頁の表参照)

この抑制關係から考察して Taka-型酵素は基質の Glucose 又は Galactose 部位に先づ結合し、次に β-Hexosid 部位に結合する、Emulsin 型酵素はそれと逆に先づ β-Hexosid 部位に結合し次に Glucose 又は Galactose 部位に結合すると云ひ得る。即ち β-Glucosidase 及び

基質	Aglucon	p-Nitrophenol-			
	Hexosid	β-Glucosid	β-Galactosid	β-Glucosid	β-Galactosid
酵素	型	Taka 型		Emulsin 型	
	種	β-Glucosidase	β-Galactosidase	β-Glucosidase	β-Galactosidase
	天然單獨存在	モロコシ	豚脾	Prol. Vulgaris	Bac. coli commun
添加物質と抑制強度	Glucose	++	○	○	○
	Glucon 酸	+++	○	○	○
	Phenol-β-Glucosid	++	○	+	+
	Glucon 酸-γ-lacton	+++	○	+++	+++
	Galactose	○	++	○	○
	Galacton 酸	○	++	○	○
	Phenol-β-galactosid	○	++	+	+
	Galacton 酸-γ-lacton	○	+++	+++	+++

Galactosidase には夫々基質の兩原子團と近似なる化學構造を持つ原子團(親和簇)があり、この第1親和簇を以て基質と結合して第1次結合體を形成し、次にこの結合體中にて酵素第2親和基と基質第2原子團との間に結合が行はれて第2次結合體を生ずる。これらの結合體生成は構造近似性に基き行はれる分子反應であるから溶液のpHによりて影響されぬ; 基質特殊性を決定する反應はpHに左右されないといふのが私共の所論である。第2次結合體中にて酵素第3親和基が基質第3原子團と結合し、この中間體の生成と自家崩壊とはpHによりて左右せられる。これが至適酸度發現の原因たるは酵素模型實驗にて論じた通りである。かくて酵素は3つの親和基を有し基質原子團と順次結合して水解反應を營む。これが私共の提唱する酵素3親和力説である。

さて第1次結合體生成量 J_1 と基質濃度 S との間には質量作用法則に基き $J_1 = S/(S + Km)$ 式が成立つ。 Km は第1次結合體の解離恒數である。第2次結合體生成量 J_2 は J_1 に正比例する、 $J_2 = K_2 J_1$ 。第3次結合體生成量 J_3 はpHが一定なれば、 $J_3 = K_3 J_2$ 、故に所定のpHにての酵素反應速度 V と S との間には $V = K \cdot S / (S + Km)$ なる關係が成立する。上式の $S / (S + Km)$ が1となる時即ち S が充分大にして總ての酵素が基質と第1次結合體を形成したときの酵素活性度を1とし、活性度と pS (S の逆數の對數) との關係を圖示すると活性度 pS 曲線が得られる。この曲線はS型經過をとるのが通則であり、實際に Emulsin, 豚脾, Takadiastase が p-Nitrophenol-β-galactosid を, Emulsin, モロコシが p-Nitrophenol-β-glucosid を水解する時に認められ、活性度 0.5 に相應する横軸上の點は pKm 即ち第1次結合體の Km の逆數の \log 値を示す。その數値は酵素と基質が異れば相違する。ところが Takadiastase が β-Glucosid を水解する反應の活性度 pS 曲線は Bell 型經過を示して一見何とも説明し難いが、この場合第1

次結合體生成と共にほこの結合體が第2次親和基にて過剩基質第2原子團と結合する副反應が並發すると考へて、第1次結合體の K_m をば同型酵素たるモロコシの K_m とし、副反應による結合體の K_m をば Eulsin の K_m と相等しとして理論的に扱ふと、理論曲線は Bell 型経過をとり、而も實驗曲線と全く一致する。上述せる様に Taka 型酵素は先づ Glucose 部位と、次で β -Hexosid 部位と結合し、反之 Emulsin 型酵素は逆に先づ β -Hexosid 部位と結合すると私共は想定した。今 Takadiastase にてその第1次結合體が第2親和基にて過剩基質の β -Hexosid 部位と結合する反應に關する K_m が、 β -Hexosid 部位と先づ結合する Emulsin の K_m と相等しきは上述の想定を立證する。

一般に酵素反應速度は第3物質添加により影響せられる。この添加物質が酵素の第1、第2、或は第3親和基に結合するかによりて抑制機序が相違する。かく分析的に考察すると文献に記載された諸抑制試験の結果を理論的に解説することが出来るが、茲には詳論するを略す。

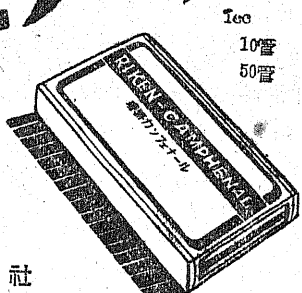
かくの如く酵素の基質特殊性は酵素第1及第2親和基が基質分子中の原子團と構造上近似たるに基くが、水解反應を誘發する第3次結合體生成に關與する第3親和基の構造はなほ覗ひ知るを得ない。酵素は一般に蛋白性の Apo-酵素と非膠質性の CO-酵素とから成るとせられ、この CO-酵素にかの第3親和基の存在を考へるが妥當である。私共は磷酸酵素の CO-酵素が Histidin たるを認めた。しかしこの Amino 酸が何故に CO-酵素の役を演ずるやは今のところ全く測り難い。この點につき研究を進めたく思ふて居る。

強心剤

信頼される理研製品

理研カンフェナル

カンフル酸化誘導體中、最も有効なりと認めらる、10 apocamphor 1 aldehyde (ベータオキソカンフル)の1%水溶液にして、その強心呼吸興奮作用は既に定評あり



100
10管
50管

製造元 東京文京區 理研榮養藥品株式會社