

(44) (照井) 酵素反応速度に對する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I: 理論的要約)

した速度式が正しいものである限り時間に依て變化しない. 酵素の初發濃度を E_0 とすれば, 酵素破壊が起らぬ時の, 實驗より計算された反應速度恒數 k_r は當然

$$k_r = kE_0 \dots\dots\dots (1)$$

である. 酵素の破壊が起るならば一定温度に於て任意の時間 t (秒又は分數をとる) に於ける活性酵素濃度 E は,

$$E = E_0 \cdot f(t) \dots\dots\dots (2)$$

に依て表はされる. 但し $f(t)$ は時間の或る函数であり, 單位濃度の酵素が時間と共に如何に減少するかを示す. 従て時間 $0-t$ に就て計算された k_r は, 見掛け上の値となり, kE_0 に等しくない. 之を k_r と區別して k_r' と記號すると, (3) 式の如くなり.

$$k_r' = \frac{1}{t} kE_0 \int_0^t f(t) dt \dots\dots\dots (3)$$

$$(\text{有効積分酵素量}) \equiv E_0 \int_0^t f(t) dt \equiv \Phi \dots\dots (4)$$

(4) 式の定義を用ひると $k_r' = k\Phi/t$ となる. 以上の關係に就ては論義の餘地はない.

然らば, T_{opt} に對し式に於て如何なる定義を與へるのが最も合理的であるか. その答は上の關係から自ら判明する如く, “他の測定條件を一定とし温度のみを變數にとつた場合 ($k \cdot \Phi$) を最大ならしむる様な温度” であり, 當然 (5) 式を満足する温度である.

$$\left. \begin{aligned} \frac{\partial(k \cdot \Phi)}{\partial T} = 0; \quad k \frac{\partial \Phi}{\partial T} + \Phi \frac{\partial k}{\partial T} = 0 \\ \text{又は} \quad \frac{\partial \ln k}{\partial T} = - \frac{\partial \ln \Phi}{\partial T} \end{aligned} \right\} \dots\dots (5)$$

(5) 式に既知の諸關係を適用する事に依り, 最適温度とは物理化學的に如何なる要約を満足せるものであるかを, より具體的に述べる事が出来るであらう.

先づ酵素の一定温度に於ける破壊速度式であるが, これは, 1次反應式として一般に承認されてゐる處である. その速度恒數 (破壊恒數) を Z とすれば

$$Z = \frac{1}{t} \ln \frac{E_0}{E}, \quad \text{又は} \quad E = E_0 \exp(-Zt) \dots\dots (2')$$

$$\therefore \Phi = E_0 \int_0^t \exp(-Zt) dt = E_0 \left\{ \frac{1 - \exp(-Zt)}{Z} \right\} \dots\dots (4')$$

$$\therefore k_r' = \frac{1}{t} \cdot k \cdot E_0 \left\{ \frac{1 - \exp(-Zt)}{Z} \right\} \dots\dots (3')$$

(3') に於て $Z \rightarrow 0$ の極限值は當然 (1) 式になる. 即ち,

$$\lim_{z \rightarrow 0} k_r' = \lim_{z \rightarrow 0} k \cdot E_0 \exp(-Zt) = kE_0 = k_r$$

以上の諸關係は之を導出した前提が成立する限り, 基質變化の反應が如何なる速度式に従ふとも成立すべきで, その一々の證明は省略する. k_r は基質充分ならば酵素濃度に比例する事も明かであり, 連鎖反應に於てすら此事が成立するのである²⁾. 零次~2反應に對して結果は次表の如くなり, 又 MICHAELIS 恒數が入つても, 反應生産物の拮抗的阻害が入つても, 相當する速度式を適用すれば差支ない.

(5), (4') の關係より

$$\frac{\partial \ln k}{\partial T} = - \frac{\partial \ln \Phi}{\partial T} = \left(1 - \frac{Zt}{\exp(Zt) - 1} \right) \frac{\partial \ln Z}{\partial T} \dots\dots (6)$$

即ち最適温度は最初の酵素量に無關係に出現する. 又一方に於て $\ln k$, $\ln \Phi$ の温度に依る變化率には(7)式の關係がある.

(照井) 酵素反応速度に対する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I : 理論的要約) (45)

$Z > 0$ \dots $k_r = k \frac{\Phi}{t} =$ <hr style="border-top: 1px dotted black;"/> $Z = 0$ \dots $k_r = k E_0 =$	zero order $\dots \frac{1}{t} (X_0 - X)$ 1st order $\dots \frac{1}{t} \ln \frac{X_0}{X}$ 2nd order $\left\{ \begin{array}{l} \dots \frac{1}{t} \frac{X_0 - X}{X_0 X} \\ \dots \frac{1}{t(X_0 - Y_0)} \ln \frac{Y_0 X}{X_0 Y} \end{array} \right.$
但し X_0, Y_0 は基質初濃度, X, Y は経過時間 t に於ける基質濃度である. $X_0 \neq Y_0$.	

$$\frac{\partial \ln k}{\partial T} = \frac{\mu}{RT^2}; \quad \frac{\partial \ln Z}{\partial T} = \frac{\mu_z}{RT^2} \dots (7)$$

茲に μ は酵素の破壊を捨象して與へられる所の反応の活性化エネルギー μ_z は酵素破壊反應の活性化エネルギー (ARRHENIUS) を示す.

(6)の右邊の指數函數を展開し, (7)を代入し, 更に整理して容易に次式が得られる.

$$W_\epsilon = \frac{1}{|2} Zt + \frac{1}{|3} (Zt)^2 + \dots, \dots (8a)$$

又 (2')の實驗式を適用して

$$W_\epsilon = \frac{1}{|2} \left(\ln \frac{E_0}{E} \right) + \frac{1}{|3} \left(\ln \frac{E_0}{E} \right)^2 + \dots, \dots (8b)$$

但し, $W_\epsilon = \frac{\mu}{\mu_z - \mu} \dots (9)$

(8)の關係は多數の酵素に就ては, 更に簡略化して適用し得る. 即ち常溫より高い溫度に就ては多數の酵素の μ は 15 Kcal 以下であり又 μ_z は大部分 40 Kcal 以上⁴⁾である¹³⁾. この場合 (8)に於て,

$$f(Zt) \leq 0.6 \dots (10)$$

となり, 第2項以下を無視しても多くの場合大差はない. 即ち,

$$2W_\epsilon \cong Zt = \ln \frac{E_0}{E} \dots (11)$$

又, μ, μ_z は適用溫度範圍に於て近似的に $\Delta H^*, \Delta H_z^*$ に等しいものとして,

$$2W_\epsilon \cong 2W_H = \frac{2\Delta H^*}{\Delta H_z^* - \Delta H^*} \cong Zt \dots (11')$$

と書表はし得る. 但し $\Delta H^*, \Delta H_z^*$ は, 夫々基質變化及び酵素破壊に對する活性化熱で, 既明なる如く,

$$\Delta H^* = \mu - RT; \quad \Delta H_z^* = \mu_z - RT \dots (12)$$

この場合最適溫度とは (Zt) が, 活性化エネルギー (乃至活性化熱) の關係に依て規定される或る値 $2W_\epsilon$ (乃至 $2W_H$) に等しい様な溫度と云ふことが出来る. Zt は W_ϵ と同様無次元の數値として表はし得る事勿論である*.

▲ 水解酵素の場合, 35°C以上では $\mu < 10 \text{ Kcal}$ と見て殆で差支ない.
 又 μ_z に就ては例外的に胎貝 Catalase の 10 Kcal が報告され⁴⁾てゐるが, 血液 Catalase では 45 Kcal である⁵⁾. 水解酵素に於ける μ_z の例外は Asclepain(s) の 25 Kcal がある⁶⁾. 併し Asclepain(m) に就ては 76 Kcal と報告されてゐる.

* Zt は E_0/E なる比の對數として表はし得る故に.

(46) (照井) 酵素反応速度に対する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I: 理論的要約)

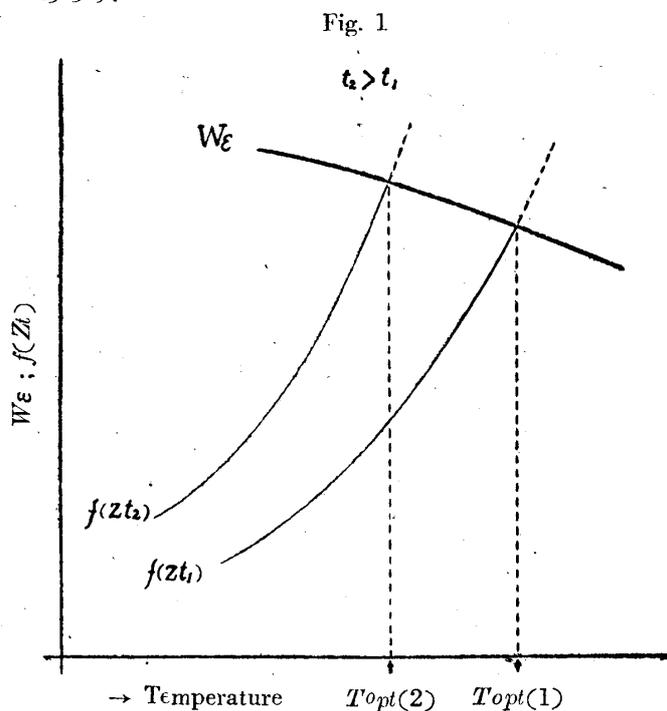
(10) が略正しく成立する多くの酵素に就ては (11), (2') の関係より, T_{opt} は酵素破壊率 $(1-E/E_0) \times 100$, が実験時間に於て約70%以下なる所にある事を示す. 又例外的に μ の大なる酵素 (Urease に関する VAN SLYKE⁴⁾ の所與より) にして約20 Kcal を示すものは, (8) 式は第3項までを計算する必要がある. 併し斯る異状に大なる μ は, KISTI AKOWSKY 等の検討した結果に依れば低温部に於て特殊の阻害因子の作用が大に現はれた爲めとも見做され, 同氏等は Urease に對する正常な値として8.839 Kcal を與へてゐる⁷⁾.

以上の式 (8)~(11) が正しく成立する爲めには, 反応しつつある條件に於て酵素破壊が1次反應に従ふものでなくてはならないが, (5) の條件は一般的に成立すべきである.

第1圖は (8~11') の関係を略示したものである. μ 又は ΔH^* は, 測定温度範圍に於て一定なるか又は T と共に減少する. 一方に於て μ_2 乃至 ΔH_2^* は T と共に若干増加する傾向がある³⁾. 従つて W_e は T と共に減少する傾向がある. Z は温度と共に(7) に従て増加し増加率は k よりも可成り大である.

$f(Zt)$ 線と W_e 線との交點に依り T_{opt} の位置が決定される. Z の大なる酵素或は反應時間の長なる測定では $f(Zt)$ 線が高く, 又 μ_2 の高い酵素では W_e が低くなり孰れの場合にも T_{opt} が低温部に移行する等, 最適温度象現が第1圖に依て最も明瞭に説明される.

併し $\mu_2 < \mu$ なる場合には Duclaux 的最適温度は (8) の前提が成立する限り原理的に存在し得ない事になる. この場合 T を上昇して μ_2 が増加するか E が減少するかに依り, $W_e > 0$ となつて甫て T_{opt} が出現することが考へられる. ($\mu_2 - \mu \leq 0$ なる場合は原理的には考へられるが實際問題としては起らないであらう.



W_e 線は實驗的に求める事が可能であるから任意の酵素及び反應條件に就て, 第1圖の様な最適温度特性圖を求める事は敢て困難ではなからう. 上の関係よりして, W_e を以て最適温度障壁と呼ぶのが適當である.

■ “絶対最適温度”(T_{A0})

多くの水解酵素は, 反應速度温度關係から求めた活性化エネルギー及び活性化熱の値は温度上昇と共に低下する. この關係を求めるには勿論, 酵素不活性化がその反應條件の範圍内に於て起つてゐない事が必要である. 第2圖の點線は主として(7)及び(12)の原理に従つて, 多くの著者の實驗値より計算された ΔH^*

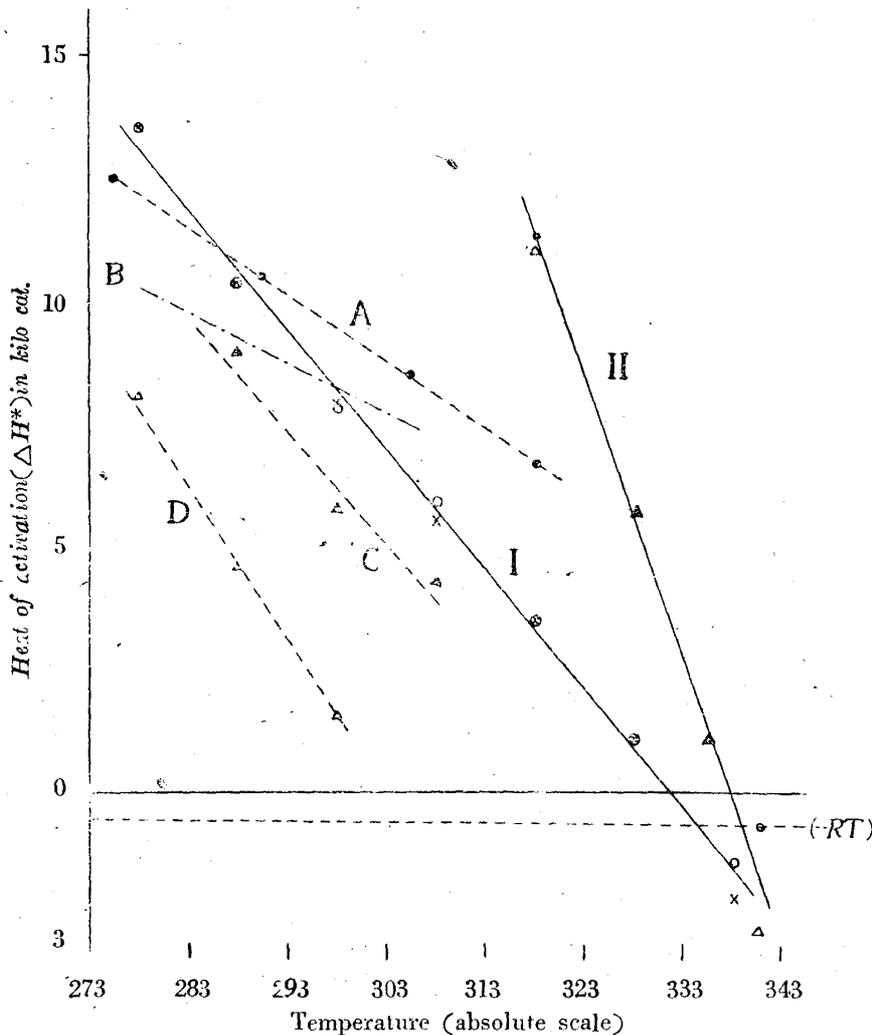
を T に對して plot したものである. Urease に就て最近得られた値は酵素變性を伴はぬ限り μ が略一定となつてゐるが⁷⁾, 水解酵素としては寧ろ例外的と思はれる. 實線は著者及び協働者が α -型 Amylase に就て, 酵素不活化を含まぬ事を豫め確認した條件範圍を用ひて得た値であるが, その詳細は(其2~3)に於て取扱ふことにする.

A~D の經過は高温部に外挿する時に $\Delta H^* = 0$, 更に $\mu = 0$ (即ち $\Delta H^* = -RT$) となり, 更に又 $\mu < 0$ となる事が想像されるが, 斯る高温部は一般に酵素破壊を伴ふ危険があり正しいエ

(照井) 酵素反應速度に對する溫度効果の解析並に“絕對最適溫度”に就て(其 I : 理論的要約) (47)

Mark	Enzyme	Substrate	Author	Calculated by
A ●	Saccharase	Saccharose	O'Sullivan et al. ⁽⁸⁾	Stearn ⁽³⁾
B - - - ●	"	"	Euler et al. ⁽⁹⁾	Terui (Euler)
C ▲	Maltase	Maltose	Lintner et al. ⁽¹⁰⁾	Stearn ⁽³⁾
D △	Hepatic lipase	Ethyl butyrate	Kastle et al. ⁽¹¹⁾	Stearn ⁽³⁾
I ○ x	Bacterial amylase (α-type)	Soluble starch	Terui and Okuno ⁽¹²⁾	
II △ ▲	Malt α-amylase	" "	Terui and Okada ⁽¹³⁾	

Fig. 2



エネルギーの値を得難い。

A, C, D 等の經過に酵素破壊の含まれてゐる懸念が全く無いとは云へない*。

併し吾々は實線 I, II の如く實際に斯る状態が現出される事を確認した。

茲に著者は“絕對最適溫度” (T_{A0}) なるものを定義し $\partial k/\partial T=0$ (又は $\partial \ln k/\partial T=0$) なる溫度即ち、酵素破壊 (又は緩徐なる可逆的不活性化) を伴ふ事なしに出現する最適溫度とし、DUCLAUX 的最適溫度と區別するものである。前述の様に、この溫度では

$$\Delta H^* = -RT_{A0};$$

$$\mu = 0 \dots \dots \dots (13)$$

となる。

茲に附言すべきことは一つの酵素の T_{A0} を以て、直に該酵素に關する限り不動のものと解してはな

らない事である。之はあくまで DUCLAUX 的最適溫度と區別される所の上の定義に基く最適溫度であり、その値は他の條件に依て若干の變動があつても差支へないのである。この溫度では反應溫度係數 Q は1となり、より低温では1より大、より高温では1より小となる傾向がある點に於ては T_{opt} と (見掛けの上で) 同様であるが、DUCLAUX 的 Q 低下は酵素破壊に依て起るのである。而して T_{A0} は又凡ての酵素に就て認められると云ふものではない。

最適溫度の實測條件即ち酵素が反應を接觸しつゝある條件に於て酵素の破壊が起るや否やを検

* LINEWEAVER (J. Am. Chem. Soc., 61, 403, 1939) は斯かる μ 低下傾向は見掛けのもので、適用速度式の不適に基くものとしてゐる。

(48) (照井) 酵素反応速度に対する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I: 理論的要約)

定するには種々なる方法が考へられる。

著者及び協働者が適用せる簡易なる方法の1例を示せば次の様である。即ち、反応時間法則が零次であつても2次であつても、基質初濃度及び温度を一定とすれば酵素破壊が起らぬ限り、一定分解度に達するに要する時間 t は E_0 に逆比例するから E_0 と $1/t$ とのダイアグラムが第3圖の實線となればその温度時間に於て破壊が起らぬ事が實證されたのであり、破壊が起れば破線の如く、その $plot$ が實線より下に現はれ E_0 の小なる程勾配が大になつて行く。若し、酵素破壊が1次反應として進むならば、破線の経過より Z を算出する事が可能である $\Delta\Delta$ 。斯かる方法に依る酵素破壊の検定は α -Amylase, Proteinase 等に於ては極めて便利に適用され得る。

Fig. 3

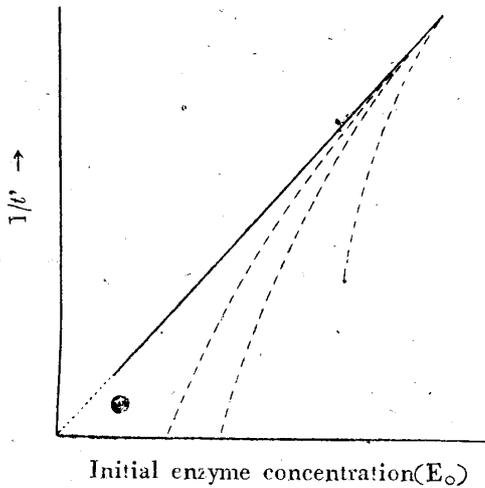
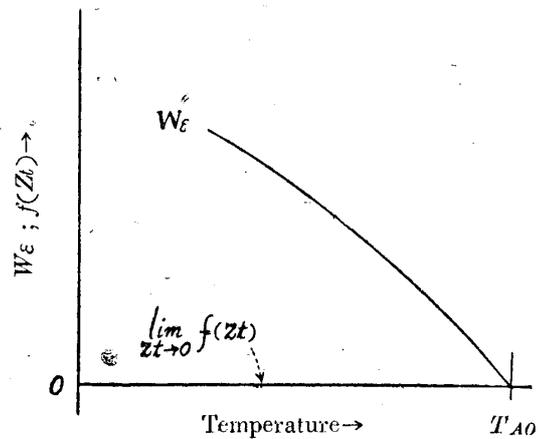


Fig. 4



又若し反應速度が MICHAELIS 式に従ふ場合には t と X_0 とのダイアグラムを取り E_0 を一定とした時に t が X_0 の1次函数である事を確認し得る温度範圍 $\Delta\Delta$ を求めるならば酵素破壊を無視し得る所の温度時間を知る事が出来る。

以上の様な吟味の下に求められる T_{AO} 現象は、之を第1圖の型式で表現するならば、次の様になる。即ち、第4圖に於て W_ϵ が T 上昇と共に低下する。即ち、 $\partial\mu/\partial T$ が著しく負である様な場合 W_ϵ 線が遂に横軸に交る。この交點は $Zt \rightarrow 0$ の極限に於ける最適温度であり之が即ち T_{AO} であると云ふことが出来る。

III 絶対最適温度現象への理論的考察

T_{AO} は一つの現象であり、その或物は現實に把握し得るのみならず、未だ實際に驗證されなものであるも第2圖の様な實驗的 ΔH^* の経過を外挿する事に依りその存在を容易に推定し得る如きものもある。 T_{AO} 出現の理論に就ては少くとも次の三つの假説が考へられる。

A. 實驗的 ΔH^* を以て眞の活性熱と見做す事

酵素破壊を捨象して得られる反應速度温度關係から算出せる μ 乃至 ΔH^* を以て眞の活性化エネルギー乃至は活性化熱と見做す事は必ずしも無理ではない、特に ΔH^* と T とのダイアグラムが直線として現はれるに及んで之が眞正の ΔH^* であろうとの感を深くする。而して、

$$\Delta H^* = H^* - H$$

$$\frac{\partial(\Delta H^*)}{\partial T} = \Delta C_p^*; \Delta C_p^* = C_p^* - C_p \dots \dots \dots (14)$$

Δ 後報参照。 $\Delta\Delta$ 示式は確定してゐるが、本報では之を省略する。

(照井) 酵素反応速度に対する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I: 理論的要約) (49)

但し H^* , C_p^* は夫々 activated complex のエンタルピー及び恒壓分子熱であり, H , C_p は activated complex の先駆母體の夫等であつて, 一般的な記號を用ひた.

T_{AO} は $\Delta C_p^* \ll 0$ なるものに於て出現するものであるが, 公知の熱力學的關係を當嵌めて次式を得る.

$$\Delta C_p^* = T \left(\frac{\partial(\Delta S^*)}{\partial T} \right) \ll 0 \dots \dots \dots (15)$$

但し ΔS^* は活性化エントロピーである.

若し第2圖の様な直線的關係があれば, 實驗溫度範圍に於て (14~15) を積分して得られる次式が成立する譯けである.

$$\Delta H^* = \Delta C_p^* \cdot T + C_H \dots \dots \dots (16)$$

C_H は積分恒數であり, ΔH^* : T のダイヤグラムより算出し得る. 第2圖の例では $C_H \geq 0$.

$$\Delta S^* = \Delta C_p^* \ln T + C_S \dots \dots \dots (17)$$

C_S は實驗式を満足する所の積分常數である.

STEARN は絶対反應速度論に於て, ΔH^* が溫度と共に低下する様な多數の酵素反應に就き, ΔS^* が著明な負の値である事を示した. 吾々の見る所では, この値は過大に評價されてゐるが, 大體論として,

$$\text{多くの Hydrolase に就き (少くとも高温部に於て). } \Delta S^* < 0 \dots \dots \dots (18)$$

此場合 ΔS^* は T 上昇と共に益々低下 (絶対値を増加) するもので, 溫度に依る低下率は $\Delta C_p^*/T$ である.

$\Delta C_p^* \ll 0$ なる反應系に於ては, 原系より activated complex 形成の際起るべき反應分子の一定秩序の配列が溫度上昇に依る分子運動の増加に依り鋭敏に攪亂せられ, 斯くして degree of randomness の増加が activated complex 形成の確率を低下する傾向の強いものと見做されるのである. ΔH^* は溫度の函數であるが, 之が見掛け上一定である様な他の酵素反應と, 茲に問題としてゐる酵素反應とでは, 如上の點に於て對溫度舉動の大なる相違が現はれるのである.

如上の原因に依る反應速度低下の傾向と, 溫度上昇に依り, 全體系のエネルギー準位上昇に依る反應速度上昇の傾向とが或る溫度に於て釣合う事態が起れば, T_{AO} が現象するであろう.

之を activated complex 生成の平衡恒數 K^* に就て見るに,

$$P \rightleftharpoons P^* ; K^* = P^*/P \dots \dots \dots (19)$$

P^* は activated complex, P はその母體で, 酵素と基質とより生成した中間體と考へる事が出来る. STEARN は酵素+基質の系 (Reactants) を考へてゐるが, MICHAELIS の考へを導入すれば上の如くなる.

全體の反應は P^* の分解反應に依て律速され, 従て K^* に比例する. [分子數/秒] の型式で表はした反應速度恒數 k (k_r でも同じ) は (轉位狀態説に據り).

$$k = K^* T (K_B/h)$$

但し K_B は Boltzmann の常數, h は Planck の常數である.

$\Delta H^* = 0$ なる溫度に於て K^* は最大である. 此時 ($\partial \ln K^* / \partial T = 0$) 従て,

$$\partial \ln k / \partial T = \mu / RT^2 = 1/T \therefore \mu = RT \dots \dots \dots (20)$$

$$R \ln K^* = \Delta S^* \dots \dots \dots (21)$$

となる. 更に溫度上昇すれば, $\Delta H^* < 0$ となり, K^* は低下し, k の最大値が得られる. この時,

$$\partial \ln k / \partial T = 0 = \Delta H^* / RT^2 + 1/T \quad \Delta H^* = -RT$$

K^* 最大値以上の溫度では ΔH^* が負即ち $P \rightarrow P^*$ が發熱的適程となるけれども, 活性化自由エネルギー (ΔF^*) は T と共に常に増加の傾向を辿る. 即ち公知の關係と (18) とよりして,

(50) (照井) 酵素反応速度に對する溫度效果の解析並に“絶對最適溫度”に就て(其 I : 理論的要約)

$$\partial(\Delta F^*)/\partial T = -\Delta S^* > 0 \dots\dots\dots (22)$$

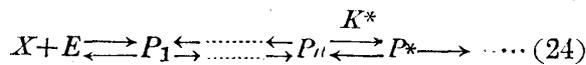
K^* の最大に於ては溫度も充分に高く、

$$\Delta F^* = -T\Delta S^* > 0 \dots\dots\dots (23)$$

即ち ΔF^* は正の値を持続し、分子活性化の學說に矛盾することはない。

B. 原系と Activated Complex との中間段階に特殊な反應を假定する事

實驗的反應速度より算出せる ΔH^* 乃至 μ は見掛け上のものであつて μ の眞の値は一般化學反應と同様にあまり廣くない溫度範圍に於て實際上一定であるが、activated complex 生成の中間段階に於て溫度に對し特殊な舉動をとる反應が介在すると考へるのである。(多くの酸化還元酵素や Urease¹⁾ 等では Q_{10} の溫度上昇に依る低下は目立たない。特に Urease では ARRHENIUS-plot は直線になると云ふ)。今、 X, E を以て夫々基質及び酵素を表はし、次の反應に於て、



P_n 迄の間に反應段階 $P_x \rightleftharpoons P_{x+1}$ があり、之が T に對する舉動は第2圖の様な結果を齎らすものと假定する。この反應の平衡恒數を K_x とすれば、 K_x が第2圖の舉動を現出せしめる爲めに如何なる溫度特性を持つべきであるか。その答は當然、

$$\frac{\partial \ln K_x}{\partial T} = \frac{\Delta H_x}{RT^2}; \quad \frac{\partial(\Delta H_x)}{\partial T} = \Delta C_{p_x} < 0 \dots\dots (25)$$

この假定では又 $\partial(\Delta H^*)/\partial T = 0$ であり、實驗的 ΔH^* (第2圖) は眞の ΔH^* と區別する爲め特に ΔH_{ap}^* 、又假説 A に於ける K^* は K_{ap}^* と記號して眞の K^* と區別すると、

$$\frac{\Delta H_{ap}^*}{RT^2} = \frac{\partial \ln K_{ap}^*}{\partial T} = \frac{\partial \ln K_x K^*}{\partial T} = \frac{1}{RT^2} (\Delta H_x + \Delta H^*) \dots\dots (26)$$

但し (26) に於て $P_x \rightleftharpoons P_{x+1}$ 以外の段階に於ける平衡は Van't Hoff の法則に従ふものとし $\partial(\Delta H)/\partial T$ を 0 と置いた。

この假説では $\Delta C_{p^*} = 0$ であるから、之と區別する爲め第2圖の計算から得られる ΔC_{p^*} を特に $\Delta C_{p^*}(ap)$ と記號すると、(26) より、

$$\frac{\partial(\Delta H_{ap}^*)}{\partial T} = \Delta C_{p^*}(ap) = \Delta C_{p_x} \dots\dots\dots (27)$$

ΔC_{p_x} は P_{x+1} と P_x との恒壓分子熱の差である。

即ち假説 A の ΔC_{p^*} が ΔC_{p_x} に置き代つただけである。

(24) に對して最も簡単な場合を當嵌めて見よう。

例へば MICHAELIS 化合物 P が P^* と直接平衡状態にある場合で、



斯かる關係は若干の修正を受ける事 Δ があつても、略々實際に近いものと考へられる。但し K_M は MICHAELIS 恒數 (K_m) の逆數 (親和力恒數) である。

K_M の溫度係數はあまりよく知られてゐない。水解酵素に就ては、 β -Glucosidase の K_M 溫度係數は 1 であると云はれてゐるが²⁾、STEARN が諸文献より検討し、一般に K_M 段階は發熱的 ($\Delta H_x < 0$) であろうとしてゐる。 ΔH_x の溫度係數は更に不明である。然し吾々が細菌 Amylase に就て検討した結果に依れば K_M は溫度に依てあまり變化しない(後報)。麥芽中の α -Amylase に就ても略々同様の事情が推察されてゐる。 α -Amylase に於ては基質濃度充分ならば實驗溫度範圍に於ては酵素が殆ど定量的に基質と結合するものと見做され、最近豚の膵臓より結晶

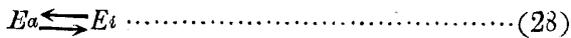
Δ 最近 AFANASEV (Chem. Abstr., 41, 1949: Biokhimiya, 14, 259, 1949) は (Enzyme)₂-Substrate 説を提出してゐる

(照井) 酵素反応速度に對する溫度効果の解析並に“絶対最適溫度”に就て(其 I : 理論的要約) (51)

として分離された α -Amylase では $K_m = 1.8 \times 10^{-4} \text{g/cc}$ となつてゐる¹⁵⁾. 斯かる觀點よりすれば, この假説が成立し難い様に思はれる. 事實, 著明なるエントロピー低下を伴ふ様な, 而もそれが T と共に低下する様な段階こそ, 斯かる酵素に於ける $P \rightarrow P^*$ の段階そのものと見做すべきではあるまいか.

C. 動態酵素と不動態酵素との間の迅速なる平衡達成を假定する事

實驗的 ΔH^* 乃至 μ をば見掛けのものに見做す點に於ては假説 B の場合と同様である. 茲では, 酵素の不可逆的不活性化を捨象した條件に於ても, 可逆的不活性化を考へ, 動態不動態の2つの状態間の平衡が溫度に依り不動態の方向に移行する結果, 動態酵素單位濃度に對する k が T と共に上昇しても動態酵素濃度の減少が全體の反應速度低下を招來せんとし, この矛盾せる2種傾向の結果として, T_{A0} が出現すると假定するのである.



動態 (E_a) と不動態 (E_i) との平衡達成は迅速であつて吾々が破壊の起らぬ程度の高溫に於て酵素液を處理し, E_i を増大せしめても之を直ちに低溫に齎らして測定すれば, 豫熱前と同じ活性を示すのでなければならぬ. 若し反應條件に於て Taka-amylase¹⁶⁾ や Trypsin¹⁷⁾ 等に於て認められてゐる様な所謂 “Allmählich reversible Inaktivierung” が行はれるものならば吾々は夙に之を見破ることが出来たのである. 緩徐なる平衡達成に於ては又, 第3圖の實線經過を辿る事も不可能である. 夫故に (28) の平衡は極めて迅速に達成され, 吾々の實測精度に於ては平衡達成速度を測定し得ないものと假定せざるを得ない. 又 α -Amylase に於けるが如く K_m の非常に小なるものに於て, E_a のみが基質と結合し (28) の平衡圏外に去り, 斯くて E_i が極端に微小となる様な事態があつては, 現象の説明が不可能となる. 夫故に E_a も E_i も共に均しく基質 X に對して結合し $X \cdot E_a$, $X \cdot E_i$ は同程度の解離恒數を持つと假定される Δ . $E_a \rightarrow E_i$ の過程は, 蛋白分子内の NH₂, OH, CH₂, CHO 結合の開裂としても, 或ひは又 α -Amylase の場合には反應に必要な無機イオンと蛋白との結合の解離としても一應考へる事が出来る. (28) の平衡恒數を K_{ai} , 又 $E_s = E_a + E_i$ と置けば,

$$E_a = (1 + K_{ai})^{-1} E_s \dots\dots\dots (29)$$

又, 前に規定した反應速度恒數 k_r は kE_a である代りに,

$$k_r = kE_a \dots\dots\dots (30)$$

となる. 反應速度關係より直接算出せる活性化エネルギーを眞の活性化エネルギー μ と區別し μ_{ap} と記號すると,

$$\partial \ln(kE_a) / \partial T = \partial \ln k_r / \partial T = \mu_{ap} / RT^2 \dots\dots\dots (31)$$

E_a , E_i 間の平衡を VAN'HOFF に據り取扱ひその反應吸熱を ΔH_{ai} とし, 且つ, (7), (29), (31) の關係を用ひると,

$$\partial \ln K_{ai} / \partial T = \Delta H_{ai} / RT^2 \dots\dots\dots (32)$$

$$\therefore \frac{\partial \ln(kE_a)}{\partial T} = \left\{ \mu - \left(\frac{K_{ai}}{K_{ai} + 1} \right) \Delta H_{ai} \right\} \cdot \frac{1}{RT^2} \dots\dots\dots (33)$$

上の關係を整理し且つ $\mu_{ap} = \Delta H_{ap}^* + RT$ を用ひて

$$\Delta H_{ap}^* = \Delta U^* - \left(\frac{K_{ai}}{K_{ai} + 1} \right) \Delta H_{ai} \dots\dots\dots (34)$$

Δ $X \cdot E_a$ が $X \cdot E_i$ に比して非常に大なる K_m を持つと考へる事は尠くとも α -Amylase に就ては無理であらう.

ΔH_{ap}^* は, 前の假説 B に於ける ΔH_{ap}^* と同じである,

(52) (照井) 酵素反応速度に對する温度効果の解析並に“絶対最適温度”に就て(其 I: 理論的要約)

を得る. 然るに第2圖の様な關係に對しては, 低温部に於て(例 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$) $E_s \cong E_a$ であり, 又温度上昇に依る促進効果が認められぬか又は却て低下する様な高温部に於て $K_{ai} \gg 1$ と假定される. 事實低温部に於ては酵素反應としては可成り高い ΔH^*_{ap} を有する. 従て實驗低温部に於て,

$$\Delta H^*_{ap} \cong \Delta H^* \dots \dots \dots (35)$$

又, $\Delta H^*_{ap} < 0$ なる高温に於て(又は必要に應じて更に高温部に外挿して),

$$\Delta H_{ai} \cong \Delta H^* - \Delta H^*_{ap} \dots \dots \dots (36)$$

となる. 以上の方法に依り, この假説を以てする ΔH^* 及び ΔH_{ai} を概算し得, 且つ K_{ai} と温度との關係を求める事が出来る. (36)に依れば $\Delta H_{ai} > \Delta H^*$ であるが, $E_a \rightarrow E_i$ を以て斯く強力な吸熱反應と考へる事は必ずしも無理ではない. 併し第2圖 I, C, Dの, 傾斜が比較的大なる経過の酵素反應に對しては, 酵素蛋白と作用團又はイオンとの間の1箇の鹽狀結合の解離を假定する事が困難であろう. この場合 ΔH_{ai} は十數 Kcal となるから蛋白分子内の CHO, NHO, OHO 等々の結合が大約3箇開裂するものとも考へ得る.

その際斯かる開裂及び複元の速度は吾々が酵素反應速度測定の常法に依ては把握し得ない程迅速であると假定しなければ如上の假定は成立しない. 測定各温度に於て蛋白變性及び複元が斯くも迅速に進行するとの假定が問題である.

併し乍ら, この第3の假説を否定すべき決定的要素は, 目下の處存在しない様に思はれる.

以上, T_{Ao} 現象に對し觀點を異にする3種の解説を試みたが, この中第1の解説が最も無理のないものとも考へられる. 併し, その本質的な解決は勿論今後の問題である. T_{Ao} は耐熱性大なる水解酵素に對しては實際的應用面に於ても重要な意義を有する事は上述の諸點より明かであり, 斯かる酵素の反應速度温度關係に對しては高温部に於て一般的“R.G.T.-Regel”が通用しないのである.

V 摘 要

1) 酵素反應に於ける所謂最適温度—DUCLAUX 的最適温度 (T_{opt})—の現象を速度論的に解析し, T_{opt} が如何なる物理化學的條件を満足せるものなるかを明瞭ならしめた.

酵素破壊が1次反應なる場合, この關係は(8a)式に示される. (8a)式と温度との關係を第1圖に示した. 之等に依て T_{opt} 現象への理解が深化すると共に新たなる問題に多くの示唆が與へられる.

2) DUCLAUX 的最適温度の出現は酵素破壊恒數 $Z > 0$ を必要の前提とする. 然るに多くの酵素反應に於て認められる様な, 反應の實驗的活性化熱 (ΔH^*) が温度上昇と共に低下するものでは(第2圖), $Z = 0$ に於ても最適温度が出現する傾向があり, 後報する照井, 岡田, 奥野等の研究は現實に斯る最適温度を把握せるものである. 之を DUCLAUX 的最適と區別する爲めに絶対最適温度 (T_{Ao}) と呼び, 本文に於て定義した.

3) 第1圖に示した様に, T_{opt} は反應及び酵素破壊の活性化エネルギー値に依て規定される W_e : T の線と ($Z \times$ 時間) に依て規定される函数 $f(Z)$: T の線との交點に相當する温度であるが, 第2圖に示す如き多くの Hydrolase に對しては $W_e = 0$ なる温度が考へられる. 斯る温度 (W_e 線と T との交點) は T_{Ao} に相當するのであり, 之は第3圖に示した觀方よりすれば, $Z \rightarrow 0$ 又は $t \rightarrow 0$ の極限に於ける T_{opt} と云ふ事も出来る.

4) T_{Ao} 出現の理論に關し代表的な3種の假説を提示した. その第1は速度より算出せる反應

Δ STEARN が Trypsin の可逆的不活性化の場合に論じてある様に, 夫等の結合力は, 平均的に 5Kcal である.

ΔH^* を以て眞の活化熱と見做す事であり、之に依て活性化エントロピー、活性化自由エネルギーの關係を矛盾なく説明する事が出来る。その第2は Activated complex 生成以前の段階に於てその反應熱が第1に於ける ΔH^* と同様の舉動を現はす事を假定し、速度より算出せる値は見掛けのものと考へるのである。その第3は酵素そのものに動態と不動態との2型を假定し、兩者間の平衡は温度上昇に依て不動態の方向に移動し(即ち不動態に向つて吸熱的)且つ平衡達成は、第3圖の檢定方法其他の檢定常法にては把握し得ぬ程に迅速であると考へるのである。考察に依れば、第1が最も眞實に近いものと一應考へられるが、現在の處第3を否定すべき決定的な證明は得られない。

5) T_{A_0} は、その出現の理論的解説の如何を問はず、一つ現象であり、温度速度論的に又エネルギー論的に一定の方向に向ふ軌道線上に出現する現象として特に興味ある問題であるが、多くの耐熱性水解酵素に於ては實際的にも重要な意義を有する。

文 献

- 1) Haldane, Stern: Allgemeine Chemie der Enzyme (Theodor Steinkopf, 1932).
- 2) e.g., Moelwyn Hughes: Ergebnisse der Enzymforsch., VI, 23 (1937).
- 3) cf. Stearn: Ergebnisse der Enzymforsch., VII, 1 (1938).
- 4) Marks, Fox: J. Biol. Chem., 103, 269 (1933).
- 5) Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, 5 Aufl.
- 6) Greerberg, Winnick: J. Biol. Chem., 135, 781 (1940).
- 7) Kistiakowsky: J. Am. Chem. Soc., 71, 2006 (1949).
- 8) O' Sullivan, Thompson: J. Chem. Soc. (Lond.) 57, 834 (1890), Cited from Stearn (loc. cit.)
- 9) Euler, Laurin: Z. physik. Chem., 110, 55 (1920).
- 10) Lintner, Kröber: Ber. chem. Ges., 23, 1050 (1895).
- 11) Kastle, Lövenhart: J. Am. Chem. Soc., 24, 491 (1900).
- 12) 照井, 奥野: 本誌(近々発表の豫定); 大阪醸造學會記念講演會(1949年10月30日)にて1部發表.
- 13) 照井, 岡田: 本誌(近刊).
- 14) Veibel, Eriksen: Cited from Stearn³⁾.
- 15) Fischer, Bernfeld: Helv. Chim. Acta, 31, 1735 (1948), Cited from Chem. Abstr., 47 (20) 7979 (1949).
- 16) Miyake, Ito: J. Biochem., 3, 177 (1924), 尙極端なる pH に於ける不活性化と緩徐なる再活性化に就ては: Ohlsson, Swätichin: Bull. Soc. Chim. Biol., 11 (1929).
- 17) Anson, Mirsky: J. Gen. Physiol., 17, 393 (1934).

Rhizopus 属菌の乳酸生成能に就て (第5報)

Rhizopus の呈する Homo-乳酸醱酵

北原 覺雄・福井 作藏

(京都大學食糧科學研究所, 乳酸醱酵に関する研究第4部の V)

本研究の第3報¹⁾に於て著者等は Ba^{++} の添加により、乳酸率を76%まで引上げ得る事を報じたが、これは Rhizopus の行う種々の分解作用の内主として乳酸醱酵だけが抑制されずに残るためと考へている。本報では一つの理論的な問題として、果して乳酸生成能が Homo-型の乳酸醱酵に該當するや否やに就て更に検討して見た結果に就て報告する。

(1) 重金属鹽と乳酸醱酵

重金属鹽の影響に就ては前報でも一部觸れたのであるが、今回は鉛, 銅, 水銀などに就て檢し