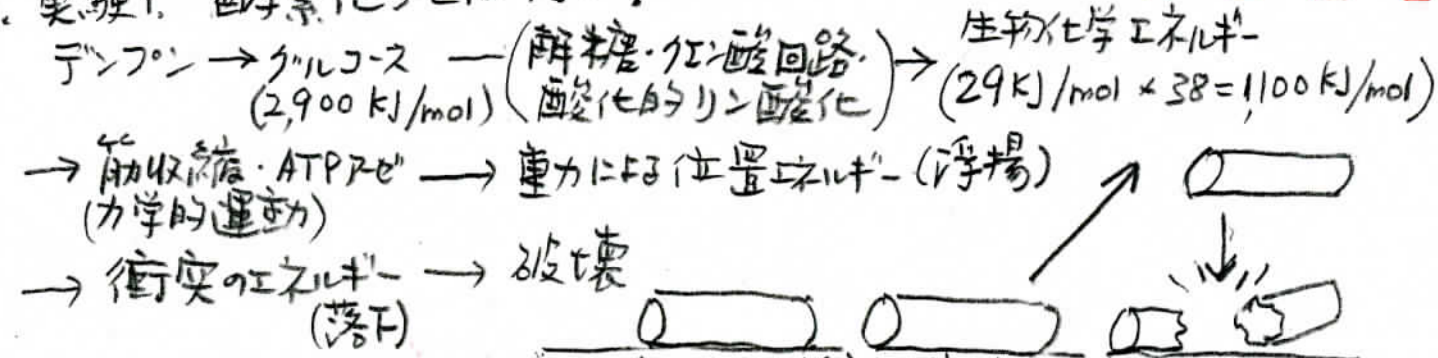
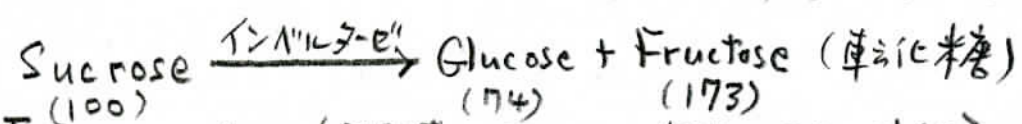


1. 実験1. 酵素化学とは何か?



2. 1890年頃



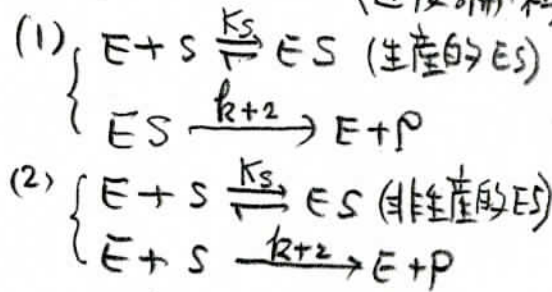
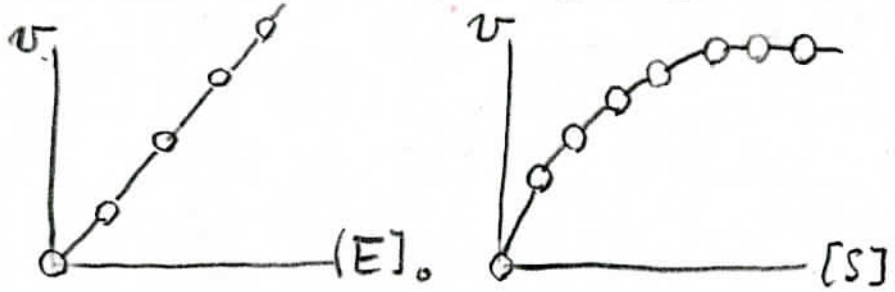
3. ES複合体は存在するか?

(ESは encounter-complex)

3-1. E. Fischer (1894): 酵素は高基質特異性 (と反応特異性) をもつ。Lock-and-Key 説 (ES複合体は生産的)。

3-2. O'Sullivan + Tompson (1890): 基質の存在下には酵素は安定化する

3-3. V. Henri (1902): $E + S \rightarrow E + P$, $\frac{d[P]}{dt} = v$ (酵素反応速度論)



3-4. E. Fischer による基質式決定着

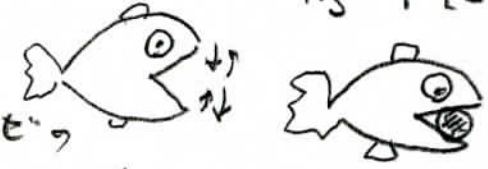


$v = \frac{k_{+2} C [E]_0 [S]}{K_s + [S]}$

3-5. 赤塚四郎 (1960) 金魚説

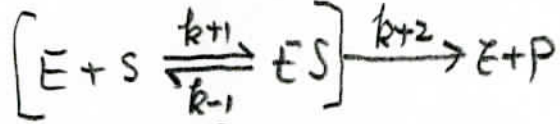
3-6. 八木国夫 (1962) D-アミノ酸脱水素化

ES複合体結晶化



3-7. Laskowski, 廣海 (1975-90) 酵素の70年代-EI-ECモデルが非常にわかりやすく解説される 基質と酵素とのEI (ES) 複合体の構造反応解析

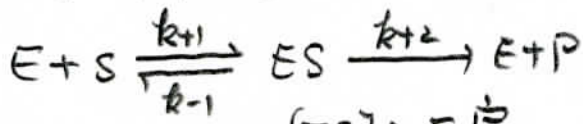
4. Michaelis-Menten (1913) 迅速平衡仮説



平衡

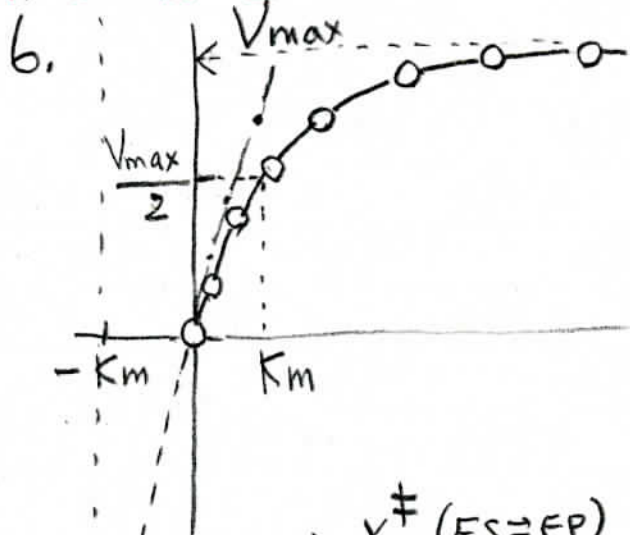
$v = \frac{k_{+2} [E]_0 [S]}{\left(\frac{k_{-1}}{k_{+1}}\right) + [S]}$

5. Briggs-Haldane (1925) 定常状態仮説



[ES]: 一定

$v = \frac{k_{+2} [E]_0 [S]}{\left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}\right) + [S]}$



$$v = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten 式}$$

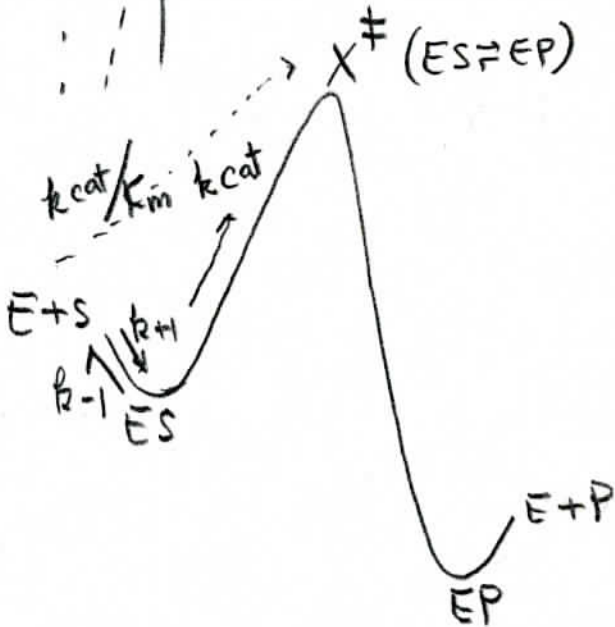
k_{cat} : 分子活性, 回転数 (s^{-1}), k_{+2} と同じ。

K_m : ミカエリス定数 (M)

$[S] \gg K_m \quad v = k_{cat} [E]_0 \equiv V_{max}$

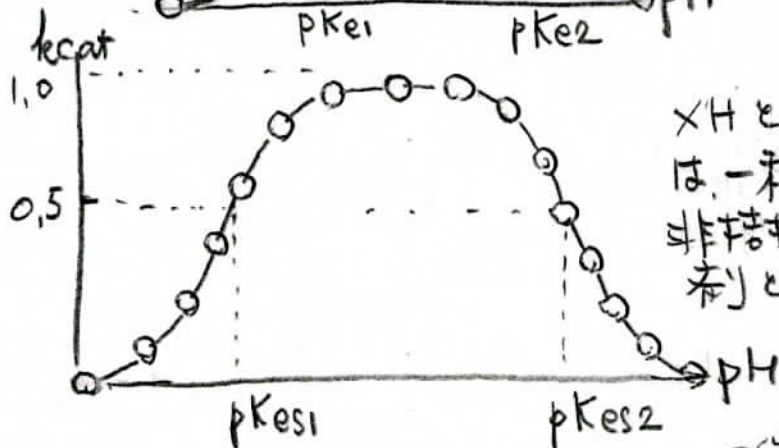
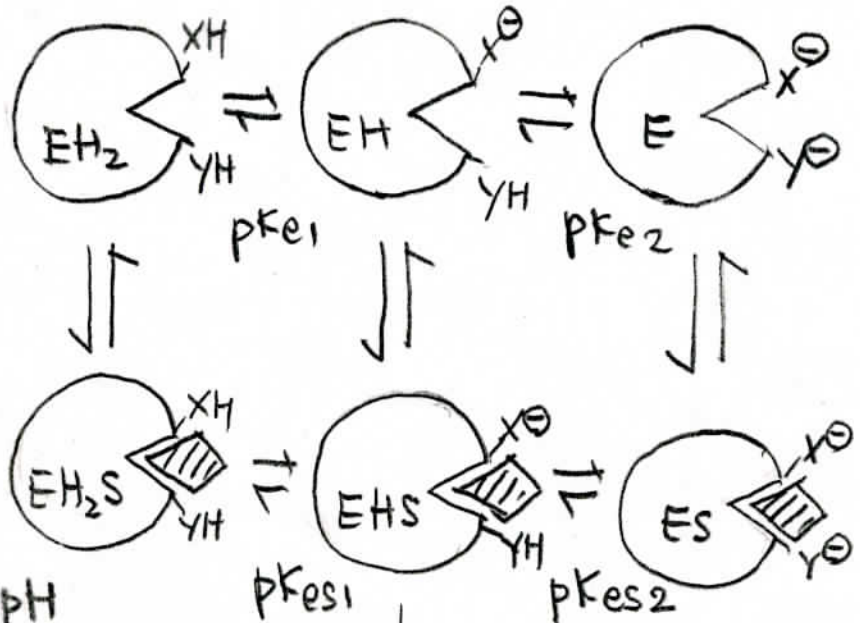
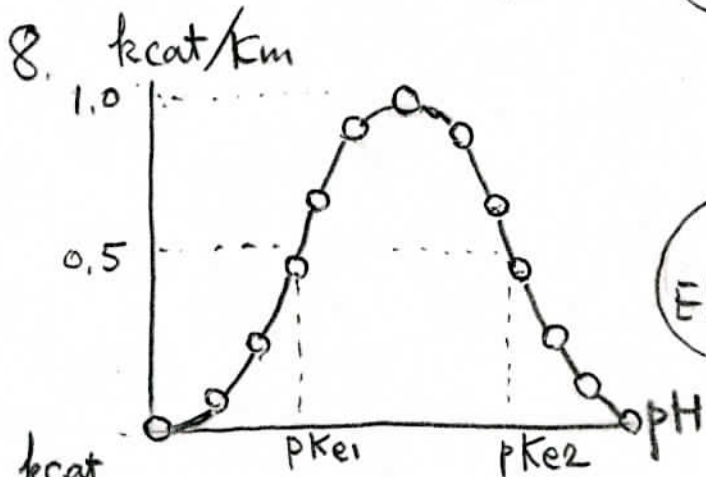
$[S] \ll K_m \quad v = \frac{k_{cat}}{K_m} [E]_0 [S]$

$\frac{k_{cat}}{K_m}$: 特異性定数 ($M^{-1} s^{-1}$)

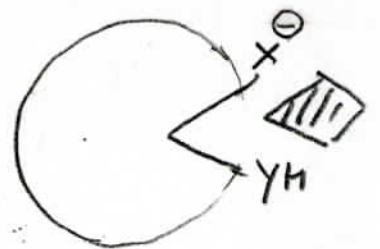
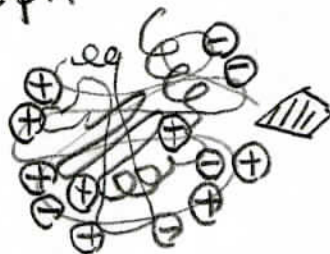


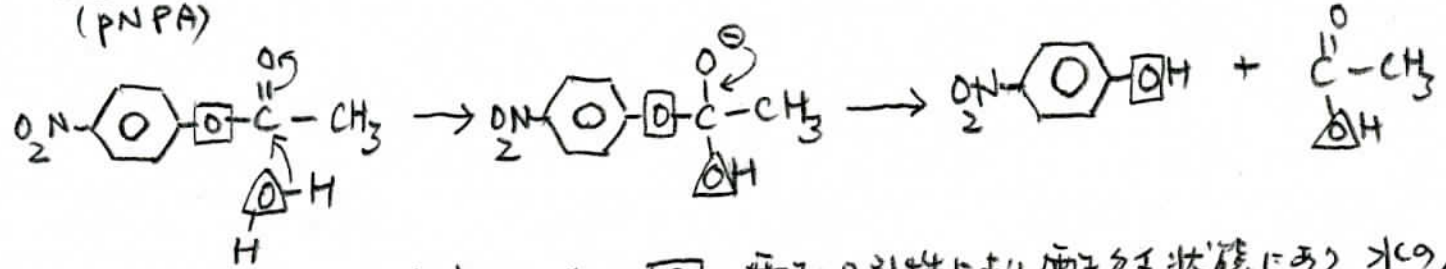
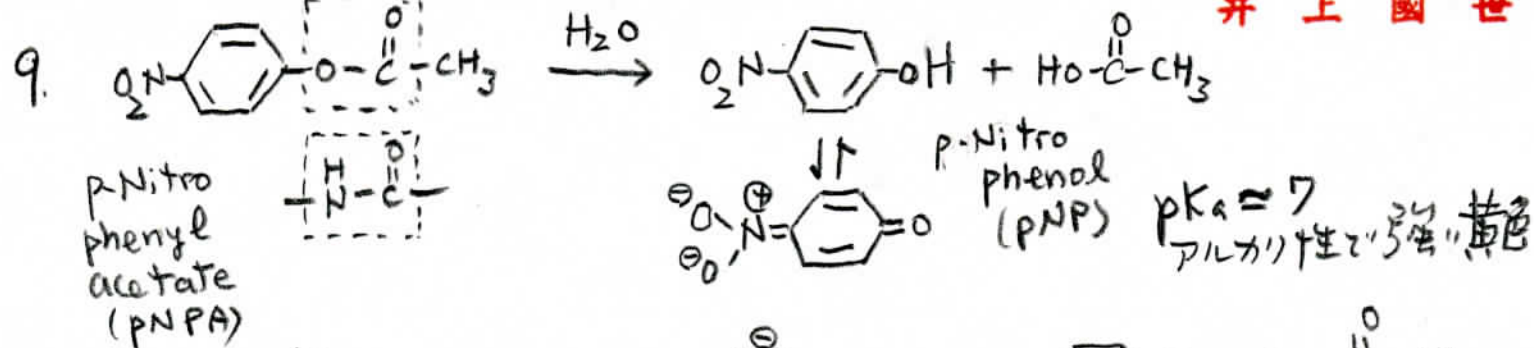
7. アミノ酸側鎖の pKa

Asp ~ 3.9	Tyr ~ 10.5
Glu ~ 4.1	Lys ~ 10.5
His ~ 6.0	Arg ~ 12.5
Cys ~ 8.4	Ser ~ 16

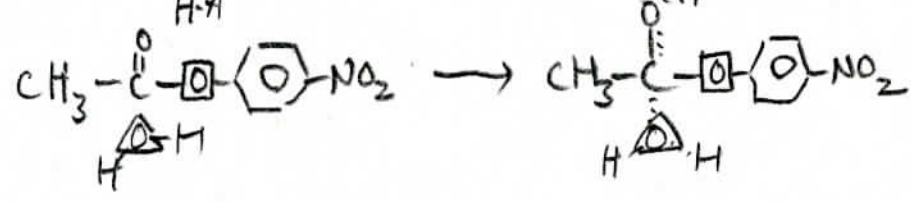
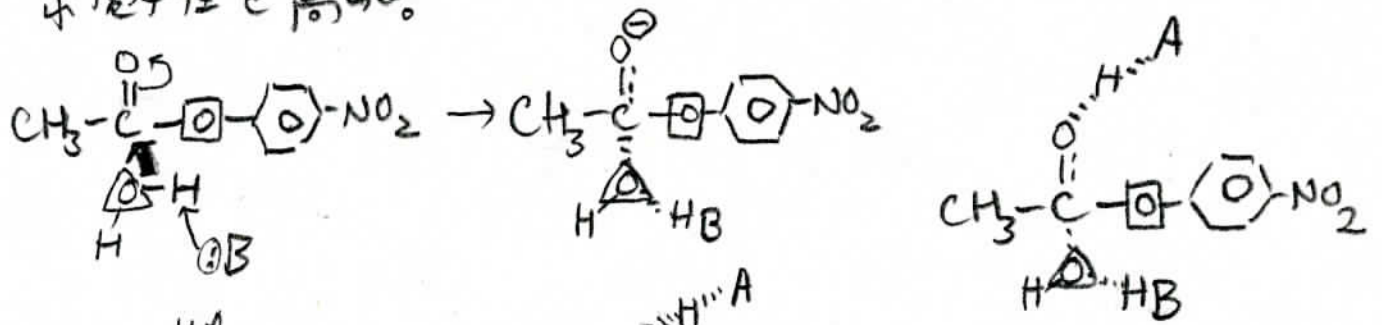


XH と Y- は一様な非拮抗阻害剤として作用

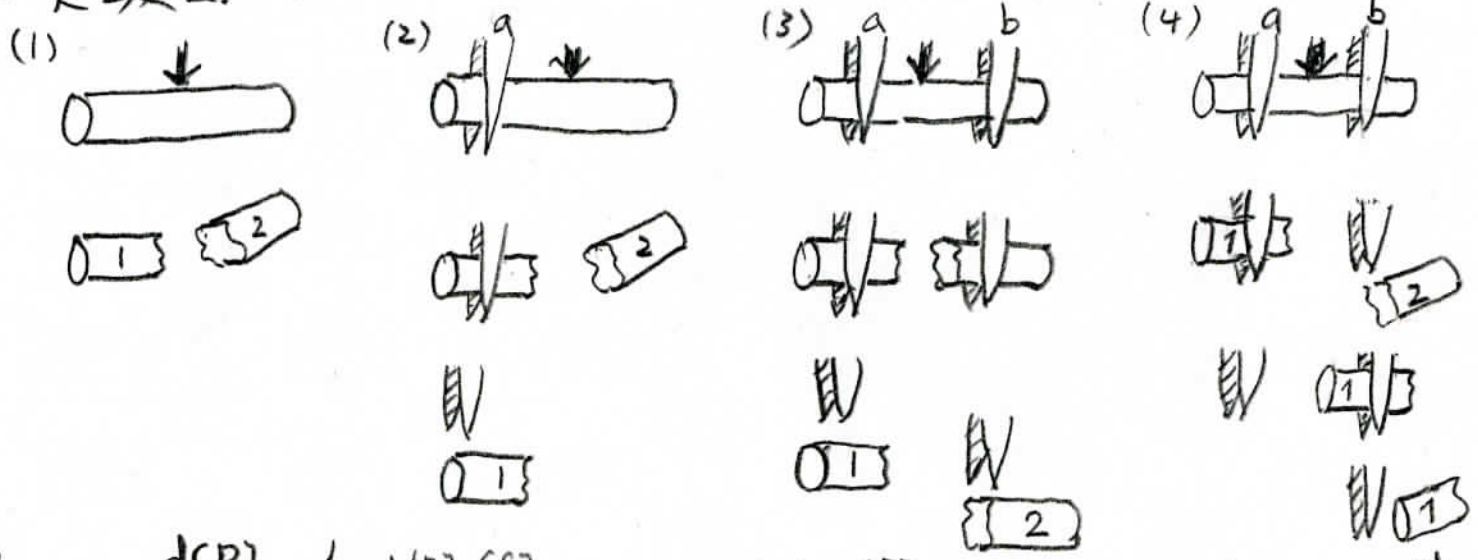




10. エステルのカルボニル炭素は通常の $\text{C}=\text{O}$ の電子吸引性より電子不足状態にある。水の H の不対電子がカルボニル炭素を攻撃する。この反応をより進めよには?
 (1) 水の H の上の電子密度を増えよ。水の酸性を高める。
 (2) PNPA のカルボニル炭素上の電子密度を下げて、カルボニル炭素の酸性を高める。



11. 実験2. 1つものを1つで2つに分けよ。

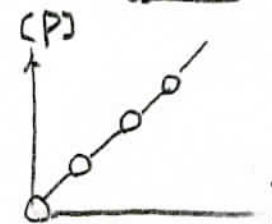


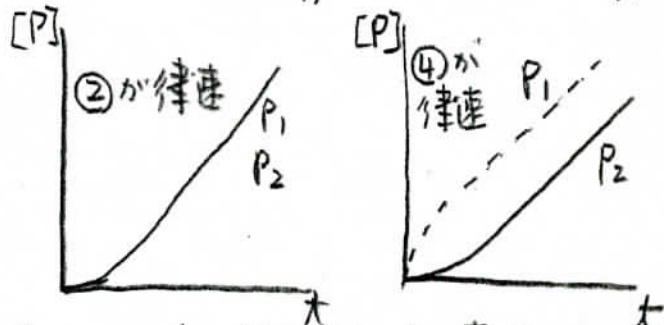
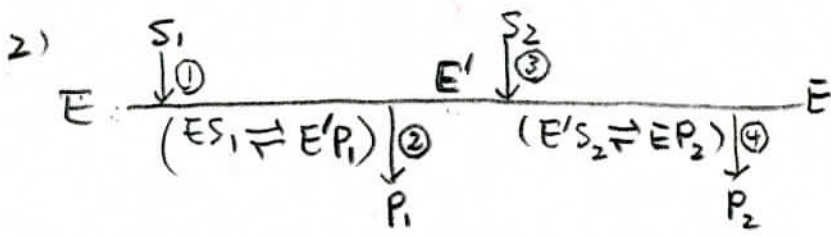
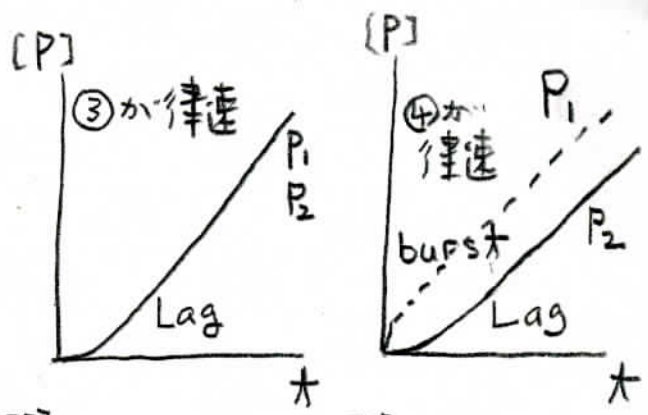
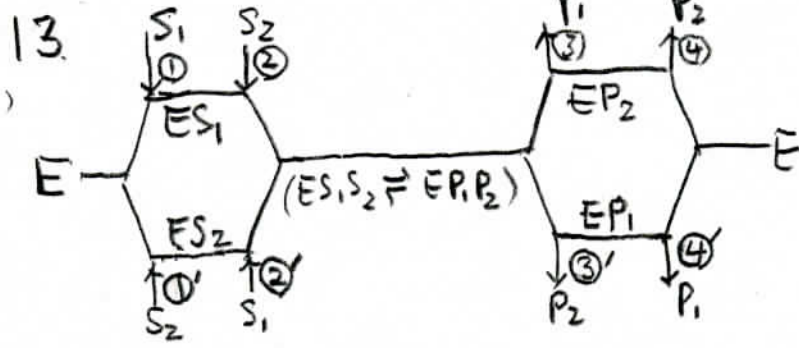
12.
$$v = \frac{d[CP]}{dt} = \frac{k_{cat}(E)_0(S)_0}{K_m + (S)_0}$$

$\therefore [P] = A \times [CP]$

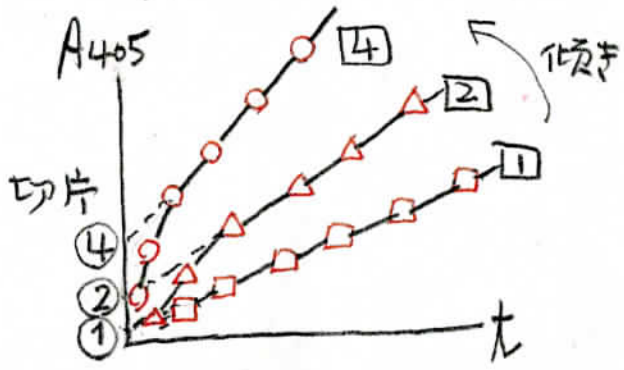
秒速: $100 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$
 秒速: $100 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$

本当?!



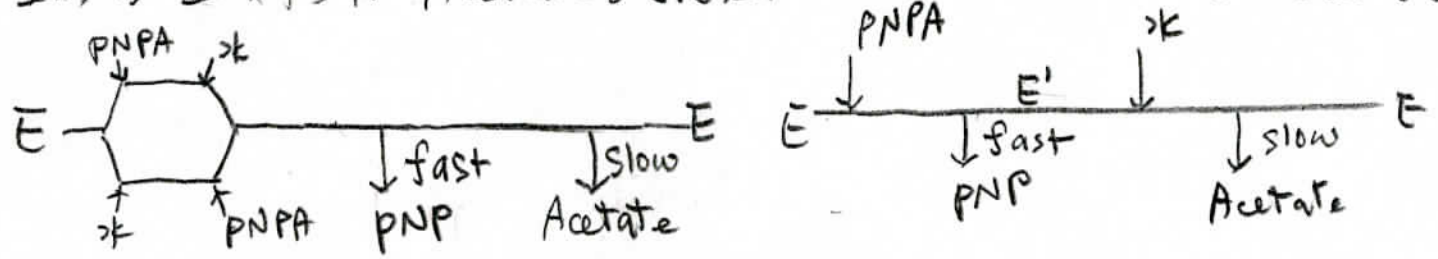


14. pNPA と 2-キエトリポリン (またはズブツリン) の加水分解反応 (3回生酵素化学実験, 私の準備(1972))

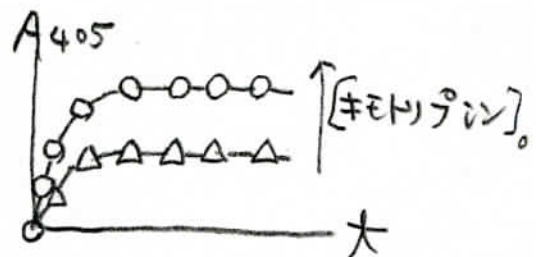
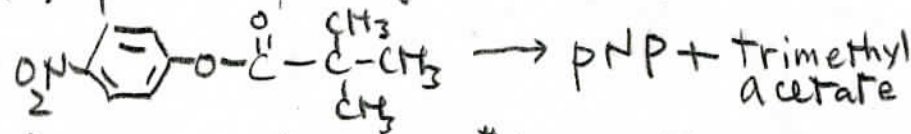


A405 での PNP の生成を追跡:
 酵素濃度を 1 → 2 → 4 倍とおと
 定常状態相の傾きは 1 → 2 → 4 倍
 前定常状態相の t 軸切片も 1 → 2 → 4 倍
 となり、その切片から t=0 での pNPA 濃度は
 酵素濃度と一致。一定常状態に入
 る前の 1 回目の turnover で生成した PNP。

PNP の Burst が観察された — 律速段階に先立ち、速い反応段階が存在し、ここで生成する生成物が PNP である。あるいは律速段階で生成する生成物は Acetate。可能性は決つてゐない。(2), (3) を支持。



15. p-nitrophenyl-trimethyl-acetate



[キエトリポリン] と同じ濃度の [PNP] が生成する。
 反応後の酵素を 2,4-ジニトロフェニルアミン (NH₂OH) (強力な核剤) で反応させると、
 トリメチル酢酸の 2,4-ジニトロフェニルアミン誘導体 (CH₃)₃C-C(=O)-NH-OH を生じる。→
 p-nitrophenyl-trimethyl acetate の 2,4-ジニトロフェニルアミン誘導体は 2,4-ジニトロフェニルアミン誘導体 (CH₃)₃C-C(=O)-NH-OH を生じる。
 アリル化してアリル化酵素を生成する共有結合阻害剤 (自殺基質)。

16. Ser195 への修飾は、酵素は先活: $F-P(=O)(O-CH(CH_3)_2)_2$

Acetyl-Tyr によりアセチル化;

Diisopropyl fluorophosphate (DFP)

により、リン酸化; p-Toluenesulfonyl-cl によりトシル化;

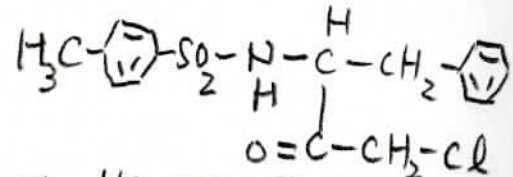
p-nitrophenyl-trimethyl acetate により Trimethyl-acetyl it.

17. His 57 への修飾は、酵素は先活:

N-toluenesulfonyl-phenylalanine

chloromethyl ketone (TPCK) により

His 57 N-3 位への修飾 (Shaw, 1962).



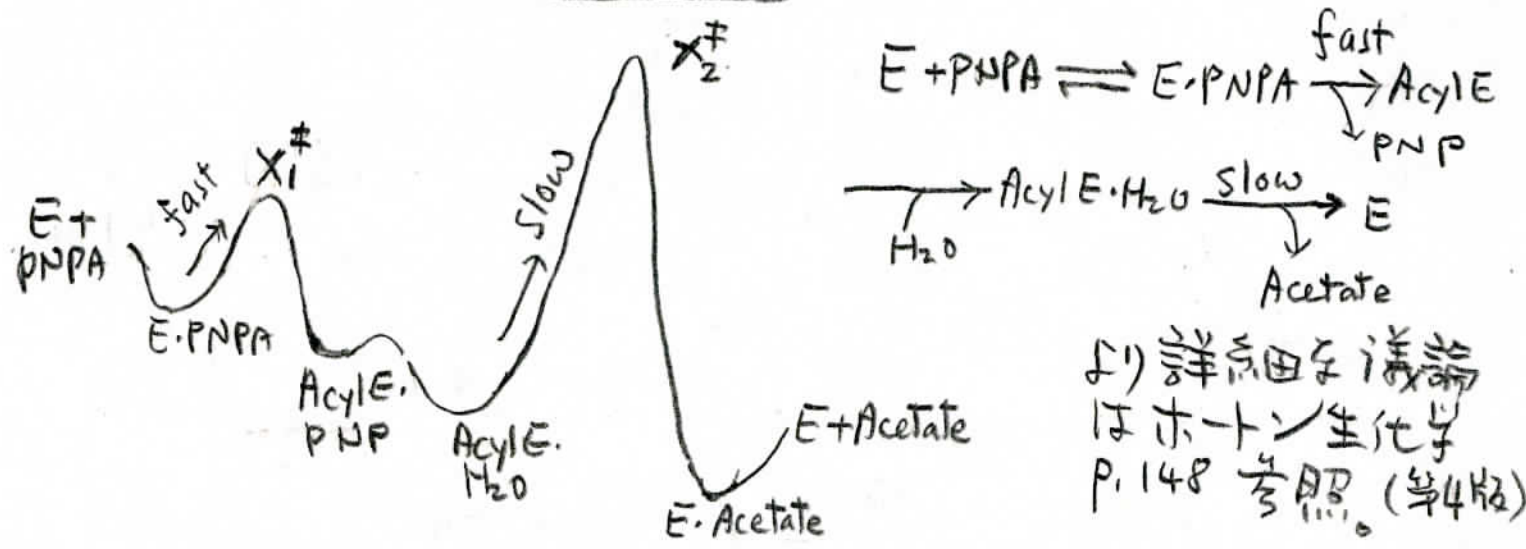
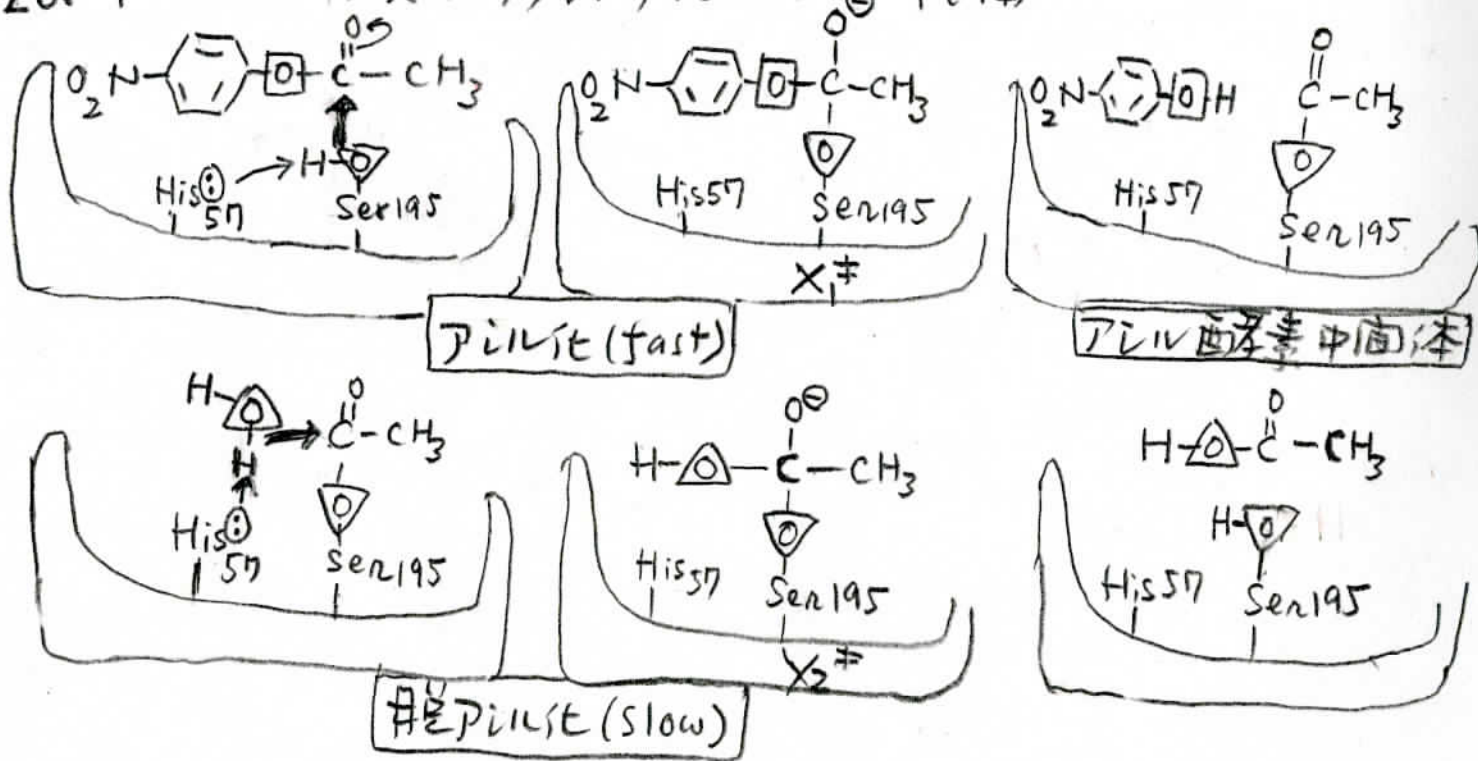
His 57 の直接の隣り。

18. X 線結晶解析: Tosyl-L-phenylalanine (Blow, 1967)

Ser 195, His 57, Asp102, Asp194 への修飾は、酵素は先活。

19. 酸性側活性解離基 $pK_{a1} \approx 7$ (Hess, 1967)

20. フェトリソンのアセチル化反応の機構 — #13 ~ 18 あり



より詳細な議論は、ホーソン生化学 p. 148 参照 (第4版)