綜 説

Exo 型酵素による直鎖状ポリマーの解重合反応

大阪府立大学 農 学 部 広 海 啓 太 郎*

生体高分子の合成や解重合など、単一な酵素によって触媒される逐次反応は、酵素反応の重要な一分野を占めており、これらの反応の時間経過は速度論の立場からもきわめて興味ある問題である。酵素による高分子基質の分解様式には、ほぼランダムに切って行く endo 型と呼ばれるものと、特定の末端から決まった少数個の単位で切り離して行く exo 型と呼ばれるものがある (図 1)。一回目の切断について考えると、

図 1. 切断様式の模式図。数字は切断の順序を示す。

endo 型では切断されうる結合の数だけの切れ方があるのに対して、exo 型では一通りしかない。したがって exo 型酵素による直鎖状ポリマーの解重合反応は、単一な酵素による逐次反応の中でも最も取り扱い易いと考えられる。酸などによる非酵素的な加水分解反応はすべてランダム型 (endo 型) であるから、exo 型的水解反応は酵素反応に特有であるともいえる。反応経過に伴う重合度分布の推移なども、ランダム型とは全く趣を異にするであろうという点で興味深いものがある。

同種の構成単位からできているポリマー (ホモポリマー) を基質とする exo 型酵素の例としては、澱粉の直鎖成分である アミロース に対する β -アミラーゼ (マルトース単位で切る) やグルコアミラーゼ (グルコース単位で切る) があり、何種類かの異なる構成単位からなるポリマー (ヘテロポリマー) を基質とする exo 型酵素の例としては、蛋白質やペプチドに対するカルボキシペプチダーゼ A, B, ロイシンアミノペプ

チダーゼ、また RNA や DNA に対する数種のエキソヌクレアーゼがある。われわれは、扱っていたグルコアミラーゼが典型的な exo 型酵素であることから、この種の反応経過の速度論に興味をもち、簡単な2, 3の場合について取り扱ったので、ここにまとめて御紹介したいと思う。

ホモポリマーの場合には、反応の途中に現われる種々の重合度の基質の消長、および末端から生ずる小さい生成物の総量の時間変化に主として着目する。後者は、高重合度のホモポリマーの数平均分子量の決定に応用することができる。またヘテロポリマーの場合は、端から切れて出て来る各種のモノマーの、反応経過に伴う変化が主として興味の対象となる。

1. ホモポリマーの exo 型解重合

n 個の同種の構成単位からできている直鎖状のホモポリマー S_n が、exo 型酵素 E によって、特定の末端から単量体生成物 P を遊離して、重合度を1ずつ減じながら加水分解されて行く反応を考えよう。 S_n が完全に加水分解されて n 個の P になるまでに、 $(n-1)$ 段階の Michaelis-Menten 機構を含むと考えられる。すなわち任意の重合度 i をもつ基質 (i -mer) を S_i とすれば、

と書ける。生成物 P は基質に似た構造をもつので、一般に拮抗阻害剤となるであろう。これを考慮すると、

がつけ加わる。

(1)の各式に対して、Michaelis 定数 K_{m_i} と最大速度 V_i が対応する。

$$K_{m_i} = \frac{k_{-1,i} + k_{+2,i}}{k_{+1,i}} \quad V_i = k_{+2,i} [E]_0 \quad (3)$$

Exo-Enzyme-Catalyzed Degradation of Linear Polymer Substrates;

※ Keitaro HIROMI: Laboratory of Biophysical Chemistry, Department of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai.

ここに $[E]_0$ は酵素の全濃度である。これらの速度パラメーター K_{mi} および V_i は、一般には重合度 i に依存するであろう。しかし重合度がある限界値 m^* 以上に大きくなるとほとんど一定となる。いいかえると、酵素は重合度がたとえば 100 の基質と 99 のものを区別できない、と考えるとよい。グルコミラーゼによる一連の直鎖状基質 ($n=2\sim 800$) の水解についての実験結果¹⁾ (図 2 参照) も、これを支持している。したがって、 n が m に比べて十分大きい場合には、短い基質が無視できない程度にできてきている反応の末期を論じない限り、 K_{mi} , V_i を一定と見なしてよいだろう。

図 2. グルコミラーゼ反応の速度パラメーター (K_{mi} , k_{+2}) に対する直鎖状基質の重合度 n の影響¹⁾

これに対して n が小さい場合には、 K_{mi} , V_i が i と共にかなり顕著に変化すると考えねばならない (図 2)。したがってホモポリマーの取り扱いでは、1) 重合度が十分大きく、速度パラメーターが一定とみなし得る場合と、2) 重合度が低く、速度パラメーターが重合度に依存する場合とに分けて取り扱うのが便利である。

始めの基質 S_n を key substrate と考えて、その初モル濃度を x^0 とし、反応開始後の時間 t におけるそのモル濃度を x , i -mer 基質 S_i ($i=2\sim n-1$) の濃度を x_i , また生成物 P の濃度を p とすれば、模式(1)に含まれる各 ES complex の定常状態と、生成物の

* m の値は、酵素表面に最大限いくつのモノマー単位が結合し得るかにによって決まる。リゾチームの X 線解析の結果によれば、6 個の N-アセチルグルコサミン残基が結合し得るという²⁾。

拮抗阻害を示す(2)の平衡とから、基質 $S_n, \dots, S_2$ に関する $(n-1)$ 個の速度式(4)と、生成物 P に関する 1 個の速度式(5)が得られる。

$$\left. \begin{aligned} -dx/dt &= K_n V_n x / \mathfrak{D} \\ dx_{n-1}/dt &= (K_n V_n x - K_{n-1} V_{n-1} x_{n-1}) / \mathfrak{D} \\ &\dots\dots\dots \\ dx_i/dt &= (K_{i+1} V_{i+1} x_{i+1} - K_i V_i x_i) / \mathfrak{D} \\ &\dots\dots\dots \\ dx_2/dt &= (K_3 V_3 x_3 - K_2 V_2 x_2) / \mathfrak{D} \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

$$dp/dt = (\sum_{i=2}^n K_i V_i x_i + 2K_2 V_2 x_2) / \mathfrak{D} \quad (5)$$

分母の $\mathfrak{D}$ はすべての式に共通で、

$$\mathfrak{D} \equiv 1 + \sum_{i=2}^n K_i x_i + K_p p \quad (6)$$

である。^{**}ここに K_i ($i=2\sim n$) は(3)の Michaelis 定数 K_{mi} の逆数で ($K_i = 1/K_{mi} = k_{+1,i}/(k_{-1,i} + k_{+2,i})$), K_p は(2)の阻害についての阻害物質定数の逆数 ($K_p = k_{+p}/k_{-p}$) である。(4), (5)を解けば、各基質 $S_n, \dots, S_2$, および生成物 P の時間変化が得られることになる。ここで前述の二つの場合、すなわち n が十分大きい場合と小さい場合とに分けて取り扱うことにしよう。

1.1. 高重合度の基質^{3a, b)}

上に述べたように、ある限界値 m 以上の重合度をもつ基質については、 K_{mi} (したがって K_i) および V_i は一定と見なすから、これを

$$K_i = K, V_i = V \quad (i > m) \quad (7)$$

とすれば、高重合度の基質 S_n の exo 型解重合反応において、 m 以下の重合度をもつ i -mer がかなりの割合に達する反応末期を除いては、

$$\sum_{i=2}^n K_i x_i = K \sum_{i=2}^n x_i = K x^0 \quad (8)$$

と置くことができる。ここに第 2 の等号は、始めにあった x^0 モルの基質のモル数がそのまま保存されていること (すなわち完全に水解されてしまった基質分子がほとんどないこと) を仮定している。これらの条件が満たされる限り、(4), (5)の速度式はそれぞれ

* 分母の $\mathfrak{D}$ が各段階に共通となることは、単一酵素による逐次反応で生成物が拮抗阻害をする場合の特長である。(1)の各段階で別種の酵素が働く場合には、分母は共通とはならない。

** 定義により $x_n = x$ である。

$$\left. \begin{aligned} -dx/dt &= KVx/(1+Kx^0+K_p p) \\ \dots\dots\dots \\ dx_i/dt &= KV(x_{i+1}-x_i)/(1+Kx^0+K_p p) \\ \dots\dots\dots \\ \dots\dots\dots \end{aligned} \right\} \quad (9) \quad (i=m \sim n-1)$$

$$dp/dt = KVx^0/(1+Kx^0+K_p p) \quad (10)$$

となる。(9)の第1番目の式で他の式および(10)を割ると、

$$\left. \begin{aligned} -dx_{n-1}/dx &= 1 - (x_{n-1}/x) \\ \dots\dots\dots \\ -dx_i/dx &= (x_{i+1}-x_i)/x \\ \dots\dots\dots \end{aligned} \right\} \quad (11) \quad (i=m \sim n-1)$$

および

$$-dp/dx = x^0/x \quad (12)$$

となる。(11)を逐次的に解けば、各 i -mer の濃度 x_i を key substrate S_n の濃度 x で表わすことができる。

簡単のために始めの基質が均一であるとすれば、初期条件は $x=x^0$ で $x_i=0$ ($i=2 \sim n-1$) であるから

$$x_i = \frac{x \{\ln(x^0/x)\}^{n-i}}{(n-i)!} \quad (13)$$

となる。また(12)から、 p も x の関数として

$$p = x^0 \ln(x^0/x) \quad (14)$$

で与えられる。単量体生成物の総濃度 p は実験的に簡単に測定できるものであるから、反応が完結したときの p を p_∞ とし、単量体生成物についての反応率 α_P を

$$\alpha_P = p/p_\infty = p/nx^0 \quad (15)$$

で定義しておくと、(14)により

$$n\alpha_P = \ln(x^0/x) \quad \text{または} \quad x = x^0 e^{-n\alpha_P} \quad (16)$$

となる。これを用いて(13)は

$$x_i = x^0 \cdot \frac{e^{-n\alpha_P} (n\alpha_P)^{n-i}}{(n-i)!} \quad (17)$$

と書ける。(16), (17)は、反応の経過に伴う始めの基質 S_n および途中に現われる i -mer 基質の消長を、時間を用いる代りに、時間に対して単調に変化し、かつ容易に実測し得る反応率 α_P を用いて表わしたものである。

S_n の濃度 x は反応の進行と共に単調に減少するが、 $(n-1)$ -mer 以下の基質は、反応率 α_P に対して極大をもつ。 i -mer の濃度 x_i が極大値に達する反応率 $\alpha_{P(i-\max)}$ 、およびその極大値 $x_{i\max}$ は、 $dx_i/d\alpha_P = 0$ より

$$\alpha_{P(i-\max)} = 1 - \frac{i}{n} \quad (18)$$

$$x_{i\max} = x^0 \cdot \frac{e^{-(n-i)} (n-i)^{n-i}}{(n-i)!} \quad (19)$$

で与えられる。Stirling の公式を用いると、(19)は余り小さくない $(n-i)$ に対して、近似的に

$$x_{i\max} \approx \frac{x^0}{\sqrt{2\pi(n-i)}} \quad (20)$$

と書ける。すなわち i -mer の極大は $1-(i/n)$ なる反応率で現われ、その極大値は近似的に $(n-i)$ の平方根に逆比例する。

(17)はまた一定の α_P における重合度分布を示す式と見ることができる。2, 3の α_P における重合度分布を図3に示す。均一な基質 S_n が exo 型の解重合を受

図3. 反応に伴う重合度分布の推移^{3a)}

けるとき、その重合度は丁度切断を受けた回数だけ小さくなる。切断を受ける回数は Poisson 分布にしたがうから、重合度の減少 $(n-i)$ もまた、同じく Poisson 分布にしたがうはずである。(17)は正にこのことを示している。

以上、反応の経過を論じるのに、時間の代りに反応率 α_P を用いた。ここまでの取り扱い、(11), (12)から出発しており、もとの速度式(4), (5) (または(9), (10))の共通の分母 $\mathcal{D}$ は全部消去されているので、その具体的な内容には全く無関係である。すなわち生成物による拮抗阻害は $K_p p$ という形で $\mathcal{D}$ の中に入っているが(6)参照)。これはあってもなくても、今までの結果には何等影響はない。極端な場合、 $\mathcal{D}$ が定数であってもよいのである。これはこの反応が Michaelis-Menten 型の酵素反応ではなく、非酵素的な単なる逐次1次反応であることに相当する。時間軸の代りに反応率を用いることに関するこの議論は、1.3 および2に述べる

取り扱いについても同様に成り立つ。

x_i や p を“時間”の関数として表現したい場合には、⑩の内容が問題となる。まず(9)の第1番目の式の分母の p に(14)を代入して積分すれば、 x と t との関係式として

$$KVt = (1 + Kx^0) \ln \frac{x^0}{x} + \frac{K_p x^0}{2} \left(\ln \frac{x^0}{x} \right)^2 \quad (21)$$

が得られる。 x_i と x との関係は(13)で得られているから、これと結びつけば x_i の“時間変化”が得られることになる。これらは定数 K , V , K_p , x^0 を含むので、反応率に対する挙動よりも、はるかに多くの要因によって支配されることとなる。

生成物 P の時間変化は、直接(10)を積分して

$$KVx^0t = (1 + Kx^0)p + \frac{K_p}{2}p^2 \quad (22)$$

となる。

以上の取り扱いでは、始めの基質の重合度を均一と仮定した。これはもとより現実性がなく、当然分布をもつとしなければならない。最初の基質が重合度分布をもつ場合も、最高の重合度のもの S_n とし、これを key substrate として上の取り扱いと同様にすればよく、異なるのはただ初期条件のみである。すなわち x_i^0 を未反応の始めの基質の状態における i -mer のモル濃度とし、始めの基質の総モル濃度 X^0 を

$$X^0 = \sum_{i=2}^n x_i^0$$

とし、またその数平均重合度を $\bar{n}$ とすれば

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=2}^n i x_i^0}{\sum_{i=2}^n x_i^0}$$

(13), (17)に相当する式として

$$x_i = x \sum_{j=0}^{n-i} \frac{x_i^0}{x^0} \frac{\ln(x^0/x)^j}{j!} \quad (13')$$

$$x_i = e^{-\bar{n}\alpha_P} \sum_{j=0}^{n-i} x_i^0 \frac{(\bar{n}\alpha_P)^j}{j!} \quad (17')$$

が得られ、また(14), (15), (16), (21), (22)はそれぞれ

$$p = X^0 \ln(x^0/x) \quad (14')$$

$$\alpha_P = p/p_\infty = p/\bar{n}X^0 \quad (15')$$

$$\bar{n}\alpha_P = \ln(x^0/x) \quad (16')$$

$$KVt = (1 + KX^0) \ln \frac{x^0}{x} + \frac{K_p X^0}{2} \left(\ln \frac{x^0}{x} \right)^2 \quad (21')$$

$$KVX^0t = (1 + KX^0)p + \frac{K_p}{2}p^2 \quad (22')$$

となる。 i -mer の極大の条件は、この場合(18), (19)のよ

うな簡単な形に得ることはできない。

1.2. 数平均分子量決定への応用⁴⁾

exo 型酵素の作用様式の特長は、それがポリマーの特定の末端からしか作用しないということである。速度を論じる場合に問題となる“基質濃度”は、endo 型の酵素の場合のように切断を受けるべき結合の総数とはならず、特定の末端の濃度、すなわちポリマー自身の“モル濃度”となる。したがって、一定重量濃度 c (g/100 ml) のポリマー溶液を取った場合、その完全分解値 p_∞ は、その平均重合度にほとんど無関係に一定であるが、“基質濃度” X^0 は、数平均重合度 $\bar{n}$ 、あるいは数平均分子量 $\bar{M}_n$ に逆比例することとなる。

すなわちモノマー残基の分子量を M とすれば

$$X^0 = 10c/\bar{M}\bar{n} = 10c/\bar{M}_n \quad (23)$$

となる。一方、反応の初速度 v は Michaelis-Menten 式によって、“基質濃度” X^0 と関係づけられ、さらに(23)により

$$v = \frac{VX^0}{K_m + X^0} = \frac{10Vc}{K_m \bar{M}_n + 10c} \quad (24)$$

で表わされる。したがって、exo 型酵素による直鎖状ポリマーの反応の速さは、同一重量濃度の試料溶液については、重合度の大きいもの程小さいはずである。グルコアミラーゼによる種々の重合度のアミロースの⁴⁾分画標品 (AF, DF グループ) の水解反応の反応曲線は、図4, 5に示すように、明らかにこの傾向を示して

図4. 種々の粘度平均重合度 $\bar{M}_v$ のアミロース試料 (AF グループ) のグルコアミラーゼによる水解反応⁴⁾
(pH 4.6, 25°C)

$c = 0.1$ g/100 ml $[E]_0 = 6.8 \times 10^{-8}$ M

○ : AF I-1 $\bar{M}_n = 1,650,000$

△ : AF I-2 $\bar{M}_n = 1,100,000$

● : AF II $\bar{M}_n = 360,000$

図 5. 種々の数平均重合度 $\bar{M}_n$ のアミロース試料 (DF グループ) のグルコアミラーゼによる水解反応⁴⁾
(pH 4.6, 25°C)
 $c=0.025$ g/100 ml $[E]_0=1.84 \times 10^{-5}$ M
○: DF 2 $\bar{M}_n=33,000$
△: DF 3 $\bar{M}_n=20,000$
●: DF 5 $\bar{M}_n=13,000$

いる*。この性質を用いて、鎖状ポリマーの数平均分子量を決定できないだろうかと考えられる。(24)から分かるように、基質濃度 c が $(K_m \bar{M}_n/10)$ に比べて十分低い処では、 $v \propto 1/\bar{M}_n$ が近似的に成り立つから、 $\bar{M}_n$ の知られた標準試料を用いることにより、初速度 v の測定から、未知試料の $\bar{M}_n$ を決めることができるであろう。しかしこの範囲を超える基質濃度では、この比例性は成り立たないし、また用いる試料の $\bar{M}_n$ を知る前に、この濃度範囲に関する判定をくだすことはできない。

そこで生成物 P の時間変化を表わす式 (22') を見てみよう。これは直ちに

$$\frac{t}{p} = \frac{1+KX^0}{KVX^0} + \frac{K_p}{2KVX^0} \cdot p \quad (25)$$

と書け、 t/p の p に対するプロットは直線を与え、その傾斜 s は(23)を用いて

* endo 型の酵素では、これとは逆に重合度の大きい方が速度の大きい場合が多い。

$$s = \frac{K_p}{2KVX^0} = \frac{K_p}{20KV_c} \cdot \bar{M}_n \quad (26)$$

となることが分かる。すなわちこの式は、同じ重量濃度 c (g/100ml) の試料溶液については、この傾斜 s は数平均分子量 $\bar{M}_n$ に比例することを示している。この関係を用いれば、標準試料についての s の値と比較することによって、数本の反応曲線の測定から、未知試料の $\bar{M}_n$ を決定することができるはずである。

(25)の直線関係が実際に成り立つかどうかを調べるために、図4, 5の反応曲線を、 t/p 対 p プロットに書き直したのが図6, 7である。図6の矢印で示した反応率

図 6. AF グループについての t/p 対 p プロット⁴⁾
(図4の結果による)
○: AF I-1 $\bar{M}_n=1,650,000$
△: AF I-2 $\bar{M}_n=1,100,000$
●: AF II $\bar{M}_n=360,000$
矢印は反応率 $\alpha_F=0.70$ の点を示す。

図 7. DF グループについての t/p 対 p プロット⁴⁾
(図5の結果による)
○: DF 2 $\bar{M}_n=33,000$
△: DF 3 $\bar{M}_n=20,000$
●: DF 5 $\bar{M}_n=13,000$

$\alpha_P=0.70$ を超える反応の末期を除いて、よく直線性が成立していることが分かる。反応末期で実験値が上にあがれる（速度が理論値よりも小さくなる）のは、小さい K , V 値をもつ低分子のものがかなり生じていること、および始めにあったポリマー分子のあるものは既に完全に水解されて、基質濃度 X^0 が低下したことにより、この取り扱いの基礎になっている(8)の条件がもはや成り立たなくなったためである。

次にこのプロットの傾斜 s と $\bar{M}_n$ との比例性(8)を調べるために、用いた試料の粘度平均分子量 $\bar{M}_v$, または数平均分子量 $\bar{M}_n$ (還元性末端基の定量による)に対して s をプロットしたのが図 8, 9 である。それぞれ s との間により比例性が見られる。高分子量の AF グループに対しては、浸透圧法や末端基定量法による

図 8. s と $\bar{M}_v$ との関係 (AF グループ)^{a)}

図 9. s と $\bar{M}_n$ との関係 (DF グループ)^{a)}

$\bar{M}_n$ の測定が困難なので、粘度平均分子量 $\bar{M}_v$ を用いた。これらの試料について、 $\bar{M}_n$ はほぼ $\bar{M}_v$ に比例すると考えてよいだろう。

図 4~7 から分かるように、重合度の低い DF グループでは、高重合度の AF グループに比して、試料相互間の速度の違いも、 i/p 対 p プロットの傾斜も共に小さい。つまりこの方法は高重合度の試料に対してより感度がよいといえる。浸透圧法や末端基定量法など、従来の数平均分子量の決定法は、いずれも高分子量の試料に対して精度が悪く、測定可能な $\bar{M}_n$ の上限は約 5×10^5 ないし 10^6 といわれている。exo 型酵素を用いるこの方法は、従来の方法の適用できない程の高分子量の試料に対して特に威力を発揮する点、および少量の試料(数十mg)ですみ、操作が簡単で、低分子の不純物の影響を受けにくい点がその特長といえよう。ただ、適当な exo 型酵素で水解可能なホモポリマーにしか適用できないこと、および $\bar{M}_n$ 既知の標準試料を必要とすることがその欠点である。アミロースは、グルコアミラーゼという恰好の exo 型酵素があるので非常によい対象といえる。アミロースの種々の分画標品について、この方法で決定した数平均分子量を、従来の方法による結果と共に表 1 に掲げておく。

表 1. 種々のアミロース分画標品の粘度平均および数平均分子量^{a)}

分画番号	$\bar{M}_v$	$\bar{M}_n$			s/s^0 ^{c)}
		浸透圧法	末端基定量法	exo 型酵素法	
AF I-1	1,650,000	—	—	1,520,000	3.80
AF I-2	1,100,000	—	—	920,000	2.29
AF I-3 ^{a)}	460,000	400,000	420,000	400,000	1.00 ^{a)}
AF II	360,000	210,000	300,000	270,000	0.68
AF III-1	540,000	—	—	480,000	1.19
AF III-2	270,000	220,000	—	200,000	3.50
DF 2 ^{b)}	57,400	33,000	33,300	33,000	1.00 ^{b)}
DF 3	33,000	—	20,000	19,000	0.58
DF 5	15,200	—	13,400	12,000	0.35

a), b) AF I-3 および DF 2 を、それぞれ AF および DF グループの exo 型酵素法による $\bar{M}_n$ 決定の標準試料として用いた。

c) s^0 は標準試料の s 値 (図参照) を表わす。

1.3 低重合度の基質^{5,6,3b)}

前述のように、基質の重合度がある程度(大体10前後と考えるとよいだろう)以下になると、1.1 で用いた K_i , V_i が一定という近似(7)は使えなくなり、 i に依存するものとして扱わねばならない。始めの速度式(4)

に立ち戻り、 $K_i V_i$ が i によって異なるものとして、分母 $\mathcal{D}$ と時間 t を消去すると、(11)に相当する式として $(n-2)$ 個の微分方程式

$$\left. \begin{aligned} -dx_{n-1}/dx &= 1 - \rho_{n-1}(x_{n-1}/x) \\ &\dots\dots\dots \\ -dx_i/dx &= \rho_{i+1}(x_{i+1}/x) - \rho_i(x_i/x) \\ &\quad (i=2 \sim n-1) \end{aligned} \right\} \quad (27)$$

が得られる。ここに ρ は

$$\rho_i = K_i V_i / K_n V_n \quad (i=2 \sim n-1) \quad (28)$$

で定義される定数で、これは i -mer 基質の分解過程、すなわち (1) の i 番目の過程の速度パラメーターの積 $K_i V_i$ を、始めの基質のそれ $K_n V_n$ で割ったものである。1.1 の取り扱い、 $\rho_i=1$ の場合に相当する。

始めの基質が均一なものとして (27) を逐次的に解くと、

$$x_i = x^0 \sum_{k=i}^n a_{ik} (x/x^0)^{\rho_k}, \quad (i=2 \sim n) \quad (29)$$

となる。ここに係数 a_{ik} は

$$a_{ik} = \prod_{l=i+1}^n \rho_l / \prod_{l=i(\neq k)}^n (\rho_l - \rho_k) \quad (30)$$

で与えられ、これは i 以上の重合度をもつ基質に対する ρ の値によって決まる。(29)は反応のある時点における i -mer 基質 S_i の濃度 x_i を、その時点における始めの基質 S_n (key substrate) の濃度 x で表わしたもので (x^0 は S_n の初濃度)、1.1 の (13) に相当する式である。

一方、構成単位の総量は反応によって変わらないから、

$$nx^0 = p + \sum_{i=2}^n i x_i \quad (31)$$

が成り立つ。(29)を(31)に代入すると、単量体生成物濃度 p を x で表わす式として

$$p = nx^0 - x^0 \sum_{i=2}^n i \sum_{k=i}^n a_{ik} (x/x^0)^{\rho_k} \quad (32)$$

が得られる。単量体生成物で測った反応率 α_P は、(15) と (32) より

$$\alpha_P = p/nx^0 = 1 - \frac{1}{n} \sum_{i=2}^n i \sum_{k=i}^n a_{ik} (x/x^0)^{\rho_k} \quad (33)$$

となる。したがって (29), (30), (33) を用いれば、 x をパラメーターとして、 i -mer 濃度 x_i と反応率 α_P との関係が得られることになる。これらは各 i -mer ($i=2 \sim n$) の $K_i V_i$ が (したがって ρ_i が) 既知ならば計算することができる。一例として、 $n=10$ のポリマーに

つき、 ρ_i が図11 (後出) の黒丸で示すように、重合度 i と共に減少する場合について計算した結果を図10に示す。ここに用いた ρ_i と i との関係は、図2の実験結果にもとづいて設定したものである。

図10. 反応率 α_P に伴う i -mer 濃度 x_i の変化⁵⁾。
 $n=10$, ρ_i の i に対する依存性は図11に示す。

i -mer の極大については、(27)で $dx_i/dx=0$ とすれば直ちに

$$x_{i+1}/x_{i\max} = \rho_i/\rho_{i+1} \quad (34)$$

という簡単な関係が成り立つ。つまり i -mer の極大値 $x_{i\max}$ と、その時点における $(i+1)$ -mer の濃度 x_{i+1} との比は、 ρ_{i+1} と ρ_i の比に等しい。この性質を用いると、図10のように反応に伴う各 i -mer の濃度変化が実験的に得られれば、すべての ρ_i を、始めの基質 n -mer の値 $\rho_n=1$ から出発して、逐次きめることができることとなる。(30), (34)から分かるように、 i -mer の極大値は、 i 以上の重合度をもつ基質の ρ の値によって決まり、 i 未満のもの ρ には無関係である。

i -mer の極大の現われる反応率 $\alpha_{P(i\max)}$ については、高重合度の基質の場合の (18) のような簡単な関係は期待できない。しかし図10の結果について、 $\alpha_{P(i\max)}$ を i に対してプロットして見ると、図11の白丸で示すように、1.1 の高重合度の場合 (即ちすべての i につき $\rho_i=1$) に成り立った

$$\alpha_{P(i\max)} = 1 - (i/n) \quad (18)$$

の関係 (図11の直線がこれに当たる) にかなりよくし

図 11. i -mer が極大に達する反応率 $\alpha_P(i-max)$, および図 10 の計算に用いた ρ_i の値。直線は (8) 式の関係を表わす。

たがうことが分かる*。したがって、 n -mer を原料として exo 型酵素を用いて、ある特定の重合度 j のものを最高収量で得たいと思えば、反応率 $\alpha_P = 1 - j/n$ のところで反応を止めればよい**。

x_i および p_i の“時間経過”が必要であれば、まず (2) を (4) の第 1 番目の式に代入して積分し、 x と t との関係を得、これと (2), (3) とを結びつけばよい。しかしこれらは多くの因子によって支配されるため、非常に複雑となり、実用的価値に乏しいので、ここでは省略する。簡単に実測し得る反応率 α_P を時間の代りに使うことによって、上述のように取り扱いをはるかに単純化することができることは既に述べた通りである。 α_P と時間との関係は、実験的に容易に得られるから、これを図 10 によって翻訳すれば、各 i -mer の“時間変化”を、半経験的に得ることができる。

2. ヘテロポリマーの exo 型解重合

前章 1.3 の取り扱いは、容易にヘテロポリマーに拡

* この関係はどんな場合にも成り立つとはいえないが、 ρ_i が i と共に単調に減少する場合には成立するようである。

** ある特定の重合度のポリマーが均一に得やすい場合がある。アミロースでは $n=15, 7, 6$ などが得やすい。これらを出発物にして、それらから少したけ重合度の低いものを収量よく作りたい場合は、 exo 型酵素を用いるのが最もよい方法である。収量については図 10 を参照されたい。

張することができる。例として、異なるアミノ酸 A, B, C... からできているペプチド ABC... が、エキソペプチダーゼによって加水分解される場合を想像して頂きたい。(1) の模式はこの場合一般形として

と書ける。ここに P_i は i -mer 基質 S_i の末端から切れて生じる単量体生成物 (A, B, C など) を表わし、H は 1 つの結合が切れる毎に生じる副生成物を表わす。上の例では水素イオンがこれに当る。これは pH スタットなどを用いて容易に測定できる。 P_i は A, B, C などのアミノ酸に相当し、アミノ酸分析機を用いて個々に定量することが可能である。それゆえ、ホモポリマーの場合とは違って、切れて残った基質 S_{i-1} よりも、むしろ個々の単量体生成物 P_i の方に着目することとなる。

基質についての速度式は (4) と全く同形で

$$\left. \begin{aligned} -dx/dt &= K_n V_n x / \mathcal{D}' \\ \dots\dots\dots \\ dx_i/dt &= (K_{i+1} V_{i+1} x_{i+1} - K_i V_i x_i) / \mathcal{D}' \end{aligned} \right\} \quad (36)$$

($i=2 \sim n-1$)

また生成物 P_i については、そのモル濃度を p_i とすれば、

$$dp_i/dt = K_i V_i x_i / \mathcal{D}' \quad (37)$$

($i=2 \sim n$)

となる。分母の $\mathcal{D}'$ は P_i による拮抗阻害

を考慮して

$$\mathcal{D}' = 1 + \sum_{i=2}^n K_i x_i + \sum_{i=1}^n K_{p_i} p_i \quad (39)$$

となる。ここに K_{p_i} は (38) の平衡定数 (阻害物質定数の逆数) を表わす。(明らかに $p_2 = p_1$, $p_n = x^n - x$ である。) また (3) の S_{2-1} は P_1 に相当する。

(39) の最初の式で他の式および (37) を割ると、 dx_i/dx としては (2) と全く同一の式が得られ、 dp_i/dx としては

$$-dp_i/dx = \rho_i x_i / x, \quad (i=2 \sim n) \quad (40)$$

が得られる。 x_i と x との関係は 1.3 の場合と全く同じであるから、既に得た x_i の式 (2) を (40) に代入して積分すれば、 p_i は x の関数として

$$p_i = x^n \rho_i \sum_{k=i}^n \frac{i a_k}{\rho_k} [1 - (x/x^0)^{\rho_k}] \quad (41)$$

図12. (a), (b) $n=8$ のヘテロポリマーの exo 型解重合反応に伴う P_i および S_i の濃度変化。実線は p_i/x^0 を、破線は x_i/x^0 を表す。数字はそれぞれの i の値を示す。 ρ_i の値については表2参照。

で与えられる。

一方副生成物Hのモル濃度を h とすると、明らかに

$$h = \sum_{i=1}^n p_i - p_1 = \sum_{i=2}^n p_i \quad (42)$$

である。 h はまた切れた結合のモル濃度に等しいから、反応率 α_H を、始めにあった水解されるべき全結合数に対する切れた結合数の割合として定義すると

$$\alpha_H = h / (n-1)x^0 = \sum_{i=2}^n p_i / (n-1)x^0 \quad (43)$$

となる。これは前章で用いた単量体生成物についての反応率 α_P とは少し違う。 α_P はヘテロポリマーの場合

$$\alpha_P = \sum_{i=1}^n p_i / nx^0 \quad (44)$$

となる。反応率としてどちらを用いるかは、反応の性質と測定方法に応じて便利な方を選べばよい。ホモポリマーの場合でも、末端基の“増加量”で測れば α_H が得られることになる。

(43) または (44) と (41) から、 x をパラメーターとして、 α_H または α_P と p_i の関係が、各 p_i の値が知られれば計算によって求められる。

酵素の特異性から考えて、 i -mer の p_i の値は主として水解される末端に位する単量体（例えばアミノ酸）の種類によって決まるだろう。したがって、ホモポリマーの場合（ p_i の i に対する依存性は単調なの

が常である）とは違って、ヘテロポリマーでは構成単位の種類とその配列順序に応じて、 i の減少に伴う p_i の変化は不規則であると考えねばならない。

$n=8$ のヘテロポリマーが exo 型酵素で水解される反応において、 p_i が 2^{w_i} の形を取る（ ρ_i は定義によって1である）として、 w_i が i と共に種々の変り方をする場合につき、 x_i および p_i の反応率 α_H に伴う変化の有様を計算したが、図12(a), (b) にその中の2例を示した。ここに用いた p_i の値を表2に掲げてお

表 2. 図12の計算に用いた p_i の値

p_i	ρ_8	ρ_7	ρ_6	ρ_5	ρ_4	ρ_3	ρ_2
(a)	1	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}
(b)	1	2^{-1}	2^{+1}	2^{-2}	2^{+2}	2^{-3}	2^{+3}

く。相隣る二つの ρ の相対的な大きさ、 $p_i \geq p_{i-1}$ 、に対応して、 p_i と p_{i-1} の曲線間の間隔が増減し、また $(i-1)$ -mer の山の高さが低くまた高くなる有様は、直観的に予想されるところとよく一致している。このような取り扱い、ペプチドのアミノ酸結合順序の決定に応用できるだろう。

3. Multiple Attack

以上の取り扱いでは、(1)に示したように、 n -mer の逐次解重合の各段階が、すべて Michaelis-Menten 式

にしたがい、第1段階で生じた $(n-1)$ -mer が一旦酵素から離れて溶液中に帰り、質量作用の法則にしたがって次の活性な ES_{n-1} complex を作ると素朴に考えた。しかし ES_{n-1} complex の出来方には、この外に質量作用の法則にしたがわない図13に示すような経

図 13. multiple attack の機構

路も存在しうる。すなわち ES_n において第1番目の結合が切れた後に、単量体生成物が先に遊離して、 S_{n-1} が酵素と結合したままの状態 (ES'_{n-1} で示す) で残っているとすると、このものは酵素から脱離して溶液中に帰る前に、酵素表面上を動いて次の活性な ES_{n-1} complex に移行して第2の結合が切れるということが、ある確率で起こり得るだろう。このようにして、一つの酵素分子が、同じ基質分子を何回かつづけて攻撃する可能性が存在する。この機構は multiple attack と呼ばれ、その極端な場合は、一つの基質分子を完全に水解し尽すまで他の基質分子を攻撃しないという、いわゆる single-chain mechanism¹⁰⁾ となる。これに対して前章までに考えた(1)の機構は、multi-chain mechanism¹¹⁾ と呼ばれる。これらの機構は、 β -アミラーゼによるアミロースの水解反応において、屢々議論されてきたところである。この問題を、ホモポリマーの最も簡単な場合、すなわち $n=3$ の場合について、速度論的に扱って見よう。図13のような multiple attack の可能性を考慮した模式は

となる。この模式に基づいて1.3と同様に取り扱うと、 S_2 の極大値 x_{2max} について

$$x_{2max}/x^0 = (1 - \sigma') \rho_2 \rho_2 / (1 - \rho_2) \quad (46)$$

が得られる。ここに σ' は

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{\sigma'} = & \left(1 + \frac{k_2'}{k_2''}\right) \left[1 + \left(\frac{k_3}{k_4}\right) \left(1 + \frac{k_{-9}}{k_8}\right)\right. \\
 & \left. + \left(\frac{k_{-9}}{k_8}\right) \left(1 + \frac{k_{-8}}{k_4}\right)\right] \quad (47)
 \end{aligned}$$

の内容をもつ因子で、図13の経路を考えない場合(すなわち前章までの取り扱い)では、 $k_2''=0$ であるから $\sigma'=0$ となる。 ρ_2 は、 S_2 および S_3 を基質として得られる速度パラメーターの積の比、 $\rho_2 = K_2 V_2 / K_3 V_3$ であることは、前章までと同じで、multiple attack に無関係である。

multiple attack が顕著になると、中間に生ずる基質 S_2 は蓄積される暇なく水解されてしまうので、 x_{2max} は0に近づく。したがって σ' は、multiple attack の寄与の程度を示す尺度となる⁶⁾。そしてこの大きさは、 ρ_2 と x_{2max} を実測すれば(46)によって知り得るはずである。

われわれは、グルコアミラーゼによるマルトリオース (S_3) の水解反応について、この方法によって σ' を評価した。結果を表3にまとめておく。この場合に

表 3. グルコアミラーゼによるマルトリオースの水解反応における σ' の評価⁶⁾。
(15°C, pH 5.1)

x_{2max}/x^0	$\rho_2 = K_3 V_3 / K_2 V_2$	$\rho_2 \rho_2 / (1 - \rho_2)$	$1 - \sigma'$
$0.85 \pm 0.03^{a)}$	0.0427	0.87	0.98 ± 0.03

a) $x^0 = 10.1, 1.04, 0.694 \text{ mM}$ についての平均値。

は、実験誤差の範囲内で $\sigma' \approx 0$ と見なされ、multiple attack の寄与は無視しうると考えられる。しかしながら、基質の重合度 n が大きくなると、酵素との結合が強くなり、酵素表面から離れにくくなるだろう。このことは、(47)に含まれる k_2'/k_2'' および k_{-9}/k_8 を小さくすることによって、 σ' を大きくする効果をもたらす。multiple attack の寄与の可能性を増すと考えられる。Bailey と French は、 β -アミラーゼによるラベルしたアミロースの水解を巧みな方法で調べ、一つの酵素分子が一つのアミロース分子を、平均約4回つづけて攻撃することを見出している⁸⁾。

ここに述べた multiple attack を考慮した取り扱い¹³⁾ は、一般の n -mer に拡張することができる。上述の結果からも類推されるように、 i -mer の極大値は multiple attack の寄与の増すにしたがって低くなるが、1.2に述べた s と $\bar{M}_n$ との比例関係⁴⁾はそのまま成り立つことが示される。

む す び

以上、exo 型酵素による直鎖状基質の解重合という、一つの扱いやすい対象についての取り扱いをまとめて

見た。これは単一酵素による逐次反応という広大な領域における一つの出発点に過ぎない。分枝した基質, endo 型酵素^{14,15)}, さらに生体高分子の生合成など^{16,17)}, 発展の方向はきわめて多岐である。今後の進展についていろいろ御教示を頂ければ何より幸である。

終りに、御指導頂いた小野宗三郎教授、数学的な取り扱いでお世話になった静岡大学の松本和夫教授、ならびに計算に際して多大の御協力を頂いた塩野義解析センターの浅野長一郎博士、林英輝博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) S. Ono, K. Hiromi, M. Zinbo : J. Biochem., 55, 315 (1964)
- 2) D. C. Phillips : Sci. American, 215, No. 5, 78 (1966)
- 3) a) 広海啓太郎, 小野宗三郎 : 第15回酵素化学シンポジウム講演集, p. 114 (1963); b) K. Hiromi, S. Ono : J. Biochem., 53, 164 (1963)
- 4) K. Hiromi, K. Ogawa, N. Nakanishi, S. Ono : J.

Biochem., 60, 439 (1966)

- 5) K. Hiromi, S. Ono : J. Biochem., 61, 654 (1967)
- 6) 広海啓太郎, 増田清, 小野宗三郎 : 酵素化学シンポジウム, 15, 33 (1961)
- 7) 広海啓太郎, 小野宗三郎 : 第19回酵素化学シンポジウム, 金沢 (1968) 発表予定
- 8) J. M. Bailey, D. French : J. Biol. Chem., 226, 1 (1957)
- 9) J. F. Robyt, D. French : Arch. Biochem. Biophys., 122, 8 (1967)
- 10) M. A. Swanson : J. Biol. Chem., 172, 805 (1948); J. M. G. Cowie, I. D. Fleming, C. T. Greenwood, D. J. Manners : J. Chem. Soc., 1958, 697
- 11) R. H. Hopkins et al. : Biochem. J., 56, 136, 140 (1954)
- 12) C. T. Greenwood : Advances in Carbohydrate Chem., 11, 335 (1956)
- 13) 未発表
- 14) J. Osugi : Proc. Japan Acad., 27, 241, 245 (1951)
- 15) S. Wang, F. H. Carpenter : Biochemistry, 6, 215 (1967)
- 16) I. Gerst, S. N. Levine : J. Theoret. Biol., 9, 16 (1965)
- 17) J. M. Zimmerman, R. Simha : J. Theoret. Biol., 9, 153 (1965), ; 13 103 (1965)

モノクロメーター L 型

プリズムモノクロメーター			回折格子モノクロメーター		
形 式	プリズム材質	分 解 能 ($\lambda=540$ nm)	形 式	格子定数	分 解 能
G	重フリント硝子	$\lambda/\Delta\lambda=9000$	LD-6	$\frac{1}{638}$	$\lambda/\Delta\lambda=32500$
Q-F	熔融透明石英	$\lambda/\Delta\lambda=2600$	LD-10	同上	$\lambda/\Delta\lambda=16500$
Q-C	結 晶 水 晶				

高分解能

携帯至便

廉価

営業品目 光電分光光度計 ■ 分光写真器 ■ ファブリペロ干渉分光計 ■ ジャマン干渉計 ■ マッハツェンダー・マイケルソン干渉計 ■ シュリーレン装置

株式会社 溝尻光学工業所

取締役社長 溝 尻 寛
東京都品川区西品川2丁目8番2号
電話 (492) 1900 代表