

Title	透析定常法によるキサントキシダーゼ反応速度論
Author(s)	上河原, 良衛
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31571
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍) ^{かみ が わら よし え} 上 河 原 良 衛
 学位の種類 医 学 博 士
 学位記番号 第 3 8 7 8 号
 学位授与の日付 昭 和 52 年 3 月 25 日
 学位授与の要件 医 学 研 究 科 生 理 系
 学位規則第 5 条第 1 項該当
 学位論文題目 透 析 定 常 法 に よ る キ サ ン チ ン 酸 化 酵 素 反 応 速 度 論

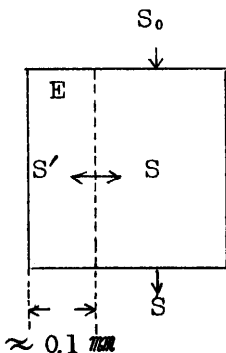
論文審査委員 (主査) 教 授 中 馬 一 郎
 (副査) 教 授 山 野 俊 雄 教 授 和 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

透析装置を用い、酵素不透過性の半透膜に包みこまれた微量の酵素溶液のまわりを流れる基質溶液が、酵素によって分解される反応を解析する。最初に酵素溶液を充填しておけば、基質溶液を変えるコック操作によるだけで異なる条件下の基質-酵素反応を反復して行うことができる。従って本法の特徴として、酵素が微量ですむこと、実験者のピペット操作による誤差をなくしその繁雑さが避けられるという自動化に通じる利点をあげることができる。酵素反応の解析は、半透膜が介在しているので若干複雑になり、いくつかの解析法が考えられている。本研究の目的は、単純な理論式を提出し、実験成績との比較を行なって検証し、Michaelis-Menten式の V_m, K_m, K_i 等が正しく与えられることを示すことにある。

〔解析法〕



左図のように酵素不透過性の半透膜（点線）で2室に区切られた容器において、左室に酵素溶液Eを入れ、右室に濃度 S_0 の基質溶液を流入させる。半透膜透過性の基質の濃度は反応によって S_0 から S に減少する。左室中の基質濃度を S' 、基質溶液の流入速度を f 、右室の容積を V_e 、半透膜の面積を A 、基質ならびに生成物の膜透過速度を k とすると、単位時間あたりの S の変化量は次式で表わされる。

$$da/dt = -kA(S - S')/V_e + f(S_0 - S)/V_e$$

第1項は右室から左室へ移動する量で、第2項は液の流出入による変化量を意味する。左室中の酵素反応は、Michaelis-Menten式に従うとすると、左室の容積をViとすれば、S'の変化量は次式となる。

$$ds'/dt = KA(S - S')/Vi - VmS'/(S' + Km)$$

定常状態ではds/dt=ds'/dt=0であり、両式よりS'を消去して次式を得る。

$$\left\{ \frac{VmVi}{f} - (So - S) \right\} \left\{ \frac{So}{So - S} - \left(1 + \frac{f}{kA} \right) \right\} = Km$$

基質変化量が小さいときは、近似的に次式のように変形できる。

$$\frac{1}{So - S} = \frac{f}{VmVi} \left\{ 1 + \frac{1}{So} \left(Km + \frac{VmVi}{kA} + \frac{VmVi}{f} \right) \right\}$$

[方法ならびに成績]

半透膜には市販セロファンを用い(膜面積30~80cm²)、上図左室部分の容積は0.15~0.40ml(深さ≈0.1mm)右室の容積は2.3~4.5mlの透析装置を作成した。キサンチン酸化酵素は牛乳より抽出して精製した。実験は次のような条件下で行った。キサンチン酸化酵素濃度(1~10μg/ml)、基質濃度(キサンチン10⁻⁴~10⁻⁵M)、流速(0.3~1.0ml/min)、緩衝液(0.1Mピロリン酸, pH 8.3)、温度25℃、キサンチンおよび尿酸の濃度は、分光的にそれぞれ275nm、295nmの吸光度より算出した。左室の酵素濃度、ならびに右室に流出入する基質濃度を変数とした実験成績は次のような実験式にまとめられた。Soは流入液の基質濃度、Sは流出液の基質濃度とする。

(1) 基質濃度を変数とするとき

$$\frac{1}{So - S} = \frac{a}{So} + b \quad a, b \text{定数}$$

(2) 酵素濃度Vmを変数にするとき

$$\frac{1}{So - S} = \frac{a'}{Vm} + b' \quad a', b' \text{定数}$$

(3) (1)のプロットは酵素濃度のいかにかわらず、定点を通る。

(1)~(3)はいずれも理論式から帰結されることであり、理論式は実験的に検証された。実験成績を理論式に代入して求めた定数Km(2.0×10⁻⁵M)は従来法で得られる値と一致した。更に拮抗阻害剤の濃度をI、解離定数をKiとすると次式で与えられる。

$$\frac{1}{So - S} = \frac{f}{VmVi} \left\{ 1 + \frac{1}{So} \left[Km \left(1 + \frac{I}{Ki} \right) + \frac{VmVi}{kA} + \frac{VmVi}{f} \right] \right\}$$

キサンチン酸化酵素の拮抗的阻害剤であるサリチル酸を添加した実験成績をこれに代入してKiを求め

ると $2.8 \times 10^{-4} \text{M}$ となり、従来知られた値と一致した。

〔総括〕

酵素反応速度の測定に、微量（0.15 ～ 0.4ml）の酵素を反復使用可能という特徴をもつ透析定常法の研究を行なった。本法の理論的な裏づけとして、単純な理論式を誘導し、キサンチン酸化酵素反応のデータを用いてその実験的検証を行なった。実験成績は理論式を矛盾なく満たした。また実験成績を用いてこの理論式から得た K_m , K_i は従来法による値と一致した。

以上本法の理論的根拠を明らかにし、また理論式の実験的検証とそれから正しい V_m , K_m , K_i が得られるという手続きを経て、本法の方法的正しさと有用性を示した。

論文の審査結果の要旨

本研究は、酵素不透過性の半透膜に包みこまれた酵素溶液とそのまわりを一定速度で流れる基質溶液との反応速度を理論的に取扱い、透析定常法による反応速度式を導出し、その妥当性をキサンチン酸化酵素反応について実験的に検討したものである。

その結果、本法によって得られたミハエリス定数、阻害剤定数は従来の方法による値と良く一致し、本法の妥当性と実用性を証明することに成功している。本法は、微量酵素を反復して使用できぬという特徴をもっており、将来の発展が期待され、学術の進歩に寄与するところすくなくないと認める。