



Title	毒物によるカタラーゼ反応の阻害に就いて(第一報)
Author(s)	小倉, 安之; OGURA, Yasuyuki; 殿村, 雄治 他
Description	原報 Original Papers
Citation	觸媒, 4, 57-80
Issue Date	1948-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22397
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_P57-80.pdf



毒物によるカタラーゼ反應の阻害に就いて (第一報)

On the Retardation of Catalase Reaction by Poison.

小倉安之, 殿村雄治, 日野精一, 塚本 晃^{*)}

Yasuyuki Ogura, Yuji Tonomura, Seichi Hino and Akira Tsukamoto.

(昭和 22 年 6 月 1 日受理)

1. 緒 論
2. 各型の毒物に就いて
 - (i) シアン型
 - (ii) アジド型
 - (iii) フェノール型
 - (iv) 結 論
3. 毒物相互の關係
 - (i) 緒 論
 - (ii) 同じ型に屬する毒物相互の關係
 - (iii) 異つた型に屬する毒物相互の關係
 - (iv) 結 論
4. 各毒物と H_2O_2 との相互作用
5. 摘 要

1. 緒 論

周知の様にカタラーゼは過酸化水素を水と分子狀酸素に分解する酵素であつて、その本體はヘミン誘導體を含んだ複合蛋白である。その濃厚溶液は一般のヘミン系複合蛋白と同様可視部に特異的な吸収スペクトルを興へる。カタラーゼは又その作用が種々の物質の添加によつて可逆的に抑制せられる點で特に著明であるが、毒物による抑制作用はそれ等の物質とカタラーゼ分子とが不活性の結合物を作る爲と考へられ、實際二三の毒物についてはその結合が吸収スペクトルの變化に現れる事が明かにされてゐる。カタラーゼに對する種々の毒物の反應様式を明かにする事は該酵素の構造的性質を知る上に意義あるばかりでなく、カタラーゼによる過酸化水素分解の機作を解明する上にも役立つ所少くないと思はれる。我々はカタラーゼと毒物の結合を反應速度論的並びに分光化學的に研究する事によつて種々の新しい知見を得たので以下にその概要を報告する。

用ひたカタラーゼ標品は北川¹⁾及び白川¹⁾に従ひ新鮮な馬の肝臟からアセトン處理により得たもの

*) 東京大學理學部植物學教室田宮研究室

1) M. Kitagawa, M. Sirakawa: Biochem., 33 (1941), 201.

でカタラーゼの作用能を示す K_{atf} -値²⁾ は約 40000 のものである。

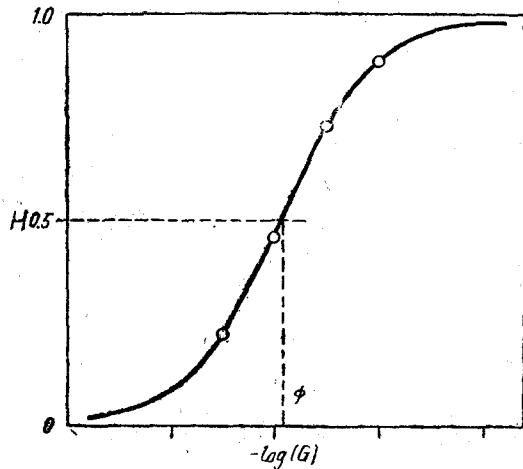
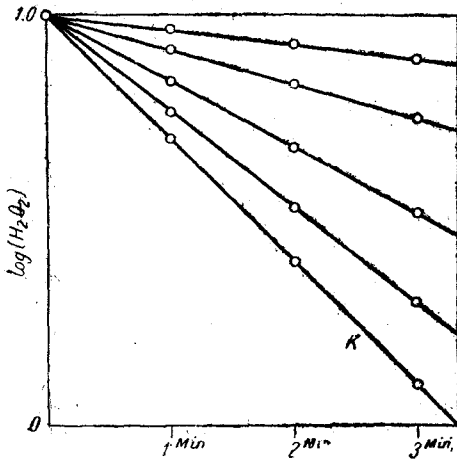
今低温に於て一定濃度のカタラーゼ溶液 (pH 7.0 の磷酸緩衝液終局濃度 $1/150$ M/L) に一定量の H_2O_2 (我々の実験では約 $10^{-2.0}$ M/L) を加へ、一定時間後に H_2SO_4 (1:4) を加へて反応を停止させ残存した H_2O_2 の濃度を $KMnO_4$ ($N/100$) によつて滴定すると、 H_2O_2 の濃度の對數 $\log [H_2O_2]$ と時間 t との間には直線的關係が見出される。(第一圖直線 K)。即ちカタラーゼによる H_2O_2 分解は H_2O_2 の量に關して一次反應的である。又その分解速度は用いたカタラーゼの濃度 $[\Sigma E]$ に比例する。即ち H_2O_2 分解は H_2O_2 とカタラーゼに關して二次反應的で

$$-\frac{d[H_2O_2]}{dt} = k [H_2O_2] [\Sigma E]$$

従つて
$$-\frac{d \ln [H_2O_2]}{dt} = k [\Sigma E]$$

即ち第一圖に於ける直線 K と横軸となす角度の正切は $k [\Sigma E]$ に比例する。

この式に従つて起る H_2O_2 分解の場合の前述せる角度の正切を V 、毒物が $[G]$ なる濃度で存在する時のそれを V_G とし、毒物による阻害度 H を



第一圖 ϕ -値 の 測 定

$$H = 1 - \frac{V_G}{V}$$

で表すと、 H と $[G]$ の間には一般に次の關係が見出される。

$$H = \frac{[G]}{\phi + [G]}$$

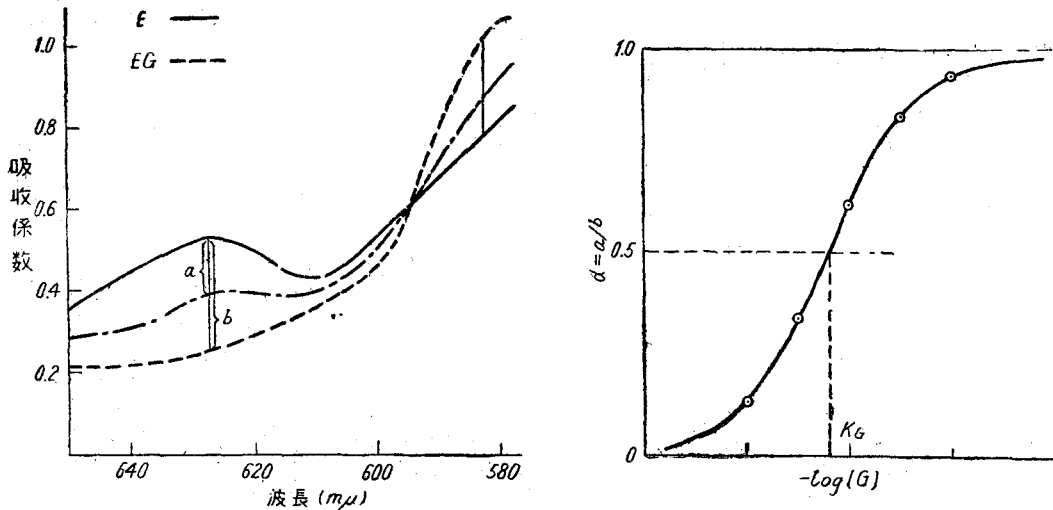
茲に ϕ は阻害度が 50% なる時の毒物の濃度である。^{*)} H を縦軸に $-\log [G]$ を横軸と取る

2) H. v. Euler, K. Josephson: Liebigs Ann., 452 (1927), 158.

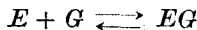
*) 藤田稔, 日野精一 (未發表) はカタラーゼに於いて Cyanine 系色素の或る物は溶液中で重合する結果、その阻害度が加へた色素の濃度 $[g]$ に關して $H = \frac{[g]^{1/2}}{\phi^{1/2} + [g]^{1/2}}$ に従ふことを見出してゐる。

と第一圖に示した如き S 字型をした「一次のシグモイド」曲線が得られ ϕ 値を直ちに求めることが出来る。³⁾

一方我々はカタラーゼ溶液の示す可視部の吸収スペクトルが種々の毒物を加へることによつて變化すると云ふ事實⁴⁾を利用して種々の波長に於ける吸収係数を比較する事によつて分光化學的に毒物とカタラーゼの結合物の解離恒数を求めた。吸収係数の測定には Nutting 型 Spectrophotometer (Hilger. H. 181 型) を用いた。カタラーゼ溶液に充分量の毒物を加へ毒物濃度をそれ以上に増加してもスペクトルが變化しなければそのスペクトルはカタラーゼ E と毒物 G との結合物 EG によるものと考へられる。カタラーゼの濃度を一定にして毒物の濃度を變化すると、第二圖に示した如く各波長に於いて E と EG のスペクトルに對して比例關係を示すスペクトルが得られる。^{*} 圖の $a/b = \alpha$ は $[EG]/[\Sigma E]$ を示すものであるから、



第二圖 K_G - 値 の 測 定



3) 田宮博, 太田行人; 科學 12 (1942), 326.

酵素反應のみならず一般生理現象につき毒物阻害を上記の如き H - 値で表示し, H と毒物濃度 $[G]$ との函數關係を求めると極めて多くの場合次の式に當てはまる事が田宮及びその共同研究者等によつて明かにせられ.

$$H = \frac{[G]^n}{\phi^n + [G]^n}$$

n は現象により約 $\frac{1}{2}$ 以上 7~9 に至る種々の正の値をとる。 $[G]$ の對數を横軸に H を縦軸にとると n - 値により夫々特異的なシグモイド曲線が得られる。即ち n - 値が大なる程曲線は直立的となる。(n - 値が一定なる限り ϕ が變じても曲線の形は變らず唯その位置が横軸に添つてずれるのみである。) 吾々は夫々の特異的なシグモイドをその n - 値に應じて夫々 $\frac{1}{2}$ 次, 1 次 2 次... 等のシグモイドと呼んでゐる。

4) H v. Euler K. Josephson: Liebig's Ann. 452 (1927), 158; 455 (1927), 1. K. G. Stern: J. gen. Physiol. 20 (1937), 631. D. Keilin, E. F. Hartree: Proc. Roy. Soc. London (B) 121 (1936), 173.

*) 實際には Nutting 型 Spectrophotometer では二つの溶液の吸光係数の差を直接測定することが出来る。

$$\frac{[E][G]}{[EG]} = K_G, [E] + [EG] = [\Sigma E]$$

$$\frac{[EG]}{[\Sigma E]} = \alpha = \frac{[G]}{K_G + [G]}$$

茲に K_G の値は $\alpha = 0.5$ なる時の毒物の濃度に等しい。この場合にも α を縦軸に $-\log[G]$ を横軸にとることによつて得られる「一次のシグモイド曲線」から K_G 値が求まる。^{*)}

我等は斯様にして色々の状態に於けるカタラーゼと種々の毒物との反応の ϕ -値及び K_G 値を測定することによつて、毒物はシアン型、アジド型、フェノール型の三つの型に大別出来ることを明かした。

尙、以下述べる總ての實驗は何れも pH 7.0 の條件で行つたものである。速度論的實驗と分光化學的實驗とは可及的同一の條件で行つたが、兩者の間の最も著しい差異は實驗液中のカタラーゼ濃度である。即ち速度論的實驗では約 $10^{-9.0}$ M/L であるに對し、分光化學的實驗では約 $10^{-4.5}$ M/L である。

2. 各型の毒物に就いて

先づ各々の型の毒物の作用様式に就いて述べる。

(i) シアン型

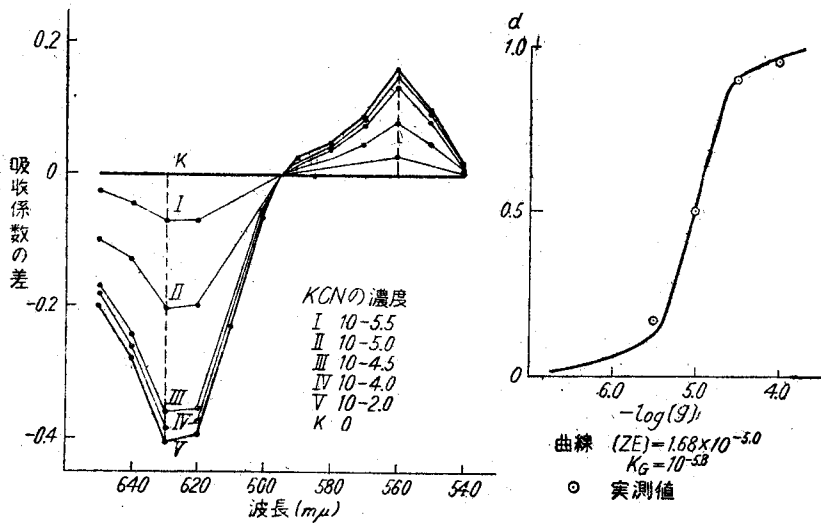
この型に屬する毒物としては KCN, NaF 等がある。カタラーゼ溶液に KCN を加へた場合にも、 $\log[H_2O_2]$ と時間 t との間には直線的關係が見出されるが、その直線が横軸となす角度の正切は、毒物を加へない場合よりも小となつてゐる。KCN の各濃度に於けるこの正切の値から ϕ -値を求めると 0°C で $10^{-6.2}$ M/L, 5°C で $10^{-5.8}$ M/L である。(實驗例一参照)。

一方カタラーゼ溶液は 508, 538, 627 $m\mu$ に吸収極大を持つたスペクトルを示すが、それに充分多量の KCN を加へると吸収極大は 544, 575 $m\mu$ ^{**)} に移動する。前述した様に、カタラーゼの濃度を一定にして KCN の濃度を變化すると、各波長に於てカタラーゼとシアンカタラーゼのスペクトルに對して一定の比例關係を示すスペクトルが得られる。今 α を縦軸に加へた毒物の濃度 $[g]$ の對數のマイナスを横軸にとると第三圖に示した如く一次のシグモイド曲線とは可なり異つた曲線が得られる。これは平衡状態に於ける溶液中の毒物の濃度 $[G]$ が加へた毒物の全濃度 $[g]$ とは異つてゐて、^{***)}

*) 後に示す如く毒物の中には明かにカタラーゼと結合すると考へられるにも拘らず、その可視部に於ける吸収スペクトルを變化しないものがある。従つてこれ等のものでは以上の方法によつて K_G -値を求めることは出来ない。可視部に於ける吸収はヘミン核に基くものであるから毒物が吸収の變化を來すか否かはそれが結合によつてヘミン核に影響を及ぼすか否かによると考へられる。

**) K. Zeile, H. Hellström, H. v. Euler K. Josephson: Liebigs Ann. 452 (1927), 158; 455 (1927), 1) は 589, 557 $m\mu$ と報告してゐるが、吾々の知見との差異が何に基くかは明かでない。

***) これに對して反應速度論的實驗の場合にはカタラーゼの濃度が毒物のそれに比に非常に小であるために $[G] \neq [g]$ となり、 H と $-\log[g]$ との關係は次のシグモイド曲線として示される。



第三圖 KCN の K_G 値

$$[G] + [EG] = [g]$$

$$[E] + [EG] = [\Sigma E]$$

$$\frac{[EG]}{[\Sigma E]} = \alpha, \quad \frac{[E][G]}{[EG]} = K_G$$

従つて,

$$\frac{([\Sigma E] - \alpha[\Sigma E])([g] - \alpha[\Sigma E])}{\alpha[\Sigma E]} = K_G$$

となるからである。各 g -値に於ける α -値からこの式の未知数である K_G 値と $[\Sigma E]$ の値が求められる。(實驗例二参照)。

5°C に於ける K_G 値は $10^{-5.8}$ M/L で反應速度論的に求められた ϕ -値と全く一致する。一方 $[\Sigma E]$ として得られた値は $1.68 \times 10^{-5.0}$ M/L である。所でこの實驗に用いたものと同じカタラーゼ溶液をピリジンで處理してその含有するヘミンの全量を Pyridin Hämatin の吸收係數より測定した所約 $3.3 \times 10^{-5.0}$ M/L なる値が得られた。即ちヘミンの含量は先に得られた $[\Sigma E]$ の値の約 2 倍である事が知られる。 $[\Sigma E]$ はカタラーゼ分子中のシアンと結合する部分の濃度を示すものであるから、カタラーゼ 1 分子に 4 個のヘミンがあるものとすればその中の恐らく 2 個だけがシアンと結合すると考へなければならぬ。この結論はカタラーゼ分子の構造並びにその作用機作を考察する上に重要な手懸となるものと思はれる。

NaF についてもその ϕ -値と K_G 値は全く一致し、5°C に於て $10^{-5.8}$ M/L である。但しこの場合には $[g]$ が $[\Sigma E]$ に比して充分大である爲、 $[g] = [G]$ となり分光化學的に求められる α と $-\log [G]$ との關係を表はす曲線は KCN の場合と異り一次のシグモイドになる。

5) K. G. Stern R. W. G. Wyckoff: J. biol. Chem., 124 (1938), 573.

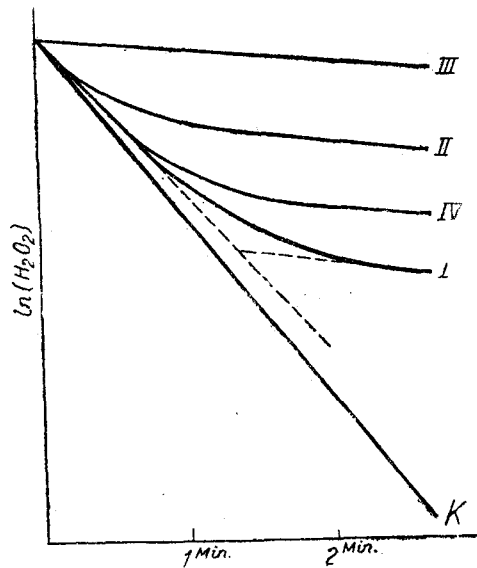
J.B. Sumner N. Gral'n: J. biol. Chem., 125 (1938), 33.

(ii) アジド型

NaN_3 及び NH_2OH がこれに属する。 NaN_3 を添加した場合にはシアン型の場合と異り、 $\log [\text{H}_2\text{O}_2]$ と時間 t との関係は第四圖に示した如き彎曲した曲線となるが時間的に最初の部分と後の部分とは夫々直線をなしてゐる。 NaN_3 の濃度を變化することによつて各直線部分によつて異つた $-\log [G] - H$ 關係が求められる。 兩關係とも一次のシグモイドをなすがその ϕ -値は異なる。 即ち初めの部分の ϕ -値は 7°C で $10^{-5.5} \text{ M/L}$ であり、後の部分では 10°C で $10^{-7.7} \text{ M/L}$ である。(實驗例三参照)。

以下の現象に關して極めて興味ある事實が實驗開始(カタラーゼ作用の測定のため分解さるべき H_2O_2 の添加)の一定時間前に極く少量の H_2O_2 (實驗液中の濃度約 $10^{-4.0} \text{ M/L}$) を加へると云ふ前處理をほどこした場合に見出された。 即ち圖に示した如く前處理と實驗開始迄の間隙が短いと最初の直線部分が現れるが、その間隙が約 15 分の場合には現れなくなり(即ち滴定曲線は彎曲しなくなり)更にそれよりも間隙が長くなると再び曲線の彎曲が見られるのである。 注目すべき事には後の部分に於ける直線の正切は前處理をほどこすと否とに拘らず、又前處理と實驗開始までの時間と關せず毒物濃度が一定なる限り一定である。

種々の事實から以上の現象は次の如く解釋せられる。 カタラーゼ E は H_2O_2 の添加によつて速かに或る型 E' に移行する。 E の E' への移行は極めて微量の H_2O_2 の存在によつても起る。 E' は液中の H_2O_2 が分解し盡された時には再び E にもどる。 カタラーゼに H_2O_2 を加へた場合一次反應的に H_2O_2 を分解するものは實際上總て E' 型のカタラーゼであると考へられる。^{***)} さて NaN_3 は E と E' とも可逆的に結合するが、前者との結合物は後者との結合物よりもその解離恒數が大である。 初期の直線部分(初期状態)で見られる ϕ -値は E との結合物の解離恒數に當り、後期の直線部分(後期状態)で見られる ϕ -値は E' との結合物の解離恒數に



第四圖 NaN_3 ($10^{-6.5} \text{ M/L}$) の阻害に對する微量の H_2O_2 に対する前處理の影響
 I 前處理をしない時、II 5分前に前處理をした時、III 15分前にした時、IV 35分前にした時
 K は NaN_3 の加えられてない對照

*) 初めの部分の ϕ -値はカタラーゼ溶液を空氣を通じて烈しく攪拌しながら H_2O_2 を添加し 3 秒後に H_2SO_4 を加へて反應を止め、その反應速度から求めた。この部分の實驗溫度が 7°C であるのは斯かる操作のためである。フェノール型の場合も同様である。

**) この點に關しては II (4) 結論の項を参照されたい。

當る. E' が H_2O_2 の添加により瞬間的に生成されると考へられるにも拘らず後期の直線部分の出現に或る時間を要するのは E' と NaN_3 との結合の活性エネルギーが相當大でその平衡達成に時間を要するからである.*) (E と NaN_3 との間の平衡達成にも相當時間を要する事がスペクトル觀察から知られる.)

初期状態の ϕ -値が E との結合物の解離恒數である事はスペクトルの觀察によつて證明することが出来る. 即ちアジトカタラーゼ (吸収極大は 540, 622 $m\mu$) と遊離のカタラーゼの吸収スペクトルの差を利用して分光化學的に求めた $5^\circ C$ に於ける K_G -値は $10^{-5.8} M/L$ であるに對し反應速度論的に求められた $7^\circ C$ に於ける初期状態の ϕ -値は $10^{-5.5} M/L$ である.***) なお先に KCN に於て行つたと同様の方法で (同濃度のカタラーゼ溶液につき) スペクトル法で求めた $[\Sigma E]$ 値即ちカタラーゼ分子中のアジドと結合する部分の濃度は $1.75 \times 10^{-5.0} M/L$ で略々シアンの場合に得られた値に等しい. 即ちアジドも亦カタラーゼ分子に於ける 4 個のヘミンの中の 2 個に結合するものと考へられるのである.

NH_2OH の場合には $7^\circ C$ の初期状態の ϕ -値は $10^{-4.9} M/L$ であり, $0^\circ C$ の後期状態のそれは $10^{-6.9} M/L$ である. 分光化學的に求められた $5^\circ C$ に於ける K_G -値は $10^{-5.0} M/L$ でこの場合にも初期状態の ϕ -値によく對應してゐる.

尙分光化學的に吾々が觀察し得たのは初期状態に於ける結合即ち E と毒物との結合であつて後期状態に於ける E' と毒物との結合に就いては觀察を行ふことが出来なかつた. カタラーゼが E' の状態で保たれるには溶液中に微量乍らも或る量の H_2O_2 が存在しなければならない. しかるにスペクトル觀察には相當の長時間を要するに拘らず, 用ひられる溶液のカタラーゼ濃度は極めて高く H_2O_2 を添加しても直ちに分解されてしまふ. 後期状態に於ける結合がスペクトル法で觀察出来なかつたのはこの理由によつてである.

(iii) フェノール型

これに屬する毒物としては Phenol, Resorcine, Hydroquinone, Cresol 類, Chlorophenol 類, Nitrophenol 類がある. これ等の場合にもアジド型毒物の場合と同じく時間 t と $\log [H_2O_2]$ との関係は二つの直線部分より成り, 各部分に於ける阻害度と毒物濃度の對數との関係は夫々一次のシグモイドで表される. $HO-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ の $7^\circ C$ に於ける初期状態の ϕ -値は $10^{-2.5} M/L$, $0^\circ C$ に於ける後期状態の ϕ' -値は $10^{-4.6} M/L$ である. 又 $HO-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})-\text{CH}_3$ のそれは夫々 $10^{-2.1} M/L$, $10^{-5.2} M/L$ である. 反應速度論的實驗の結果がアジド型毒物の場合と全く相同的である

*) 第 II 報に詳論する.

***) 溫度による K_G -値の變化は E と G の結合の反應熱を ΔH とすれば

$$\frac{d \ln K_G}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

で示される.

事からこれ等の毒物に於ても E と E' の二者に對する結合が起り且つそれ等の結合の平衡達成には相當の時間を要するものである事が結論される。

然るに一方アジド型毒物とこの型の毒物との間には一つの極めて著しい差異がある。即ちこれ等の毒物では充分多量にカタラーゼ溶液に添加せられた場合にも可視スペクトルの變化が認められないのである。我々は特に $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ につき充分多量に加へた場合の紫外 (250 $m\mu$ 迄) 赤外 (1500 $m\mu$ 迄) 兩部に於けるスペクトルを測定したが純粹のカタラーゼ溶液の場合に比し何等の變化も認め得なかつた。このことはこれ等の毒物が恐らくカタラーゼの蛋白部分に結合するものであり、且つその結合がカタラーゼ分子の發色團たるヘミン核に影響を與へないものであることを示してゐると云へよう。

(iv) 結 論

先に吾々は H_2O_2 の存在に於てカタラーゼ E が E' なる型に移行すると考へ、これによつてアジド型及びフェノール型毒物に於ける阻害現象に初期と後期の別が見られる事を説明した。種々の實驗事實より E' なるものはカタラーゼ E と H_2O_2 との結合體と考へられる。今 H_2O_2 を S で記せば E による S の分解過程には二分子の S が登場し次の如き逐次反應が起ると想像されるのである。



茲に k_1, k_1', \dots 等は夫々の方向への速度恒數である。 $\overset{S}{E}$ は先に E' と記したものである。 E' (以下再び $\overset{S}{E}$ を E' で記することとする) の解離恒數は SE' の夫れに比して遙かに小さく ($k_1'/k_1 \ll k_2'/k_2$) その平衡達成も (1) は (2) に比して速かであると思へる。又 $k_2 \ll k_3, [S] \ll k_3/k_2$ であるとすれば H_2O_2 分解の定常速度は (2) に於ける E' と S の結合反應によつて律せられ且つ反應の繼續中カタラーゼの全量は實際上總て E' なる型に於て存在する事になる。

即ち H_2O_2 の分解速度 v は

$$v = k_2[\overset{S}{E}][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (4)$$

* 例へば $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ は濃度を $10^{-1.5}$ M/L 以上になるとカタラーゼを不可逆的に變化させ、溶液は白濁する。

** 赤外吸収は東京帝大理學部化學教室島内武彦氏に測定して戴いた。こゝに謹んで感謝する。

6) 田宮博, 太田行人: 科學 12 (1942), 326; H. Tamiya, Y. Ohta: Acta Phytochim. 14 (1944), 123. D. Keilin, E. F. Hartree: Proc. Roy. Soc. London (B) 121 (1936), 173. K. G. Stern: J. Bio. 114 (1936), 473.

***) 第二報に於て詳しく論ずる筈である。

となり最初に述べた實驗事實によく對應する。實驗によれば H_2O_2 との反應中に於けるカタラーゼのスペクトルは遊離のカタラーゼの夫れと同一である。即ち E' は少くとも可視部に於ては E と同一の吸收スペクトルを與へるものと考へられる。

さてカタラーゼに對する毒物は何れもカタラーゼ分子と可逆的に結合してその作用を害するのであるが、その結合には E に對するものと E' に對するものとの二つが可能である。一般に毒物を G で表し、これ等二種の結合の解離恒數を夫々 K_G, K_G' で表せば



となる。遊離のカタラーゼ溶液に毒物を加へて分光化學的に求められる解離恒數は K_G である。アジド型及びフェノール型毒物に於ては (5) 及び (6) の平衡達成に相當の時間を要する。従つてカタラーゼと毒物のみ存在に於て充分 (5) の平衡が達成した状態で突然 H_2O_2 を加へた場合反應の初期に於ては (6) の反應は全く無視され得る。然るに H_2O_2 の分解が進行する間は前述の理由により毒物と結合してゐないカタラーゼは實際上總て E' の型をとるから、時間の経過に伴ひ (5) の平衡は次第に解けそれに代つて (6) の平衡が成り立つてくる。或る時間の後には毒物とカタラーゼの平衡は (6) となり (5) の反應は實際上無視し得るに至る。

平衡が (5) のみで (6) が無視され得る場合には

$$\frac{[E]}{[\Sigma E]} = \frac{K_G}{K_G + [G]}$$

となり、この場合に於ける H_2O_2 分解の速度を v_G とすれば

$$v_G = k_2 [\Sigma E] [\text{H}_2\text{O}_2] \frac{K_G}{K_G + [G]}$$

である。平衡が (6) のみで (5) が無視され得る場合には

$$\frac{[E']}{[\Sigma E]} = \frac{K_G'}{K_G' + [G]}$$

となり、この場合の H_2O_2 分解の速度を $v_{G'}$ とすれば

$$v_{G'} = k_2 [\Sigma E] [\text{H}_2\text{O}_2] \frac{K_G'}{K_G' + [G]}$$

である。従つて v_G 及び $v_{G'}$ に對する阻害度を夫々 H, H' とすれば

$$H = \frac{[G]}{K_G + [G]} \quad (7)$$

$$H' = \frac{[G]}{K_G' + [G]} \quad (8)$$

となる。前述の考察より明かな如くアジド型及びフェノール型毒物で見られる初期状態の阻害度

*) この觀察は充分量の H_2O_2 を用ひて Hand spectroscope によつて行つた。

毒物によるカタラーゼ反応の阻害に就いて (第一報)



となる。こゝに K_G は夫々の結合の解離恒数である。

一毒物が存在する場合と同様の考察から、定常状態に於ける速度 $v_{1,2}$ を求めると、 $[H_2O_2]$ 《 k_3/k_2 》であれば、

$$v_{1,2} = \frac{k_2[\Sigma E][H_2O_2]}{1 + [G_1]/K_{G_1} + [G_2]/K_{G_2} + K_{G_1}/K_{G_1} \cdot [G_1]/K_{G_1} \cdot [G_2]/K_{G_2}}$$

となる。又毒物 G_1 が一定濃度 $[G_1]$ だけ存在し毒物 G_2 が存在しない場合の速度 v_1 は

$$v_1 = \frac{k_2[\Sigma E][H_2O_2]}{1 + [G_1]/K_{G_1}}$$

である

今毒物 G_1 が一定濃度 $[G_1]$ だけ添加されてゐるカタラーゼ溶液を用ひてこれを對照とし、その溶液に更に毒物 G_2 を濃度 $[G_2]$ になるまで加へた時の G_2 の阻害度を

$$H_{1,2} = 1 - \frac{V_{1,2}}{V_1}$$

で定義することにする。こゝに V は夫々 $[H_2O_2]$ に関する一次反応の速度恒数である。従つて

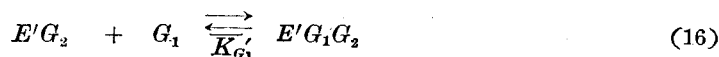
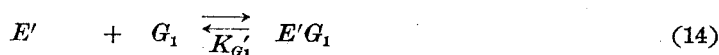
$$H_{1,2} = \frac{[G_2]}{K_{G_2} \left\{ \frac{\frac{K_{G_1}}{K_{G_1}} (K_{G_1} + [G_1])}{\frac{K_{G_1}}{K_{G_1}} \cdot K_{G_1} + [G_1]} \right\} + [G_2]} \quad (12)$$

となる。従つてこの場合に於ける毒物 G_2 の ϕ -値は

$$\phi_{1,2} = K_{G_2} \left\{ \frac{\frac{K_{G_1}}{K_{G_1}} (K_{G_1} + [G_1])}{\frac{K_{G_1}}{K_{G_1}} \cdot K_{G_1} + [G_1]} \right\} \quad (13)$$

である。

同様の考察は前記の (5) 型の反応が無視され得る条件即ち阻害反応の後期状態のみに關して行ふ事も出来る。即ちこの場合カタラーゼと毒物との間の可能な反応は



となり、(12) 及び (13) に相當する式は

$$H'_{1,2} = \frac{[G_2]}{K'_{G_2} \left\{ \frac{\frac{K'_{G_1}}{K_{G_1}} (K'_{G_1} + [G_1])}{\frac{K'_{G_1}}{K_{G_1}} \cdot K'_{G_1} + [G_1]} \right\} + [G_2]} \quad (17)$$

$$\phi'_{1,2} = K'_{G_2} \left\{ \frac{\frac{K'_{G_1}}{K_{G_1}} (K'_{G_1} + [G_1])}{\frac{K'_{G_1}}{K_{G_1}} \cdot K'_{G_1} + [G_1]} \right\} \quad (18)$$

となる。

さて斯くの如くして求められる $\phi_{1,2}$ 及び $\phi'_{1,2}$ の取り得る値としては次の三つの場合が考へられる。

a) もし毒物 G_1 と毒物 G_2 の阻害作用が相互に全く無影響であれば、

$$K_{G_1} = \bar{K}_{G_1}$$

従つて

$$\phi_{1,2} = K_{G_2}$$

或は

$$K'_{G_1} = \bar{K}'_{G_1}$$

従つて

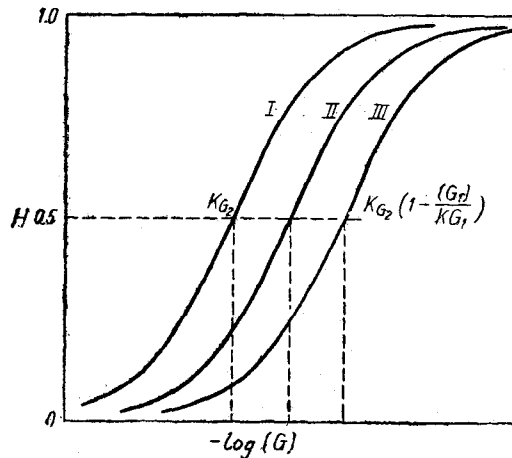
$$\phi'_{1,2} = K'_{G_2}$$

である。

b) 毒物 G_1 と G_2 の作用が互に拮抗的であれば EG_1G_2 或は $E'G_1G_2$ なる結合物は形成されず

$$\bar{K}_{G_1}/K_{G_1} = \infty \quad \text{或は} \quad \bar{K}'_{G_1}/K'_{G_1} = \infty$$

となり



第五圖 毒物共存による ϕ 値の移動
 I 無影響 II 相互作用 III 拮抗的

$$\phi_{1,2} = K_{G_2} (1 + [G_1]/K_{G_1})$$

或は

$$\phi'_{1,2} = K'_{G_2} (1 + [G_1]/K'_{G_1})$$

となる。

e) もし毒物 G_1 と G_2 との間に相互作用があり、それで反撥的であれば K_{G_1}/K_{G_1} 或は K'_{G_1}/K_{G_1} なる値は 1 より大なる或る有限の値となり

$$K_{G_2} < \phi_{1,2} < K_{G_2}(1 + [G_1]/K_{G_1})$$

或は

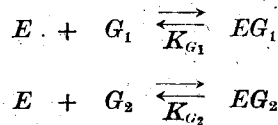
$$K'_{G_2} < \phi_{1,2} < K_{G_2}(1 + [G_1]/K_{G_1})$$

となる。

斯様にして我々は毒物 G_1 が一定濃度入つてゐるカタラーゼ溶液を対照として毒物 G_2 の ϕ -値或は ϕ' -値を反應速度論的に測定することによつて二つの毒物が相互に無影響であるか、拮抗的であるか、又はその間に相互作用があるかを決定することが出来る。

一方毒物がカタラーゼと結合してそのスペクトルを變化させる場合には E と G_1 及び G_2 の諸關係は分光化學的に追求することが出来る。

先づ毒物 G_1 と G_2 とが E に對し拮抗的に結合する場合、即ち EG_1 及び EG_2 は可能であるが、 EG_1G_2 は形成されない場合には次の事が豫測される。今毒物 G_1 を充分量、即ち存在するカタラーゼが實際上總てその毒物との結合物に變化する程度に多量加へた後、その溶液に更に第二の毒物 G_2 を添加して行くと、



なる二反應が起る。この際、

$$\frac{[EG_2]}{[EG_1]} = \frac{[G_2]}{K_{G_2}} \cdot \frac{K_{G_1}}{[G_1]}, \quad [\Sigma E] = [EG_1] + [EG_2]$$

故に

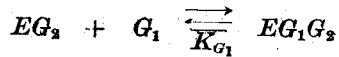
$$\frac{[EG_2]}{[\Sigma E]} = \frac{[G_2]}{K_{G_2} \frac{[G_1]}{K_{G_1}} + [G_2]}$$

なる關係式に従つてスペクトルが變化する。即ちスペクトルは總て EG_1 , EG_2 の夫れに對し一定の比例關係を示し、 $[G_2]$ が $[G_1]$ に比して充分大となればスペクトルは遂に EG_2 のものと一致する。又 $[G_1]/K_{G_1} = [G_2]/K_{G_2}$ なる時 $[EG_1] = [EG_2]$ 即ちスペクトルは EG_1 と EG_2 の夫れの丁度眞中になる。然して $-\log [G_2]$ を横軸に $\alpha = [EG_1]/[\Sigma E]$ を縦軸にとれば一次のシグモイド曲線が得られ、この場合の K_G に相當する値は $K_{G_2} \cdot [G_2]/K_{G_1}$ である筈である。

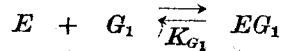
これに對して二つの毒物が同時に E に結合し EG_1G_2 なる結合物を形成し得る場合には、カタラーゼに充分多量の毒物 G_2 を加へ、それに更に充分多量の毒物 G_1 を加へると EG_1 , EG_2 のスペクトルに對して或る一定の比例關係を示さない全然新しい EG_1G_2 のスペクトルが出現するであらう。 EG_1G_2 のスペクトルが知られれば充分多量の G_2 を加へたものに種々の濃度の G_1

*) $[\Sigma E] = [EG_2] + [EG_1G_2]$ なる條件が満足される必要がある。

を加へて行くことにより、



なる結合の解離恒数 \overline{K}_{G_1} を求めることが出来る筈である。而して G_2 の存在しない場合に同様にして求められる



の解離恒数 K_{G_1} と比較した場合、若し $\overline{K}_{G_1} = K_{G_1}$ であれば G_1 と G_2 との作用は相互に全く無影響であり、 $\overline{K}_{G_1} > K_{G_1}$ であれば G_1 と G_2 との間には相互作用があると結論せらるべきである。

以下かゝる方法を用ひて我々が行つた實驗結果を述べよう。

(ii) 同じ型に屬する毒物相互の關係

同じ型に屬する二つの毒物は同時に同一のカタラーゼ分子に結合する事は出来ない。即ちそれ等のカタラーゼに對する結合は拮抗的である。

(1) KCN と NaF

シアン型に屬する KCN と NaF は何れも E 及び E' との平衡達成が速かゞ且つ ϕ -値と ϕ' -値の別が見られない。KCN そのものの示す ϕ -値は $10^{-6.2}$ M/L (0°C) であるが今 $10^{-1.5}$ M/L なる一定濃度の NaF を加へたカタラーゼ溶液に種々の濃度の KCN を加へその ϕ -値 ($=\phi'$ -値) を求めると 0°C に於て $10^{-5.65}$ M/L である。NaF の ϕ -値を K_{G_1} 、KCN のそれを K_{G_2} とし両者が拮抗的であるとして理論的に求められる $\phi_{1,2} = K_{G_2}(1 + [G_2]/K_{G_1})$ は實驗的に求められる上記の値と一致する。逆に KCN を一定濃度入れたカタラーゼ溶液に對する NaF の ϕ -値も両者を拮抗的として得られる計算値として一致する。

KCN と NaF とが拮抗的であることは分光化學的にも證明される。 5°C に於て NaF の濃度 $10^{-1.0}$ M/L なるカタラーゼ溶液に KCN を加へるとスペクトルはフルオリドカタラーゼからシアン-カタラーゼの方向に移行し、KCN の濃度が NaF の濃度に對して K_G 比の時即ち

$10^{-1.0} \times 10^{-5.8} / 10^{-1.8} = 10^{-5.0}$ M/L なる時シアンカタラーゼとフルオリド-カタラーゼの略々中間のスペクトルが觀察せられた。

(2) NaN_3 と NH_2OH

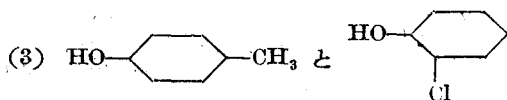
アジド型に屬する NaN_3 と NH_2OH も互に拮抗的である。しかもその拮抗現象は E に關しても E' に關しても認められる。

先づ E に對する結合即ち初期状態に就て述べると 7°C 、 NaN_3 $10^{-5.0}$ M/L なるカタラーゼ溶液に於ける NH_2OH の ϕ -値は拮抗的であるとして計算した $10^{-4.3}$ M/L と一致する。又分光

* NaF の K_G -値が大でありその溶解度が小であるため $[\Sigma E] = [E \cdot F] + [E \cdot \text{CN}]$ なる條件を充分満足する程度に NaF を加へることは出来なかつた。

化学的にも NaN_3 と NH_2OH が拮抗的であることを直接證明することが出来る。

後期状態即ち E' との結合に關しても, 0°C NaN_3 $10^{-6.5}$ M/L なるカタラーゼ溶液に於ける NH_2OH の ϕ' -値は $10^{-5.7}$ M/L で計算値 $10^{-5.7}$ M/L と完全に一致した結果が得られた。



フェノール型に屬する CC1=CC=CC=C1O と ClC1=CC=CC=C1O ともカタラーゼに對し互に拮

抗的に結合する事が速度論的實驗から結論せられる。但しその拮抗は E' に對する結合に關しては確證せられたが, E との結合について證明し得なかつた。その理由は初期状態に於ける ϕ 値が大なる爲該現象の證明には極めて高濃度の毒物を用ひねばならず KMnO_4 による H_2O_2 の滴度が正確を期し難かつたからである。^{*} 又前述した如くこれ等フェノール型の毒物によつてはカタラーゼのスペクトルが變化しないために分光化学的に直接その結合を證明することも出来なかつた。

後期状態 0°C で行つた實驗では CC1=CC=CC=C1O $10^{-4.0}$ M/L なるカタラーゼ溶液に對する ClC1=CC=CC=C1O の ϕ' -値は $10^{-4.5}$ M/L となり兩者の結合が拮抗的として算出される値と全く一致する。逆の場合に於ても同様である。

第 三 表

同じ型に屬する毒物相互の關係

	G_1	$-\log \phi_1$	$-\log[G_1]$	G_2	$-\log \phi_2$	$-\log \phi_1 \cdot 2$	計算値
初期 (7°C)	NaN_3	5.5	5.0	NH_2OH	4.9	4.3	4.3
後	NaF	1.9	1.5	KCN	6.2	5.65	5.65
	NaN_3	7.7	6.5	NH_2OH	6.9	5.7	5.7
期 (0°C)	<chem>CC1=CC=CC=C1O</chem>	4.6	4.0	<chem>ClC1=CC=CC=C1O</chem>	4.5	4.5	4.5

註) 計算値とは二毒物が拮抗的として理論的に算出される値である。

(iii) 異つた型に屬する毒物相互の關係

異つた型に屬する毒物の間では同型の毒物同志の間に見られる様な拮抗現象は起らない。即ち二つの毒物は同時に一つのカタラーゼで分子に結合し得るのである。然るに或る毒物 G_1 が遊離

* 毒物が高濃度となつた場合は毒物自身が KMnO_4 と反應するからである。

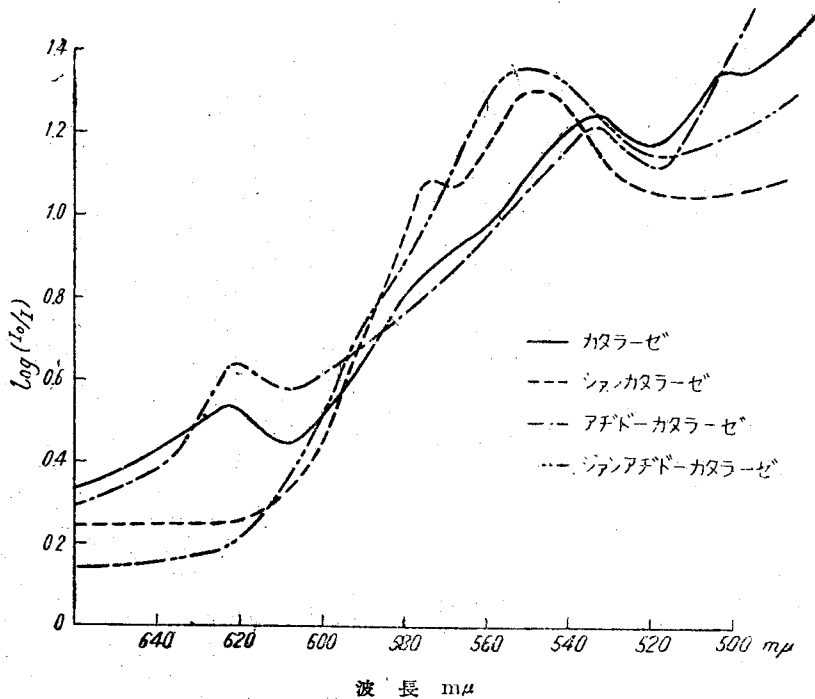
のカタラーゼと結合する場合と既に別の毒物 G_2 の結合してゐるカタラーゼに結合する場合とではその結合のエネルギーが同一でない。換言すれば G_2 がカタラーゼと結合する事により G_1 とカタラーゼとの結合が影響を受けるのである。二つの毒物が斯かる意味で影響を與へ合ふ現象を前記の拮抗現象に對し以後相互作用と呼ぶことにする。相互作用は三種の型の何れの間にも認められ、しかも何れの場合にも常に反撥的である。兩毒物間の相互作用が極めて強い場合には反應速度論的實驗の結果では兩毒物が拮抗的に作用する場合と實際上同様の関係が見られる。

(1) シアン型とアジド型

a) KCN と NaN_3

初期状態、 7°C 、 NaN_3 の濃度 $10^{-4.5}$ M/L なるカタラーゼ溶液に於ける KCN の ϕ -値は $10^{-4.9}$ M/L である。この値は KCN と NaN_3 が互に無影響であるとした時のこの温度に於ける KCN の ϕ -値 $10^{-5.7}$ M/L よりも大きく、拮抗的であるとした場合の $10^{-4.65}$ M/L よりも小さい。即ち二毒物の間には相互作用があり KCN の K_{G_1} -値が NaN_3 の存在によつて別の値 K_{G_1} に變ずると考へなければならぬ。上に得られた結果から K_{G_1}/K_{G_1} を計算すると 170 となる。

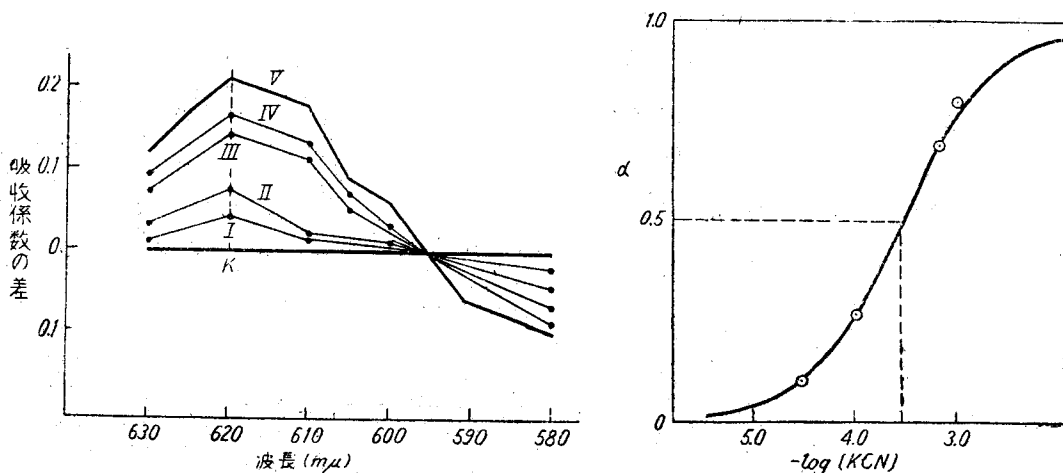
今カタラーゼ溶液に充分多量の NaN_3 を加へるとアジドカタラーゼのスペクトルが現れる。これに更に充分多量の KCN を加へると第六圖に示した如くアジドカタラーゼとシアン-



第六圖 カタラーゼ結合物のスペクトル
カタラーゼの濃度 $4 \times 10^{-6.0}$ M/L. 容器の厚さ 5 cm

ーゼのスペクトルは對して比例關係を示さない 530 m μ に吸収極大を示す全然新しいスペクトルが出現する。

これはカタラーゼにシアンもアジドも結合したシアン-アジド-カタラーゼのスペクトルである。前述せる方法を用ひてアジド-カタラーゼと KCN の結合の解離恒數を測定すると $10^{-3.6}$ M/L となり、この温度に於けるカタラーゼと KCN の結合の解離恒數 $10^{-5.8}$ M/L の 160 倍になつてゐる。この値は前述せる反應速度論的に得られた 170 なる値が大體正しかつたことを示すものである。^{*)}



第七圖 アジドカタラーゼと KCN の結合
 KCN の濃度 I $10^{-4.5}$ II $10^{-4.0}$ III $10^{-3.2}$ IV $10^{-3.0}$ V $10^{-3.2}$
 NaN_3 の濃度はすべて 10^{-20}

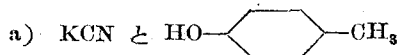
後期状態に於ては KCN と NaN_3 の間の相互作用は初期状態に於けるよりも著しくなると考へられる。即ち求められる $\phi_{1,2}$ 値は兩毒物が拮抗的であると假定した場合の計算値に殆んど一致して居る。(二毒物の相互作用が強く K_{c1}/K_{c2} が 300 以上になると速度論的方法では拮抗現象と相互作用の何れであるかを判定する事が實際上不可能となる。)

b) KCN と NH_2OH

この場合も KCN と NaN_3 との間の關係と大體同じである。シアン-ヒドロキシルアミン-カタラーゼのスペクトルは 545 m μ に吸収極大を示す。分光化學的に測定した初期状態のヒドロキシルアミン-カタラーゼの KCN 結合の解離恒數は $10^{-3.8}$ M/L で、アジド-カタラーゼと KCN のそれと大體一致する。

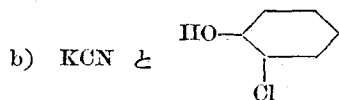
(2) シアン型とフェノール型

*) D. Keilin, E. F. Hartree (Proc. Roy. Soc. London (B) 121 (1936), 173.) は Handspectroscope による觀察の結果から NaN_3 と KCN とが互に拮抗的にカタラーゼと結合すると述べてゐるが、恐らく彼等の場合シアン-アジド-カタラーゼとシアン-カタラーゼのスペクトルが判別され得なかつた結果誤つた結論が得られたものと思はれる。



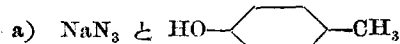
反應速度論的實驗の結果によれば後期状態に於ける兩毒物間の相互作用は極めて著しく ϕ -値の移動は兩毒物が拮抗的と假定した場合と殆んど一致する. 従つてこの方法では $\overline{K_{G_1}}/K_{G_1}$ を決定することが出来なかつた. 又初期状態に於ては HO-C6H4-CH3 とカタラーゼの結合の解離恒数が大であるためパラクレゾール-カタラーゼと KCN の結合の解離恒数を直接分光化學的に測定することにも成功してゐない.

然し乍ら, KCN と HO-C6H4-CH3 が眞に拮抗的ではなく同時に同一のカタラーゼ分子に結合し得るものであることは, HO-C6H4-CH3 がカタラーゼのスペクトルを變化させないこと及び次に述べる HO-C6H4-CH3 と NaN_3 との関係等から明かである.

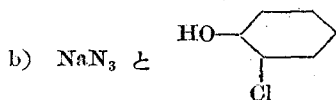


兩者間の關係は前述せる KCN と HO-C6H4-CH3 との關係と全く相同的である.

(3) アジド型とフェノール型



後期状態, 0°C に於ける NaN_3 の濃度 $10^{-6.0}$ M/L なるカタラーゼ溶液に對する HO-C6H4-CH3 の ϕ' -値 $10^{-3.2}$ M/L は二毒物が互に無影響であるとした場合の HO-C6H4-CH3 の ϕ' -値 $10^{-4.6}$ M/L より大きく, 拮抗的であるとした場合の値 $10^{-2.9}$ M/L より小さい. この値から $\overline{K_{G_1}}'/K_{G_1}'$ を計算すると 35 である.



後期状態, 0°C , NaN_3 $10^{-6.5}$ M/L なるカタラーゼ溶液に於ける HO-C6H3(Cl)-CH3 の ϕ' -値は $15^{-4.2}$ M/L である. この値から K_{G_1}/K_{G_1}' を求めると 27 となり, NaN_3 と HO-C6H4-OH_2 の場合の値に近い.

(4) カタラーゼと毒物が平衡状態にない場合

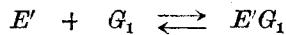
以上考察した所は何れも毒物がカタラーゼ E 或は E' と常衡状態を形成した場合の諸關係である. 斯かる條件が満足されない場合には上述のものとは異つた諸關係が見出される. その最も著しい例はカタラーゼと速かに結合平衡に達するシアン型毒物と平衡達成の緩徐なアジド型或はフェノール型毒物とを次の如き條件で作用せしめた場合でこの場合には外見上兩毒物が全然相互作用を及ぼさないかの如き結果さへ一時的に見られるのである.

今平衡達成の緩徐なアジド型或はフェノール型毒物を G_1 とし, これを後期状態のカタラーゼ

E' と充分時間接触せしめて平衡状態を形成して置く。これにシアン型毒物 G_2 を H_2O_2 と同時に加へ観察される H_2O_2 の分解の初速度から G_1 と G_2 の相互作用を検するに兩者の間には全く相互作用が存しないと云ふ結果になる。即ち G_1 についての ϕ' -値は G_2 が存しない場合の夫れと全く異らず逆に G_2 の ϕ' -値に關しても同様の結果が得られる。但しそれは H_2O_2 分解の初期に關してのみで時間が経過するに従つて兩毒物の間に相互作用が見られる様になる。

例へば後期状態に於てカタラーゼと NaN_3 充分長い間接触せしめてその間に平衡状態を達成させ、これに H_2O_2 と KCN $10^{-5.0}$ M/L を加へて NaN_3 の ϕ' -値を測定すると KCN を加へた直後はこれ等二毒物が無影響の場合の NaN_3 の ϕ' -値 $10^{-7.7}$ ML を示し、約 25 分後には眞の平衡状態が成達され NaN_3 の ϕ' -値は $19^{-6.4}$ M/L となる。

初期に見られる過渡的な現象は次の如く説明せられる。 H_2O_2 及び G_2 の添加前 G_1 はカタラーゼ E' と



なる平衡を充分形成して居りカタラーゼの全量は $[\Sigma E] = [E'] + [E'G_1]$

となつてゐる。これに平衡達成の速かな G_2 と H_2O_2 とが同時に與へられると G_2 は一定の割合で E' に作用し、 E' の濃度を變化する。若し毒物 G_1 が平衡達成の速かなものであれば E' の濃度變化に應じて直ちに前記の平衡が崩れて新しい平衡が成立する譯であるが、 G_1 の性質上新しい平衡状態への移行は直ちに起らない。初めの平衡が崩れ出す迄は謂はゞ $E'G_1$ は凍結された形で存在しその期間中 G_2 は遊離の E' とのみ反應して平衡状態を形成する。今 G_2 が加へられる前の遊離のカタラーゼの濃度を $[E']$ とし、 G_2 が加へられた直後の (凍結状態に於ける) 夫れを $[\bar{E}']$ とすれば

$$\frac{[\bar{E}']}{[E']} = \frac{K_{G_2}'}{K_{G_2}' + [G_2]}$$

である。従つてこの期間に於ける $H_{T,2}$ を求めると


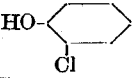

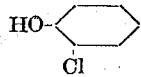
$$H_{T,2} = \frac{[G_2]}{K_{G_2}' + [G_2]}$$

となり、 G_1 と G_2 とは全く無關係なる如く見へる。然し乍ら時間の経過と共に初めの平衡が崩れるにつれて關係は變化し最後に眞の平衡が達成すれば ϕ' -値の移動は前述の如き一定値に達するのである。

第 四 表


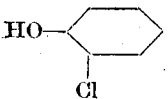
異つた型に屬する毒物相互の關係

	G_1	$-\log \phi_1$	$-\log [G_1]$	G_2	$-\log \phi_2$	$-\log \phi_{T,2}$	\bar{K}_{G_1}/K_{G_1}
初期 (7°C)	NaN_3	5.5	4.5	KCN	5.7	4.9	170

後	KCN	6.2	5.0	NaN ₃	7.7	6.5	> 300
		4.6	4.0	KCN	6.2	5.5	> 300
期 (0°C)	KCN	6.2	5.0		5.2	4.0	> 300
	NaN ₃	7.7	6.0		4.6	3.2	35
	NaN ₃	7.7	6.5		5.2	4.2	27

(iv) 結 論

以上に示した如く少くとも吾々が検した毒物は共存した場合常に多少とも反撥的影響を相互に興へるものである。スペクトルの観察によつて裏書させられる如く（但しフェノール型毒物ではスペクトル観察は役立たない）同じ型に属する毒物は互ひに拮抗的に作用して同時に同一のカタラーゼ分子には結合しないに對し，別の型に属するものは相互作用は及ぼし合ふが同時に同一のカタラーゼ分子に結合し得る。この事は同じ型の毒物はカタラーゼの同じ作用基と結合し，異つた型に属する毒物は異つた作用基と結合するとすれば最も簡単に理解出来る。シアン型とアジド型の毒物は結合によつてカタラーゼのスペクトルを變ずる點から見て恐らくヘミン基と結合するものであり，フェノール型の毒物はスペクトルを變じない點より見て恐らくは蛋白部分と結合するものと考へられる。

而してこれ等の毒物は何れも一價の陰イオンとしてカタラーゼと結合すると思はれるから⁷⁾ 異つた型に属する毒物間の相互作用は恐らく陰イオン相互の反撥力によるものであらう。NaN₃ と KCN, NH₂OH と KCN の相互作用が大體同じ程度であり，HO- と NaN₃,  と NaN₃ の相互作用も大體同じ程度であることはこの事を示唆してゐるようと思はれる。而してシアン型，アジド型の毒物のフェノール型の毒物に對する相互作用が著しく異なることはシアン型，アジド型の毒物が結合するヘミン基が異なるためか，或は同一のヘミン基であつてもその結合個所が異なるためであらう。

4 各毒物と H₂O₂ との相互作用

毒物の存在しない場合カタラーゼに H₂O₂ を加へると H₂O₂ は分解されるがスペクトルには何等の變化も認められない。（既述の如く H₂O₂ の分解中カタラーゼは實際上總て E' 型に移行してゐると考へられるが，E' と遊離のカタラーゼ E との間には一少くとも可視部に於ては一分光化學的差異が認められない。然るに毒物が存在する場合には H₂O₂ の添加によつて新しいス

7) C. D. Coryell, F. Stitt, L. Pauling: J. Am. Chem. Soc. 58 (1937), 633.

スペクトルが出現する事がある。この現象を追求する事は毒物と H_2O_2 の相互作用を知る上に興味あるばかりでなく H_2O_2 の分解機作を窺ふ手懸りともなると思はれる。

(1) アジド型

カタラーゼに充分多量の NaN_3 を加へ、これに更に H_2O_2 を加へると 542, 573 $m\mu$ に吸収極大を示す新しいスペクトルが出現する。これは過酸化水素-アジド-カタラーゼ (恐らくは E' にアジドと H_2O_2 が結合したもの) のスペクトルと見做される。 H_2O_2 の濃度を變化させることによつてアジド-カタラーゼ (恐らくは $E'N_3^-$) と H_2O_2 との結合の解離恒数を分光化學的に測定すると $5^\circ C$ に於て $10^{-3.76}$ M/L である。恐らくこの H_2O_2 の結合は正常な H_2O_2 -分解過程に於ける律速段階即ち $E' + S \rightleftharpoons SE'$ [前述の (2)] 結合に該當するものでないかと思はれる。假りにこの場合 H_2O_2 は分子として結合するものであり、 $E'N_3^-$ と H_2O_2 の結合と E' と H_2O_2 の結合が同一エネルギーで生起するものとすれば上記の解離恒数は k_2'/k_2 に等しいことになる。一方カタラーゼ反応の Michaelis 恒数即ち $k_2' + k_3/k_2$ は $10^{-0.4}$ M/L である。従つて k_3/k_2 は大體 $10^{3.4}$ となる。更に定常状態に於ては $[E'/S](k_2' + k_3) = k_2[E'][S]$ であり $[S]$ は我々の實驗ではせひせひ $10^{-2.0}$ M/L であるから $[S]/[E'] < 10^{-1.6}$ となり、II (4) の推定によく對應する。

分光化學的に證明されるアジド-カタラーゼと H_2O_2 の結合 $E'N_3^- + S \rightleftharpoons SE'N_3^-$ は先に述べた反應速度論的考察では考慮に入れなかつたものである。然し乍ら II (iv)(4) に於て述べた如く NaN_3 と E' との平衡達成には約 20 分要するのに對し、我々の行つた速度論的實驗は約 3 分間に於ける反應に就ての觀察であり、その間たとへ一部分 $SE'N_3^-$ が生ずるとしても、既に形成せられた E' と N_3^- の間の平衡がこれによつて變化を受ける事は殆んどないものと考へてよい。即ち $SE'N_3^-$ の生成は短時間の反應速度論的實驗では現象としては現れないのである。

尙充分量のアジドの存在に於て H_2O_2 の濃度を $10^{-0.8}$ M/L 以上にすると更に新しいスペクトルが現れる。一方 Stern⁸⁾ によれば H_2O_2 の濃度がこの程度になればカタラーゼ反應は H_2O_2 によつて可逆的に阻害される。この二つの事實の間には關連があるように思はれる。

(2) シアン型

カタラーゼに充分多量の KCN を添加するとシアン-カタラーゼのスペクトルが現れるが、この溶液に H_2O_2 を加へても NaN_3 の場合とは異りスペクトルは變化しない。

前記せる如くアジド-カタラーゼには H_2O_2 も KCN も共に結合するが、一定の充分多量の KCN をアジド-カタラーゼに加へシアン-アジド-カタラーゼの状態にし更に種々の濃度の H_2O_2 を加へるとスペクトルはシアン-アジド-カタラーゼと過酸化水素-アジド-カタラーゼに對して一

*) 第二報に詳く論ずる筈である。

8) K. G. Stern: Z. Physiol. Chem. 309 (1932), 176.

定の比例関係を示し、KCN と H_2O_2 の濃度が夫々の解離恒数の比に等しい時スペクトルは兩者の中央になる。即ち KCN と H_2O_2 とはアジド-カタラーゼに對して拮抗的に結合することが知られる。

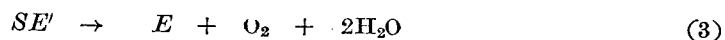
(3) フェノール型

フェノール型の毒物に於ても充分量の毒物の存在下で H_2O_2 を加へてもスペクトルには何等の變化も認められない。

カタラーゼ溶液に NaN_3 を充分多量に加へそれに更に $HO-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ (實驗液中の濃 $10^{-2.5}$ M/L) 度を加へてこの状態に於けるカタラーゼと H_2O_2 との結合の解離恒数を分光化學的に測定すると $10^{-2.5}$ M/L となり、アジド-カタラーゼと H_2O_2 の夫れ $10^{-3.75}$ M/L より大きい。即ちフェノール型の毒物はカタラーゼと H_2O_2 との結合の親和力を減少せしめる。

5. 摘 要

(1) 速度論的實驗の諸結果からカタラーゼによる H_2O_2 分解の過程は次の如きものであることが推論された。(S は H_2O_2 を, E は遊離のカタラーゼを, E' は一分子の H_2O_2 と結合したカタラーゼ分子を示す.)



反應 (1) は速かに平衡に達し且つその解離恒数が反應 (2) に於ける夫れに比し著しく小さい。反應 (3) は極めて速かに進行するので定常状態では SE' 存在せず、實際上カタラーゼ分子の全量は E' の型で存在することになり、又反應全體の速度は (2) の結合反應によつて律せられる事になる。

(2) カタラーゼの毒物はシアン型、アジド型、フェノール型の三つに大別出来る。速度論的實驗の結果から推論せられる所によればこれ等の毒物は何れも E 及び E' と結合するが、シアン型では兩者に對する親和力が等しいのに對し、アジド型、フェノール型では E' に對する方が E に對するよりも親和力が強い。又 E 及び E' の何れに對してもシアン型毒物は速かに結合の平衡状態に達するが、他の二型では平衡の達成に相當の時間を要する。

(3) シアン型及びアジド型の毒物は E との結合によつてそのスペクトルを變化せしめるが、フェノール型毒物に於ては變化が認められない。シアン型及びアジド型毒物と E との結合物に於て分光化學的に求められた解離恒数は速度論的に求められる値とよく一致する。

(4) 同じ型に屬する毒物は同時は同一のカタラーゼ分子に結合し得ない事、及び異つた型に屬する毒物は同時に同一のカタラーゼ分子に結合し得るが、兩毒物はその結合に際し互に反撥し合ふ事が速度論的並びて一結合によりスペクトルの變化が起る場合には一分光化學的に證明せられた。同じ型に屬する毒物の拮抗現象はそれ等がカタラーゼ分子に於ける同一の作用基に結合する

からであり、異つた型に屬する毒物間の反撥作用はそれ等毒物間のイオン反撥によるものと理解せられる。

(5) シアン型毒物は E' に對し H_2O_2 と拮抗的に結合するものと考へられる。アジド型毒物と E' との結合物には更に H_2O_2 が結合し得る。フェノール型毒物は E' と H_2O_2 との結合の親和力を減少せしめる。

本研究に當り終始懇篤なる御指導を賜つた田宮博教授に深謝する。又徳川生物學研究所員高宮篤博士からは種々有益なる御助言を得た。實驗の一部を手傳つて戴いた高島士郎、岩村達一、藤田稔の諸兄に厚く感謝する。

尙本研究は學術研究會議・第二部第六研究班(微量金屬イオンの觸媒及び生物作用)及び日本學術振興會觸媒研究第 13 小委員會より田宮教授に委託せられた研究費で行はれたものである。

實驗例一

カタラーゼ液 2 cc, M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 2 cc, KCN (對照では H_2O) 2 cc, H_2O 12 cc なる組成の實驗液を充分溫度平衡に達せしめた後、よく攪拌しながら H_2O_2 2 cc を極めて短時間に加へ、1分、2分、3分後に實驗液から 5 cc づゝホールピペット(先を切つた)で吸出し $H_2SO_4(1:4)$ 5 cc と急速に混じて反應を止める。1°C に於て KCN の各濃度(實驗液中)に於ける各時間後の $[H_2O_2]$ を N/100 $KMnO_4$ で滴定した所次の如き結果が得られた。

-log [KCN]	N/100 $KMnO_4$ の 滴 定 値 (cc)			Hob. (%)	Hcal. (%)
	1 分	2 分	3 分		
∞	5.45	2.50	1.10	0	0
7.0	6.0	2.90	1.45	12	12
6.5	6.75	3.80	2.20	29	31
9.0	8.6	6.10	4.35	57	57
5.5	10.75	9.35	8.15	82	81
5.0	11.75	11.25	10.55	95	93

$$\phi = 10^{-6.15}$$

但し Hob. は實驗より得られた値、Hcal は $\phi = 10^{-6.15}$ とした一次のシグモイドから得られる値である。

實驗例二

我々は光源として活動寫眞映寫用のガス入電球 (mazda) 100 V - 500 W を適當な荷電で用ひた。尙カタラーゼは紫外線により不可逆的に破壊されるため、理研ウルトラジンフィルター No. 3 を用ひて紫外部を取り除いた。測定用容器はガラス製の長さ 5 cm, 容積約 7.5 cc のものである。一定溫度 (5°C) の水中に容器を入れて溫度を一定にした。

同一濃度のカタラーゼ溶液に於て KCN を加へることにより最も吸收係数の差が著しく出る 680 $m\mu$ と 560 $m\mu$ の値から求められた $\alpha_{ob.}$ と、 $K_G = 10^{-5.8}$ M/L, $[\Sigma E] = 1.68 \times 10^{-5.0}$

觸 媒

として理論的に算出される α_{cal} を比較すると次の如くである。

-log [KCN]	$\alpha_{ob.}$	$\alpha_{cal.}$
2.0	1.0	1.0
4.0	0.95	0.97
4.5	0.90	0.91
5.0	0.50	0.50
5.5	0.17	0.13

實 験 例 三

カタラーゼ液 1 cc (実験一の場合の約 40 倍の濃度のもの) $N/15$ 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 1 cc NaN_3 (対照では H_2O) 1 cc, H_2O 6 cc なる実験液を一定温度に約 30 分放置したる後, air compressor から導いた究氣を通ずることにより激しく攪拌しながら, H_2O_2 1 cc を加へ約 3 秒後 $H_2SO_4(1:4)$ 10 cc を加へて反應を止める。殘存せる H_2O_2 の量を $N/100$ $KMnO_4$ で滴定した所次の如き結果が得られた。

-log [NaN_3]	$N/100$ $KMnO_4$ の 滴 定 値				$H_{ob.}$ (%)	$H_{cal.}$ (%)
	時 間	c.c.	時 間	c.c.		
∞			3.0	5.95	0	0
6.0			3.0	8.2	26	26
5.5	0	23.9	3.2	10.4	44	50
5.0			3.15	17.1	80	77
4.5			3.15	22.0	95	91

$$\phi = 10^{-5.5}$$

こゝに H_{cal} は $\phi = 10^{-5.5}$ とした一次のシグモイドより得られる値である。