

# 阻害剤の反応速度論

## 0. はじめに

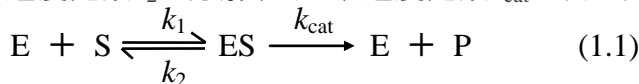
阻害剤(inhibitors)は酵素と相互に作用し、その反応効率を低下させる合成物または天然に存在する化合物である<sup>1)</sup>。それらは代謝反応速度をコントロールするための医薬品として用いられ、酵素反応機構を理解するための道具としても用いられる。多くの有毒な化合物は酵素阻害剤で、生体に大きな影響を与えるため、抗生物質、農薬、除草剤などに使われている。一方、天然の生理的な阻害剤は生体調節や生体防御等のために働いている。阻害剤は異なる機構で酵素と相互作用するが、酵素反応速度論はこれらの機構を区別することができる重要な手段となる。ここでは阻害機構の特徴や酵素反応速度式を導出し、さらに、阻害定数(解離定数)  $K_i$  を決定する方法を述べる。

以下の解説では次の略号を使用する。

E	酵素	S	基質	ES	酵素・基質複合体
I	阻害剤	EI	酵素・阻害剤複合体	P	生成物
$[E]_0$	全酵素濃度(または[E])	$[E]_f$	遊離の酵素濃度	$[ES]$	酵素・基質複合体濃度
$[S]_0$	基質初濃度(または[S])	$[S]_f$	遊離の基質濃度	$k$	反応速度定数
$K_m$	ミカエリス定数	$V_{max}$	最大反応速度	$K_i$	阻害定数(EIの解離定数)

## 1. 酵素反応速度式——ミカエリス・メンテンの式

酵素(E)と基質(S)は速やかに反応して酵素・基質複合体(ES)を形成する。その速度定数は $k_1$ である。ついで、ESは速度定数 $k_2$ で分解するか、速度定数 $k_{cat}$ で反応産物Pになる。全過程は(1.1)のように表わされる。



以下、**定常状態近似**を用いて反応速度( $v$ )を求めると、次の**ミカエリス・メンテン (Michaelis- Menten) の式**

$$v = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (1.2)$$

が得られる。

定常状態近似では、複合体の生成速度と消失速度は等しいとおく。

$$\text{複合体の生成速度} = k_1[E]_f[S]_f \quad (1.3)$$

$$\text{複合体の消失速度} = (k_2 + k_{cat})[ES] \quad (1.4)$$

これより、

$$k_1[E]_f[S]_f - (k_2 + k_{cat})[ES] = 0 \quad (1.5)$$

ところで、

$$[E]_0 = [E]_f + [ES]$$

$$[S]_0 = [S]_f + [ES] + [P]$$

なので、これらを(1.4)に代入すると、

$$k_1([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES] - [P]) - (k_2 + k_{cat})[ES] = 0 \quad (1.6)$$

となる。

通常の実験条件では $[S]_0 \gg [E]_0$ であり、反応の初期(初速度)\*をとれば[P]は無視できるから、 $[S]_0 - [ES] - [P] \approx [S]_0$ としてよい。

$$k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 - (k_2 + k_{cat})[ES] = 0 \quad (1.7)$$

\*通常、加水分解率が10%以下にする。

変形すると、

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_2 + k_{cat} + k_1[S]_0} \quad (1.8)$$

生成物を生じる反応速度は次のように表される。

$$v = k_{cat}[ES] \quad (1.9)$$

(1.9)を代入して、

$$v = \frac{k_1 k_{cat} [E]_0 [S]_0}{k_2 + k_{cat} + k_1 [S]_0} \quad (1.10)$$

酵素に対して大過剰の基質を用いた場合、酵素の活性部位の全てが基質で飽和されると考えることができる。つまり、 $[E]_f \approx 0$ なので $[ES] \approx [E]_0$ となり、このときの反応速度を**最大反応速度** $V_{max}$ と表す。

$$V_{max} = k_{cat}[E]_0 \quad (1.11)$$

これを、(1.10)に代入するとともに、分母分子を $k_1$ で割ると、

$$v = \frac{V_{max}[S]_0}{\frac{k_2 + k_{cat}}{k_1} + [S]_0} \quad (1.12)$$

ここで、

$$K_m = \frac{k_2 + k_{cat}}{k_1} \quad (1.13)$$

とおく。 $K_m$ は**ミカエリス定数**と呼ばれる。これより、(1.2)が得られる。

**Michaelis-Menten** の式(1.2)を図で表すと右のようになる。以下、簡単のために $[S]_0$ を $[S]$ 、 $[E]_0$ を $[E]$ と記す。

### 【ミカエリス・メンテンの式の特徴(右図)】

・ $[S] \gg K_m$ の場合:

$v = V_{max}$ となり、反応速度は $[S]$ に依存せず、0次反応になる。一般に $V_{max}$ は酵素濃度に比例するが、酵素濃度一定の条件で測定すれば、 $V_{max}$ は定数と見なせる。

・ $K_m \ll [S]$ の場合:

$v = (V_{max}/K_m)[S]$ となり、基質濃度に関して一次反応になる。

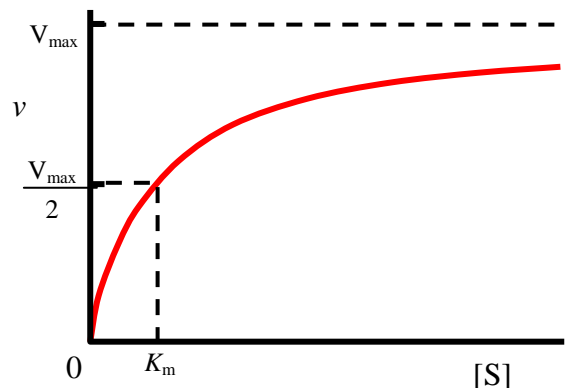


図1 基質濃度と酵素反応速度の関係

## 2. 動力学パラメーター $K_m$ と $V_{max}$ の意味

- $K_m$ と $V_{max}$ は酵素の特徴を表す重要なパラメーターで、反応速度や触媒効率等がわかり、酵素の触媒機構の理解にもつながる。
- 最大反応速度 $V_{max}$ は、1秒間に酵素が変化させうる基質のモル数で表され、酵素の**作用回転数**(turn over)という。
- ミカエリス定数 $K_m$ の意味： ミカエリス・メンテンの式(1.2)から、 $v=V_{max}/2$ のとき、基質濃度 $[S]=K_m$ になる(図参照)。一方、ESの解離定数を $K_S$ とすると、 $K_S$ は次のように表される。

$$K_S = \frac{[E][S]_f}{[ES]} = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.1)$$

もし、 $ES \rightarrow E + P$ の反応が律速段階ならば $k_2 \gg k_{cat}$ となり、(1.2)と(2.1)から、 $K_m \doteq K_S$ となる。

したがって、 $K_m$ は**酵素と基質の親和性を表わすパラメーター**と考えてよい。

$K_m$ 値が小さい程ESの解離が起きにくく、EとSが結合し易いことになる。一般に、EとSは極めて速い平衡にあり、 $k_1, k_2 \gg k_{cat}$ の条件は満たされていることが多い。

### 【 $K_m$ と $V_{max}$ の求め方——Lineweaver-Burkプロット】

Michaelis-Mentenの式(1.2)を変形すると、 $1/v$ と $1/[S]$ のプロットは次のように直線となる。これを**Lineweaver-Burkの式**という。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

$1/[S]$ に対して $1/v$ をプロットすると、直線のX切片から $K_m$ 、Y切片から $V_{max}$ が求まる。 $V_{max}$ は直線の傾き(= $K_m/V_{max}$ )から求めてもよい。Lineweaver-Burkプロット以外に、Michaelis-Mentenの式を変形したいくつかのプロット法が知られている。

• Hanes-Woolfプロット

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{max}} [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (2.3)$$

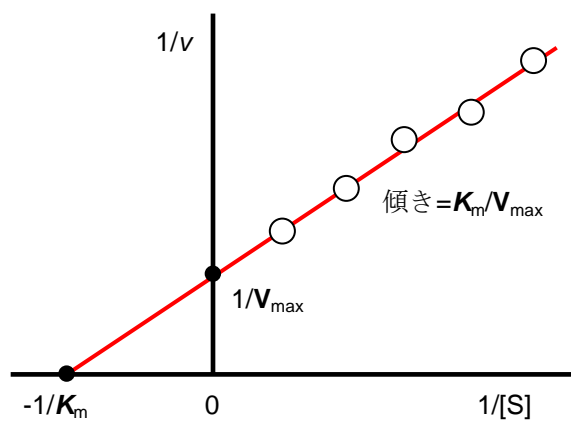


図2 Lineweaver-Burkプロット

## 3. 阻害剤と酵素活性への影響

### 3-1 阻害の形式

**拮抗阻害(Competitive Inhibition)**

- 阻害剤は活性部位に結合する阻害形式である。
- 基質と阻害剤が活性部位を競って結合するため、 $K_m$ 値は大きくなるが、 $V_{max}$ は変化しない。

**非拮抗阻害(Non-competitive Inhibition)**

- 阻害剤が活性部位とは異なる部位に結合して酵素の立体構造を変え、基質が生成物に変わるのを抑える阻害形式である。また、酵素基質複合体

(ES)にも結合して阻害するため、基質濃度を高くしても阻害は解消されない。

- $V_{max}$ が低下するが、阻害剤は直接活性部位に結合しないため基質の親和性に变化がなく、 $K_m$ 値は変化しない。

**不拮抗阻害(Uncompetitive Inhibition)**

- 阻害剤が遊離の酵素とは結合せず、酵素基質複合体(ES)とだけ結合するような阻害形式である。
- $K_m$ 値と $V_{max}$ は両方とも変化する。

これらの阻害をモデル的に表わすと、次のようになる。

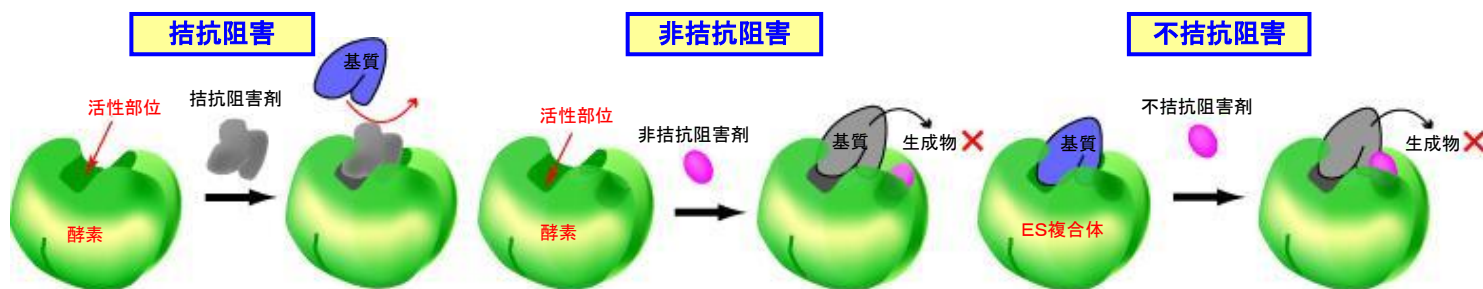
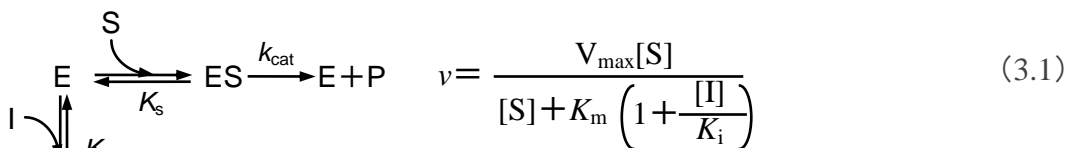


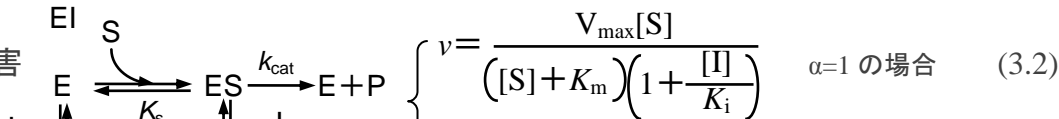
図3 酵素の阻害の仕組み

これらを式で示すと、図4のようになる。反応速度はそれぞれ右の式ようになる。

拮抗阻害



非拮抗阻害



不拮抗阻害

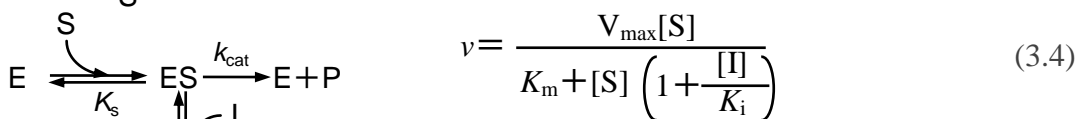


図4 酵素阻害のスキーム(左)と反応速度式(右)

### 3-2 Lineweaver-Burkプロットによる阻害様式の決定——弱い阻害剤に適用

阻害剤が存在するときの Lineweaver-Burk の式は次のようになる。阻害形式はこのプロットで区別できる。

$$\begin{array}{ll}
 \text{拮抗阻害} & \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}[\text{S}]} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\text{max}}} \\
 \text{非拮抗阻害} & \frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{\text{max}}[\text{S}]} + \frac{1}{V_{\text{max}}}\right) \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \\
 \text{混合型} & \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}[\text{S}]} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\text{max}}} \left(1 + \frac{[\text{I}]}{\alpha K_i}\right)
 \end{array}$$

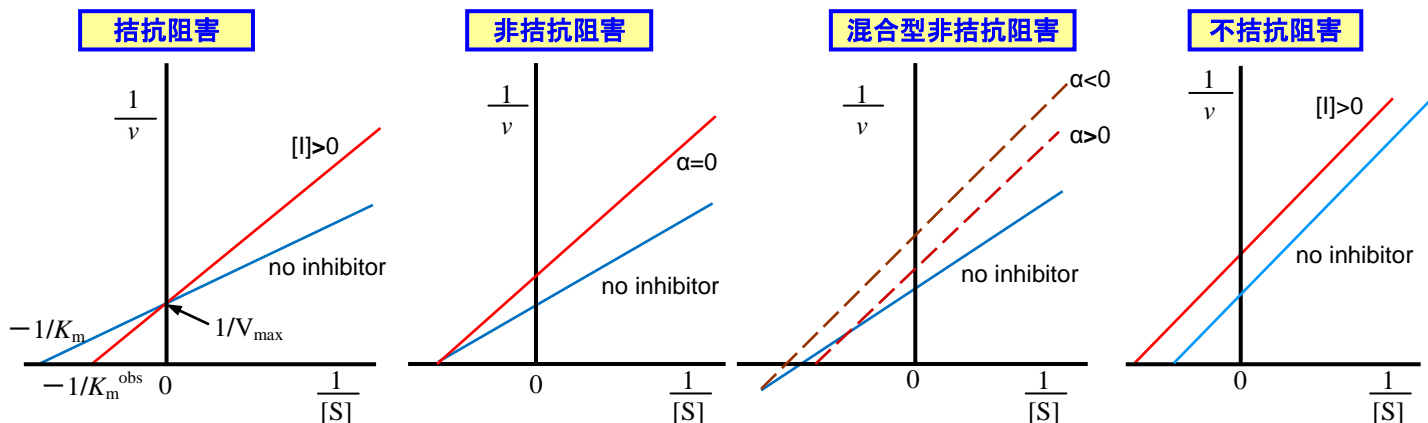


図5 Lineweaver-Burkプロットによる阻害様式の判定

拮抗および非拮抗阻害では Lineweaver-Burk プロットの直線の傾きが大きくなるが、不拮抗阻害の場合は変化しない。阻害剤のあるなしでの直線の交点は次のような特徴がある(図5も参照)。

表1. Lineweaver-Burk プロットによる阻害様式の判定基準

拮抗阻害	非拮抗阻害 $\alpha=0$	混合非拮抗阻害 $\alpha>0$	混合非拮抗阻害 $\alpha<0$	不拮抗阻害
Y軸上	X軸上	X軸の上方	X軸の下方	平行

### 3-3 見かけの $K_m$ ( $K_m^{\text{obs}}$ )からの $K_i$ の計算

拮抗阻害の場合、阻害剤は $K_m$ にだけ影響を与えるので、見かけの $K_m$ から $K_i$ を求めることができる。

$$K_m^{\text{obs}} = K_m \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_i}\right) \quad (3.5)$$

図5のようにして $K_m$ と $K_m^{\text{obs}}$ を求めれば(3.5)から $K_i$ を計算できる。

### 3-4 Dixonプロットによる可逆的阻害剤の $K_i$ 値の決定

$[I] \gg [E]$ の条件が当てはまるような、結合が弱い阻害剤の場合、 $K_i$  値の測定法として **Dixon 法**<sup>2)</sup>がある。

【操作】2つ以上の基質濃度で、種々の濃度の阻害剤を酵素に作用させて反応速度を測定する。  
**Lineweaver-Burk** プロットと同様に、次ページの図のようにして  $1/v$  と  $[I]$  でプロットする。直線の交点が  $K_i$  値である。不拮抗阻害の場合は  $[S]/v$  と  $[I]$  でプロットして交点から  $K_i$  値を求める。

●  $1/v$  と  $[I]$  でプロット      ここで、 $S_1 < S_2$

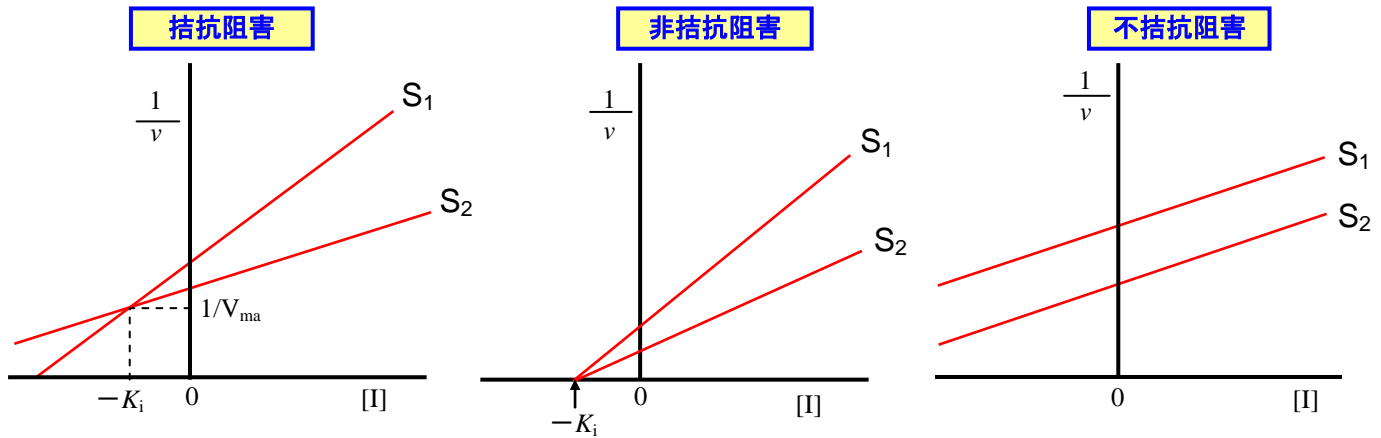


図6A Dixonプロットによる $K_i$ 値の決定:  $1/v$ と $[I]$ でプロット

●  $[S]/v$  と  $[I]$  でプロット

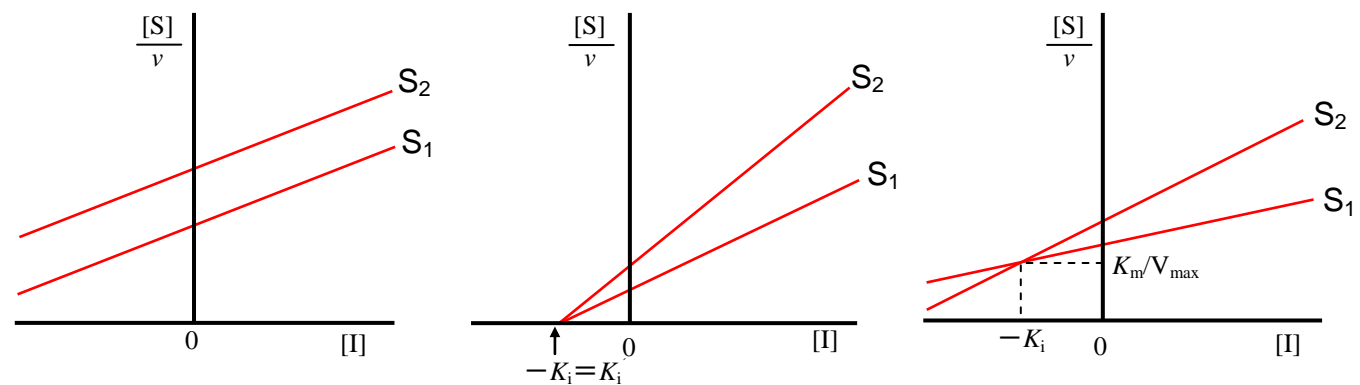


図6B Dixonプロットによる $K_i$ 値の決定:  $[S]/v$ と $[I]$ でプロット

## 4. 強く結合する阻害剤(tight binding inhibitors)

### 4-1 強く結合する阻害剤の $K_i$ 値の決定

酵素濃度に近い濃度 ( $[I] \approx [E]$ ) を用いる必要があるような阻害剤では **Dixon** の方法は使えない。**Morrison (1969)**<sup>3)</sup> によって提案された阻害の一般式 (4.15) は、酵素と強く結合する阻害剤の場合に適用できる。**Morrison** の式は、阻害剤濃度  $[I]$  と酵素活性比 **fractional enzymatic activity** ( $v_i/v_0$ ) の関係を示す。

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (4.15) \text{ Morrisonの式}$$

【操作】一定濃度の酵素および基質に対して、種々の濃度の阻害剤を作用させ、酵素活性比を計算する。後述の非線形 **curve-fitting** 法によって、見かけの  $K_i$  ( $K_i^{app}$ ) が求まる。

見かけの解離定数  $K_i^{app}$  から真の解離定数  $K_i$  を求めるには、次の式を用いる。

$$\text{拮抗阻害: } K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (4.16)$$

$$\text{非拮抗阻害: } K_i^{app} = \frac{K_i(K_m + [S])}{\frac{K_m}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}} \quad (4.17) \text{ ここで、}\alpha=1\text{ならば、}K_i^{app} = K_i\text{となる。}$$

$$\text{不拮抗阻害: } K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (4.18)$$

(Morrisonの式の導き方)



酵素と阻害剤の全濃度を[E], [I], 遊離の酵素と阻害剤の濃度を[E]<sub>f</sub>, [I]<sub>f</sub>とすると,

$$[E] = [E]_f + [EI] \quad (4.2)$$

$$[I] = [I]_f + [EI] \quad (4.3)$$

平衡では, 解離定数は次のようになる。

$$K_i = \frac{[E]_f [I]_f}{[EI]} \quad (4.4)$$

変形して,

$$[EI] = \frac{[E]_f [I]_f}{K_i} \quad (4.5)$$

これに(4.2)(4.3)を代入して,

$$[EI] = \frac{([E] - [EI])([I] - [EI])}{K_i} \quad (4.6)$$

$$([E] - [EI])([I] - [EI]) - K_i [EI] = 0 \quad (4.7)$$

展開して,

$$[EI]^2 - ([E] + [I] + K_i)[EI] + [E][I] = 0 \quad (4.8)$$

根の公式より,

$$[EI] = \frac{([E] + [I] + K_i) - \sqrt{([E] + [I] + K_i)^2 - 4[E][I]}}{2} \quad (4.9)$$

ところで, [EI]を求めるには, 酵素の反応速度を測定する方法が用いられる。Michaelis-Mentenの式から, 阻害剤がない場合の反応速度は,

$$v_0 = \frac{k_{cat}[E][S]}{[S] + K_m} \quad (4.10)$$

阻害剤が存在すると, 反応速度v<sub>i</sub> は[E]<sub>f</sub> に比例する。

$$v_i = \frac{k_{cat}[E]_f[S]}{[S] + K_m} \quad (4.11)$$

よって, fractional enzymatic activity (v<sub>i</sub>/v<sub>0</sub>)は

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{[E]_f}{[E]} \quad (4.12)$$

(4.2)を代入して,

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{[E] - [EI]}{[E]} = 1 - \frac{[EI]}{[E]} \quad (4.13)$$

(4.9)に(4.13)を代入して,

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i) - \sqrt{([E] + [I] + K_i)^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (4.14)$$

基質濃度がK<sub>i</sub>にどう影響するかは阻害形式で異なる。そこで, K<sub>i</sub>の代わりに見かけの解離定数K<sub>i</sub><sup>app</sup>を用いると, (2.14)からMorrisonの(2.15)が得られる。

4-2 Hendersonプロット

Morrisonの式は非線形なので, コンピュータの使用が一般化する前は使いにくい式だった。そこで, Henderson(1972)<sup>4)</sup>はMorrisonの式を直線の式に直し, グラフの直線の傾きからK<sub>i</sub>を導けることを示した。Hendersonの一般式は次のようになる。

$$\frac{[I]}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = K_i^{app} \left( \frac{v_0}{v_i} \right) + [E] \quad (2.20)$$

【操作】一定濃度の酵素および基質に対して, 種々の濃度の阻害剤を作用させ, 酵素活性比を計算する。

式(2.20)より, v<sub>0</sub>/v<sub>i</sub>に対して[I]/(1-v<sub>i</sub>/v<sub>0</sub>)をプロットすると, 直線の傾きがK<sub>i</sub><sup>app</sup>, Y切片が酵素濃度[E]となる(図7)。また, 次に示すように, 阻害の形式も判別できる。

Hendersonプロットによる阻害様式の判定は, 基質濃度を増加した時の直線の傾きの変化で調べる(図8)。拮抗阻害では[S]の増加に伴い傾きも増加するが, 不拮抗阻害では逆に減少する。一方, 非拮抗阻害では直線の傾き(=K<sub>i</sub>)は基質濃度に影響されない。

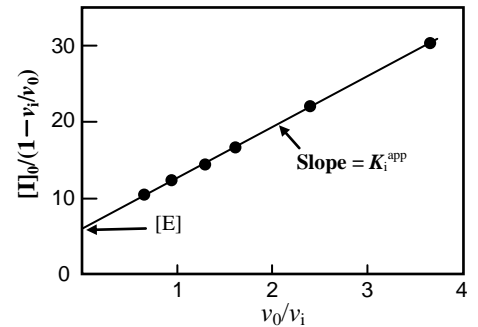


図7 Hendersonプロット

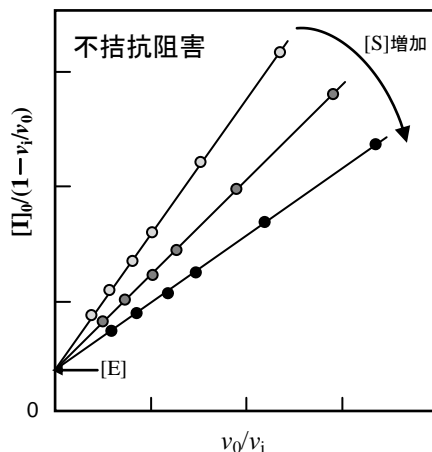
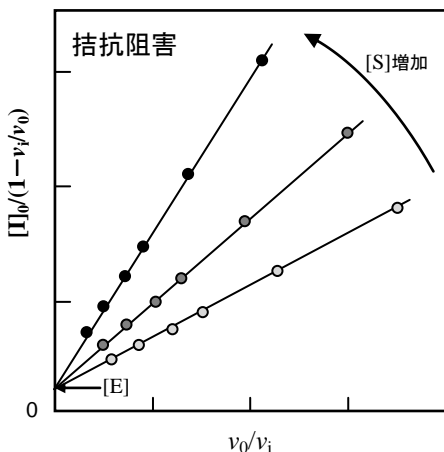


図8 Hendersonプロットによる阻害様式の判定

### 4-3 Morrisonの式を用いるcurve-fitting

Hendersonの方法はコンピュータを使用しなくて済むが、式の両辺に $v_0$ が入っているため $v_0$ の正しい測定値が必要になる。 $v_0$ が不正確な場合は $v_i$ 値が正しくても計算値が大きくなり、直線にならなくなる可能性が示唆されている(Henderson, 1973)。コンピュータの使用が一般化した現代ではMorrisonの式を用いてcurve-fittingすることが可能で、 $K_i^{app}$ の算出にはむしろその方が望ましいとされている(図8)。

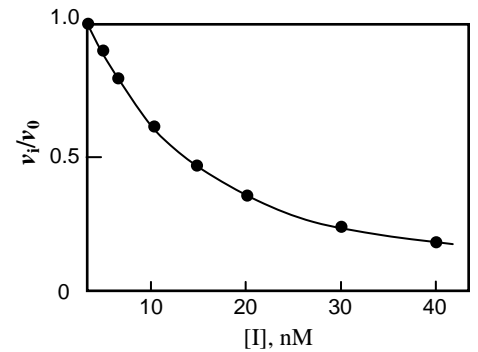


図9 Morrisonの式を用いるcurve-fitting.

### 4-4 解離平衡定数を用いる $K_i$ 測定の簡便法

今、**同じモル濃度**の酵素と阻害剤(例えば、最終濃度  $4 \times 10^{-7}$  Mとする)を混ぜて残存活性を測定した時、 $v_i/v_0$ が0.06だったとする。酵素の残存活性が6%なので、94%は酵素-阻害剤複合体で存在する。

$$[E]_f = [I]_f = 4 \times 10^{-7} \times 0.06 = 0.24 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$[EI] = 4 \times 10^{-7} \times 0.94 = 3.76 \times 10^{-7} \text{ M}$$

となる筈。式(4.4)より、解離平衡定数は次のようになる。

$$K_i = \frac{[E]_f[I]_f}{[EI]} = \frac{(0.24 \times 10^{-7})^2}{3.76 \times 10^{-7}} = 0.0153 \times 10^{-7} \text{ M} \doteq 1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$$

この方法は残存活性の誤差により、計算結果がかなり変動するという欠点があるが、おおよその値を見積もるのには使える。(上の例で残存活性を7%にすると $K_i$ は $2.1 \times 10^{-9}$  Mになる。)

## 5 引用文献

- <sup>1)</sup> Copeland, R. A., "Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists." Wiley-Interscience, 2005
- <sup>2)</sup> Dixon, M., The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.*, **55**, 170-171 (1953); Dixon, M., The graphical determination of  $K_m$  and  $K_i$ . *Biochem. J.*, **129**, 197-202 (1972); Cornish-Bowden, A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-Competitive Inhibitors. *Biochem. J.*, **137**, 143-144 (1974).
- <sup>3)</sup> Morrison, J.F., Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, **185**, 269-286 (1969).
- <sup>4)</sup> Henderson, P. J. F., A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.*, **127**, 321-333 (1972).