Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-03

酵素阻害定数算出のための新しい作図法

奥宮, 明子

(Citation)
神戸大学医学部保健学科紀要,21:79-83

(Issue Date)
2006-03-30

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(JaLCDOI)
https://doi.org/10.24546/00522824

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/00522824

KOBE UNIVERSITY

酵素阻害定数算出のための新しい作図法

奥宮　明子

要　旨

本論文の目的は50％阻害を示すインヒビター濃度 I_{50} と基質濃度 $[S]$ との間に導かれる関係式から酵素阻害定数 K_i を求める新しい作図法を紹介することにある。まず、競合的阻害の場合 I_{50} は $I_{50}=\frac{K_i}{K_m}[S]+K_i$ とあらわされる。ここで K_m はMichaelis定数を表す。一方、非競合的阻害の場合は $I_{50}=K_i$ となる。したがって、縦軸に I_{50}、横軸に $[S]$ をとると、競合的阻害の場合は傾き K_i/K_m の直線となり、非競合的阻害の場合は x 軸に平行な直線となる。いずれの阻害様式の場合も y 切片が K_i を示し、一目で値が読み取れるのが本法の特徴である。

合成インヒビターMNAPPA（(2R, 4R)-4-phenyl-1-[Nα-7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl]-L-arginyl)-2-piperidinecarboxylic acid）によるトリプシン阻害の実験結果を、この新しい方法と従来用いられているDixon法で処理して K_i を求め比較したところ、よい一致が得られ、K_i を求める作図法として本方法は有用な方法であると考えられた。

索引用語：I_{50}、K_i、Dixon法、競合的阻害、トリプシンインヒビター

緒　言

種々の疾患に関与する酵素を標的とするインヒビターは疾患をコントロールする有用な手段となり、薬剤として治療に用いることができる。たとえば筆者らの開発したトロンビン阻害剤アルガトロバンは血栓症の治療薬としてあるいは透析時の抗凝固薬として臨床現場で役立っている。アルガトロバンの開発研究の過程で筆者らは化学物質の評価のパラメーターの一つとして K_i を使用した[1]。K_i は阻害効果の客観的指標として酵素阻害物質の開発において一般に広く用いられる。

K_i 算定には正確かつ簡単な方法が望まれる。従来広く用いられてきた K_i 算出方法としてDixon法がある[2]。これは縦軸に $1/v$、横軸に $[I]$ をとり、異なる基質濃度を用いて得られた2本の直線の交点から K_i を求めるものである。Dixon法は作図による方法としては代表的なものであるが、2本の交点を求めるという方法の性格上、測定誤差が出やすいという欠点が指摘されている[3]。筆者は2本の交点でなく1本の直線から簡単に K_i を求める方法を模索した。その結果、I_{50} を導入することにより y 切片がそのまま K_i を表すという簡単な作図法（以下 $I_{50}-S$ 法と表記する）を見出したので報告する。

材料と方法

$I_{50}-S$ 法をDixon法と比較するために、合成基質H-Phe-pip-Arg-pNA（S2238、KABI）を用いたMNAPPA((2R, 4R)-4-phenyl-1-[Nα-7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl]-L-arginyl)-2-piperidinecarboxylic acid）によるトリプシン（Sigma）阻害を測定した。反応はトリスーイミダゾール緩衝液（pH 8.1）中で37℃でのパラニトロアニ

神戸大学医学部保健学科

リンの放出を405nmでの吸光度変化としてプレートリーダー（SJオートⅡ，三光純薬）により測定した[4]。

Dixon法は縦軸に$1/v$、横軸に$[I]$をとり、2本の直線の交点からK_iを求めた[2]。データの処理と直線回帰はMicrosoft社のExcelを用いて行った。

結　　果

1）$I_{50}-S$法

Dixonは次のような競合的阻害の反応式を導出した[2]：

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V_{max}K_i[S]}[I]+\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{K_m}{[S]}\right) \quad \cdots 1)$$

ここでvは反応速度、V_{max}は最大基質下における最大反応速度、$[S]$は基質濃度、$[I]$はインヒビター濃度を示す。Dixonプロットはこの式に基づき、縦軸に$1/v$、横軸に$[I]$をとり、異なる2つの基質濃度について得た2本の直線の交点が$-K_i$として求められるというものである。

インヒビターの無いときの酵素反応速度v_oと、インヒビター存在下での酵素反応速度v_iの比v_o/v_iは式1）から次のように表わされる：

$$\frac{v_o}{v_i}=\frac{K_m}{K_i(K_m+[S])}[I]+1 \quad \cdots\cdots 2)$$

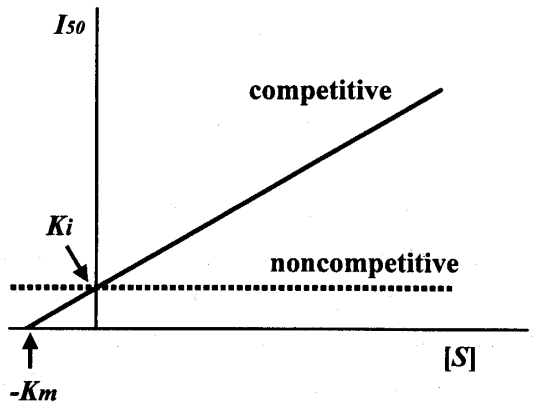

図1．$I_{50}-S$法によるK_iの求め方

競合的阻害の場合、y切片がK_i、x切片が$-K_m$の直線となり、非競合的阻害の場合は、y切片K_iをもつx軸に平行な直線となる。

この式から、v_o/v_iを縦軸に、$[I]$を横軸にとれば、いずれの$[S]$濃度を用いてもy切片1を通る直線となり、I_{50}すなわち50%阻害濃度は$v_o/v_i=2$となるときのインヒビター濃度$[I]$として求められる。さらに、式2）に$v_o/v_i=2$および$[I]=I_{50}$を代入すれば

$$I_{50}=\frac{K_i}{K_m}[S]+K_i \quad \cdots\cdots 3)$$

と導出される。この式はy軸にI_{50}を、x軸に$[S]$をとると図1のように作図され、y切片、x切片がそれぞれK_iおよび$-K_m$となり、一目でこれらの値が読み取れる。

一方、非競合的阻害の場合の反応速度は次のとおりである[2]：

$$v=\frac{V_{max}[S]}{(1+[I]/K_i)(K_m+[S])} \quad \cdots\cdots 4)$$

ここから

$$\frac{v_o}{v_i}=\frac{[I]}{K_i}+1 \quad \cdots\cdots 5)$$

したがってI_{50}は

$$I_{50}=K_i \quad \cdots\cdots 6)$$

と表され、図1のようにx軸に平行な直線となって、ここでもやはりy切片がK_iを示す。以上のように、I_{50}と$[S]$の関係をプロットすればy切片からK_iがよみとれるのが新しい$I_{50}-S$法である。

2）トリプシンインヒビターのK_i測定への応用

具体的にインヒビターによる酵素阻害のデータを$I_{50}-S$法を用いて処理し、Dixon法と比較した。既に報告したトリプシンインヒビターMNAPPAによるトリプシン阻害のデータ[4]を$I_{50}-S$法で処理しK_iを求める手順を示したのが図2 a、bである。本法ではまず図2 aのようにv_o/v_i-$[I]$のグラフから各$[S]$についてI_{50}を求める。次にこのI_{50}値を縦軸に、$[S]$を横軸にとると図2 bのようになり、y切片がK_i値（ここでは0.11μM）を示す。x軸と平行でないのは明らかであり、MNAPPAは競合的にトリプシンを阻害することが示された。

図2 cには同じデータをDixon法で処理した

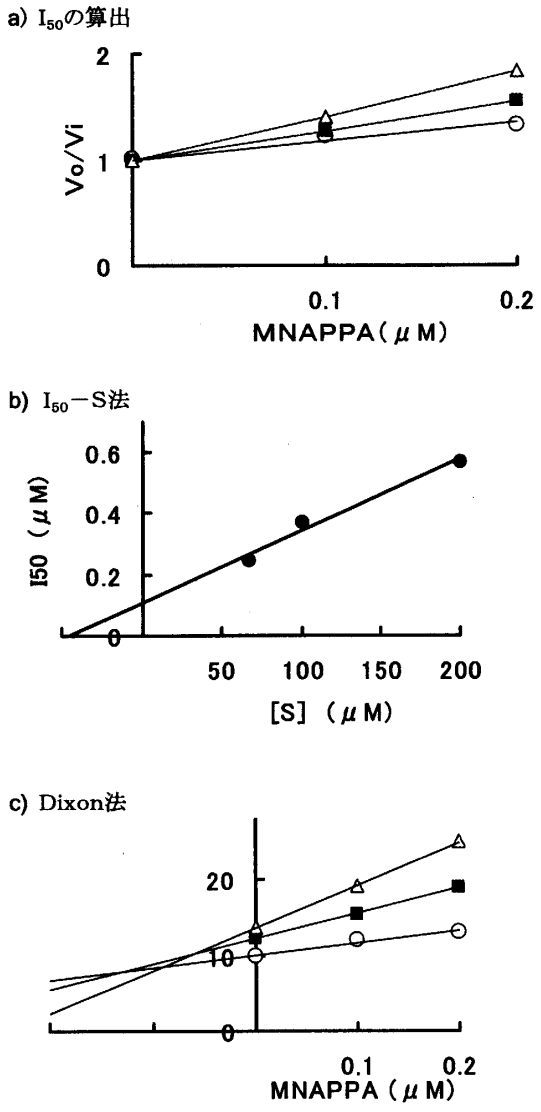

図2．MNAPPAによるトリプシン阻害

a) b)：既報のデータ[4]を $I_{50}-S$ 法で処理する手順を示す。まず、a) I_{50} を求める。各基質濃度（△；[S] =67 μM、■；[S] =100 μM、○；[S] =200 μM）における I_{50} は、y 切片を1に固定して得た回帰直線の傾きから I_{50} = 1 / 傾き として算出される。次に、b) 得られた I_{50} 値を用いてプロットした I_{50}—S の回帰直線の y 切片が K_i である。c)：同じデータ[4]の Dixon 法でのプロット。△；[S] =67 μM、■；[S] =100 μM、○；[S] =200 μM。

結果を示した。Dixon 法でプロットしたとき、2本の直線の各交点3つの x 座標値は−0.06から−0.13 μM と幅があり、平均 K_i 値は0.09 μM となった。また、同様の実験5回の K_i の平均と SD は、筆者の新しい $I_{50}-S$ 法による算定では 0.12±0.03 μM、Dixon 法では0.12±0.04 μM となり、両者はよく一致した。

考　　察

阻害定数 K_i はドラッグデザインの研究においては阻害効果や酵素選択性の定量的な評価のために大変有用である。また、K_i は *in vitro* で得られた実験値を用いたコンピューターによる *in vivo* 反応のシミュレーション計算においてもしばしば必要となる基本的なパラメーターの一つである。

近年 K_i の算定法としてコンピュータソフトによる非線形分析が行われている。しかし、直線回帰は簡単で且つ視覚的に確かめやすいという利点があり捨てがたい。直線回帰による K_i 算定法としては Dixon 法が代表的である[2]。Dixon 法は2本の直線の交点から K_i を求めるものであるが、各直線の小さなばらつきが結果的に大きなずれとして2本の交点すなわち K_i に影響することがあり、とりわけ高濃度の基質を用いたときに実験誤差が大きくなることが指摘されている[3]。

本論文で示した $I_{50}-S$ 法では異なる基質濃度を用いて得られた全てのデータを1本の直線にまとめることになり、図2 b) のように K_i は一つの y 切片として示される。同じデータを Dixon 法でプロットすると、各直線の交点3つから得られた K_i は0.06～0.13 μM の間でばらついたが、これらの平均値は $I_{50}-S$ 法で算定された K_i とほぼ一致した。さらに、5回の実験での K_i の平均値と SD も両法でほぼ同じであり、このデータの処理結果に関する限り、2つの方法には精度的に大きな差はみられなかった。

手順の煩雑さに関しては、$I_{50}-S$ 法はまず① v_o/v_i - [I] のグラフから I_{50} を求める、②次にこの I_{50} 値と [S] の間で再びグラフを描くと、[S] がどんなに多くても一本の直線が得られ、y 切片として K_i を読み取ることができる。Dixon 法では① $1/v$ − [I] のグラフを描き、②各2本の直線の交点を求め、③いくつかの交点の平均値を求めて K_i とする。[S] が多いほど組合せが

多くなり、交点は多くなる。手順の煩雑さはそれほど変わらないと考えられる。

$I_{50}-S$ 法に似たプロット法として K_{mapp}（インヒビター存在下でのみかけの K_m）と $[I]$ の関係式 $K_{mapp}=\frac{K_m}{K_i}[I]+K_m$ から、縦軸に K_{mapp}、横軸に $[I]$ をとる方法がある。この方法では、競合的阻害の場合は傾き K_m/K_i の直線となり、y 切片が K_m、x 切片が $-K_i$ となる。非競合的阻害の場合は y 切片 K_m をもつ x 軸に平行な直線となり、K_i は求められない。すなわち、このプロットはどちらかといえば K_m 算出に主眼が置かれた作図法と考えられる。

さらに本法は、競合的阻害の場合 I_{50} は $[S]$ に依存するが、非競合的阻害の場合には I_{50} は $[S]$ に全く依存しないことを視覚的に理解させるには便利な作図法であり、教育現場での利用価値があるのではないかと考えられる。

文　献

1．Hijikata-Okunomiya A, Okamoto S. A strategy of the synthetic thrombin inhibitors. Semin Thromb Hemost 18：135-149, 1992.

2．Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem J 55：170-171, 1953.

3．Kakkar T, Boxenbaum H, Mayersohn M. Estimation of Ki in a competitive enzyme-inhibition model: Comparisons among three methods of data analysis. Drug Metab Dispos 27：756-762, 1999.

4．Hijikata-Okunomiya A, Tamao Y, Kikumoto R, et al. Selective inhibition of trypsin by（2R,4R）-4-phenyl-1-[Nα-7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl]-L-arginyl)-2-piperidinecarboxylic acid. J Biol Chem 275：18995-18999, 2000.

A new graphical method for estimation of enzyme inhibition constants

Akiko Hijikata-Okunomiya

ABSTRACT : The present study describes a new graphical method that enables us to read the inhibition constant (K_i) directly. The following equations are introduced : $I_{50} = \frac{K_i}{K_m}[S] + K_i$ for a competitive inhibition and $I_{50} = K_i$ for a noncompetitive inhibition. When plots are prepared of I_{50} versus $[S]$, a straight line is obtained. If the straight line does not run parallel with the horizontal line, the inhibition is assumed to be competitive, and if it does, noncompetitive. The intercept on the y -axis represents K_i in either case.

The K_i value of MNAPPA ((2R, 4R)-4-phenyl-1-[Nα-7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl]-L-arginyl)-2-piperidinecarboxylic acid) for trypsin estimated by this method was comparable to that estimated by the Dixon plot, suggesting that the new method is useful for the estimation of K_i.

Key Words : I_{50} , K_i ,Dixon method, competitive inhibition, trypsin inhibitor

Faculty of Health Sciencses, Kobe University School of Medicine