重金属による δ -Aminolevulinic Acid

Dehydratase の阻害機構の解明

II. 酵素阻害のシミュレーション

Inhibition Mechanisms of δ -Aminolevulinic Acid

Dehydratase by Heavy Metals

II. Simulation of enzyme inhibition

順天堂大学医学部衛生学教室

深 野 駿 一

Shunichi Fukano

Department of Hygiene, Juntendo University School of Medicine, Tokyo

An "Imaginary Reaction Box" (IR Box) was constructed using a microcomputer to elucidate the inhibition mechanisms of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). The IR Box could print out the changes of the concentrations of enzyme, substrate, enzyme-substrate complex and various other components in an enzyme reaction when the amounts of enzyme, substrate, and inhibitor, and provisional velocity constants were input from the keyboard. By using this IR Box, the inhibition effects of Zn, Pb and Hg on ALAD were examined. It was assumed that these metals and ALAD form an active site inhibitor-enzyme complex (EI), an allosteric inhibitor-enzyme complex (IE), an allosteric inhibitor-enzyme-substrate complex (IES), and an allosteric inhibitor-enzyme-active site inhibitor complex (IEI), and that reactions of about 20 kinds occur in the IR Box, including reverse reactions. Results of the reactions in the IR Box made it clear that there are reaction mechanisms which explain the conflicting results obtained from inhibition by these metals *in vitro*. The IR Box can be a useful tool not only for the investigation of enzyme reactions *in vivo* which do not obey Michaelis-Menten kinetics, e.g., allosteric regulation and allosteric inhibition, but also for the improvement of the efficiency of experiments involving such reactions.

Key words: Simulation, δ -Aminolevulinic acid dehydratase, Enzyme kinetics, Metal inhibition

シミュレーション, δ -アミノレブリン酸脱水酵素, 酵素反応速度論, 金属阻害

目 的

水銀、カドミウムを初めとする大量～中程度暴露による重金属中毒問題は減少し、近年長期、微量暴露による人体への影響とその予防が重要となって来ている。微量暴露の影響が最も顕著に現れる例として鉛暴露による δ -Aminolevulinic acid dehydratase (5-aminolaevulinate hydro-lyase, ALAD, EC 4, 2, 1, 24) の活性低下がある。この酵素はヘム合成系の2番目に位置し、鉛に

より鋭敏に阻害されポルフィリン代謝異常を起こすことから、その阻害機構について鉛ばかりでなく他の金属も含め詳しく検討されている。

例えば亜鉛 (Zn) は低濃度で ALAD の失活を保護しているが¹⁾、その至適濃度を越すと阻害剤となり ALAD を失活させる²⁻⁴⁾。阻害形式は非競合型 (non-competitive type) であり^{3,5)}、酵素との結合力は弱い⁶⁾。2価鉛 (Pb) は強力な阻害剤であるが、S-S 結合還元試薬である Dithiothreitol (DTT) あるいは glutathione と、Zn を

添加すると容易に活性が回復する。その阻害形式は混合型 (mixed type)^{3,5)} といわれている。また2価水銀(Hg)はPbほど強力ではないが^{2,3)}一旦阻害するとDTT, Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) で処理しても活性が半分ほど回復するのみで不可逆的失活をする⁶⁾。その阻害形式は競合型 (competitive type) である^{3,5)}。Hgが競合型阻害であるなら不可逆的阻害はありえないが不可逆を示し、矛盾した結果が得られている。

このような阻害形式の差異あるいは矛盾がどのような反応機構に起因しているのか、いろいろな予測が成り立つ。またその予測が正しいかを実証することは、生体内における金属の作用機作を知ることにつながり興味の持たれる所であるが、多くの労力と時間が必要でありその証明が困難な場合も多い。そこでコンピューター内に模擬実験用の「仮想反応槽」を構築して、予測した仮定により実験を行い、金属による阻害形式の差異が矛盾なく説明できるかを検討した。

実験方法

1. 反応の基本モデル

「反応は、反応に関与する分子同士が衝突した時、その合計の運動エネルギーが一定の値以上を持つとき反応が成立するものとする。」この単純な仮定によって「仮想反応槽」を構築することを基本とし、如何なる理論式も使用しなかった。この反応の基本原理は、分子はMaxwellの速度分布式

$$F(u)du = \text{const} \cdot u^2 \cdot \exp(-mu^2/2kT)du$$

但し u は速度, k はボルツマンの定数

T は絶対温度, $*$ は積算

によって運動しており、分子同士が衝突した時、その合計の運動エネルギー ($mu^2/2$) が活性化エネルギー (E) 以上の値を持つ時のみ反応が成立するという理論に基づいて仮定したものである。このとき反応速度定数 K は

$$K = A \exp(-E/kT) \quad n/1 \cdot \text{sec}$$

又は

$$= A \exp(-E/RT) \quad \text{mol/l} \cdot \text{sec}$$

但し A は全衝突数, R は気体定数,

n は分子数

によって示すことが出来る。即ち $\exp(-E/RT)$ は全衝突回数に対する有効衝突回数の割合を表し, K はこの値に比例している。

2. 酵素反応理論

酵素反応は以下の式によって進行するものとした。(酵素反応速度論は多くの著書があり説明するまでもないが、ここで使用する記号の定義および反応機構の説明上簡単に示した。)

この反応経過を式で示すと

$$d[E]/dt = (K_2 + K_3)[ES] - K_1[E][S]$$

$$-d[S]/dt = K_1[E][S] - K_2[ES]$$

$$d[ES]/dt = K_1[E][S] - (K_2 + K_3)[ES]$$

$$d[P]/dt = K_3[ES]$$

ここで $[E_0] = [E] + [ES]$

$[S_0] = [S] + [ES] + [P]$ である。

但し E : 遊離酵素, S : 基質, P : 反応産物, ES : 酵素基質複合体, E_0, S_0 : 初期濃度, K_1, K_2, K_3 : 反応速度定数, ES のような場合複合体の濃度か、それぞれの濃度の積 $E \cdot S$ か不明確の場合は, $[ES]$ 又は $E \cdot S$ と示す。

この連立微分方程式を一定の条件下でコンピューターで解を求め、各成分の濃度変化をグラフ化したものはすでに報告されている。しかし阻害剤を加えると式が複雑で解を求めることが困難となってくる。そこで微分方程式を使用せず「反応の衝突理論」のみによって「仮想反応槽」を構築した。

3. 仮想反応槽

「仮想反応槽」は Program 1 の BASIC プログラムにより成り立っている。但しプログラム中の記号の定義は以下の通りとする。

NS, NE, NES, P1; それぞれ $[S]$, $[E]$, $[ES]$, $[P]$

Program list 1.

```
1200 *ST1
```

```
1201 K=K+1
```

```
1212 IF RND<AR1 THEN NR1=NS*NE*AV: NES=NES+NR1: NS=NS-NR1: NE=NE-NR1
```

```
1214 IF RND<AR2 THEN NR2=NES*AW: NES=NES-NR2: NS=NS+NR2: NE=NE+NR2
```

```
1710 IF RND<AR30 THEN HR30=NES*AW: P1=P1+NR30: NES=NES-NR30: NE=NE+NR30
```

```
1720 IF K=KT THEN GOTO *EXIT2
```

```
1730 GOTO *ST1
```

を示す。

K: 反応時間

NR1: 1 回の反応で生成する ES の量 (K1 の反応に関与する)

AR1: 全衝突回数に対する有効衝突回数の割合に比例する値 (K1 の反応に関与する)

NR2: 1 回の反応で解離する ES の量 (K2 の反応に関与する)

AR2: 反応に関連する分子数に対する有効反応数の割合に比例する値 (K2 の反応に関与する)

NR30: 1 回の反応で出来る反応産物の量 (K30 の反応に関与する)

AR30: 反応に関連する分子数に対する有効反応数の割合に比例する値 (K30 の反応に関与する)

AV: 2 分子が反応し結合する時に関与する定数

AW: 1 分子が反応する時に関与する定数

RND: 乱数 $0 \leq \text{RND} < 1$ の範囲の値

時間 (K) が 1 進むと ($K=K+1$), 基質 (NS) と酵素 (NE) が衝突し合い, この分子同士が有効衝突の範囲 (AR1) 内 ($\text{RND} < \text{AR1}$) であれば, 酵素基質複合体 (NES) を NR1 量生成し ($\text{NES}=\text{NES}+\text{NR1}$) 基質および酵素は NR1 だけ減少する (1212行)。これは $\text{E}+\text{S} \xrightarrow{\text{K1}} \text{ES}$ の反応に相当する。同様にして $\text{E}+\text{S} \xleftarrow{\text{K2}}$ ES の反応は 1214 行で示すことが出来る。すなわち, 乱数

の値が AR2 の範囲内にあれば ES が NR2 の量解離して NE と NS が NR2 増加する。 $\text{ES} \xrightarrow{\text{K30}} \text{E}+\text{P}$ の反応は, 同様に 1710 行によって示すことが出来る。これら一連の反応を KT 時間続け, 出来た反応産物および酵素, 基質, 複合体の変化量を反応槽より取り出す (1720行)。AR1, AR2, AR30 は速度定数 (全衝突回数に対する有効衝突回数の割合に比例する値) と同一の値とすれば理解し易い。しかし実際の反応では速度定数は非常に小さいためコンピューター内で実行すると実行速度が遅くなる。このため見かけの値として AR1 を仮定し 1 回の反応で出来る反応産物量を $\text{NR1}=(\sqrt{\text{AV}} * \text{NE} * \sqrt{\text{AV}} * \text{NS})$ とした。ここで $\sqrt{\text{AV}} * \text{NE}$ および $\sqrt{\text{AV}} * \text{NS}$ はそれぞれ 1 回の反応にあずかる酵素量および基質量とした。その他の係数についても同様に定めた。これらの係数は実験に裏づけられた値としたいが不明のため仮の値とした。

阻害剤を入れた場合; 例えば競合型阻害剤を入れた場合の反応式は

であるから, K3 の反応は Program 2 の 1222 行, および K4 の反応は Program 2 の 1224 行を追加した。又, 不競合型 (un-competitive type) の場合は,

Program list 2.

```
1200 *ST1
1201 K=K+1
1212 IF RND<AR1 THEN NR1=NS*NE*AV: NES=NES+NR1: NS=NS-NR1: NE=NE-NR1
1214 IF RND<AR2 THEN NR2=NES*AW: NES=NES-NR2: NS=NS+NR2: NE=NE+NR2
1222 IF RND<AR3 THEN NR3=NI*NE*AV: NEI=NEI+NR3: NI=NI-NR3: NE=NE-NR3
1224 IF RND<AR4 THEN NR4=NEI*AW: NEI=NEI-NR4: NI=NI+NR4: NE=NE+NR4
1232 IF RND<AR5 THEN NR5=NI*NE*AV: NIE=NIE+NR5: NI=NI-NR5: NE=NE-NR5
1234 IF RND<AR6 THEN NR6=NIE*AW: NIE=NIE-NR6: NI=NI+NR6: NE=NE+NR6
1242 IF RND<AR7 THEN NR7=NS*NEI*AV: NEIS=NEIS+NR7: NEI=NEI-NR7: NS=NS-NR7
1244 IF RND<AR8 THEN NR8=NEIS*AW: NEIS=NEIS-NR8: NEI=NEI+NR8: NS=NS+NR8
1252 IF RND<AR9 THEN NR9=NES*NI*AV: NIES=NIES+NR9: NI=NI-NR9: NES=NES-NR9
1254 IF RND<AR10 THEN NR10=NIES*AW: NIES=NIES-NR10: NI=NI+NR10: NES=NES+NR10
1262 IF RND<AR11 THEN NR11=NEI*NI*AV: NIEI=NIEI+NR11: NI=NI-NR11: NEI=NEI-NR11
1264 IF RND<AR12 THEN NR12=NIEI*AW: NIEI=NIEI-NR12: NI=NI+NR12: NEI=NEI+NR12
1272 IF RND<AR13 THEN NR13=NIE*NS*AV: NIES=NIES+NR13: NS=NS-NR13: NIE=NIE-NR13
1274 IF RND<AR14 THEN NR14=NIES*AW: NIES=NIES-NR14: NS=NS+NR14: NIE=NIE+NR14
1282 IF RND<AR15 THEN NR15=NIE*NI*AV: NIEI=NIEI+NR15: NI=NI-NR15: NIE=NIE-NR15
1284 IF RND<AR16 THEN NR16=NIEI*AW: NIEI=NIEI-NR16: NI=NI+NR16: NIE=NEI+NR16
1292 IF RND<AR21 THEN NR21=NEIS*NI*AV: NIEIS=NIEIS+NR21: NI=NI-NR21: NEIS=NEIS-NR21
1294 IF RND<AR22 THEN NR22=NIEIS*AW: NIEIS=NIEIS-NR22: NI=NI+NR22: NEIS=NEIS+NR22
1710 IF RND<AR30 THEN NR30=NES*AW: P1=P1+NR30: NES=NES-NR30: NE=NE+NR30
1712 IF RND<AR31 THEN NR31=NEIS*AW: P1=P1+NR31: NEIS=NEIS-NR31: NEI=NEI+NR31
1720 IF K=KT THEN GOTO *EXIT2
1730 GOTO *ST1
```

であるから1252および1254行を追加した。但しEIおよびIESは、酵素作用がないものとする。以上のように阻害形式によってプログラム中に適時プログラムを追加した。

この「仮想反応槽」が実際の反応をどの程度再現しているかは疑問であるが、ES複合体の形成を基本にしたMichaelis-Menten式、あるいはLineweaver-Burk plotsに代表される阻害型の理論は、 $E+S \rightleftharpoons ES$ などの反応式を取り入れることで総て網羅することが出来る。 $E+S \rightleftharpoons ES$ などの個々の反応の実行は「反応の衝突理論」によっているが、これはコンピュータ内に構築した反応モデルを説明するのに便利であり、また実用上多くの実験事実を説明出来ることが証明されているため採用した。高分子である酵素の反応が衝突理論によって説明出来るとは直観的に受け入れ難いが、一般的な酵素反応速度論で扱うレベルの実験事実は充分説明することが出来る。また $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow ES'+P_1 \rightarrow E+P_2$ などの三段階機構が実験上証明された場合は順次反応式をプログラム中に追加していけばよいため実用上きわめて便利である。

酵素反応速度論において多く利用されている競合、非競合などの阻害形式の分類およびMichaelis-Menten式は共に基質量、阻害剤の量、ES複合体量が反応中不変と仮定して導かれたもので、必ずしも現実の阻害形式を網羅することは出来ない。実際の反応では1) EI複合体形成反応が不可逆である。2) 反応速度低下のため定常状態になりにくい。3) 生成物が反応を阻害する。4) 阻害が反応途中で何らかの原因で開始または停止する。などがしばしば見られる。このような理論式では表しにくい非定常状態の反応においても「仮想反応槽」は容易に再現することができ、実際の酵素反応に、より正確に近似させることが出来る。

実験結果および考察

1. 阻害剤無添加の酵素反応における反応成分の濃度変化

基質濃度 $NS0=80,000$ 、酵素濃度 $NE0=8,000$ 、測定時間 $KT=480,000$ 、 $AR1=0.8$ 、 $AR2=0.4$ 、 $AR30=0.1$ 、 $AV=4 \times 10^{-9}$ 、 $AW=0.00032$ の反応条件下の各成分の濃度変化をFig. 1に示した。図より基質と酵素は反応初期に急激に減少し酵素基質複合体を形成することが理解できる。又、反応産物はLag phase後増加している。この時の反応時間はストップドフロー装置を利用した高速反応解析によれば0.1秒以下といわれている。その後、複

Fig. 1 Time-courses of concentrations of ES complex and other components in a general enzyme reaction. The lower figure shows the magnified form of the upper chart at the initiation of the enzyme reactions. The reaction conditions were: $NS0=80000$, $NE0=8000$, $NI0$, $AR1=0.8$, $AR2=0.4$, $AR30=0.1$, $AV=3 \times 10^{-9}$, $AW=0.0032$

合体の濃度は安定し、過剰の基質存在下では一定となり定常状態となる。この時、反応産物は時間に比例して増加する。反応末期では基質が減少するために複合体量も減少し、その結果反応速度も低下している。

2. Zn添加が酵素反応に与える影響

ZnはALADの活性中心の-SH基に配位しているが、基質との結合に関与せず⁷⁾、-SH基の酸化を防いでいるといわれている¹⁾。しかし、Znをわずかに過剰に加えるとALADを阻害し始める^{3,5)}。阻害の強さはHg, スズ(Sn)に匹敵する³⁾。この反応系からZnを除くと、全く阻害は見られない⁶⁾。また阻害形式は非競合型阻害を示す^{3,5)}。これらの実験結果から以下のような反応機構を仮定し、この反応をProgram 2により実行した。

但し、ここではIをZnとする。

K3の反応は酵素の活性中心とZnが結合しEZn複合体を形成することを示す。この複合体中のZnは阻害剤として作用するのではなく活性中心の-SH基を酸化剤(例えば溶存酸素)から守っている。このためEI複合体に基質が衝突した場合、容易にEIS複合体を形成し、反応産物をつくる事が出来るものとする(K7の反応)。

Znは又酵素を保護するばかりでなく阻害する。この場合は酵素の活性中心以外にZnが結合したと見なし(IE), アロステリック効果により阻害するものとする(これをK5の反応とし、K3の反応で形成されるEIと区別する)。従って、このIE複合体は基質と結合してIESになっても(K13の反応)反応産物をつくることは出来ない。同様にES, EI, IE, EIS複合体にZnが結合したIES, IEI, IEIS複合体も(K9, K11, K15, K21の反応)同様に反応産物をつくることは出来ない。

以上の反応機構を満たすために以下の定数を設定した。見かけの反応速度定数AR1(K1の反応に対応する。以下同様)およびAR7は0.6, AR2およびAR8は0.5, AR30およびAR31は0.1とし、酵素にZnが結合する場合の見かけの反応速度定数AR3, AR5, AR9, AR11, AR13, AR15は0.3とした。逆反応のAR4, AR6, AR10, AR12, AR14, AR16は0.1とした。またその他の反応条件はNS0=80,000, NE0=8,000, KT=96,000, AV=2 $\times 10^{-8}$, AW=0.0016とした。これらの条件下で反応させ各成分の濃度変化をFig. 2に示した。Fig. 1と異なる点は酵素基質複合体ESが反応初期に明らかな極大値をとり、その後ESはIESと反応産物Pなどをつくり減少

Fig. 2 Time-courses of concentrations of various components in the inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) by zinc (I). The lower figure shows the magnified form of the upper chart at the initiation of the reaction. The reaction conditions were: NS0=80000, NE0=8000, NI0=40000, AR1=0.6, AR2=0.5, AR3=0.3, AR4=0.1, AR5=0.3, AR6=0.1, AR7=0.6, AR8=0.5, AR9=0.3, AR10=0.1, AR11=0.3, AR12=0.1, AR13=0.3, AR14=0.1, AR15=0.3, AR16=0.1, AR21=0.3, AR22=0.1, AR30=0.1, AR31=0.1, AV=2 $\times 10^{-8}$, AW=0.0016.

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots of inhibition of ALAD by zinc (Zn). The reaction conditions were: A; NI0=60000, B; NI0=40000, C; NI0=20000, D; NI0=0 and other parameters are the same as in Fig. 2.

していくことである。反応産物と複合体の濃度 P , IES , IEI の変化はいずれも Lag phase が存在している。EI 複合体は反応初期に極大がありその後減少していくが, Zn がアロステリック部位に結合した $Zn \cdot$ 酵素結合複合体 IES , IE , IEI は反応初期に極大値が存在しない。

同様の反応条件下で実験し Lineweaver-Burk plots を描き, Fig. 3 に示した。図に示した様に模擬実験においても非競合型阻害となった。この時の基質濃度 $NS0$ は 40,000, 80,000, 160,000, 320,000 で阻害剤濃度は 20,000, 40,000, 60,000 とした。但し Lineweaver-Burk plots の前提条件から $NS0$ と $NI0$ は反応中変化しないものとした。以上の結果より Zn に酵素の安定化と阻害という2つの作用が存在しても、非競合型阻害を示す場合が有り得ることが明らかとなった。

3. 溶存酸素存在下における Zn 添加の影響

ALAD は Zn を含み, しかも酵素活性測定時に Zn を添加すると活性が上昇することから従来金属酵素とされていた。例えば精製 ALAD に Zn を添加すると Fig. 4 の下図にみられる様に (N. Pespiaux らの報告²⁾ をグラフ化した) 低濃度では ALAD を活性化する。しかし濃度が高くなると ALAD を阻害しているのが観察される。この反応機構として低濃度では Zn が活性中心に配位し活性化し, 高濃度では他の部位に結合することにより阻害するという反応機構が受け入れ易い。しかし Zn は活性中心の $-SH$ 基を酸化から保護しているのみであると報告されている¹⁾。そこで Zn は低濃度では活性中心の $-SH$ 基に配位して阻害を保護し, 高濃度になると他の部位に Zn が結合し酵素を阻害するという機構が考えられる。しかし濃度によって結合部位が変わるというのは反応理論としては考えにくい。反応物質の濃度が高いということは速度定数は一定で単に反応速度が大きくなると考えるのが自然である。以上の前提条件によって以下の反応機構を想定した。

Zn 添加によって活性化するという事は, 溶液中に溶存酸素があり ALAD 酵素が常に酸素により阻害を受けていることが考えられる。そこで活性中心の $-SH$ 基が酸素 (O) により酸化を受け $-S-S-$ になり, 一部が酸化型酵素 (EO) となると仮定した。

また EO は基質と反応する以前に形成されていたと考えるのが自然であるからこの量を酵素量の $1/4$ とした。但し, この酸化型酵素量は反応速度定数によって最終的には一定値となるため必ずしも厳密に決定する必要はない。

Fig. 4 Agreement between the result from the "imaginary reaction box" (upper chart) and the experimental result of Despiaux, et al. (lower chart) for activation and inhibition effects of Zn concentrations. The reaction conditions were: $NS0=160000$, $NE0=8000$, $N0=16000$, $NE0=2000$, $AR1=0.6$, $AR2=0.5$, $AR3=0.7$, $AR4=0.1$, $AR5=0.3$, $AR6=0.1$, $AR7=0.6$, $AR8=0.5$, $AR9=0.3$, $AR10=0.1$, $AR11=0.3$, $AR12=0.1$, $AR13=0.3$, $AC14=0.1$, $AR15=0.3$, $AR16=0.1$, $AR17=0.15$, $AR18=0.01$, $AR19=0.7$, $AR20=0.05$, $AR21=0.3$, $AR22=0.1$, $AR30=0.1$, $AR31=0.1$, $AV=2 \times 10^{-8}$, $AW=0.0016$.

また, Zn は DTT 存在下で容易に酸化酵素を活性型の Zn 配位酵素 (EI , ここでは Zn を I とする。) に変換することができる¹⁾。

また, $K3$ の反応は Zn の活性中心へのアフィニティー効果を強調するためにアロステリック阻害による反応速度定数より高い値とした。これらの反応機構を満足させるために $AR3=0.7$, $AR17=0.15$, $AR18=0.01$, $AR19=0.7$, $AR20=0.05$, $NO0=16,000$, $NEO0=2,000$ の値を設定し, 他の係数は "2. Zn 添加が酵素反応に与える影響" における値と同一とした。この条件下で「仮想反応槽」内で反応を行い Zn の添加量の増加による ALAD 活性の変化をみると実測値ときわめてよく一致した (Fig. 4)。このことは Zn が低濃度においても常に阻害を起こしていると仮定しても矛盾しないことを示している。ま

たこの仮想反応実験により Zn による ALAD の活性化と阻害という 2 つの反応機構が、活性中心と阻害部位に配位する Zn の反応速度定数の差のみにより説明出来ることが明らかとなった。

ヒトの赤血球中には Zn が 0.2 mM ほど存在し、またヘモグロビンから遊離する酸素もある。これらが ALAD の活性発現に深くかかわっており、特に Zn は活性発現と阻害の両方の作用があるためその阻害機構は複雑である。ここで示した仮想実験によれば Zn は活性中心ばかりでなくアロステリック部位にも結合し、その結合は酵素単独にも ES 複合体にも等しく結合して阻害することを示している。またアロステリック部位に結合する Zn の速度定数は活性中心に結合する場合より小さい。このように反応液の Zn 濃度および溶存酸素濃度は活性発現に微妙に影響するため酵素活性測定時には充分注意を要する。また実験を行う上で各成分の濃度と速度定数についてあらかじめ知ることは重要であるが仮想実験によってこれらの相対的関係を知ることが出来た。

4. Pb 添加が酵素反応に与える影響

Pb は ALAD を最も強力に阻害する重金属として知られている。その阻害機構は活性中心にある -SH 基をブロックし酵素・基質反応を阻害するためとされている¹⁾。この機構のみによって阻害を受けるとすると競合型阻害になる。しかし実際の反応では混合型阻害^{3,5)}でしかも反応系から Pb を除き Zn と DTT を加えると完全に元の活性に回復する⁶⁾。これらの条件を満たす反応として以下の反応を仮定した。

反応の組合せは Zn の場合と同一とする。従って K1~K31 の反応は同じ意味を持つものとする。Pb は強力な阻害剤であるから AR3 を 0.8 (K3 の反応) とした。但し Zn と異なり EI 複合体は基質と反応することはできない。従って AR7, AR21, AR31 は共に 0 である (K7, K21, K31 の反応)。また活性中心以外の部位にも Pb は結合し、アロステリック効果により酵素活性がなくなると仮定した。この時の見かけの反応速度定数 AR5 は AR3 より非常に遅いものとし 0.2 とした (K5 の反応)。EI, ES 複合体は共に Pb と活性中心以外の部位と結合するものとし、この時の見かけの反応速度定数 AR9, AR11 は共に AR5 と同一の 0.2 とした (K9, K11 の反応)。IE 複合体は活性中心の -SH 基が未反応で残っているため、基質が結合出来るものとし、見かけの速度定数 AR13 は AR1 と同じ 0.6, AR14 は 0.5 とした (K13, K14 の反応)。但しアロステリック部位に Pb が結合した酵素 IE は反応産物を生成することが出来ないものとし

た。また IE 複合体は同様に活性中心に -SH 基が存在しているため Pb と結合することが出来、その時の見かけの速度定数 AR15 は AR3 と同一の 0.8 とした。また可逆的に Pb は結合しているので、見かけの反応速度定数 AR6, AR10, AR12 を 0.1 とし AR4, AR16 を 0.2 とした。基質量は NS0=160,000 として、その他の反応条件は Zn の場合と同一としそれぞれ NE0=8,000, KT=96,000, AV=2*10⁻⁸, AW=0.0016 とした。以上の反応条件下で「仮想反応槽」(Program 2) で実験し、各反応物質の濃度変化を Fig. 5 に示した。図に示したように、まず酵素基質複合体 ES が急激に出来るが反応産物と IES 複合体形成のために消費され減少していく。酵素・Pb 複合体 EI は Pb が阻害力が強いと仮定しているため急激に上昇しているのが特徴である。

同一の反応条件下で実験し Lineweaver-Burk plots を描き結果を Fig. 6 に示した。図にみられるように阻害形式は混合型となった。一点に集中していないのは Pb

Fig. 5 Time-courses of concentrations of various components in the inhibition of ALAD by lead (I). The lower figure shows the magnified form of the upper chart at the initiation of the reaction. The reaction conditions were: NS0=160000, NE0=8000, N10=40000, AR1=0.6, AR2=0.5, AR3=0.8, AR4=0.2, AR5=0.2, AR6=0.1, AR7=0.0, AR8=0.0, AR9=0.2, AR10=0.1, AR11=0.2, AR12=0.1, AR13=0.6, AR14=0.5, AR15=0.8, AR16=0.2, AR30=0.1, AV=2*10⁻⁸, AW=0.0016.

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of inhibition of ALAD by lead (Pb). The reaction conditions were: A: $NI_0=60000$, B: $NI_0=40000$, C: $NI_0=20000$, D: $NI_0=0$ and other parameters are the same as in Fig. 5.

の阻害が大きいため反応産物が少なくバラツキが大きくなったためと思われる。以上の結果より活性中心に結合する Pb の反応速度が大きくアロステリック部位に結合する Pb の反応速度が非常に小さい時に、混合型阻害を示す場合があり得ることが認められた。

5. Hg 添加が酵素反応に与える影響

Hg は -SH 基に強力に結合する重金属として知られているが Pb より ALAD に対する阻害力は小さい^{2,3)}。 10^{-9} モル濃度で比較すると Pb の $1/9$ 程度の阻害力である³⁾。しかし反応系から Hg イオンを除き、さらに結合している Hg を遊離させるために DTT, EDTA 等で ALAD を処理しても 50% ほど活性が回復するのみである⁶⁾。これは Hg が ALAD に結合し、不可逆的変性を起こしたことを示している。しかし Hg は Lineweaver-Burk plots において競合型阻害を示す³⁾。

これらの条件を満たす反応としていろいろな反応様式が考えられるが競合型阻害という条件を満たすために非常に限られたものとなった。現在この「仮想反応槽」により得られた反応形式は活性中心に結合する Hg は基質の妨害のため非常に遅く、但し結合すると不可逆的に遊離することはないというものである。活性中心以外に Hg は結合しアロステリックな効果を示すものもあり得ると思われるが混合型又はその他の阻害型となり Y 軸上に交点を結ぶ反応型は得られなかった。ここで示す反応条件は活性中心と結合する Hg の見かけの反応速度 AR_3 を 0.02 とし、その他の阻害にかかわる反応速度は全て 0 とした。勿論、不可逆的であるから AR_4 は 0 とし

Fig. 7 Time-courses of concentrations of various components in the inhibition of ALAD by Mercury (I). The lower figure shows the magnified form of the upper chart at the initiation of the reaction. The reaction conditions were: $NS_0=80000$, $NE_0=8000$, $NI_0=40000$, $AR_1=0.6$, $AR_2=0.5$, $AR_3=0.02$, $AR_4=0$, $AR_{30}=0.1$, $AV=2 \times 10^{-8}$, $AW=0.0016$.

た。その他の基質量、酵素量等の条件は Zn の反応条件と同一とし、得られた結果を Fig. 7 に示した。不可逆であるため EI 複合体は直線的に上昇している。このため ES 複合体が常に減少し、定常状態が存在せず常に反応速度が変化している。また阻害力が弱いいため Pb と Zn の阻害と比べ反応産物の生成速度は早い。

同一の反応条件下で実験し同様に Lineweaver-Burk plots をとり Fig. 8 に示した。この条件下で反応時間 60,000 後の酵素の不可逆的失活量は

$NI_0=2,000$, $NS_0=40,000$ の時 25%

$NI_0=4,000$, $NS_0=40,000$ の時 45%

$NI_0=6,000$, $NS_0=40,000$ の時 61% であった。

以上の結果は Hg のように不可逆的阻害剤であっても、その反応速度定数がある特定の値の時、競合型阻害形式を示す場合もあり得ることを示唆している。また Hg の阻害力がもっと強い場合、すなわち AR_3 の値が 0.02 以上とすると、競合型阻害とはならず Y 軸の右側で交点を結ぶ。実際に Hg の阻害力が Pb に劣らず強いとする報告例もある⁴⁾。この条件を満足させしかも競合型阻害で有り得るためには阻害の一部が可逆的と考えなければな

Fig. 8 Lineweaver-Burk plots of inhibition of ALAD by mercury (Hg). The reaction conditions were: A; $NI0=60000$, B; $NI0=40000$, C; $NI0=20000$, D; $NI0=0$ and other parameters are the same as in Fig. 7.

Fig. 9 Lineweaver-Burk plots of inhibition of ALAD by mercury (Hg) on irreversible and reversible inhibition mechanisms. The reaction conditions were: A; $NI0=60000$, B; $NI0=40000$, C; $NI0=20000$, D; $NI0=0$, $AR3=0.02$, $AR4=0.0$, $AR5=0.3$, $AR6=0.1$ and other parameters are the same as in Fig. 7.

らない。すなわち結合部位によって可逆、不可逆の両方が存在すると仮定すると競合型で不可逆しかも阻害力が強いという矛盾する結果を満足することが出来る。例えば Hg が活性中心に結合した場合 (EI) は不可逆で、アロステリック部位に結合した場合 (IE) は可逆と仮定し、 $K5$ および $K6$ の見かけの反応速度定数 $AR5$, $AR6$ をそれぞれ 0.3 , 0.1 とした。この条件下で「仮想反応槽」で実験し、Lineweaver-Burk plots を描くと不可逆的阻

害のみと比べ傾きが増し阻害力が増加していることが示されている (Fig. 9)。また Y 軸上で交点を結び競合型阻害の条件をも満たしている。

以上、非競合型、競合型、混合型と代表的な ALAD の阻害形式について検討し、反応機構を予測した。これらの反応機構が実際の ALAD 阻害機構を直接証明するものではない。これを裏づける実験も必要であろう。しかしここで示した反応機構が実験で得られた結果を矛盾なく説明出来ることから、この反応仮説を否定することは出来ない。現実の反応は阻害剤の結合部位によって阻害力が異なると考えられる。しかし結合部位による阻害力の差は現在実験的には殆ど証明されるに至っていない。この「仮想反応槽」では結合部位による差は結合量によって補正されていることになる。このように「仮想反応槽」は反応を直接再現していない場合もある。従って今後とも新しい事実が判明した場合はその結果を順次追加し、より現実の反応に近づけていくことが必要である。しかし「仮想反応槽」は反応にかかわる各種の反応成分を取り出すことが出来ること、また反応式を可能な限り追加していくことが出来るため実験では得られない利点もある。例えば Fig. 4 では Zn 濃度に対して酵素活性を「仮想反応槽」から取り出し、実験結果と極めて一致した値を得ているが、この反応時の酵素・Zn 複合体、酵素・酸素複合体、溶存酸素量など実験を行わずして知りたい成分を取り出しグラフ化することが出来る。また *in vitro* の実験では個々の酵素の阻害機構を知ることが出来るが、酵素の集まりである代謝系に対してどのような影響を与えるか予測が困難である。「仮想反応槽」では実験的に得られた個々の酵素の基本データを基にして一連の代謝系を組み立て、阻害の影響を代謝系全体として予測が可能となる。

環境化学物質の低濃度長期暴露が問題になるにつれ生体影響の指標は臨床的な症状から酵素阻害など生体内での作用機作へと対象が移りつつある。このような生体内の複雑な反応を実験的に証明していくにはその反応予測が必須であり、その予測が正しいかをシュミレーションによりあらかじめ検証できれば労力と時間を効率よく使用することが出来る。酵素を阻害する物質は Hg, Pb などの重金属ばかりでなく農薬、排気ガスに含まれる有機化合物等が環境中に多数存在している。これら多くの物質の人体への影響を知るために過去に求められた基礎的なデータを基にして予測していくことは実験の効率化にきわめて有用であり、今回提示した「仮想反応槽」はその有効な一手段となり得ると考えている。

要 約

ALADの金属による阻害機構を解明するためにコンピュータ内に「仮想反応槽」を構築した。この「仮想反応槽」は見かけの酵素、基質、阻害剤を入れ、任意に決めた見かけの反応速度定数を設定するとそれぞれの反応条件に対応した反応成分の濃度変化をプリントアウトすることが出来る。この反応槽を利用して、ALADに対するZn, Pb, Hgの阻害機構を検討した。これらの金属とALADが「仮想反応槽」内で、酵素・活性中心阻害剤複合体(EI), アロステリック阻害剤・酵素複合体(IE), アロステリック阻害剤・酵素・基質複合体(IES), アロステリック阻害剤・酵素・活性中心阻害剤複合体(IEI)などの複合体を形成し、また逆反応も含め約20種類の反応が起きると仮定した。

その結果, *in vitro*の実験では一見、矛盾ある結果が得られていたが、これらの結果を満足する反応機構があり得ることが明らかとなった。

この「仮想反応槽」は酵素阻害剤の反応機構ばかりではなく、代謝系における阻害剤の影響、Michaelis-Menten式では扱うことが出来ないアロステリック制御、アロステリック阻害など、生体内での酵素阻害の作用機作を予測すると同時に、それらの実験の効率化に今後有効な手段となり得ると思われる。

謝 辞

本研究に当り種々御指導と御助言を頂きました順天堂大学の菊池正一教授、千葉百子講師に心から感謝致します。

す。

文 献

- 1) Tsukamoto, I., Yoshinaga, T. and Sano, S.: The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in δ -aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **570**, 167-178 (1979).
- 2) Despau, N., Bohuon, C., Comoy, E. and Boudene, C.: Postulated mode of action of metals on purified human ALA-dehydratase, *Biomedicine*, **27**, 358-368 (1977).
- 3) 藤本暢子, 千葉百子, 菊池正一: ヒト赤血球より単離した δ -アミノレブリン酸脱水酵素活性に対する金属イオンの影響, *日衛誌*, **39** (1), 498 (1984).
- 4) 藤田博美, 吉永保夫, 佐野晴洋: δ -ALADの精製と性質, *日衛誌*, **33** (1), 151 (1978).
- 5) Anderson, P.M. and Desnick, R.J.: Purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase of human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **254** (15), 6924-6930 (1979).
- 6) 深野駿一, 千葉百子: 重金属による δ -Aminolevulinic Acid Dehydrataseの阻害機構の解明 I. 固定化酵素の利用, *日衛誌*, **43**, 一 (1988).
- 7) Bevan, D.R., Bedlanender, P. and Shemin, D.: Mechanism of porphobilinogen synthase, *J. Biol. Chem.*, **255** (5), 2030-2035 (1980).

(受付 1987年8月10日 受理 1987年12月2日)