総説

カーバメイトの AChE 阻害定数の測定

西岡孝明, 藤田稔夫, 中島 稔

京都大学農学部農芸化学科
京都市左京区北白川追分町
(昭和51年4月2日受理)

Kinetic Constants for the Inhibition of AChE by Phenyl Carbamates

Takaaki NISHIOKA, Toshio FUJITA and Minoru NAKAJIMA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan*

Experimental procedures and conditions for determination of kinetic constants of AChE inhibition by phenyl carbamate insecticides are reviewed. Experimentally determined dissociation equilibrium constant of the enzyme-inhibitor reversible complex, K_d , and the first order rate constant for the carbamylated enzyme formation, k_2 , are shown to depend on the concentration of inhibitors in currently used procedures such as the Main method and the Hart and O'Brien's procedure in the presence of chromogenic substrate. The apparent K_d and k_2 values are virtually reproducible regardless of the procedures, if similar carbamate concentrations are used for the determination. Assuming that the further binding of carbamate molecules to the reversible complex and/or the carbamylated enzyme is significant with high inhibitor concentrations, "true" constants K_d and k_2 are obtainable with a rather low carbamate concentration range whose product by k_1 is of the order of $0.2-1.0 \text{ min}^{-1}$. For the decarbamylation rate constant k_3 which is usually determined upon dilution of the reaction mixture, the dilution factor should be selected according to the magnitude of K_d and k_2 and to the inhibitor concentration.

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) の阻害剤カーバメイトによる基本的な阻害反応過程は Scheme 1 であらわされる¹⁻⁷⁾。カーバメイト (CX) は AChE (E) と最初速やかにカーバメイト酵素複合体 (ECX) を形成し、ついで安定なカルバミル化 (またはカルバモイル化) 酵素 (EC) を形成する (カルバミル化反応)。このカルバミル化酵素はきわめてゆっくりではあるが、カルバミン酸 (C) と AChE (E) にまで加水分解され (脱カルバミル化反応)、AChE は反応系を1回転したことになる。 $K_d = k_{-1}/k_1$ は「迅速平衡の仮定」に基づく解離平衡定

数である⁸⁾。カルバミル化速度定数 k_2 であらわされる過程は、酵素活性部位のカルバミル化反応と脱離基 X (アルコールやフェノール) の脱離過程をふくんでいる。

このようにカーバメイトは AChE の「基質」として加水分解をうけるのであるが、本来の基質であるアセチルコリン (ACh) や合成基質 phenyl acetate が加水分解反応をうける場合にくらべて、 k_2 や k_3 がきわめて小さく、かつ脱カルバミル化律速 $k_2 \gg k_3$ であることによりカルバミル化酵素が蓄積し、カーバメイトは非可逆的阻害剤として作用する。

カーバメイトのカルバミン酸部分が等しければ、アルコール部分の種類によらず生成するカルバミル化酵素は同じであり、脱カルバミル化速度定数 k_3 はすべて等しい¹⁾。したがって置換基の異なる substituted phenyl methylcarbamate のように、アルコール部分が異なるカ

$$K_d = k_{-1}/k_1$$

Scheme 1

ーバメイトの阻害力の違いは、反応定数 K_d , k_2 の違いによるものであり、 K_d が小さくて k_2 の大きな——すなわち $k_2/K_d=k_1$ の大きな——カーバメイトほど強い阻害活性を示すことになる。

従来カーバメイトの阻害活性を比較するために、しばしば用いられてきた I_{50} 値 (AChE 活性を 50% 阻害するカーバメイト濃度) は、阻害反応時間、基質 ACh 濃度や反応定数 K_d , k_2 , k_3 の複雑な関数としてあらわれ、反応定数が分離されていない値であって、構造活性相関の研究目的には必ずしも適当な値であるとはいえない。

反応定数 K_d と k_2 をそれぞれ分離して評価するのに、これまで「Main プロット」と呼ばれる方法が用いられてきた。しかしこの方法で測定された K_d と k_2 値は、正確さや信頼性において不十分な値であることが指摘されている⁹⁾。たとえば Sevin による

仔牛赤血球 AChE 阻害反応において $K_d=10.6 \mu\text{M}$, $k_2=1.33 \text{ min}^{-1}$ (pH 7.0, 38°C)¹⁰⁾ あるいは $K_d>5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $k_2>20 \text{ min}^{-1}$ (pH 7.6, 25°C)¹¹⁾ と互いにまったく異なる値が報告されている。また ECX 複合体の安定性 (K_d) あるいはカルバミル化速度 (k_2) のどちらが substituted phenyl methylcarbamate 類の阻害活性の違いを決定しているのかを調べる目的で、O'Brien らは 8 種類の置換体について K_d と k_2 を測定し、 K_d 値が置換基とともに大きく変化する 17.9 mM (未置換体)~3.4 μM (*m*-iso Pr) のにくらべて、 k_2 値はほとんど変化しない 3.00 min^{-1} (*m*-CF₃)~1.05 min^{-1} (*o*-O iso Pr) ことから、カーバメイトの阻害活性の強さの変化は、ECX 複合体の安定性の変化のみによって支配されているものと結論した¹⁰⁾。一方 Hastings らは 5 種類の置換体について測定した結果、 K_d 値 23.7 mM (未置換体)~3.0 μM (eserin), k_2 値 80.7 min^{-1} (*m*-iso Pr)~0.45 min^{-1} (*m*-NO₂) のように K_d , k_2 値ともに置換基の変化とともに大きく変わることから、これらカーバメイトの阻害活性の違いは ECX 複合体の安定性のみならず、カルバミル化速度の違いにも依存しているものと考えた¹¹⁾。

従来、阻害活性の指標とされてきた I_{50} 値が測定条件や酵素標品の違いにもかかわらず信頼性を備えた値である⁹⁾ ことを考慮すれば、これまでに測定された K_d や k_2 値における正確さや信頼性の問題は、Scheme 1 より「Main プロット」の関係式を導く際に設定された前提条

件や制約が、実験的に満足されていないことに起因するものと推定される。本総説ではカーバメイトの AChE 阻害反応における反応定数 K_d , k_2 , k_3 の測定法を統一的な酵素反応速度式に基づいて概観し、目的とする反応定数を測定するための方法や実験条件について考察する。

カルバミル化反応の速度式

カーバメイトが AChE の「基質」として加水分解される過程をまず考えてみよう。加水分解により生成する脱離基 X を時間とともに記録すれば、Fig. 1 で示されるように最初 X は速やかに生成し、ついで一定速度で生成する biphasic な曲線が得られる¹²⁾。Scheme 1 において、

① 最初の段階 $E+CX \rightleftharpoons ECX$ の平衡が速やかに達成される、 $K_d=[ECX]/[E][CX]$ 。[迅速平衡の仮定]。

② カーバメイト濃度は反応中変化しない、 $[CX]=[CX]_{t=0}$ 。

の二つの仮定を設けると、反応開始後 t 時間までに生成した脱離基の濃度 $[X]_t$ は (1) 式であらわされる^{8,13,14)}。

$$[X]_t = pt + q[1 - \exp(-bt)] \quad (1)$$

$$p = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [E]_0 [CX]}{[CX] + \frac{K_d k_3}{k_2 + k_3}}, \quad q = [E]_0 \frac{\left(\frac{k_2}{k_2 + k_3}\right)^2}{1 + \frac{K_d k_3}{k_2 + k_3} \frac{1}{[CX]}}$$

$$b = k_3 + \frac{k_2}{1 + \frac{K_d}{[CX]}}, \quad [E]_0 \text{ は全酵素濃度}$$

(1) 式において十分な時間が経過すれば $t \rightarrow \infty$, $\exp(-bt) \rightarrow 0$ となるので、(2) 式であらわされる直線関係が得られる。この状態は定常状態 (steady state) と呼ばれ、Fig. 1 に示された曲線の直線部分に対応する。

$$[X]_{\infty} = pt + q \quad (2)$$

(1) 式において、 $k_2 k_3 [E]_0 / (k_2 + k_3) = V_{\text{max}}^{\text{CX}}$, $K_d k_3 / (k_2 + k_3) = K_m^{\text{CX}}(\text{app})$ とおきかえると p は (3) 式のようにあらわされる。

Fig. 1 Time course of leaving group production $[X]_t$.

$$p = \frac{V_{\max}^{\text{CX}} [\text{CX}]}{[\text{CX}] + K_m^{\text{CX}} (\text{app})} \quad (3)$$

Fig. 1 における直線部分の傾き p の逆数値を、カーバメイト濃度の逆数値に対してプロットすれば、Lineweaver-Burk プロットが得られる。このプロットの切片からカーバメイト加水分解の最大速度 $V_{\max}^{\text{CX}}$ と「見かけの」Michaelis 定数が求められる。酵素濃度 $[E]_0$ と k_3 とが既知であれば、これらの値から反応定数 K_d と k_2 値を求めることが可能である。

$k_2 \gg k_3$ と $[\text{CX}] \gg K_d k_3 / (k_2 + k_3)$ の両条件が満たされるとき、 q は $[E]_0$ に等しくなる。このとき (2) 式であらわされる Fig. 1 の直線部分を $t=0$ に外挿した切片値 q から酵素濃度——正確には活性部位濃度——が決定される^{7,15)}。

カーバメイトと AChE とを反応させたとき、反応開始後しばらくの間、 $[X]_t$ は指数関数的に増加する (Fig. 1)。この状態は前定常状態 (presteady state) と呼ばれる。 p や q とは異なって (1) 式の指数関数部 $\exp(-bt)$ の定数 b には、酵素濃度 $[E]_0$ が含まれておらず、また次のようにして比較的容易に求めることができるので、 b は酵素濃度が未知の酵素標品について反応定数を決定しうる唯一のパラメーターである¹⁴⁾。(2) 式と (1) 式との差をとれば $q \exp(-bt)$ が残ることを利用して、Fig. 1 に示された曲線と、(2) 式によりあらわされる直線を $t=0$ のほうに外挿した値との差 $\Delta[X] (=q \exp(-bt))$ をとり、一次反応式に従う片対数プロットをおこなえば b が得られる^{13,14)}。定数 b を精度よく求めるためには、反応の前定常状態から定常状態にいたるまでを正確に追跡することができなければならない。

ところでこれら反応過程を詳しく追跡するための実験条件として酵素濃度が十分高くなければならない。しかし AChE は分離精製の操作に対してきわめて不安定であり、電気ウナギ発電器官 AChE の場合を除いて十分に酵素濃度の高い標品を得ることがむずかしい⁷⁾。他のエステラーゼ類にくらべて、AChE 触媒反応を厳密に速度論的な取り扱いをすることがむずかしいのは、酵素濃度が低いことによるものであり、この点を克服するためにさまざまな工夫が試みられており、それらが AChE 阻害反応研究の特徴となっている。

特殊なカーバメイトを用いた反応定数の測定

酵素濃度の低いことを補うために特殊なカーバメイトを使って、脱離基の生成を感度よく測定した例がいくつか報告されている。

たとえばフェノール部分を ^3H 標識した 3,5-diisopropyl-

phenyl methylcarbamate を用いて生成する 3,5-diisopropylphenol を液体シンチレーションカウンタにより測定する方法や¹⁰⁾、2-cyano-あるいは2-nitrophenyl dimethylcarbamate のように生成するフェノールが大きな紫外吸収係数を持っていることを利用して、定常状態を追跡する方法^{15,16)}などである。いずれの実験においても (2) 式に従う定常状態が観察され、脱離基生成直線の切片 q から酵素濃度 $[E]_0$ が測定された。しかしこれらのカーバメイトにおいても脱離基の分光学的感度が、前定常状態における反応の追跡をおこなうにはまだ十分に高くないので、 K_d と k_2 の分離、測定には適当ではない。

Rosenberry and Bernhard は hydroxyquinolinium の zwitterion が蛍光を発することに着目して 1-methyl-7-dimethylcarbamoyloxyquinolinium iodide と電気ウナギ発電器官 AChE との

前定常状態における反応過程を精度よく追跡することに成功した¹²⁾。その結果次のことが明らかにされた。

① 4 個のサブユニットより構成されている AChE^{7,17)} 1 分子あたり 3.9 個のカルバミル化部位が存在する。すなわち、サブユニット 1 個あたり 1 個の活性部位が存在する。

② (1) 式における定数のうち、 b は反応中変化しない。このことは反応定数 K_d 、 k_2 、 k_3 が反応中一定であり、カルバミル化をうけたサブユニットと受けていないサブユニットとの間に特殊な相互作用が存在していないことを意味している。

③ このカーバメイトの反応定数は $K_d = 10.2 \mu\text{M}$ 、 $k_2 = 5.06 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_3 = 0.0254 \text{ min}^{-1}$ と決定された。

④ 基質 ACh の拮抗阻害剤 (choline chloride, 1-naphthol, 1-methyl-5-hydroxyquinolinium iodide) はこのカーバメイトに対しても阻害作用を示し、その拮抗阻害定数は ACh に対する拮抗阻害定数に等しい。

⑤ これらの阻害剤は遊離の酵素 E のみならず、カルバミル化酵素 EC と結合して複合体 $\text{EC} \cdot \text{CX}$ を形成する。

ここに述べた方法は、比活性の高い酵素標品を比較的多量に、しかも特殊な脱離基を構成成分とするカーバメイトを用いた反応に限られた特殊な方法であり、他のカーバメイトや酵素標品には適用できない。

基質 acetate 類の AChE による加水分解反応を indicator とする測定

酵素が Scheme 1 で示された反応過程を一定時間あたり何回回転するのかを表わす指標として turnover number が用いられる⁸⁾. $\text{turnover number} = V_{\max}/[E]_0$, turnover number の大きな基質ほど単位酵素あたりの脱離基生成速度が大きくなる. ACh や phenyl acetate の電気ウナギ発電器官 AChE による加水分解反応では $\text{turnover number} = 0.9 \sim 1.72 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ ^{7,12,16,18-22)} ときわめて大きい, メチルあるいはジメチルカーバメイトでは後述するように $\text{turnover number} = k_3 = 1 \sim 2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ^{23,24)} ときわめて小さく, acetate 類のほぼ $1/10^8$ にすぎない.

したがってカーバメイトと AChE との反応過程を, 脱離基の生成を指標にして直接観察する方法にくらべて, turnover number の大きな ACh や phenyl acetate をこの反応系に加えてこれら acetate の加水分解反応速度の変化を観測すれば, カーバメイトとの反応を 10^8 倍拡大して観察することができる. このように基質 ACh や phenyl acetate の AChE による加水分解反応をとおして, カーバメイトと AChE との反応過程すなわち阻害反応過程を間接的に観察すれば, 酵素濃度の低いことやカーバメイトの反応速度の低いことによる実験の困難さを克服することができる. 以下に述べる反応定数の測定法は, いずれもこの性質を利用したものである.

Main プロットによる反応定数の測定²⁾

カーバメイトと AChE とを一定時間反応させた後に, 十分高濃度の ACh や phenyl acetate——以後は「基質」とあらわす——を加えると, AChE による基質の加水分解速度 v_t はカルバミル化されていない酵素の濃度 $[E] + [ECX] = [E]_0 - [EC]$ に比例する. ここに $[E]_0$ は全酵素濃度であり, 十分に高濃度の基質とは, 基質を加えたときに反応系のカーバメイト酵素複合体の濃度 $[ECX]$ を, $[E]_0 - [EC]$ にくらべて無視しうような基質濃度のことである. このとき, 加水分解反応のカーバメイトによる阻害はカルバミル化酵素濃度 $[EC]$ に比例する.

(1)式を導く際に仮定した2条件の下で, Scheme 1 にもとづいて $[EC]$ は (4) 式のようにあらわされる. t は AChE とカーバメイトとの反応時間である.

$$[EC] = \frac{a}{b} [E]_0 \{1 - \exp(-bt)\} \quad (4)$$

$$a = \frac{k_2}{1 + K_d/[CX]} = b - k_3$$

Fig. 2 Time course of residual enzyme activity.

$t=0$ における基質の加水分解速度 v_0 は全酵素濃度 $[E]_0$ に比例することより, (5)式の関係が導かれる (Fig. 2).

$$\frac{v_t}{v_0} = \frac{[E]_0 - [EC]}{[E]_0} = \frac{k_3 + a \exp(-bt)}{b} \quad (5)$$

(5)式はカーバメイトと AChE との反応生成物と, 基質の加水分解速度との関係を示す式である. (5)式の右辺には酵素濃度 $[E]_0$ の項が含まれていない. k_3 を他の項とくらべて無視しうような実験条件を設定して, 反応定数 K_d と k_2 とを決定しようとするのがこの方法の特徴である.

条件 $k_3 \ll a \exp(-bt)$ を満たすように反応時間 t とカーバメイト濃度 $[CX]$ とを選ぶと, (5)式は次の(6)式のように k_3 を含まない一次反応速度式であらわされる.

(4)式における a の定義から (7)式が導かれ, $t/\ln(v_0/v_t) = 1/a$ と $1/[CX]$ を両軸にプロットすれば, 傾きと切片の値から K_d と k_2 が決定される²⁾.

$$\frac{v_t}{v_0} = \exp(-at) \quad (6)$$

$$\frac{1}{a} = \frac{t}{\ln(v_0/v_t)} = \frac{K_d}{k_2[CX]} + \frac{1}{k_2} \quad (7)$$

この方法が有効であるためには, 次の2条件が実験的に満足されることが必要である²⁵⁾.

① $\ln(v_t/v_s)$ と t とのプロットが $t=0$ において, 0 を通らなければならない. ここで v_s はカーバメイトが存在しないときの基質加水分解速度である. このような条件が満足させられるとき, v_t 測定に際して $[ECX]$ を $[E]_0 - [EC]$ にくらべて無視することができ, v_t 測定中にもはやそれ以上カルバミル化反応が進行しない.

②最初の t 時間内は, 阻害反応が一次反動的に進行しなければならない. すなわち $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が成立し, $\ln v_t/v_s$ と t との片対数プロットが直線にならねばならない. Fig. 3 に 3-isopropylphenyl methylcarbamate による仔牛赤血球 AChE 阻害反応におけるプロット例

Fig. 3 First order inhibition of AChE with 3-isopropylphenyl methylcarbamate.

を示す²⁴⁾。高濃度 $[CX]=1.66 \mu M$ の場合を除いて反応開始後 3 分間は、片対数プロットが直線になっていることから、 $t=3$ 分以内であれば $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が満足されている。

実測値 $K_d=5.55 \mu M$, $k_2=3.13 \text{ min}^{-1}$, $k_3=0.022 \text{ min}^{-1}$ ²⁴⁾ を用いて $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が成立するためのカーバメイト濃度 $[CX]$ と反応時間 t との関係を計算してみよう。 $[CX]=0.33 \mu M$ では $t=1, 2, 3, 5$ 分において $a \exp(-bt)=0.145, 0.119, 0.097, 0.065 \text{ min}^{-1}$, $[CX]=1.66 \mu M$ では $a \exp(-bt)=0.343, 0.163, 0.078, 0.018 \text{ min}^{-1}$ となる。5 分後あるいは高濃度では 3 分後に、 $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が満足されなくなることがわかる。

$[CX]$ が高濃度になれば反応時間 t を短くしなければならぬし、そのために特殊な反応容器が考案されている²⁵⁾。このように片対数プロットで直線性を確かめるのみならず、得られた反応定数 K_d, k_2 値を用いて計算によっても $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が成立しているのかどうかを確かめるべきであろう。

有機リン酸エステルではカーバメイトにくらべて、脱リン酸化速度定数 k_3 がきわめて小さい、 $k_3 \approx 0$ 、ので²⁶⁾十分に長い時間にわたって $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が満たされ、片対数プロットも直線性

が保たれることになる。しかし Tetram による AChE 阻害反応では半対数プロット

が、反応開始後しばらくで直線とはならず曲線になる例が報告されている^{27,28)}。これらの酵素標品には数種類の AChE が混在しているとする gel electrophoresis や affinity chromatograph による分析結果²⁷⁾と関連づけて、

これら片対数プロットの曲がりは、リン酸化速度定数 k_2 の異なるいくつかの AChE が混在することによるものと説明されている^{27,28)}。

また電気ウナギ発電器官 AChE やイェバエ頭部の AChE 標品とカーバメイト eserine との反応において

も、片対数プロットにおける直線性からのずれより、O'Brien らは $k_1=k_2/K_d$ 値が 1.9~2.1 倍異なる 4~5 種類の AChE が存在するものと報告している²⁹⁾。

しかしこの「Main プロット」による実験法では酵素標品の不均一性によって、 $\ln(v_i/v_s)$ と t との片対数プロットの直線性が失われるのか、あるいはまたリン酸化酵素の aging などにより見かけの k_3 が大きくなった³⁰⁾、カーバメイトでは脱カルバミル化反応が寄与することによって、直線性が失われるのかを区別することが一般に困難である。酵素標品の不均一性による反応定数の違いを調べるためには、後述する「基質共存下の方法」における片対数プロットの直線性を調べるのが適している。

定常状態における測定^{3,24)}

カーバメイトと AChE との反応が定常状態に至れば (Fig. 2), (4)式において $t \rightarrow \infty$, $[EC] \rightarrow a[E]_0/b$ になることから (8) 式の関係が得られる。

$$\frac{[E]_0 - [EC]_\infty}{[EC]_\infty} = \frac{v_\infty}{v_0 - v_\infty} = \frac{k_3 K_d}{k_2} \frac{1}{[CX]} + \frac{k_3}{k_2} \quad (8)$$

v_∞ は定常状態における基質加水分解速度をあらわす。 k_3 値が既知であれば $v_\infty/(v_0 - v_\infty)$ の $1/[CX]$ に対するプロットの傾きと切片より K_d, k_2 値が得られる。しかしこのプロットの切片値が十分な信頼性をもって得られるようなカーバメイト濃度 $[CX]$ では、定常状態において反応系に存在する全酵素の 96~99% がカルバミル化酵素 EC であり、 v_∞ 測定に際して加えられる基質によって定常状態が成立しなくなる。すなわち脱カルバミル化反応——阻害の回復——が顕著にあらわれて、正確に v_∞ を測定することがむずかしいという欠点がある。

基質共存下の方法^{24,31,32)}

カーバメイト、基質と AChE とがはじめから ($t=0$), 同時に存在して反応を開始する系 (Scheme 2) を考えてみよう。ここに S, ES', P はそれぞれ基質、基質の「見かけの」Michaelis 複合体および生成物である。 $K_{m(\text{app})}$ と k_{cat} は、カーバメイトが存在しない反応系における基質加水分解反応の Lineweaver-Burk プロットより得

Scheme 2

られる「見かけの」Michaelis 定数と触媒定数である。phenyl acetate のように色原基を持つ生成物 P を与える基質 (chromogenic substrate) を使えば、この反応過程を分光光度計にて容易に追跡することができる。

基質の加水分解反応系はきわめて速やかに定常状態に達するものと仮定すれば³¹⁾、加水分解生成物の時間 t における濃度 $[P]_t$ は(9)式であらわされる。

$$[P]_t = \frac{c'k_3}{b'}t + \frac{a'c'}{b'^2} \{1 - \exp(-b't)\} \quad (9)$$

ここで a' と b' は(1)(4)式で定義された a と b において、 $[CX]$ のかわりに基質が濃度 $[S]_0$ で共存することによるカーバメイトの実効濃度 $[I] = [CX]/(1 + [S]_0/K_{m(\text{app})})$ を代入したものであり、 $c' = V_{\text{max}}/\{(1 + K_{m(\text{app})}/[S]_0)(1 + [I]/K_d)\}$ をあらわす。比較して明らかなように(9)式は(1)式に対応している。

2-cyanophenyl dimethylcarbamate 存在下で、基質 phenyl acetate の仔牛赤血球 AChE による加水分解反応の追跡を、生成する phenol による紫外吸収の増加によっておこなったものを Fig. 4 に示す。前定常状態から定常状態にいたるまでを連続的に観察できることがわかる。Fig. 4 は Fig. 1 に対応している。

この phenol 生成曲線の直線部分を $t=0$ 方向に外挿した直線と、反応開始後数分間に観察される曲線との差

Fig. 4 Spectrometric trace of substrate hydrolysis in the presence of carbamate.

Fig. 5 First order decrease of ΔP .

ΔP をとれば、(9)式のうち指数関数部分だけが残る。 b' は ΔP 減少の一次反応定数として、 $\ln \Delta P$ を時間 t に対してプロットしたときの傾き、(10)式、から求められる。

$$\ln \Delta P = -b't + \ln(a'c'/b'^2) \quad (10)$$

$\ln \Delta P$ と t とのプロットは「Main プロット」における $\ln v_t$ あるいは $\ln v_t/v_s$ と t とのプロットに対応する。Fig. 5 に示されるように 3-isopropylphenyl methylcarbamate の各濃度で $\ln \Delta P$ と t とのプロットは直線である。したがってカルバミル化された酵素 EC とカルバミル化を受けていない酵素 E との間には、特殊なサブユニット間相互作用が存在せず、カルバミル化に関して、用いた酵素標品が均一であることがわかる。

Fig. 6 Double reciprocal plot from the method in the presence of substrate: Phenyl acetate as substrate; -□- 2.56 mM; -○- 0.79 mM.

k_3 値が既知であれば, $\ln \Delta P$ と t とのプロットより求められた b' 値から $a' = b' - k_3$ として a' 値が算出される. 定義により $1/a'$ と $1/[I]$ とをプロットすれば, 傾きと切片から K_d, k_2 値が得られる ((11)式).

$$\frac{1}{a'} = \frac{K_d}{k_2} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_2} \quad (11)$$

((11)式は「Main プロット」の(7)式に対応する.

3-isopropylphenyl methylcarbamate と仔牛赤血球 AChE との反応について $1/a'$ と $1/[I]$ プロットをおこなった例を Fig. 6 に示す. このプロットは濃度の高い, すなわち $1/[I]$ が小さな領域で勾配が急になり必ずしも (11)式に従う直線性を示さない. われわれは, 他の10種類の substituted phenyl methylcarbamate や dimethylcarbamate についても同様に, 濃度範囲によって勾配が変化することを確かめた. カーバメイトや基質の濃度が反応中に減少することが勾配変化の原因となるものかどうかなどを詳細に検討した結果, $1/a'$ と $1/[I]$ とのプロットの直線性からのずれはむしろ ternary complex 形成によるものと推定した. すなわち反応系のカーバメイト濃度が高い場合, Scheme 3 に示すように複合体 ECX

やカルバミル化酵素 EC にもう一分子のカーバメイトが結合した ternary complex, $\text{ECX} \cdot \text{CX}$ や $\text{EC} \cdot \text{CX}$ が形成されると考えられる^{8,12,30,33-35}). このとき $\ln \Delta P$ と t とのプロットから得られる傾きは, (9)式が導かれる際に定義された $b' (=a' + k_3)$ ではなくて, $a' + (k_3 + k_3'[\text{CX}]/K_d')/(1 + [\text{CX}]/K_d')$ であらわされる. したがって (傾き $-k_3$) 値は, 定義された a' の値とは異なり, $a'_{(\text{app})} = (\text{傾き} - k_3)$ とおけば Fig. 6 のプロットは $1/a'_{(\text{app})}$ と $1/[I]$ とのプロットになる.

すなわち, 反応が Scheme 3 のように進行するとき, $1/a'_{(\text{app})}$ と $1/[\text{CX}]$ のプロットは直線とはならず, $[I]$ とともに勾配が変化する. Fig. 6 に示されるプロットの高濃度範囲および低濃度範囲の曲線部分をそれぞれ外挿する直線から得られる切片と傾きはそれぞれ Table 1 のようになる.

カーバメイト濃度範囲によって, プロットから得られ

Table 1 Kinetic parameters estimated from low and high inhibitor concentration ranges.

[I] range	Intercept	Slope
Low	$1/k_2$	k_2/K_d
High	$1/k_2'$	$K_d'\{1/k_2 - 1/k_2'\}/\{1 + [\text{S}]_0/K_m(\text{app})\}$

る「見かけの」反応定数値が異なり, 目的とする反応定数 K_d, k_2 は低いカーバメイト濃度範囲でプロットをおこなう場合にのみ得られる. 「Main プロット」の場合にもまったく同じことがあてはまるものと考えられる.

実際に, 最初引用した Hastings らの測定条件はカーバメイト濃度が高く $[\text{CX}] > k_1$, 逆に O'Brien らの測定条件は反応時間 $t = 3$ 分から判断すると, 低いカーバメイト濃度 $[\text{CX}] < k_1$ で行なったものと思われる.

われわれが測定をおこなった結果でも, 高いカーバメイト濃度範囲 $[\text{CX}] > k_1$ で測定した「見かけの」 K_d, k_2 は, Hastings らの測定値とよく対応しており, 低いカーバメイト濃度範囲 $[\text{CX}] < k_1$ で測定した K_d, k_2 は, 「Main プロット」「基質共存下の方法」いずれにおいてもよい一致を示し, O'Brien らの測定値ともよい対応を示した.

Fig. 4 に示された脱離基 P 生成曲線に, 一定時間ごとに接線をひけば接線の傾きは $d[P]/dt$ である. 反応が Scheme 2 に従えば, $d[P]/dt$ および定常状態における接線の傾き $(d[P]/dt)_\infty$ は Fig. 7 のようにあらわされる. 傾きの差 $\Delta(d[P]/dt) = d[P]/dt - (d[P]/dt)_\infty$ を求め, $\ln \Delta(d[P]/dt)$ を t に対してプロットすれば, その勾配から b' が求められる. しかし曲線部分に接線をひくときに, 任意性が生じやすく, 誤差が大きくなることを考慮すれば, 直接 ΔP をとる方法 (Fig. 4) がすぐれている. ただし反応開始直後の基質加水分解初速度 v_0 を, 接線から求めることは比較的容易であり, 再現性のある値が

Fig. 7 Substrate hydrolysis in the presence of carbamate. The rate of substrate hydrolysis.

得られる。Scheme 3 にしたがえば v_s/v_0 は(12)式であらわされる。

$$\frac{v_s}{v_0} = 1 + \frac{[I]}{K_d} \left\{ 1 + \frac{[CX]}{K'_d} \right\} \quad (12)$$

$K'_d \gg K_d$ かつカーバメイト濃度範囲が低いときには、 $[I]/K_d \gg [I][CX]/K_d K'_d$ であるから v_s/v_0 の $1/[I]$ に対するプロットは切片 1, 傾き $1/K_d$ の直線となる。このようにして得られた K_d 値は「Main プロット」や(11)式の「基質共存下の方法」より得られた K_d 値とよく一致する^{24,36)}。

脱カルバミル化速度定数 k_3 の測定

カーバメイトによる阻害反応過程を調べる場合、とくに「基質共存下の方法」によって K_d, k_2 値を測定する場合に、 k_3 値を正確に評価しておく必要がある。脱カルバミル化速度定数 k_3 は希釈^{1,3,10,34,37,38)} やゲル濾過^{23,24,39)}によって阻害反応液中のカーバメイト濃度を急に低くしたとき、酵素活性がゆっくりと回復する際の一次反応定数として測定される。しかし希釈による場合、何倍以上希釈すれば十分であるのかという点に関しては、普通は経験的に 100~1000 倍程度の希釈がおこなわれているにすぎず、従来まったく検討されていなかった。

Fig. 8 に示されているように希釈による酵素活性の回復を、カルバミル化反応の (Fig. 1), 逆反応過程とみなせば(13)式が得られる⁴⁰⁾。

$$\ln \frac{[EC]_{\infty} - [EC]_t}{[EC]_{\infty} - [EC]_0} = \ln \frac{v_{\infty} - v_t}{v_{\infty} - v_0} = \left(\frac{k_2}{1 + \alpha K_d/[CX]} + k_3 \right) t \quad (13)$$

ここに添字の 0, t , ∞ は希釈開始後の時間経過を、また α はカーバメイト濃度の希釈倍率をあらわす。 $\alpha = [\text{希釈前のカーバメイト濃度}]/[\text{希釈後のカーバメイト濃度}]$ 。(13)式右辺の $[CX]$ は希釈前のカーバメイト濃度である。

$[CX] \approx K_d$ で阻害反応を行なえば $k_2/(1 + \alpha K_d/[CX]) \approx$

Fig. 8 Time course of residual enzyme activity. Recovery of carbamylated enzyme.

$k_2/(1 + \alpha)$ となり、 $k_2/k_3 \approx 100$ であるので $k_2/(1 + \alpha K_d/[CX]) + k_3 \rightarrow k_3$ となるような希釈倍率 α は少なくとも 1000 倍以上なければならないことがわかる。ゲル濾過による方法であれば、この条件はほぼ満足されている。このとき $\ln(v_{\infty} - v_0)/(v_{\infty} - v_t)$ と t とのプロットの傾きから k_3 が得られる。

阻害反応液の希釈によって脱カルバミル化速度定数 k_3 の測定をおこなった場合には、測定されたあるいは予想される K_d, k_2 値と、阻害反応に用いたカーバメイト濃度 $[CX]$ とから、実験でおこなった希釈が $k_2/(1 + \alpha K_d/[CX]) \ll k_3$ を満しているかどうかを計算によって確かめておく必要がある。

ま と め

解離平衡定数 K_d とカルバミル化速度定数 k_2 を測定する「Main の方法」や「基質共存下の方法」では、阻害反応に用いるカーバメイト濃度に依存して、異なった「見かけの」反応定数値が得られるが、その濃度範囲が等しければいずれの方法によっても、反応定数値は互いによく対応する。しかし高濃度のカーバメイトが反応系に存在する場合には、カーバメイト酵素複合体 ECX やカルバミル化酵素 EC にも 1 分子のカーバメイトが結合することによる影響があらわれて、正確な反応定数値が求められない。目的とする反応定数 K_d, k_2 は低いカーバメイト濃度範囲 (積 $[CX] \times k_1$ が 0.2~1.0 min⁻¹) で測定した場合にのみ得られる。

脱カルバミル化速度定数 k_3 の測定においては、用いるカーバメイトの K_d, k_2 , 濃度 $[CX]$ などの条件を考慮したうえで、希釈倍率を十分大きくとらなければならない。

以上、カーバメイトの AChE 阻害反応定数 K_d, k_2, k_3 を測定するために、これまで用いられてきた測定原理、測定方法を互いに比較しながら、目的とする反応定数を精度よく求めるための実験条件について述べた。

本総説に解説した方法論が、カーバメイト系殺虫剤の構造活性相関や最近あきらかにされたカーバメイト抵抗性などの諸問題に対する酵素レベルにおける解明に寄与することを期待したい。

引 用 文 献

- 1) I.B. Wilson, M.A. Hatch & S. Ginsburg: *J. Biol. Chem.* **235**, 2312 (1960)
- 2) A.R. Main & F.L. Hastings: *Science* **154**, 400 (1966)
- 3) K. Hellenbrand: *J. Agr. Food Chem.* **15**, 825 (1967)

- 4) H.E. Froede & I.B. Wilson: "The Enzymes," ed. by P.D. Boyer, Vol. V, Academic Press, New York, p. 87, 1971
- 5) W.N. Aldridge & E. Reiner: "Enzyme Inhibitors as Substrates," North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 123, 1972
- 6) J.R. Corbett: "The Biological Mode of Action of Pesticides," Academic Press, New York, Chap. 3, 1974
- 7) T.L. Rosenberry: "Advances in Enzymology," ed. by A. Meister, Vol. 43, John Wiley & Sons, New York, p. 103, 1975
- 8) K.J. Laidler & P.S. Bunting: "The Chemical Kinetics of Enzyme Action," Clarendon Press, Oxford, Chap. 1, 3 & 6, 1973
- 9) R.L. Metcalf: *Bull. Wld. Hlth Org.* **44**, 43 (1971)
- 10) R.D. O'Brien, B.D. Hilton & L. Gilmour: *Mol. Pharmacol.* **2**, 593 (1966)
- 11) F.L. Hastings, A.R. Main & F. Iverson: *J. Agr. Food Chem.* **18**, 497 (1970)
- 12) T.L. Rosenberry & S.A. Bernhard: *Biochemistry* **10**, 4114 (1971)
- 13) H. Gutfreund & J.M. Sturtevant: *Biochem. J.* **63**, 656 (1956)
- 14) M.L. Bender, F.J. Kézdy & F.C. Wedler: *J. Chem. Educ.* **44**, 84 (1967)
- 15) M.L. Bender, M.L. Bequé-Cantón, R.L. Blakeley, L.J. Brubacher, J. Feder, C.R. Gunter, F.J. Kézdy, J.V. Killheffer, Jr., T.H. Marshall, C.G. Miller, R.W. Roeske & J.K. Stoops: *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5890 (1966)
- 16) M.L. Bender & J.K. Stoops: *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1622 (1965)
- 17) J.D. Berman: *Biochemistry* **12**, 1710 (1973)
- 18) H.O. Michel & S. Krop: *J. Biol. Chem.* **190**, 119 (1951)
- 19) I.B. Wilson & M.A. Harrison: *ibid.* **236**, 2292 (1961)
- 20) L.T. Kremzner & I.B. Wilson: *Biochemistry* **3**, 1902 (1964)
- 21) G. Mooser, H. Schuluman & D.S. Sigman: *ibid.* **11**, 1595 (1972)
- 22) T.L. Rosenberry, H.W. Chang & Y.T. Chen: *J. Biol. Chem.* **247**, 1555 (1972)
- 23) W.D. Reed & T.R. Fukuto: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 120 (1973)
- 24) T. Nishioka, K. Kitamura, T. Fujita & M. Nakajima: *ibid.* **6**, in press (1976)
- 25) A.R. Main & F. Iverson: *Biochem. J.* **100**, 525 (1966)
- 26) E. Reiner: *Bull. Wld. Hlth Org.* **44**, 109 (1971)
- 27) A.R. Main: *J. Biol. Chem.* **244**, 829 (1969)
- 28) F. Iverson & A.R. Main: *Biochemistry* **8**, 1889 (1969)
- 29) R.K. Tripathi, Y.C. Chiu & R.D. O'Brien: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 55 (1973)
- 30) W.N. Aldridge & E. Reiner: "Enzyme Inhibitors as Substrates," North-Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 79 & Appendices, 1972
- 31) G.J. Hart & R.D. O'Brien: *Biochemistry* **12**, 2940 (1973)
- 32) G.J. Hart & R.D. O'Brien: *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**, 239 (1974)
- 33) R.M. Krupka & K.J. Laidler: *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1454 (1961)
- 34) R.J. Kitz, L.M. Braswell & S. Ginsburg: *Mol. Pharmacol.* **6**, 108 (1970)
- 35) T.L. Rosenberry & S.A. Bernhard: *Biochemistry* **11**, 4308 (1972)
- 36) B. Hetnarski & R.D. O'Brien: *J. Agr. Food Chem.* **23**, 709 (1975)
- 37) I.B. Wilson, M.A. Harrison & S. Ginsburg: *J. Biol. Chem.* **236**, 1498 (1961)
- 38) E. Reiner & W.N. Aldridge: *Biochem. J.* **105**, 171 (1967)
- 39) H.R. Smissaert, S. Voerman, L. Oostenbrugge & N. Reynooy: *J. Agr. Food Chem.* **18**, 66 (1970)
- 40) 北村公二: 京都大学農学研究科修士論文 (1975)