

これから創薬を始める方へ [Vol. 4]

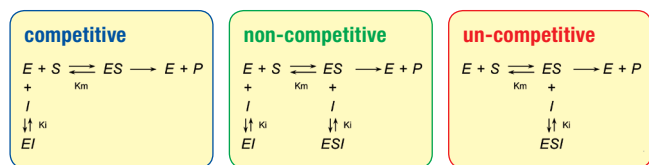
～ 酵素阻害剤編 ～

酵素阻害剤をとらえようとしたときに、どんなアッセイ系を構築しますか。

系を構築するにあたり考慮する点として、シグナルが検出できることは言わずもがなですが、コスト計算はもとより、簡便性、所要時間、false positive、false negative がないこと、さらにできれば希望するようなものが取れるようにする、なんていうのもあります。

酵素反応が、単純な Michaelis-Menten の式にどこまで当てはまるのかどうかはさておき、参考になることがあります。酵素量や基質量の調整です。教科書的には可逆的阻害剤には、**competitive**、**non-competitive**、**un-competitive** な阻害剤があり、次のような阻害様式で示されます。

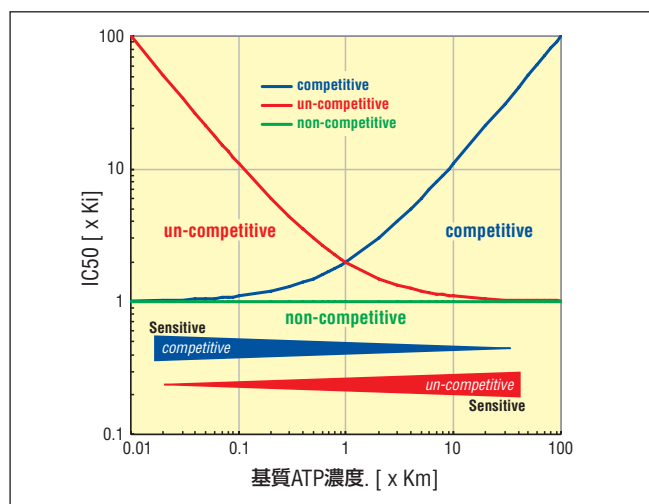
酵素と基質の親和性を **Km**、酵素と阻害剤の親和性を **Ki** とします。



E: 酵素 S: 基質 I: 阻害剤 P: 反応生成物

たとえば Kinase 阻害剤について考えます。もちろん Kinase は単一基質ではありませんが、ここでは単純に考えます。

下記の図は、典型的な Kinase のアッセイで、ATP の濃度を振った場合に得られる理論的な阻害剤の IC50 を示しています。ATP の濃度が Km の何倍か、阻害剤の IC50 が Ki の何倍かを表しています。



ATP に competitive な阻害剤の場合、ATP 濃度を Km と同じにした場合は、実験で得られる IC50 は Ki の 2 倍になります。ところが ATP の濃度を Km の 10 倍にすると得られる IC50 は Ki の 10 倍強。IC50 が 5 倍違うということは、ある濃度で 50% 阻害を示すものが ATP 濃度が高いと 20% 阻害以下になってしまうことになります。

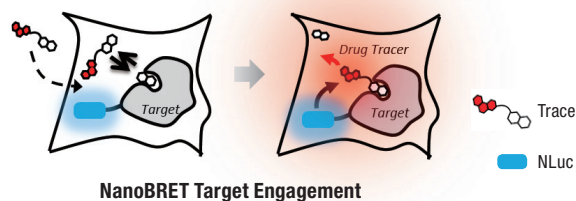
Kinase の assay を構築するにあたり、もしも ATP competitor を望まないのであれば、アッセイ中の ATP の濃度を高く設定することにより、ATP competitor の Hit を減らすことができます。またこの原理を使って、Hit したものが、ATP competitive か見ることができます。また ATP 濃度を下げた方が ATP competitive 阻害剤が見つけやすくなりますが、Km よりも下げてもさほど大きな効果はないともいえます。

そもそも、上記は 1 基質酵素反応で考えており、実際にはそんな単純ではないし、不可逆阻害剤もありえます。そもそも薬理作用を示すかどうか重要なことから、あまり深く考えても仕方がないのかもしれない。

さて、多くの酵素は細胞内に存在していますので、前述のセルフリー *in vitro* アッセイを示した薬剤は、細胞内の酵素に実際に結合するのでしょうか。

セルフリーアッセイは、すべてが人工的に作られた環境ですので、アッセイ系での役者はすべてわかっていてクリアですが、実際の細胞内での反応系は未知のものがたくさんあります。細胞内のタンパク質は多くの分子と相互作用をしているといわれているので、本来の酵素の環境下で、その活性を確認することが理想です。

セルフリーの系であれば、分子間相互作用を調べる方法として SPR 等が利用されますが、セルベースとなるとなかなか一般的な方法はありません。そんな細胞内での酵素への結合活性を BRET の技術を用いた Target Engagement のアッセイ法の開発を現在 Promega では行っています。



この方法を用いることにより、昨今話題になっている薬剤の Residence Time による評価も可能になります。こちらの技術は機会を改めてご紹介いたします。

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982
E-Mail : promotec@jp.promega.com