

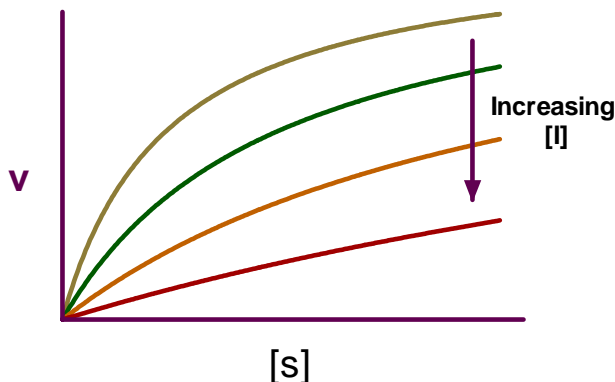
12: 競合的酵素阻害剤の K_i を求める

競合的酵素阻害剤は基質と酵素の結合を阻害します。よって V_{max} に影響を及ぼすことなく、 K_m を増やすことができます。また、競合的阻害剤は基質濃度を増やすことで、機能が弱められます。競合的阻害剤 I の値が大きくなると、次の式で示すように、 K_m の「apparent」（明瞭）な値が大きくなります。

$$K_{m_{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

ここで K_i は酵素阻害剤の分離定数です。 K_i は阻害剤の効力を示す格好の定数です。なぜなら、 IC_{50} などとは違って、基質濃度からは完全に独立した値となっているからです。

K_i を求めるにはグラフを利用する方法がいくつか用意されています。グラフを作成する手順は、阻害剤の濃度を変化させて基質-反応速度曲線を描くというお馴染みのものです。



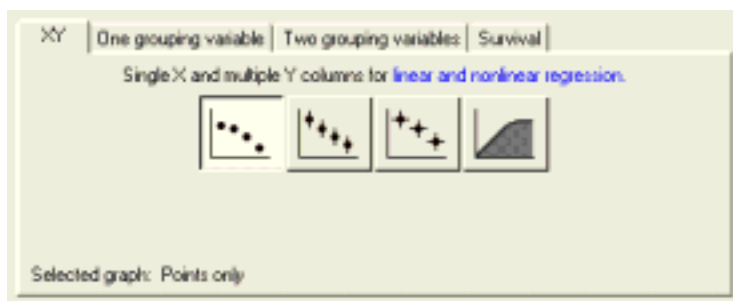
かつてはデータを線形変換し、グラフを作成して K_i を求める手法が一般的でした。しかし、Prism の場合、非線形回帰の機能を利用することによって、高い信頼性を持った速度定数を即座に求めることができます。また、回帰曲線はグローバル(共有パラメータ)カーブフィット機能を使ってプロットされます。回帰式は次の通りです。

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

この関数式は基質反応速度曲線の一般型です。[S] と [I] は独立変数ですが、[I] は場合によっては従属変数ともなりえます。 V_{max} , K_m , K_i はシステム(すべてのデータセット)に共通した値です。Prism は阻害剤の濃度が異なる複数の曲線に対して、同時にカーブフィット(グローバルカーブフィット)を実行し、それらの最適なフィット曲線を提供する V_{max} , K_m , K_i を計算します。

データ入力とグラフ作成

ウェルカムダイアログで次のように操作します。



次の図のようにデータを入力します。X列には基質濃度を入力し、Y列には見出しに入力した各阻害剤濃度に対する反応速度の値を入力します。

	X Values	A	B	C	D
	[S], nM	0 nM	3 nM	10 nM	30 nM
	X	Y	Y	Y	Y
1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	50	17.0	7.2	3.6	0.0
3	100	22.2	13.3	8.1	0.1
4	150	30.6	17.8	13.6	4.8
5	200	33.6	25.1	10.8	5.2
6	400	50.4	38.0	21.9	14.6
7	600	58.4	45.0	25.5	13.5
8	800	62.7	50.5	31.8	15.9
9	1000	63.5	52.6	38.1	20.9
10	10000	81.0	74.3	70.9	61.7

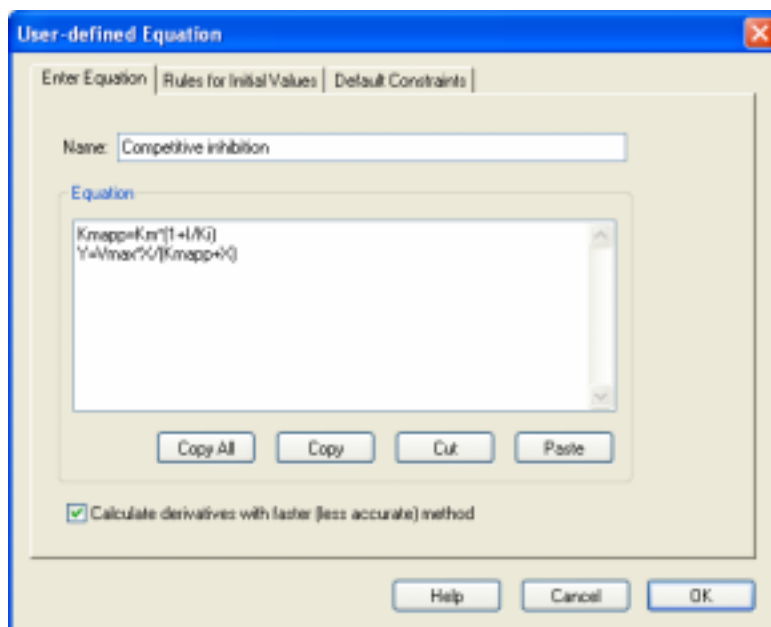
この例題では[S] と[I] の単位を nM とし、反応速度の単位を $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ プロテインとしました。見出しに入力した単位は単なるメモであり、入力しなくてもかまいません。見出しに入力した情報は凡例に表示されるものであり、単位が自動的に回帰分析で自動認識される訳ではありません。ですから、分析結果のシートなどで数値を読み取る場合、 K_m と K_i の単位は nM、 V_{max} の単位は $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ プロテインとして読み取ります。

黄色の **Graphs** タブをクリックしてグラフを表示します。殆どのデータ点が左 Y 軸の付近に密集していますが、この状態は後で編集します。

ここではそのまま **Analyze** ボタンをクリックします。**Analyze Data** ダイアログでは **Curves & regression** の項目から **Nonlinear regression (curve fit)** を選択します。

そして **Parameters: Nonlinear Regression (Curve Fit)** ダイアログで **Equation** タブを表示し、**More equations** を選択します。リストが表示されますから、**[Enter your own equation]** をクリックします。すると、次の **User-defined Equation** ダイアログが表示されます。

次の図のようにユーザ定義関数を 2 行で入力します。



1 行目の式は前出の中間変数 apparent K_m を定義する式です。実際の式は次のページに示します。

$$K_{m_{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

2行目の式では、右辺で「Kmapp」を利用しています。この式を使って Prism はデータセットへのフィット形式を行います。2行目の式は前出の速度式と同じものです。

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

実際、「X」を独立変数 [S] で置換して考えてみましょう。

1行目における乗算の演算子 * は必ずしも必要ではありません。しかし、できるだけ記述するクセを付けておく方がよいでしょう。Prism では乗算演算子を省略できますが、曖昧な表記となると不都合が生じます。例えば、Prism は「AB」を A と B の積ではなく、変数と認識します。ユーザ定義関数の記述上の注意点に関する詳細な情報は *User's Guide* を参照してください。

次のステップでは、いよいよ(a)「共有パラメータ」の設定と(b)利用すべき[I]の設定について説明します。

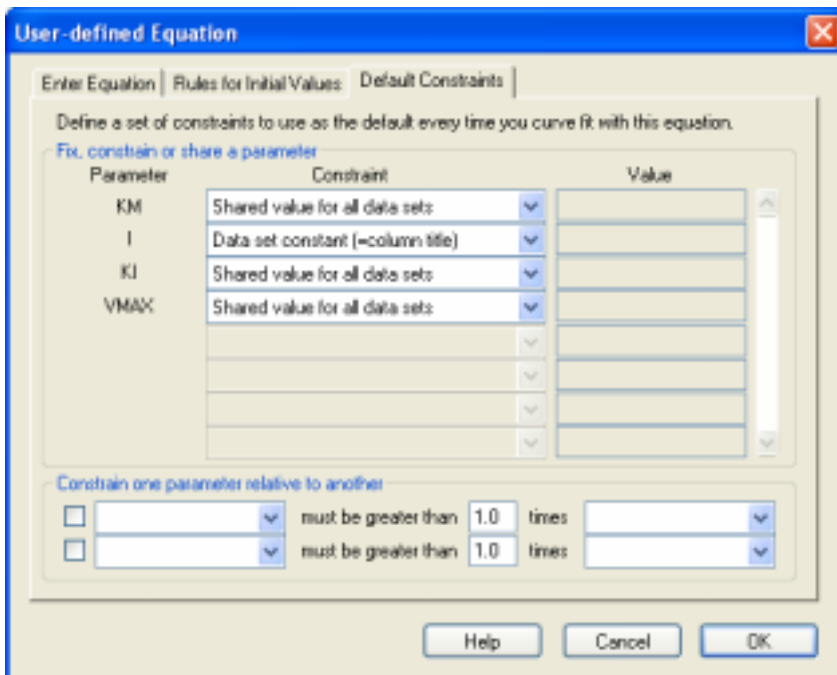
グローバル(共有)パラメータの設定

Default Constraints タブを選択します。回帰式で入力した変数が自動的にパラメータとして表示されています。

K_m , K_i , V_{max} は全てのデータセットに対して共通です。よって、条件として **Shared value for all data sets** をプルダウンメニューから選択します。

阻害剤に関しては *apparent* K_m は変数の扱いが変化しますが、 K_m 自身は独立変数です。つまり、 K_m はグローバルパラメータです。

ダイアログの様子を次に示します。ダイアログを開いた状態で次のセクションへ進んでください。



User-defined Equation ダイアログで設定したパラメータの条件は、この式を利用する時に常に有効になっています。パラメータに関する設定は **Parameters: Nonlinear Regression (Curve Fit)** ダイアログの **Constraints** タブでも設定できます。しかし、その場合の設定内容は実行中のフィッティングにだけ有効で、定義式自体の初期設定となる訳ではありません。

Y 列の見出しをパラメータとして利用する

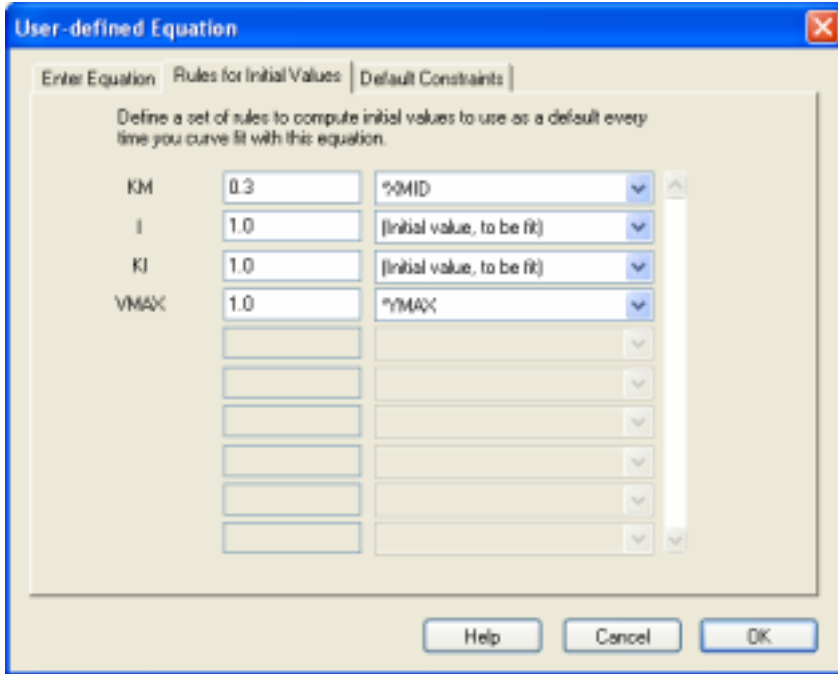
上のダイアログの変数「I」に注目してください。**Data set constant (=column title)** というオプションが選択されています。このオプションを選択すると、Prism は異なるフィット関数を各データセットに実行します。つまり、変数 [I] として Y 列の見出しの一部を利用するのです。

A	B	C	D
0 nM	3 nM	10 nM	30 nM
Y	Y	Y	Y

この機能のおかげで、2つの独立変数のあるデータも効率的に処理できます。

カーブフィットの実行

Rules for Initial Values タブを表示します。次の図に示すように初期値を入力します。



OK ボタンを2回クリックして、Parameters ダイアログを閉じます。カーブフィットが即座に実行されます。そして Results シートに次のような分析結果が表示されます。

	0 nM	3 nM	10 nM	30 nM	Global (shared)
	Y	Y	Y	Y	Y
Competitive inhibition					
Best-fit values					
KM	236.7	236.7	236.7	236.7	236.7
I	0.0	3.000	10.00	30.00	
KI	2.744	2.744	2.744	2.744	2.744
VMAX	79.92	79.92	79.92	79.92	79.92

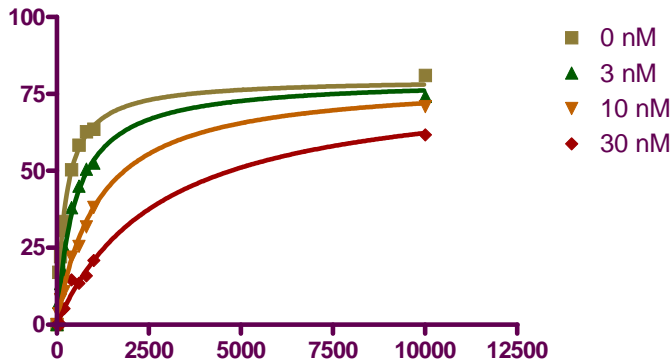
共有設定したパラメータのセルにはすべて同じ値が入力されています。パラメータ K_i の最適値は、このようにグローバル設定の機能を利用することで求めることができます。

パラメータの設定条件を変更してカーブフィットを再度実行する場合は、**Change... Analysis Parameters** と操作します。

フィット曲線のグラフ

黄色の **Graphs** タブをクリックしてグラフを表示します。

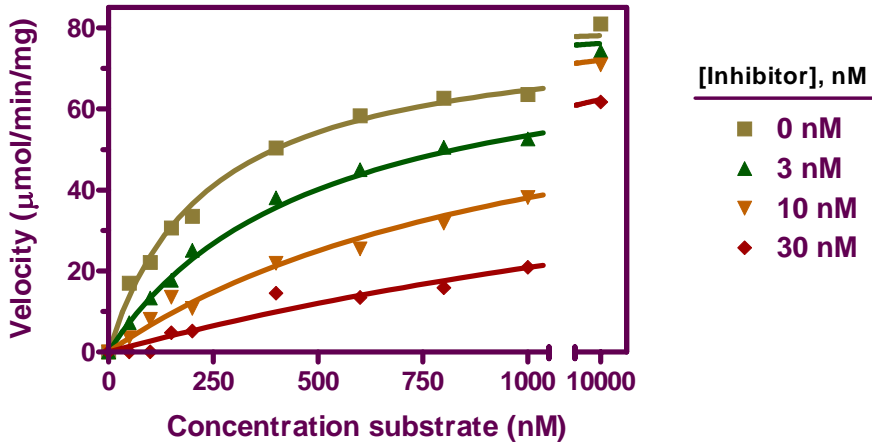
阻害剤の値が大きくなるほど、データ点は曲線の一部(直線的な部分以外)にしかのっていません。そこで、データテーブルの構造を変える事無く、基質濃度と阻害剤の関係を表す方法をご紹介します。もちろん、データテーブルで同一の X 値だけを利用する必要はありません。異なる X 値のデータセットを利用する方法については、『13：用量応答データの分析』を参照してください。



ここでは軸破断で X 軸を 2 分割することによって、データをより詳細に表現してみます。

X 軸での軸破断設定

このセクションでは X 軸を X = 1050 までの範囲と X = 9000 からの範囲に分割して表示する軸破断の方法をご紹介します。



X 軸破断を使った基質-反応速度曲線のグラフ

軸破断の設定方法は下記に示す通りです。その他のグラフの編集方法はこのマニュアルの別のページでそれぞれ紹介されています。

X 軸をダブルクリックします。**Format Axes** ダイアログが表示されます。**X axis** のタブが表示されていることを確認します。**Gaps and Direction** の項目で **Two segments** のオプションを選択します。分割した各軸の設定を、それぞれ、行う必要があります。**Segment** の項目が **Left** になっていることを確認して軸の範囲と軸目盛のオプションを次のように設定します。



次に **Segment** リストボックスを **Right** にします。そして軸の範囲と軸目盛のオプションを次のように設定します。



この種のグラフを作成する場合、必ず試行錯誤が必要になります。分割した後の軸の長さの割合(**Length % of axis**)を決める場合は、すこし手間取るかもしれません。ただし、分割後の軸の端をドラッグすることによって、**Length % of axis**の値を調整することもできるので、覚えておきましょう。