

인체 간 조직의 Cytochrome P450 3A4의 활성화에 대한 Troleandomycin의 작용기전

김복량^{1,2} · 오현숙¹ · 김혜정¹

¹원광대학교 의약자원연구센터, ²의대 생화학 교실

Reaction Mechanism of Troleandomycin on the Activity of Human Liver Microsomal Cytochrome P450 3A4

Bok Ryang Kim^{1,2}, Hyun Sook Oh¹ and Hye Jung Kim¹

¹Medicinal Resources Research Center and

²Department of Biochemistry, College of Medicine, Won Kwang University, Iri, 570-749, Korea

(Received December 1, 1995)

(Accepted December 12, 1995)

ABSTRACT : Incubation of aflatoxin B₁ (AFB₁) with microsomes isolated from human liver number 110 yielded two metabolite peaks which were aflatoxin Q₁ (AFQ₁) and AFB₁-exo-8,9-epoxide (exo-epoxide) in high performance liquid chromatography. Production ratio of AFQ₁ to exo-epoxide was 2.43 ± 0.04 . Metabolism of AFB₁ to AFQ₁ and exo-epoxide was inhibited by troleandomycin in a same degree although troleandomycin was not activated as a mechanism-based inhibitor. The inhibitory effect was dependent upon either the incubation time with AFB₁ or the preincubation time before the addition of AFB₁. Incubation of troleandomycin and NADPH by the microsomes resulted in the formation of a cytochrome P450 (P450)-metabolic intermediate (MI) complex and the level was approximately 80% of total P450 3A4 in the microsomes. This figure was similar to that of the inhibitory effect of troleandomycin on AFB₁ metabolism. Glutathione which was reported that it prevented the formation of MI complex in rat liver microsomes did not inhibit the formation of MI complex in human liver microsomes. These results suggested that the inhibitory effect of troleandomycin on AFB₁ metabolism is due to the formation of MI complex with P450 3A4. And the reaction mechanism of troleandomycin by human liver microsomes might be different from that one by rat liver microsomes.

Key Words : Human liver microsomes, P450 3A4, Aflatoxin B₁, Troleandomycin, MI complex

I. 서 론

Cytochrome P450(P450) 효소 군은 동물체 내에서 여러 steroid와 eicosanoid를 포함하는 세포내의 기질물질들과 xenobiotics로 총칭하는 환경오염 물질, 각종 용매, 약품 등의 화학물질 그리고 생명체에서 만들어지는 생체 활성물질 등의 수많은 성분들을 산화 및 환원시켜서, 필요한 물질로 전환시키든지 혹은 체외로 제거하는 기능을 수행할 것으로 여겨진다. P450 효소들이 대사시켜야하는 물질은 수십만 종류일 것으로 추정되는데 대사 된다고 밝혀진 물질은 수백 여종이다 (Porter와 Coon, 1991). 밝혀진 물질들 중에서도 여러 물질들은 인체의 P450 효소에 의해 대사되는 과정에서 더 독성이 강한 물질로 혹은 발암성이 높은 물질로 전

환되고있으며 한 종류의 P450 효소에 의해 대사되는 두가지 이상의 약품을 동시에 복용하면 drug-drug interaction을 보이므로(Guengerich, 1992) 인체 P450 효소들이 각각 어떠한 물질을 어떻게 대사하고 있는지를 규명하는 일은 매우 의의가 있을 것이다.

Chemical inhibition test(CIT)는 특정 P450 효소에 특이한 기질이나 억제제로 알려진 물질들이 임의의 반응을 억제하는지를 조사하여 그 반응이 특정 P450 효소에 의해 대사되는 지를 판정하는 방법(Harris 등, 1994)이다. Mechanism-based inhibitor들은 특정 P450 효소에 대사될 때 형성되는 intermediate가 그 효소의 촉매 부위를 변형해서 활성을 저해하므로 CIT에 자주 이용되고있다. Mechanism-based inhibitor의 일종인 troleandomycin은 macrolide 계열의 항생제로 *in vivo*와

*in vitro*에서 P450 3A계 효소와 결합하여 type I binding spectrum을 형성한 후, tertiary amine기가 N-dealkylation되어 nitrosoalkane으로 대사된 후 P450 3A 효소들의 Fe(II)와 complex(cytochrome P450 metabolic intermediate complex; MI complex)를 형성한다 (Delaforge 등, 1983; Lindstrom 등, 1993). 백서에 troleandomycin을 *in vivo*로 처리할 때 형성되는 MI complex의 양에 반비례적으로 간 조직내 glutathione의 농도가 감소되었고, 그 MI complex를 환원시키면 complex를 이뤘던 P450 효소가 다시 활성화되어 *in vitro*에서 troleandomycin과 재차 MI complex를 형성한다 (Pessayre, 1982; Pessayre 등, 1983). 이 때 glutathione이 존재하면 MI complex의 형성이 차단된다고 한다. 성인 간 조직에는 P450 3A4와 P450 3A5 등이 존재하는데 (Guengerich, 1992), troleandomycin 투여로 형성되는 MI complex의 양은 그 P450 효소들의 분포도와 비슷하였으며 (Lindstrom 등, 1993), 그 효소들이 대사하는 반응들을 효율적으로 억제시킨다. 그러나, P450 3A 효소가 있음에도 불구하고 MI complex가 형성되지 않았으며 (Lindstrom, 1993), P450 3A4에 의해 촉매되는 반응을 저해하는 정도가 매우 낮았었다는 보고가 있어 (Tassaneeyakul 등, 1994; Oh 등, 1995), troleandomycin이 백서와 인체 간 조직의 서로 다른 P450 3A1, P450 3A2, P450 3A4 및 P4503A5 등을 동일한 기전에 의해서 저해하는지를 더 연구해야 할 것이다.

이에 본 논문은 인체 간 조직의 microsomes에 존재하는 P450 3A4의 활성 (Lasker 등, 1993)을 aflatoxin B₁ (AFB₁)을 기질로 이용하여 troleandomycin의 억제기전을 측정하였다. AFB₁은 P450 3A4의 서로 다른 두 군데의 기질결합 부위를 통하여 동시에 두가지 물질로 대사 됨으로 catalytic site가 직접 억제되는지를 쉽게 측정할 수 있다 (Oh 등, 1995). 또, 인체의 P450 3A에 대한 MI complex 형성에 glutathione이 미치는 영향도 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

AFB₁, troleandomycin, glucose 6-phosphate, NADP⁺, yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase, glutathione, ferricyanide 및 그 외 일반시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 그리고 HPLC용 용매는 Merck (Franckfurter, Germany)에서 구입하였다.

2. 인체 간 조직의 microsomes 분획의 조제

본 실험에 이용한 인체 간 조직은 Tennessee Donor Services (Nashville, TN, USA)를 통해서 얻은 Human Liver Sample (HL) 110이었으며, Lindstrom 등이 보고한 방법 (1993)에 따라서 microsomes 분획을 얻었다. 이 분획의 P450 함량을 Omura-Sato 방법 (1964)으로 측정 한 바, 0.87 nmol/mg protein이었다.

3. AFB₁ 대사의 측정

인체 microsomes의 cytochrome P450 3A4 활성화에 의하여 AFB₁이 aflatoxin Q₁ (AFQ₁)과 AFB₁-exo-8,9-epoxide (exo-epoxide)로 대사되는 반응은 Oh 등이 기술한 방법을 약간 변형하여 실시하였다 (1995). 즉, 반응의 혼합물은 총 1 mL로 100 pmol의 HL 110 microsomes, 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5), 2 mM glutathione, 0.6 mg의 mouse liver cytosol, 50 μM AFB₁, 5 mM glucose 6-phosphate, 1.0 mM NADP⁺ 및 1.0 IU의 yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase 등으로 이루어졌다. 이 혼합물을 37°C에서 20분간 반응시키고, 110 μL의 초산을 첨가하여 반응을 종료시킨 후, -70°C로 10 시간동안 보관하였다. 해동 후 3,000×g에서 10분간 원심 분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. AFB₁ 대사물들은 Raney 등이 기술한 방법 (1992)을 약간 변형하여 Beckman HPLC을 이용하여 분석하였다. 즉, 사용된 column은 Ultrasphere ODS C-18 reverse-phase column (Beckman, 5 μm, 4.6×250 mm)이었고, 용출용매는 20 mM ammonium acetate (acetic acid로 pH 4.0을 만듦)인 용매 A와 acetonitrile: methanol: H₂O가 4.5:4.5:1.0의 비율로 혼합된 용매 B로 이루어졌으며, 용출 속도는 1.5 mL/min이었다. 90% A-10% B로 된 용매로 column을 평형시킨 후, 20 μL의 시료를 주입하자마자 상기된 용매를 연속된 농도 구배 방식으로 16분 동안에 걸쳐서 30% A-70% B로 변화시키면서 시료를 용출하였다. 이어서, 4분 동안에 걸쳐서 용출 용매를 90% A-10% B로 변화하였다. AFB₁ 대사물질은 360 nm에서 검사하였다. Exo-epoxide는 반응혼합물에 존재하는 glutathione과 mouse cytosol의 glutathione S-transferase로 glutathione conjugate를 만들었다. 이것의 retention time(t_R)은 8.1 min, AFQ₁은 11.8 min 그리고 AFB₁은 14.0 min이었다. 각 대사물질들의 peak 면적을 Beckman Integrator (Model 427)로 측정하여 external standard 방식으로 exo-epoxide와 AFQ₁의 농도를 산출하였다.

4. Troleandomycin의 처리

Troleandomycin을 세 가지의 방법으로 반응 혼합물에 첨가하였다. 즉, HL 110 microsomes, NADPH-generating system 그리고 50 mM phosphate(pH 7.5)로 이뤄진 용액에 50 μ M의 troleandomycin만을, 혹은, troleandomycin과 2 mM glutathione을 함께 37°C에서 40분까지 전 처리 반응을 실시한 후 AFB₁의 대사를 37°C에서 20분간 진행하였다. 단, 전 처리 반응에 glutathione을 첨가하지 않은 실험에서는 AFB₁을 첨가할 때 glutathione을 넣었다. 일부의 실험에서는 전 처리 반응없이 troleandomycin을 AFB₁과 동시에 첨가하였다.

5. MI complex의 정량

MI complex의 양을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 50 mM의 phosphate 완충용액(pH 7.5)에 HL 110 microsomes을 1 mg/mL로 희석한 후, 수정으로 만들어진 reference와 sample cuvette에 각각 1 mL씩 넣는다. Sample cuvette에 ethanol로 용해시킨 5 mM troleandomycin을 10 L 첨가하고, reference cuvette에는 ethanol 10 μ L을 첨가한다. 이 cuvette들을 Varian Cary 210 spectrophotometer를 이용하여 420에서 500 nm에 걸쳐서 base-line을 맞췄다. 그 후, 양 cuvette에 NADPH를 1 mM이 되게 첨가하고 37°C에서 20분간 방치시킨 후 420에서 500 nm까지 wave-length scanning을 실시하여 MI complex를 측정하였다. MI complex의 양은 456 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이를 $64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pershing과 Franklin, 1982)로 나누어 계산하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 인체 간 조직의 Microsomes에 의한 AFB₁의 대사

AFB₁는 peroxidases나 lipoxgenases에 의해 대사(Battista와 Marnett, 1985)될 수는 있지만 대부분은 P450 함유 효소들에 의해 대사된다. 인체 간 조직의 cytochrome P450 효소들 중에서 P450 1A1과 P450 1A2들은 AFB₁을 AFB₁-endo-8,9-epoxide(endo-epoxide), exo-epoxide, AFQ₁ 및 AFM₁ 등으로 대사하는데 AFM₁이 주된 생성물이며, P450 1A2는 P450 1A1의 대사속도의 10배 정도이다(Guo 등, 1994; Ueng 등, 1995). P450 3A4와 P450 3A5는 AFB₁을 exo-epoxide와 AFQ₁로 대사시킨다(Kim 등, 1993; Gillam 등, 1995).

본 실험에서 사용된 효소원은 HL 110 microsomes으

로, 이것에 의한 AFB₁의 대사산물은 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 AFM₁이 전혀 존재하지 않고 exo-epoxide와 AFQ₁만이 형성되었다. Troleandomycin으로 HL 110 microsomes에 존재하는 P450 3A4와 P450 3A5의 활성을 억제시켜도(Fig. 1B) 생성되는 대사물질의 양상은 변화되지 않아 HL 110 microsomes에 의한 AFB₁의 대사에 P450 1A1이나 P450 1A2 등이 관여하지 않았다고 분석되었다. 따라서 HL 110 microsomes에 존재하는 P450 3A4와 P450 3A5가 AFB₁을 대사한다고 여겨지나, P450 3A5는 caucasian에서 25%의 사람에서만 발현되며 발현되는 양도 P450 3A4의 30% 정도이다(Wrighton 등, 1990). Gillam 등 (1995)에 의하면 정제된 P450 3A5가 AFB₁을 대사시키는 specific activity는

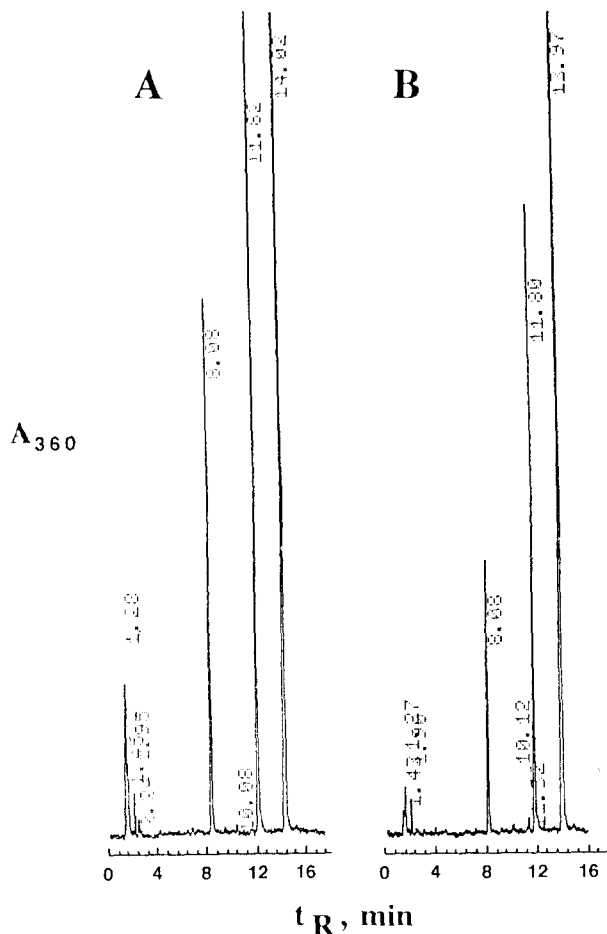


Fig. 1. Oxidation products of AFB₁ formed by human liver microsomes. Human liver microsomes were incubated with NADPH-generating system (A) or 50 μ M troleandomycin plus and NADPH-generating system (B) for 20 min at 37°C. AFB₁ (50 μ M) was then added in all mixtures and the mixtures were incubated for 20 min at 37°C. The indicated peaks were identified as the glutathione conjugated of the exo-epoxide (t_R : 8.1 min), AFQ₁ (11.8 min) and AFM₁ (14.0 min) by comparison of t_R with authentic standards.

P450 3A4보다 느렸으나, AFB₁로부터 exo-epoxide를 AFQ₁보다 7.4배나 빠른 속도로 합성한다고 한다. 반면, Fig. 1A와 Fig. 1B의 chromatogram상에서 형성된 AFQ₁의 peak는 exo-epoxide의 peak보다 2.43배이었는데, 이는 정제된 P450 3A4에 의해 형성된 AFB₁과 exo-epoxide의 비율은 2와 3사이(Gillam 등, 1993)의 보고와 비슷하였다. 따라서, HL 110 microsomes에 의한 AFB₁의 대사는 그 대부분이 P450 3A4에 의해 진행되었다고 분석되었다.

2. Troleandomycin에 의한 AFB₁ 대사의 억제

본 실험조건에서 P450 3A4의 활성화에 의해 AFB₁이 exo-epoxide와 AFQ₁으로 대사되는 양은 반응시키는 시간이 20분까지는 시간에 따라 비례하다가 20분부터는 그 증가율이 점차 감소되었다(Fig. 2). 그러나, 반응의 전 구간에서 형성된 AFQ₁과 exo-epoxide의 비율은 2.43 ± 0.03 으로 촉매반응의 속도에 관계없이 일정한 비율로 대사물질들을 합성하였다. P450 3A계 효소들의 mechanism-based inhibitor로 알려진 troleandomycin을 효소와 NADPH-generating system에 AFB₁과 동시에 첨가하면, 반응시간에 따른 AFQ₁와 exo-epoxide의 생성량은 대조군에 비해서 5분에서 $74.3 \pm 7.0\%$ 와 $74.7 \pm 8.2\%$, 10분에서 $71.7 \pm 4.7\%$ 와 $72.2 \pm 6.2\%$, 20분에서 $63.1 \pm 4.6\%$ 와 $64.2 \pm 5.1\%$ 그리고 30분에서는 $56.3 \pm 4.3\%$ 와 $55.5 \pm 6.1\%$ 등으로 각각 감소되어 반응

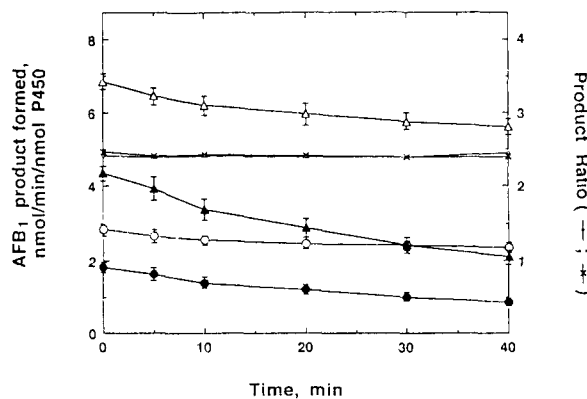


Fig. 2. Effect of troleandomycin on AFB₁ oxidations in human liver microsomes as a function of incubation time. Human liver microsomes were incubated with NADPH-generating system, glutathione, mouse cytosol and 50 μ M AFB₁ in the presence (filled circles and triangles) or in the absence (open circles and triangles) of 100 μ M troleandomycin for the indicated time at 37°C. The formation of exo-epoxide (circles) and AFQ₁ (triangles) were measured by HPLC. Each product ratio of AFQ₁ to exo-epoxide was shown as -○- in the presence of troleandomycin or -×- in the absence of troleandomycin.

중 troleandomycin의 억제효과가 반응시간에 비례적으로 점차 증가하였다. 그러나 troleandomycin이 존재하여도 두 가지 대사산물의 형성비율은 반응의 전 시간에 걸쳐서 2.42 ± 0.04 로 대조군과 같았다.

Troleandomycin을 HL microsomes과 NADPH-generating system에 첨가하여 mechanism-based inhibitor로 전환시키는 전처리 반응을 진행시킨 후 AFB₁과 glutathione을 첨가하여 그 대사속도를 20분간 측정하였다(Fig. 3). 전처리 과정 중 troleandomycin을 첨가하지 않은 대조군에서 exo-epoxide와 AFQ₁의 생성속도는 전처리 과정의 시간에 따라 같은 비율로 완만하게 줄어들어 40분이 경과하면 전처리 반응을 거치지 않은 것의 17-18% 정도가 감소되었다. P450 3A4의 활성화에 대한 troleandomycin의 억제효과는 전처리 시간이 경과됨에 따라 민감하게 증가하였다. 즉, AFQ₁와 exo-epoxide의 생성속도는 전처리 시간이 0, 5, 10, 20, 30, 그리고 40분일 때에 각각에 대한 대조군의 $63.7 \pm 2.9\%$ 와 $65.1 \pm 4.7\%$, $61.6 \pm 4.8\%$ 와 $61.7 \pm 5.2\%$, $54.5 \pm 5.1\%$ 와 $55.1 \pm 4.3\%$, $48.2 \pm 2.8\%$ 와 $48.8 \pm 3.7\%$, $41.8 \pm 4.2\%$ 와 $42.1 \pm 5.0\%$ 그리고 $37.1 \pm 3.7\%$ 와 $36.3 \pm 3.8\%$ 등으로 나타났다. AFQ₁와 exo-epoxide의 형성비율은 대조군에서 2.42 ± 0.02 그리고 troleandomycin 처리군에서 2.41 ± 0.03 으로 나타났다. 이 결과들은 troleandomycin이 AFB₁을 두가지물질로 대사하는 P450 3A4의 활성을 동시에 동일한 정도로 억제하여 mechanism-based inhibitor로 작용하고 있는 것으로 분석되었다.

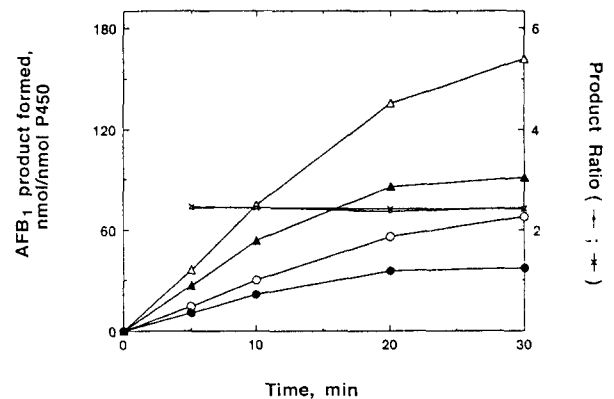


Fig. 3. Inhibition of AFB₁ oxidation following the incubation in human liver microsomes with NADPH-generating system and troleandomycin. Human liver microsomes were preincubated at 37°C for the indicated time with an NADPH-generating system in the presence (filled circles and triangles) or in the absence (open circles and triangles) of 100 μ M troleandomycin. After the preincubation, 50 μ M AFB₁ was added to all reaction mixtures and further incubated for 20 min. The formation of exo-epoxide (circles) and AFQ₁ (triangles) were measured by HPLC. Each product ratio of AFQ₁ to exo-epoxide was shown as -○- in the presence of troleandomycin or -×- in the absence of troleandomycin.

3. Glutathione이 troleandomycin에 의한 AFB₁ 대사의 억제에 미치는 영향

Troleandomycin은 백서의 P450 3A1과 P450 3A2(Pessayre, 1983; Delaforge 등, 1983; Vage 및 Svensson, 1994) 그리고 인체의 성인 간 조직의 P450 3A4와 P450 3A5(Pessayre 등, 1982; Lindstrom, 1993)에 의해서 대사된 후 그 효소들의 catalytic site를 이루고있는 heme의 Fe(II)와 화학적으로 안정한 MI complex를 형성하여 P450 3A계 효소들의 활성을 동일한 기전으로 저해하는 것으로 알려졌다. 백서에 troleandomycin을 *in vivo*로 투여하면 간 조직에서 MI complex의 형성량이 증가하는데, 이 증가에 반비례적으로 간 조직내의 glutathione의 농도는 감소되었다(Pessayre 등, 1983). 또한 백서 간 조직의 microsomes에 NADPH-generating system과 troleandomycin을 *in vitro*로 반응시켜도 대사가 진행되어 MI complex가 형성되는데, glutathione을 반응 초기부터 첨가하면 MI complex의 형성을 차단한다. 백서에서 MI complex를 해리시키면 P450 3A 효소들의 활성이 재생됨으로 glutathione이 MI complex의 형성을 막아주는 것은 백서의 P450 3A1과 P450 3A2의 활성을 troleandomycin으로부터 보호하는 작용일 것이다. 따라서 troleandomycin이 백서와 인간 간 조직의 P450 3A계 효소들을 같은 기전으로 저해한다면 glutathione이 본 실험조건에서도 troleandomycin의 억제효과를 차단할 가능성이 있을 것이다.

이를 밝히기 위해 troleandomycin, HL 110 microsomes 및 NADPH-generating system 등을 전처리반응으로 30분간 진행시킨 후에 기질과 함께 glutathione을 투여한 군과 전처리과정에 troleandomycin과 함께 glutathione을 투여한 군에서 AFB₁의 대사를 조사하였다(Fig. 4). 단, exo-epoxide를 glutathione과의 conjugate로 전환시키기 위해 첨가하는 glutathione의 일반적인 농도는 5.0 mM(Gillam 등, 1993)정도인데, 이 농도에서 AFB₁의 대사반응이 약간 저해되고 있음이 관찰(data not shown)되어 2.0 mM로 줄였다. 첨가되는 glutathione의 농도가 부족하여 conjugation 반응이 제대로 진행되지 않으면 Ueng 등(1995)의 보고와 같이 exo-epoxide가 glutathione과 결합치 않고 그대로 가수분해되어 AFB₁-8,9-dihydrodiol로 전환되는데, 이 물질은 reversed-phase C-18 column으로 분석하면 exo-epoxide와 AFQ₁이 용출되는 t_R값 사이에서 나타난다. Fig. 1A와 Fig. 1B에서와 같이 본 실험조건에서도 glutathione의 농도를 줄였음에도 AFB₁-8,9-dihydrodiol이 형성되지않아 2 mM의 glutathione은 AFB₁ 대사에 영

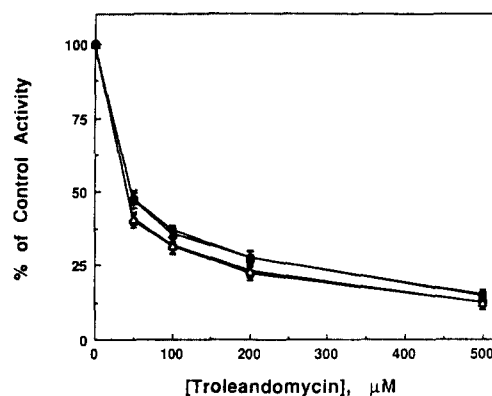


Fig. 4. Inhibition of AFB₁ oxidations by troleandomycin according to the presence of glutathione in the preincubation mixtures. Reaction mixtures which contained the indicated concentrations of troleandomycin were prepared as described under Materials and Methods. Half of the samples (filled circles and triangles) were preincubated with 2 mM glutathione for 20 min at 37°C. AFB₁ and mouse cytosol were then added and the reactions were continued for 20 min at 37°C. The rest of them (open circles and triangles) were preincubated without glutathione for 20 min at 37°C. After preincubation, AFB₁, mouse cytosol and glutathione were added and the reactions were continued for 20 min at 37°C. The formation of exo-epoxide (circles) and AFQ₁ (triangles) were measured by HPLC.

향을 주지 않았다. Fig. 4는 glutathione이 전처리과정에 먼저 투여되면 기질인 AFB₁을 첨가할 때 투여한 군보다 troleandomycin의 억제효과가 덜 나타났으나 그 차이는 매우 적었다. 특히, 500 μM에서 AFQ₁와 exo-epoxide의 생성속도는 전처리 과정에 glutathione이 존재할 경우, 각각 대조군의 14.5±1.0%와 14.9±1.8%이였으며, 전처리 반응 후에 첨가할 때는 각각 12.5±2.4%와 12.1±2.1%이였다. 또한 glutathione이 전처리 반응에 첨가되어도 첨가된 troleandomycin의 모든 농도범위에서 AFQ₁과 exo-epoxide의 형성비율은 2.41±0.04로, Fig. 2와 Fig. 3에서 나타난 비율과 같아, AFB₁을 AFQ₁과 exo-epoxide로 대사하는 P450 3A4의 활성들이 같은 정도로 감소되고 있음을 보여준다. 그러므로, Fig. 4의 결과는 P450 3A4가 troleandomycin을 mechanism-based inhibitor로 전환시키는 기전이 P450 3A1이나 P450 3A2의 기전과 다를 가능성을 시사해주고 있다.

4. Glutathione이 MI complex 형성에 미치는 영향

Glutathione이 인체 간 조직의 microsomes과 troleandomycin에 동시에 첨가해도 P450 3A4의 활성이 억제되었는데 이는 P450 3A4에 의해 troleandomycin이 mechanism-based inhibitor로 전환되는 반응이 glu-

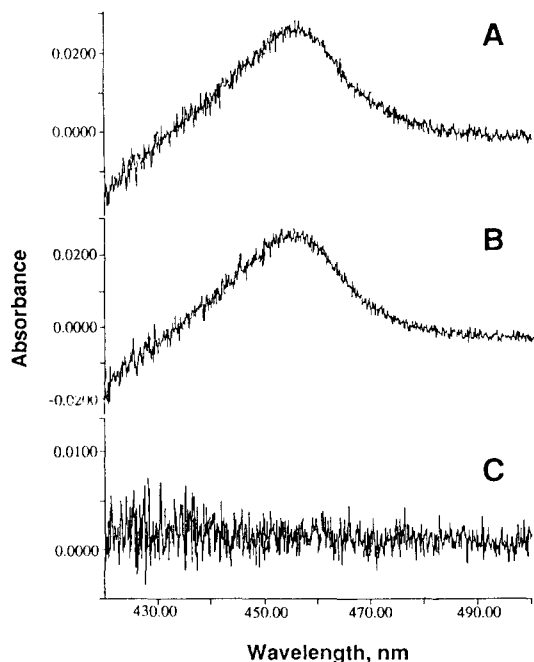


Fig. 5. *In vitro* formation of a cytochrome P450 MI complex from troleandomycin. Human liver microsomes were incubated with 200 μ M troleandomycin and 1.0 mM NADPH in the absence (A) or in the presence (B) of 2.0 mM glutathione. The MI complex formed in B experiment was destroyed by the addition of 50 μ M potassium ferricyanide (C).

tathione에 무관하게 진행되어 MI complex의 형성을 통해 P450 3A4의 활성이 저해되었던지, 혹은 glutathione이 전처리 과정에 존재하면 백서의 간조직의 P450 3A1이나 P450 3A2와 같이 MI complex의 형성은 차단(Pessayre 등, 1983)되나 반응혼합물에 존재하는 대사되지 않은 troleandomycin이 P450 3A4의 기질 결합부위에 결합하여(type I binding; Lindstrom 등, 1993) nifedipine 등과 같은 기전으로(Oh 등, 1995), AFQ₁과 exo-epoxide 등의 형성이 동시에 억제되었을 수도 있을 것이다. 이를 밝히기 위해서, *in vitro*에서 P450 3A4가 troleandomycin를 대사하는 과정에서 만들어지는 MI complex의 형성에 glutathione이 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5).

Fig. 5A는 1 mg/mL의 HL 110 microsomes을 200 μ M의 troleandomycin과 1 mM의 NADPH와 반응시켰을 때 형성되는 MI complex로 456 nm에서 최대로 빛을 흡수하고 있는 것을 보여준다. MI complex의 흡광 계수가 64 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pershing과 Franklin, 1982)이므로 HL 110 microsomes내 mg protein당 포함되어있는 0.87 nmol P450 함량 중 48%인 mg protein당 0.42 nmol의 P450이 MI complex를 형성하였다. HL 110 microsomes내에 P450 3A4가 약 60% 정도 분포(Guengerich,

1990)되어 있으므로 80% 정도의 P450 3A4가 MI complex를 형성한 것으로 계산되었다. Fig. 5B는 2.0 mM의 glutathione이 존재하여도 MI complex가 0.40 nmol/mg protein 농도로 형성되어 MI complex의 형성에 glutathione이 거의 관여하지 않음을 보여주었고, P340 3A4의 활성 억제 정도(Fig. 4)와 MI complex 형성 정도도 일치하였다. 이 결과는 HL 110 microsomes의 P450 3A4는 MI complex가 1.0 mM과 2.5 mM의 glutathione에서 각각 $8 \pm 5\%$ 및 $2 \pm 3\%$ 로 감소되는 백서 간조직의 P450 3A1과 3A2(Pessayre, 1983)와는 다른 기전으로 troleandomycin을 대사하고 있는 것을 나타내주었다. Fig. 5C는 Fig. 5B에서 형성된 MI complex가 ferricyanide에 의해 환원될 때 사라지는 것을 보여 주어 456 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 물질이 MI complex임을 확인시켜 주었다.

이상의 결과들에 의하면 troleandomycin은 백서의 P450 3A1과 3A2나 인체 간조직의 P450 3A4에 의해 대사되어 그 효소들의 활성 부위와 MI complex를 형성하는 mechanism-based inhibitor임은 분명하지만, glutathione이 MI complex 형성에 미치는 영향은 P450 3A1/2와 P450 3A4간에 전혀 다르게 대응하였다. 이는 백서나 인체의 P450 3A계 효소들이 troleandomycin을 아직 밝혀지지 않은 서로 다른 기전으로 대사시키든지, 혹은 동일한 기전으로 대사하지만 각 microsomes 내의 서로 다른 계열의 P450 효소들에 의해서 troleandomycin의 대사가 영향을 받아서 보여지는 현상일 수도 있을 것이다. 이를 알아보기 위해 본 연구진은 P450 3A1, P450 3A2, P450 및 P450 3A4 등의 cDNA를 *E. coli*에서 발현시킨 정제된 효소를 이용하여 더 조사하고자 한다.

참고문헌

- Battista, J.R. and Marnett, L.J. (1985): Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of aflatoxin B₁, *Carcinogenesis* **6**, 1227-1229.
- Delaforge, M., Jaouen, M. and Mansuy, D. (1983): Dual effects of macrolide antibiotics on rat liver cytochrome P-450, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2309-2318.
- Gillam, E.M.J., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S. and Guengerich, F.P. (1993): Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 123-131.
- Gillam, E.M.J., Guo, Z., Ueng, Y.-F., Yamazaki, H., Cock, I., Reilly, P.E.B., Hooper, W.D. and

- Guengerich, F.P. (1995): Expression of cytochrome P450 3A5 in *Escherichia coli*: Effects of 5' modifications, purification, spectral characterization, reconstitution condition and catalytic activities, *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 374-384.
- Guengerich, F.P. (1992): Characterization of human cytochrome P450 enzymes, *The FASEB J.*, **6**, 745-748.
- Guengerich, F.P. (1990): Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P-450 3A4 by gestodene, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 363-371.
- Guengerich, F.P., Ueng, Y.-F., Kim, B.-R., Langouet, S., Coles, B., Iyer, R.S., Thier, R., Shimada, T., Yamazaki, H., Ketterer, B. and Guillouzo, A. (1995): Activation of toxic chemicals by cytochrome P450 enzymes; Regio- and stereoselective oxidation of aflatoxin B₁, In Proceedings, Biological Reactive Intermediates V, in press.
- Guo, Z., Gillam, E.M.J., Ohmori, S., Tukey, R.H. and Guengerich, F.P. (1994): Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization and catalytic properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **312**, 436-446.
- Harris, J.W., Rahman, A., Kim, B.R., Guengerich, F.P. and Collins, J.M. (1994): Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and of an unknown P450 enzyme, *Cancer Res.*, **54**, 4026-4035.
- Kim, B.R., Baba, T., Gillam, E.M.J. and Guengerich, F.P. (1993): 3 α -hydroxylation and 8,9-epoxidation of aflatoxin B₁ by cytochrome P450 3A4: Evidence for allosteric behavior in microsomal membranes and a recombinant enzyme, *FASEB J.*, **7**, A1168.
- Lindstrom, T.D., Hanssen, B.R. and Wrighton, S.A. (1993): Cytochrome P450 complex formation by dirithromycin and other macrolides in rat and human livers, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**, 265-269.
- Lasker, J.M., Huang, M.-T. and Coelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. (1993): The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA and Cell Biol.*, **12**, 1-51.
- Oh, H.S., Lee, K.S. and Kim, B.R. (1995): Effects of several inhibitors of human liver microsomal cytochrome P450 3A4 on catalytic activities of the enzyme, *Korean J. toxicol.*, **11**, 23-29.
- Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- Pershing, L.K. and Franklin, M.R. (1982): Cytochrome P450 metabolic-intermediate complex formation and induction by macrolide antibiotics: A new class of agents, *Xenobiotica*, **12**, 687-199.
- Pessayre, D., Larrey, D., Vitaux, J., Breil, P., Belghiti, J. and Benhamou, J.-P., (1982): Formation of an inactive cytochrome P450 Fe(II)-metabolite complex after administration of troleandomycin in humans, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 1699-1704.
- Pessayre, D., Tinel, M., Larrey, D., Cobert, B., Funck-Brentano, C. and Babany, G., (1983): Inactivation of cytochrome P-450 by a troleandomycin metabolite. Protective role of glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **224**, 685-691.
- Porter, T.D. and Coon, M.J. (1991): Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulation mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469-13472.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J., McManus, M.E., Tassaneeyakul, W., Veronese, M., Andersson, T., Tukey, R.H. and Miners, J.O. (1994): Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: Contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms, *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1767-1776.
- Ueng, Y.-F., Shimada, T., Yamazaki, H. and Guengerich, F.P. (1995): Oxidation of aflatoxin B₁ by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes, *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 218-225.
- Vage, C. and Svensson, C.K. (1994): Evidence that the biotransformation of dapsone and monoacetyldapsone to their respective hydroxylamine metabolites in rat liver microsomes is mediated by cytochrome p450 2C6/2C11 and 3A1, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 391-398.
- Wrighton, S.A., Brian, W.R., Sari, M.A., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Raucy, J.L., Molowa, D.T. and VandenBranden, M. (1990): studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450 3A5, *Mol. Pharmacol.* **38**, 207-213.