COMMENTARY

抱合反応の機構解析と構造決定

Reaction Mechanism of Amino Acid Conjugation
and Determination of the Structure

糟谷 史代*

Fumiyo KASUYA

(Received January 25, 2001; Accepted March 7, 2001)

Glycine conjugation is the most important route of detoxification, not only of many xenobiotic carboxylic acids but also of endogenous acids. However, the first reaction of glycine conjugation in some cases is reported to involve a class of active intermediates implicated in toxicity. The pathway of glycine conjugation consists of two sequential reactions. To elucidate the factors that regulate glycine conjugation, benzoic acid derivatives, acyl-CoAs as the active intermediates and glycine conjugates were simultaneously determined by LC-ESI-MS. Three compounds were collected from the microdialysis probe immersed into mitochondrial incubation mixture. A rate-limiting step was found to be the linkage to the amino group of glycine in a reaction that is catalyzed by acyl-CoA glycine: *N*-acyltransferases. However, the medium chain acyl-CoA synthetase catalyzing the initial reaction of glycine conjugation was the rate-limiting enzyme. Further, it was suggested that the stability of acyl-CoAs is one of the factors that determine the metabolic fate of xenobiotics containing a carboxylic group.

薬物の第二相抱合反応による解毒の一つにアミノ酸抱合がある。アミノ酸抱合はカルボキシル基含有外来異物（薬物、農薬、殺虫剤など）および内因性物質（中鎖脂肪酸など）の解毒に大きな役割を果たしている。また、有機酸代謝異常者の体内に過剰に蓄積された物質をアミノ酸抱合体として体外に排泄する¹⁾。しかし、一方で、カルボン酸類がアミノ酸抱合を受ける過程において解毒の経路ではなく、脂質の生合成系に作用して、毒性化の過程をたどることも報告されている²⁾。

アミノ酸抱合はミトコンドリアにおいて、(1)カルボン酸の活性化 (acyl-CoAs の形成) に続いて、(2)アミノ酸の転移反応が起こることにより形成される。第1段階の反応は medium chain acyl-CoA synthetase により活性化され、第2段階は acyl-CoA : *N*-acyltransferase によって触媒される。しかしながら、medium chain acyl-CoA synthetase においては2種類の酵素 (Mahler 酵素³⁾ とサリ

チル酸活性化酵素⁴⁾ について部分精製の報告のみであり、この酵素系についてはほとんど情報がないのが現状である。したがって、解毒と毒性化の両方に関与する medium

chain acyl-CoA synthetase について精製し、性質などを明らかにしてきたが^{5)~14)}、その中で、アミノ酸抱合反応の調節機構について、質量分析から得られた結果を紹介したい。

1. グリシン抱合の律速段階

アミノ酸抱合としてグリシン抱合、タウリン抱合、グルタミン抱合などが報告されており、その中の最もよく観察されるグリシン抱合について述べる。グリシン抱合は2段階の反応よりなるが、どの段階が律速であるか確証はない。カルボン酸類が解毒あるいは毒性化のどちらの経路をたどるかは形成された acyl-CoAs 中間体の性質が重要なファクターになると考えられる。基質、活性中間体である CoA エステル体、グリシン抱合体の形成反応を経時的に追跡するために、マイクロダイアリシス法を用いて、これら3種を LC-ESI-MS (Quattro LC, Micromass) で測定した。また、酵素源としてはグリシン抱合活性の高い腎臓のミトコンドリアを用い、グリシン抱合を受けやすい安息香酸を基質に選んだ。移動相として酢酸アンモニウム buffer を用いることにより、正イオンモード測定で benzoyl-CoA 体の m/z 872 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンが感度良く検出できた (Fig. 1)。負イオンマススペクトルにおいては $[\text{M}-\text{H}]^-$ イオン以外に m/z 435 に2価のイオンも観察された。この移動相では馬尿酸 3.2 分、安息香酸 4.5 分、benzoyl-CoA 体 9.3 分の順にカラムより溶出した。benzoyl-CoA 体の形成は非常に速く、反応開始 5 分後には 81% の形成が観察された (Fig. 2)。それに対し、グリシンの転移 (グリシン抱合体の形成) は 5 分では全体の 4% に過ぎず、30 分

* 神戸学院大学薬学部 (〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-gakuin University (518, Arise, Ikawadani, Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan)

Fig. 1. Positive- and negative-ESI mass spectra of benzoyl-CoA. Column, Cosmosil 5C18-MS; mobile phase, 10 mM ammonium acetate - acetonitrile=80 : 20, v/v; cone voltage, (+) 55 V, (-) 40 V; flow rate, 0.8 mL/min.

まで直線的に増加した。転移されるグリシンが存在しない場合、形成された benzoyl-CoA 体は 40 分で消失し、安息香酸に戻った。腎ミトコンドリアを用いて反応速度論的解析を行ったところ、安息香酸の活性化反応 (benzoyl-CoA 形成) の K_m 値は低基質濃度では 177.0 μ M, 高基質濃度では 16.1 μ M となった。それに対し、グリシンの転移反応の K_m 値は 1.48 mM であった。これらの結果より、グリシン抱合の律速はグリシンの転移段階であることが明らかとなった。また、 K_m 値の測定結果より、腎における安息香酸のグリシン抱合体形成には少なくとも 2 種類の medium chain acyl-CoA synthetase と 1 種類の *N*-acyltransferase が関与していることが推察された。

3-Phenoxybenzoic acid に関してはエステル体に活性

化された後、トリグリセリドに取り込まれ毒性化の過程をたどることが報告されている。形成された 3-phenoxybenzoyl-CoA 体を測定したところ、安定であったのに対し、馬尿酸として解毒される安息香酸から形成された benzoyl-CoA 体は非常に不安定であった。これらの結果より、acyl-CoA 体の安定性により体内に入った異物の解毒化と毒性化の二者択一経路が決定されることが示唆された。

2. グリシン抱合の調節酵素

精製した medium chain acyl-CoA synthetase がグリシン抱合体形成にどの程度関与しているのか (律速酵素であるかどうか) を明らかにすることが必要である。この酵

Fig. 2. Time courses of formation of benzoyl-CoA and hippuric acid in mouse kidney mitochondria.

素が律速酵素であるかどうかについては詳細な検討がなされておらず、議論が分かれているところである。また、グリシン抱合体の形成は動物種や組織間において大きな差があることが報告されているけれども、まだ十分に明らかにされていない。さらに、化合物の構造とそれらグリシン抱合体との関係を明らかにすることは、解毒のメカニズム、特に酵素と化合物との相互作用を解明するうえで重要である。これらの理由により、まず、グリシン抱合を受けやすい化合物として安息香酸誘導体を選び、マウスの肝と腎のミトコンドリアを用いてグリシン抱合体を *in vitro* 系で形成させた。マウスはラットに比べるとグリシン抱合以外のアミノ酸抱合を受けやすいことから、マウスを用いた。

2.1 安息香酸誘導体とグリシン抱合との構造代謝相関

グリシン抱合は安息香酸誘導体の置換基の種類や位置により大きく異なった^{9), 10), 12)}。肝臓と腎臓ともに、置換基がどの位置にあっても、メチル基、クロル基、フルオロ基を

有する安息香酸誘導体においては高いグリシン抱合体形成が観察された。メトキシ基が2位に置換した場合にはグリシン抱合体の形成が全く認められなかったのに対し (Fig. 3), 3位と4位置換体では高いグリシン抱合活性が見られた (Fig. 4)。肝臓と腎臓におけるグリシン抱合体形成の大きな違いは2位に置換基を有する場合に観察された^{11), 12)}。サリチル酸のグリシン抱合体は腎でしか形成されなかった。2位置換体のグリシン抱合体形成は肝よりもむしろ腎の方が高いことが明らかとなった。サリチル酸のグリシン抱合体形成には腎の役割が大きく、ヒトにおけるグリシン抱合体は68%が腎、32%が肝で形成されている¹⁾。グリシン抱合は基質となる化合物の化学構造に依存することがわかった。つまり、3位と4位置換体におけるグリシン抱合体形成は化合物の脂溶性と置換基の大きさによって影響されるが、2位置換体においては置換基の大きさが抱合体形成の主要な決定因子であることを明らかにした。一方、グリシン抱合の第一段階を触媒する medium chain acyl-CoA synthetase の基質になりやすい化合物の構造的特徴として、分子モデリング法による検討結果から、カルボキシル基の面と同一平面上にフラットな疎水性部分 (ベンゼン環) をもつ化合物が基質になりやすいことがわかった⁸⁾。ベンゼン環と同一平面上にカルボキシル基の面がくるコンフォメーションの形成は置換基によって大きく影響されることから、medium chain acyl-CoA synthetase の基質になりやすい化合物がグリシン抱合体形成を左右することが推察される。

2.2 グリシン抱合の律速酵素

精製 medium chain acyl-CoA synthetase がグリシン抱合体の形成にどの程度関与しているのかを明らかにするために、medium chain acyl-CoA synthetase による acyl-CoA 体生成活性とグリシン抱合活性との関係を求め

Fig. 3. Glycine conjugation of *ortho*-substituted benzoic acids in mouse liver and kidney mitochondria.

た (Fig. 4). 用いた medium chain acyl-CoA synthetase はマウス肝と腎, 各々より精製したが, どちらの酵素も基質特異性や阻害剤に対する感受性は同じであり非常によく似た酵素であった. 肝では相関係数 $r=0.963$ と非常に良い相関を示したのに対し, 腎では相関係数 $r=0.566$ と低

い結果しか得られなかった. マウス肝では精製酵素がグリシン抱合体形成の主要な酵素であり, 律速酵素であることが明らかとなった⁶. それに対し, 腎では基質特異性をオーバーラップした他のアイソザイムの関与が大きいのか, あるいは, 転移段階が反応にとって重要であるのか明らか

Fig. 4. Correlation between the activity of the medium chain acyl-CoA synthetase and glycine conjugation of the substituted benzoic acids.

Fig. 5. Effect of various reagents on the medium chain acyl-CoA synthetase purified from mouse liver mitochondria.

ではない。しかし、マウス腎において、安息香酸のグリシン抱合には少なくとも2種類の medium chain acyl-CoA synthetase が関与していることが推定された。また、マウスのミトコンドリアを用いた *in vitro* 系においてサリチル酸のグリシン抱合体形成は肝ではなく、腎でのみ観察された。さらに、精製 medium chain acyl-CoA synthetase はサリチル酸を含む2位置換安息香酸類に対し活性を示さなかった。これらの理由より、サリチル酸に活性を示す酵素は腎における発現量が多いために、それがグリシン抱合体形成の差になって現れたのであろう¹¹⁾。したがって、腎においても肝と同様に精製 medium chain acyl-CoA synthetase が律速酵素であることが示唆された。

2.3 Medium chain acyl-CoA synthetase 関与代謝系の阻害 (薬物相互作用)

Medium chain acyl-CoA synthetase がかわる代謝系 (アミノ酸抱合や脂肪酸代謝) に影響を及ぼす薬物などについては明らかにされていない。薬物代謝酵素の阻害による薬物相互作用の基礎的検討として、酵素の分子種とその分子種によって代謝される医薬品およびその分子種を阻害する医薬品との関係を求めておけば、医薬品の開発や臨床において薬物相互作用の可能性を推測できる。新たな薬物代謝酵素について阻害する医薬品を明らかにしておくことも重要である。Medium chain acyl-CoA synthetase は解熱鎮痛消炎剤の代謝酵素の一つである。副作用として、解

熱鎮痛剤によるライ症候群の発症が報告されており、この酵素阻害と何らかの関係があるのかもしれない。

現在、精製 medium chain acyl-CoA synthetase の活性を迅速かつ簡便に連続して測定する方法がない。活性は共役酵素を組み合わせ、還元型 NAD の減少量を 340 nm の吸光度で測定している。しかし、共役酵素を阻害しないことの確認が必要である。精製 medium chain acyl-CoA synthetase にかかわる薬物相互作用の検討にあたり、薬物の medium chain acyl-CoA synthetase への影響について、hexanoyl-CoA 体をダイレクトに LC-ESI-MS で測定し、酵素連続反応測定法により得られた結果と比較した。阻害する薬剤のうちサリチル酸を選び、サリチル酸による hexanoyl-CoA の形成抑制が確認できた。酵素はカルボキシル基の β 位に水酸基やケトン基を有する医薬品 (解熱鎮痛剤であるサリチル酸 ($K_i=19.6 \mu\text{M}$) やジフルニサル ($K_i=0.6 \mu\text{M}$), キノロン系抗菌剤であるナリジクス酸 ($K_i=12.4 \mu\text{M}$), ニューキノロン系抗菌剤であるエノキサシン ($K_i=23.7 \mu\text{M}$) やオフロキサシン ($K_i=38.2 \mu\text{M}$)) により強く競合的阻害を受けた^{13), 14)} (Fig. 5)。薬物相互作用として、ニューキノロン系抗菌剤と解熱鎮痛剤の併用投与による中枢性痙攣の報告がある。そのメカニズムとしては、GABA 応答に対するニューキノロン系抗菌剤による阻害が非ステロイド系消炎鎮痛剤により、その作用が増幅されるためであるとされている。最も強い痙攣を起こす薬剤の

Fig. 6. Positive-ion mass spectra of the glycine conjugates of 4-methyl-, 4-chloro-, 4-acetyl-, and 3-butoxy-4-amino-benzoic acids. Column, Cosmosil 5C18; nebulizer temperature, 300–340°C; drift voltage, 85 V; flow rate, 1.0 mL/min.

組み合わせとしてエノキサシンとフェルピナクスの併用が指摘されているが、本酵素もその薬剤の併用により強く阻害を受けることがわかった¹⁴⁾。薬物のアミノ酸抱合による解毒および中鎖脂肪酸の代謝系に影響を及ぼす薬物についての報告はなされていない。しかし、同じ薬剤の組み合わせにより medium chain acyl-CoA synthetase が影響されることは、*in vitro* の結果ではあるが、興味をもたれるところである。今回は精製した1種類の酵素についての結果を示したけれども、他のアイソザイムの阻害についてさらに検討する必要があると思われる。

3. 安息香酸誘導体のグリシン抱合体の LC-APCI- マススペクトルの特徴

グリシン抱合の調節機構の検討に、マウスの肝と腎ミトコンドリアを用いて、種々の安息香酸誘導体のグリシン抱合体を形成させたが、その同定は LC-APCI-MS で分析することにより行った。グリシン抱合体の分析と同定のためのマススペクトルの特徴を明らかにすることは薬物代謝や中毒の分野において有用である。そこで、グリシン抱合体分析のための一定の法則を導き、定義を試みた^{15)~17)}。

安息香酸誘導体は負イオンモードのみ測定可能であった (M-2000 Double-Focusing Mass Spectrometer, Hita-

chi)。グリシン抱合体は正イオン、負イオンの両モードで測定可能であった。正イオンモードの方がグリシン抱合体に特徴的なイオンを検出できたのに対し、負イオンモードでは置換基由来の情報をより多く得ることができた。

《グリシン抱合体の正イオンマススペクトル》

すべてのグリシン抱合体に $[M+H]^+$ イオンが観察され、さらにグリシン抱合体特有のイオン $[M-CH_2COOH+2H]^+$, $[M-NHCH_2COOH]^+$, $[M-CONHCH_2COOH]^+$ も検出された (Fig. 6)。置換基由来のイオンは観察されにくかったが、3位と4位にアルコキシル基とアセチルアミノ基を有する場合はこれらの置換基由来のイオンも検出できた。

《グリシン抱合体の負イオンマススペクトル》

すべてのグリシン抱合体に $[M-H]^-$, $[M-COOH]^-$, $[M-CONHCH_2COOH]^-$ イオンが検出された (Fig. 7)。酸の負イオンマススペクトルと同様に置換基由来のイオンもまた観察された。2位置換体に関して、*N*-(2-fluorobenzoyl) glycine では $[M-COOH-F-2H]^-$, *N*-(2-iodobenzoyl) glycine では $[M-COOH-I-2H]^-$ イオンが観察され、脱離しやすい置換基由来のイオンが検出された。

《グリシン抱合体の HPLC クロマトグラムにおける特徴》

Fig. 7. Negative-ion mass spectra of the glycine conjugates of 2-hydroxy-, 2-fluoro-, 2-methyl-, and 2-iodo-benzoic acids. Column, Cosmosil 5C18; nebulizer temperature, 300–340°C; drift voltage, 85 V; flow rate, 1.0 mL/min.

Mobile phases (water-methanol-acetic acid)	Substituted benzoic acids
(a) 50 : 50 : 0.6, v/v	4-Cl-, 4-CH ₃ -, 3-Cl-, 3-CH ₃ -, 3-C ₄ H ₉ O-4-NH ₂ -
(b) 60 : 40 : 0.6, v/v	H-, 4-CN-, 4-NO ₂ -, 4-CH ₃ O-, 4-CN-, 3-NO ₂ -
(c) 77 : 23 : 0.6, v/v	3-CH ₃ O-, 2-OH-, 2-Cl-, 2-F-, 2-I-, 2-CH ₃ -
	4-NH ₂ -, 3-NH ₂ -, 2-NH ₂ -, 2CH ₃ O-

安息香酸誘導体とそれらグリシン抱合体の HPLC クロマトグラムにおける特徴について、安息香酸誘導体の保持時間に対するグリシン抱合体の保持時間を相対保持時間として表したところ、3 位と 4 位置換体においては一定の値を示したのに対し、2 位置換体では大きな差が見られた。

2-Substituted benzoic acids

Relative $t_R = 0.39 \pm 0.12$ (mobile phase b and c)

3- and 4-Substituted benzoic acids

Relative $t_R = 0.36 \pm 0.02$ (mobile phase a and b)

Relative $t_R = 0.49 \pm 0.03$ (mobile phase c)

4. 結 語

アミノ酸抱合の酵素系についての研究は非常に遅れている。これは安全な代謝系であると考えられていたためであろう。しかし、主としてグルクロン酸抱合体として排泄されるケトプロフェンがミトコンドリアにおいてドリグリセライドに取り込まれるとの報告がなされ、活性中間体が脂質生合成系に作用して、外来異物が体内に蓄積される可能性が示唆されている。医薬品のみならず、環境ホルモンなどの化学物質が活性 acyl-CoA 体から毒性発現に関与する可能性もあり、今後、この酵素系についてさらなる検討が必要である。

文 献

- 1) A. J. Hutt and J. Caldwell, In "Conjugation Reactions in Drug Metabolism," ed. by G. J. Muler, pp. 273-305, Taylor & Francis Ltd., London (1990).
- 2) A. Carabaza, N. Suesa, and D. Tost, *Chirality*, **8**, 163-172

- (1996).
- 3) H. R. Mahler, S. J. Wakil, and R. J. Bock, *J. Biol. Chem.*, **204**, 453-468 (1953).
- 4) P. G. Killenberg, E. D. Davidson, and L. T. Webster, *Mol. Pharmacol.*, **7**, 260-268 (1971).
- 5) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *Drug Metab. and Dispos.*, **24**, 879-883 (1996).
- 6) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 805-809 (1996).
- 7) T. Masuda, K. Nakamura, T. Jikihara, F. Kasuya, K. Igarashi, M. Fukui, T. Takagi, and H. Fujiwara, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **15**, 194-200 (1996).
- 8) F. Kasuya, Y. Yamaoka, K. Igarashi, and M. Fukui, *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1769-1775 (1998).
- 9) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *J. Pharmacodyn.*, **13**, 432-440 (1990).
- 10) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *J. Pharmacodyn.*, **14**, 671-677 (1991).
- 11) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *Chemico-Biol. Interact.*, **118**, 233-246 (1999).
- 12) F. Kasuya, Y. Yamaoka, E. Osawa, K. Igarashi, and M. Fukui, *Chemico-Biol. Interact.*, **125**, 39-50 (2000).
- 13) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1643-1646 (1996).
- 14) F. Kasuya, M. Hiasa, Y. Kawai, K. Igarashi, and M. Fukui, *Biochem. Pharmacol.*, in press.
- 15) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *J. Chromatogr. A*, **654**, 221-228 (1993).
- 16) F. Kasuya, K. Igarashi, and M. Fukui, *J. Chromatogr. A*, **684**, 93-101 (1994).
- 17) F. Kasuya, K. Igarashi, M. Fukui, Y. Yanagawa, A. Kimura, and H. Fujiwara, *J. Chromatogr. B*, **746**, 25-31 (2000).

Keywords: LC-ESI-MS, glycine conjugation, rate-limiting, microdialysis