

◇ 총 설 ◇

## Microsomal Cytochrome P-450 에 대한 이론적 고찰

### The Theoretical Review on Microsomal Cytochrome P-450-Monooxygenases

한국인삼연초연구소

박 기 현

이물질(xenobiotics)을 포함한 생체내의 기질대사와 관련하여 microsomal cytochrome P-450에 대한 연구는 그 기작에 대한 분명한 이해를 하는데 최근까지도 여러 의문이 적지 않다.

특히 발암현상에서 cytochrome P-450-monoxygenase에 의한 이물질의 대사활성화의 중요성이 여러 학자들에 의해 강조되고 있지만 뚜렷한 결론을 내리기에는 아직 미흡하다.

다음의 총설은 P-450의 다양한 작용을 몇몇 분야로 나누어 서술하였으나 불충분한 부분이 적지 않다. 따라서 실험을 위한 방법론적인 내용이 라든가, 연구결과에 따른 구체적인 어떤 수치들을 참고하고자 할때는 본 총설에 제시한 인용문헌을 참조하길 바란다. 그리고 P-450에 대해 좀더 관심을 갖고 있는 분은 본인이 과거에 발표한 몇 편의 총설 즉, i) Cytochrome P-450 isoenzymes에 대한 최근의 연구동향(화학공업의 진보, 25(7), 497, 1985), ii) Microsomal Cytochrome P-450s의 특이성(생화학 총설집, 1, 309, 1986), iii) Microsomal Cytochrome P-450 동위효소에 의해 촉매되는 산화반응(한국연초학회, 8(2), 67, 1986), iv) Cytochrome P-450-monoxygenases 연구에서 유기용매의 중요성(생화학 뉴스, 7(3), 8, 1987) 등을 각각 참고하면 다소 도움이 되리라 생각된다.

본문에서의 약자는 아래와 같다.

P-450(cytochrome P-450), BP(benzo(a)pyrene), MC(3-methylcholanthrene), PB(phenobarbital), BNF( $\beta$ -naphthoflavone), PCB(polychlorinated biphenyl), PAH(polycyclic aromatic hydrocarbons), AHH(aryl hydrocarbon hydroxylase), ECDE(7-ethoxycoumarin O-deethylase).

#### 1. P-450의 일반적인 특성

동물조직중에서 간세포 총량의 약 15~20%는 microsomes로 구성되어 있으며, 간의 microsomes는 또한 간의 RNA의 50~60%를 갖고 있는데 그것은 ribosomes의 존재때문이다. 그리고 microsomes의 막은 지질이 상당히 많이 들어 있는데 이에 lipid, phospholipid, phosphatidylinositol, inositol, plasmalogen 그밖에 약간의 gangliosides를 갖고 있다.

간의 망상조직(endoplasmic reticulum)은 triglycerides, phospholipids, cholesterol의 합성에 이용되는 여러 효소들이 있다. 그러나 다양한 대사의 기능이 microsomes의 막에 존재하는 P-450 system에 의해 이루어 지는데 적어도 두 종류의 전자전달체인 flavo 단백질 즉,

NADPH-P-450 (cytochrom c) reductase와 NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase가 관여한다.

한편 barbiturate와 같은 P-450 유도물질을 흰쥐에 처리하면 microsomes의 총 단백질을 10% 정도 P-450가 증가되며 한 분자의 NADPH-cytochrome P-450 reductase는 20~30분자의 P-450과 상호반응한다. 두번째 전자 전달계는 cytochrome b<sub>5</sub>(b<sub>5</sub>), NADH-b<sub>5</sub> reductase, fatty acyl CoA desaturase로 구성되어 있으며, 지방산을 불포화 시키기 위해 NADH로부터 전자를 받는다. P-450 단백질들은 microsomal membrane에 좀 더 깊이 결합되어 있으며 NADPH-P-450 oxidoreductase분자의 3/4이상이 Fig.1과 같이 lipid bilayer에 자유롭게 분포되어 있다.

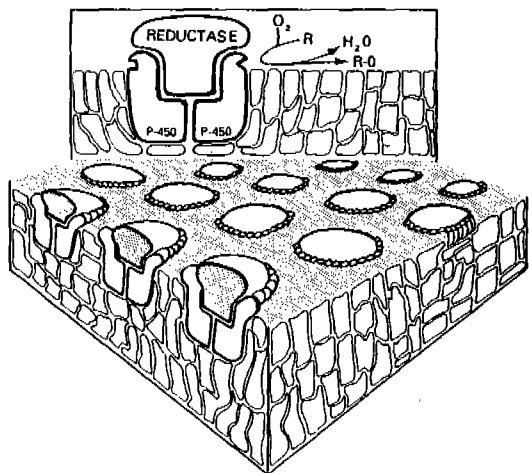


Fig.1. Three-dimensional concept of the monooxygenase system in the endoplasmic reticulum. R, substrate.

한편 포유류의 간조직 microsomes에는 화학양론적으로 P-450:NADPH-P-450 oxidoreductase가 10:1~100:1의 비율(범위)을 이루고

있다(Nebert & Gonzalez, 1987). 그런데 P-450은 단 하나의 효소를 말하는 것이 아니고 서로 다른 특성을 나타내는 한 그룹의 효소들이라

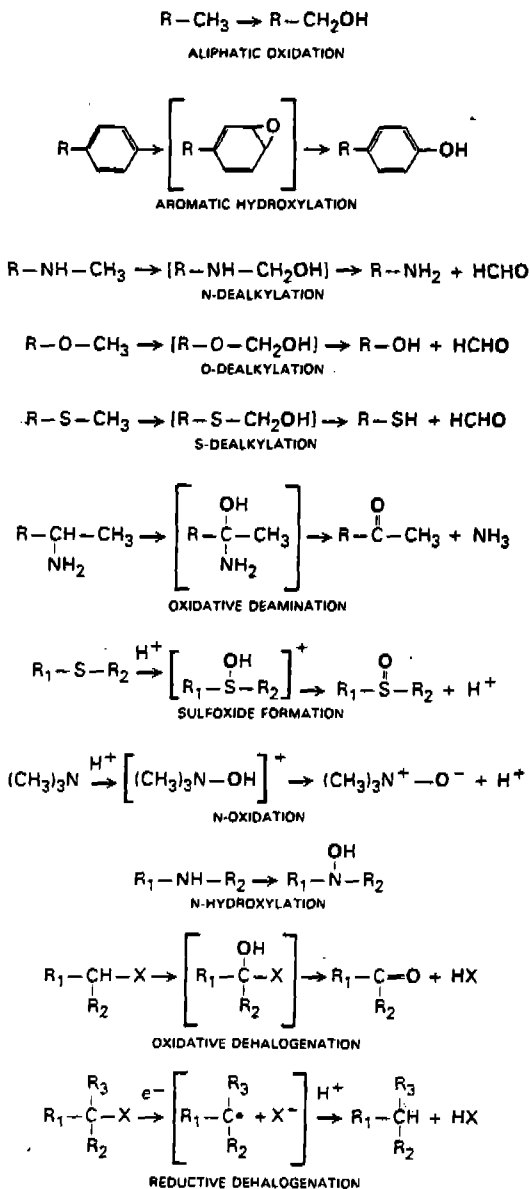


Fig.2. Examples of the many diverse monooxygenase activities of the P-450 enzymes. The oxygen derived from atmospheric oxygen is denoted by bold print.

말할 수 있으나 그 특이성이 자주 중복된다. 동물체의 간조직에 들어 있는 P-450에 대해 주로 많은 연구가 되어 왔으나 뇌와 신장, 폐는 물론 피부조직 그리고 작은창자의 장벽에도 P-450이 존재한다. 따라서 여러 동위효소로 구성된 P-450은 생체내 물질인 steroids 홀몬, arachidonic acid, 비타민 D, cholesterol 등과 생체밖 물질(또는 이물질)인 약물, 살충제, 발암성물질등을 oxidative biotransformation을 통하여 좀더 hydrophilic한 대사물질로 전환시킨다. P-450의 기능을 촉진(또는 활성도를 증가)시키는 데 NADH를 첨가하면 NADPH의 상승작용을 나타내기도 하는데 그 예로 aminopyrine(N-demethylation)의 대사속도는 NADH와 NADPH를 동량 첨가했을 때 그 속도가 거의 2배까지 증가된다(Vermillion & Coon, 1978).

일반적으로 microsomes 막에 결합되어 있는 수 많은 효소들의 활성도는 그들을 둘러 싸고 있는 인지질의 종류에 달려 있다. 인지질과 효소의 상호반응에 의한 효소의 활성도 발현에서 detergent가 인지질의 활성화 효과를 대신할 수 있으며 약 20배가 넘는 과량의 인지질이 최대효과를 위해 요구되는 것으로 보아 상대적으로 낮은 활성도를 나타낸다.

한편 Fig.2는 aliphatic, aromatic 화합물 등이 P-450-dependent monooxygenase에 의해 촉매되는 여러 반응예를 나열한 것으로 이 밖에도 생체내 기질과 이물질을 대사하는데 따른 monooxygenases의 역할이 적지 않게 보고되었다.

## 2. P-450에 의한 Cholesterol의 대사

P-450 효소계를 연구하는 학자들이 항상 관심을 갖는 가장 흥미있는 의문중의 하나는 대부분의 P-450 효소가 동물의 생리적인 대사에서 주된 역할을 담당하는지 또는 그 일부에만 관여하는지 하는 점이다.

P-450의 생체내 기질로서 현재까지 가장 집중적으로 연구된 물질중의 하나로 cholesterol을 들 수 있다.

생체내에서 steroid생합성은 cholesterol의 결가지중 C-20, C-22에서 수산화반응으로부터 시작되며 mitochondria에서 이 반응이 일어난다. 이에 관여하는 효소가 바로 P-450-hydroxylase이다. 넓은 기질특이성을 나타내는 microsomal P-450과는 달리 mitochondrial P-450은 대단히 철저한 구조적인 특이성을 갖는다. 그러나 microsomes에서와 같이 adrenal mitochondrial P-450도 membrane에 강하게 결합되어 있다.

현재까지 두 종류의 mitochondrial P-450이 분리되었는데 그 하나는 P-450<sub>sec</sub>(side chain cleavage enzyme)이며 이것은 cholesterol의 산화를 3번씩이나 촉매한다(Fig.3). 즉, isocaproaldehyde의 결가지를 분해시켜 여러 steroid의 전구물질인 pregnenolone을 생성한다. 또 다른 하나는 P-450<sub>11β</sub> 또는 11β-hydroxylase로서 glucocorticoid생합성 과정에서 최종의 수산화반응을 촉매한다. 그런데 이와 같은 반응은 adrenal cortex에서만 일어난다. 위의 두 종류의 mitochondrial P-450은 flavo 단백질과 iron sulfur 단백질로 구성된 같은 전자전달계를 공유한다. mitochondria의 수산화반응계의 단백질 성분은 박테리아의 P-450<sub>cam</sub>(camphor hydroxylase system)이 수용성이지만 mitochondria의 P-450은 mitochondria의 안쪽막에 결합되어 있는 것을 제외하고는 P-450<sub>cam</sub>과 유사하다.

Fig.3과 같이 cholesterol은 처음에 22R 위치에서 수산화되고 계속해서 20α 위치에서 일어난다. 3번째는 아직 밝혀지지 않은 메커니즘에 의해 pregnenolone을 생성하기 위해 diol의 산화적인 분해가 일어난다(Lambeth, 1985).

dihydroxycholesterol을 생성하는 과정을 자세히 쓰면 Fig.4에서 보는 바와 같이 reduc-

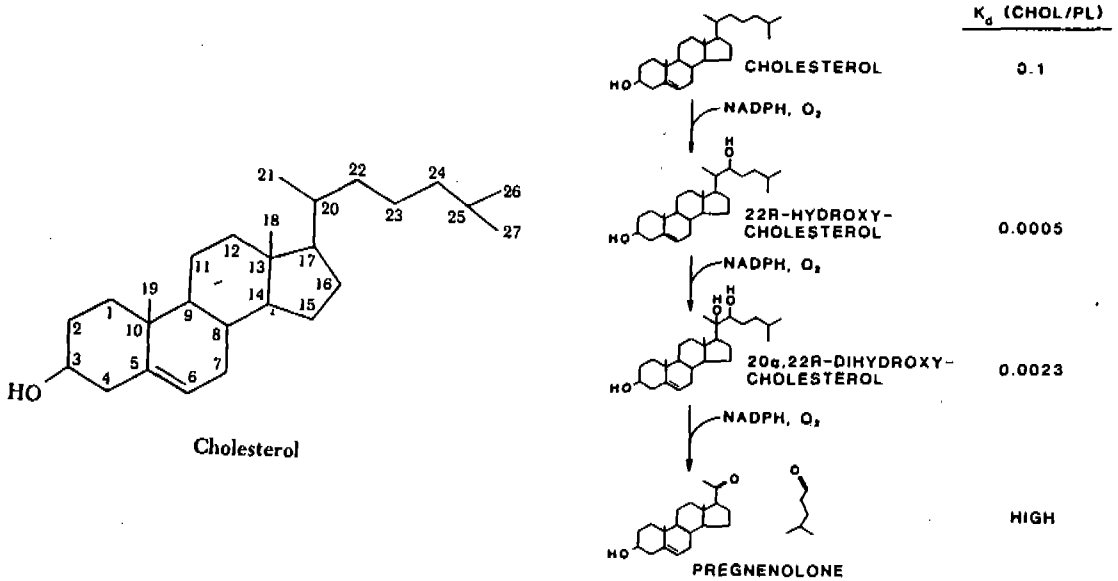


Fig. 3. Sequence of oxidations of cholesterol catalyzed by cytochrome P-450<sub>sc</sub>. The enzyme catalyzed sequentially a 22R-hydroxylation and a 20 $\alpha$ -hydroxylation; a third O<sub>2</sub>/NADPH-dependent oxidation results in the scission of the cholesterol side chain to yield pregnenolone (plus isocaproaldehyde). The hydroxylated intermediates are bound significantly more tightly to the enzyme than is cholesterol, thus preventing release and accumulation of these steroids.

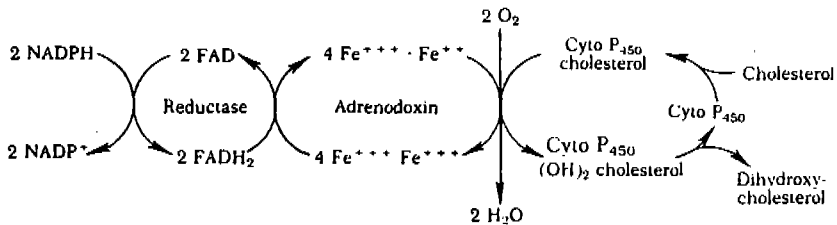


Fig. 4. Oxidations of cholesterol by electron transfer.

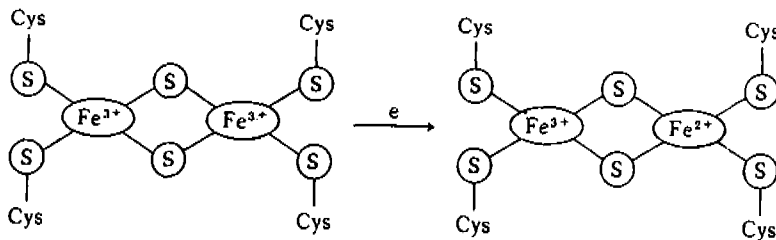


Fig. 5. Structure of adrenodoxin.

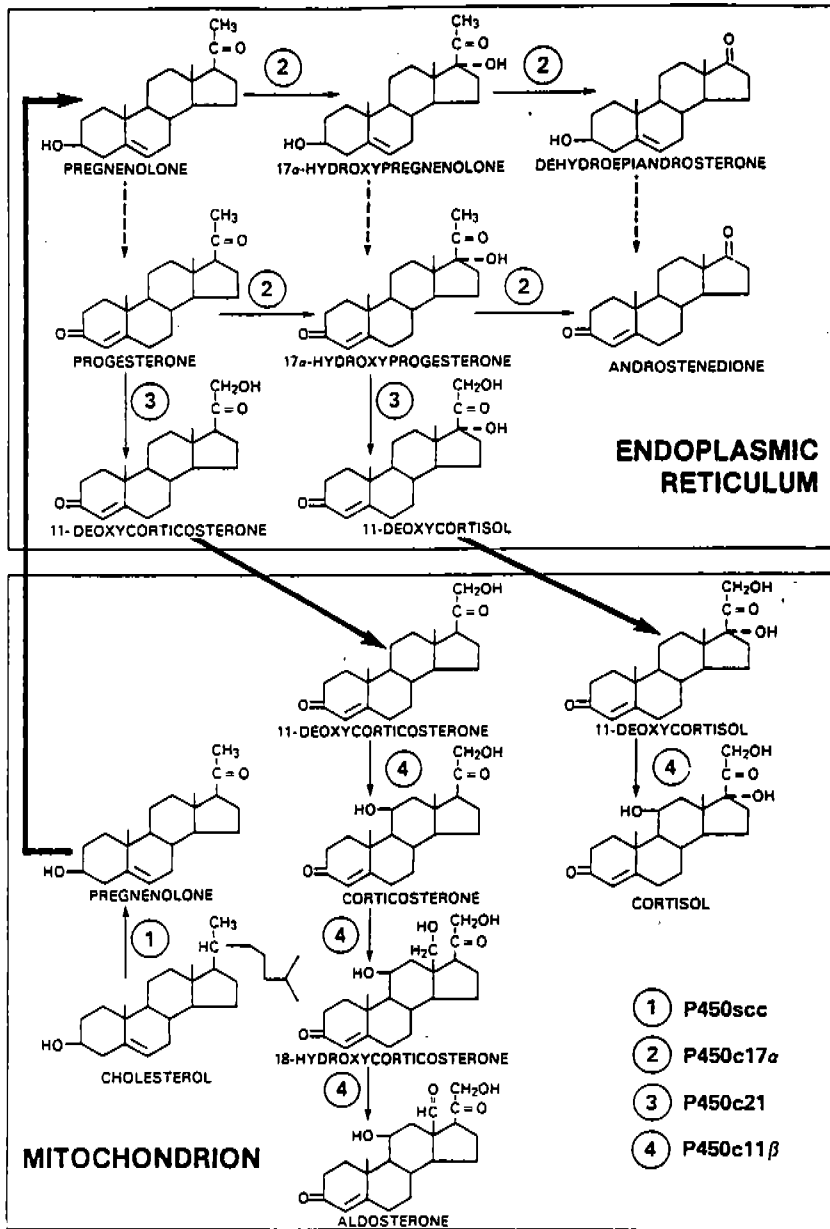


Fig. 6. Metabolic pathways leading to the mitochondrial (*bottom*) and microsomal (*top*) biosynthesis of sex steroid and mineralocorticoid hormones and the key steps involving four P-450 monooxygenases. The involvement of 11 $\beta$ -hydroxylase in the two steps between corticosterone and aldosterone has recently been established. Estrogens and testosterone are formed by the further metabolism of androstene-3,17-dione. scc, cholesterol side-chain cleavage.

tase는 adrenodoxin (M.W. = 22,000)을 환원 시키는데 이것은 iron-sulfur 단백질로서 adrenal mitochondria membrane에서만 발견된다. 이와 같은 adrenodoxin은 inorganic sulfur와 iron을 각각 두 원자씩 갖고 있으며 두 개의 철원자 각각은 두 분자의 cysteine-sulfur와 결합되어 있다 (Fig. 5). ferric iron들은 flavo 단백질로부터 P-450에 단 하나의 전자만을 전달한다.

이와 같은 과정을 거쳐 P-450이 관여하는 전자전달 반응에 의한 수산화반응에 따라 cholesterol이 20,22-dihydroxycholesterol로 된다 (James & Otto, 1982). 그러나 최종적으로 생성된 pregnenolone은 생체내에서 또 다시 각종 P-450-dependent monooxygenases에 의해 Fig. 6과 같이 망상조직의 microsomes와 mitochondria에서 산화적인 대사를 통해 sex steroid와 hormones으로 된다. 그런데 P-450<sub>sc</sub>와 11 $\beta$ -hydroxylase는 mitochondria 효소이지만 21-hydroxylase와 17 $\alpha$ -hydroxylase는 microsomes 효소로서 이들 4 종류의 효소는 핵의 유전자들에 의해 암호화 되어 있다 (Nebert & Ganzales, 1987).

mitochondria의 cholesterol이 P-450<sub>sc</sub>에 의해 대사된 후 그 대사산물이 망상조직의 P-450<sub>c17와 P-450<sub>c21</sub>에 의해 계속해서 대사되며 mitochondria의 P-450<sub>c11 $\beta$</sub> 에 의해 최종적으로 대사되는 과정은 대단히 흥미있는 일이다.</sub>

한편 steroids를 제외한 다른 지질은 서로 다른 여러 P-450의 기질로 이용되는데 뚜렷한 세 종류의 산화반응을 촉매한다. 즉, i)  $\omega$ -와  $\omega$ -1-hydroxylation, ii) epoxidation, iii) allylic oxidation으로  $\omega$ -oxidation이 정상적인 환류의 간에서 총 지방산 산화의 약 5%가 일어난다.

환류간의 P-450은 lauric acid(dodecanoic)와 같은 지방산의 수산화반응을  $\omega$ -와  $\omega$ -1-위치 양쪽을 촉매한다 (Michael, et al., 1986).

### 3. 비타민 D대사에서 P-450의 역할

비타민 D<sub>3</sub>의 천연형인 cholecalciferol은 전구물질인 7-dehydrocholesterol로부터 UV에 의해 피부에서 생성된다. cholecalciferol 그 자체는 생물학적으로 활성을 나타내지 않으며 이의 대사산물인 1,25-dihydroxycholecalciferol이 활성을 나타낸다. Fig. 7과 같이 이 물질은 cholecalciferol이 두 단계의 수산화반응을 거쳐 생성된다. 첫 단계의 반응은 간에서 일어나며 그 후의 반응은 신장에서 일어난다 (Olson, et al., 1976; Frazer & Kodicek, 1970; Gray, et al., 1971).

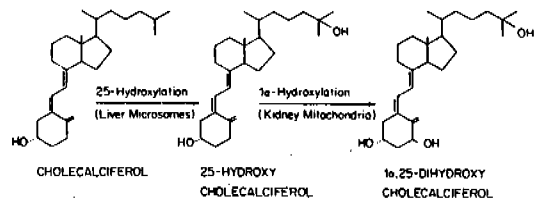


Fig. 7. Cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation reactions leading to production of active forms of vitamin D.

cholecalciferol 25-hydroxylase는 간의 망상조직에 있으며 이 효소는 전형적인 microsomal P-450 수산화 반응계로 밝혀졌다 (Madhok & Deluca, 1979). 간의 microsomal 25-hydroxylase와는 반대로 신장의 1 $\alpha$ -hydroxylase는 신장의 mitochondria에 존재한다. 수태하지 않은 동물에서 신장은 1 $\alpha$ -수산화반응이 일어나는 가장 중요한 장소이며 태반은 1 $\alpha$ -수산화반응이 일어날 수 있는 잠재적인 장소이다. 1 $\alpha$ -수산화 반응으로 부터 가장 큰 주목을 받는 25-hydroxycholecalciferol이 인체와 동물의 혈액에서 발견되는 비타민 D의 주된 대사물이다.

24-수산화반응은 여러 조직에서 일어나는데 특히 신장과 장에서 잘 일어난다. 신장의 mitoch-

ondria에서 일어나는 이 반응은 1 $\alpha$ -hydroxylase의 그것에 유사한 일종의 P-450-dependent system에 의해 촉진된다.

#### 4. P-450 에 의한 이물질(Xenobiotics) 대사

동물체의 간조직은 이물질의 대사를 위한 일차 기관이며 폐와 신장이 그 다음 기관으로 이와 같은 기관들이 기질에 따라 즉, 화합물을 대사하는데 간의 대사용량의 약 10~30%를 담당한다.

Table 1은 간의 microsomes가 이물질을 대사하는 능력을 기준으로 여러 조직으로부터 각각 분리한 microsomes의 이물질 대사능력을 상호 비교한 것이다. 따라서 근육, 뇌, 태반, 피부는 그 활성도가 상당히 낮음을 알 수 있다. 그런데 많은

Table 1. Capacity of various tissues for metabolizing compounds.

Organ or tissue	Capacity for metabolizing compounds (percent relative to liver microsomes)
Gut	10
Adrenal cortex	50-75
Testes	10-20
Spleen	5
Heart	3
Muscle	1
Brain	1
Placenta	1
Skin	1

화학물질들이 간에서 대사되는데 그 대사속도가 여러 요인에 의해 변경될 수 있다. 대사를 증가시키는 그와 같은 물질들을 “유도물질(inducers)”이라 하는데 microsomal P-450에서 좀 더 많은 P-450의 합성을 유도하거나 어떤 화합물을 특별히 효과적으로 대사시킬 수 있는 어떤 특정한 type의 P-450(동위효소) 합성을 유도하기 때문이다.

현재까지 수백종의 화학물질들이 이물질(xenobiotics) 대사의 유도물질로서 확인되었으며 그 일부를 Table 2에 나열하였다.

Table 2. Some compounds reported to induce biotransformation.

Drugs	Industrial chemicals
Aminopyrine	Alcohols
Amphetamine	Aldrin/dieldrin
Barbiturates	Chlordane
Chloral hydrate	Chloroform
Chlordiazepoxide (Librium)	DDT, DDD
Chlorpromazine	DMSO
Diazepam(Valium)	Heptachlor
Diphenhydramine	Ketones
Ethanol	Lindane
Ethanol pyridione	PCB compounds
Glutethimide	Piperonyl butoxide
Halothane	Pyrethrum
Imipramide	Toxaphene
Meprobamate	
Morphine	
Nicotine	
Phenylbutazone	Polyaromatic hydrocarbons
Phenytoin	Benz(a)pyrene
Promazine	Dibenzanthracene
Propoxyphene (Darvon)	3-Methylcholanthrene
Steroids	
Sulfanilamide	
Thalidomide	
Trimethadione	
Urethane	
Zoxazolamine	

P-450-monoxygenases에 의해 생성된 대사물 중 발암현상과 관련지어 가장 중요한 것은 고리화합물로부터 생성되는 epoxides로 이 물질이 돌연변이성 또는 발암성 물질로 분류되고 있어 화학적인 발암현상을 구명하는데 모델물질로 연구되고 있다. epoxides는 원래의 PAH화합물보다 극성이 더 크며 전구물질(PAH)보다 독성이 좀 더 크기 때문이다. 그러나 epoxides는 특히

불안정하여 phenol 을 형성하기 위해 스스로 재배열되기도 하지만 발암의 활성을 나타내기 위해 충분히 오랫동안 조직에 존재하는지도 모른다. 이 물질을 산화 또는 해독시키는 또 다른 중요한 효소는 epoxide hydrolase 인데 epoxide 를 dihydrodiol 로 대사한다. 이 물질도 극성을 나타내지만 epoxide 와는 달리 독성이 없으며 쉽게 배설된다. 그러므로 한번 생성된 epoxides 는 스스로 phenol 로 재배열될 수 있으며 epoxide hydrolase 에 의해 dihydrodiol 로 되기도 한다(Ellen, 1985).

한편 P-450 동위효소들은 benzene 과 이의 유도체를 epoxidation 시키는데 그 촉매정도가 서로 다르게 나타난다. 그리고 동위효소들은 epoxidation 에 대하여 서로 다른 regioselectivity 를 나타내는데 그 선택성의 차이는 생성된 폐놀대사산물의 차이로부터 알 수 있다. 즉, 대사산물들은 같은 기질로부터 생성되나 서로 다른 동위효소에 의해 서로 다른 위치(site)가 촉매되기 때문이다.

동위효소에 의한 epoxidation 에서 regioselectivity 의 차이는 정제한 P-450 과 NADPH-P-450 reductase 를 첨가한 재구성계에서 가장 확실한 증거를 얻을 수 있다. 그 예로 흰쥐의 PB-P-450 동위효소를 첨가한 재구성계에서 biphenyl 로부터 일차적으로 4-hydroxybiphenyl 이 생성되며, 흰쥐의 MC-P-450 동위효소에선 2-와 4-hydroxybiphenyl 이 0.44의 비율로 그 대사산물이 생성된다(Burke and Mayer, 1975). 그러므로 PB-동위효소는 biphenyl 의 3,4-oxides 생성을 촉진하고, MC-동위효소는 2,3-과 3,4-oxides 의 생성을 각각 촉진한다.

따라서 P-450 의 동위효소들이 나타내는 서로 다른 regioselectivity 는 생체내의 독성발현에 대하여 상당히 중요성을 갖는다.

bromobenzene 이 나타내는 간 독성은 PB 를 처리한 동물에서 촉진되고 MC-나 BNF-처리동물에선 감소한다. 이것은 PB-처리동물로부터 정

제된 P-450 에 의한 연구결과이며 bromobenzene 의 3,4-epoxidation 을 촉매하기 때문이다. 그러나 BNF-처리동물은 2,3-epoxidation 을 즉, 2,3-epoxide 형성을 촉매하며 생성된 이 물질은 3,4-epoxide 와 비교했을 때 간 독성을 나타내지 않기 때문이다(Lau & Zammcni, 1979; 1981; Lau, *et al.*, 1980).

따라서 benzene 과 이의 유도체들이 서로 다른 독성을 나타내는데 여러 P-450 동위효소들이 관련되어 있으며 Fig.8 과 같이 benzene 이 arene oxide 로 활성화 되는데 regioselectivity 의 차이뿐 아니라 대사산물의 제 2차적인 대사에서의 차이 때문에 독성의 발현과 그 정도가 서로 다르게 나타나는지도 모른다. 또한 DBA/2 와 C57BL/6 mice 를 실험동물로 한 연구에서(Longacre, *et al.*, 1981) benzene 이 DBA/2 에 보다 큰 독성을 나타낸다는 것은 같은 물질이라 하더라도 strain 에 따라 그 대사산물에 큰 차이가 있음을 시사하고 있다.

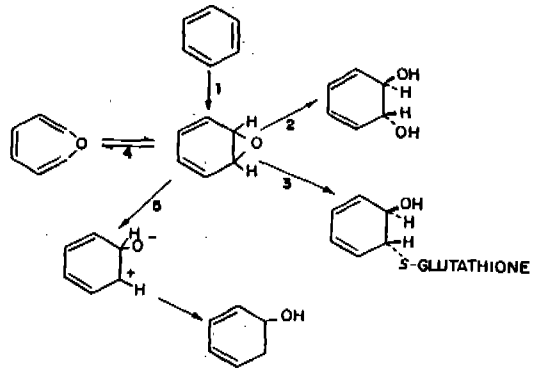


Fig.8. (1)The bioactivation of benzene to the arene oxide; (2)hydration of the arene oxide to the *trans*-dihydrodiol catalyzed by epoxide hydrolase; (3) spontaneous or glutathione S-epoxide transferase-catalyzed addition of glutathione; (4) tautomerism of benzene to the oxepin; (5) spontaneous isomerization of the arene oxide to the phenol via a carbonium ion intermediate.



PCBs는 생체내에서 활성화된 후 쥐, 생쥐 또는 토끼의 간 microsomes에서 고분자와 결합한다(Shimada & Sato, 1978). 이때 P-450유도는 그 결합을 증가시킨다. 그러나 간의 microsomes에서 PB에 의한 P-450 유도는 MC에 의한 유도보다 효과적이지만 신장의 microsomes에선 PB에 의한 유도가 효과가 없으며 MC에 의한 유도가 오히려 그 결합을 증가시킨다. 이로 미루어 P-450 동위효소 구성은 활성화된 화합물의 결합에 분명히 영향을 주는 것을 알 수 있다. 또한 CHO 세포에서 활성화된 4-chlorobiphenyl은 단백질은 물론 DNA, RNA에 공유결합하는데 총 결합의 85%를 차지한다. 그러나 그 중에서 DNA와의 결합율이 단백질의 3.5배나 된다. (Wong, *et al.*, 1979).

Benzene도 대사되어 활성화된 후 DNA와 공유결합한다. 그러나 bromobenzene이 일차적으로 간세포나 microsomes의 고분자와 결합하는데 benzene 유도체의 공유결합과 독성발현과의 상관관계는 현재까지 분명치 않다.

한편 흰쥐의 MC-microsomes에 의해 형성된 PAH 대사산물은 고도로 정제한 P-450c를 첨가한 재구성계에서 생성되는 대사산물들과 유사하다. 그 정제한 P-450c의 재구성계에서 얻어진 PAH 대사산물은 P-450의 단 하나의 동위효소가 PAH의 여러 위치를 산화시킬 수 있다는 것을 증명하는 것이기도 하다(Levin, *et al.*, 1982; Thomas, *et al.*, 1979; 1981).

흰쥐의 MC-microsomes에 비해 대조구의 microsomes는 총 P-450중 P-450c가 2%미만 존재한다(Thomas, *et al.*, 1981). 그러나 PB-microsomes와 대조구의 microsomes는 MC-microsomes에 의해 생성되는 PAH 대사산물이 거의 같다. 이와 같은 결과는 기질인 PAH에 대한 P-450의 여러 동위효소가 상당히 유사한 regioselectivity를 갖고 있음을 의미한다.

어떻든 결론적으로 P-450c는 PAH 대사에서의 specific selectivity와 regioselectivity

를 나타냄으로써 넓은 기질특이성을 보인다.

한편 P-450 system에 의해 Fig.9와 같이 toluene이 산화되기도 하며, azo 화합물과 nitro 화합물이 수소 첨가 반응에 의해 환원된다(Fig. 10). 따라서 azoreductase와 nitroreductase는 P-450과 NADPH-P-450reductase에 의해 그 활성을 나타낸다.

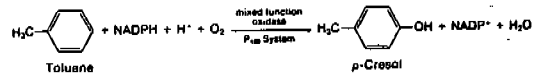


Fig.9. Oxidation of toluene by the mixed function oxidase.

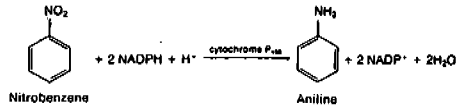


Fig.10. Reduction of nitrobenzene.

### 5. 출연이 태반의 P-450에 미치는 영향

태반(placenta)은 약리학과 독성학을 연구하는데 있어서 대단히 중요한 기관으로 태아에 이물질과 약물의 접근을 조절하는 주된 조직이기 때문이다.

실험동물의 간조직에서 약물대사를 연구하는 것에 비해 태반(특히, 인체태반의 경우)을 재료로 한 P-450-monoxygenases에 관한 연구는 어려움이 적지 않은데 그 이유중의 하나는 끈적끈적한 결체조직과 섬유조직이 상당히 많아 균질화 할 때 다른 조직(예 : 간)과 같이 쉽게 되지 않기 때문이다. 또한 그 과정에서 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라 강렬한 균질화 작업에 의해 순간적인 열이 발생되기 때문에 초원심분리한 후 pellet에 대한 P-450 함량과 monoxygenases 활성도는 각각 상당히 감소된 상태이므로 실험에 신중을 기하지 않으면 안된다.

태반으로부터 microsomes와 P-450의 분리가 상당히 까다로움에도 불구하고 세계의 여러 연

구실에서 집중적으로 연구되는 것은 태반에서 해독과 대사활성화에 대한 분명한 이해가 얻어질 수 있으리라는 기대 때문이다. 태반은 또한 내분비학적인 면에서 대단히 중요한 기관으로 여러 steroid 홀몬들이 태반에서 합성되기 때문이며 그중에서 좀 더 중요한 두 단계가 P-450 과 관련된 효소에 의해 촉진된다. 즉, aromatase 와 cholesterol-side chain cleavage 효소 (SCC 또는 CSCC)이다 (Tulchinsky and Ryan, 1980).

그러므로 태반에서 이물질 산화와 steroid 를 산화시키는 P-450 사이의 어떤 가능한 상관관계가 연구되어야만 한다.

한편 모체의 흡연에 의해 태반으로부터 AHH가 유도되며 (Welch, et al., 1969; Nebert, et al., 1969; Juchau, 1971; Pelkonen, et al., 1972), 이와 같은 유도는 개체차이와 어떤 환경요인들에 의해 특징지어진다 (Pelkonen, et al., 1978; Gurtoo, et al., 1983). 그러나 유전적인 것과 환경요인에 대한 관계, 그리고 monooxygenases 유도 메카니즘에 관련되어 상당한 의문점이 적지 않다. 흡연에 의해 유도되는 AHH와 관련된 P-450 은 여러 이물질들을 대사하는데 필요한 효소로 여러 종류의 유도물질 중에서 담배연기는 태반의 이물질대사를 유도할 수 있는 유일한 것이기도 하다 (Pelkonen, 1980; Juchau, 1980).

인체의 서로 다른 조직을 상호비교하면 (Table 3) 태반이 모체의 흡연에 의해 분명히 반응 하지만 인체의 간에서는 AHH 유도가 일어나지 않는다 (Vähäkangas, et al., 1983). 그러나 체외이식 조직이나 배양된 조직 그리고 세포는 배양중에 PAH 유도물질에 노출됐을 경우 유도능력이 생기기 때문에 위와는 메카니즘이 다소 다른것 같다 (Pelkonen & Nebert, 1982). 또한 태반의 체외이식조직이나 세포는 배양중에 AHH 유도능력을 잃기 때문에 예외가 된다 (Pelkonen & Moilanen, 1979).

한편 lymphocyte 는 사람에게 있어서 AHH 활성도의 유도능력을 측정하는데 기준조직으로 사용되고 있는데 배양중에 흡연에 관한 몇 가지 기억을 보유하게 되는것 같다. BP 대사를 연구하기 위해 Pelkonen 등 (1979) 은 태반의 explant culture 를 시도하였으나 유도물질 처리후 관찰되는 AHH는 상당히 낮았으며 그와 상응하는 태반에서의 AHH 활성도와의 어떤 상관관계를 찾지 못했다.

태반도 다른 조직에서와 같이 여러 환경요인과 식이들에 의해 많은 영향을 받는다. 어쨌든 태반은 간조직의 그것보다 그 활성도가 반정도 밖에 되지 않으며 그 관찰의 어려움은 위에 지적한 것 외에도 균질화한 태반 막에 hemoglobin, methemoglobin 이 강력히 결합되어 있어 활성도 측정등에 있어 방해물질이 되기 때문이다 (Juchau & Symms, 1972; Symms & Juchau, 1974). 즉, 여러 약물대사에서 hemoglobin 이 관여하며 spectrum 측정에서 heme 단백질이 방해 물질로 존재하기 때문이다 (Hodgsan & Juchau, 1977).

ECDE 는 AHH 와 같이 일반적으로 P-450c 동위효소에 의해 주로 그 활성도가 나타나는 것으로 알려졌으나 AHH 활성도 변화와는 달리 특이한 것은 ECDE 활성도가 태반의 경우에는 전혀 관계가 없다 (Table 4).

Table 3. Effect of cigarette smoking and phenobarbitone-type inducers on aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in different human tissues

Tissue	Induction of AHH activity by:	
	Cigarette smoke	Drugs
Placenta	+++	-
Lungs	(+)	-
Liver	-	++
Intestine	+	-
Lymphocytes <i>in vitro</i>	(+)	-

Table 4. Association of various placental monooxygenase activities with placental aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity

Placental monooxygenase activities closely correlated with placental AHH activity	Placental monooxygenase reactions not closely correlated with AHH activity
1. 5 & 7-hydroxylations of <i>N</i> -2-fluorenylacetamide	1. <i>N</i> -& 1-hydroxylations of <i>N</i> -2-fluorenylacetamide*
2. <i>N</i> -demethylation of 3-methyl-4-monomethylaminoazobenzene	2. <i>O</i> -deethylation of 7-ethoxycoumarin*
3. 6-hydroxylation of zoxazolamine	3. <i>N</i> -demethylation of <i>N</i> -methylaniline
4. Hydroxylations of 7,12-dimethyl-benz [a] anthracene	4. <i>N</i> -demethylation of <i>N</i> -methylaminobenzoic acid
	5. <i>N</i> -demetylation of chloromethyl-aniline
	6. 4-hydroxylation of biphenyl <sup>+</sup>

\* These activities were increased by preexposure to cigarette smoke, but were not positively correlated with AHH activity statistically <sup>+</sup>In rat placentas (Lake *et al.*, 1973)

인체의 태반에 관한 많은 연구는 흡연이 BP의 산화속도와 상관관계를 분명히 나타내고 있다. 그리고 7-ethoxycoumarin (Jacobson, *et al.*, 1974), zoxazolamine (Kapitulnik, *et al.*, 1977), 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (Juchau, *et al.*, 1978) 등의 산화속도가 비흡연자보다 흡연자의 태반에서 상당히 높게 나타난다. 이는 한 마디로 담배연기속에 존재하는 PAH 계열화합물들이 태반의 monooxygenases 활성도의 수준을 증가시키는 유도물질로 작용했기 때문이다.

그런데 흥미있는 것은 위에 제시한 Table 3에서 모체의 흡연에 의해 태반으로 부터 AHH가 유도되지만 모체의 간에서는 AHH유도가 일어나지 않는다고 Vähäkangas 등 (1983)이 지적한바 있으나 Conney(1986)는 그의 총설에서 그동안 이와 관련하여 보고된 논문들을 종합 검토한 후 수태한 흰쥐를 담배연기에 노출시키면 태반은 물론 흰쥐 자체의 간, 폐, 창자에서 AHH 활성도를 촉진시킨다는 상반된 보고를 하였다.

본 연구실에서도 이와 관련하여 흰쥐에 대한 흡연실험을 실시한 결과 (Park, *et al.*, 1988) 간

에는 전혀 영향을 주지 않음을 관찰하였다. 따라서 Conney (1986)의 보고는 본 저자의 견해와도 근본적으로 상반되고 있다. 그러나 실험방법에 따라 서로의 결과에 차이를 보일수 있으며 또한 인체와 흰쥐를 대상으로 한 각각의 관찰이란 면에서 좀 더 신중한 검토가 있어야 하겠다. 어쨌든 증가된 monooxygenase 활성도는 또한 흰쥐의 새끼의 간에서도 발견되는데 이것은 담배연기에서 효소유도물질이 태반을 통해 태아에 전달되었기 때문이다.

한편 Table 5와 같이 인체의 태반에서 발암물질과 여러 약물의 산화적인 대사에 대한 흡연의 영향에서 AHH는 물론 aminoazodye *N*-demethylase와 zoxazolamine hydroxylase 활성도를 상당히 촉진시키는 것으로 나타났으며 (Welch, *et al.*, 1968; 1969; Conney, *et al.*, 1971; Jacobson, *et al.*, 1974; Kapitulnik, *et al.*, 1976), 7-ethoxycoumarin의 *O*-dealkylation에 대한 흡연의 효과는 약간의 촉진효과만이 관찰되었다 (Jacobson, *et al.*, 1974).

이들 결과는 태반이 서로 다른 조절을 받으며 여러 monooxygenases가 존재한다는 것을 의

Table 5. Effect of cigarette smoking on the metabolism of chemicals by placenta.

Reaction measured	Enzyme activity in placenta	
	Nonsmokers	Cigarette smokers
Benzo [a] pyrene hydroxylation	0.5± 0.1 <sup>ab</sup>	31± 4
3-Methyl-4-monomethylamino-azobenzene N-demethylation	<4 <sup>c</sup>	26± 5
Zoxazolamine hydroxylation	0.4± 0.1 <sup>d</sup>	6± 2
7-Ethoxycoumarin O-dealkylation	29± 3 <sup>e</sup>	46± 5
Estrogen biosynthesis	44± 9 <sup>f</sup>	47± 5

Placentas from nonsmokers and from women smoked 7-40 cigarettes/day during pregnancy were examined for ability to metabolize several chemicals.

<sup>a</sup> Average ± S.E.

<sup>b</sup> nmol fluorescent phenolic metabolites equivalent to 3-hydroxy-benzo[a]pyrene formed per g placenta per hr.

<sup>c</sup> nmol 3-methyl-4-aminoazobenzene formed per g placenta per hr.

<sup>d</sup> nmol tritiated water formed per g placenta per hr.

<sup>e</sup> nmol 7-hydroxycoumarin formed per g placenta per hr.

<sup>f</sup> nmol estradiol and estrone formed per g placenta per hr from  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione.

미한다.

AHH 활성도는 비흡연자의 태반에서 보통 6배 정도의 차이를 보이며, 흡연자의 태반에서는 80배 가량의 차이를 나타낸다(Conney, 1986). 흡연자의 태반에서 가장 높은 AHH 활성도는 비흡연자의 태반에서 보다 적어도 400배의 활성도를 나타내기도 한다. 하루에 15~20개의 담배를 피는 사람들중에서 태반의 AHH 활성도는 70배 이상의 범위에서 변화를 보인다.

흡연자의 태반에서 AHH 유도가 상당한 개인 차이를 나타내는 원인파(또는 발암물질들 대사하는 효소를 유도하는데 따른 개인적인 특성) 흡연자와 비흡연자에서 어떻게 암을 유발시키는지를 밝히는 것은 상당히 흥미있는 일로 암의 발생관계를 연구하는 모든 학자들에게 앞으로의 과제이기도 하다. 이 문제에 관해 많은 연구가 수행되어 왔지만 그 결과들은 아직 충분한 것이 되지 못하기 때문이다.

한편 이물질대사에 미치는 흡연의 효과를 살펴 보면 PAH 투여에 의해 흰쥐의 간과 장에서 효소계가 유도되어 phenacetin의 경우 이의 주된 대사산물인 N-acetyl-P-aminophenol이 생성

된다(Pantuck, *et al.*, 1974). 인체에서 phenacetin대사에 대한 흡연의 효과(*in vivo*)로 phenacetin을 경구투여 했을때 plasma의 half life를 변경시키지는 않지만 plasma의 함량을 낮추거나 plasma의 총 N-acetyl-P-aminophenol을 감소시켰다(Pantuck, *et al.*, 1972; 1974). Plasma에서 phenacetin의 농도와 총 N-acetyl-P-aminophenol의 농도비율은 흡연자에서 상당히 증가되었는데 이것은 흡연이 위장관(gastrointestinal)에서 phenacetin의 대사를 촉진시켰거나 또는 처음에 간을 통해 들어가는 동안 흡연이 대사를 촉진시킨 것을 암시한다. 흡연이 phenacetin의 대사에 미치는 효과를 연구한 대부분의 경우에서 이의 대사를 촉진시켰다 할지라도 어떤 흡연자들은 phenacetin 대사를 촉진시키지 않았다. 이밖에 흡연자는 비흡연자보다 caffeine(Parsons & Neims, 1978), theophylline(Jenne, *et al.*, 1975), antipyrine(Hart, *et al.*, 1976)이 plasma의 half life를 좀 더 감소시켰다. 그러나 흡연은 phenytoin, meperidine, nortriptyline의 대사를 촉진시키지 않았다.

흡연이 어떤 이물질의 대사를 촉진시키기 때문에 흡연자는 이물질을 대사하는 같은 효소들에 의해 대사되는 어떤 다른 환경오염물질에 아마도 잘 적응할 수 있을지도 모른다.

최근에는 흡연이 개에서 testosterone의 대사에 영향을 준다고 보고된 바 있다(Mittler, *et al.*, 1983). Table 6에서와 같이 담배연기 성분에 오랫동안 노출된 개는 간의 testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase 활성도가 204% 증가되었으며, serum testosterone 함량은 46% 감소되었다. 한편 전립선의 크기도 56% 감소되었다. 이와 같은 관찰은 흡연자의 serum에선 testosterone이 좀 더 낮은 함량을 갖는다는 것을 시사하는 것인지도 모르며 비흡연자보다 전립선의 이

상발달(비대)이 좀 더 낮은 빈도를 나타내는 것인지도 모른다(Morrison, 1978).

인체조직에서 P-450 함량 또는 AHH 활성도가 유도 또는 증가되는 메카니즘에 관련한 분자생물학적인 연구를 위해 흡연할 때 태반은 표적기관으로서 대단히 매력적인 조직이다. 그러나 실질적인 연구 이전에 아직도 여러 어려움이 적지 않으며 그 중 주된 것은 태반에서 BP를 대사시키는 P-450을 분리 정제하는데 상당한 어려움이 있기 때문이다. 즉, 순수 정제된 P-450을 준비하는 것이 분자생물학적인 연구를 위한 필요조건중의 하나이며 이에 따른 monoclonal antibody를 제조하는 일이다.

Table 6. Effect of cigarette smoke on hepatic testosterone metabolism; testosterone serum level, and prostate size in dogs.

Treatment	Hepatic testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase (ng product formed/mg/hr)	Testosterone serum level (ng/dl)	Relative prostate size
Control (Sham-smoked)	1.20 $\pm$ 0.37	128 $\pm$ 21	100
Cigarette smoke	3.65 $\pm$ 0.60	69 $\pm$ 7	44

Dogs were sham-smoked or exposed to smoke from 12 high tar/nicotine cigarettes per day for 662-816 days.

### 6. P-450에 대한 억제패턴

먼저 P-450의 구조적인 특성을 살펴보면 heme 단백질인 P-450의 활성부위는 단 하나의 철원자를 갖고 있는 protoporphyrin K(Fig. 11)의 prosthetic group인데 heme의 다섯 번째 배위위치(Fe)는 polypeptide의 cysteine으로부터 thiolate cysteinyl sulfur와 결합되어 있다. 그런데 heme에서 ferric iron의 다섯 번째 배위위치에서 강한 ligand물질의 배위결합이나 여섯 번째 배위위치에서 강한 ligand물질에 의한 약한 ligand의 치환은 high spin 상태에서 low spin 상태로 효소를 shift 하며

430 nm의 Soret maximum을 나타내는 "type II" binding spectrum을 일으킨다(Jefcoate, 1978; Kumaki, *et al.*, 1978; Schenkman, *et al.*, 1981). 이와 같은 spin 상태의 변화는

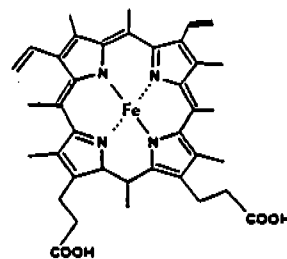


Fig. 11. Structure of protoporphyrin K.

P-450 reductase에 의해 환원되는 효소의 산화 환원전위에 따른 어떤 변화에 의해 나타나는 것이다(Sligar, *et al*, 1979; Guengerich, 1983). 그러므로 효소의 활성부위와 결합하기 위해 기질과 가역적으로 경쟁하는 억제물질들은 i) 효소의 hydrophobic 부분과 결합하는 물질, ii) prosthetic heme iron에 배위결합하는 물질, iii) 특이적인 활성부위의 잔기와 이온결합 또는 특이적인 수소결합에 참여하는 물질들을 포함한다(Testa & Jenner, 1981; Netter, 1980).

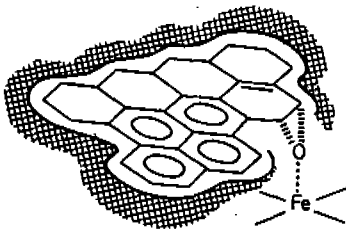


Fig.12. Postulated topology of the catalytic site of P-450<sub>c</sub>. Benzo [a]pyrene is depicted lying over a plane parallel to the porphyrin plane. The protein perimeter in the catalytic permits only one of two possible faces of the substrate to be oriented in a fashion allowing epoxidation of the C9-C10 double bond. The depicted topology introduces the epoxide in the observed 9*R*, 10*S* geometry.

Fig.12은 P-450c의 촉매부위와 BP의 결합을 나타낸 것이며(Yagi and Jerina, 1982), Fig.13은 ethoxycoumarin의 산화에서 P-450c에 의한 regioselectivity의 변경과 이에 따른  $\alpha$ -carbon 산화의 입체화학을 도식화 하였다(Jerina, *et al*, 1982).

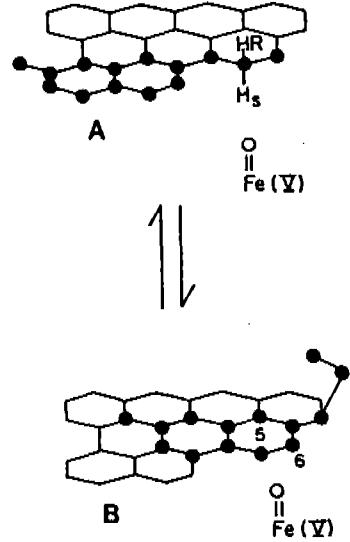


Fig.13. Stereochemistry of  $\alpha$ -carbon oxidation and alteration in regioselectivity by P-450<sub>c</sub> during the oxidation of 1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-ethoxycoumarin. (A) The substrate is depicted in the active site of P-450<sub>c</sub> in the only fashion that does not require the extension of coumarin or the side chain terminal methyl groups into the perimeter of the protein domain shown in Fig.12. The pro-S hydrogen abstraction predicted by Jerina's model(1982) was observed. (B) A second favorable orientation of the substrate places the C5-C6 double bond in a position susceptible to the oxygen addition observed with 1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-ethoxycoumarin.

한편 Fig.14는 P-450b의 protoporphyrin에서 pyrrole고리가 크게 두 부분으로 구분되어 각각의 특성을 보이고 있음을 말해 주고 있다(Johnson, 1979).

P-450의 촉매과정은 3 단계로 요약할 수 있는데 즉, i) 기질의 결합, ii) 최초의 전자전달에

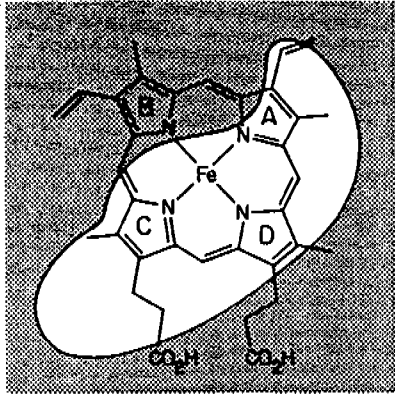


Fig. 14. Topology of P-450<sub>b</sub>. The elongated perimeter of the protein domain is not centered over the porphyrin and covers pyrrole ring B. Pyrrole rings A, C, and D are susceptible to alkylation by suitable terminal olefins or acetylenes.

수반하는 분자상 산소의 결합, iii) 기질이 실제로 산화되는 촉매단계로 구분된다. 그러나 각 단계마다 억제물질에 의해 영향을 받기 쉬운데 억제물질들은 위의 3 단계의 어느 하나에 작용하게 된다. 그러므로 P-450 억제물질은 다음과 같이 세 종류의 서로 다른 기작으로 크게 나눌 수 있다.

i) 가역적으로 반응하는 물질로 억제물질이 P-450에 경쟁적으로 결합하여 P-450에 의한 대사를 억제하는 경우와, ii) heme iron과 함께 준-비가역적(quasi-irreversible)인 복합물을 형성하는 물질로 P-450이나 heme 단백질의 합성을 억제하는 경우이다. 그리고 iii) 단백질이나 보결분자단의 heme group에 비-가역적으로 결합하는 물질 또는 P-450에 결합하지 않고 보결분자단의 heme group의 분해를 촉진하는 물질로 P-450이나 망상조직을 파괴시키거나 P-450을 불활성화 시키는 물질로 나눌 수 있다.

그러나 간과해서는 안 될 것은 유도와 억제 이외에 P-450에 관련된 반응은 물론 이물질의 생체대사에 영향을 주는 여러 요인중에는 다음과 같

은 것들이 지적되고 있다. i) 식이; 단백질함량이 적은 식이는 이물질 대사를 감소시킨다. 즉, 절식하는 경우 반드시 대사되어야만 하는 특별한 이물질에 따라 그 대사가 촉진 또는 억제된다. ii) 영양상태; Ca와 Cu결핍은 Zn, Fe의 결핍에서와 같이 대사를 감소시키며 비타민 C 또는 E의 결핍도 대사를 감소시킨다. iii) 홀몬수준; 부신피질 자극홀몬(adrenocorticotropic hormone, ACTH)은 대사를 증가시키며 성장홀몬도 증가시킨다. iv) 연령; 나이가 어릴수록 또는 나이가 많을수록 일반적으로 대사능력이 낮다. v) 성(sex); 많은 화합물들은 암컷과 수컷사이의 대사속도와 대사경로에 차이를 나타낸다. vi) 유전; 여러 반응경로가 유전순환의 속도에 영향을 줄 수 있기 때문이다.

### 7. 약물에 의한 P-450의 억제효과

P-450에 대한 억제패턴에서 지적한 바와 같이 P-450-monoxygenases에 대한 활성화도 억제는 여러 면에서 생각해 볼 수 있다. 따라서 약물에 의한 P-450의 억제효과를 연구하기 위해서는 먼저 P-450에 의한 반응경로를 보다 구체적으로 살펴볼 필요가 있다.

Fig. 15는 P-450에 의한 기질대사의 반응경로를 요약한 것이다. 기질이 처음 결합하는 (A) 단계는 low-spin물질로 부터 high-spin물질로 산화된 P-450의 spin equilibrium에서 어떤 shift와 연관되어 있다. 분광학적인 방법에 의해 이와 같은 주장이 뒷받침되고 있는데 Type I의 spectrum변화( $\lambda_{max} \sim 390$  nm, Peak;  $\lambda_{min} \sim 420$  nm, trough)는 apoprotein site에 P-450<sub>s</sub> 기질을 포함해서 지질친화성 분자의 결합을 해석하는 데 폭넓게 적용되고 있다 (Jefcoate, 1978). 두번째 단계 (B)는 flavo 단백질인 NADPH-P-450 reductase를 통해 NADPH에 의해 공급된 하나의 전자에 의한

high-spin ferric P-450의 환원이다. 그런데 low-spin ferric P-450의 환원은 열역학적으로는 적절치 않은 전이(transition)이다(Rein, et al, 1979). (C)단계는 Fig.15에서 보는 바와 같이 ferrous P-450-O<sub>2</sub> 대사물을 생성하기 위한 산소의 결합과정이다. (D)단계는 NADPH

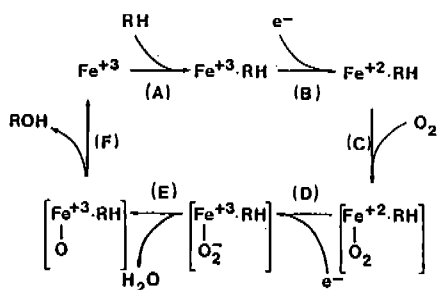


Fig.15. The cytochrome P-450 reaction cycle.

-P-450 reductase를 통한 NADPH나 또는 b<sub>5</sub>를 통한 NADH 둘 중의 어느 하나로부터 중간 대사물에 두번째 전자의 전달이다. 환원된 O<sub>2</sub> 중간대사물인 (E) 단계로부터 물의 손실과 복합물의 분해는 ferric P-450을 재생산하고 최종적으로 (F)단계에서 기질을 산화시킨다.

위의 P-450에 의한 반응경로의 상태는 기질 산화의 억제될 수 있는 여러 단계를 분명히 나타내고 있다. 이를 참고로 강력한 가역적인 억제 물질(inhibitors)과 비가역적인 억제물질에 의해 나타나는 그들 특이적인 반응에 대해 검토하고 치료약물에 의해 나타나는 약물산화의 억제에 대한 예를 중점적으로 살펴보고자 한다. 그러나 2개이상의 지질친화성 물질이 같은 P-450의 활성부위에 대해 경쟁하는 반응과 NADPH-P-450 reductase 수준에서 전자전달이나 약물들 사이의 상호반응은 다음 기회에 살펴보기로 한다.

대사의 가역적인 억제에서 약물대사의 억제는 또다른 약물이 P-450의 heme 부분과 상호반

응하는 경우를 생각할 수 있다. 그리고 가역적인 억제는 억제물질의 대사에 의해 일어날 수 있으며 효소의 활성부위로 부터 떨어진 억제물질의 확산 후에도 일어날 수 있다. 현재까지 보고된 가장 강력한 가역적인 P-450 억제물질은 nitrogen heterocycle들로 이와 같은 것들에는 imidazole과 quinoline고리를 갖는 화합물들이 알려져 있다(Fig.16). 그런데 이와 관련하여 중요한 것은 이들 고리계열 화합물이 상당히 많은 치료제에 속한다는 사실이다. 그리고 최적의 억제조건이 imidazole고리를 갖는 약물(화합물)에 의해 나타난다. 그 조건으로서 i) 입체적으로 접근하기 쉬운 lone electron pair가 heme iron과 배위결합하기 위해 요구되며 이와 같은 전자쌍은 보통 heterocyclic

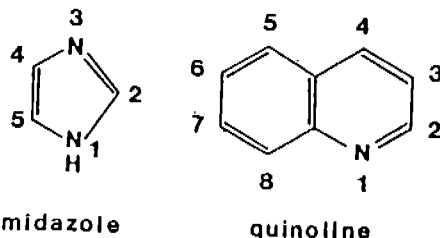


Fig.16. General structures of the imidazole and quinoline ring systems. Ring numbering in these systems is indicated.

nitrogen atom에 의해 제공된다. ii) imidazole의 1- 또는 4(5)- 위치에서 지질친화성의 치환물질이 요구되며 2-위치 또는 4,5-두 위치에서의 치환은 강력하지 않은 억제물질에 의해 일어난다. iii) benzimidazole의 경우에서 2-위치 치환물질의 입체상태에서와 같이 모든 지질친화성은 중요한 인자이다.

P-450 heme 결합과 이의 활성억제사이를 설명할 수 있는 좋은 예가 여러 1-alkylimidazole에 의해 수행된 바 있으며(Wilkinson et al, 1974) 지질친화성과 입체적인 요인 두 가지가



imidazole에 의한 억제정도를 나타내는 중요한 결정요인으로 생각되고 있다 (Rogerson, *et al*, 1977; Murray, *et al*, 1982; Murry & Ryan, 1983a; 1983b).

Fig. 17과 같이 항 곰팡이성 (antifungal) 물질로 대표적인 ketoconazole, miconazole, clotrimazole, econazole을 들 수 있는데 인체와 실험동물에서 microsomal P-450을 조절하는 작용을 나타낸다 (Kahl, *et al*, 1980; Niemegeers, *et al*, 1981; Sheets &

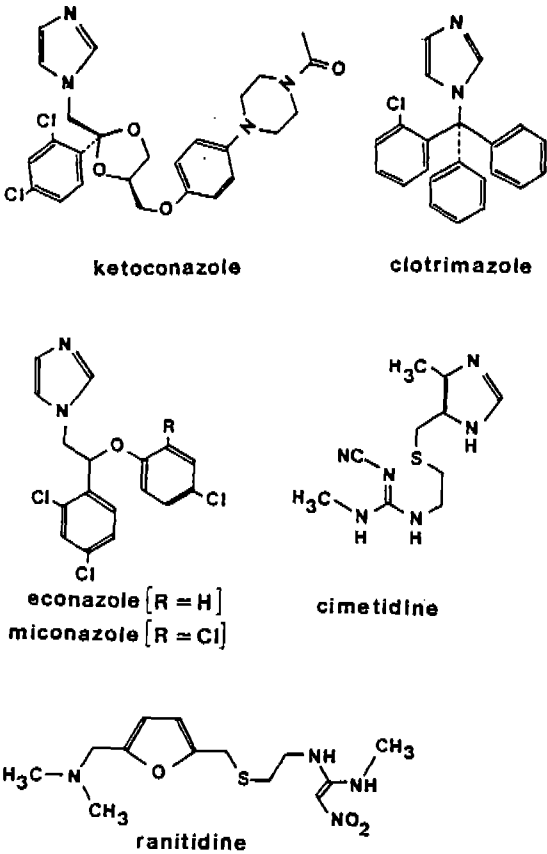


Fig. 17. Structures of the imidazole drugs ketoconazole, miconazole, clotrimazole, econazole, and cimetidine, and the related drug ranitidine.

Mason, 1984; Meredith, *et al*, 1985). 위의 여러 물질들은 *in vivo*에서 임상적으로 중요한 약물의 상호반응에 관련된 것들이다.

간의 약물대사에 대한 여러 antimycotic imidazole의 효과에서 억제정도는 ferric P-450의 여섯 번째 배위위치에서 imidazole 결합의 친화력에 밀접하게 관련되어 있는 것으로 나타난다 (Fig. 18, Sheets, *et al*, 1986). 항 곰팡이성을 나타내는 imidazole 또한 생리적으로 중요성을 갖는 기질의 생합성에 관여하는 간의 P-450의 존성 반응경로를 억제하는 것으로

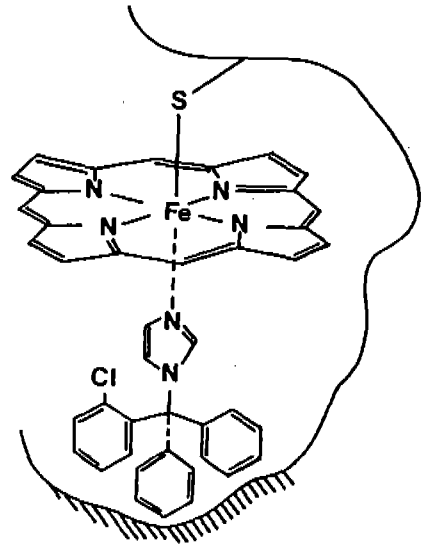


Fig. 18. Interaction of clotrimazole with ferric P-450 at the sixth axial heme ligand position. The shaded region is a hydrophobic apoprotein binding site for the within the P-450 active site.

로 최근에 밝혀졌다. 그 예로 ketoconazole은 lanosterol 14-demethylation의 억제에 의해 cholesterol의 생합성을 감소시키며 cholesterol 산화의 억제에 의해 adrenal steroid-

dogenesis를 억제한다(Pony, *et al*, 1982; Loose, *et al*, 1983).

Schuster(1985)는 항 곰팡이성의 여러 imidazole 약품에 의해 adrenocortical mitochondrial P-450<sub>11 $\beta$</sub>  활성도가 억제된다고 보고했으며 다른 조직에서 steroidogenic pathway도 억제물질에 민감한 것으로 관찰되었다.

Henry(1985)는 또한 배양한 닭의 신장세포에 의해 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>가 1-위치에서 수산화가 일어나는데 이때 ketoconazole과 miconazole에 의해 억제된다고 보고하였다.

사람 고환의 microsomes에서 chorionic gonadotropine(HCG)에 의해 촉진되는 cholesterol 17/20-lyase 활성도는 ketoconazole과 clotrimazole에 의해 억제되며 그 결과는 testosterone생합성의 감소를 초래한다(Pont, *et al*, 1982; Kan, *et al*, 1985).

위의 여러 관찰과 같이 간 이외의 P-450 효소가 항 곰팡이성의 imidazole에 의해 상당히 예민하게 억제되는 것이 분명하다. 이들 system은 생리적인 기능들이 분명하기 때문에 비정상적인 기능을 나타낼 때 imidazole유도체를 사용한 치료가 긍정적으로 효과적인 중요한 변경을 가져올지도 모른다.

imidazole을 기본 골격으로 한 cimetidine(Fig.17)의 경우 이 물질에 의한 약물대사의 억제에 대하여 Murray(1987)의 총설은 사람과 실험동물에 대한 많은 실험 예를 제시하고 있다. 인체에 cimetidine의 투여는 손상된 항 응고 대사가 항 응고 활성의 상승작용으로 나타난다(Flind, 1978; Serlin, *et al*, 1979; Silver & Bell, 1979; Hetzel, *et al*, 1979). 그리고 antipyrine과 diazepam의 분해를 감소시킨다(Klotz & Reimann, 1980; Serlin, *et al*, 1980). 다른 imidazole과 같이 cimetidine은 type II의 광학적인 spectrum 차이를

나타내는데 이것은 P-450 heme의 6번째 ligand 위치에서 P-450(ferric)과 상호반응하기 때문이다(Pelkonen, 1980). 이와 같은 특성은 pentacoordinate high spin state로부터의 spin equilibrium에서 어떤 shift와 연관되어 있으며, NADPH로부터 전자전달의 속도가 더 늦은 것보다도 관련되어 있을 뿐만 아니라 약물대사의 억제와도 관련 있다. cimetidine은 microsomal P-450에 결합하는데 본래의 낮은 친화력 때문에 P-450-monoxygenases의 활성도를 억제하는 데 아주 약하며 이와 같은 특성은 아마도 약물 그 자신의 낮은 지질친화성 때문인 것 같다. 그러나 imidazole 그 자신은 일반적으로 좀더 지질친화성구조로 이 특성은 monoxygenase의 활성도를 억제하는 데 가장 중요한 물질로 알려져 있다(Wilkinson, *et al*, 1974; Murray, *et al*, 1982; Murray & Ryan, 1983a). 한편 Fig.18은 clotrimazole이 ferric P-450의 여섯번째 배위 위치에 결합하는 상태를 나타낸 것이다.

ranitidine도 자주 연구되고 있으나 monoxygenase에 대해 약한 억제효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다(Rendic, *et al*, 1984; Breen, *et al*, 1982). 그 효과는 ranitidine의 furan고리가 imidazole을 대신하기 때문이다(Fig.17). 그러나 furan의 산소원자의 nucleophilicity는 P-450 hemo iron atom과 상호반응하여 전자전달을 효과적으로 막기 위해서는 충분치 않다.

quinoline은 약리학적으로 치료의 효과를 나타내는 중요한 물질로서 질소를 갖고 있는 heterocyclic 화합물의 또다른 부류이다(Fig.19). 예를 들면 quinoline 고리화합물은 많은 항 말라리아제의 기본물질이며 이들 여러 약물은 *in vivo* *in vitro*에서 약물산화를 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. Back등(1983)은 primaquine이 환주에서 chloroquine보다 강력한

monoxygenases 억제물질임을 관찰하였다. 흰 쥐 간 조직으로부터 분리한 primaquine의 대사 산물은 *N*-acetyl 과 5-hydroxyprimaquine 으로 이들은 antipyrine 대사를 효과적으로 억제한다 (Mihaly, *et al*; 1985).

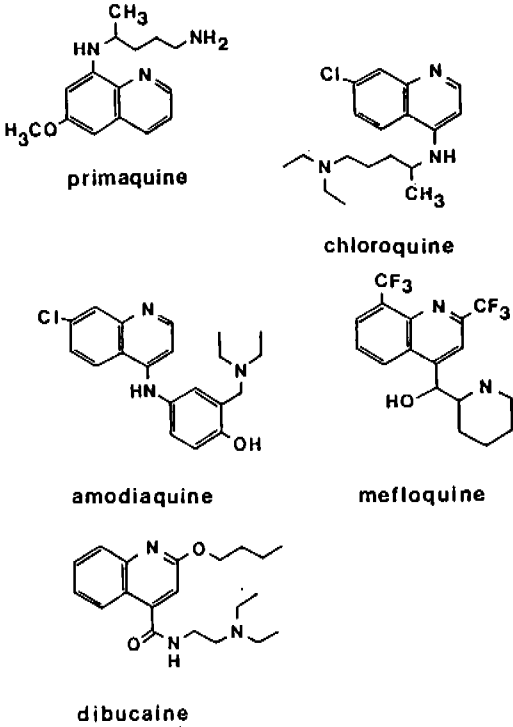


Fig. 19. Structures of the quinoline drugs primaquine, chloroquine, amodiaquine, mefloquine, and dibucaine.

quinolinyl 과 quinuclidinyl system 사이에 탄소원자에 의해 일어나는 것으로 알려진 quinine 과 이의 입체이성체인 quinidine에서 quinine 이 이성체보다 몇 배 더 강력한 억제효과를 나타낸다 (Fig. 20, Murry, 1986). 그러므로 quinine 에서 quinuclidine 의 질소원자가 low spin 과 high spin 의 ferric P-450 양쪽의 heme iron 에 접근할 수 있다. 반면 입체적인

요인들이 high spin ferric P-450 과 quinine 에서 quinuclidine 의 질소원자와의 효과적인 상호반응을 방해한다 (Murray, 1984). 그러나 racemic primaquine 과 같은 enantiomers 는 quinine 과 이의 입체이성체인 quinine 과는 달리 약물산화에 대해 똑같이 강력한

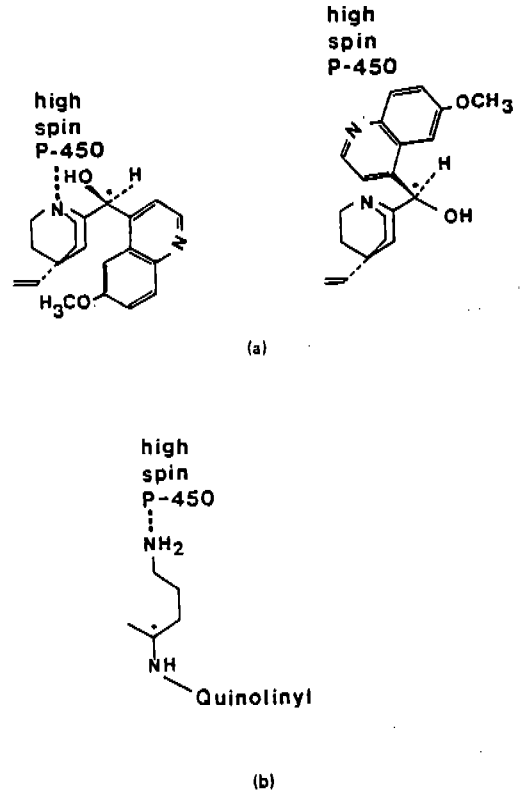


Fig. 20. Stereochemistry in (a) quinine (left) and quinidine (right), and (b) primaquine. Asterisks indicate centers of asymmetry. Note that in quinidine the quinuclidinyl system obstructs the interaction of the quinuclidinyl nitrogen atom with high-spin P-450. The asymmetric center in primaquine is removed from the point of interaction of the drug with P-450.

억제물질들이다(Mihaly, *et al*, 1985). 비대칭 중심에 있는 치환그룹이 중요한 반대의 입체효과를 나타내지 않는 primaquine의 enantiomer의 경우에는 이와 같은 현상이 일어나지 않는다. Primaquine의 8-위치 치환에서 아미노 말단기가 ferric P-450에 결합하는 데 직접적으로 관여한다(Murray, 1984; Murray & Farrell, 1986).

amodiaquine(Murray, 1984)과 mefloquine(Riviere & Back, 1985)을 포함한 다른 quinoline 항 말라리아제(Fig. 19)는 약물대사 효소의 억제물질들이지만 quinoline핵은 그 자신이 억제효과를 거의 나타내지 않는 것 같으며 그것은 pyridine질소에 입체적인 방해때문인 것 같다. 그 대신에 이와 같은 구조는 지질친화성 요인들의 결과로서 P-450 활성부위에 대한 친화력을 말하는 것이다. 그리고 quinoline 치환물은 억제효과를 관찰할 수 있는 일차적인 물질이기도 하다. dibucaine은 quinoline을 기본으로한 국부마취제이며 이것은 간의 monooxygenases 활성도를 조절한다(Murray, 1986). 그 억제는 P-450 heme에 직접적으로 결합하는 것에 의한 것이 아니며 apoprotein결합부위에 강력한 소수성의 상호결합 때문이다.

### 8. Cytochrome b<sub>5</sub>의 구조적인 특성

cytochrome b<sub>5</sub> (b<sub>5</sub>)는 P-450과 같은 heme 단백질로 망상조직의 microsomes에 존재하며 P-450에 의한 기질대사에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 그러나 b<sub>5</sub>의 기능은 P-450의 동위효소에 따라 그리고 사용된 기질의 종류에 따라 b<sub>5</sub>가 필수적으로 요구되기도 하며 그렇지 않은 경우등으로 b<sub>5</sub>와 관련한 P-450-monooxygenases의 최대 활성도를 구명하는데 좀더 충분한 연구가 요구된다. 그런데 b<sub>5</sub>는 NADH-b<sub>5</sub> reductase와 NADPH-P-450

reductase와 함께 microsomal membrane에 결합되어 있으며 인지질과 상호반응한다. 그 구조는 b<sub>5</sub>를 구성하고 있는 아미노산의 60%정도가 hydrophobic한 것들이며 나머지의 대부분은 중성 아미노산이다.

b<sub>5</sub>는 두 부분의 단백질이 결합되어 있는데 그 하나는 heme부분인 hydrophilic 부분으로 촉매의 기능을 나타내며 다른 하나는 중요한 구조를 갖는 hydrophobic한 부분으로 인지질막과의 상호반응은 물론 detergent micell과 같이 막과 같은 구조를 갖는 다른 물질과도 상호반응한다. 인지질막과 b<sub>5</sub>의 상호반응은 어떤 유용한 hydrophobic환경을 나타내는 주위에 b<sub>5</sub>의 hydrophobic부분을 끼워 넣기 위한 분자특성의 어떤 특이적인 경우인 것으로 나타난다.

Fig. 21과 같이 b<sub>5</sub>는 인지질과 결합하는 데 적어도 두 가지 mode가 알려지고 있다(Lambeth, 1985). 즉, b<sub>5</sub>의 hydrophobic부분의 구조는 강력한 결합에 중요한 역할을 하는데 그 부분은 b<sub>5</sub>의 C-말단에 존재하며 이 부분의 아미노산 결합서열은 Fig. 22와 같다. 참고로 i) 비극성 aliphatic 또는 aromatic 곁가지를 가진 아미노산은 “=”으로 표시하였고 ii) 이온을 띠지 않았으나 극성을 띤 곁가지를 가진 아미노산은 “-”으로 표시하였다. 한편 iii) 이온을 띤 곁가지를 가진 아미노산은 “-”을 표시하지 않았다.

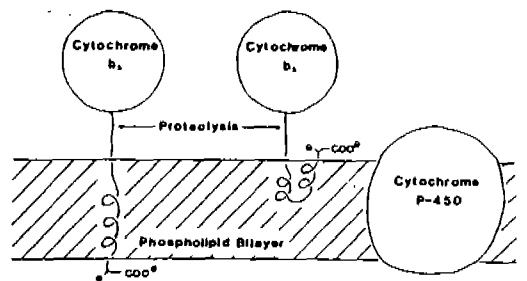


Fig. 21. Interaction of cytochrome b<sub>5</sub> and cytochrome P-450 with phospholipid membranes.

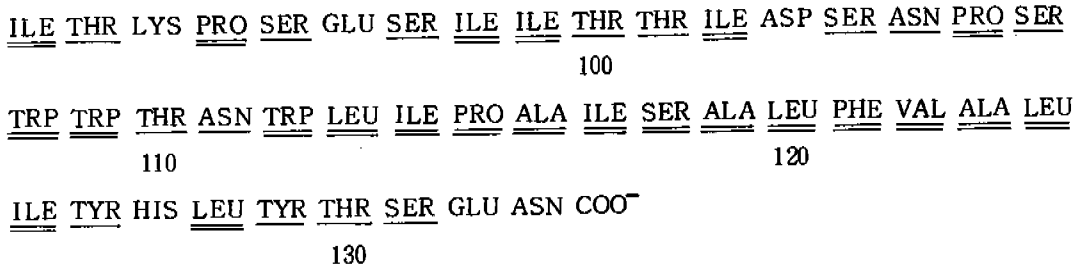


Fig. 22. C-terminal amino acids of cytochrome b<sub>5</sub>

carboxypeptidase를 처리하여 Glu 132와 Asn 133의 carboxyl 그룹을 포함한 6개의 C-말단 아미노산들을 제거했을 때 b<sub>5</sub>의 강력한 결합능력이 소실되는 결과를 보였다. 때문에 Dailey와 Strittmatter (1981)는 음이온 아미노산이 b<sub>5</sub>가 인지질막에 고정되는데 중요한 역할을 한다고 지적하였다. 그러므로 먼저 기술한 바와 같이 인지질이 결합하는 데 두 종류의 가능한 일반적인 구조가 제안되었다(Fig. 21). 그 하나는 b<sub>5</sub>의 polypeptide가 세포질쪽(cytoplasmic side)에 대하여, 그리고 인지질막의 구경쪽(luminal side)에 대하여 hydrophilic 부분과 함께 hydrophobic 부분이 인지질막을 관통할 수 있을 정도로 충분히 길다. 또 하나의 모델은 b<sub>5</sub>의 hydrophobic 환경에서 hydrophobic 부분의 구조가 Robinson과 Tanford (1975)에 의해 제안되었는데 b<sub>5</sub>와 인지질의 상호반응에서 b<sub>5</sub>의 polypeptide에서 115번째의 아미노산으로부터 126번째 아미노산의 α-helix가 β-turn하여 인지질 밖으로 나오는 구조이다.

한편 b<sub>5</sub>는 P-450 농도의 25% 정도 존재하며 P-450 reductase는 P-450의 5% 정도 존재하는 것으로 알려져 있다. 그리고 NADPH-b<sub>5</sub> reductase는 NADH로부터 전자를 받아 그들을 b<sub>5</sub>에 전달한다. NADPH-P-450(cytochrome) reductase는 한 분자당 두 부분의 flavin을 갖는 71,000 dalton의 효소로 그 flavin은 FAD와 FMN으로 FAD는 NADPH

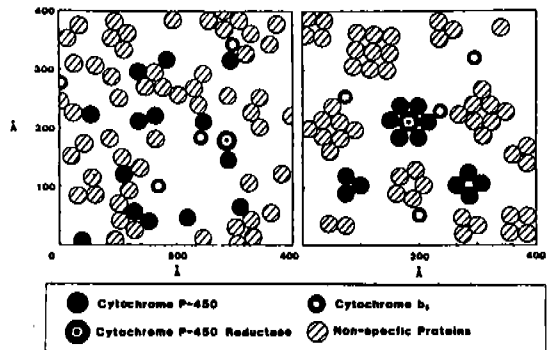


Fig. 23. Two conceptions of the organization of the microsomal membrane. Both models depict a 400×400 Å portion of the microsomal membrane, viewed from above. Left, the drawing depicts the random or diffusional model, in which long-lived complexes among proteins do not occur, and electron transfers among proteins occur by random diffusion and collision. Right, depicted is the organized array model, in which there are static, long-lived complexes among functionally interacting components. In one conception a cytochrome P-450 reductase is surrounded by about 6 cytochrome P-450 monomers to form a single functional unit.

로부터 전자를 받아 그들을 내부적으로 FMN에 전달한다(LaMbeth, 1985). Fig. 23은 microsomal membrane에 존재하는 P-450, b<sub>5</sub>, reductase의 두 종류 model을 나타낸 것이다.

9. P-450 동위효소의 분류

생체내 기질과 이물질대사에 관련하여 P-450-monoxygenases에 대한 연구는 흰쥐와 토끼에서 가장 많이 연구되었는데 흰쥐의 P-450과 토끼의 그것이 서로 다른 특성을 나타내는 것은

Table 7. Rat hepatic P-450's; designations used by different laboratories for corresponding forms

Waxman <i>et al</i> <sup>a</sup>	Levin <i>et al</i> <sup>b</sup>	Guengerich <i>et al</i> <sup>c</sup>	Fe <sup>2+</sup> -CO $\lambda_{max}$	Designations for equivalent rat P-450's	Analogous rabbit P-450's <sup>d</sup>
PB-1	—	PB-C	450	—	— <sup>e</sup>
PB-2a	—	PCN-E	449-450	P-450p	3c
2c	h	UT-A	451	RLM5', P-450-male <sup>f</sup>	—
2d	i	UT-I	449	P-450-female, P-450 15 $\beta$	—
3	a	UT-F	452	—	—
PB-4	b <sup>h</sup>	PB-B	450 <sup>i</sup>	—	2 <sup>j</sup>
PB-5	e	PB-D	450	P-450, fraction C, PB-1, P-450 PB	—
6	—	—	450	—	—
BNF-B	c	BNF-B	447	P-448, MC-1, P-448 MC, MC- I /MC- II <sup>k</sup> , MC-2, P-447	6
ISF-G	d	ISF-G	447	MC-2, P-448 HCB, MC-1, ISF-P-450, form 5	4
—	f	—	447.5	—	—
—	g	—	447.5	—	—
—	—	UT-H	449	—	—

<sup>a</sup> P-450 forms 1-6 are numbered in their relative order of elution from Whatman DEAE-cellulose (DE52), with the prefix PB indicating significant induction of the particular isozyme by phenobarbital. The two major polycyclic hydrocarbon-induced forms.

<sup>b</sup> Individual P-450's are designated by nondescriptive letters (a,b,c, and so on) assigned sequentially as new isozymes are purified and characterized by these investigators.

<sup>c</sup> P-450's are assigned arbitrary letters (A,B,C, and so on) prefixed by UT,PB,PCN,BNF, or ISF to indicate whether the isozyme is more readily obtained from untreated rats or from rats pretreated with the indicated inducing agents. This does not imply, however, that the agent designated is necessarily the most efficacious inducer of the isozyme in question.

<sup>d</sup> Analogous forms are identified on the basis of primary structure comparisons and on the basis of their similar response to monooxygenase inducers. Rat hepatic P-450's corresponding to rabbit forms 1,3a,3b, and 5 cannot be identified at this time.

<sup>e</sup> Analogous rabbit forms have not been described.

<sup>f</sup> Note, however, that the N-terminal sequence reported by this group differs from that reported by Waxman (1984) and by Hanju *et al*(1984) at residues 12 and 13.

<sup>g</sup> This identification should be viewed as tentative in the absence of information on the steroid hydroxylase activities of P-450-male.

<sup>h</sup> Strain difference characterize this major phenobarbital-induced form such the P-450b, isolated from Long-Evans rats, can be distinguished from P-450 PB-4 (or P-450 PB-B), isolated from Sprague-Dawely rats.

<sup>i</sup> It is unclear whether the forms studied by these investigators correspond to P-450 PB-4, to P-450 PB-5, or to a mixture.

<sup>j</sup> Although the primary structure of rabbit form 2 is 77% identical to rat forms PB-4 and PB-5, it exhibits the high activity characteristic of form PB-4 rather than the low activity associated with PB-5.

<sup>k</sup> These two forms can be distinguished by HPLC and yet exhibit indistinguishable catalytic properties and N-terminal sequences. Both appear equivalent to P-450 BNF-B.

물론 환취의 P-450도 각각의 동위효소가 서로 다른 특성을 나타낸다.

토끼에 PB를 처리한 후 분리된 P-450<sub>LM2</sub>는 포유동물에서 정제된 최초의 P-450 동위효소이다 (van der Hoeven, *et al*, 1974; Imai & Sato, 1974). 그리고 heme iron에 배워진 cysteine 잔기가 확인됨으로써 이 위치 이웃에 있는 아미노산이 높은 hydrophobic 특성을 나타내기 위한 일종의 marker 임을 시사하였다.

현재까지 P-450 동위효소의 분리가 여러 연구실에서 이루어졌으며 분리된 P-450에 대한 명명이 분리한 연구자에 따라 서로 다르게 표기되고 있다.

Table 7은 P-450의 순수 분리와 이의 특성들을 밝히는 데 가장 큰 공헌을 한 Levin 그룹과 Guengerich 그룹 그리고 Waxman 그룹에서 각각 명명한 환취의 P-450 (동위효소)을 그 특성의 유사성을 기준으로 분류하였다. 그러나 다음에 열거한 여러 특성중에서 3~4개의 특성이 같을 때는 동일한 동위효소로 분류하였다. 즉, i) Fe<sup>2+</sup>-CO 복합체의 λ<sub>max</sub>, ii) 재구성계에서 촉매의 특이성, iii) 면역화학적 특성, iv) N-말단의 아미노산 결합서열, v) SDS gel에서 명확히 구분되는 P-450 동위효소의 이동성, vi) 연령과 성별에 따라 나타나는 특이성, vii) 어느 특정한 monooxygenase 유도물질에 의한 반응등을 분류의 기준으로 하였다. 따라서 Table 7은 환취 간으로부터 명확히 구분되는 적어도 13종의 P-450 (동위효소)을 비교하였으며 (Waxman, 1986) 이들은 환취의 간 조직으로부터 순수 분리는 물론 정제가 가능한 것들이다.

i) P-452 (Tamburini, *et al*, 1984)는 clofibrate에 의해 유도된 P-450으로 lauric acid hydroxylase 활성도 (turnover = 43 min<sup>-1</sup> P-450<sup>-1</sup>)가 매우 높다. 2c와 3과 같은 동위효소가 분광학적으로 유사할지라도 이들 두 P-450이 독특한 주된 대사산물인 mono-

hydroxy testosterone 생성을 촉매하지 않기 때문에 명확히 구분된다. ii) P-450 PB-2 (Kuwahara, *et al*, 1984)는 PB에 의해 2~4배 유도되는 것을 포함해서 이와 같은 form에 대해 보고된 여러 특성들은 P-450 PB-1의 특성과 유사하다. 그러나 두 form의 N-말단 아미노산은 5와 6에서 서로 차이를 보이고 있다. iii) 기타의 P-450 중에서 여러 P-450을 Table 7에 제시한 P-450과 P-451, form 1, 2, 3, 4, P-450 MC-III 그리고 PB-1과 PB-2 등에 대한 특성비교는 아직 충분한 연구결과를 얻지 못한 상태이다.

환취의 간 조직으로부터 적어도 13종의 P-450이 발견되었다 할 지라도 각각의 동위효소의 함량은 동물의 연령, 성별 그리고 monooxygenase 유도물질로서 작용하는 이물질에 노출된 정도와 기간에 따라 많은 영향을 받는다. 유도물질을 처리하지 않은 정상 환취나 여러 유도물질을 처리한 환취에서 P-450 동위효소수준의 면역화학적 정량이 이루어 졌으며 13종의 P-450 중에서 7종에 대한 효과적인 유도물질이 확인되었다 (Table 8) 이와 같은 결과는 환취의 간조직에서 P-450유도의 복잡성을 잘 나타내주는 것으로 아래와 같이 요약할 수 있다 (Waxman, 1986).

i) 많은 유도물질이 총 P-450/mg protein (P-450 specific content)을 2~3배 유도한다 하더라도 같은 유도물질에 각각의 동위효소가 서로 다른 반응, 즉, 유도되는 정도가 서로 다르게 나타난다. ii) 구조적으로 서로 관련 없는 화합물들이 같은 P-450 동위효소를 유도하는데 아주 효과적이다. 그 예로 PB와 Arclor 1254는 모두 PB-4의 유도물질로 효과적이다. iii) 각각의 동위효소의 유도는 독립적으로 조절되는 것으로 나타난다. 그 예로 PB가 PB-1과 PB-2a를 몇 배 유도시키지만 16α-cyano-pregnenolone (PCN)은 PB-2a만을 유도시킨다. iv) 여러 유도물질 처리에 의해 유도되는

P-450 forms로 PB-1,3, PB-4/PB-5, BNF-B, ISF-G는 질적으로나 양적으로 암수에 똑같이 나타난다. 그러나 PCN을 흰쥐(adult, female)에 처리하면 PB-2a가 70 배 이상 증가되지만 adult male의 흰쥐에서는 4~5 배 증가되고 있어 P-450 PB-2a가 성(sex)에 따라 큰 차이를 보이는 주목할만한 현상을 나타낸다.

한편 위의 표에는 제시하지 않았지만 흰쥐에 P-450 유도물질을 처리하면 P-450 b 동위효소와 이와 유사한 P-450 e 동위효소가 상당히 유도되는데 전체 P 함량의 약 50~60%가 이들 두 동위효소로 구성되어 있다(Johnson, 1979).

Table 8에 표시한 바와 같이 P-450 동위효소의 sex specificity에 관한 번역화학적인 그리고 촉매 작용에 관련한 연구는 P-450<sub>2c</sub>가 male

specific하며 사춘기(puberty)에 유도가 잘 되고 있다(Murakami & Okuda, 1981; Waxman, *et al*, 1985). P-450<sub>2d</sub>는 3~4 주된 미숙한 흰쥐(male)에서 특이적인 함량을 나타냈다 할지라도 female 흰쥐에서 유도된다(Maeda, *et al*, 1984; Waxman, *et al*, 1985). 또한 P-450 PB-2a의 male specificity는 female 흰쥐에서 상당히 억제되고 있다(Waxman, *et al*, 1985). P-450 g 또한 male-specific P-450 동위효소이며(Ryan, *et al*, 1984) sex-specific이 아니라 하더라도 P-450 3에 의해 나타나는 microsomal testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylase 활성도는 adult male에 비교했을 때 adult female에서 40% 정도 더 높은 수준을 나타냈다(Waxman, *et al*, 1985).

Table 8. Rat hepatic P-450's: monooxygenase induction and sex specificity<sup>a</sup>

P-450 form	Typical inducers <sup>b</sup>	Fold induction	Sex specificity <sup>c</sup>
PB-1	PB	2-4	— <sup>d</sup>
PB-2a	PB,PCN,DEX	2-5	♂ <sup>e</sup>
2c	— <sup>f</sup>	5 <sup>g</sup>	♂
2d	—	—	♀
3	BNF, PB	~ 2	♀ / ♂ ~ 1.4
PB-4	PB,ACLR	≥30 <sup>h</sup>	—
PB-5	PB,ACLR	≥20	—
6	—	—	—
BNF-B	BNF,MC,ACLR	≥30	—
ISF-G	ISF,BNF,ACLR	≥20	—
f	—	—	—
g	—	—	♂
UT-H	—	—	—

<sup>a</sup> Data obtained from the references indicated in Table 7.

<sup>b</sup> Included are representative examples of agents commonly used to induce the indicated P-450's. PB, phenobarbital; PCN, 16 $\alpha$ -cyanopregnenolone; DEX, dexamethasone; BNF,  $\beta$ -naphthoflavone; ACLR, Aroclor 1254, MC, 3-methylcholanthrene; ISF, isosafrole.

<sup>c</sup> Isozymes that are present at  $\geq 10$ -fold higher levels in adult rats of one sex as compared to the other are termed sex specific.

<sup>d</sup> These P-450's are expressed at similar levels in adult rats of both sexes.

<sup>e</sup> The male-specific expression of this P-450 is abolished upon xenobiotic administration (Waxman, *et al*, 1985).

<sup>f</sup> No inducing agents have been described for these P-450's.

<sup>g</sup> Expression of form 2c is suppressed by a variety of monooxygenase inducers. In the case of some polybrominated biphenyls, this results in a 90% decrease in immunoreactive 2c.

<sup>h</sup> Minimum values due to the difficulty in obtaining accurate estimates of the low of these forms in uninduced rat liver.



위에 나열한 P-450 중에서 8종의 P-450는 성에 따라 차이를 나타내지 않는다. 흰쥐의 간조직에서 동위효소의 조성은 동물의 sex와 유도상태에 따라 상당히 영향을 받기 때문에 P-450을 분리할 때 이들 요인을 염두에 두어야 한다. 즉, i) PB-1, -4, -5의 순수 분리를 위해선 PB를 처리한 흰쥐의 간조직을 사용하는 것이 적당하며, ii) PB-2a를 위해선 PCN을 처리한 adult male의 간조직을, iii) 2c와 g를 위해선 아무 것도 처리하지 않은 adult male의 간조직을, iv) 2d는 adult female의 간조직으로부터 각 분리하는 것이 가장 이상적이다.

한편 서로 다른 연구실에서 수행하는 P-450의 기질특이성에 관련된 연구를 확인하는 데는 상당한 어려움이 따르게 되는데 그것은 포유류의 microsomal P-450가 중복되는 기질특이성을 나타낼 뿐 아니라 또한 넓은 기질특이성을 나타내기 때문이다. 그러므로 P-450 동위효소에 특이적으로 촉매되는 monooxygenase 기질을 사용해서 P-450의 촉매에 관련된 연구를 하면 P-450의 확실한 동위효소를 확인하는 데 효과적인 접근 방법이 될 수 있다.

Table 9에서와 같이 9종이 기질들이 흰쥐의 간조직으로부터 분리한 P-450을 확인하는 데

Table 9. Rat Hepatic P-450's : Isozyme-Specific Monooxygenase Activities

P-450 form	Characteristic activity	Turnover number <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> P-450 <sup>-1</sup> )	Substrate concentration ( $\mu$ M)	Catalytic activity exhibited	
				by other P-450's <sup>d</sup> %	P-450 form
PB-1	S-Warfarin 7-hydroxylase	1.2	300	20	BNF-B
PB-2a	Androstenedione 6 $\beta$ -hydroxylase	0.1-0.5 <sup>e</sup>	25	(variable) <sup>d</sup>	several
2c	Testosterone 2 $\alpha$ -hydroxylase	3.5	25	<2	— <sup>e</sup>
2d	Steroid disulfate 15 $\beta$ -hydroxylase	2.0	25	<2	—
3	Testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylase	17.6	25	<2	—
PB-4	Androstenedione 16 $\beta$ -hydroxylase	12	25	<2	—
6	Testosterone hydroxylase <sup>f</sup>	0.5	25	<10	—
BNF-B	7-Ethoxyresorufin O-deethylase	6.9	20	8	ISF-G
UT-H	Debrisoquine 4-hydroxylase	3.5	1000	5	2c
PB-5	— <sup>g</sup>	—	—	—	—
ISF-G	—	—	—	—	—
f	—	—	—	—	—
g	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Typical values obtained at the substrate concentrations indicated. Decreased isozymic specificity may occur at higher substrate concentration.

<sup>b</sup> Ratio of catalytic activities exhibited by other P-450's (identified in this column) to those exhibited by the P-450 form identified in the first column, expressed as a percentage.

<sup>c</sup> Range of activities observed for various preparations. Purified isozyme appears generally inactive.

<sup>d</sup> Although several rat hepatic P-450's catalyze androstenedione 6 $\beta$ -hydroxylation in purified, reconstituted systems, antibody inhibition experiments have established that, irrespective of its low 6 $\beta$ -hydroxylase activity in purified systems (footnote c), P-450 PB-2a is the major isozymic contributor to androstenedione 6 $\beta$ -hydroxylase activity both in uninduced and in variously induced rat hepatic microsomes (Waxman, *et al.*, 1985).

<sup>e</sup> Catalytic activities are at or below the limits of detection for all other P-450's examined.

<sup>f</sup> Unique monohydroxy testosterone metabolite not identified.

<sup>g</sup> Although the catalytic specificities of these forms are distinct when examined using a series of monooxygenase substrates, isozyme-specific catalytic reactions have not been reported for any of these forms. P-450 PB-5 exhibits a substrate specificity profile which is quite similar to that of PB-4; its catalytic activity is, however only 5-15% that of P-450 PB-4 (Ryan, *et al.*, 1984; Waxman and Walsh, 1982).

<sup>h</sup> Waxman, D.S. unpublished results.

유용하게 사용되고 있다(Waxman, 1986). 그리고 microsomal P-450에 의해 나타나는 활성도는 P-450에 대하여 특이적으로 반응하는 monoclonal antibody에 의해 80% 이상이 억제될 수 있기 때문에 이를 이용하여 동위효소를 분류하기도 한다. 따라서 구조적으로 동질성을 나타내는 P-450의 동위효소를 확인하기 위해 면역화학적 방법이 유용하게 시도되고 있으나 PB-4와 PB-5의 경우에선 이와 같은 방법에 의해 구분이 잘 되지 않는데 그 이유는 아미노산 결합서열의 97%가 동일하기 때문이다(Cheng & Schenkman, 1983; Fujii, *et al*, 1982; Yuan *et al*, 1983).

#### 10. P-450 유전자에 대한 분자생물학적인 접근

흰쥐의 간조직에 존재하는 여러 P-450 동위효소들(P-450s)의 수준은 성별과 연령에 따라 차이를 보이고 있다(Waxman, *et al*, 1985; Whitlock, 1986). 따라서 아미노산 결합서열과 면역화학적 방법이 P-450 동위효소사이의 특징적인 관계를 결정하는데 이용되고 있다. 예를 들면 PB와 그밖의 유도물질의 처리에 의해 유도되는 흰쥐의 P-450b와 P-450e는 97% 이상의 동질성을 나타내는 아미노산 결합서열을 갖고 있다(Yuan, *et al*, 1983; Mizukami, *et al*, 1983; Suwa, *et al*, 1985). 유전적으로 이들 heme 단백질은 비-대립형질의 관계를 나타내는 것으로 그들 유전자들이 아주 가깝게 연결되어 있다(Rampersaud & Walz, 1983). 더구나 cDNA sequence를 이용한 연구로부터 P-450b와 P-450e가 적어도 4개이상의 유전자 또는 pseudogene을 포함한 같은 subfamily인 것으로 보인다(Mizukami, *et al*, 1983). 흰쥐의 웅성에서만 특이적으로 관찰되는 P-450g와 P-450h를 포함한 적어도 5개의 확실한 동위효소로 구성되어 있는 또다른 P-450 subfamily의 존재가 N-말단 결합서열확인과 면역화학적 방

법에 의해 밝혀졌다(Haniu, *et al*, 1984; Bandiera, *et al*, 1985; 1986).

P-450에 대해 흰쥐의 간조직에서 가장 많이 연구되어 왔지만 P-450 유전자의 염색체상의 분포는 현재까지 생쥐와 인체에서 좀더 연구되고 있다(Nebert, *et al*, 1987). P-450의 유전자 지도를 확인하기 위한 결정적인 필요성은 대립형질의 다양성을 특징짓는 데 있다.

흰쥐의 outbred로부터 얻은 간 microsomes에 대하여 전기영동한 결과 유전적인 변이가 P-450 유전자들 사이에 공통적인 것이며 이 방법에 의해 측정된 polymorphism의 수는 현재 P-450b에 대해선 4개, P-450e에 대해선 2개의 변이를 각각 보이고 있으며(Rampersand & walz, 1983) P-450h에 대해선 3개, P-450g에 대해선 일종의 조절적인 변이를 나타내고 있다(Rampersaud, *et al*, 1985). P-450에 대한 분자생물학적인 연구가 1980년대 부터 시작되어 두 개의 P-4503' cDNA probe가 1980년에 최초로 보고 되었고 1983년에는 P-450 cDNA 결합서열이 완전히 밝혀졌다. 현재까지 밝혀진 10종의 P-450 유전자의 진화와 유전자구조중에서 8종이 포유류에 존재하는 것들이다(Nebert & Gonzalez, 1987). 그런데 아미노산 결합서열의 비교와 cDNA nucleotide 결합서열로부터 P-450 유전자의 진화가 분명하게 나타난다. 그리고 동물체의 발육과 성 그리고 조직상의 특이적인 P-450 유전자발현에서 분명한 차이점이 현대의 분자생물학적인 접근방법에 의해 구명되고 있다. 더구나 최근에는 P-450 발현 vector가 효모에서 성공적으로 transform되었으며 포유동물 세포 배양에서 일시적으로 transfect되었다(Nebert & Gonzalez, 1987).

한편 10개의 유전자 family에서 서로 다른 family에 속하는 단백질은 아미노산의 결합서열이 36% 이상 일치되고 있다(Nebert, *et al*, 1987). percent 유사성에 기초를 둔 유전자

family의 이와 같은 정의는 얼마간은 임의적인 것이지만 현재까지 60종이상의 P-450의 아미노산결합서열을 분석한 후에 얻어진 결론이다. 그리고 같은 subfamily에 있는 것으로 생각되는 P-450 유전자는 같은 subfamily에 있는 다른 유전자로부터의 아미노산 배열이 68% 이상 유사성을 갖고 있다.

흰쥐의 P-450c를 포함한 몇 종류의 P-450 유전자의 cloning에 의한 효모발현실험으로부터 모든 P-450 효소들을 3등분해서 중간(middle third) 즉, 거의 ~180-320 사이의 아미노산이 기질결합과 특이성에 대한 가장 확실한 부분인 것을 알수 있다(Nebert & Gonzalez, 1987). 이와 같은 예는 245번째의 arginine이 proline으로 치환된 돌연변이는 P<sub>1</sub>-450에 의한 촉매활성에서 2~3배의 감소현상을 보이며 Pro-245치환과 118번째의 leucine이 arginine으로 치환되었을 경우 P<sub>1</sub>-450이 활성도를 나타내지 못한다(Nebert & Gonzales, 1987).

P-450 유전자를 확인하는 최근의 연구방법은 생쥐의 여러 근친교배 strain을 검색함으로써 촉진되고 있다.

### 11. 미생물로부터 분리된 P-450<sub>cam</sub>의 특성

박테리아로 부터 분리된 P-450 중에는 토양박테리아인 *Pseudomonas putida*로 부터 분리된 P-450<sub>cam</sub>이 가장 많이 연구되었다. 그러나 P-450<sub>cam</sub>과 박테리아의 P-450는 동의어가 아니다. 왜냐하면 P-450<sub>meg</sub> (*Bacillus megaterium*, ATCC 13368) 등 여러 종류의 P-450이 여러 박테리아로부터 분리되었기 때문이다. 그러나 그 중 P-450<sub>cam</sub>이 가장 많이 연구되어 왔기 때문에 흔히 P-450<sub>cam</sub>을 박테리아 P-450과 혼동하는 수가 있다.

P-450<sub>cam</sub> (*P. putida*, ATCC 17453)은 현재 P-450<sub>cam</sub> 유전자의 DNA sequence가 밝혀져 *E. coli*에 gene cloning이 이루어 졌다. P.

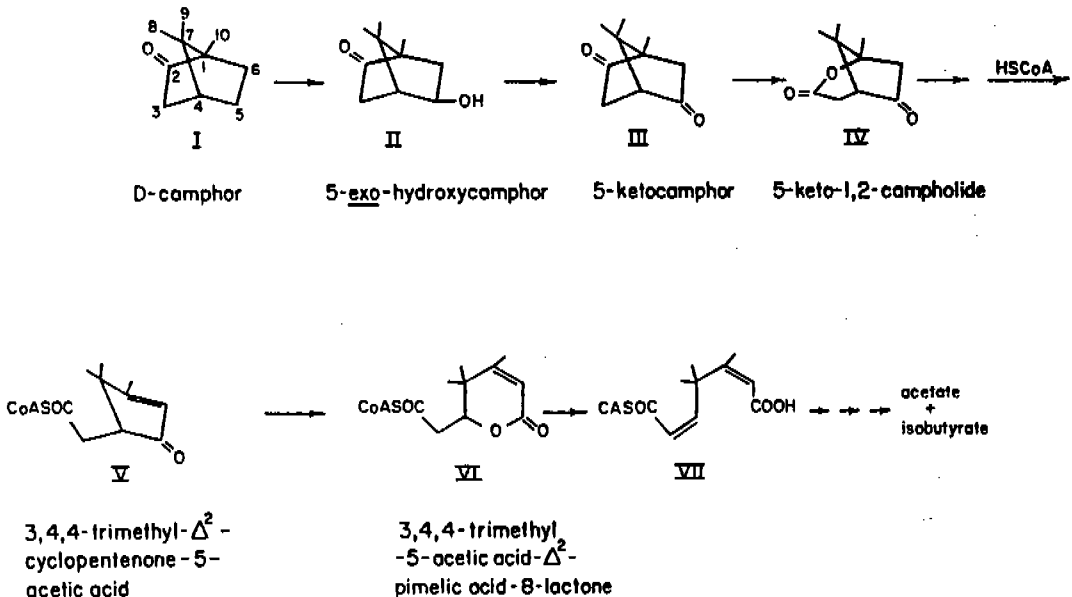


Fig.24. Metabolic degradation of camphor by *Pseudomonas putida*.

*putida*는 탄소와 에너지의 유일한 source로서 불활성의 camphor (monoterpene)를 대사하는 능력이 있다. 즉, camphor를 분해하는 능력은 이에 관여하는 효소가 *P. putida*에 있기 때문에 P-450<sub>cam</sub> system은 camphor 분자의 입체적인 특이성을 나타내는 수산화반응과 함께

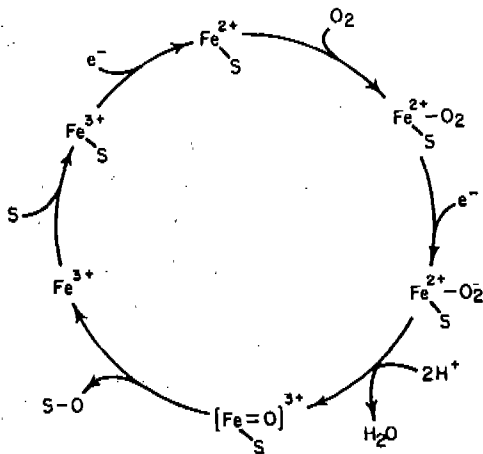


Fig. 25. Proposed reaction cycle of P-450<sub>cam</sub>.

dioxygen의 두 개의 전자환원을 수행한다(Fig. 24, Fig. 25). 즉, camphor에 의해 *P. putida*로부터 유도되는 P-450<sub>cam</sub>은 그 다음 camphor를 대사시킨다. 이와 같은 P-450<sub>cam</sub>은 막에 결합되어 있기 보다 오히려 수용성으로 존재하며 입체적인 구조와 아미노산 결합서열, 활성부위 등에 따른 생화학적인, 물리화학적인 특성이 다른 박테리아의 P-450 중 가장 많이 연구되었다(Stephen & Ralph, 1986).

P-450에 관한 연구는 이제부터 시작이라고 할 수 있다. 그것은 80년대 초부터 분자생물학적인 접근방법에 의해 P-450의 본질적인 기능을 밝히는 데 유전자수준에서 구명하려는 노력이 시도되고 있기 때문이다. 따라서 지금까지 기술한 위의 내용은 몇몇 장을 제외하고는 불충분한 부분이 적지 않다. 이에는 본 저자가 P-450에 관련된

수 많은 논문을 충분히 이해한 후 총설의 형식을 빌어 내용을 논리적으로 요약할 수 있는 능력이 부족한 원인도 있기 때문이다. 그러므로 좀 더 관심을 갖고 있는 분은 중간 중간에 인용한 논문들을 참고하면 더욱 도움이 되리라 생각된다. 또한 서론에 본인이 소개한 몇 편의 총설이 P-450의 여러 특성을 이해하는 데 도움이 되리라 생각되어 제시하였다.

## 참고 문헌

1. Armstrong, R.N., Vyas, K.P., Thakker, D.R., Yagi, K., Thomas, P.E., Ryan, D.E., and Levin, W. (1982), *Stereochemical modeling of the catalytic site of P-450c*, pp.195-201. in "Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity", (Sato, R and Kato, R. eds), Japan scientific societies Press, Tokyo.
2. Back, D.J., Purba, H.S., Staiger, C., Orme, M.L. and Breckenridge, A.M. (1983) *Biochem. pharmacol.* 32, 257.
3. Bandiera, S., Ryan, D.E., Levin, W. and Thomas, P.E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 478.
4. Bandiera, S., Ryan, D.E., Levin, W. and Thomas, P.E. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 658
5. Breen, K. J. Bury, R., Desmond, P.V., Mashford, M.L., Morphett, B., Westwood, B. and Shaw, R.G. (1982) *Clin. Pharmacol. Ther.* 31, 297.
6. Burke, M.D. and Mayer, R.T. (1975) *Drug Metab. Dispos.* 3, 245.
7. Cheng, K.C. and Schenkman, J.B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11738.
8. Conney, A.H. (1986) *Life sci.* 39, 2493.
9. Conney, A.H., Welch, R., Kuntzman, R., Chang, R., Jacobson, M., Munro-Faure, A.D., Peck, A. W., Bye, A., Poland, A., Poppers, P.J. Finster, M. and Wolff, J.A. (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 179, 155.

10. Dailey, H.A. and Strittmatter, P. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1677.
11. Dean, M.E. and Stock, B.H. (1975) *Drug Metab. Dispos.* **3**, 325.
12. Ellen, J.O.F. (1985). *Absorption, Distribution and Elimination of Toxic Agents*, in "Industrial Toxicology", pp.27-58. Phillip, L.W. and James, L.B. (eds), Van Nostrand Reinhold Co. (NY).
13. Feuer, G. and Kardish, R. (1975) *Intl. J. Clin. Pharmacol.* **11**, 336.
14. Flind, A.C. (1978) *Br. Med. J.* **ii**, 1367.
15. Frazer, D.R., and Kodicek, E. (1970) *Nature*, **228**, 764.
16. Fujii, K.Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K., and Muramatsu, M. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, **79**, 2793.
17. Gray, R., Boyle, I., and Deluca, H.F. (1971) *Science*, **172**.1232.
18. Guengerich, F.P. (1983), *Biochemistry*, **22**, 2811.
19. Gurtoo, H.L., Williams, C.J., Gottlieb, K., Mulhern, A.I., Caballes, L., Vaught, J.B., Marinello, A.J., and Bansal, S.K. (1983). *Int. J. Cancer*, **31**, 29.
20. Haniu, M., Ryan, D.E., Ida, S., Lieber, C.S., Levin, W., and Shively, J.E. (1984), *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 304.
21. Hart, P., Farrell, G.C., Cooksley, W.G.E. and Powell, L.W. (1976), *Br. Med. J.* **2**, 147.
22. Henry, H.L. (1985) *J. Steroid Biochem.* **23**, 991.
23. Hetzel, D., Birkett, D., and Miners, J., (1979) *Lancet*, **2**, 639.
24. Hodgson, E., and Juchau, M.R. (1977), *J. Steroid Biochem.* **8**, 669.
25. Imai, Y., and Sato, R. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 569.
26. Jacobson, M., Levin, W., Poppers, P.J., Wood, A.W., and Conney, A.H. (1974), *Clin. Pharmacol Ther.* **16**, 701.
27. James, M.O., and Otto, W.N. (1982), *Human Biochemistry* (Tenth ed.), pp.616-617, The C.V. Mosby Co. (London).
28. Jefcoate, C.R. (1978), *Methods Enzymol.* **52**, 258.
29. Jenne, J., Nagasawa, H., Mchugh, R., Macdonald, F. and Wyse, E. (1975), *Life sci.* **17**, 195.
30. Jerina, D.M., Michaud, D.P., Feldmann, R.J., Armstrong, R.N., Vyas, K. P., Thakker, D.R., Yagi, H., Thomas, P.E., Ryan, D.E., and Levin, W., (1982), Stereochemical modeling of the catalytic site of cytochrome P-450, in: *Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity* (R. Sato and R. Kato, eds.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp.195-201.
31. Johnson, E.F. (1979) *Multiple forms of cytochrome P-450; Criteria and significance*, in "Reviews in Biochemical Toxicology" (Hodgson, E., Bend, J.R., and Philpot, R.M. eds), pp. 1-26, Elsevier/North Holland (Amsterdam).
32. Juchau, M.R., Namkung, M.J., Jones, A.H., and Digiovanni, J. (1978) *Drug Metab. Dispos.* **6**, 273.
33. Juchau, M.R. (1971) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**, 665.
34. Juchau, M.R. (1980) *Pharmacol. Ther.* **8**, 501.
35. Juchau, M.R. and Symms, K.G. (1972) *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2053.
36. Kahl, R., Friederici, D.E., Kahl, G.F., Ritter, W. and Krebs, R. (1980) *Drug Metab. Dispos.* **8**, 191.
37. Kan, P. B., Hirst, M. A. and Feldman, D. (1985) *J. Steroid Biochem.* **23**, 1023.
38. Kapitulnik, J., Levin, W., Poppers, P.J., Tomaszewski, J. E., Jerina, D. W., and Conney, A. H. (1977) *Clin. Pharmacol. Ther.* **20**, 557.
39. Klotz, U. and Reimann, I. (1980) *N. Engl. J. Med.* **302**, 1012.
40. Kumaki, K., Sato, M., Kow, H., and Nebert, D. W. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1048.
41. Kuwahara, S., Harada, N., Yoshioka, H., Miyata, T. and Omura, T. (1984) *J. Biochem.* **95**, 703.
42. Lake, B.G., Hopkins, R., Chakraborty, J. Bridges, J.W. and Parke, D.V.W. (1973). *Drug Metab. Dispos.* **1**, 342
43. Lambeth, J.D. (1985) *On the role of Phospholipids and membranes in the regulation of oxidative enzymes*. pp. 189-215. in "Phospholi-

- pids and Cellular Regulation* (Vol II), Kuo,J.F. (ed), CRC Press Inc. (Florida).
44. Lau,S., Abrans,G. D. and Zommoni,V. G. (1980) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 703.
  45. Lau,S. and Zammoni,V.G. (1979) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50, 309.
  46. Lau,S. and Zammoni,V.G. (1981) *Mol. Pharmacol.* 20, 234.
  47. Levin,W., Wood,A., Chang,R., Ryan,D., Thomas,P., Yagi,H., Thakker,D., Wyas,K., Boyd, C., Chu,S.Y., Conney,A. and Jerina, D. (1982) *Drug Metab. Rev.* 13, 555.
  48. Longacre,S.L., Kocsis,J.J. and Synder,R. (1981) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60, 398.
  49. Loose,D. S., Kan,P.B., Hirst,M.A., Marcus,R. A., and Feldman, D. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 1495.
  50. Madhok,T.C. and DeLuca,H. F. (1979) *Biochem. J.* 184, 491
  51. Maeda,K., Kamataki, T., Nagai,T. and Kato, R (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 509.
  52. Meredith,C. G., Maldonado,A.L. and Speeg, K. V.Jr. (1985) *Drug Metab. Dispos.* 13, 156.
  53. Michael, R. M., Maliyakal, E.J. and Evan, R.S: (1986) *Regulation of Synthesis and Activity of Cytochrome P-450 Enzymes in Physiological Pathways* (Chapter 10), pp. 371. in "Cytochrome P-450", Paul, R. O. de M (ed), Plenum Press (NY and London)
  54. Mihaly,G.W., Ward,S.A., Nicholl,D.D., Edward, G. and Breckenridge,M.A. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 337.
  55. Mittler,J.C., Pogach,L. and Ertel,N.H. (1983) *J. Steroid Biochem.* 18, 759.
  56. Miwa,G.T. and Lu, A. Y. H. (1986) *The Topology of the Mammalian Cytochrome P-450 Active site.* pp.77-88. in "Cytochrome P-450" Paul, R. O. de M. (ed), Plenum Press (N Y and London)
  57. Mizukami,Y., Fujii-Kuriyama,Y. and Muramatsu (1983), *Biochemistry* 22, 1223.
  58. Morrison,A.S. (1978) *J. Cron. Dis.* 31, 357.
  59. Murakami, K. and Okuda, K. (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 8658.
  60. Murray, M. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33, 3277.
  61. Murray, M. (1987) *Drug Metab. Re.* 18, 55.
  62. Murray, M. and Farrell,G.C. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 2149.
  63. Murryay, M., Ryan, A. J. and Little P. J. (1982) *J. Med. Chem.* 25, 887.
  64. Murray, M. (1986) *J. Pharm Pharmacol.* 38, 472.
  65. Murray, M. and Ryan, A. J. (1983a) *Chem-Biol. Interact.* 43, 341.
  66. Murray, M. and Ryan, A. J. (1983b) *Xenobiotica.* 13, 707.
  67. Neale,M.G. and Parke,D.V. (1973) *Biochem. Pharmacol.* 22, 1451.
  68. Nebert,D.W., Adesnik,M., Coon,M.J., Estabrook,R.W. Gonzalez,F.J., Guengerich,F.P., Gunsalus,I.C., Johnson,E.F., Kemper B., Levin, W., Phillips, I.R., Stato R. and Waterman,M.R. (1987) *DNA*, 6, 1.
  69. Nebert,D.W. and Gonzalez,F.J. (1987) *Cytochrome P-450 Genes, Ann. Review Biochem.* 56, 945.
  70. Nebert,D.W., Winker,J. and Gelboin,H.V. (1969) *Cancer Res.* 29,1763.
  71. Netter,K.J. (1980) *Pharmacol. Ther.* 10, 515.
  72. Niemegeers,C.J.E., Levron,J.C., Awouters,F. and Janssen, P.A.J. (1981) *Arch. Int. Pharmacodyn.* 251, 26.
  73. Olson,E.B.Jr., Knutoson,J.C., Bhattacharyya,M. H. and Deluca,H.F. (1976) *J. Clin. Invest.* 57, 1213.
  74. Pantuck, E. J., Hsiao, K. C., Kaplan, S. A., Kuntzman.R. and Conney,A.H. (1974) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 191, 45.
  75. Pantuck,E.J., Hsiao,K.C., Maggio,A., Nakamura, K., Kuntzman. R. and Conney,A. H. (1974) *Clin. Pharmacol. Ther.* 15, 9.
  76. Pantuck,E. J., Kuntzman, R. and Conney,A.H. (1972) *Science* 175, 1248.
  77. Park,K.H., Lee D.W., Mun,Z.Y. and Kim,S.Y. (1988) *unpublished data.*
  78. Parsons,W.D. and Neims,A.H. (1978) *Clin. Pharmacol. Ther.* 24, 40.
  79. Pelkonen,O. (1980) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*

- 18, 17.
80. Pelkonen, O., Jouppila, P., and Kärki, N. T. (1972) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23**, 399.
  81. Pelkonen, O., Kärki, N. T., Korhonen, P., Koivisto, Tuimala, R. and Kauppila, A. (1978) *Adv. Pharmacol. Ther.* **8**, 101.
  82. Pelkonen, O., Kärki, N. T., Korhonen, P., Koivisto, M., Tuimato, R. and Kauppila, A. (1979) in "Carcinogenesis" (Vol. 4), Ann. Arbor Science Publishers, Ann. Arbor (Michigan)
  83. Pelkonen, O. and Moilanen, M. L. (1979) *Med. Biol.* **57**, 306.
  84. Pelkonen, O. and Nebert, D. W. (1982) *Pharmacol. Rev.* **34**, 189.
  85. Pelkonen, O. and Puurunen, J. (1980) *Biochem. Pharmacol.* **29**, 3075.
  86. Pont, A., Williams, P. L., Azhar, S., Reitz, R. E., Bochra, C., Smith, E. R. and Stevens, D. A. (1982) *Arch. Intern. Med.* **142**, 2137.
  87. Pony, A., Williams, P. L., Loose, D. S., Feldman, D., Reitz, R. E., Bochra, C. and Stevens, D. A. (1982) *Ann. Intern. Med.* **97**, 370.
  88. Rampersand, A. and Walz, F. G. Jr. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, **80**, 6542.
  89. Rampersaud, A., Waxman, D. J., Ryan, D. E., Levin, W. and Walz, F. G. Jr. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 174.
  90. Rein, H., Ristau, O., Misselwitz, R., Buder, E. and Ruckpaul, K. (1979) *Acta. Biol. Med. Germ.* **38**, 187.
  91. Rendic, S., Kajfez, F. and Ruf, H. H. (1984) *Drug Metab. Dispos.* **11**, 137.
  92. Riviere, J. H. and Back, D. J. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 567.
  93. Robinson, N. C. and Tanford, C. (1975) *Biochemistry.* **14**, 369.
  94. Rogerson, T. D., Wilkinson, C. F. and Hetnarski, K. (1977) *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1039.
  95. Ryan, D. E., Iida, S., Wood, A. W., Thomas, P. E., Lieber, C. S. and Levin, W. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1239.
  96. Ryan, D. E., Thomas, P. E. and Levin, W. (1982) *Arch Biochem. Biophys.* **216**, 272.
  97. Schenkman, J. B., Sligar, S. G., and Cinti, D. L. (1981) *Pharmacol. Ther.* **12**, 43.
  98. Schuster, I. (1985) *Xenobiotica*, **15**, 529.
  99. Serlin, M. J., Challiner, M., Park, B. K., Turcan, P. A. and Breckenridge, A. W. (1980) *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1971.
  100. Serlin, M. J., Sibeon, R. G., Mossman, S., Breckenridge, A. M., Williams, J. R. B., Atwood, J. L. and Willoughby, J. M. T. (1979) *Lancet* **2**, 317.
  101. Sheets, J. J. and Mason, J. I. (1984) *Drug Metab. Dispos.* **12**, 603.
  102. Sheets, J. J., Mason, J. I., Wise, C. A. and Estabrook, R. W. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 487.
  103. Shimada, T. and Sato, R. (1978) *Biochem. Pharmacol.* **27**, 585.
  104. Silver, B. A. and Bell, W. R. (1979) *Ann. Intern. Med.* **90**, 348.
  105. Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G. and Schekman, J. B. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 925.
  106. Stephen, G. S. and Ralph, I. M. (1986) *Cytochrome P-450cam and Other Bacterial P-450 enzymes, pp.429-445. in "Cytochrome P-450"*, Paul, R. O. de M. (ed), Plenum Press (NY and London)
  107. Suwa, Y., Mizukami, Y., Sogawa, K. and Fujii, K. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7980.
  108. Symms, K. G. and Juchau, M. R. (1974) *Drug Metab. Dispos.* **2**, 194.
  109. Tamburini, P. P., Masson, H. A., Bains, S. K., Makowski, R. J., Morris, B. and Gibson, G. G. (1984) *Eur. J. Biochem.* **139**, 235.
  110. Testa, B., and Jenner, P. (1981) *Drug Metab. Rev.* **12**, 1.
  111. Thomas, P. E., Korzeniowski, D., Ryan, D. and Levin, W. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 524.
  112. Thomas, P. E., Reik, L. M., Ryan, D. E. and Levin, W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1044.
  113. Tulchinsky, D. and Ryan, K. L. (eds) (1980), *Maternal-Fetal Endocrinology*, W. B. Saunders Co., (Philadelphia).
  114. Vahakangas, K., Pelkonen, O. and Sotaniemi,

- E. (1983) *Clin. Pharmacol. Ther.* **33**, 375.
115. van der Hoeven, T. A., Haugen, D. A. and Coon, M. J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 569.
116. Vermillion, J. L. and Coon, M. J. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2694.
117. Waxman, D. J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15481.
118. Waxman, D. J., Dannan, G. A. and Guengerich, F. P. (1985) *Biochemistry*, **24**, 4409.
119. Waxman, D. J. and Walsh, C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10446.
120. Waxman, D. J. (1986) *Rat Hepatic Cytochrome P-450*, pp.525-539. in "Cytochrome P-450" Paul, R. O. de M. (ed), Plenum Press (NY and London).
121. Welch, R. M., Harrison, Y. E., Conney, A. H., Poppers, P. J. and Finster, M. (1968) *Science* **160**, 541.
122. Welch, R. M., Harrison, Y. E., Gommi, P. J., Poppers, P. J., Finster, M. and Conney, A. H. (1969) *Clin. Pharmacol. Ther.* **10**, 100.
123. Whitlock, J. P. (1986) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**, 333.
124. Wilkinson, C. F., Hetnarski, K., Cantwell, G. P. and Dicarlo, F. J. (1974) *Biochem. Pharmacol.* **23**, 2377.
125. Wong, A., Basrur, P. and Safe, S. (1979) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **24**, 543.
126. Yagi, H. and Jerina, D. M. (1982), *J. Am. Chem. Soc* **104**, 4026.
127. Yuan, P. M., Ryan, D. E., Levin, W. and Shirely, J. E. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**, 1169.