

## Hydroperoxide 의존성 반응에서의 Cytochrome P-450의 산화활성종 형성양식

문전옥\* · 김기현

부산대학교 약학대학

(Received November 4, 1992)

### Mechanism of Peroxide-supported Hydroxylation by Cytochrome P-450: Its Formation Pattern of the Active Intermediate

Jeon-Ok Moon\* and Ki-Heun Kim

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Abstract**—Peroxidase activity of cytochrome P-450 was examined using N, N-dimethylaniline (NDA) as a substrate and cumene hydroperoxide (CHP) as an oxidant. The initial rates of the N-demethylation for varied concentrations of NDA (0.05~0.5 mM) by P-450 at different fixed concentrations of CHP (0.02~0.2 mM) were determined. The results suggest that P-450 proceeds its peroxidative reaction by the rapid equilibrium random bi bi mechanism to form a ternary complex with substrate and oxidant as an active intermediate.

**Keywords** □ Cytochrome P-450, Peroxide-supported Hydroxylation, rapid equilibrium random bi bi mechanism.

Cytochrome P-450(이하, P-450)은 지방산, 스테로이드 등의 생체물질의 대사와, 약물의 해독 과정 및 발암진구체물질의 활성화에 중요한 역할을 하며 다양한 산화반응에 관여하므로 이 효소에 관한 많은 연구가 각분야의 연구자들에 의해 활발히 진행되고 있다.<sup>1)</sup> Cytochrome P-450은 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 작용으로 기질을 산화하는데, 이 반응기전의 핵심부분인 궁극적인 산화활성종 형성 및 기질과의 반응단계는 화학량론적으로 추정된 것일뿐, 상세한 부분은 제대로 밝혀지고 있지 않다.

한편, peroxidase류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alkyl hydroperoxide 혹은 allyl hydroperoxide 등의 hydroperoxide를 소비하여 무기 및 유기화합물의 산화를 촉매하는 효소인데, P-450도 이러한 hydroperoxide 존재하, peroxidase활성을 나타내며,<sup>2,3)</sup> 실제 P-450의 촉매활성에 관한 많은 부분은 P-450의 peroxidase활성을 Horseradish peroxidase (HRP) 등의 전형적인 peroxidase

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

활성과 비교·검토함으로써 얻어진 것이다.<sup>4)</sup> 본 연구에서는 P-450이 alkyl hydroperoxide 존재하 기질을 산화하는 반응을 2기질이 관여하는 반응으로 볼 때, 어떠한 기구에 의해 반응을 진행시키는 지를 검토하였다. 한편 P-450의 hydroperoxide의존성 반응이 peroxidase와 같지 않음을 밝히며, P-450이 기질을 산화하는 과정에 형성하는 산화활성종의 특성에 대해 검토하였다.

#### 실험방법

**시약**—cumene hydroperoxide는 Nakarai Tesque, Inc.에서 구입하였으며, 그 밖에 사용된 각종 시약은 Wako pure chemical industries, LTD 및 Tokyokasei Chemical Co. 제품을 사용하였다.

**Rat 간미크로솜의 조제**—체중 약 150g 전후의 Wistar계 수컷 rat에 phenobarbital(Na염, 60 mg/Kg 체중)을 3일간 복강내 투여했다. 24시간 절식시킨 후

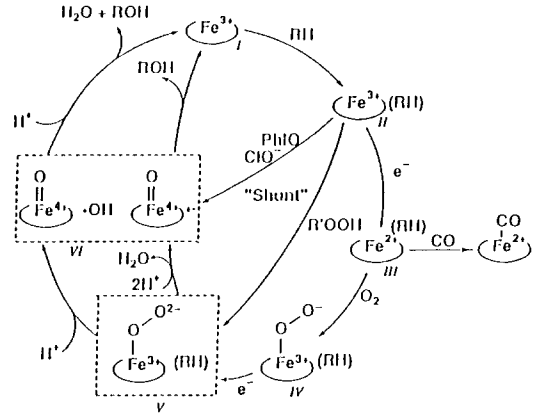
4일째 에틸로 마취한 rat의 경동맥을 절단, 대부분의 피를 제거한 후 복부를 절개하여 간동맥을 통하여 빙냉한 1.19% KCl용액을 약 100 ml 관류시켜 간장내의 혈액을 제거했다. 적출한 간중량의 약 4배 정도되는 인산 완충액과 함께 호모지네이트를 하여 9,000×g에서 20분간 원심분리 하였다 그 상층을 105,000×g에서 1시간 초원심분리하여 얻은 pellet를 인산완충액을 가해 호모지네이트 한 뒤 소량으로 분주, -78°C에 보존하여 사용하였다. 단백질정량은 Lowry법에 따라 행하였다.<sup>5)</sup>

**Cytochrome P-450의 함량 측정**—Omura와 Sato의 방법에 준하여 환원체의 일산화탄소 흡수 스펙트럼에서 함량을 구했다.<sup>6)</sup> 즉, 마이크로솜을 20% glycerol을 포함하는 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)에 현탁시켜 0.5~2.0 mg protein/ml 용액으로 한 뒤 이 용액에 소량의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>를 가해 환원시켰다. 대조용과 Sample용의 UV cell에 분주한 뒤 500 nm~400 nm의 base line을 보정했다. Sample측에 일산화탄소 gas를 60초간 bubbling 한 뒤 Spectra를 기록했다. 450 nm와 490 nm의 흡광도 차를 구해  $\epsilon = 91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 로서 계산하였다. 본 실험에 사용된 마이크로솜은 mg protein 당 1.54 nmole의 cytochrome P-450을 함유했다.

**N, N-dimethylaniline의 N-탈메틸화반응의 활성 측정**—N, N-dimethylaniline이 N-탈메틸화되어 생긴 HCHO를 Nash법<sup>7)</sup>에 따라 정량하였다. 100 mM sodium phosphate 완충액중에 기질 N, N-dimethylaniline (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0 mM)과 microsomal protein 1 mg을 포함하는 반응액을 37°C에서 preincubation시킨 뒤 에탄올 20  $\mu$ 에 녹인 cumene hydroperoxide를 각각 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 및 0.20 mM이 되도록 가하여 반응을 개시했다. 2분간 incubation 한 뒤, 20% trichloroacetic acid 용액 1.0 ml를 가하여 37°C에서 40분간 incubation하여 발색시킨 뒤 412 nm에서의 흡광도를 측정하였다. blank는 20% trichloroacetic acid 용액으로 반응을 중지시킨 후 cumene hydroperoxide를 가하여 조제했으며, 각 반응결과는 duplicate한 평균치이다.

**결과 및 고찰**

P-450이 촉매하는 반응은 대단히 복잡다양하나 기본적으로는 산소첨가반응중의 일원자산소첨가반응에

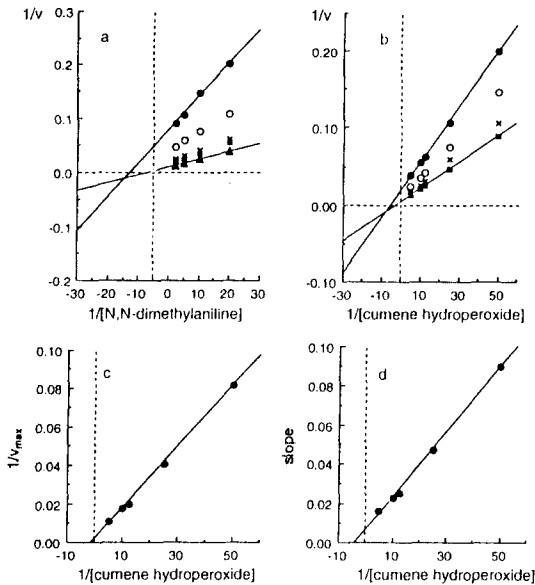


**Scheme I**—Catalytic cycle of cytochrome P-450

속하며, 그 반응은 Scheme I에 나타난 것과 같이 단계적으로 일어나는 반응 cycle에 의한 것으로 여겨지고 있다.<sup>4,8)</sup> 즉, (i) 유리형(산화형) P-450에 기질이 결합(I→II), (ii) 제 1전자 도입으로 인한 P-450의 환원(Fe<sup>3+</sup>→Fe<sup>2+</sup>) (II→III), (iii) 산소분자의 결합(소위 산소화형의 형성) (III→IV), (iv) 2번째의 전자도입 (IV→V), (v) H<sup>+</sup>의 도입과 물분자의 생성 및 해리, (vi) 생성물의 생성과 해리, 그리고 산화형 P-450의 재생(V→I)이다. 이들중 산소화형(IV)에 2번째 전자를 도입하는 단계가 전체 반응 cycle에 있어서 율속과정인데, (V)로 표시되는 것과 같은 peroxy형 중간체가 생성되는 것으로 추정된다.

한편, P-450도 peroxidase활성을 지니고 있어서 NADPH와 분자상 산소가 존재하지 않는 상태에서 여러 유기 peroxide에 의해 기질을 산화할 수 있다. 따라서 P-450이 촉매하는 산소첨가 기구는 반응기구가 잘 연구되어 있는 peroxidase의 경우와 대비하여 연구되어져 왔다. peroxidase의 Compound I 생성과정에서 유추할 때, P-450의 경우에도 peroxide의 O-O간의 결합이 불균등개열을 일으키면 oxene이, 균등개열을 일으키면 radical을 형성할 것이다. 그러나, P-450에 의한 산소첨가 반응에 있어서 V, VI로 나타내어진 중간체는 아직 동정되지 않았고 이 단계의 해명이 가장 지연되고 있다.

한편, P-450 및 peroxidase가 산화제 존재하에 기질을 산화하는 반응은 2기질이 관여하는 반응으로 볼 수 있는데, 두 기질이 관여하는 반응에 대표적인 것으로는 ping-pong, ordered, Theorell-Chance 및



**Fig. 1**—Double reciprocal plots for cumene hydroperoxide-dependent oxidation of N, N-dimethylaniline by cytochrome P-450. (a) The concentration of N, N-dimethylaniline was varied while the cumene hydroperoxide concentration was held constant at the following values: ●, 0.02; ○, 0.04; ×, 0.08; ■, 0.1; and ▲, 0.2 mM. (b) The concentration of cumene hydroperoxide was varied while the N, N-dimethylaniline concentration was held constant at the following values: ●, 0.05; ○, 0.1; ×, 0.2; ■, 0.5 mM. (c) Intercepts on the ordinate axis of (a) were plotted against the reciprocal of the cumene hydroperoxide concentration which gave that intercept. (d) Slopes from (a) were plotted against the reciprocal of the cumene hydroperoxide concentration which gave that slope.

rapid equilibrium 기구를 들 수 있다.<sup>9)</sup> 일반적으로 peroxidase는 ping-pong bi bi 기구로 산화제 존재하에서 기질을 산화시키는데<sup>10)</sup> 이것은 peroxidase가 산화제와 반응하여 산화활성종(Compound I)을 형성하며 이 산화활성종이 기질에 산소원자를 도입하는 것을 의미한다. P-450의 경우 어떠한 기구에 의해 반응을 진행시키는 가를 검토함으로써 P-450이 기질산화과정에서 형성하는 산화 활성종에 대한 특성을 살펴보기로 하였다.

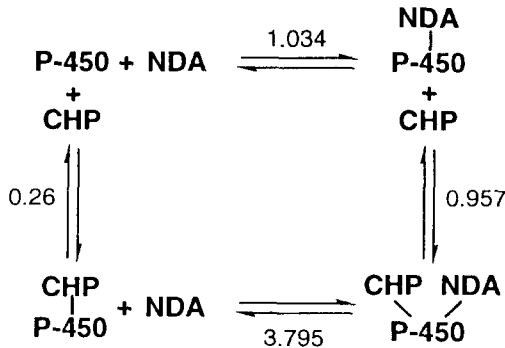
우선 반응조건을 검토하였다. 기질로는 N, N-dime-

thylaniline (NDA)을, 산화제로는 cumene hydroperoxide (CHP)를 택해, 각각 그 농도를 10 mM과 2 mM로 과잉으로 존재시킨 상태에서, P-450의 탈메틸화반응의 단백질농도의존성을 검토하였다. 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 및 2.0 mg 단백질을 사용하여 각 mg 단백질당 반응의 경시변화를 보았다. 그 결과 1.0 mg protein을 사용한 경우까지는 2분이상 직선성을 보였으나, 2.0 mg protein인 경우 직선성을 상실했으며, 반응시간을 1분으로 할 경우의 반응성은 2 mg protein까지 직선성을 보였다. 따라서 1 mg protein 농도로 2분간 반응을 시켜 1분당 생성하는 formaldehyde양을 계산하였다.

기질 농도와 산화제농도를 변화시키면서, 각각의 경우의 P-450의 탈메틸화반응속도를 측정하였다. Fig. 1-a는 각종 일정 산화제 농도 (0.02, 0.04, 0.08, 0.1 및 0.2 mM)에서 반응속도의 역수를 기질농도의 역수에 대해 plot한 것이며 Fig. 1-b는 각종 일정 기질 농도 (0.05, 0.1, 0.2 및 0.5 mM)에서 반응 속도의 역수를 산화제 농도의 역수에 대해 plot한 것이다. 양 graph는 수직축 좌측, 제 3상환에 교점을 형성하고 있다. 산화제 농도가 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 및 0.2 mM로 변함에 따라 각각의 경우의 외관상  $V_{max}$ 는 12.2, 24.6, 50.0, 56.2 및 90.1 nmol/min/mg prot.으로 변화하였다.

일반적으로 peroxidase의 경우, ping-pong bi bi 기구로 반응을 진행시키므로 각종 일정한 산화제농도에서 반응속도의 역수를 기질 농도 역수에 대해 plot하면 산화제의 농도가 증가함에 따라 외관상  $1/V_{max}$ 와  $1/K_m$ 은 감소하나  $K_m/V_{max}$ 는 일정한 평행선을 얻게 된다. 반면에, P-450의 경우는 Lineweaver-Burk plot결과, 교점을 지니고 있어서 ping-pong bi bi 기구의 peroxidase와는 달리 기질, 산화제 및 효소의 삼자복합체를 형성하여 반응을 진행시킴이 시사되었다.

Fig. 1-c는 외관상  $V_{max}$ 역수를 산화제 농도의 역수에 대해 plot한 것인데 종축과의 교점에서 진정치  $V_{max}$ 는 602 nmol/min/mg prot.으로 추정되었다. Fig. 1-d는 일정 산화제농도에 있어서의 Lineweaver-Burk plot의 경사를 구해 (0.02, 0.04, 0.08, 0.1 및 0.2 mM에 대해 각각 0.0896, 0.0468, 0.0254, 0.0231 및 0.0162였다.) 그 역수를 산화제 농도의 역수에 대해 plot한 것인데 횡축과의 교점인  $-1/K_{m_{CHP}}$ 은  $-3.835$ 로서  $K_{m_{CHP}}$ 는 0.26 mM로 추정되었다.



**Scheme II**—Dissociation constants (mM) of cytochrome P-450 in the reaction of N, N-dimethylaniline (NDA) N-demethylation with cumene hydroperoxide (CHP).

효소-기질-산화제의 삼자복합체를 형성하는 양식중 order 및 Theorell-Chance 기구는 삼자복합체를 이자복합체로 부터 형성한다. 즉, 기질과 효소가 결합한 후에야 산화제가 결합하거나, 산화제와 효소가 결합한 뒤에야 기질이 결합하여 반응을 진행시키므로 기질 및 산화제가 각각 효소와 단독으로 결합할 수 있음이 알려져 있는 P-450의 경우,<sup>11)</sup> 다른 가능성을 지니게 된다. 이를 rapid-equilibrium random bi bi 기구라 할 때, Fig. 1-c의 횡축과의 교점,  $-1/(\alpha K_{m_{\text{CHP}}})$ 은  $-1.045$ 로서  $\alpha K_{m_{\text{CHP}}}$ 값은  $0.957$  mM이다. 따라서  $\alpha$  값은  $3.67$ 이며 종축과의 교점인  $\alpha K_{m_{\text{NDA}}}/V_{\text{max}}$ 가  $0.00634$ 로서  $K_{m_{\text{NDA}}}$ 는  $1.034$  mM로 추정된다.

이상의 결과를 Scheme II에 나타내었다. 기질 N, N-dimethylaniline과 산화제 Cumene hydroperoxide는 순서에 관계없이 각각의 해리상수  $1.034$  및  $0.26$  mM으로 P-450에 결합한다. 한편, 어느 한쪽이 결합하게 되면 다른 한쪽의 P-450에 대한 affinity를 변화시키는 데, 기질은 산화제-효소복합체에 해리상수  $3.795$  mM로, 산화제는 기질-산화제복합체에 해리상수  $0.957$  mM로 결합한다. 반응이 종결되면 기질 N, N-dimethylaniline은 N-methylaniline으로, 산화제 cumene hydroperoxide는 cumyl alcohol로 변화하여 각각 P-450에서 해리되어 나오고 그 결과 P-450은 재생된다.

일반적인 peroxidase는 peroxide와 1 : 1반응을 하여 활성산화종인 Compound I을 형성하고,<sup>12)</sup> 이때 기질이 존재하면 Compound I과 기질이 반응하여

산화반응이 진행된다. P-450의 경우 peroxide와 함께 기질도 공존할 때 삼자복합체를 형성하며 그 결과 기질이 산화됨이 밝혀졌다. P-450은 막단백질로서 주위에는 끊임없는 막지질의 과산화가 일어나고 그 결과 다량의 유기 peroxide가 생성되고 있음을 고려할 때, P-450은 불필요한 산화활성종의 형성을 줄이고 기질이 존재할 때만 유기 peroxide를 이용한 peroxidase활성을 나타낼 가능성이 시사된다.

## 문 헌

- 1) Ortiz de Montellano, P. R. (eds): *Cytochrome P-450; Structure, Mechanism and Biochemistry*. Plenum Press, New York (1986).
- 2) Rahimutula, A. and O'Brien, P.: Hydroperoxide catalyzed liver microsomal aromatic hydroxylation in reactions involving Cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 440 (1974).
- 3) Hrycay, E., Gustafsson, J., Ingelman-Sundberg, M. and Ernster, L.: Sodium periodate, sodium chlorite, organic hydroperoxide, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  as hydroxylating agents in steroid hydroxylation reactions catalyzed by partially purified Cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 209 (1975).
- 4) White, R. E. and Coon, M. J.: Oxygen activation by Cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 315
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. R., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 6) Sato, R. and Omura, T.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
- 7) Nash, T.: The colorimetric estimation of HCHO by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 416 (1953).
- 8) Sato, R. and Omura, T. (eds): *Cytochrome P-450*. Kodansha-Academic Press, Tokyo and New York (1978).
- 9) Segal, I. H.: *Biochemical Calculations*. John Wiley & Sons, Inc. p. 293 (1976).
- 10) Kedderis, G. L. and Hollenberg, P. F.: Characterization of the N-demethylation reactions catalyzed by Horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **258**, 8129 (1983).

- 11) Blake II R. C. and Coon, M. J.: On the mechanism of action of Cytochrome P-450: Spectral intermediates in the reaction of P-450<sub>LM2</sub> with peroxy compounds. *J. Biol. Chem.* **255**, 4100 (1980).
- 12) Schonbaum, G. R. and Lo, S.: Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides, product analysis. *J. Biol. Chem.* **247**, 3353 (1972).