

대장균에서 발현된 인간 Cytochrome P450 1A1과 Rat NADPH-P450 Reductase와의 Fusion Protein의 효소 특성 연구

천영진 · 정태천 · 이현걸 · 한상섭 · 노정구
한국화학연구소 안전성센터

Enzymatic Properties of a Fusion Protein between Human Cytochrome P450 1A1 and Rat NADPH-P450 Reductase Expressed in *Escherichia Coli*

Young Jin Chun, Tae Cheon Jeong, Hyun Kul Lee, Sang Seop Han, Jung Koo Roh
Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT),
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon, 305-606, Korea

(Received July 18, 1996)
(Accepted August 22, 1996)

ABSTRACT : The enzymatic properties for NADPH-P450 reductase domain of a fusion protein between human cytochrome P450 1A1 and rat NADPH-P450 reductase expressed in *Escherichia coli* were investigated. The fusion plasmid pCW/1A1OR-expressed *E. coli* membrane showed high NADPH-cytochrome c reductase activity ($830.1 \pm 85.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$), while pCW control vector and P450 1A1 expression vector pCW/1A1 showed relatively quite low activity (4.35 ± 0.49 , $3.27 \pm 0.50 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, respectively). The kinetic curves for NADPH-cytochrome c reductase followed typical Michaelis-Menten kinetics. The K_m and V_{max} for NADPH-dependent reductase activity were $8.24 \pm 2.61 \mu\text{M}$ and $817.9 \pm 60.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, respectively, whereas those for cytochrome c-dependent reductase activity were $19.97 \pm 2.86 \mu\text{M}$ and $1303.5 \pm 67.1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$. The reductase activities were also compared with those of rat, porcine and human liver microsomes. The activity of pCW/1A1OR-expressed *E. coli* membrane was 15.2-fold higher than that of rat liver microsomes. Treatment with benzo(a)pyrene, 7-ethoxyresorufin and α -naphthoflavone which are known as specific substrates or inhibitor for human P450 1A1 increased NADPH-cytochrome c reductase activity of fusion protein in *E. coli* membrane dose-dependently. These results demonstrate that the membrane topology of fused enzyme may be important for activity of its NADPH-P450 reductase domain.

Key Words : Human P450 1A1, NADPH-P450 reductase, Fusion protein, *E. coli* membrane, Benzo(a)pyrene, 7-Ethoxyresorufin, α -Naphthoflavone

I. 서 론

Cytochrome P450 (P450)은 많은 종류의 생체내와 생체외에 존재하는 화학물질들의 대사에 관여하는 heme-thiolate oxygenase들로 구성되어있다(Guengerich, 1990). 많은 종류의 cytochrome P450 중에서 human cytochrome P450 1A1은 인체의 폐암과의 관련성 때문에 많은 연구가 진행되어 왔다. 비록 많은 다른 종류의 P450들이 폐암의 발생에 관여한다는 보고가 있지만, P450 1A1이 폐암 발생에 가장 밀접하게 연관된 P450으로 알려져왔다. 인간의 P450 1A1 유전자의

MspI polymorphism이 흡연으로 인한 폐암과 관련되어 있다고 알려져 있다. 인간의 P450 1A1은 폐, 태반, 및 혈구 등의 간이외의 장기에서 주로 발현되고, 간에서는 단지 소량만이 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Wrighton 등, 1986; Guengerich 등, 1986). 또한, P450 1A1 mRNA도 대부분의 인간의 간에서 소량만이 존재하고, 흡연자의 경우에도 간에서의 발현정도가 크게 증가되지는 않았다 (Fujino 등, 1982). 현재까지 인체 조직으로부터 활성을 갖는 상태의 인간의 P450 1A1의 순수분리는 성공하지 못하였고, 이에따라 인간의 P450 1A1 단백질에 대한 생화학적 연구는 많이 이루

어지지 않았다.

인체조직으로 부터의 순수분리의 난점 때문에 heterologous expression system을 이용한 인간의 P450 1A1의 발현이 연구되어 왔으며 (McManus 등, 1990; Eugster 등, 1990; Ching 등, 1991), 최근 인간의 P450 1A1 cDNA를 사용한 P450 1A1의 high-level expression을 *E. coli*에서 성공하였다 (Guo 등, 1994). *E. coli*를 이용한 bacterial expression system은 다른 expression system들에 비해 상대적으로 비용이 적게 들고, 높은 수율을 얻을 수 있으며, vector의 조작이 간편한 장점들이 있다. 하지만, 비록 일부의 P450 활성은 *E. coli*내에 존재하는 flavodoxin과 NADPH-flavodoxin reductase를 통한 전자전달계에 의해 발현되지만, P450에 전자를 전달하여 주는 NADPH-P450 reductase의 결핍으로 인하여 *E. coli*내에서 대부분의 P450 활성의 발현은 성공적이지 못하였다(Jenkins와 Waterman, 1995). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 P450와 NADPH-P450 reductase의 fusion protein을 유전공학적으로 개발하였다 (Sasaki 등, 1990; Fisher 등, 1992). P450와 NADPH-P450 reductase사이의 결합의 중요성은 P450과 NADPH-P450 reductase가 한 개의 단백질의 형태로 자연상에 존재하는 P450_{BM-3}의 경우에 잘 알려져 있다. P450_{BM-3}는 turnover number가 4000 min⁻¹으로 현재까지 알려진 P450의 반응중에서 가장 큰 turnover number를 갖고 myristate ω-2 hydroxylation 반응에 관여한다 (Fulco와 Ruttinger, 1987). Chun등은 Ser-Thr으로 구성된 dipeptide linker를 이용하여 인간의 P450 1A1과 rat NADPH-P450 reductase 사이의 fusion protein을 *E. coli*내에서 성공적으로 발현시켰다(Chun 등, 1996). 본 논문에서는 발현된 P450 1A1과 NADPH-P450 reductase의 fusion protein의 환원 활성에 대한 특성을 recombinant *E. coli*에서 얻은 membrane을 사용하여 연구하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약

*E. coli*배양을 위한 세균배지는 Difco (Detroit, MI)에서, T4 DNA ligase, restriction endonuclease들은 Promega (Madison, WI)에서 구입하였다. NADPH, NADP⁺, glucose 6-phosphate, glucose 6-phosphate dehydrogenase, horse heart cytochrome c, IPTG, δ-aminovalulinic acid 및 그 외의 일반시약들은 Sigma (St. Louis, MO) 에서 구입하였다.

2. Expression vector의 제조

Ser-Thr의 dipeptide linker를 사용하여 인간의 P450 1A1의 C-terminus의 coding sequence와 rat NADPH-P450 reductase의 N-terminus의 coding region을 연결하기 위하여 PCR을 수행하였다 (Chun 등, 1996). 모든 PCR에는 native *Pfu* polymerase (Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하였으며, rat NADPH-P450 reductase gene을 변형시키기 위하여 template로 pBluescript II vector에 cloning되어 있는 rat NADPH-P450 reductase gene을 사용하여 5' PCR primer는 5'-GTATACGCA-TGCAGATCTCTCGAGTCGACTATCCAAACAA-CGGCC-3'를, 3' PCR primer는 5'-CTGGTTCTCGTAGCTCTTC-3'를 사용하여 PCR을 수행하여 PCR product에 *SalI*과 *SacI* site를 도입하였다. 생성된 PCR product를 *SalI*과 *SacI*으로 절단한 뒤 분리후 rat NADPH-P450 reductase cDNA의 *SalI-Hind III* digest, pCW expression vector의 *SalI-Hind III* digest와 ligation시켜서 pCW/RatOR vector를 cloning하였다. 또한, 인간의 P450 1A1의 C-terminal sequence에 새로운 *SalI* site를 도입하기 위하여 5' PCR primer 5'-CAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCAACTG-3' 과 3' PCR primer 5'-GCTCTCAAGAGTCGACGAGCG-CAGCT-3'을 사용한 PCR을 수행하였다. 생성된 PCR product를 *EcoRI*과 *SalI*으로 절단하고 분리 한 후, 인간의 P450 1A1 cDNA의 *NdeI-EcoRI* digest 및 pCW/RatOR vector의 *NdeI-SalI* digest와 함께 ligation시켜서 pCW/1A1OR의 fusion protein expression vector를 제조하였다. pCW vector는 University of Oregon의 F.W. Dahlquist 교수, pCW/1A1 vector는 Vanderbilt University의 F.P. Guengerich 교수로부터 입수하였다.

3. *E. coli*에서의 발현 및 membrane fraction 조제

각 expression vector를 *E. coli* DH5a cell에 transformation한 후 ampicillin에 내성을 보이는 colony를 얻어 ampicillin (100 μg ml⁻¹)이 함유된 LB medium에서 37°C로 overnight 배양하였다. 다음날 10 ml의 LB culture를 0.2% bactopectone (w/v), ampicillin (100 μg ml⁻¹), 1.0 mM thiamine, 0.5 mM δ-aminovalulinic acid, trace element 및 1.0 mM IPTG가 첨가된 1.0 liter의 TB medium에 seeding 한 후 28°C에서 48시간동안 배양하였다. 배양을 마친 후 bacteria를 회수하고 membrane fraction을 조제하였다 (Gillam 등, 1993).

4. 효소 활성의 측정

조제한 *E. coli* membrane fraction을 20% glycerol (v/v)과 0.2% Emulgen 913 (w/v)가 함유된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 희석한 뒤에 Omura와 Sato의 방법 (Omura와 Sato, 1964)에 따라서 P450 spectra를 측정하였다. NADPH-cytochrome *c* reductase 활성은 horse heart cytochrome *c*를 사용하여 0.3 M potassium phosphate buffer (pH 7.7)에서 수행하였다. 반응은 0.12 mM NADPH를 가하여 개시하고, cytochrome *c* reduction의 속도를 550 nm에서 측정하였다. 활성도 계산에 사용된 cytochrome *c*에 대한 extinction coefficient는 $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었다 (Vermillion과 Coon, 1978). 단백질 농도의 측정은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 등의 방법으로 수행하였다 (Lowry 등, 1951).

III. 결과 및 고찰

인간의 P450 1A1을 *E. coli*를 이용한 heterologous expression system에서 high-level expression할 때에 P450 1A1 단백질의 N-terminal region의 두번째 amino acid를 leucine에서 alanine으로 바꾸는 것이 필요하였다. 이에 따라 형성된 pCW/1A1#17 clone은 약 $25 \text{ nmol (liter culture)}^{-1}$ 정도의 P450 1A1을 *E. coli*에서 발현하였다. 반면, 원래의 염기서열을 갖는 pCW/1A1#1 clone은 $2 \text{ nmol (liter culture)}^{-1}$ 이하의 낮은 발현정도를 나타내었다 (Guo 등, 1994). 본 실험에서는 가장 expression level이 높았던 pCW/1A1#17의 인간의 P450 1A1 cDNA와 rat NADPH-P450 reductase cDNA가 fusion된 pCW/1A1OR fusion protein expression vector를 이용하였다 (Fig. 1) (Chun 등, 1996). Heme 전구물질인 δ -aminolevulinic acid (0.5 mM)를 배지에 첨가하여 주었을 때에 membrane fraction내의 P450의 발현정도는 $150 \text{ nmol (liter culture)}^{-1}$ 정도로 크게 증가되었으며 이러한 현상은 인간의 P450 2D6, 2C10 및 2E1의 경우에도 나타나는 것으로 알려져 있다 (Gillam 등, 1995).

pCW, pCW/1A1 및 pCW/1A1OR vector를 발현시킨 *E. coli* membrane에서의 CO-difference spectrum을 측정하였을 때 pCW/1A1 및 pCW/1A1OR membrane의 경우에는 전형적인 P450의 spectra가 나타났으나 pCW membrane의 경우에는 carbon monoxide에 의한 450 nm에서의 P450 spectra가 나타나지 않았다 (data not shown). 1A1OR fusion protein의 reductase로서의 성질을 연구하기 위하여 각각의 membrane fraction에

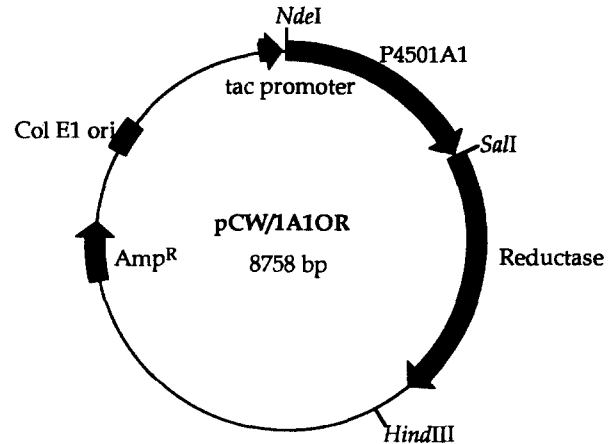


Fig. 1. Human cytochrome P450 1A1/NADPH-P450 reductase fusion plasmid (pCW/1A1OR). The 8.8 kb plasmid contains the tac promoter, cDNAs for P450 1A1 and NADPH-P450 reductase, transcription terminator derived from pBR322, the gene encoding β -lactamase (Amp^R), and the high-copy origin of Col E1.

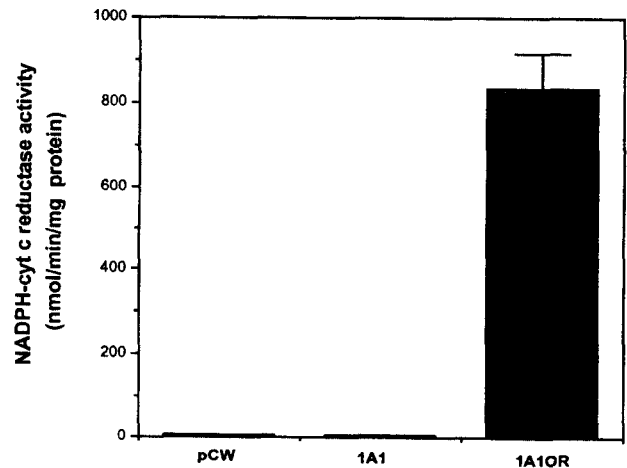


Fig. 2. NADPH-cytochrome *c* reductase activity of *E. coli* membranes transformed by expression plasmids. pCW, pCW/1A1 and pCW/1A1OR expressed *E. coli* membranes were incubated with $40 \mu\text{M}$ cytochrome *c* in 0.3 M potassium phosphate buffer (pH 7.7) for 3 min at room temperature. NADPH ($120 \mu\text{M}$) was added to reaction mixtures, and absorbance at 550 nm was measured by time. Results represent the means \pm SD.

서 NADPH-cytochrome *c* reductase 활성을 측정하였다 (Fig. 2). pCW membrane의 경우 $4.35 \pm 0.49 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 의 낮은 활성을 나타내었으며, P450 1A1만을 발현시킨 경우에는 $3.27 \pm 0.50 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 으로 pCW membrane의 경우와 큰 차이가 나타나지 않았다. 하지만 P450 1A1과 NADPH-P450 reductase의 fusion protein을 발현시킨 *E. coli* membrane에서는 $830.1 \pm 85.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 로 활성도가 pCW membrane에 비해 191배가 높게 나타났다. 이러한 높은 활성도는 fusion protein내의

NADPH-P450 reductase의 부위가 *E. coli* membrane상에서 효소활성을 나타내기 위해 적당한 구조로 존재하고 있음을 의미한다.

pCW/1A1OR membrane을 사용하여 NADPH와 cytochrome *c*에 대한 NADPH-cytochrome *c* reductase 활성의 kinetics를 연구하였다 (Fig. 3). Membrane내에 존재하는 fusion protein은 Michaelis-Menten kinetics에 잘 따르는 것으로 나타났으며, NADPH에 대한 K_m 은 $8.24 \pm 2.61 \mu\text{M}$, V_{max} 는 $817.9 \pm 60.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 이었으며, cytochrome *c*에 대한 K_m 은 $19.97 \pm 2.86 \mu\text{M}$, V_{max} 는 $1303.5 \pm 67.1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 의 값을 나타내었다(Table 1).

Table 2에서는 pCW/1A1OR membrane의 reductase 활성도를 rat, porcine 및 인간의 liver microsome들에서의 값과 비교하여 나타내었다. Rat liver microsome의 대조군, TCDD 투여군, porcine liver microsome 및 인간의 liver microsome HL-4, HL-64 등은 각각 55.8, 56.3, 51.1, 67, 55 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 으로 서로 유

사한 활성도를 보였으며, phenobarbital을 투여한 rat liver microsome은 대조군에 비해 약 1.6배 높은 값을 보였다 ($89.2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$). 이 결과는 phenobarbital에 의해 NADPH-P450 reductase의 발현이 증가한다는 이전의 보고와 일치하는 것이다(Gonzalez와 Kasper, 1980). 반면 pCW/1A1OR membrane은 $848.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 로서 rat liver microsome의 대조군에 비하여 15.2 배가 높은 값을 나타내어 pCW/1A1OR의 *E. coli* membrane에서는 여러 종의 liver microsome 보다 훨씬 많은 양의 NADPH-P450 reductase가 발현됨을 보여주었다.

다음으로 NADPH-cytochrome *c* reduction에 대한 P450 1A1의 기질들에 대한 영향을 알아보았다 (Table 3). 인간의 P450 1A1에 대한 대표적인 기질에는 7-ethoxyresorufin, benzo(a)pyrene, 및 α -naphthoflavone 등이 존재하는데, 7-ethoxyresorufin은 P450 1A1에 의한 O-deethylation의 결과로 resorufin으로 변하게 된다. 이 반응은 P450 1A1과 1A2에 특이적인 것으로 알려져 있다(Burke와 Mayer, 1975; Lang과 Nebert, 1981).

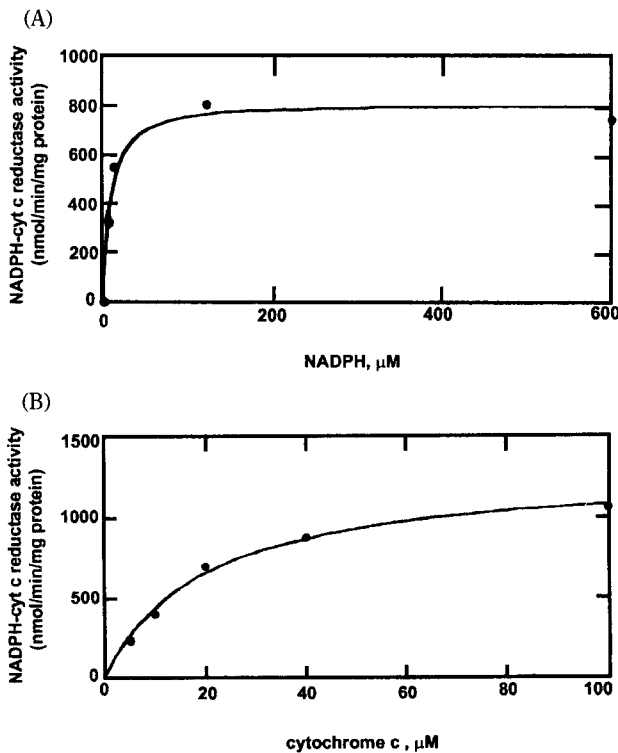


Fig. 3. Typical kinetic curve for NADPH-cytochrome *c* reduction in pCW/1A1OR-expressed *E. coli* membrane. (A) NADPH-dependent kinetic curve. Reaction mixtures contained *E. coli* membrane, cytochrome *c* ($40 \mu\text{M}$) in 0.3 M potassium phosphate buffer ($\text{pH } 7.7$), with varying NADPH concentrations ($0\text{--}600 \text{ mM}$). (B) cytochrome *c*-dependent kinetic curve. Reaction mixtures contained *E. coli* membrane, NADPH ($120 \mu\text{M}$) in 0.3 M potassium phosphate buffer ($\text{pH } 7.7$), with varying cytochrome *c* concentrations ($0\text{--}100 \mu\text{M}$).

Table 1. Kinetic parameters of pCW/1A1OR-expressed *E. coli* membrane for NADPH-cytochrome *c* reduction

Substrate	Kinetic parameter	
	K_m (μM)	V_{max} ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg protein}$)
NADPH ^a	8.24 ± 2.61^c	817.9 ± 60.8
cytochrome <i>c</i> ^b	19.97 ± 2.86	1303.5 ± 67.1

^aReactions containing 0.3 M potassium phosphate, $\text{pH } 7.7$ and $40 \mu\text{M}$ cytochrome *c*, with varying NADPH concentrations.

^bReactions containing 0.3 M potassium phosphate, $\text{pH } 7.7$ and $120 \mu\text{M}$ NADPH, with varying cytochrome *c* concentrations.

^cEach value represents the means \pm SD.

Table 2. NADPH-cytochrome *c* reductase activity of rat, porcine, and human liver microsomes and pCW/1A1OR *E. coli* membrane

Sample	NADPH-cytochrome <i>c</i> reductase activity ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg protein}$)
Rat liver microsome	
Control	$55.8 (1.0)^c$
TCDD-treated	$56.3 (1.0)$
Phenobarbital-treated	$89.2 (1.6)$
pCW/1A1OR <i>E. coli</i> membrane	$848.8 (15.2)$
Porcine liver microsome ^a	$51.1 (0.92)$
Human liver microsome ^b	
HL-4	$67 (1.2)$
HL-64	$55 (1.0)$

^aTamura *et al.* (1990)

^bYamazaki *et al.* (1996)

^cThe numbers in parentheses represent the relative values when NADPH-cytochrome *c* reductase activity of rat liver microsome is assigned as 1.0.

Table 3. Effect of P450 substrates and inhibitor on NADPH-cytochrome *c* reductase activity

chemical	NADPH-cytochrome <i>c</i> reductase activity (nmol/min/mg protein)	% of control
DMSO control	874.3±20.2 ^a	100
7-ethoxyresorufin		
0.2 μM	1367.1±24.9	156.4
2.0 μM	1579.9±20.2	180.7
benzo(<i>a</i>) pyrene		
0.1 mM	1000.0±26.5	114
1.0 mM	1079.4±17.2	123.6
α-naphthoflavone		
0.01 μM	1437.7±21.8	164.4
0.05 μM	1663.7±92.0	190.3

^aResults represent the means±SD.

Benzo(*a*)pyrene은 P450 1A1에 의해 주로 3-hydroxy, 7, 8-diol, 및 9,10-diol form을 주로 형성한다(Guo 등, 1994; Shimada 등, 1989; Bauer 등, 1995). α-Naphthoflavone (7,8-benzoflavone)은 P450 1A1에 의해 5, 6-oxide와 5,6-diol로 바뀌는 것으로 알려져 있고 P450 1A1에 대한 기질로써 보다는 저해제로 주로 사용된다(Bauer 등, 1995; Eugster 등, 1990). Table 3에 나타난 결과에서 2 μM의 7-ethoxyresorufin에 의해 reductase 활성도가 1.8배가 증가하였고, 1 mM benzo(*a*)pyrene 및 50 nM α-naphthoflavone에 의해 각각 1.2배와 1.9배가 증가되었다. 이러한 효소활성의 증가는 용량 상관성을 나타내는 것으로 보였다.

본 실험에서는 인간의 P450와 rat NADPH-P450 reductase 사이에서 형성된 fusion protein의 reductase에 대한 성질을 *E. coli* membrane을 사용하여 실험하였다. NADPH-dependent cytochrome *c* reduction에 대한 V_{max} 는 약 820 nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹으로 이러한 값은 실험동물이나 인체의 liver microsome에서 얻은 값보다 약 15배가 높을 뿐만 아니라 현재까지 보고된 다른 P450 1A1과 reductase사이의 fusion protein의 결과보다도 높은 값이다(Wittekindt 등, 1995). 하지만, 이 값은 pJL2E1/OR vector를 이용하여 인간의 P450 2E1과 rat NADPH-P450 reductase를 *E. coli*에서 동시에 발현시켰을 때의 발현정도 (1800 nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹)에 비하면 약 절반 정도이다(Dong과 Porter, 1996). 이것은 발현되는 fusion protein의 경우에는 분자량이 129 kDa로 커서, P450와 reductase가 모두 활성을 갖는 단백질을 형성하기 위하여 protein folding에 대한 제약이 P450와 reductase를 각각 별개로 membrane에 발현시킬 때 보다 크기 때문일 것으로 생각된다. 또한 발현조건이나 사용한 *E. coli* strain의 차이등도 무시할 수는 없을 것이다.

흥미롭게도 P450 1A1에 대한 기질이나 저해제에 의하여 NADPH-P450 reductase의 활성도가 증가하는 결과를 얻었다. *Bacillus megaterium*에 존재하는 cytochrome P450_{BM-3}를 이용한 Klein과 Fulco의 실험에서 이 단백질의 기질인 myristate (100 nmol)에 의하여 P450_{BM-3}의 cytochrome *c* reduction 활성도가 1.4배 증가한 결과를 보였다(Klein과 Fulco, 1994). 이러한 결과는 fatty acid의 결합으로 heme domain의 conformational change가 일어나고(Narhi와 Fulco, 1986), 이에 따라 reductase domain의 conformation도 변화되어 이 domain으로의 electron flow가 증가하는 것으로 해석되었다. P450_{BM-3}는 특이하게도 P450와 NADPH-P450 reductase 사이의 fusion protein의 형태로 자연에 존재하며 eukaryotic endoplasmic reticulum에 존재하는 P450 system과 유사한 self-sufficient fatty acid ω-hydroxylase이므로 본 연구에서 사용한 fusion protein의 membrane에서의 특성을 설명하는 데에 유용한 model이 될 수 있다. 본 실험에서도 7-ethoxyresorufin (2 μM)이나 α-naphthoflavone (50 nM)에 의해 fusion protein의 reductase activity가 약 2배 정도 증가하여 위에서 언급한 P450 2E1과 reductase의 동시발현시의 reductase의 활성도와 유사한 값을 나타내었다. 결과적으로 P450와 그 기질과의 결합에 의하여 전체적인 membrane상에서의 topology의 변화로 인하여 fusion protein의 reductase domain의 구조가 cytochrome *c*에 보다 전자를 전달하기 용이한 형태로 바뀌고 있음을 의미한다. Mammalian cell내에서 NADPH-P450 reductase가 전자를 전달하는 것으로 알려진 cytochrome *b₅*를 이용하여 이러한 현상이 cytochrome *b₅* reduction의 경우에도 일어나는가를 현재 실험 중이며, site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 fusion protein의 reductase domain내의 active site에 존재하는 amino acid의 치환으로 이러한 현상에 관여하는 amino acid residue들을 확인 할 수 있을 것이다.

참고문헌

- Bauer, E., Guo, Z., Ueng, Y. -F., Bell, L.C., Zeldin, D. and Guengerich, F.P. (1995): Oxidation of benzo [*a*]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes, *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 136-142.
- Burke, M.D. and Mayer, R.T. (1975): Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation, *Drug Metab. Dispos.*, **3**, 245-253.
- Ching, M.S., Lennard, M.S., Tucker, G.T., Woods, H.

- F., Kelley, D.E. and Kelly, S.L. (1991): The expression of human cytochrome P450IA1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 753-758.
- Chun, Y.J., Shimada, T. and Guengerich, F.P. (1996): Construction of a human cytochrome P450 1A1: rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein cDNA, and expression in *Escherichia coli*, purification, and catalytic properties of the enzyme in bacterial cells and after purification, *Arch. Biochem. Biophys.*, **330**, 48-58.
- Dong, J. and Porter, T.D. (1996): Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 254-259.
- Eugster, H., Sengstag, C., Meyer, U.A., Hinnen, A. and Wrgler, F.E. (1990): Constitutive and inducible expression of human cytochrome P450IA1 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an alternative enzyme source for in vitro studies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 737-744.
- Fisher, C.W., Shet, M.S., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C.A. and Estabrook, R.W. (1992): High-level expression in *Escherichia coli* of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10817-10821.
- Fujino, T., Park, S.S., West, D. and Gelboin, H.V. (1982): Phenotyping of cytochromes P-450 in human tissues with monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3682-3686.
- Fulco, A.J. and Ruettinger, R.T. (1987): Occurrence of a barbiturate-inducible catalytically self-sufficient 119,000 dalton cytochrome P-450 monooxygenase in *Bacilli*, *Life Sci.*, **40**, 1769-1775.
- 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 with reconstitution of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 123-131.
- Gillam, E.M.J., Guo, Z., Martin, M.V., Jenkins, C.M. and Guengerich, F.P. (1995): Expression of cytochrome P450 2D6 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic characterization, *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 540-550.
- Gonzalez, F.J. and Kasper, C.B. (1980): Phenobarbital induction of NADPH-cytochrome *c* (P-450) oxidoreductase messenger ribonucleic acid, *Biochemistry*, **19**, 1790-1796.
- Guengerich, F.P. (1990): Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 97-153.
- Guengerich, F.P., Distlerath, L.M., Reilly, P.E.B., Wolff, T., Shimada, T., Umbenbauer, D.R. and Martin, M.V. (1986): Human-liver cytochromes P-450 involved in polymorphisms of drug oxidation, *Xenobiotica*, **16**, 367-378.
- 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.
- Jenkins, C.M. and Waterman, M.R. (1994): Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P 450c17 hydroxylase activities, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27401-27408.
- Klein, M.L. and Fulco, A.J. (1994): The interaction of cytochrome *c* and the heme domain of cytochrome P-450_{BM-3} with the reductase domain of cytochrome P-450_{BM-3}, *Biochim. Biophys. Acta*, **1201**, 245-250.
- Lang, M.A. and Nebert, D.W. (1981): Structural gene products of the *Ah* locus: evidence for many unique P-450 mediated monooxygenase activities reconstituted from 3-methylcholanthrene-treated C57BL/6N mouse liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **256**, 12058-12067.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Huggett, A., Quattrochi, L.C. and Tukey, R.H. (1990): Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450, *Cancer Res.*, **50**, 3367-3376.
- Narhi, L.O. and Fulco, A.J. (1986): Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160-7169.
- Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- Sasaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H. and Ohkawa, H. (1990): Genetically engineered P 450 monooxygenases: construction of bovine P 450c17/yeast reductase fused enzymes, *DNA Cell Biol.*, **9**, 27-36.
- Shimada, T., Martin, M.V., Pruess-Schwartz, D., Marnett, L.J. and Guengerich, F.P. (1989): Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in

- the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Res.*, **49**, 6304-6312.
- Tamura, M., Yoshida, S., Tamura, T., Satoh, T. and Takeshita, M. (1990): Effect of divalent cations on NADH-dependent and NADPH-dependent cytochrome *b*₅ reduction by hepatic microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 313-319.
- Vermillion, J. and Coon, M.J. (1978): Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8812-8819.
- Wittekindt, N.E., Wugler, F.E. and Sengstag, C. (1995): Functional expression of fused enzymes between human cytochrome P4501A1 and human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Cell Biol.*, **14**, 273-283.
- Wrighton, S.A., Campanile, C., Thomas, P.E., Maines, S.L., Watkins, P.B., Parker, G., Mendez-Picon, G., Haniu, M., Shively, J.E., Levin, W. and Guzelian, P.S. (1986): Identification of a human liver cytochrome P-450 homologous to the major iso-safrole-inducible cytochrome P-450 in the rat, *Mol. Pharmacol.*, **29**, 405-410.
- Yamazaki, H., Nakano, M., Imai, Y., Ueng, Y.-F., Gunegerich, F.P. and Shimada, T. (1996): Roles of cytochrome *b*₅ in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 174-182.