

Cytochrome P-450 Isoenzymes 에 대한 최근의 연구동향

박 기 현*

1. 유도물질과 그 특이성

현재까지 연구된 모든 효소의 생화학적 특성이 밝혀지기까지는 많은 시간이 필요하였지만 최근까지도 혼란을 주고 있는 효소로 Cytochrome P-450 (P-450)을 들 수 있다.

P-450이란 효소명칭은 생체내에 존재하는 다른 Cytochrome 과는 그 작용과 구조적인 면에서 전혀 다르지만 오래전부터 사용되어 왔기 때문에 그대로 부르고 있다. 이 효소는 일산화탄소에 대해 강력한 친화력을 갖고 있어 P-450·CO 복합물 형성이 잘 이루어지고 있으며 이와 같은 복합물은 450 nm에서 흡수극대를 나타내기 때문에 비롯된 이름이다.

P-450 과 Cytochrome b₅(b₅)는 동물의 간 마이크로솜 (liver microsome)에 존재하는 두 종류의 핵 단백질로서 P-450은 철에 리간드하는 황원자를 갖고 있는 상당히 독특한 단백질이다.¹⁾

이 효소의 기능이 구체적으로 밝혀지기 시작한 것은 최근의 일로 동식물 및 미생물에도 널리 분포되어 있으며 약물과 환경오염물질로서 이물질 (Xenobiotics) 뿐만 아니라 생체내 물질로서 스테로이드, 지방산등에 작용하는 일종의 monooxygenase이며 주로 지질친화성물질에 작용한다. 무수한 기질과 함께 다양한 반응을 촉진하는 기능을 나타내므로 Mixed Function Oxidase (MFO)라고도 하는데 어떤 경우엔 특징적으로 benzo(a)pyrene(BP)이 최적기질로서 반응하므로

aryl hydrocarbon hydroxylase (AHHase, EC. 1, 14, 14, 1)라 부른다. 이와 같이 효소의 이름을 붙이는 것이 그리 간단치 않은 이유중의 하나는 P-450은 동위효소(isoenzymes)로 구성되어 있으며 각각의 동위효소들이 서로 다른 반응 특이성을 나타내므로 기질의 범위가 넓기 때문이다. 그 예로서 토끼 간의 마이크로솜에 있는 P-450 LM은 지방족과 방향족화합물의 수산화반응을 촉매할 뿐 아니라 N-oxidation, sulfoxidation, epoxidation, N-, S-, O-dealkylation 그리고 peroxidation, deamination, desulfuration, dehalogenation을 촉매한다.^{2,3)}

한편 다른 유사한 형태의 P-450 특이성이 종 (Species)에 따라 큰 차이를 보이고 있다는 점에서 이의 연구를 더욱 어렵게 하고 있다.⁴⁾

3-methylcholanthrene (3-MC)은 흰쥐와 토끼에서 원래는 존재하지 않았던 비정상적인 동위효소를 유도하지만 흰쥐에서 유도된 P-450은 토끼에서 유도된 P-450 보다 훨씬 효과적으로 BP의 수산화반응을 촉진하는 것이 그 예이다. 또한 흰쥐에서 phenobarbitone은 codeine N-demethylation을 유도하지만 codeine O-demethylation을 유도하지는 않는다.^{5,6)} 반면에 R-warfarin 7-hydroxylation은 phenobarbitone에 의해 그리고 R-warfarin 8-hydroxylation은 3-MC에 의해 각각 선택적으로 유도된다.⁷⁾ phenobarbitone은 흰쥐에서 주로 R-warfarin 7-hydroxylation을 유

* 한국인삼연구소 초연구소 책임연구원

도하지만 토끼에서는 주로 R-warfarin 4-hydroxylation을 유도한다.⁸⁾ 따라서 약물대사를 유도하지 못한다는 것은 그 약물이 P-450의 기질이 아니라기 보다는 부적당한 유도물질(inducers)이 사용되었다고 생각할 수 있으며 유도물질이 종에 따라 작용하는 것이 전혀 다르다는 것을 의미한다.

그러므로 유도물질과 종의 선택은 물론 실험하려는 약물의 선택이 이들과 서로 연관되어야 하기 때문에 아주 복잡하다. 또한 어떤 동물의 마이크로솜 P-450 동위효소를 사용한 재구성계(reconstituted purified P-450 system)에서 연구해야 할 것인가를 선택하는 문제가 상당히 중요할 뿐 아니라 어려운 문제이다.

P-450에 의해 촉매되는 대부분의 기질은 다른 조직보다는 간에서 더 잘 대사되며 약물대사의 경우 흰쥐의 암컷보다는 수컷에서 현저하게 급속히 일어나는데 biphenyl은 똑같은 속도로 대사되는 반면 ethoxyresorufin은 흰쥐 암컷에서 더 빨리 대사되기도 한다.⁹⁾ 그러나 인체에 일반적으로 유효한 약물인 경우는 성에 의한 차이를 나타내지 않는 것으로 알려져 있다.

2. 구조와 촉매활성

P-450의 구조에 따른 촉매활성은 어떻게 나타나는가. 이물질과 생체내 여러 기질의 다양한 반응을 촉진하는 P-450 LM의 능력은 활성자리(active site)의 상태에 관해 의문을 갖게 한다.

P-450 LM의 활성자리는 분자중에 iron protoporphyrin IX 부분을 갖고 있으며 apoprotein의 표면에서 억제되어 상대적으로 열리게 된다.¹⁰⁾ 그리고 중심금속이온에 하나 또는 두개의 배위-공유결합을 이룬다(그림 1). 그 철이온은 tetradenate porphyrin고리인 표면에 의해 4개의 리간드를 이루며 5번째 리간드가 폴리펩티드사슬의 시스테인 잔기에 의해 thiolate 음

이온을 나타낸다.¹¹⁾ 그 후 소수성기질은 철의 여섯번째 배위 위치의 옆에 있는 단백질 또는 헴 표면에 결합한다.¹²⁾ P-450 활성자리의 이와 같은 모델은 단백질의 수많은 안정된 상태에 의해 나타나는 보기드문 스펙트라특성에 의해 제안된 것이다(표 1). Dawson 등¹³⁾은 토끼간의 P-450 LM₂와 P-450 LM₄의 여러 산화상태의 스펙트라를 얻은 후 적절한 모델화합물의 비교로부터 thiolate가 P-420이 아닌 P-450에서 제 5의 리간드를 형성한다고 결론지었다.

한편 P-450 LM₂와 P-450 LM₄의 리간드 전환반응이 보고된 바 있으며¹⁴⁾ 표 1에서와 같이 여러 리간드가 P-450 LM₂에서 자연적으로 여섯번째 리간드인 유사한 각각의 아미노산잔기로 되었다.

P-450에 의해 촉매되는 기질의 수산화반응에 따른 기작은 그림 2와 같으며 순환반응은 아직 확실하게 정립된 것은 아니다. 특히 양성자를 취하는 부분은 다소 의문점이 없지 않다.¹⁵⁾

P-450과 기질과의 결합은 ferric P-450이 ferrous 상태로 환원되면서 일어나며 그 후 단계에서 산소결합이 가능하게 된다. 두번째 환원은 산소-산소 결합이 분해되면서 하나의 산소원자는 생체의 2H⁺와 결합하여 물이 되고 다른 활성화된 산소원자는 알칼을 생성하기 위한 기질의 C-O결합에 삽입된다. 그 다음 촉매반응의 완성과 더불어 ferric의 재발생으로 방출된다. 그

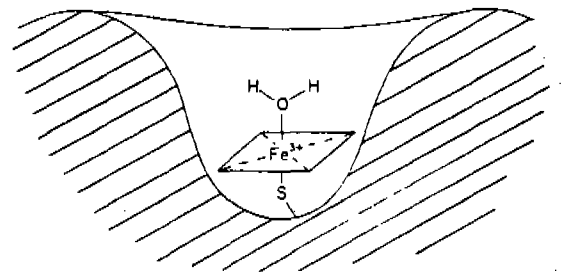


그림 1. Model of the active site of cytochrome P-450. S represents a sulfur ligand.

표 1. Electronic spectra of cytochrome P-450 states.

Cytochrome	Oxidation state	Added ligands	Absorbance maxima (nm)				Spin state
			nuv ^a	Soret	β	α	
P-450 _{LM2}	Ferric		360	418	535	568	Low
P-450 _{LM4}	Ferric		- b	394	-	645	High
P-450 _{LM2}	Ferric	1-Benzylimidazole	359	422	539	575(s)	Low
P-450 _{LM4}	Ferric	1-Butanol	357	418	535	568	Low
P-450 _{LM2}	Ferric	1-Octan thiol	377	467	-	550	Low
P-450 _{LM2}	Ferric	Pentamethylene sulfide	360	423	540	570(s)	Low
P-450 _{LM2}	Ferrous		-	413	-	544	High
P-450 _{LM2}	Ferrous	CO	370	451	-	552	Low
P-450 _{cam}	Ferrous	NO	366	438	-	558	Low
P-450 _{cam}	Ferrous	O ₂	356	418	555	580(s)	Low

^a Near ultraviolet. ^b Dash indicates the absence of a band in that region.

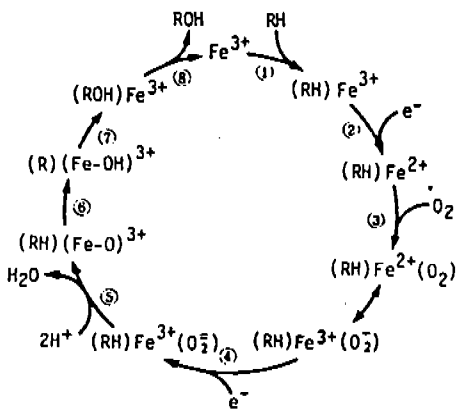


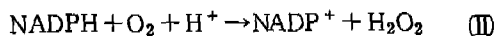
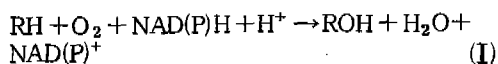
그림 2. Proposed scheme for mechanism of action of cytochrome P-450 in hydroxylation reactions. RH represents a substrate and ROH the corresponding product.

런데 그림 2에서 가장 중요한 것은 효소의 활성화에 어떻게 기질이 결합하느냐 하는 문제이다. P-450 LM₂ 와 같이 정제된 마이크로솜 단백질의 경우 결합에너지는 주로 hydrophobic effect에 의해 나타난다.^{16,17)} 순환반응의 기작은 실험적인 증거에 의해 확실히 그리고 완전히 밝혀진 것은 아니며 동물 간의 마이크로솜과 *Pseudomonas putida*에서 집중적으로 연구되었다. 반면 간 마이크로솜에서 P-450 과 reductase의 몰비는 보통 20:1 이지만 재구성계에서의 실험에서는 쉽게 바뀌어 1:3 을 나타낸다.¹⁸⁾ 그리고 기질의 association constant는 P-450 LM₂ 와 함께 인지질의 존재여부에 달려 있으며 지질이 있을 때는 없을 때보다 2~3 배의 높은 결합력을 보인다.¹⁹⁾ 즉, NADPH, P-450 reductase, phosphatidylcholine으로 구성된 재구성계(reconstituted-purified P-450 system)에서 P-450 의 충분한 활성을 위해 요구되는 물질은 인지질이다.

P-450의 여러 동위효소들에 대한 기질의 결합은 활성자리에 기질의 결합이 heme iron의 높고 낮은 spin 상태 사이에서 균형이 깨지면서 촉진된다.

표 1에서와 같이 ferric의 높고 낮은 spin 상태는 스펙트라에 차이를 나타내기 때문에 결합의 범위는 분광학적인 방법으로 쉽게 측정된다.²⁰⁾ 그 후 기질과 결합한 P-450가 단 하나의 전자에 의해 환원되는 과정이다. 이와 같은 reducing equivalent는 결국 마이크로솜과 미토콘드리아의 P-450과 함께 NADPH로 부터 온다. 그러나 마이크로솜 P-450계는 박테리아와 미토콘드리아의 수산화효소계와는 다른 전자전달연쇄를 이용한다.²¹⁾ 환원 후 hem은 산소분자와 결합할 수 있으며 이것이 산소가 활성화되는 실질적인 첫 단계이다. ferrous dioxygen 복합물은 adrenal mitochondrial P-450_{cam}에서 상당히 안정하지만 P-450 LM₂는 그렇지 않다.^{22, 23, 24)} 최적조건에서 온도를 30 °C로 하고 산소를 혼합시켰을 때 ferrous P-450 LM₂는 420과 558 nm에서 흡수극대를 나타내는 중간생성물이 곧 형성되는 것을 미루어 알 수 있다.

두 번째 전자전달 반응은 화학양론적인 순서로서 P-450 LM계에 의한 active turn over는 H₂O₂ 생성인데 소모된 산소의 55%가 기질의 존재하에서 H₂O₂로서 나타나며 기질이 없을 때는 100%이다.²⁵⁾ 그런데 일반적으로 P-450이 산소를 전달하는 촉매로서의 반응식은 (I)과 같으며 첨가된 전자전달 단백질의 존재하에서 반응이 가능하다(RH: 기질). 따라서 반응식은 더 나아가 반응식 (II)로 나타낼 수 있다.



분명히 두 번째 전자가 빠른 시간에 충분히 전달되지 않는다면 산소복합물은 ferric P-450과 superoxide 음이온으로 해리될지도 모른다. 이

런 점에서 메카니즘이 충분히 설명되기에는 아직도 연구되어야 할 점이 적지 않다.

Nordblom과 Coon²⁶⁾은 기질존재하에서 흡수된 산소의 반 정도는 과산화물로 전환되며 그 전환속도가 2배이고 기질이 제거되면 환원된다고 지적하였다. 기질이 P-450 LM₂로의 첫번째 전자전달속도를 증가시킨다고 해도 그 기질이 전체적인 turn over 속도와 그 효과를 어떻게 조절할 수 있는지는 명확치 않다.

한편 P-450 LM에 의해 촉매되는 수산화반응에서 b₅가 두번째 전자를 공급한다고 보고된 바 있으나 확실히 꼭 있어야만 하는 성분은 아니다.²⁶⁾ 그러나 재구성계에서 b₅가 없을 때는 많은 기질이 마이크로솜에서 관찰되었던 것보다 같거나 또는 더 많은 turn over numbers를 나타낸다.

^{27, 28)} Miki 등²⁹⁾은 b₅에 대하여 강력한 친화력을 나타내는 P-450의 또다른 동위효소를 토끼간의 마이크로솜으로부터 정제했으며 NADH에 의한 P-450의 환원에는 NADH-b₅ reductase와 b₅, 그리고 detergent의 적절한 농도가 요구되는 것을 알았다. 그리고 NADH-b₅ reductase가 과량 존재할 때는 NADPH-P-450 reductase 활성도가 b₅의 농도에 달려 있으며 NADH 존재하에서 b₅로부터의 전자전달은 P-450으로, 그리고 NADPH 존재에서는 가역적이었다. 즉, 이와 같은 평형은 사용된 환원제와는 관계없으며 b₅의 산화환원특성은 막에서 ferrous oxy-P-450의 환원이 잘 일어나고 정제된 것과 막과 결합된 상태에서는 P-450 LM의 산화환원상태에 상당한 차이가 있었다. 두번째 환원은 산소가 ferric 이온에 의해 배워되는 과산화물 복합물에 당량으로 존재하지만 실질적인 전자분포와 양성자 첨가상태는 밝혀지지 않았다. 그 후 산소와 산소결합의 분해와 기질에 산소의 삽입등은 훨씬 더 복잡하게 진행되는 데 현재까지의 연구로는 정확히 밝혀지지 않은 부분이 많을 뿐 아니라 지면상 다음 기회에 논하기로 하며, 최종적으로 이 반응에서 P-450의 활성자리로부터 생성된 알콜

의 해리에 의해 반응이 완성된다. 이 과정은 분명히 새로운 반응이 시작되기 전에 완성되는데 diols이 alkane 수산화반응에서 관찰되지 않는 것으로 알 수 있다. 그리고 형성된 수산화그룹은 직접적으로 철에 배위하는데 이것은 두번째 수산화반응을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다. 열역학적으로 극성을 띤 알콜은 본래의 alkane 보다 친화력이 적은 상태에서 결합될 것이며 순수한 기질분자와 함께 산화된 분자의 대치가 잘 일어난다. 물론 대부분의 경우 알콜은 효소표면으로부터 한번 해리되지만 반응을 거치지 않은 높은 농도의 기질은 두번째의 수산화반응이 일어나지 않는다.¹⁵⁾

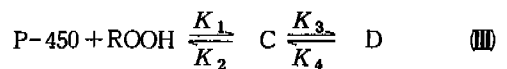
P-450에 의해 촉진되는 복잡한 반응 메카니즘에서 각각의 단계적인 반응은 일정하게 제한된 속도를 나타내는데 특히 P-450 LM에서 잘 알려져 있으며 여러 기질의 영향과 reductase, b₅, NADPH, 인지질의 영향을 받는다. 그러나 8 단계를 거쳐 쉽게 수산화물이 된 기질존재하에서는 그중 3 단계가 특별한 조건에서 제한된 속도를 보이므로 연구가 용이하지 않다.

현재 마이크로솜이나 재구성계에서 수산화반응을 억제하는 물질을 찾으려는 많은 연구가 활발히 시도되고 있다. benzphetamine N-demethylation의 정류상태의 속도는 1:1의 비율로 두개의 단백질을 갖고 있는 P-450 reductase 복합물의 농도에 직접적으로 비례하는 현상을 Miwa 등^{30,31)}이 관찰하였다. reductase P-450 복합물의 turn over number는 재구성계나 마이크로솜의 막에서 대략 같은 비율로 나타난다. 기질의 포화되는 농도를 측정하였을 때 NADPH 산화의 처음 속도와 benzphetamine demethylation의 처음 속도가 30°C에서 각각 9와 4 nmol·min⁻¹ per nmol of P-450이었다.²⁵⁾ 그러나 P-450과 reductase의 비율이 20:1의 마이크로솜에서는 reductase의 제한된 양 때문에 이들 속도는 실질적으로 제한된 성분을 근거로 표현되므로 20을 곱해야 한다. 따라서 그 속도는 NADPH 산화를 위해서는 reductase

의 180 nmol·min⁻¹ nmol⁻¹이며 formaldehyde 축적을 위해서는 reductase의 80 nmol·min⁻¹ nmol⁻¹이었다. 그러므로 결합하는데 있어서 전체적인 효율은 소모된 NADPH의 mol 당 0.44 mol의 CH₂O이었다. Vermillion과 Coon³²⁾도 속도에 영향을 주는 성분으로서 정제된 reductase를 첨가한 재구성계에서 유사한 조건하에 benzphetamine demethylation과 NADPH의 산화속도를 측정할 결과 NADPH는 reductase의 197 nmol·min⁻¹ nmol⁻¹ 속도로 산화가 진행되었고 CH₂O는 reductase의 92 nmol·min⁻¹ nmol⁻¹ 속도에서 축적되었으며 결합효율은 산화된 NADPH의 mol 당 0.47 mol의 CH₂O이었다. 이들 결과는 P-450에 의해 촉매되는 반응에서 속도에 영향을 주는 단계가 마이크로솜과 재구성계가 동일함을 의미한다.

한편 P-450 LM은 alkyl 수산화반응에서 반응식(II)와 같이 기질의 산화를 촉매할 수 있으며 지방족과 방향족화합물의 수산화반응에도 촉매한다.^{2,3)} 수산화반응이 일어나는 기작은 일반적으로 peroxidase에 의한 기작과 유사한 것으로 알려져 왔으나 alkyl hydroperoxide (R'OOH)는 간단히 ferric heme에 배위하기 위한 것으로 생각되며 최종적으로 알콜을 밀어 낸다.

산화농도를 변화시키는데 따른 새로운 중간 생성물의 형성에 대한 정확한 first-order rate constant의 분석은 반응식(III)과 같이 나타낼 수 있다.



C는 효소-기질 복합물이며 D는 관찰되는 준안정성의 스펙트럼 (metastable spectral species)이다.³³⁾ K₁/K₂ 비는 단백질과 함께 산화물에 대한 association constant이다. 즉, 이것은 과산화수소의 소수성과 함께 상관관계가 잘 유지되고 있다. K₃와 K₄의 크기가 과산화물 구조의 기능이며 D의 스펙트라가 서로 다른

과산화물에 대한 차이라는 사실들은 원래의 과산화수소의 유기부분이 단순히 하나 또는 두개의 산소원자가 아니며 복합물 C와 D의 양쪽에 존재한다는 것을 의미한다. 간단히 말하면 과산화수소와 P-450의 반응은 과산화물의 반응과는 거의 모든 면에서 서로 다른 것으로 생각된다.

지금까지 P-450의 inner-sphere 반응으로서 산소-산소결합의 분해를 촉진하는 전자전달을 대략 설명했지만 outer-sphere 반응은 alkoxy 라디칼과 화합물 II의 생성으로부터 설명이 되고 있으며 그림 3과 같다.

그러나 이 경우에 alkoxy 라디칼에 의해 결합된 기질로부터의 반응성이 큰 수소원자 때문에 수산기는 탄소원자에 공유결합된다.¹⁵⁾ P-450에 관련된 과산화물에 의한 반응에서는 산소가 필요치 않으며 생성물의 산소는 과산화수소로부터 유래된다고 믿고 있지만 부분적으로 연구된 현재까지의 보고로는 아직 명백한 결론을 내릴 수 없다.

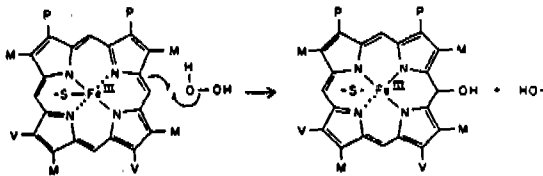


그림 3. Outer-sphere reaction of peroxide with P-450.

3. 동위효소의 종류와 분류

표 2는 현재까지 가장 많이 연구된 순서로 토끼, 흰쥐, 생쥐, 물고기 순으로 그리고 특히 동일한 분자량과 동일한 유전자로 추정되는 동위효소 (isoenzymes) 별로 분류한 것이다.

위에서 지적한 바와 같이 P-450은 기질 및 작용특이성이 넓어 동위효소간에 중복되는 기질이 있는 것이 특징이다. 따라서 촉매활성이 애매모호하기 때문에 분리 정제한 P-450의 동정에 곤란을 받게 된다. 다시 말하면 P-450은 여러 동위효소로 구성되어 있으며 각각의 동위효소가 특

이성이 다르기 때문에 여러 종류의 반응이 일어날 뿐 아니라 그에 따른 많은 수의 기질이 촉매되므로 이들 효소의 이름을 붙이는 것이 간단치 않다. 유도물질을 처리하지 않은 흰쥐의 P-450 동위효소중 주된 것으로 P-450_a의 유전자는 토끼의 Form 1의 유전자와 일치하며³⁴⁾ 토끼의 LM₂³⁵⁾, Form 2³⁶⁾, P-450₁^{37,38,39)}은 동일한 단백질인 것으로 생각되는데 phenobarbital (PB)-inducible form의 주된 효소이다. 또한 흰쥐의 P-450_{3b}⁴⁰⁾와 생쥐 P-450-PB는 분자량이 모두 50~52 kd 범위인 것으로 알려졌으며 이들도 PB 유도에 의한 주된 동위효소로 밝혀졌다.⁴⁰⁾ 토끼 LM₂의 구조적인 유전자는 흰쥐 P-450_b와 생쥐의 P-450-PB의 것과 일치한다.³⁹⁾ 흰쥐의 P-450_e는 P-450_b으로부터 분리되거나 다른 종에서는 P-450_e와 동일한 것이 확인되지 않는다.³⁹⁾ 그런데 P-450_b와 P-450_e는 분자량에 차이를 보이고 있으며 CO 복합물의 흡수극대가 구별되어 분명한 차이를 보이지만 면역화학적 방법에 의한 검정으로는 구별이 잘 되지 않는다. 그러나 흰쥐에 3-MC 또는 PB를 처리한 후 유도된 P-450_c와 P-450_e에 대하여 이들의 구조적인 유전자를 비교한 결과 조상부터 서로 상당한 차이가 있음이 관찰되었다.⁴¹⁾ P-450_b와 마찬가지로 P-450_e도 PB에 의해 적어도 50배 유도되지만 P-450_a는 3배정도 유도된다.^{42,43)} 이것은 PB에 의해 흰쥐 간으로부터 적어도 3종의 P-450이 유도될 수 있음을 시사하는 것이다.

LM_{3a}는 aniline과 ethanol을 가장 잘 촉매한다.³⁹⁾ LM_{3b}⁴⁴⁾, Form 3b^{36,45)}, P-450₅³⁷⁾는 동일한 단백질인 것으로 생각되며 그들의 분자량, 스펙트럼 특성, aminopyrine을 대사하는 능력등으로부터 이들이 유사한 것으로 뒷받침 된다. P-450_{B1}은 b₅에 대하여 강한 친화력을 나타내며 NADPH 뿐 아니라 NADH-dependent *p*-nitroanisole *o*-demethylase 활성도를 나타낸다.⁴⁶⁾ 토끼의 LM₄는 토끼의 생체에서 β -naphthoflavone-inducible P-450의 하

표 2. Comparisons of different forms of liver microsomal P-450 among four species.*

Rabbit	Rat	Mouse	Fish
'Form 1' < 50 kd	'P-450 _a ' 48 kd		
'LM ₂ ' 'form 2' 'P-450 ₁ ' 49 or 50 kd	'P-450 _a ' 52 kd	'P-450-PB' 52 kd	
	'P-450 _e ' 52.5 kd		
'LM _{3a} '			
'LM _{3b} ' 'P-450 ₅ ' (?) 51 or 52 kd			
'Form 3b' 'P-450 ₅ ' (?) 51 or 52 kd			
'LM _{3c} ' 'P-450 ₉ ' (?) 53 kd			
'P-450 _{B1} ' 'P-450 _{10b} ' (?) 50 or 52 kd			
	'P-450-PCN' 51 kd	'P-450-PCN' 53 kd	
	'P-446' 53.4 kd		
	'P-448' 55 kd		
'LM ₄ ' 'form 4' 'P-448 ₁ ' 54 kd	'P-450 _c ' (?) 56 kd	'P-448' 55 kd	'P-448'
'Form 5' 55 kd			
'Form 6' 'P-448 ₂ ' (?) 56 kd	'P-450 _c ' (?) 56 kd	'P ₁ -450' 55 kd	'P ₁ -450'
'LM ₆ ' 'P-448 ₂ ' (?) 56 kd	'P-450 _d ' 53 kd	'P ₂ -450' 55 kd	

* The isozymes are arranged in their approximate order of increasing molecular weight. The approximate molecular weights (in kilodaltons, kd) are sometimes included, although it should be appreciated that these can vary among laboratories by several thousand daltons, depending upon experimental conditions employed. Sato's rabbit 'P-450₂', 'P-450₃', 'P-450₄', 'P-450₆', 'P-450₇', 'P-450_{8a}', 'P-450_{8b}', 'P-450_{10a}', and 'P-448₉' are not included in this table. Mitochondrial, bacterial, and nonvertebrate forms of P-450 are beyond the scope of this review.

나쁜인 동위효소로 설명되었으나 현재는 적어도 두 종류의 주된 동위효소와 분자량을 구할 수 없는 또다른 동위효소가 존재하는 것으로 알려졌다.^{39,47)} β -naphthoflavone 또는 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin은 토끼에서 Form 4와 Form 6의 적어도 두가지 P-450을 유도³⁶⁾하며, 3-MC도 생쥐에서 P-448, P-450을 유도하는데 흰쥐 간으로부터는 P-450_c가 50배 유도되어 주된 동위효소가 되며 P-450_a도 4배가 유도된다. 그러나 P-450_b는 증가되지 않는다.^{42,43)} 그리고 β -naphthoflavone을 처리한 흰쥐로부터 분리한 다섯 종류의 P-450에서 하나의 동위효

소만이 AHH_{ase} 활성도를 나타냈다.³⁶⁾

최근에 Kaku 등^{48,49,50)}은 토끼에서 작은 창자의 점막 마이크로솜으로부터 3종의 P-450 동위효소를 분리했으며 그 중 P-450_{c,b}가 재구성계에서 prostaglandin의 ω -수산화반응을 효과적으로 촉진할 뿐더러 지방산의 수산화반응에도 관여하는 것을 확인하였다.

한편 그림 4는 arachidonic acid가 P-450과 b₅에 의해 생체내에서 대사되는 메카니즘을 나타낸 것으로 대사를 저해하는 각종 억제물질의 다양한 작용부위들을 표시하였다.⁶⁴⁾ 소를 실험동물로 하여 Maliyakal 등⁵¹⁾은 콜레스테롤의 결

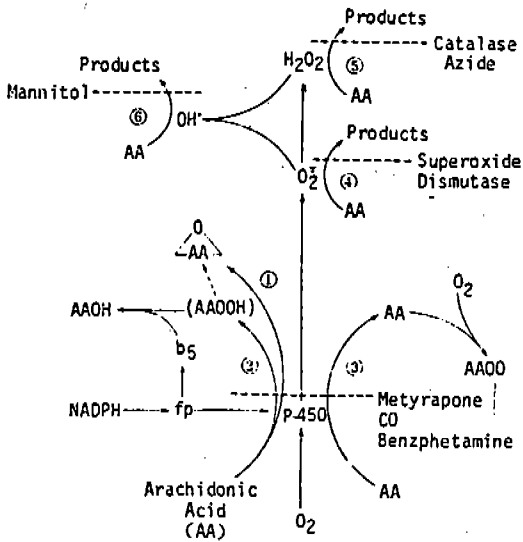


그림 4. Schematic representation of the possible reaction pathways associated with the function of microsomal cytochrome P-450 for the metabolism of arachidonic acid(AA). The sites of influence of various inhibitors are designated. AAOOH, the postulated arachidonic acid hydroperoxide; AAOH, the hydroxy acid; fp, flavoprotein; b₅, cytochrome b₅.

사슬을 끊는 P-450의 cDNA 클론을 분석하고 그 특성을 보고하였다.

4. 발암현상과 해독작용

환경오염물질이 발암에 직접적으로 관여한다는 일치된 보고들은 이미 60년대부터 보편적으로 인식되기 시작했으나 그 정확한 발암현상의 구명은 아직도 구체적인 결론을 내릴 수 없는 상태이다. 그러나 환경오염물질중에서 발암유발물질로 가장 주목되는 BP는 비교적 집중적으로 연구되어 이에 의한 발암 메커니즘이 밝혀졌다.⁵²⁾

그림 5는 MFO에 의해 BP가 대사되어 일부는 수용성인 페놀화합물로 전환되어 배설되는 해독반응과 epoxides가 된 후 epoxide hydrolase에 의해 diols로 그리고 다시 MFO에 의해 활성을 나타내는 여러 diol epoxides로 전환되어 DNA와 그밖의 생체 고분자와 공유결합됨으로써 돌연변이 또는 발암현상이 초래되는 반응을 보이고 있다.³⁾

즉, MFO는 해독작용과 독성작용 양쪽에 다 관여하고 있으며 이 때의 기질이 BP일 때 AHH_{ase}라 한다.^{53, 54, 55)} BP는 이와 같은 대사과정을 통하여 적어도 40여종 이상의 중간 대사물로 전환된다. 다환방향족 탄화수소에 대한 지금까지의 보고를 종합해 볼 때 유전적인 감수성에 따라 독성 또는 해독에 큰 차이를 보이는 것으로 생각된다.³⁾

Welch 등^{54, 56)}은 흡연하는 임신부의 태반에서 AHH_{ase}의 활성도가 상당히 증가된 것을 관찰하고 그것은 담배 연기중의 다환 방향족 탄화수소 중에서 특히 BP에 의한 것임을 확인하였다.⁵⁷⁾ 그 후 Kouri 등^{58, 59)}은 생쥐를 실험동물로 하여 발암과 AHH_{ase} 활성도 증가는 직접적으로 상관관계가 있음을 보고하였으며, Donald 등⁶⁰⁾도 이를 뒷받침 하였다. 그리고 임상적으로도 이와 같은 현상이 관찰되었다.^{61, 62)} 그러나 Paigen 등⁶³⁾은 이들과 다른 보고로서 AHH_{ase} 증가와 발암과는 전혀 관계가 없음을 제시하였으며 현재까지도 상반되는 연구결과들이 계속 보고되고 있으나 화학물질에 의해 유발된 암환자와 그밖의 요인에 의한 암환자를 구분하여 임상적으로 연구한다는 것은 용이한 일이 아니다. 따라서 다환 방향족 탄화수소 화합물이 P-450에 의해 활성화된 발암물질로 전환되는 대사와 AHH_{ase} 활성도 변화는 화학물질에 의한 발암현상에 결정적인 관련이 있는 것으로 *in vitro*와 실험동물에서 증명되었지만 인체를 대상으로 임상적인 연구에서는 다소 차이가 없지 않으며 앞으로의 중요한 연구과제라고 생각된다.

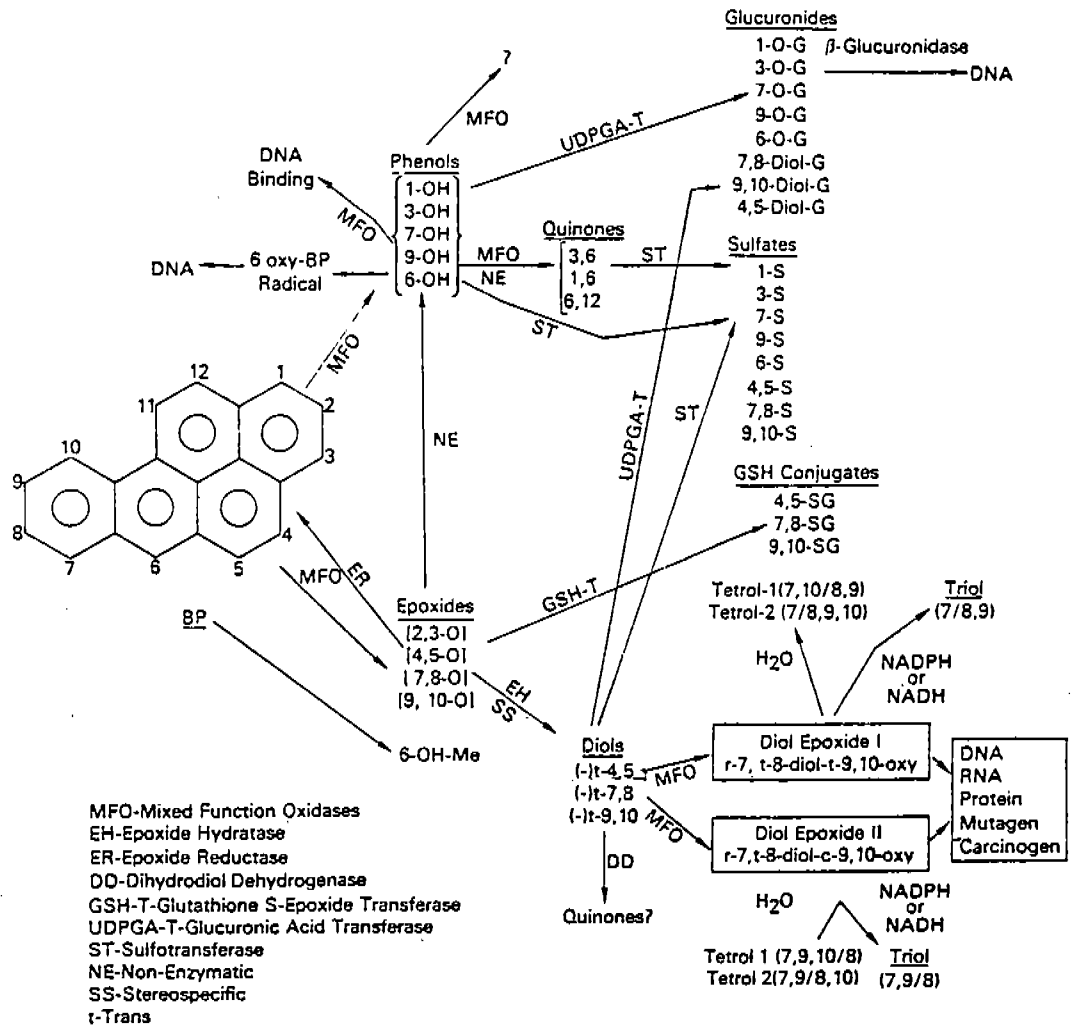


그림 5. Metabolism and activation of benzo[a]pyrene.

한편 P-450에 의한 이물질대사는 특정한 항체에 의해 억제되는데 포유류의 각 장기에 존재하는 P-450 동위효소에 대하여 단일 항체 (monoclonal antibodies)를 처리한 결과 각각의 활성이 선택적으로 완전히 억제되었다.^{65, 66} 이와 같은 연구의 가장 큰 목적은 발암을 억제 또는 치유하기 위한 것으로 획기적인 연구결과라 생각된다. 따라서 특정한 동위효소를 분석하는데도 이용될 수 있으며 동물의 여러 조직으로부터 P-450의 간단

하고 신속한 정제방법을 위해서도 단일항체를 사용한 RIA 방법^{67, 68}은 앞으로 P-450이 관여하는 대사를 연구하는데 좀 더 중요한 접근방법이 될 것이며, 종의 차이를 구명하는 데도 많은 진전이 있을 것으로 예상된다. 그러나 종간의 유전적 변이성은 무작위 교배한 실험동물을 재료로 하였을 때 연구의 혼란을 초래하기도 한다.^{69, 70} 그 이전 동물의 P-450이 인체의 P-450과는 어떤 차이가 있는지도 연구되어야 하며 *in vitro*와 *in*

*vivo*에서의 연구가 연결되기 위해서는 언제, 어디서나, 동일한 개인에 대하여 연구가 수행되어야 한다. 이로부터 *in vivo*에서의 약물대사의 개인간의 차이가 hepatic P-450 과 *in vitro* 반응의 차이와 연결되는지를 알아야 한다.

결론적으로 현재까지의 보고를 종합해 볼 때 동물 P-450 은 적어도 118 종의 약물을 포함한 이물질 (주로 환경오염물질) 을 대사할 수 있음을 강력히 시사하지만⁷¹⁾ 이에 대한 뚜렷한 증거는 아직 미비한 상태이며 더구나 인체의 P-450이 특히 약물대사에서 중요한 역할을 한다는 직접적이고 구체적인 증거도 현재로서는 명확치 않은 상태이다.

오늘날까지도 단지 10여 종류의 P-450 동위효소만이 서로 전혀 다른 것으로 증명되었을 뿐이며 순수 분리하여 재구성계로 부터 이들의 효과가 연구되어 생화학적인 특징을 설명할 수 있다. 이런 일은 주로 흰쥐와 토끼에서 수행되었다.

극단적인 생각으로는 각각의 포유류가 수백 또는 수천의 독특한 P-450 단백질을 생산할 유전적인 능력을 갖고 있을 것이라는 흥미있는 가설이다. 그렇다고 해서 여러가지 P-450 유도물질에 대응하는 능력을 갖는다는 것이 P-450 단백질이 언제나 존재한다는 것을 의미하는 것은 아니다. 어쨌든 P-450의 복합성에 대해 현재 대답보다는 질문이 더 많지만 분자생물학과 진화학이 오늘날 가장 흥미있는 생화학연구 분야중 하나로 새로운 방법론에 따른 새로운 결과들이 속속 보고되는 현재의 연구추세로 미루어 P-450에 대한 여러 의문점이 머지않아 곧 풀리리라 기대한다.

참 고 문 헌

1. T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
2. J.M. Coon and V.A. Persson, "In Enzymatic Basis of Detoxification (Ed. Jakoby, W.B.)," Academic Press, New York, 1980, p.117.
3. V.H. Gelboin, *Physiological Review*, **60**, 1107 (1980)
4. A.Y.H. Lu, and S.B. West, *Pharmac. Ther.*, **2**, 337 (1978).
5. J.F. Henderson and P. Mazel, *Biochem. Pharmac.*, **13**, 1471 (1964).
6. J.T. Wilson and J.R. Fouts, *Biochem. Pharmac.*, **15**, 1238 (1966).
7. L.R. Pohl, W.R. Porter, W.F., Trager, M.J. Fasco, and J.W. Fenton, *Biochem. Pharmac.* **26**, 109 (1977).
8. R.A. Van Dyke and A.J. Gandolfi, *Mol. Pharmac.*, **11**, 809 (1975).
9. M.D. Burke, S. Orrenius and J.A. Gustafsson, *Biochem. Pharmac.*, **27**, 1125 (1978).
10. H. Rein, S. Marcic, G.R. Janig, S. Vuk-Pavlovic, B. Benko, O. Ristau and K. Ruckpaul, *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 325 (1976).
11. D. Dolphin, B.R. James and H.C. Welborn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 415 (1979).
12. O. Gotoh, Y. Tagashira, T. Iizuka and Y.F. Kuriyama, *J. Biochem. (Japan)*, **92**, 807 (1983).
13. J.H. Dawson, J.R. Trudell, R.E. Linder, Barth, Ol, E. Bunnenberg, C. Djerassi, *Biochemistry*, **17**, 33 (1978).
14. R.E. White, *Fed. Proc.* **38**, 320 (1979).
15. R.E. White and M.J. Coon, in Annual Review of Biochemistry (Eds. E.S. Esmond, D.B. Panal, M. Alton, C.R. Charles). Palo Alto, California, USA, 1980, p.315.
16. Z. Sipal, P. Anzenbacher, Z. Putz, J. Chlumsky and O. Krivanova, *Acta. Biol. Med. Ger.* **38**, 483 (1979).
17. B.W. Griffin, and J.A. Peterson, *Biochemistry*, **11**, 4740 (1972).
18. J.A., Peterson, R.E. Ebel, D.H. O'keeffe, T. Matsubara and R.W. Estabrook *J. Biol. Biochem.*, **251**, 4010 (1976).
19. R.E. White, D.D. Oprian and M.J. Coon, In Microsomes, Drug Oxidation, and Chemical Carci-

- nogenesis, ed. M.J. Coon, A.H. Conney, R.W. Estabrook, H. Gelboin, J.R. Gillette and P.J. O'Brien, Academic, Press, N.Y. p.243, 1980.
20. J.B. Schenkman, H. Remmer and R.W. Estabrook, *Mol. Pharmacol.*, **3**, 113 (1967).
 21. J.A. Peterson, K.E. White, Y. Yasukochi, M.L. Coomes, D.H. O'keeffe, R.E. Ebel, B.S.S. Masters, D.P. Ballou and M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **252**, 4431 (1977).
 22. J.A. Peterson, Y. Ishimura and B.S. Griffin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 197 (1972).
 23. I.C. Gunsalus, C.A. Tyson, R. Tsai and J.D. Lipscomb, *Chem. Biol. Interact.*, **4**, 75 (1971).
 24. H. Schleyer, D.Y. Cooper, O. Rosenthol, P. Chemg, Croat., *Chem. Acta*, **49**, 179 (1972).
 25. G.D. Nordblom and M.J. Coon, *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 343 (1977).
 26. A. Hildebrandt and R.W. Estabrook, *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 66 (1971).
 27. A.Y.H. Lu and S.B. West, *Pharmac. Ther.*, **2**, 337 (1978).
 28. D.A. Haugen, T.A. van der Hoeven, and M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **225**, 3536 (1975).
 29. N. Miki, T. Sugiyama and T. Yamano, in *Microsomes, Drug Oxidation, and Chemical Carcinogenesis*, ed M.J. Coon, R.W. Cooney, H. Estabrook, J.R. Gelboin, P.J. Gillette, and O'Brien, p.27, Academic Press, N.Y.
 30. G.T. Miwa, S.B. West, M.T. Huang, A.Y.H. Lu, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5695 (1979).
 31. G.T. Miwa, S.B. West, and A.Y.H. Lu, *J. Biol. Biochem.*, **253**, 1921 (1978).
 32. J.L. Vermilion and M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **253**, 2694 (1978).
 33. G.T. Miwa, S.B. West and A.Y.H. Lu, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1921 (1978).
 34. P.E. Thomas, L.M. Reik, D.E. Ryan, and W.J. Levin, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3567 (1975).
 35. D.A. Hangen, T.A. van der Hoeven, and M.J. Coon, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3567 (1975).
 36. R.L. Norman, E.F. Johnson, and U.M. Eberhard, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8640 (1978).
 37. Y. Imai, C.H. Yutsudo, H. Satake, A. Girardin, and R. Sato, *J. Biochem. (Japan)*, **88**, 489 (1980).
 38. C.H. Yutsudo, Y. Imai, and R. Sato, *J. Biochem. (Japan)*, **88**, 505 (1980).
 39. D.W. Nebert and M. Negishi, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2311 (1982).
 40. R.J. Schwen and G.J. Mannering, *Comp. Biochem. Physiol.*, **7113**, 445 (1982).
 41. S. Kazuhiro, G. Osamu, K. Kaname and F.K. Yoshiaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **81**, 5066 (1984).
 42. P.E. Thomas, D. Korzeniowski, D. Ryan and W. Levin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 524 (1979).
 43. P.E. Thomas, L.M. Reik, D.E. Ryan and W. Levin, *Arch. Biochem.*, **256**, 1044 (1981).
 44. D.R. Koop and M.J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1075 (1979).
 45. J. Ozols, F.S. Heinemann, and E.F. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11405 (1981).
 46. T. Sugiyama, N. Miki and T. Yamano, *J. Biochem.*, **87**, 1475 (1980).
 47. D.A. Haugen, L.G. Armes, K.T. Yasunobu, and M.J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 967 (1977).
 48. M. Kaku, E. Kusunose, S. Yamamoto, K. Ichihara, and M. Kusunose, *J. Biochem. Biophys.*, **96**, 956 (1984).
 49. M. Kaku, K. Ichihara, E. Kusunose, K. Ogita, S. Yamamoto, I. Yano and M. Kusunose, *J. Biochem.*, **96**, 1883 (1984).
 50. M. Kaku, E. Kusunose, S. Yamamoto, K. Ichihara, and M. Kusunose, *J. Biochem.*, **97**, 663 (1985).
 51. E.J. Maliyakal, C.J. Manorama, A. Patrica, J.M. Raymond and R.W. Michael, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, **81**, 5628 (1984).
 52. A.H. Conney, *Cancer Res*, **42**, 4875 (1982).

53. D.W. Nebert and H.V. Gelboin, *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242 (1968).
54. R.M. Nebert, and H.V. Gelboin, *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242 (1968).
55. E. Hodgson, "In Chemical and Environmental Factors Affecting Metabolism of Xenobiotics" (Eds. Hodgson, E. and Guthrie, F.E.), Elsevier press (N.Y) 1982, p.143.
56. R.M. Welch, Y.E. Harrison, B.W. Gommi, P.J. Poppers, M. Finster, and A.H. Conney, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **10**, 100 (1969).
57. R.M. Welch, A. Loh, and A.H. Conney, *Life Sci.*, **10**, 215 (1971).
58. R.E. Kouri, H. Ratried and C.E. Whitmire, *J. Natl. Cancer Inst.*, **31**, 197 (1973).
59. R.E. Kouri, R.A. Salerno, and C.E. Whitmire, *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 363 (1973).
60. R.M. Donald and S.T. Snorri, *Cancer Res.*, **39**, 3471 (1979).
61. R.E. Kouri, C.E. Mckinney, D.J. Slomiany, D.R. Snodgrass, N.P. Wray, and T.L. McLemore, *Cancer Res.*, **42**, 5030 (1982).
62. G. Kellerman, C.R. Shaw, and M. Luyten-K, *N. Engl. J. Med.*, **289**, 936 (1973).
63. B. Paigen, H.L. Gurtoo, J. Minowada, L. Houten, R. Vincent, D. Paigen, N.B. Park, E. Ward, and N.T. Hayner, *N. Engl. J. Med.*, **297**, 346 (1977).
64. J. Capdevila, N. Chacos, J. Werringloer, A. Prough, and R.W. Estabrook, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, **79**, 5362 (1981).
65. T. Fujine, D. West, S.S. Park, and H.V. Gelboin, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9044 (1984).
66. K.C. Cheng, H. Gleboin, B.J. Song, S.S. Park and F.K. Friedman, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12279 (1984).
67. B.J. Song, T. Fujino, S.S. Park, F.K. Friedman, and H.V. Gelboin, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1394 (1984).
68. S.S. Park, T. Fujino, H. Miller, F.P. Guengerich and H.V. Gelboin, *Biochem. Pharmac.*, **33**, 2071 (1980).
69. R.R. Racine and C.H. Langley, *Nature*, **283**, 855 (1980).
70. M.C. Rice and S.J. O'brien, *Nature*, **283**, 157 (1980).
71. D.M. Burke, *Biochem. Pharmac.*, **30**, 181 (1981).