

## Cytochrome P-450 Dependent Hydroxylation of Chemical Carcinogens

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙

= Abstract =

### Cytochrome P-450 Dependent Hydroxylation of Chemical Carcinogens

Y. S. Hong

*Department of Biochemistry, College of Medicine Ewha Womans University*

A large number of chemicals have the ability to induce cancer in a variety of tissues of various hosts, including man. Despite current interest in the viral etiology of a limited number of specific human cancers, it is generally believed that most human cancers may be caused by chemicals present either as environmental contaminants or produced in certain instances from endogenous factors. Although great advances have been made in studies of the metabolism of many chemical carcinogens and on mechanisms of their reaction with cellular constituents the fact stands out that we do not understand the pathobiological action of single chemical carcinogen.

It has been known for along time that many classes of chemical carcinogens become covalantly bound to DNA, RNA, and proteins of the cells in target tissues. It has become axiomatic that the induction of cancer by chemical carcinogens results from such covalent binding to one or more of these cellular macromolecules. However, despite much intensive reserch, the macromolecular target has not yet unequivocally been identified. Among the important classes of chemical carcinogens that become covalently bound to tissue macromolecules are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. These carcinogens must be matabolized to a chemically reactive form which then reacts to form covalent macromolecular complexes.

The millers and others have discovered that these metabolic actvations are carried out primarily by the microsomal mixed function oxidases. These enzyme systems, which are usually considered detoxifying and drug metabolizing, are the same ones that activate chemicals to carcinogenic and mutagenic forms.

## 서 론

많은 화학물질은 사람을 포함하는 여러동물의 조직에서 암을 일으키는 능력이 있다. 사람에서 암발생과 화학물질과의 상호관련은 Pott(1775)에 의하여 발견되었다. 그는 굴뚝 청소부에서 음낭암의 발생율이 높은 것은 콜타르 및 배연과의 접촉이 많기 때문이라고 설명하였다.

최근 역학 부문에서는 사람에서 가장 중요한 암의 원인은 환경을 오염시킨 화학물질이라는 것을 밝혔다. Higginson(1972, 1973)은 모든암의 80~90%는 환경에 원인이 있다고 하였다. 왜냐하면 Oncogenic Virus는 전염성이 높지않고 Cosmic ray와 자외선은 균등하게 분포되어 있기 때문에 화학물질이 가장 우세한 환경 발암원인이 된다는 것이다. Haenszel & Kurihara(1968)는 암의 원인이 되는 환경의 중요성을 처음으로 입증하였다. 이들은 일본에서는 위암의 발생률이 높고 장암의 발생률은 낮으나 미국에서는 반대로 위암의 발생률은 낮고 장암은 높은률을 나타낸다. 이런 종류의 암 발생률은 미국에 이민해서 영주하는 일본사람들에서 두나라 발생률 사이에 중간치를 보였고 이들의 2세대들은 미국사람들과 똑같이 높은 장암의 발생률을 나타냈다. 이런 결과로 암의 원인은 유전적으로 발생하는 것 보다 환경에서 온다는것을 명백히 해주는 것이다.

본 중설에서는 화학물질이 궁극적인 발암원으로서 작용하기 위해서는 반드시 대사적으로 활성화가 되어야하며 이런 활성화를 돕는 효소는 Cytochrome P-450이다. 즉 microsomal mixed function oxidase system에 의하여 Hydroxylation 및 dealkylation되는 화학물질 발암원을 간주해서 그 기전을 고찰해 보고자 한다.

### Cytochrom P-450

Cytochrome P-450의 역사는 Klingenberg와 Garfinkel(1958)이 포유동물 liver microsome의 환원형에 CO카스를 가하였더니 450nm에서 특이한 다른 spectrum이 나타나는 것을 보고 새로운 pigment의 존재를 보고하였다. 그후 1961년부터 1964년까지 Omura와 Sato는 이것이 hemoprotein이라는 것을 확인 하였고 그들의 hemoprotein의 성질도 확립시켰다. 그리고 P-450(pigment 450)이란 일시적인 이름을 붙였다. 이 이후에 비슷한 성질을 가진 hemoprotein이 동물과 미생물에서 모두 분리되었다. 지금은 이들을 모두 합하여 Cytochrome P-450이라고 부른다. 이런 집단에 속

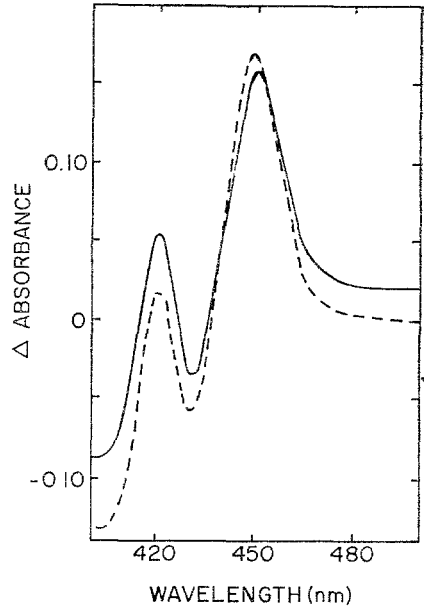


Fig. 1. CO difference spectra of dithionite reduced liver microsomes from control and MC-pretreated hamsters. The solid (—) and broken (---) lines represent microsomes from control and MC-pretreated hamsters respectively.

하는 대부분의 단백질은 생체막과 결합된 상태에 존재한다. 즉 간장, 신장, 부신수질 그리고 장점막의 microsome과 몇개의 내분비선 mitochondria 그리고 yeast에 존재한다.

과거 10년 동안 이런 범주의 hemoprotein에 관심을 기울여 그야말로 폭발적인 발전을 하여 왔다고 하여도

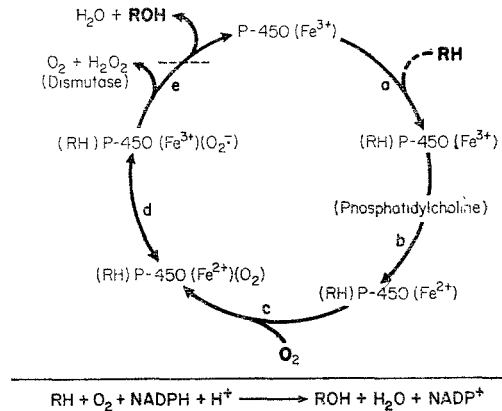


Fig. 2. Proposed mechanism of hydroxylation reactions catalyzed by cytochrome P-450.

과인은 아니다. 그들의 기능이 밝혀진것은 부신수질 microsomes에 의하여 steroid 21-hydroxylation이다. 그리고 liver microsomes에 의한 drug hydroxylation을 확립시켰다.

그후 많은 source에서 cytochrome P-450은 drug, carcinogen, steroid 및 fatty acid와 같은 광범위한 화합물들의 monooxygenase system의 terminal oxidase로서 작용한다는 것이 잘 알려 졌다.

Liver microsomal cytochrome P-450에 의하여 촉매되는 hydroxylation mechanism은 Fig. 2와 같다, Step a는 cytochrome P-450의 산화형과 기질의 결합 상태이다. 이 반응은 빠르게 일어난다. 그러나 NADPH에서 전자의 이전은 필요로 하지 않는다. Step b는 철 원자가 reductase에 의하여 촉매되는 phosphatidyl choline-dependent 반응에 의하여 ferrous 상태로 환원된다. Step c는 산소가 ternary complex로 결합된 것을 나타낸다. 이런 complex의 형성은 Pseudomonas Putida에서 분리된 cytochrome P-450에서 얻어졌다. Step d의 전자 이전은 cytochrome P-450의 산화형에 결합된 superoxide radical을 형성하면서 active complex 내에서 일어난다는 것이다. Step e는 두번째 전자를 흡수하면서 기질에서 superoxide를 공격해서 H<sub>2</sub>O를 형성하고 hydroxylated된 생성물을 형성한다. 그리고 cytochrome P-450은 ferric 상태로 다시 방출된다는 것이다.

또한 cytochrome P-450은 매우 nonspecific하고 aromatic ring hydroxylation, N-hydroxylation 그리고 많은 유기화합물의 dealkylation을 한다. 그러나 이들은 완전히 정제 되지 않았고 이들의 작용 기전도 완전히 이해되고 있지 않다.

### Metabolic Activation

많은 종류의 화학물질 발암원들은 표적 조직에서 세포의 단백질, DNA, 그리고 RNA와 공유결합으로 결합한다는 것이 알려져 왔다. Tissue macromolecule에 공유결합으로 결합되는 중요한 화학물질 발암원과 DNA, RNA 및 protein과 시험관 속에서 incubation 했을때 공유결합을 하는 화합물은 없었다. 이런 결과는 발암원들이 화학적으로 활성화되어야만 하고 그 다음에 DNA와 RNA 및 단백질과 공유결합을 하여 복합체를 형성하는 반응을 한다.

Miller & Miller(1966, 1974)는 aromatic amine과 aflatoxin의 대사적 활성화 과정을 설명하고 다음과같은 결론을 내렸다. 이것은 지금 일반적으로 받아들여지고 있다.

가) 모든 화학물질 발암원은 반드시 대사적으로 변형되어서 화학적으로 활성화 형태가 되어야 한다.

나) 활성화된 대사물질은 electrophilic reagent이다.

다) 활성화된 대사물질은 carcinogenesis의 첫단계로 cellular macromolecule 속에 nucleophilic 집단과 반응을 한다.

Millers는 이와같은 대사적 활성화는 주로 microsomal mixed function oxidase에 의하여 수행된다는 것을 발견하였다. Microsomal mixed function oxidase는 NADPH와 molecular oxygen이 필요하다. 그리고 여기에는 cytochrome P-450이 관여한다.

#### 1) Aromatic Amines

Millers(1959, 1966, 1970, 1974, 1966, 1967 & 1971)가 이들의 macromolecular 결합 그리고 작용기전등을 많이 연구하였고 model compound로써 2-Acetylaminofluorene(AAF)을 썼다. AAF의 비활성화 단계 Ring-OH AAF는 쉽게 비발암원인 monophenol을 형성해서 glucuronide와 sulfate와 결합해서 소변과 담즙에 배설된다. AAF의 활성화 단계는 microsomal N-hydroxylation이다. 백서의 간장에서 N-hydroxy form은 sulfotransferase에 의하여 반응성이 높은 sulfate ester로 변화되고 이것은 궁극적으로 발암원이 된다고 생각한다. 이 ester는 DNA, RNA 및 단백질과 공유결합을 하고 발암현상의 첫 단계가 되는 것이다. 단백질과 AAF-N-Sulfate의 main reaction은 methionine에 의하여 side chain은 제거되어서 methyl-thio-AAF를 형성한다. Guanosine과의 화학반응에서는 nitrogen-7보다 오히려 carbon-8-position에서 일어난다.

이 구조는 화학합성에 의하여 확인 되었다. 그리고 mouse와 Hamster liver에서도 AAF의 microsomal N-hydroxylation에 cytochrome P-450이 관여한다.

#### 2) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Boyland & Sims(1964)에 의하여 in vivo에서 liver slices, liver homogenate 그리고 liver microsomal preparation에서 행하여 졌다.

Benz(a)anthracene을 예로 대사적 과정을 설명한 것이다. 대사 산물들은 phenol, transdihydrodiol 그리고 glutathione conjugate이다. Phenol형성은 효소 없이 일어나고 glucuronic acid나 sulfate와 같이 결합하여 배설된다. Boyland(1950)는 이런 대사산물들은 epoxide 중간체로 설명할 수 있다고 제안 했다. 이 epoxide는 화학적으로 매우 반응성이 커서 중간체로써 분리 할수가 없다.

Grover & Sims(1970)의 연구는 phenanthrene과 dibenz(a)anthracene의 K-region epoxide는 DNA

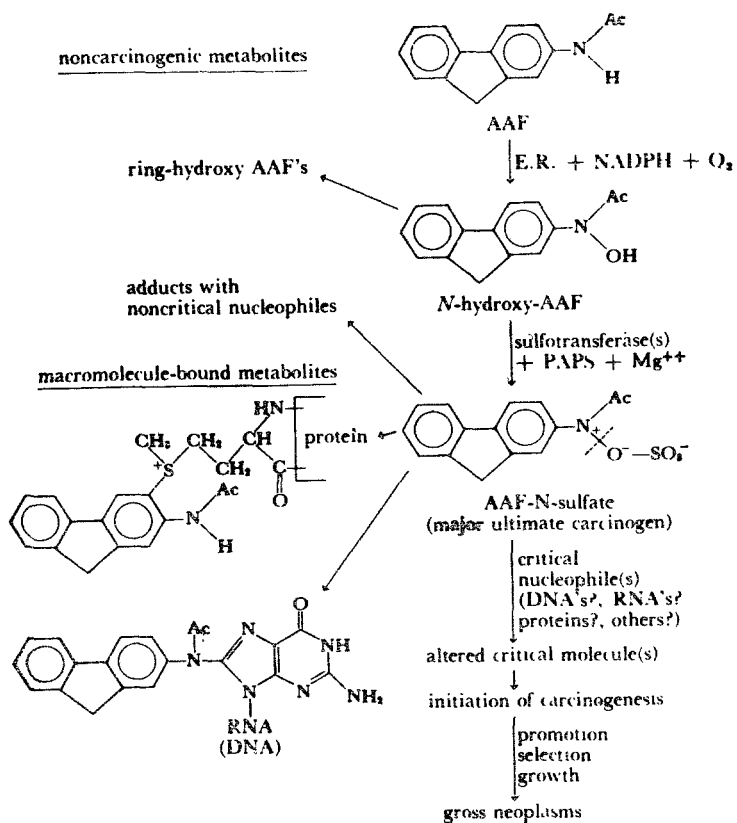
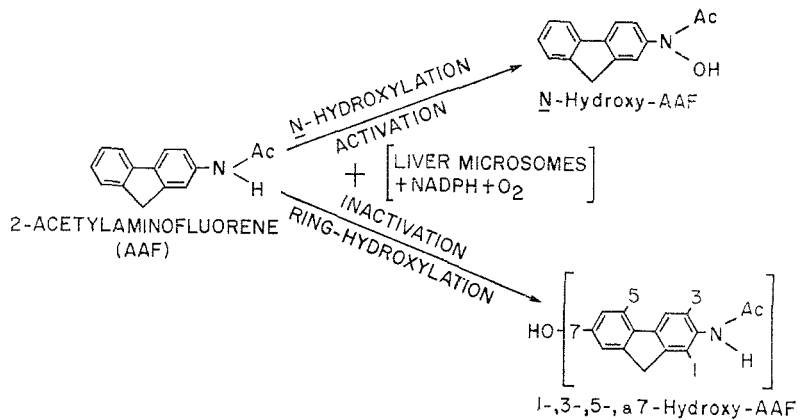


Fig. 3. Activation of 2-acetylaminofluorene.

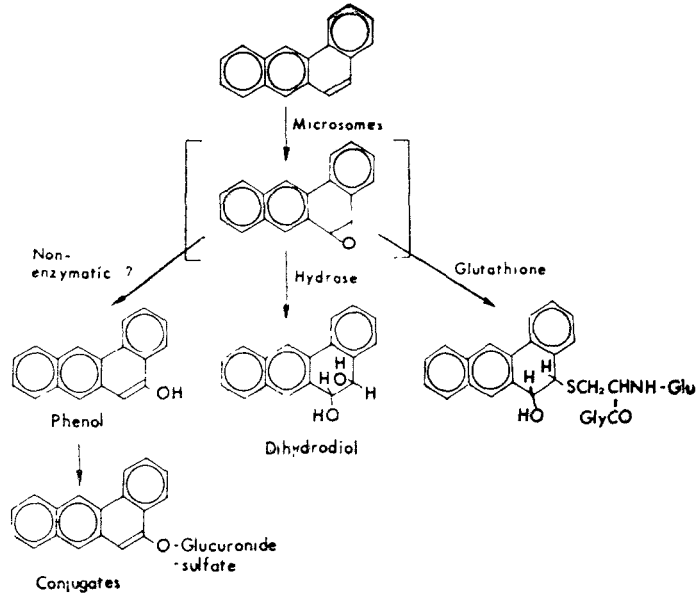


Fig. 4. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbons.

와 histone과 covalent complex를 형성 한다는 것을 입증했다. 그러나 dihydrodiol은 covalent complex를 형성하지 않는다는 것도 밝혔다. 그의 여러 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)의 표시된 K-region epoxide는 cultured cell의 DNA, RNA 및 단백질과 공유결합을 한다는 것이 알려졌다.

이런 결과들로 보아서 epoxide는 hydrocarbon phenol 그리고 dihydrodiol보다도 더 많은 정도로 cellular macromolecule과 결합한다. Jernia(1970)등은 naphthalene의 microsomal hydroxylation에서 중간체로 naphthalene oxide를 형성하는 것을 보고 모든 microsomal aromatic ring hydroxylation에서는 반드시 oxide 중간체가 생긴다는 것을 제안했다. 만약에 epoxide가 활성화된 대사물질로써 의미를 갖는다면 발암원 hydrocarbon의 microsomal metabolism의 중간체로 분리하는 것이 꼭 필요하게 되었다. 이런 분리를 완수한 사람들이 Heidelberg와 Sims(1971, & 1972)등이었다.

Microsomal system에서 여러 PAH epoxide, PAH로부터 생성된 dihydrodiol, 합성된 epoxide 그리고 epoxide의 microsomal metabolism에 의하여 얻어진 dihydrodiol등을 요약해서 table에 수록한다. 여기에서 몇개의 결론을 얻을수 있었다. 1) 분리된 모든 epoxide는 K-region에 위치한다. 2) epoxide는 dihydrodiol과 일치하게 microsome에 의하여 변화된다. 그리고로

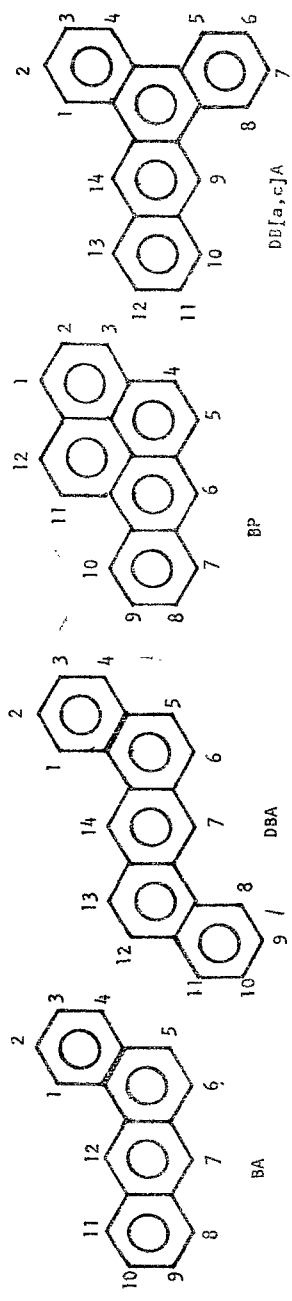
dihydrodiol의 존재는 epoxide가 중간체라는 역력한 증거를 준다. 3) 몇개의 non-k-region epoxide가 합성 되었는데 이는 k-region epoxide보다 불안정 하다. 4) Dihydrodiol로 PAH의 대사는 K-region 말고도 다른 위치에서 일어날 수 있다. 5) Methylated benz(a)-anthracene의 경우에서 hydroxymethyl 화합물로 대사과정은 epoxide보다도 먼저 일어 날수 있다. 이런 epoxide들은 mouse의 prostate fibroblast와 hamster embryo cell의 malignant transformation을 형성 하는데 모체인 hydrocarbon 보다도 활성도가 더 크다. 그리고 DNA와의 결합력도 더 강하다. 포유동물의 cell을 포함하는 여러 system에서 mutagenic이고 cultured cell에서 malignant transformation의 원인이 된다.

### 3) Nitrosamines

Magee & Barne(1956)이 dimethylnitrosamine을 백서에 먹였더니 높은률의 간암을 발생하는 것을 발견 하였다. 이런 발견은 매우 중요한 분야의 연구를 시작 하게 되었다. 간단한 aliphatic nitrosamine들은 다양한 악성 종양을 생성하는데 가장 보편적인 기관은 간장, 신장, 폐 그리고 식도이다. Druckrey(1963)등은 쥐의 환경 발암원으로 nitrosamine의 중요성을 처음으로 제안했고 secondary aliphatic amine은 sodium nitrate와 몸안에서 반응하여 nitrosamine을 형성한다고 주장했다. 이런 강력한 발암원 화합물의 형성은 메

**Table 1.** Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons and epoxides

Hydrocarbon	Epoxide isolated	Dihydrodiols isolated from hydrocarbons	Epoxides synthesized	Dihydrodiols isolated from epoxides
Benz[a]anthracene	5,6	5,6	5,6	5,6
Dibenz[a,h]anthracene	5,6	5,6	8,9	8,9
		1,2	5,6	5,6
		3,4		
Dibenz[a,c]anthracene		10,11	10,11	10,11
Benzo[a]pyrene	4,5	4,5	4,5	
		9,10	9,10	7,8
		7,8	7,8	
Dibenzo[a,h]pyrene		uncharacterized		
Dibenzo[a,i]pyrene		uncharacterized		
7,12-Dimethylbenz[a]anthracene	5,6	5,6	5,6	5,6
7-Hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene	5,6	5,6	5,6	5,6
7-Methylbenz[a]anthracene	5,6	5,6	5,6	5,6



—  
∞  
⊖  
|

우 중요하다. 왜냐하면 이런 반응의 성분은 음식속에 많이 들어 있기 때문이다. Lijinsky(1970, 1972 및 1968)등은  $\text{NaNO}_3$ 가 자연계에 널리 분포 되어있고 효소에 의하여 환원되어서  $\text{NaNO}_2$ 로 된다. 이것은 푸른 야채 속에도 있고 생선이나 고기를 보관 하는데도 많이 사용된다. Secondary amine은 fish product속에 있고 요리하는 동안에도 생긴다. 그리고 술, 음식의 향료, 담배등에 있고 강한 독성을 나타낸다.

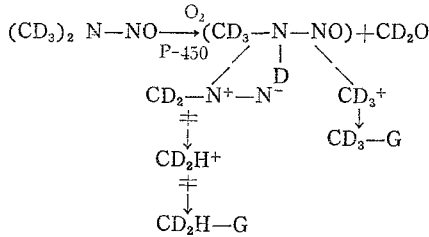


Fig. 5. Activation of dimethylnitrosamine.

Dimethylnitrosamine의 대사 첫단계는 formaldehyde이다. DMN의 대사적 활성화와 alkylation의 기전은 Lijinsky가 확립시켰다. 이 실험은 deuterated DMN을 백서에 주사하고 간장에서 DNA와 RNA를 분리하고 이들을 가수분해 했더니 7-methyl guanine이 분리되었다. 이 7-methylguanine을 mass spectrometry로 분석했더니 3개의 deuterium원자가 존재했다. 이는 methylcarbonium 이온이 active methylating agent이고 중간체로 diazomethane을 형성하지 않는다는 것을 제시하는 것이다. 이런 7-methylguanine은 발암원으로써 강한 작용을 갖는다. 다른 실험에서 DMN을 백서에 주사하고 12시간 후에 백서 간장을 density gradient centrifugation에 의하여 fractionated했다. 분자량이 큰 heterogenous RNA 즉 mRNA의 전구체라고 생각하는 fraction에서 가장 높은 특이한 활성도를 발견했고 그 다음으로 높은 독특한 활성도는 r-RNA였다. m-RNA속에 7-Me-G의 존재는 ribosome의 disaggregation을 유발하고 DMN의 cytotoxic효과 때문이라고 추측하고 있다.

#### 4) Aflatoxins

Aflatoxin들은 곰팡이 대사물의 한 계열이다. Aflatoxin B<sub>1</sub>은 백서에서 가장 강력한 간암 물질이라는 것이 Wogan & Newbern(1967)에 의하여 발견되었다 그후 여러 종족에서 간암 물질이라는 것이 알려졌다. Lijinsky(1970)등은 백서에다 aflatoxin B<sub>1</sub>을 투여하였더니 간장 DNA, RNA 및 단백질과 공유결합을 한다는 것을 발견했다. 시험관 화학반응에서 공유결합이 일어나지 않는 것으로 보아 aflatoxin도 반드시 대사

적 활성화가 필요하다는 것을 알려 준다. Garner(1971)등은 mixed function oxidase system하에서 백서 간장 microsome과 aflatoxin B<sub>1</sub>을 incubation 하였더니 매우 독성이 있는 salmonella typhimurium을 생성했다. 이 생성물은 t-RNA에 공유결합을 한다.

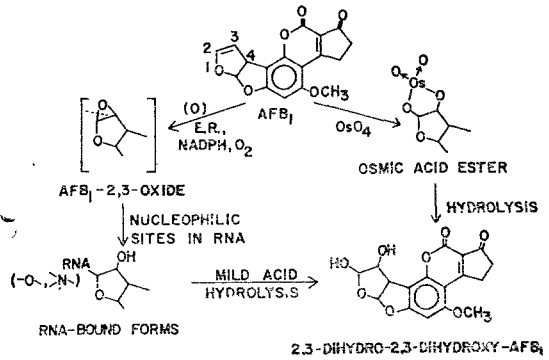


Fig. 6. Activation of aflatoxin B.

Swenson & Miller(1973)는 aflatoxin B<sub>1</sub>과 백서와 hamster의 liver microsome과 incubation 해서 형성된 생성물과 r-RNA와 결합한 화합물을 분리했다. 이것은 약산에 의하여 분해 되어서 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy 유도체를 분리했다. 이 구조는 이런 물질을 합성해서 확인하였다. 이런 결과는 활성화된 대사가 epoxide라는 것을 증명하는 것이다.

## 결 론

화학물질 발암원에 의한 암의 유발은 cellular macromolecule과의 공유결합을 하는데 그원인이 있다. 이런 결합을 하려면 주로 NADPH와 O<sub>2</sub> 그리고 cytochrome P-450이 관여하는 microsomal mixed function oxidase에 의하여 먼저 활성화된 다음에 DNA, RNA 및 단백질과 결합된다. 그러나 이 분야에 많은 집중적인 연구에도 불구하고 macromolecular target은 아직도 명백하게 밝혀지고 있지 않다.

## —References—

- 1) Boyland, E. Symp. Biochem. Soc. 5 : 40—54, 1950.
- 2) Boyland, E., Sims, P. Biochem. J. 91 : 493—506, 1964.
- 3) Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Ro-

- senthal, O., Estabrook, R.W. *Science*(Washington) 147, 400, 1965.
- 4) Druckrey, H., Steinhoff, D., Beuthner, H., Schneider, H., Klarner, P. *Arzneim. Forsch.* 13 : 320—23, 1963.
  - 5) Ellin, A., Jakobsson, S., Schenkman, J. B., Orrenius, S. *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 64, 1962.
  - 6) Ernster, L., Orrenius, S. *Fed. Proc.* 24, 1190, 1965.
  - 7) Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. *Biochem. J.* 338, 741, 1963.
  - 8) Garfinkel, D. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493, 1958.
  - 9) Garrner, R.C., Miller, E.C., Miller, J. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 : 774—80, 19 71.
  - 10) Grover, P.L., Sims, P. *Biochem. Pharmacol.* 19 : 2251—59, 1970.
  - 11) Grover, P.L., Hewer, A., Sims, P. *FEBS Lett.* 1' : 76, 1971.
  - 12) Grover, P.L., Hewer, A., Sims, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 1010—16, 1972.
  - 13) Harding, B.W., Wong, S.H., Nelson, D.H. *Biochem. Biophys. Acta* 92, 415, 1964.
  - 14) Haenszel, W., Kurihara, M. *J. Nat. Cancer Inst.* 40—43—68, 1968.
  - 15) Hgginson, J. In *Environment and cancer*, 24th symp. *Fundam cancer Res.*, 69—92. Baltimore: williams & wilkins, 1972.
  - 16) Higginson, J., Muir, Cos. In *Cancer Medicine*, ed. J.F. Holland, E. Frei 111, 241—306. Philadelphia: Lea and Febiger, 1973.
  - 17) Ishihara, K., Kusunose, E., Kusunose, M. *Biochem. Biophys. Acta.* 239, 178, 1971.
  - 18) Ishidate, K., Kawaguchi, K., Tagawa, K., Hagiwara, B.J. *Biochem (Tokyo)* 65, 375, 1969.
  - 19) Jerina, D.M., Daly, J.W., Witkop, B., Zaltzman-Nirenberg, P., Udenfriend, S. *Biochemistry.* 9 : 147—55, 1970.
  - 20) Klingenberg, M. *Arch. Biochem. Biochem.* 75, 376, 1958.
  - 21) Lijinsky, W., Epstein, S.S. *Nature* 225 : 21—23, 1970.
  - 22) Lijinsky, W., Keefer, L., Conard, E., Vande Bogart, R.J. *Nat. Cancer Inst.* 49 : 1239—49, 1972.
  - 23) Lijinsky, W., Loo, J., Ross, A.E. *Nature* 218 : 1174, 1968.
  - 24) Lindenmayer, A., Smith, L. *Biochem. Biophys. Acta* 93, 445, 1964.
  - 25) Mages, P.N., Barnes, J.M. *Brit. J. Cancer* 10 : 114—22, 1956.
  - 26) Miller, E.C. Miller, J. A. *Pharmacol. Rev.* 18 : 806—30, 1966.
  - 27) Miller, E.C., Miller, J.A. In *Molecular Biology of Cancer* ed. H. Busch, New York: Academic, 377—402, 1974.
  - 28) Miller, J. A., Miller, E.C. *Lab. Invest.* 15 : 21 7—41, 1966.
  - 29) Miller, J.A., Miller, E. C. *Progr. Exp. Tumor Res.* 11 : 273—301, 1967.
  - 30) Miller, J.A., Miller, E.C.J. *Nat. Cancer Inst.* 47 : V—XIV, 1971.
  - 31) Omura, T., Sato, R. *Biol. Chem.* 237, pc 1375, 1962.
  - 32) Omura, T., Sato, R.J. *Biol. Chem.* 239, 2370, 1964.
  - 33) Omura, T., Sato, R.J. *Biol. Chem.* 239, 2379, 1964.
  - 34) Omura, T., Sato, R., Cooper, D Y., Rosenthal, O., Estabrook, R.W. *Fed. Proc.* 24, 1181, 1965.
  - 35) Pott, P. 1755. In *Chirurgical Observation*, London: Hawkes, Clarke & Collins, 1963.
  - 36) Sato, R., Omura, T. *Proc. 5th Internat. Congr. Biochem.* 9, 529, 1963.
  - 37) Selkirk, J.K., Huberman, E., Heidelberger, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43 : 1010—1 6, 1971.
  - 38) Swenson, D.H., Miller, J.A., Miller, E.C. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 53 : 1260—67, 19 73.
  - 39) Takesue, Y., Sato, R.J. *Biochem. (Tokyo)* 61, 515, 1967.
  - 40) Wogan, G.N., Newberene, P.M. *Cancer Res.* 27 : 2370—76, 1967,
  - 41) Yohro, Y., Horie, S., J. *Biochem. (Tokyo)* 61, 515, 1967.