

Expression of Cytochrome P450 1A1, 1A2, 2C8, 2E1 and 3A4 in Human Brain

Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

We have carried out PCR reactions to investigate if cytochrome P450 (P450) enzymes (1A1, 1A2, 2C8, 2E1 and 3A4), which are well known to be the key enzymes in detoxification process and/or synthesis of steroids in the liver, are expressed in the human brain, too. P450 1A1, 2C8 and 2E1 were expressed clearly. However, P450 1A2 and 3A4 were not detectable. Their expression levels in the human brain could be extremely low or they were not expressed at all. One base substitution at nucleotide 290 (A→G) was identified in P450 1A1. It is suspected to be an individual polymorphism. Our results should contribute to the better understanding of the role of cytochrome P450 enzymes in the human brain.

Key Words: Cytochrome P450, Brain, Polymorphism

서 론

Cytochrome P450 (P450) 효소에 대한 연구는 그동안 간을 중심으로 이루어져 왔다. 간이 독성물질이나 스테로이드를 대사시키는 주된 장소이기 때문이다. 그러나 최근에 들어 뇌에서 발현되는 P450 효소에 대한 관심 또한 급증하고 있다. 뇌에서도 분명히 신경독성물질이 대사되어야 할 것이고, 또 신경스테로이드 (neurosteroid)가 합성되어야 하기 때문이다^{1,2,13,15}. 그러기 위해서는 일련의 P450 효소들이 이에 관여하고 있을 것이라는 기대인데 다만 그 발현 여부가 아직 불투명할 뿐이다. 신경스테로이드의 경우에는 P450_{scc}의 발현이 이미 뇌에서 증명된 바 있어 이에 연관된 또 다른 P450 효소들도 적으나마 분명히 발현되고 있을 것이라는 기대를 낳고 있다^{3,6,7}.

연구의 가장 큰 장애는 기술적 문제이다. 뇌에서 P450 효소들이 발현되더라도 간과 비교할 때 발현율이 현저히 낮을 것으로 예상되기 때문이다⁸. 따라서 library screening이나 northern blotting 같은 토편적인 방법으로는 이를 검출하기조차 어렵다는 것이 그동안의 연구가 미진할 수밖에 없었던 이유를 잘 설명하고 있다.

P450 효소는 알려진 것만도 무려 220여 종이 넘고 지금도 새로운 것들이 계속 보고되고 있다. 우리는 이 중에서 hydroxylation 반응에 관여하거나 알코올에 의해 유도되는 P450 1A1, P450 1A2, P450 2C8, P450 2E1, 그리고 P450 3A4를 선별하여

뇌에서의 발현 여부를 조사하였다.

본 연구는 신경독성이 어떤 경로를 통해 분해되는 지 등 뇌 세포를 보호하기 위한 연구가 P450 효소를 통해 이루어질 수 있음을 보여주기 위한 것이다. 연구 결과는 뇌에 대한 유해물질과 약물들을 선별하여 뇌세포를 보호하기 위한 기초가 될 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 재 료

Human brain cDNA library는 허태린 (경북대학교) 교수로부터 분양받았다. PCR primer는 (주)Bioneer (대전)에 의뢰하여 제작하였다. T4 ligase, Taq polymerase 등 효소와 dNTP를 비롯한 PCR 시약, DIG DNA labeling and detection kit들은 Boehringer Mannheim (Germany)으로부터 구입하였다. pBluescript plasmid는 Stratagene (USA)에서, pGem T-easy vector는 Promega (USA)에서 각각 구입하였다. DNA sequencing kit는 USB (USA)의 Sequenase Version 2.0 kit을 사용하였다.

2. PCR Template의 준비

PCR 반응의 template로는 human brain cDNA library에서 분리한 recombinant phage DNA를 사용하였다. Phage DNA를 분리하는 과정은 Maniatis 등이 제시한 방법에 준하였는데¹⁴ 적어도 10⁹ 이상의 phage를 host cell에 감염시킴으로써 발현율이 간의 3-4%로 매우 낮더라도 반드시 이들 P450 효소가 포함될 수 있도록 준비하였다.

*논문 접수: 2001년 5월 19일

수정제 접수: 2001년 6월 20일

[†]별책 요청 저자: 유민, 대구광역시 달서구 신당동 1000 계명대학교 생물학과 (우: 704-701)

Tel & Fax) 053-580-5537, E-mail: ymin@kmu.ac.kr

No	Name	Sequence	Length	Orientation
1	1A1F1	TCACAGACAGCCTGATTGAG	20	sense
2	1A1F2	AAGCTATGGGTCAACCCATC	21	sense
3	1A1F3	TCATGCTTTTCCCAATCTCC	20	sense
4	1A1R1	CTGCAGCCAGATCAGTGTCTA	20	antisense
5	1A1R2	GGGAAGGCTCCATCAGCATC	20	antisense
6	1A1R3	TGTGGCCCTGTTTACCTGT	20	antisense
7	1A2F	AAGACACCACCATTCTGAGGC	21	sense
8	1A2R	TGTCACCTCAGGCTCTGGCAA	21	antisense
9	2C8F1	AGAGGTACAGCTAAAGTCCAGG	23	sense
10	2C8F2	GAATTTCTAATCCAAATATC	21	sense
11	2C8R1	GGGGATGAGGTAGTTTCTGAAC	22	antisense
12	2C8R2	CCTTCTCCTGCACAAATTCGTT	22	antisense
13	2E1F1	CTACCTGGAAGGACATCCGGCGG	23	sense
14	2E1F2	CACAATGGACGGTATCACCGTGACTGTGG	29	sense
15	2E1R1	GAAAATGGTGTCTCGGGTTGCTTCATGG	28	antisense
16	2E1R2	CTGCAAAATGGCACACAACAAAAGAAAC	28	antisense
17	3A4F	CCAAGCTATGCTCTTCACCG	20	sense
18	3A4R	TCAGGCTCCACTTACGGTGC	20	antisense

Fig. 1. Primers used for the experiments.

3. PCR Amplification

PCR에 사용한 primer는 모두 18종류로서 간에서 발현되는 mRNA에 기초하여 제작하였다^{4,9,10,12,17}. 각각의 염기서열과 방향성, 길이 등은 Fig. 1에 정리하였다. 반응 프로그램은 denaturation을 94°C에서 15초, annealing을 52°C (P450 1A1, P450 3A4), 또는 55°C (P450 1A2, P450 2C8, P450 2E1)에서 15초, extension을 72°C에서 30초로 하여 전체 35 cycle을 수행하였다.

4. DNA Sequencing

PCR product는 pBluescript KS vector 또는 pGem T-easy vector에 subcloning 시켰고, alkaline lysis 방법에 따라 double strand DNA를 분리하였다¹⁴. Sequencing 반응은 Sanger 등이 제시한 primer extension에 의해 실시하였다¹⁰. 때로 PCR product가 간의 염기서열에 비교하여 예상 크기와 다소 틀리더라도 alternative mRNA splicing 가능성이 있으므로 일단 염기서열을 결정하여 비교하도록 하였다.

결 과

1. P450 1A1

P450 1A1은 benzo(a)pyrene을 대사시키면서도 내생 (endo-

genous)의 기질은 대사하지 않기 때문에 흥미있는 효소이다^{9,10}. 이러한 기능적 특성 때문에 뇌에서의 발현 여부는 더욱 주목을 받고 있다. 먼저 쥐의 뇌에서 mRNA를 추출하여 northern blotting을 실시하였는데 아무런 band가 검출되지 않았다 (data not shown). 이는 예상대로 뇌에서의 발현율이 상당히 낮기 때문인 것으로 사료되었다. PCR 반응으로 증폭한 band를 plasmid vector에 클로닝하여 염기서열을 결정하였고 그 결과인 965 bp를 Fig. 2에 요약하였다. 뇌 P450 1A1 염기서열 중에 간에서 보고한 것과 차이가 있는 부분이 있었는데 (nucleotide 290, A→G), 그럼에도 불구하고 아미노산에 변화를 주지 않았기에 개인차에 의한 polymorphism일 것으로 추정하였다¹⁰. 발현 여부가 확인된 만큼 full-size clone을 분리하려는 노력은 더 이상 하지 않았다.

2. P450 1A2

P450 1A2는 northern blotting과 PCR 모두에서 발현이 확인되지 않았다. 이것은 이 효소가 aflatoxin B1-4-hydroxylase activity라든가 arylamine에 촉매작용을 한다는 점에서 다소 예상외로 받아들여졌다^{9,10}. 왜냐하면 이러한 작용은 암 유발과 연관되어 있기에 화학적으로 뇌종양에 결정적인 역할을 할 것으로 추정되었기 때문이다. 한가지 가능한 추측은 우리가 template로 사용한 human brain cDNA library를 만들기 위해 제공

```

tcacagacag cctgattgag cactgtcagg agaagcagct ggatgagaac gccaatgtcc 60
agctgtcaga tgagaagatc attaacatcg tcttggacct ctttggagct gggtttgaca 120
cagtcacaac tgctatctcc tggagcctca tgtatttggg gatgaacccc aggggtacaga 180
gaaagatcca agaggagcta gacacagtga ttggcagggtc acggcggccc cggctctctg 240
acagatccca tctgccctat atggaggcct tcaccttgga gaccttccgg* cactcttctt 300
tcgtcccctt caccatcccc cacagcacia caagagacac aagtttgaaa ggcttttaca 360
tccccaaagg gcggtgtgtc tttgtaaacc agtggcagat caacatgac cagaagctat 420
gggtcaaccc atctgagttc ctacctgaac ggtttctcac ccctgatggt gctatcgaca 480
aggtgttaag tgagaagggtg attatctttg gcatgggcaa gcggaagtgt atcggtgaga 540
ccgttgcccg ctgggagggtc tttctcttcc tggctatcct gctgcaacgg gtggaattca 600
gcgtgccact gggcgtgaag gtggacatga ccccatcta tgggctaacc atgaagcatg 660
cctgctgtga gcacttccaa atgcagctgc gctcttaggt gcttgagagc cctgaggcct 720
agactctgtc tacctggtct ggttgggcag ccagaccagc aggctggcct atgtggtcta 780
agattcagcc tgaactcat agacactgat ctggctgcag ttttgctatc tgggctgtgg 860
gcaagcctaa gggatcctgc ctgcccctac cctggacttg cctctgcaca ccctccagag 920
acaacaggtg aaacagggcc acatagatgc tgatggagcc ttccc 965

```

Fig. 2. Partial sequence of P450 1A1 expressed in the human brain. Polymorphic change (at nucleotide 290) when compared to the liver sequence is indicated by asterisk (*). Relative locations for primers 1A1F1, 1A1F2, 1A1R1 and 1A1R2 (from top to bottom) are underlined. Numbers are given for the comparison purpose and indicate the relative position of nucleotide within the amplified DNA fragment.

된 mRNA에서 P450 1A2에 해당하는 것이 상대적으로 적거나 없었을 가능성이다. P450 1A2가 phage 증식에 독성을 나타내기 때문에 library pool에서 제외되었을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 결과적으로 P450 1A2는 사람의 뇌에서 발현되지 않거나 또는 워낙 그 비율이 낮아서 표준 방법으로 검색하기에는 대단히 어려운 것으로 결론지었다.

3. P450 2C8

P450 2C 계열의 효소들은 지속적으로 발현되면서도 성별과 발생 단계에 따라 다소 발현 차이를 보일 수 있다는 점이 재미있는 효소이다. 특히 P450 2C8에 대한 연구는 활발하여 그동안 HPH, IIC2, mp-12, mp-20, hP2-1, Form 1 등 다양한 이름으로 클로닝되어져 왔다¹²⁾. 이들은 phenobarbital에 의해 유도될 수 있어 간뿐 아니라 뇌에서의 발현이 주목을 받아 왔는데 아직까지는 부정적인 견해가 더 많은 실정이었다. 본 연구에서 2C8F1

과 2C8R1 primer로 반응시킨 결과 196 bp의 DNA band가 증폭되었고 이의 세부적인 염기서열이 Fig. 3에 요약되어 있다. 전체적으로 Kolyada (1990) 등이 HPH라는 이름으로 보고하였던 염기서열과 정확히 일치하였으며 polymorphism 등의 변이도 관찰되지 않았다. P450 2C8의 경우에도 발현 여부를 밝히는 것을 목적으로 하고 있었기에 full-size clone을 분리해 내기 위한 작업은 생략하였다.

4. P450 2E1

알코올, 아세톤 등에 의해 유도되는 이 효소는 알코올이 자유롭게 blood-brain barrier를 통과할 수 있다는 특성 때문에 대단한 관심을 불러 일으키고 있다⁹⁾. 이것은 치매와 같은 뇌 퇴행성 질환들과 음주로 인한 기억력 상실 등의 원인일 것으로 추측되기 때문이다. 더우기 우리나라처럼 알코올의 남용정도가 유난히 심각한 국가에서는 이것이 개인적 차원을 넘어 사회적

agaggtcaca gctaaagtcc aggaagagat tgatcatgta attggcagac acaggagccc 60
 ctgcatgcag gataggagcc acatgcctta cactgatgct gtagtgcacg agatccagag 120
 atacagtgac cttgtcccca ccggtgtgcc ccatgcagtg accactgata ctaagttcag 180
aaactacctc atcccc 196

Fig. 3. Partial sequence of P450 2C8 expressed in the human brain. Relative locations for primers 2C8F1 (sense) and 2C8R1 (antisense) are underlined. Numbers are given for the comparison purpose and indicate the relative position of nucleotide within the amplified DNA fragment.

ctacctggaa ggacatccgg cggttttccc tgaccaccct ccggaactat gggatgggga 60
 aacagggcaa tgagagccgg atccagaggg aggcccactt cctgctggaa gcactcagga 120
 agacccaagg ccagcctttc gacccacct tcctcatcgg ctgcgcgccc tgcaacgtca 180
 tagccgacat cctcttccgc aagcattttg actacaatga tgagaagttt ctaaggctga 240
 tgtattttgtt taatgagaac ttccacctac tcagcactcc ctggctccag cttacaata 300
 attttcccag ctttctacac tacttgcctg gaagccacag aaaagtcata aaaaatgtgg 360
 ctgaagtaaa agagtatgtg tctgaaaggg tgaaggagca ccatcaatct ctggaccca 420
 actgtccccg ggacctcacc gactgcctgc tcgtggaaat ggagaaggaa aagcacagtg 480
 cagagcgctt gtacacaatg gacggtatca ccgtgactgt ggccgacctg ttctttgcgg 540
 ggacagagac caccagcaca actctgagat atgggctcct gattctcatg aaataccctg 600
 agatcgaaga gaagctccat gaagaaattg acagggatgat tgggccaagc cgaatccctg 660
 ccatcaagga taggcaagag atgccctaca tggatgctgt ggtgcatgag attcagcgg 720
 tcatcacctc cgtgccctcc aacctgcccc atgaagcaac ccgagacacc attttcagag 780
 gatacctcat cccaagggc acagtcgtag tgccaactct ggactctgtt ttgtatgaca 840
 accaagaatt tcctgatcca gaaaagtta agccagaaca cttcctgaat gaaaatggaa 900
 agttcaagta cagtactat ttcaagccat tttccacagg aaaacgagtg tgtgctggag 960
aaggcctggc tcgcatggag ttgtttcttt tgttgtgtgc cattttgcag 1010

Fig. 4. Partial sequence of P450 2E1 expressed in the human brain. Relative positions for primers 2E1F1, 2E1F2, 2E1R1 and 2E1R2 (from top to bottom) are indicated as underlined. Numbers are given for the comparison purpose and indicate the relative position of nucleotide within the amplified DNA fragment.

문제로까지 확산될 수 밖에 없는 실정이다. 그동안 그 발현에 대하여 논란이 많았음에도 불구하고 각 실험실마다 다른 견해를 보고하고 있고, 또 아직 P450 2E1이 사람의 뇌에서 완전하게 클로닝된 적은 없는 실정이다. 또한 P450 2E1이 암 유발에

직접적으로 연관되어 있으므로 뇌종양과도 깊은 관계가 있을 것으로 보지만 구체적인 보고는 없는 실정이다. 본 연구에서는 간에서 보고되어 있는 염기서열에 근거하여 다양한 primer들을 제작하였고^{17,18)}, PCR로 증폭된 DNA 절편들을 클로닝하여 염

기서열을 밝혀내었다. 증폭된 염기서열은 전체 1,010 bp였으며, 사용된 primer들의 상대적 위치는 Fig. 4에 표시하였다. 전체적으로 볼 때 간의 염기서열과 완전히 일치하였으며 변이도 발견되지 않았다. 본 실험에 따라 그동안 논란이 되어 왔던 사람 뇌에서의 P450 2E1의 발현이 확실하게 확인될 수 있었다. 증폭된 부분의 전체적인 구조와 염기서열이 간의 것과 일치하였으므로 full-size clone을 분리하려는 더 이상의 노력은 하지 않았다.

5. P450 3A4

P450 3A4는 nf-25, nf-10, hPCN1 등의 이름으로 잘 알려진 효소이다¹¹⁾. 사람의 간에서 쉽게 발견되는 효소지만 뇌에서의 발현 여부에 대해서는 아직 보고도 없고 또 그다지 연구가 진행되지도 못한 실정이다. 사람과 쥐가 기능상 약간의 차이를 보이긴 하지만 합성스테로이드인 PCN (pregnenolone 16- α -carbonitrile)에 의해 유도되는 것이 또한 특징이다. 뇌에서 이 효소가 발현된다는 예측은 이 효소가 신경스테로이드 대사에도 혹시나 관련되어 있지 않을까 하는 예측 때문이다. 그러나 두 개의 primer로 실시한 PCR 반응에서 아무런 DNA band도 검출되지 않았다. Northern blotting의 결과도 마찬가지로 아무런 신호를 나타내지 않았다. 이 결과는 앞서 P450 1A2에서 기술한 것 처럼 사용한 human brain cDNA library내에 이 효소의 mRNA가 상대적으로 적었거나 뇌에서의 발현이 현저하게 낮다는 것을 의미하고 있다. P450 3A4의 경우 신경스테로이드 대사와 기능적으로 직접적인 관련이 없어서 아예 발현이 되지 않았을 가능성도 배제할 수 없다.

고 찰

다양한 P450 효소 중에서도 독성물질과 스테로이드 대사에 관여하는 P450 1A1, P450 1A2, P450 2C8, P450 2E1, P450 3A4를 대표적으로 선별하여 조사하였다. 이들을 선택한 이유는 뇌에서도 대사물질의 해독과 스테로이드 반응이 일어나야만 하며, 또 암 유발과 관련된 효소작용이 있을 것으로 믿기 때문이다. 실험에는 northern blotting, PCR, DNA sequencing 및 각종 클로닝 기법들이 사용되었다.

실험을 디자인하면서 가장 크게 제약받은 것은 아직 뇌에서 이들 클론이 분리되어 있지 않아 DNA probe가 없다는 점이었다. 따라서 PCR band가 특이적으로 증폭된 것인지를 확인하려면 반드시 DNA sequencing을 해야 한다는 번거로움이 뒤따랐다. 무엇보다도 가장 큰 제약은 P450 효소의 발현이 뇌에서는 극도로 낮기 때문에 보편적인 방법으로는 확인이 어려울 것이고, 그렇기 때문에 부정적인 결과가 얻어졌을 때 발현 여부를 확실하게 단정지을 수 없다는 점이었다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 우리는 일단 쥐 뇌에서 northern blotting을

시도하였다. 그리고 계속해서 PCR 반응을 실시하였는데 설령 아주 적은 양이 발현된다 하더라도 반드시 검출할 수 있도록 primer의 디자인과 library 취급에 신중을 기하였다. 증폭된 PCR band들은 electroelution에 따른 클로닝 작업과 DNA sequencing으로 최종 확인되었다.

실험 결과 P450 1A1과 P450 2C8 그리고 P450 2E1이 사람의 뇌에서 발현되는 것으로 확인되었다. 반면에 P450 1A2와 P450 3A4는 발현이 되지 않거나 적어도 본 실험에서는 확인할 수 없을 정도로 그 발현율이 낮은 것으로 확인되었다. P450 1A1과 P450 2C8, 그리고 P450 2E1은 모두 뇌에서의 발현 여부가 여러 실험실을 통해 논란되어 온 효소들이다. 그럼에도 불구하고 본 실험 결과는 예상과 일치한다고 볼 수 있는데 그것은 이들이 모두 독성물질의 대사와 암 유발에 관련되어 있기 때문이다. 이러한 작용은 뇌에서도 반드시 있을 수밖에 없는 기능이기 때문이다. 특히 P450 1A1은 외부로부터 유입된 독성물질만을 대사시키기에 일단 그 발현이 밝혀졌다는 자체가 뇌독성학적인 측면에서 앞으로의 다양한 연구를 유발할 수 있는 좋은 계기를 마련했다 하겠다. P450 2E1의 경우는 알코올이 뇌를 자유자재로 통과하면서 각종 뇌 퇴행성 질환을 일으킬 가능성 때문에 관심이 높았던 효소이다. 본 효소 역시 발현 여부가 확실하게 증명된 이상 앞으로는 뇌 퇴행성 질환들에 대한 치료법이 DNA 차원에서 도모되어야 할 것이다. 특히 P450 2C8은 성별에 따라 다른 양상으로 발현될 수 있는 효소인 만큼 뇌에서의 정확한 기능 추적이 앞으로 이루어져야 할 효소이다.

한가지 주의할 점은 이들 효소의 기질과 대사 경로가 간에서와 다를 수도 있을 것이라는 점이다. 그럼에도 불구하고 이들 효소의 발현이 뇌에서 밝혀졌다는 것은 분명히 뇌에서도 이러한 물질대사들이 활발하게 이루어지고 있다는 것을 의미한다. 본 결과는 뇌에 대한 유해물질과 약물들을 선별하여 뇌 세포를 보호하기 위한 선행 연구로서 이 분야의 연구를 위한 학문적 기초가 될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelly JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C and Venter JC (1992): Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*, **355**: 632-634.
- 2) Anandatheerthavarada HK, Boyd MR and Ravindranath V (1992): Characterization of a phenobarbital-inducible cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase and reconstituted cytochrome P450 mono-oxygenase system from rat Brain. *Biochem J*, **288**: 483-488.
- 3) Anandatheerthavarada HK, Shankar SK and Ravindranath V (1990): Rat brain cytochromes P-450: catalytic, immunoche-

- mical properties and inducibility of multiple forms. *Brain Research*, **536**: 339-343.
- 4) Beaune PH, Umbenhauer DR, Bo RW, Lyoyd RS and Guengerich FP (1986): Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P-450 nifedipine oxidase. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **83**: 8064-8068.
 - 5) Cammer W, Downing M, Clarke W and Schenkman JB (1991): Immunocytochemical staining of the RLM6 form of cytochrome P-450 in oligodendrocytes and myelin of rat brain. *J Histochem Cytochem*, **39**: 1089-1094.
 - 6) Geoascogene C, Robel P, Gouézou M, Sananès N, Baulieu EE and Waterman M (1987): Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science*, **237**: 1212-1215.
 - 7) Hagihara K, Shiosaka S, Lee Y, Kato J, Hantano O, Takakusu A, Emi Y, Omura T and Tohyama M (1990): Presence of sex difference of cytochrome P-450 in the rat preoptic area and hypothalamus with reference to coexistence with oxytocin. *Brain Research*, **515**: 69-78.
 - 8) Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M and Kohler C (1990): Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **34**: 451-463.
 - 9) Iversen PL, Heiger WJ, Bresnick E and Hines RN (1987): Structural details of the P-450c gene. *Arch Biochem Biophys*, **256**: 397-401.
 - 10) Jaiswal AK, Gonzalez FJ and Nebert DW (1985): Human dioxin inducible cytochrome P1-450: complementary DNA and amino acid sequence. *Science*, **228**: 80-83.
 - 11) Jayyosi Z, Cooper KO and Thomas PE (1992): Brain cytochrome P450 and testosterone metabolism by rat brain subcellular fractions: presence of cytochrome P450 3A immunoreactive protein in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **298**: 265-270.
 - 12) Kolyada AY (1990): Sequence of a human liver cytochrome P450 cDNA clone. *Nucleic Acids Res*, **18**: 5550.
 - 13) Komori M (1993): Novel P450 expressed at the high level in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **190**: 721-728.
 - 14) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 - 15) Ravindranath V, Anandatheerthavarada H and Shankar S (1989): Xenobiotic metabolism in human brain-presence of cytochrome P450 and associated mono-oxygenases. *Brain Research*, **496**: 331-335.
 - 16) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain -terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **74**: 5463-5467.
 - 17) Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS and Gonzalez FJ (1986): Complementary DNA and Protein Sequences of Ethanol-inducible Rat and Human Cytochrome P-450s. *J Biol Chem*, **261**: 16689-16697.
 - 18) Warner M and Gustafsson J (1994): Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **91**: 1019-1023.