

## 돼지 췌장내 Protein Methylase I의 분리정제 및 성질

이 향 우 · 장 만 식

성균관대학교 약학대학

(Received April 28, 1987)

### Purification and Properties of Protein Methylase I from Hog Pancreas

Hyang-Woo Lee and Man-Sik Chang

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Korea

**Abstract**—Protein methylase I has been partially purified from hog pancreas with a 11% yeild. The final preparation is completely free of any other protein-specific methyltransferases and endogenous substrate proteins. The enzyme has an optimum pH of 7.2 and the approximate molecular weight is above 800 thousands dalton. The Km values for S-adenosyl-L-methionine and histone type II-A are  $1.32 \times 10^{-5}$ M. The Ki value for S-adenosyl-L-homocysteine is  $1.52 \times 10^{-6}$ M. The effect of enzyme concentration on the activity showed a slight sigmoidal curve suggesting the involvement of certain cofactors. Even though the purified enzyme showed two bands on polyacrylamide gel electrophoresis, the enzyme is highly specific for the arginine residues of protein and specifically, highly specific for histone, suggesting histonespecific protein methylase I.

단백질의 세포내에서의 modification에는 amino acid residue side chain의 carboxylation, phosphorylation, hydroxylation, acetylation, methylation, glycosylation, thiolation, nucleotidylation, iodination등의 addition 반응이 있고, 각각 특이한 효소에 의하여 이루어지며 이러한 modification 중에서 protein methylation은 Ambler와 Rees<sup>1)</sup>가 *Samonella typhimurium*의 flagella protein에서 methylated lysine을 최초로 발견하고 calf thymus, rabbit thymus와 calf liver에서 분리한 histone의 가수분해 산물내에  $\epsilon$ -N-methyllysine이 존재한다고 보고<sup>2)</sup>된 후 이에 관련된 효소 및 그 생화학적 역할에 대하여 많은 연구<sup>3)</sup>가 진행되어 왔다.

Protein methylation이란<sup>4)</sup> 세포내에서 생합성된 단백질이 효소들의 작용으로 인하여 생체내의 S-adenosyl-L-methionine(SAM)을 methyl donor로 하여 단백질내의 arginine, glutamic acid, aspartic acid, lysine 및 histidine이 methylation됨으로써 그 단백질의 구조와 기능에 변화

를 일으키는 반응 중의 하나로서 gene regulation<sup>5-8)</sup>, bacterial chemotaxis<sup>9-13)</sup>, myelin formation<sup>14-17)</sup>, carnitine biosynthesis<sup>18-20)</sup>, exocytosis<sup>21,22)</sup>, leukocyte chemotaxis<sup>23)</sup>, electron transport chain<sup>24-26)</sup>, muscle contraction<sup>27)</sup>, sperm mobility<sup>28)</sup>등과 같은 여러가지 생화학적 작용과 관계가 있다고 보고되었다.

Protein methylation은 methyl기가 전달되는 amino acid residue뿐만 아니라 substrate protein의 종류에 따라 specificity가 서로 다른 수종의 substrate specific methyltransferases가 있으며 이중 protein methylase I [S-adenosyl-L-methionine: Protein-arginine N-methyltransferase; EC 2.1.1.23]은 histone, MBP, myosin, actin, opsin등을 substrate protein으로 하여 단백질내의 arginine residue의 guanidino group을 methylation하는 효소로서 산물은 N<sup>G</sup>-mono-, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-di-, N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethylarginine<sup>29,30)</sup>이며 척추동물의 brain, thymus, testis, spleen<sup>31)</sup>과 식물의 wheat germ<sup>32)</sup> 및 *Euglena gracilis*<sup>33)</sup>등에 널리 분포하

고 주로 cytosolic fraction에 존재하며 nucleus에서도 미량 발견된다.<sup>34)</sup> 1968년 Paik에 의하여 calf thymus에서 최초로 발견된<sup>29)</sup> 후 rat thymus nuclei<sup>34)</sup>, rat brain<sup>35)</sup>, rat liver cytoplasm<sup>36)</sup>, calf brain<sup>37)</sup>, Krebs II ascites cells<sup>38)</sup>, chick embryo fibroblast<sup>39)</sup>, wheat germ<sup>32)</sup>에서 분리 정제되었으며 substrate specificity는 완전히 밝혀져 있지는 않지만 wheat germ에서 정제된 protein methylase I은 in vivo, in vitro에서 histone만을 기질로 하며 MBP만을 기질로 하는 MBP specific 효소도 보고되었으나<sup>17,29,32,40)</sup> 이 효소의 산물인  $N^G$ -mono-,  $N^G$ ,  $N^G$ -di-,  $N^G$ ,  $N^G$ -dimethylarginine 등 3종의 methylated arginine이 한가지 또는 다른 효소들에 의하여 생성되는지 여부는 확실하지 않으며<sup>34,41)</sup> protein methylase I 이외에 protein methylase II, III 등 여러 종류의 methyltransferases가 확인되었다.

Protein methylation이 세포외적 exocytotic secretion과 밀접한 관계가 있다는 많은 연구 보고가 있다.<sup>41-46)</sup> Povilaitis 및 공동 연구자<sup>47)</sup> 들은 protein의 carboxymethylation의 일부는 세포외적 enzyme secretion에 직접 관여 된다고 보고 하였으며 한편 본 실험실에서는 수종의 동물 세포외적 protein methylases의 분포를 검색한 결과 돼지 췌장내 높은 효소 활성도를 측정할 수 있었다. 이에 췌장의 췌효소 분비와 단백질의 methylation과의 상호 관련성을 규명코저 우선 돼지 췌장으로 부터 protein methylase I을 분리 정제 및 그 효소의 성질을 검토하였다.

### 실험 방법

시료 및 기기—돼지의 췌장은 도살장으로 부터 도살 즉시 채취하여 사용하였다. S-adenosyl-L-(methyl-<sup>14</sup>C) methionine SAM-<sup>14</sup>C (Amersham), histone type II-A, bovine serum albumin [BSA], S-adenosyl-L-homocysteine [SAH], collagenase, cytochrome C, r-globulin, DEAE-cellulose, sephadex G-100, acrylamide (Sigma), 2,5-diphenyloxazole, 1,4-bis-(5-phenyloxazol-2-yl) benzene (Fisher), sepharose 4B (Pharmacia), ribon-

uclease A, hyaluronidase, cellulase(Worthington),  $\alpha$ -amylase (Nutritional Biochemicals), myelin basic protein [MBP] (Hoechst)를 사용하였으며 기기로는 liquid scintillation counter (LKB), electrophoretic apparatus (Hoefer), Diaflo ultrafiltration equipment (Amicon)를 사용하였다.

**Protein methylase I의 활성도 측정**—Paik의 방법<sup>48)</sup>에 따라 histone에 incorporation된 radioactivity를 측정하여 효소의 활성도를 계산하였으며 (specific activity: incorporated SAM-<sup>14</sup>C picomole/min./mg protein) Lowry 방법<sup>49)</sup>으로 BSA를 standard로 하여 단백질을 정량하였다.

**효소의 정제**—모든 실험은 4°C 이하를 유지하면서 조작하였다.

① **Homogenation:** 돼지 췌장 100g에 0.25M sucrose-1mM EDTA 용액 9 volume을 넣고 teflon-glass homogenizer로 연마한 후 double cheese cloth를 통과시켰다.

② **Cell fractionation:** Whole homogenate를 38,000×g에서 30분간 원심분리한 후 glass wool 층을 통과시킨 여액만을 취하여 S<sub>3</sub> fraction으로<sup>50)</sup> 하였다.

③ **DEAE-cellulose chromatography:** Buffer A [5mM-sodium phosphate, 5mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, pH 6.0] 용액으로 equilibration한 column (5×26cm)에 S<sub>3</sub> fraction 350ml을 loading 한 후 peristaltic pump로 유속을 125ml/hr.로 조절하여 buffer A 용액 960ml을 용출 시킨 다음 0.025M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-buffer A 용액 600ml을 용출시키고 0.1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-buffer A 용액으로 용출시키는 step-wise gradient method를 이용하였다.

④ **Ultrafiltration:** Diaflo ultrafiltration 용기에 exclusion limit 10,000인 membrane을 끼우고 N<sub>2</sub> gas로 30 psi 압력을 가하였다.

⑤ **Sephadex G-100 chromatography:** 상기 농축한 시료를 buffer B [5mM sodium borate, 5mM EDTA, 1.2mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, pH 7.2]로 stabilization 시킨 column (2.15×150cm)에 charge한 다음 buffer B 용액

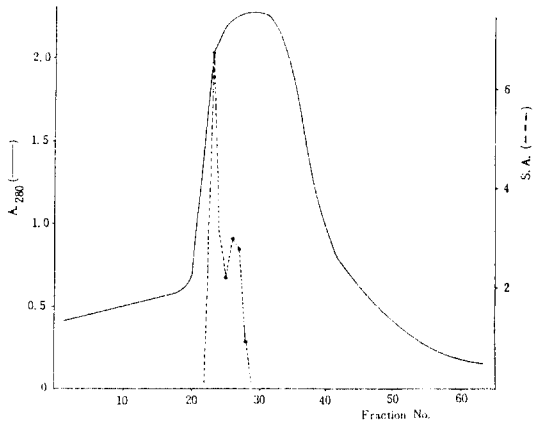
을 유속 27ml/hr로 하였다.

⑥ **Sephadex 4B chromatography:** Sephadex G-100 column 용출 후 농축한 시료를 Buffer B 용액으로 equilibration한 sephadex 4B column (1.56×100cm)에 charge한 다음 동일 buffer로 유속 8.7ml/hr로 용출시킨 시료를 농축한 후 column (1.1×50cm)에 charge하여 동일 buffer로 유속 7.4ml/hr로 rechromatography를 하였다.

### 실험 결과

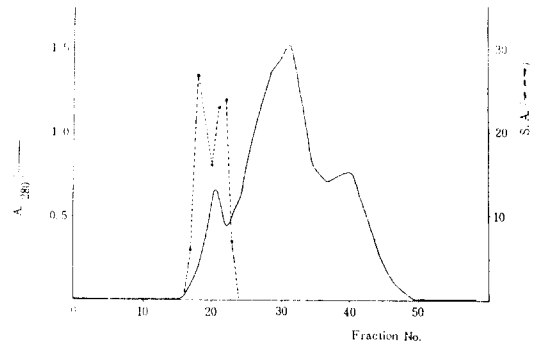
#### 효소의 정제 :

① **DEAE-cellulose chromatography:** S<sub>3</sub> fraction을 column에 loading시킨 후 흡착되지 않는 분획을 buffer A용액 960ml로 세척한 다음 0.025M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-A용액으로 분획한 결과는 Fig. 1과 같다. 이중에서 효소의 활성이 있는 fraction number 23~28를 합한 시료를 ultrafiltration하여 9.5ml로 농축하였다.



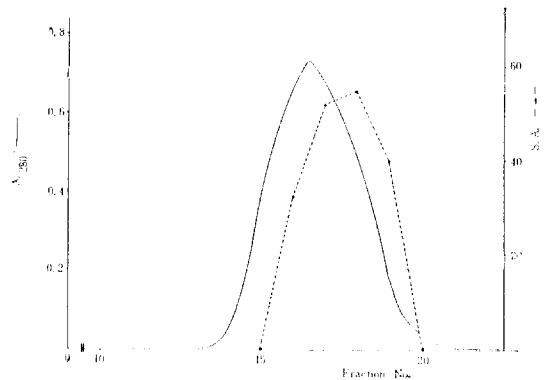
**Fig. 1**—Column chromatography of protein methylase I on DEAE-cellulose.

The DEAE-cellulose column (5cm×26cm) was equilibrated with 5mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 5mM EDTA, 2.4mM 2-mercaptoethanol and 10% glycerol (Buffer A). After loading of the S<sub>3</sub> fraction (350ml) the column was washed out with the Buffer A and with the buffer A containing 0.025M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then the column was eluted with the buffer A containing 0.1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at the flow rate of 125ml/hr. Fractions of 12ml were collected and A<sub>280</sub> was measured.



**Fig. 2**—Column chromatography of protein methylase I on sephadex G-100.

The sephadex G-100 column (2.15cm×150cm) was equilibrated with 5mM borate buffer (pH 7.2) containing 5mM EDTA, 1.2 mM 2-mercaptoethanol and 10% glycerol (Buffer B). The concentrated sample (9.4ml) from DEAE-cellulose chromatography was charged on the column and the column was eluted with the same buffer at a flow rate of 27ml/hr. Fractions of 8ml were collected and A<sub>280</sub> was measured.



**Fig. 3**—Rechromatography of the partially purified protein methylase I on sephadex 4B.

The sephadex 4B column (1.1cm×50cm) was equilibrated with buffer B. The pool of enzyme from the sephadex 4B column (1.56 cm×100cm) was concentrated and charged on the column (0.9ml). The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 7.4ml/hr. Fractions of 2ml were collected.

② **Sephaedx G-100 chromatography:** 상기 농축한 시료를 column에 charge한 후 buffer B 용액 440ml로 용출시킨 결과는 Fig. 2와 같으며

Table I—Purification of protein methylase I from hog pancreas.

Purification steps	Total protein* (mg)	Specific activity** (pmole/min/mg)	Total activity*** (pmole/min)	Purification	
				Fold	Recovery(%)
Whole homogenate	16,910	0.25	4,227.5	1.0	100.0
S <sub>3</sub> fraction	9,771	0.35	3,420.0	1.4	80.9
DEAE-cellulose	1,042	2.63	2,740.5	10.5	64.8
Sephadex G-100	99.0	18.52	1,833.5	74.1	43.4
Sepharose 4B	25.4	47.53	1,207.3	190.1	28.6
Rechromatography on Sepharose 4B	8.42	54.20	456.4	216.8	10.8

\* Total protein is based on 100g of hog pancreas.

\*\* Specific activity is represented as p mole of SAM ( $-^{14}\text{C}$ ) incorporated into mg protein per minute.

\*\*\* Total enzyme activity is represented as pmole of SAM ( $-^{14}\text{C}$ ) incorporated per minute.

효소의 활성을 나타내는 분획은 void volume에 해당하는 fraction number 18~23으로 이 분획을 합한 후 농축하여 3.8ml로 하였다.

③ **Sepharose 4B chromatography:** 상기 농축한 시료를 column(1.56×100cm)에 charge한 후 buffer B 용액으로 용출하여 효소 활성을 나타내는 fraction number 32~36을 합한 후 다시 이 시료를 0.95ml로 농축하였다. Column(1.1×50cm)에 charge하여 rechromatography한 결과는 Fig. 3과 같다.

이상과 같은 protein methylase I의 분리 정제 과정을 돼지 췌장 100g을 기준으로 하여 단계별로 specific activity, total protein, total activity, purification fold, recovery 등으로 나타내면 Table I과 같으며 whole homogenate로부터 최종 단계인 rechromatography까지 행할 때 219.8배의 정제와 10.8%의 수득율을 얻었다.

#### 효소의 성질 :

① **Electrophoresis:** 부분 정제한 protein methylase I의 polyacrylamide disc gel electrophoresis pattern은 Fig. 4와 같으며 gel-D는 Rf 값이 0.029와 0.086인 두개의 band를 나타내어 아직도 순수 정제되지 않았음을 보여주고 있다.<sup>51)</sup>

② **효소의 농도 변화에 따른 활성도의 변화:** Fig. 5에서 보는 바와 같이 histone을 기질로 하였을 때 protein methylase I의 활성도는 효소의 농도 증가에 따라 sigmoidal curve를 나타내며 이는 calf thymus, calf brain, wheat germ에

서 정제된 효소와 유사하다.<sup>29,32,37,52)</sup>

③ **효소의 기질 특이성:** 부분 정제한 효소의 기질 특이성은 Table II와 같다. 즉 histone type II-A를 기질로 하였을 때의 효소 활성도를 100으로 하여 MBP 및 그외에 몇몇 단백질과 비교한 결과 본 효소는 histone-specific enzyme임을 알 수 있었다.

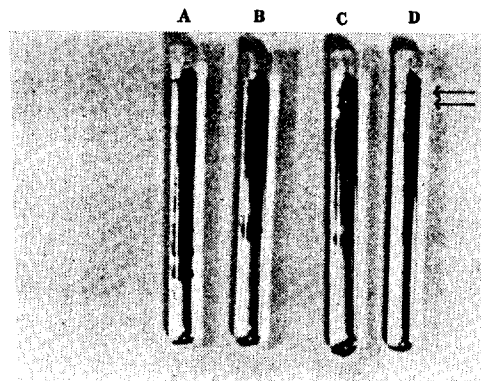
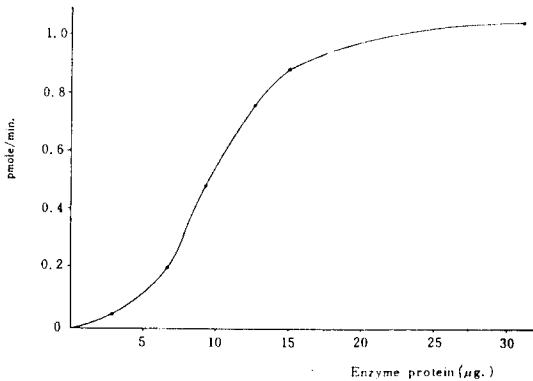


Fig. 4—Disc gel electrophoresis of the partially purified protein methylase I from hog pancreas.

The partially purified enzyme from the DEAE-cellulose column (228 $\mu\text{g}$  protein: A), sephadex G-100 column (99 $\mu\text{g}$ : B), sepharose 4B column (57 $\mu\text{g}$ : C) and the fraction number 18 of rechromatography (22 $\mu\text{g}$ : D) were charged on 7.5% polyacrylamide disc gels. The electrophoresis was performed at pH 9.5 and migration was toward the anode (from top to bottom). After separation the gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and destained with 30% methanol plus 10% acetic acid.



**Fig. 5**—Relationship between the rate of methylation and the concentration of hog pancreas protein methylase I.

1.5mg of histone type II-A was used as substrate and the amount of enzyme was varied from 3.1µg to 30.6µg protein.

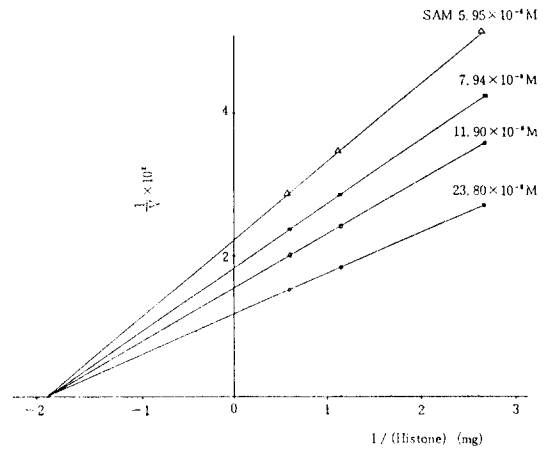
**Table II**—Relative efficiency of various proteins as substrate for hog pancreas protein methylase I.

Protein used as methyl acceptor	Efficiency (%)
Histone type II-A	100*
Myelin basic protein	0
Cytochrome C	0
Albumin	0
γ-globulin	0
Hyaluronidase	0
Cellulase	0
α-amylase	0
Collagenase	0
Ribonuclease	0

\* One hundred percent enzyme activity represent 53.4 pmole of SAM per minute per mg of enzyme protein.

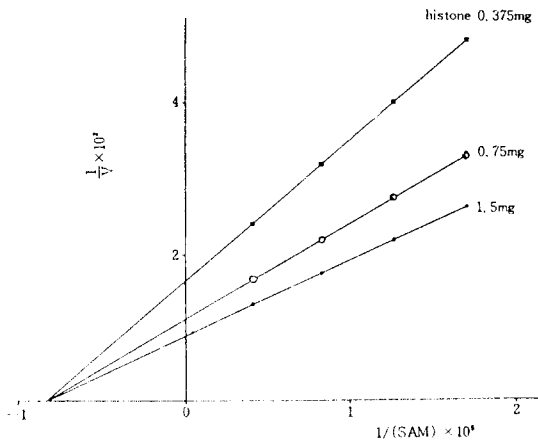
④ 기질의 농도 변화가 **protein methylation**에 미치는 영향 : 기질인 SAM과 histone type II-A의 농도 변화에 따른 효소의 활성화도 변화를 double reciprocal plot한 결과는 Fig. 6, 7과 같으며 protein methylase I의 SAM에 대한 Km value는  $1.32 \times 10^{-6}M$ ,  $V_{max}$ 는 108.7 pmole/min./mg protein 이었다.

⑤ **S-Adenosyl-L-homocysteine**이 효소의 활



**Fig. 6**—Effect of SAM on the hog pancreas protein methylase I reaction.

S-Adenosyl-L-methionine concentration was varied from  $5.95 \times 10^{-6}M$  to  $23.81 \times 10^{-6}M$ . Concentration of histone type II-A used were: 0.375mg(●), 0.75mg(○) and 1.5mg(◐).



**Fig. 7**—Effect of histone type II-A on the hog pancreas protein methylase I reaction.

Histone type II-A concentration was varied from 0.375mg to 1.5mg. Concentrations of SAM used were:  $5.95(\Delta)$ ,  $7.94(\blacksquare)$ ,  $11.90(\circ)$  and  $23.80(\bullet) \times 10^{-6}M$ .

성도에 미치는 영향 : 효소 반응의 생성물질인 SAH가 효소의 활성화도에 미치는 영향을 Line weaver-Burk equation에 의하여 plot한 결과 Fig. 8에서 보는 마와 같이 기질인 SAM에 대하여 competitive inhibition을 나타냈으며 이것을

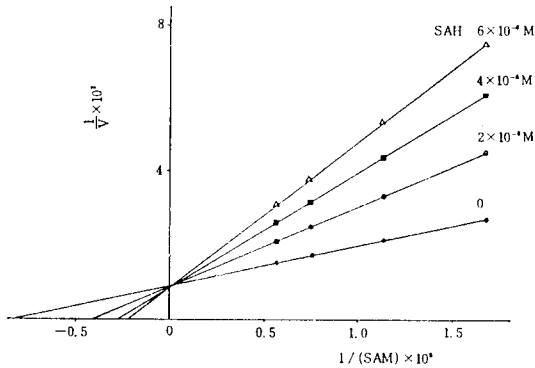


Fig. 8—Effect of SAH on the hog pancreas protein methylase I reaction.

SAM concentration was varied from  $5.95$  to  $17.86 \times 10^{-6} \text{M}$ . Enzyme was saturated with histone type II-A. Concentrations of SAH used were:  $0$  (●),  $2.0$  (○),  $4.0$  (■) and  $6.0$  (△)  $\times 10^{-6} \text{M}$ .

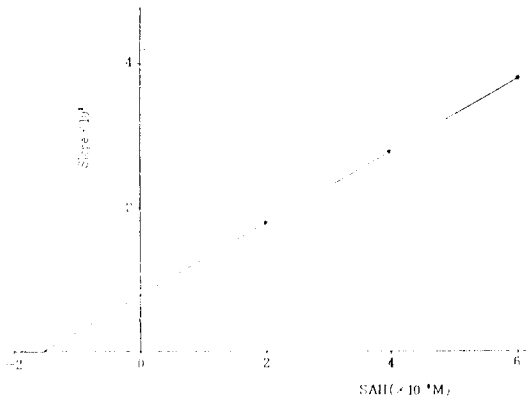


Fig. 9—Secondary plots of slopes of Fig. 8 against the reciprocals of the concentrations of SAH.

SAH 농도에 따른 slope의 변화를 secondary plot 한 결과는 Fig. 9와 같으며 효소의 SAH에 대한 dissociation constant는  $1.52 \times 10^{-6} \text{M}$ 이었다.

## 고 찰

Protein methylase I의 활성은 cell proliferation, neoplastic growth와 깊은 관계가 있어서 continuously dividing HeLa S-3 cell culture<sup>7)</sup>, 성장기의 kidney와 testis<sup>31)</sup>, fetal rat brain<sup>53)</sup>, regenerating adult rat liver<sup>54)</sup>, fast growing

Novikoff hepatoma와 Moris hepatoma에서<sup>55)</sup> 높은 활성도를 나타내며 또한 Rous sarcoma virus에 의한 chick embryo fibroblast로 transformation할 때 이 효소의 활성을 억제하면 RSV-induced transformation이 억제된다고 보고 되었다.<sup>39)</sup>

Protein methylase I의 분리 정제에 관한 본문에 있어서 calf brain과 krebs II ascites cells에서만 약 120배 정도의 정제율을 보였을 뿐 여타 보고에서는 그 정제율이 낮으며 이번 hog pancreas에서 10.8%의 수득율로서 216.8배의 높은 정제율을 얻었으나 polyacrylamide gel electrophoresis 결과에서 calf brain에서 처럼 단일 band를 얻지는 못했다.

정제 과정중 시료의 농축에 있어서 lyophilization, ammonium sulfate 처리에 의한 salting out 방법으로 수득율이 저조하였으며 dialysis membrane과 polyethylene glycol 6,000을 이용하는 것보다는 Diaflo membrane을 사용한 ultrafiltration 방법이 가장 좋은 결과를 가져왔다.

효소의 농도 변화에 따른 활성도의 변화를 보인 Fig. 5와 같이 sigmoidal curve를 나타내므로 효소의 cofactor의 존재를 가정할 것은 DEAE-cellulose chromatography한 후 농축하기 위한 ultrafiltration 과정 중에서 Diaflo membrane을 통과한 용액과 용기 내에 남아 있는 농축액을 일정 비율로 혼합하여 정제수 또는 Buffer A로 혼합한 것과 효소의 활성도를 비교 측정할 결과는 상당한 차이를 나타냄으로써 더욱 cofactor의 존재를 추정할 수 있었다.

Protein methylase I의 molecular weight는 rat thymus에서 15만, chick embryo fibroblast에서 35만, krebs II ascites cell에서 50만, calf brain에서 150만 dalton을 각각 나타내었으나 hog pancreas에서는 sephadex G-100과 G-200의 chromatography에서 void volume에서 효소가 용출되므로 80만 dalton 이상으로 사료되며 이는 subunit의 polymerization, protein의 aggregated form 또는 enzyme complex등이 추측된다.

효소의 optimum pH는 calf thymus, rat thymus 및 calf brain과 유사한 pH 7.2를 나타내었으며 알칼리성에서 최적 pH를 가지고 있는 rat

thymus nuclei, krebs II ascites cell, wheat germ (pH 8.1, 8.5, 9.0)과는 달랐다.

Protein methylase I의 substrate specificity는 명확히 밝혀져 있지는 않지만 동일한 효소가 histone과 MBP를 methylation 시킨다는 보고<sup>35)</sup>와 각각 다른 효소에 의한 것이라는 보문들이<sup>17,32,37,52,56)</sup> 있으며 MBP specific methyltransferase에 관한 연구<sup>17,29,32,40)</sup>가 있고 histone specific 효소가 식물 조직에서 보고된<sup>2)</sup> 바 있다. Table II와 같이 본 효소는 MBP를 비롯하여 다른 단백질을 전혀 기질로 사용하지 않으며 오직 histone type II-A만이 좋은 기질이므로 histone specific protein methylase I으로 사료된다.

SAM에 대한 효소의 Km value는  $1.32 \times 10^{-5}$  M이었으며 이는 calf thymus, chick embryo fibroblast ( $2.1 \times 10^{-5}$  ~  $3.8 \times 10^{-5}$  M) 보다 약간 낮고 rat brain, rat liver, wheat germ, calf brain ( $0.7 \sim 7.5 \times 10^{-6}$  M) 등에서 보다 높은 값을 나타내었다.

Protein methylases의 기질인 SAM의 공통적 competitive inhibitor인 SAH에 대한 dissociation constant는 Fig. 9와 같이  $1.52 \times 10^{-6}$  M을 얻었으며 chick embryo fibroblast의  $8 \times 10^{-6}$  M 보다 낮고 wheat germ, rat liver, krebs II ascites cell, calf brain ( $1.05 \sim 2.60 \times 10^{-6}$  M)과 유사한 결과를 나타내었으며 protein methylase I의 inhibition은 wheat germ에서 이 효소를 정제하는 도중에 natural protein methylase inhibitor의 존재를 확인하였으며 이 inhibitor는 calf brain에서 정제한 protein methylase I보다 wheat germ enzyme에 더욱 강력한 inhibition을 나타내며 이것을 adenosine으로 추정하였다.<sup>32)</sup> 또한 rat liver의 microsomal fraction에서 순수 정제된 protein methylase inhibitor는 protein methylase I, II, III 및 phospholipid methyltransferases에 대해서도 inhibition을 보이고 있으며<sup>57)</sup> 그의 SAH, synthetic SAH analogues와 sinefungin등이 inhibitor로서 보고되었다.<sup>58,59)</sup> 고로 앞으로는 protein methylase inhibitor의 생화학적 의미에 대하여 아직까지 연구 보고된 바 없으나 protein methylase들의 생화학적 기능이 점차 명백

해집에 따라 protein methylase inhibitor의 존재의의에 대한 연구가 보다 용이하게 진행될 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 돼지 췌장을 cell fractionation 후 DEAE-cellulose, sephadex G-100 및 sepharose 4B column chromatography 등의 방법으로 protein methylase I (S-adenosyl-L-methionine: protein-arginine N-methyltransferase; EC 2.1.1.23)을 분리 정제하고 이 효소의 성질을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

① 돼지 췌장으로 부터 substrate specificity를 나타내는 histone type II-A specific protein methylase I을 10.8%의 수득률로 216.8배 정제하였다.

② 효소의 molecular weight는 800,000 dalton 이상이였다.

③ Polyacrylamide disc gel electrophoresis에서 2개의 band를 보였다.

④ 효소의 optimum pH는 7.2이였다.

⑤ 효소의 농도 변화가 활성도에 미치는 영향에서 sigmoidal curve를 나타내었다.

⑥ 효소의 활성도는 ionic strength의 증가에 따라 감소하여 ammonium sulfate 100mM 농도에서 42% 감소를 보였다.

⑦ 효소는  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $2^{\circ}\text{C}$ 에서 30시간 후 각 51%, 14%의 활성도 감소를 나타내었다.

⑧ 효소의 S-adenosyl-L-methionine에 대한 Km은  $1.32 \times 10^{-5}$  M이며  $V_{\max}$ 는 108.70 pmole/min./mg이였다.

⑨ 효소의 S-adenosyl-L-homocysteine에 대한 Ki value는  $1.52 \times 10^{-6}$  M이였다.

## 감사의 말씀

본 연구의 일부는 성대약대 부설 약학연구소의 보조로 이루어 졌기에 감사드리는 바입니다.

## 문 헌

- 1) Ambler, R.P. and Rees, W.M.: *Nature*, **184**, 56

- (1956).
- 2) Murray, K.: *Biochemistry* 3, 10 (1964).
  - 3) Paik, W.K. and Kim, S.: *Science* 174, 114 (1971).
  - 4) Paik, W.K. Kim, S. and Lee, H.W.: *Biological Methylation and Drug Design* (Borchart, R.T. Creveling, C.R. and Ueland, P.M. Ed.), The Human Press Inc., Clifton, New Jersey, 16 (1986).
  - 5) Paik, W.K. and Kim, S.: *In Post-synthetic Modification of Macromolecule* (Antoni, F. and Fargo, A. Ed.), FEBS, 34, 127, North-Holland/American Elsevier (1975).
  - 6) Tidwell, T. Alfrey, V.G. and Mirsky, A.E.: *J. Biol. Chem.* 243, 707 (1968).
  - 7) Borun, T. Pearson, D. and Paik, W.K.: *J. Biol. Chem.* 247, 4288 (1972).
  - 8) Lee, H.W. Paik, W.K. and Borun, T.W.: *J. Biol. Chem.* 248, 4194 (1973).
  - 9) Adler, J. and Dahl, M.M.: *J. Gen. Microbiol.* 46, 161 (1967).
  - 10) Armstrong, J.B.: *Can. J. Microbiol.* 18, 1695 (1972).
  - 11) Gagnon, C. Viveros, O.H. Diliberto, Jr. E.J. and Axelrod, J.: *J. Biol. Chem.* 253, 3778 (1978).
  - 12) Burgess-Cassler, A. Ullah, A.H.J. and Ordal, G. W.: *J. Biol. Chem.* 257, 8412 (1982).
  - 13) VanDerWerf, P. and Koshland, D.E.: *J. Biol. Chem.* 252, 2793 (1977).
  - 14) Baldwin, G.S. and Carnegie, P.R.: *Science* 171, 579 (1971).
  - 15) Jabcoson, W. Gandy, G. and Sidman, R.L.: *J. Pathol.* 109, P.xiii (1973).
  - 16) Paik, W.K. and Kim, S.: *Biochim. Biophys. Acta* 313, 181 (1973).
  - 17) Crang, A.J. and Jacobson, W.: *J. Neurochem.* 39, 244 (1982).
  - 18) Labadie, J.H. Dunn, W.A. and Aranson, N.N.: *Biochem. J.* 160, 85 (1976).
  - 19) Paik, W.K. Nochumson, S. and Kim, S.: *Trends in Biochemical Science* 2, 159 (1977).
  - 20) Coix, R.A. and Hoppel, C.L.: *Biochem. J.* 136, 1083 (1973).
  - 21) Diliberto, Jr. E.J. and Axelrod, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1701 (1974).
  - 22) Janson, C.A. and Clarke, S.: *J. Biol. Chem.* 255, 24, 11640 (1980).
  - 23) O'Dea, R.F. Viveros, O.H. Axelrod, J. Aswanikumar, S. Schiffman, E. and Corcoran, B.A.: *Nature* 272, 462 (1978).
  - 24) Polastro, E. Deconick, M.M. Devogel, M.R. Mailer, E. Looze, Y. Schneck, A.G. and Leonis, J.: *FEBS Letter* 86, 17 (1978).
  - 25) Delange, R.J. Glazer, A.N. and Smith, E.L.: *J. Biol. Chem.* 245, 3325 (1970).
  - 26) Dimaria, P. Polastro, E. Delange, R.J. Kim, S. and Paik, W.K.: *J. Biol. Chem.* 254, 4645 (1976).
  - 27) Trayer, I.P. Harris, C.I. and Perry, S.V.: *Nature* 217, 452 (1968).
  - 28) Pike, M.C. Kredick, N.M. and Snyderman, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 76, 2922 (1979).
  - 29) Paik, W.K. and Kim, S.: *J. Biol. Chem.* 243, 2108 (1968).
  - 30) Kakimoto, Y. and Akazawa, S.: *J. Biol. Chem.* 245, 5751 (1970).
  - 31) Paik, W.K. Lee, H.W. and Lawson, D.: *Exp. Geront.* 6, 271 (1971).
  - 32) Gupta, A. Jensen, S. Kim, S. and Paik, W.K.: *J. Biol. Chem.* 257, 9677 (1982).
  - 33) Farooqui, J.Z. Tuck, M. and Paik, W.K.: *J. Biol. Chem.* 260, 537 (1985).
  - 34) Gallwitz, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 650 (1971).
  - 35) Jones, G.M. and Carnegie, P.R.: *J. Neurochem.* 23, 1231 (1974).
  - 36) Baxter, C.S. and Byvoet, P.: *Cancer Res.* 34, 1418 (1974).
  - 37) Lee, H.W. Kim, S. and Paik, W.K.: *Biochemistry* 16, 78 (1977).
  - 38) Casellas, P. and Jeanteur, P.: *Biochim. Biophys. Acta* 519, 243 (1978).
  - 39) Enouf, J. Lawrence, F. Tempete, C. Gero, M.R. and Lederer, E.: *Cancer Res.*, 39, 4497 (1979).
  - 40) Kim, S. Kim, M. Campagnoni, A.T. and Paik, W.K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 468 (1984).
  - 41) Durban, E. Nochumson, S. Kim, S. Paik, W.K.



- and Chan, S.K.: *J. Biol. Chem.* **253**, 1427 (1978).
- 42) Strittmatter, W. Gagnon, C. and Axelrod, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **207**, 419 (1978).
- 43) Povilaitis, V. Gagnon, C. and Heister: *Am. J. Physiol.* **240**, G-199 (1981).
- 44) Unger, C. Jahn, R. and Soling: *FEBS* **123**, 211 (1981).
- 45) Adhip, P.N.M. Gwendolyn, A.D. Micael, A.D. and Micael, C.G.: *Am. J. Physiol.* **248**, G-158 (1985).
- 46) Campillo, J.E. and Ashcraft, S.J.H.: *FEBS* **138**, 71 (1982).
- 47) Povilaitis, V. Gagnon, C. and Heister, S.: *Am. J. Physiol.* **240**, G-199 (1981).
- 48) Paik, W.K. and Kim, S.: *Advanced in Enzymology* (Meister, A. Ed.), John Wiley and Sons, New York, **42**, 227 (1975).
- 49) Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 50) Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.: *Method in Enzymology* **31**, 43, (1974).
- 51) Hames, B.D.: *Gel Electrophoresis of Proteins* (Hames, B.D. and Rickwood, D., Ed.), IRL Press Oxford Washington DC (1981).
- 52) Miyake, M. and Kakimoto, Y.: *J. Neurochem.* **30**, 859 (1973).
- 53) Paik, W.K. Kim, S. and Lee, H.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 933 (1972).
- 54) Lee, H.W. and Paik, W.K.: *Biochim. Biophys. Acta* **277**, 107 (1972).
- 55) Paik, W.K. Lee, H.W. and Morris, H.P.: *Cancer Research* **32**, 37 (1972).
- 56) Crang, A.J. and Jacobson, W.: *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 611 (1980).
- 57) Hong, S.Y. Lee, H.W. Desi, S. Kim, S. and Paik, W.K.: *Eur. J. Biochem.* **156**, 779 (1986).
- 58) Borchardt, R.T. and Pugh, C.S.F.: *Transmethylation* (Usdin, E. Ed.), Elsevier/North-Holland 197 (1979).
- 59) Roberto-Gero, M. Blanchard, P. Lawrance, F. Pierre, A. Vuilhorgne, M. and Lederer: *ibid.* **207** (1979).
- 60) Cantoni, G.L. Richards, H.C. and Chiang, P.K.: *ibid.* **155** (1979).