

닭 췌장 Protein Methylase II의 분리정제 및 성질

유태무 · 남궁석민 · 홍성렬* · 이향우
성균관대학교 약학대학, 농과대학 유전공학과*

(Received October 4, 1991)

Protein Methylase II from Chicken Pancreas: Purification and Properties

Tae Moo Yoo, Suck Min Namkoong, Sung Youl Hong* and Hyang Woo Lee
College of Pharmacy and Department of Genetic Engineering*
College of Agriculture, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract—Protein methylase II (S-adenosyl-L-methionine:protein carboxyl-O-methyltransferase; EC 2.1.1.24, PM II) was purified from chicken pancreas by subcellular fractionation, DEAE-cellulose chromatography, QAE-Sephadex A-50 chromatography, Sephadex G-75 chromatography, and Sephadex G-75 rechromatography. The purified PM II gave a single band upon polyacrylamide gel electrophoresis both in the presence of SDS and in Tris glycine buffer without SDS. The pI value of purified PM II was identified as 5.7 on isoelectric focusing gel. Properties and activities of PM II were studied and the following results were obtained. 1) PM II from chicken pancreas was purified approximately 221-fold with a yield of 1.3%. 2) The purified PM II appear constituted of a single polypeptide chain of a molecular weight 46,800 daltons. 3) Hemoglobin exhibited the highest of methyl-accepting activity among the substrates tested. 4) The purified PM II has a K_m of 4.67×10^{-6} M and a V_{max} of 37.5 pmoles of methyl- 14 C/min./mg enzyme for SAM- 14 CH $_3$ as methyl donor in the presence of histone type II-As. 5) It is found that S-adenosyl-L-homocysteine is a competitive inhibitor for PM II with K_i value of 3.23×10^{-5} M.

Keywords □ Protein methylase II, non-denaturing gel electrophoresis, hemoglobin, pI, K_m , K_i , V_{max} .

Protein methylase II (PM II)는 자연계에서 광범위하게 존재하는 효소로서,¹⁾ Clarke에 의하여 methyl acceptor에 따라 3가지 주 계열로 분류되었다.²⁾ 첫 번째 계열(제 1형)(EC number 2.1.1.24)은 chemotactic bacteria에서 chemoreceptor에 존재하는 특정 L-glutamic acid 잔기를 glutamyl side chain methyl esters로 변형시켜³⁾ chemotaxis 반응을 조절하며,⁴⁾ 두 번째 계열(제 2형)(EC number 2.1.1.77)은 변형된 D-aspartyl⁵⁾과 L-isoaspartyl 잔기⁶⁾의 carboxyl기를 methyl화시켜 변형되었거나 혹은 손상된 단백질을 수복시키거나 분해시키는 반응에 관계하는 것으로 보고되었다.⁷⁾ 세 번째 계열(제 3형)의 효소는 특히 최

근 새롭게 밝혀지고 있는 group으로써 methyl화된 peptide인 yeast sex factor⁸⁾로부터 밝혀져 여러 막에 관련된 단백질의 C-말단 부위의 cysteine 잔기의 α -carboxyl기를 methyl화시켜 안정한 methyl화된 단백질을 형성하는 것으로 알려지고 있는 바,⁹⁾ 포유동물의 ras oncogene products^{10,11)}와 뇌에 존재하는 G-protein의 γ subunit^{12,13)}의 methylation이 그 대표적인 예라고 하겠다. PM II의 세포내 역할로는 bacterial chemotaxis^{3,4)}가 관련됨이 밝혀진 이래, 진정 핵세포의 chemotaxis,¹⁴⁾ 선분비과정,^{15,16)} calmodulin 의존성 효소의 조절,¹⁷⁾ 손상된 단백질의 수복,^{7,18)} 세포분화¹⁹⁾ 및 *Torpedo* electric organ의 acetylcholine receptor

조절²⁰⁾ 등 세포내 여러 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서 특히 뇌하수체 후엽, 부신 수질, 이하선 등의 내분비선과 외분비선에서 분비에 중요한 역할을 한다고 보고된 이래 protein carboxymethylation의 자극과 분비의 상호 관련성 여부에 많은 논란이 있어 왔다.²¹⁻²³⁾ 많은 연구자들에 의하여 protein carboxymethylation이 외분비에 관련되는 calmodulin의 구조적 변형에 관여함으로써 분비를 조절하고 있다고 주장되고 있으나 아직 확실히 밝혀지고 있지 않다.²⁴⁾

체조직에서 일어나는 체액 분비 기전과 PM II의 연관성을 규명하기 위해서는 체조직내 PM II를 순수 정제하여 그 성질을 밝히는 것이 PM II와 관련된 반응이 생리현상에 미치는 영향을 이해하는데 필수적이며, 또한 포유류에서 정제된 PM II와의 유사성을 비교 검색하는 것도 중요하리라 생각한다. 그러므로 본 실험에서는 닭 체조직으로부터 protein methylase II를 순수 분리 정제하였으며, 그 성질을 비교 검토하였다.

실험방법

기기 및 시약—S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine(specific activity : 56 mCi/mmmole in H₂SO₄, pH 2.5~3.5)(Amersham, U.K.), histone from calf thymus type II-As, collagenase from clostridium histolyticum type 1, myelin basic protein from bovine brain(Sigma Chemical Co., U.S.A.), gabexate mesilate(p-hydroxybenzoic acid ethyl ester 6-guanidino-hexonate monomethanesulfonate)(小野藥品, 日本)와 기타의 시약은 시판의 특급시약을 사용하였다.

기기로는 Liquid scintillation counter(1211 Rack-beta, LKB, U.S.A.), Electrophoretic apparatus(SE 600, Hoefer Scientific instrument, U.S.A.), Ultrafiltration equipment(8050, Amicon Corp., U.S.A.), Ultracentrifuge(L8-80M, Beckman, U.S.A.), High speed centrifuge(KR-20000T, Kubota, Japan), Tissumizer(SDT-1810, Tekmar, Germany), Phast system(LKB-Pharmacia, Sweden) 등을 사용하였다.

Protien methylase II 활성도 측정—Paik 등의²⁵⁾ 방법에 따라 방사선으로 표지된 SAM을 이용하여 두 가지 다른 방법으로 측정하였다. 첫번째 방법은 [me-

thyl-¹⁴C] SAM으로부터 trichloroacetic acid에 의해 침전되는 기질 단백질로 전이된 radioactivity의 양을 측정하였으며, 두번째 방법은 methylation이 아미노산 잔기의 carboxyl기에서 일어났다는 것을 입증하기 위해 효소에 의하여 생성된 methyl ester가 알칼리성에서 불안정한 성질을 이용하였다. 즉, 반응생성물을 알칼리성 용액에서 가수분해시켜 생성된 radioactive methanol을 isoamyl alcohol을 이용하여 추출하여 측정하였다.

단백질의 정량—Lowry 방법²⁶⁾에 의해 bovine serum albumin(Fraction V)을 표준단백질로 하여 측정하였다.

효소의 정제—모든 조작은 4°C에서 행하였다. 도계장(대한 브로일러, 성남)에서 가져온 신선한 육계용 닭(*Arbor Acres* 종) 체장을 -20°C에서 보관하였다가 사용하였다. 닭 체장 15g(3~4개)을 취해 세절한 다음 냉각된 0.3 M sucrose 용액(5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 0.5 M gabexate mesilate 포함) 4 volume(w/v)으로 균질화하여 10,000 ×g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 ultracentrifuge로 105,000 ×g에서 1시간 원심분리하여 cytosol 분획을 얻어 이를 효소원으로 하여 정제하였다. DEAE-cellulose column(1.8 × 25 cm)을 5 mM sod. phosphate buffer, pH 6.2, 5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 240 μM gabexate mesilate, 10% glycerol(v/v)로 평형시킨 후, cytosol 분획(42 ml)을 0.02 N NaOH로 pH 6.2로 조정하여 loading한 후 50 ml/hr의 유속으로 용출하여 각 분획(3 ml)을 PM II 활성도를 측정하여 활성도가 높은 분획을 모았다. 시료에 ammonium sulfate를 시료 1/당 430g의 비율로 얼음조에서 교반하면서 소량씩 첨가한 후 1시간 동안 교반하였다. 이 용액을 37,000 ×g에서 원심분리하여 얻은 침전을 buffer A(20 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 240 μM gabexate mesilate, 10% glycerol(v/v))에 용해하여 15 시간 동안 dialysis한 후, buffer A에서 glycerol을 제거한 buffer(buffer B)에서 3시간 동안 더 dialysis하였다. Dialysis한 시료 3.5 ml(단백질량 75 mg)을 buffer B로 평형시킨 QAE-Sephadex A-50 column(1.8 × 10 cm)에 loading한 후 약 50 ml/hr의 유속으로 하여 buffer B로 충분히 세척한 후 0.1 M NaCl/buffer b, 0.5 M NaCl/buffer B로 step-wise elution하여 PM

II 활성도가 높은 분획을 모든 다음 YM 10 Diaflo membrane(직경 43 mm)을 사용하여 ultrafiltration한 후 Sephadex G-75 column(0.8×85 cm)에 loading하고 buffer A를 24 ml/hr의 유속으로 통과시켜, 용출하여 PM II 활성도가 높은 분획을 모았다. 이 시료를 ultrafiltration하여 2.0 ml(단백질량 0.3 mg)로 농축하여 rechromatography로 다시 Sephadex G-75 column(0.8×85 cm)에 loading하고 buffer A를 24 ml/hr의 속도로 용출하여 한 분획당 3 ml씩 취하여 PM II 활성도가 높은 분획을 취하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis—정제된 protein methylase II의 분자량 및 순도를 조사하기 위해 Laemmli 방법²⁷⁾을 변경한 SDS-PAGE 방법을 사용하였다.

Nondenaturing gel electrophoresis—정제된 PM II를 gel electrophoresis상에서 확인하기 위하여 실시하였다. 모든 조작은 SDS-PAGE의 조작과 동일하고 다만, 각 시약 중 SDS와 2-mercaptoethanol을 제외하고 사용하였다. 정제한 PM II 분획을 동결 건조하여 200 μl의 정제수로 녹여 11% polyacrylamide slab gel에 각 well당 50 μl씩 loading하였다. 시료를 molecular weight standards와 함께 4℃에서 25 mA로 8 시간 동안 전기영동한 후, gel의 일부를 잘라 염색시키고, 나머지 gel을 3 mm씩 잘라, 각각 시험관에 넣고, 5 mM sod. phosphate buffer, pH 6.2(10% glycerol, 5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 240 μM gabexate mesilate 포함)를 300 μl 가하여 Teckmar Tissumizer를 이용하여 균질화시킨 후, 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 취해, 각 gel에서 용출된 시료 75 μl 및 SAM-¹⁴CH₃(0.877×10⁻⁵ M) 100 μl를 사용하여 30분간 incubation하여 PM II 활성도를 측정하였다.

Isoelectric focusing—PM II의 isoelectric point를 측정하기 위해 LKB-Pharmacia제의 Phast-system을 이용한 Phast Gel IEF 3-9(pH range 3 to 9) gel에서 실시하였고, 염색은 Heukeshoven 등²⁸⁾의 방법으로 silver staining을 하였다.

실험결과

효소의 정제

Subcellular distribution—닭 췌장 15g에 0.3 M su-

Table I—Distribution of protein methylase II in chicken pancreas¹⁾

Fraction	Total Protein (mg)	Specific Activity ²⁾ (units/mg)	Total Activity (unit)	Yield (%)
Whole Homogenate	1705.4	1.66	2831.0	100
760×g ppt.	171.4	0.66	172.0	6.1
6,000×g ppt.	396.8	0.39	154.8	5.5
10,000×g ppt.	354.9	0.32	113.6	4.0
105,000×g ppt.	114.5	0.51	58.4	2.1
Cytosol	433.8	3.17	1375.5	48.6

¹⁾15g of chicken pancreas was used.

²⁾Specific Activity is represented as pmoles of S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine incorporated into mg enzyme protein per minute.

crose 용액 4 volume.으로 균질화하여 760×g로 10분, 6,000×g로 15분, 10,000×g로 20분, 105,000×g로 60분간 원심분리한 결과, 각 단계의 PM II의 활성도는 Table I과 같이 각 침전물에서는 매우 낮은 활성도를 보였고, 105,000×g의 상등액에서 whole homogenate의 48.9%의 활성도를 보였다. 따라서 닭 췌장에서 PM II의 세포내 분포도는 cytosol에서 제일 높았으며, cytosol을 효소원으로 하여 정제하였다.

DEAE-cellulose chromatography—cytosol 분획(42 ml)을 DEAE-cellulose column에 통과시킨 결과, DEAE-에 결합하지 않은 부분인 11~34번 분획에서 PM II 활성도가 높아 이 분획을 모았다. 이 시료의 비활성도는 4.96 units/mg protein, 수득률은 28.5%이었다.

QAE-Sephadex A-50 chromatography—65% (NH₄)₂ SO₄ 처리로 얻은 침전을 dialysis하여 QAE-Sephadex A-50 column에 통과시킨 결과 QAE-에 결합하지 않은 부분인 31~35번 분획에서 PM II 활성도가 높아 이 분획을 모았다. 이 시료의 비활성도는 63.53 unit/mg protein, 수득률은 5.7%이었다(Fig. 1).

Sephadex G-75 chromatography—전 단계에서 얻은 효소 분획을 ultrafiltration하고 Sephadex G-75 chromatography하여 PM II 활성도가 높은 분획인 17~22번까지 모았다. 이 시료의 비활성도는 270.62 units/mg protein, 수득률은 3.7%이었다.

Sephadex G-75 rechromatography—전 단계에서 얻은 효소 분획을 ultrafiltration하여 2 ml로 농축시킨 후 Sephadex G-75 column에 loading하여 용출시킨

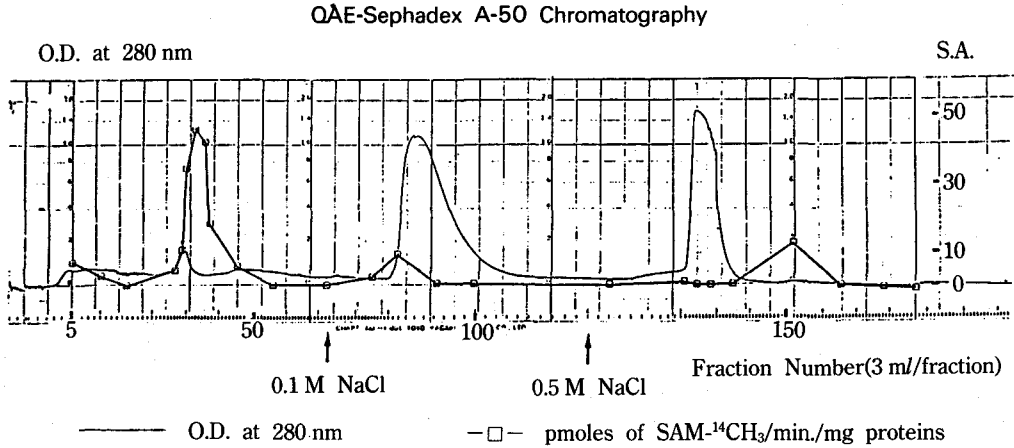


Fig. 1—Chromatography of protein methylase II on QAE-Sephadex A-50 column. The dialysate (3.5 ml) of the 65% ammonium sulfate precipitate of fraction obtained from DEAE-cellulose chromatography was applied to QAE-Sephadex A-50 column (1.8×10 cm). And the column was washed with 20 mM Tris, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, and 240 μM gabexate mesilate, and eluted with a step-wise 0.1 M and 0.5 M NaCl gradient in the buffer at a flow rate of 50 ml per hr. The fractions (3 ml) were analyzed for protein (—) and for the activities of protein methylase II (—□—).

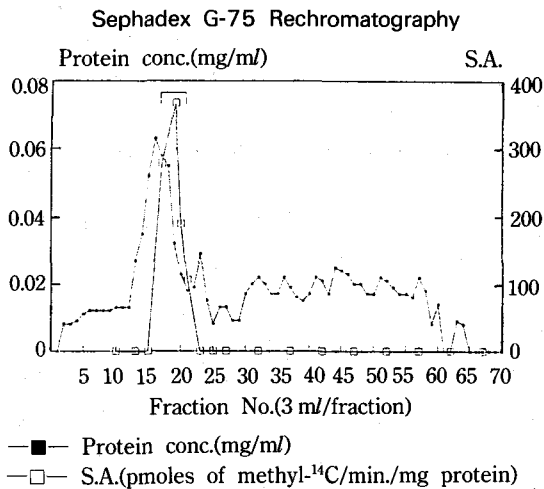


Fig. 2—Rechromatography of protein methylase II on Sephadex G-75 column. The concentrated sample (2 ml) using ultrafiltration of pooled eluate with PM II activity from 1st Sephadex G-75 column was applied to Sephadex G-75 column (0.8×85 cm) and eluted with 20 mM Tris, pH 8.0, containing 5 mM EDTA, 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 240 μM gabexate mesilate, and 10% glycerol at a flow rate of 24 ml per hr. The fractions (3 ml) were analyzed for protein (—■—) and for the activities of protein methylase II (—□—).

후, PM II 활성도가 높은 19번 분획을 취하였다. 시료의 비활성도는 366.97 units/mg protein, 수득물은 1.3%이었다(Fig. 2).

각 단계의 정제도와 비활성도를 Table II에 나타내었다.

효소의 분자량 및 순도 확인

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis—분리 정제된 PM II의 SDS-PAGE한 결과 Rf값이 0.452의 단일 band를 나타내어 순수하게 정제되었음을 알 수 있으며 본 효소는 약 46,800 dalton의 분자량을 갖는 monomer로 추정되었다(Fig. 3).

Nondenaturing gel electrophoresis—분리 정제된 PM II의 nondenaturing gel electrophoresis의 결과는 Fig. 4와 같다. slab gel을 3 mm씩 잘라 PM II 활성도를 측정 한 결과 10번째 slice(이동거리 3.0~3.3 cm 사이)인 band에서 활성도를 보여, 정제한 단백질이 PM II임을 확인하였다.

Isoelectric focusing—분리 정제된 PM II의 pI가 5.7임을 알 수 있었다.

효소의 성질

pH 변화가 효소의 활성에 미치는 영향—Histone type II-As를 기질로 하여 pH 3.0~pH 10.7 사이에서

Table II—Purification of protein methylase II from chicken pancreas¹⁾

Preparation	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (unit/mg enzyme)	Total Activity ²⁾ (units)	Purification Fold	Yield (%)
Homogenate	57.0	29.920	1705.44	1.66	2831.03	1.00	100.0
Cytosol	42.0	10.330	433.86	3.17	1375.34	1.91	48.6
DEAE-Cellulose	70.5	2.310	162.86	4.96	807.76	2.99	28.5
QAE-Sephadex A-50	20.0	0.126	2.52	63.53	160.10	38.27	5.7
Sephadex G-75	30.0	0.013	0.39	270.62	105.54	163.02	3.7
2nd Sephadex G-75	3.0	0.032	0.10	366.97	36.70	221.07	1.3

¹⁾15g of chicken pancreas was used.

²⁾Total enzyme activity is represented as pmoles of S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] methionine incorporated per minute.

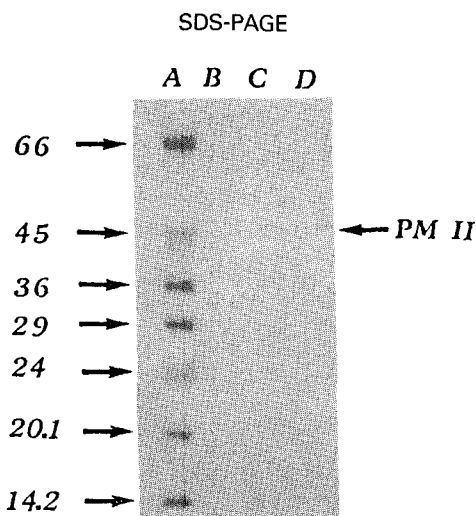


Fig. 3—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of chicken pancreas protein methylase II. The purified protein methylase II was electrophoresed on a 1.5 mm thick slab gel containing 4.5% (stacking gel) and 11% (separating gel) acrylamide in Tris-glycine buffer, pH 8.9, developed by Laemmli. Samples were prepared in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7) buffer containing 2.5% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol and 0.001% bromphenol blue as tracking dye. The mixture were then electrophoresed for 8 hrs at 25 mA. The gel was stained with coomassie blue and destained according to the method of Fair Bank *et al.* (Lane A) The molecular weight markers were bovine albumin (66,000 Da), egg albumin (45,000 Da), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000 Da), carbonic anhydrase (29,000 Da), trypsinogen (24,000 Da), trypsin inhibitor (20,100 Da), α -lactalbumin (14,000 Da). (Lane B, C, and D) Gel patterns of the purified chicken pancreas protein methylase II.

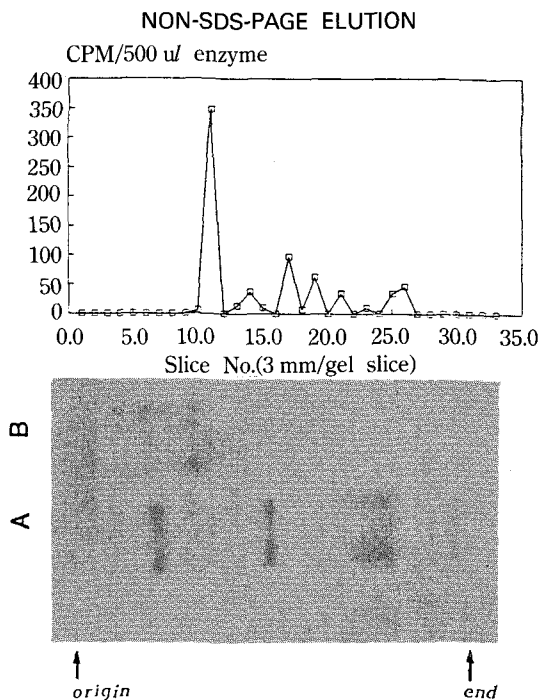


Fig. 4—Nondenaturing gel electrophoresis of purified protein methylase II. Protein methylase II obtained from Sephadex G-75 chromatography was electrophoresed on 11% polyacrylamide gel as detailed in methods section. The gel was then sliced into 3-mm sections and PM II activity determined. The molecular weight markers were bovine albumin (66,000 Da), egg albumin (45,000 Da), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000 Da), carbonic anhydrase (29,000 Da), trypsinogen (24,000 Da), trypsin inhibitor (20,100 Da), α -lactalbumin (14,000 Da). Lane 'A' indicated molecular weight markers and lane 'B' purified protein methylase II.

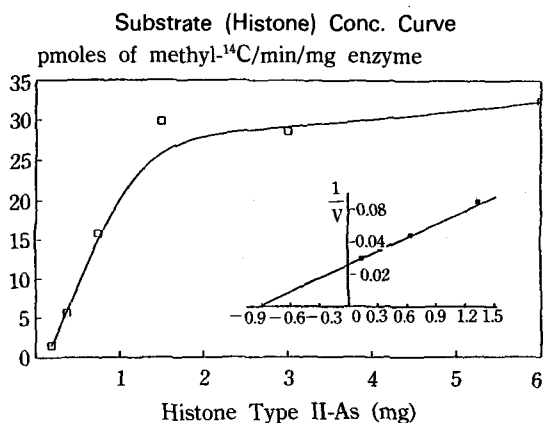


Fig. 5—Relationship between the amounts of histone type II-As and protein methylase II activity. The reaction mixture, containing 11 μ g of the purified protein methylase II and histone type II-As was incubated under the conditions described in the method's section. Amounts of histone type II-As were varied from 0.183 mg to 6.0 mg.

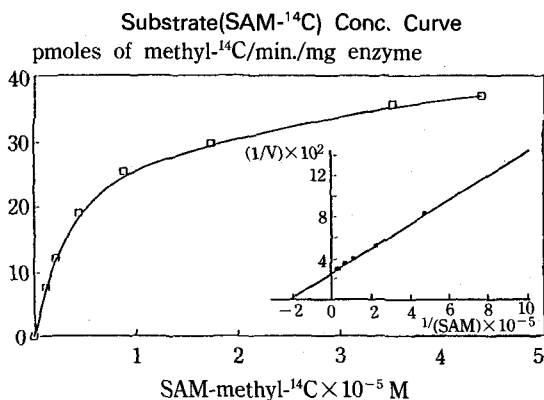


Fig. 6—Effect of SAM concentration on the protein methylase II activity. The reaction mixture, containing 11 μ g of the purified protein methylase II and 1.5 mg histone type II-As was incubated under the conditions described in the method's section. Amounts of SAM-methyl- 14 C were used from 2.19×10^{-4} M to 5.48×10^{-6} M.

PM II의 활성도 변화를 나타내었다. 이 결과에 의해 분리정제된 PM II의 최적 pH는 6.0이었다. pH 10.0과 pH 10.7에서 상당히 높은 활성도를 보였으나, 이는 최적 pH라기 보다는 다른 원인에 의한 것이라고 생각된다.

Histone type II-As의 농도변화가 효소의 활성에

Table III—Substrate protein specificity for PM II from chicken pancreas

Substrate protein ¹⁾	Specific Activity ²⁾ (unit/mg enzyme)	Relative Activity
Histone type II-As (Calf thymus)	47.80	100
Collagenase	0.00	0.00
γ -Globulin (Bovine)	62.64	131.05
Hyaluronidase	28.23	59.06
Myelin basic protein (Bovine brain)	63.30	132.43
Ribonuclease A	36.28	75.90
Bovine albumin	9.19	19.23
Cytochrome c (Bovine heart)	2.47	5.17
Hemoglobin (Bovine)	233.68	488.87

The incubation and assay condition were the same as described in the method's section.

¹⁾Five milligrams of each substrate protein and 11 μ g of purified enzyme were used.

²⁾One unit is represented as pmoles of SAM- 14 CH₃ incorporated per min.

미치는 영향—SAM- 14 CH₃을 포화시킨 상태(4.386×10^{-5} M)에서 histone type II-As의 농도변화, 즉 0.188 mg~6 mg에 의한 효소의 활성도 변화는 Fig. 5와 같으며 효소의 V_{max} 는 histone type II-As 3.8 mg 이상 농도에서 일어났으며, K_m 은 1.1 mg이었다.

SAM- 14 CH₃ 농도변화가 효소의 활성에 미치는 영향—Histone type II-As의 포화상태(1.5 mg)에서 SAM- 14 CH₃의 농도변화에 의한 효소의 활성도 변화는 Fig. 6과 같으며 Lineweaver-Burk plot에 의해 닭 췌장의 protein methylase II에 대한 SAM- 14 CH₃의 K_m 치는 4.67×10^{-6} M이었으며 V_{max} 는 37.5 pmoles/min./mg protein이었다.

S-adenosyl-L-homocysteine(SAH)이 효소활성에 미치는 영향—PM II의 inhibitor인 SAH가 효소의 활성도에 미치는 영향을 Lineweaver-Burk plot에 의해 살펴본 결과 기질인 SAM 대하여 상경적 저해를 나타내었으며 이것을 SAH 농도에 의한 slope의 변화를 secondary plot한 결과 효소의 SAH에 대한 dissociation constant는 3.23×10^{-5} M이었다.

기질 특이성—Histone type II-As를 기질로 하였을 때 효소활성도를 100으로 하여 hemoglobin 및 수종

단백질과 비교하여 본 결과 Table III에서와 같이 여러 기질에 대하여 광범위하게 작용하였다. Collagenase, cytochrome c 및 bovine serum albumin은 좋은 기질로 작용하지 못하는 반면, γ -globulin과 myelin basic protein은 약 130이었으며, 특히 hemoglobin은 489로써 약 5배 가량 높은 값을 나타내어 histone보다도 훨씬 좋은 기질로 밝혀졌다.

고 찰

닭 채장으로부터 DEAE-cellulose 음이온 교환수지, ammonium sulfate 침전법, QAE-Sephadex A-50 chromatography 그리고 Sephadex G-75 chromatography를 이용하여 PM II를 정제하였다.

최근까지 포유류에서 정제된 PM II의 일반적 특징을 종합하면 주로 cytosol에 존재하며, 광범위한 기질특이성, SAM 및 SAH에 대한 높은 친화성, 활성상태의 효소는 monomer 형태 등이 보고²⁹⁾되어 있으며, 분자량은 bovine brain,³⁰⁾ human erythrocyte,^{31,32)} rat erythrocyte,³³⁾ equine erythrocyte³⁴⁾ 등 대부분의 포유동물의 조직에서 24,000~26,000 dalton 정도이며, 예외로 ox brain³⁵⁾에서 35,000 dalton으로 보고되었다. 또한 식물인 wheat germ에서 41,000 dalton,³⁶⁾ 어류인 *Torpedo ocellata*에서 26~27 kDa과 29~30 kDa의 isozyme^{37,38)} 및 bacteria인 *Salmonella typhimurium*³⁾에서 33,000 dalton으로 보고되었다. 또한 포유동물에서 pI의 차이에 따라 pI 5.5~6.6의 isozyme들이 많이 발견되었다.

본 실험에서 정제한 PM II는 분자량이 46,800 dalton인 monomer이며, pI는 5.7, 기질에 대한 특이성은 광범위하였으나 특히 hemoglobin에 대해서는 높은 특이성을 보였다.

닭 채장에서 정제된 PM II와 포유류에서 정제된 PM II의 차이는 DEAE-cellulose와 같은 음이온 교환수지에 대한 결합력, 분자량 및 기질특이성이 다른 결과를 보였다. 음이온 교환수지에 대한 결합력의 차이에 대해 살펴보면, 닭 채장의 PM II는 pI치가 5.7임에도 불구하고 pH 8.0 20 mM Tris buffer에서 DEAE-cellulose 및 QAE-Sephadex A-50에 결합하지 않은 반면, 포유동물의 조직^{30,31,35)} 및 wheat germ³⁶⁾에서 정제한 PM II는 DEAE-column에 결합하였다. 그러나 어류인 *Torpedo electric* organ에서 분리된 PM

II³⁷⁾와 procaryotic PCM인 *Bacillus subtilis*에서 분리된 PM II는 DEAE-column에 결합하지 않았다. 이는 효소의 charged group이 3차구조의 표면에 노출되어 있지 않아 이온교환수지에 접근하기 어려워 그러한 결과가 나왔으리라 추측된다. 분자량을 비교하여 보면 포유동물 조직내 PM II의 대부분은 24,000~26,000 dalton 정도로 보고되었으나,³⁰⁻³³⁾ 닭의 채장으로부터 분리한 PM II는 46,800 dalton으로 상당히 큰 것으로 밝혀졌다. 흥미로운 점은 wheat germ에서 분리한 PM II의 분자량(41,000 dalton)³⁶⁾과 유사하였다. 기질특이성은 여러 source로부터 분리된 PM II와 상당한 차이를 나타내었다. 닭 채장으로부터 정제된 PM II는 histone type II-As보다 hemoglobin이 월등히 좋은 기질임이 밝혀졌으나(4.9배), human과 rat erythrocyte^{33,39,40)} 및 wheat germ³⁶⁾에서 정제된 PM II는 hemoglobin이 좋은 기질이 아니었다. Hemoglobin에 대한 기질특이성은 주목할만한 사실이며, subunit인 α -, β -globin에 대한 친화성 및 human을 비롯한 여러 source로부터 얻은 hemoglobin에 대해 많은 연구를 해야 할 것으로 생각된다.

보문⁴¹⁾에 의하면 PM II에 대한 K_m , V_{max} 는 model substrate로서 채장의 ribonuclease와 길이가 다른 7개의 peptide fragment에서 길이가 짧으면 짧을수록 K_m 치가 더욱 커지고, 반면 V_{max} 는 potential methyl-acceptor site수에 비례한다고 보고하였다. 본 실험에서 정제한 PM II의 SAM-¹⁴CH₃에 대한 K_m 치는 4.67×10^{-6} M [Histone type II-As : pH 6.0]이었으며 이는 human erythrocyte³³⁾ 1.72×10^{-6} M [γ -globulin : pH 6.0]와 calf thymus⁴²⁾ 1.54×10^{-6} M [Histone : pH 6.0]보다 높은 K_m 치를 보였고 calf thymus⁴²⁾ 7.7×10^{-6} M [porcine FSH : pH 6.0]보다 낮은 K_m 치를 보였다.

PM II의 기질인 SAM의 상경적 저해제인 SAH에 대한 dissociation constant는 Fig. 9와 같이 3.25×10^{-5} M을 얻을 수 있었으며 human erythrocyte⁵⁶⁾ 1.6×10^{-5} M과 *E. coli* 1.75×10^{-5} M보다 상당히 높았다. 따라서 SAH의 유도체인 sinefungin, A9145C 등 상경적 저해제 및 parachloromercuribenzenate, diazotetrazole, Woodward's reagent K(N-ethyl-5-phenyl-isoxazolium-3' sulfonate) 등에 의한 저해를 2-mercaptoethanol로 효소활성 복원성을 관찰함으로써 cysteine과 catalytic site와의 상호관계를 추정하여야 할 것이다.

앞으로 닭 채장에서 정제된 PM II를 이용하여 채조직내에 존재하는 기질을 확인하고 채조직을 구성하고 있는 acinar 세포 및 langerhans islet 세포(α , β -세포)를 분리배양 등을 통한 PM II의 세포내 분포도의 확인, 포유류내 PM II와의 유사성 측정, 여러 병변 상태에서의 변화에 대해 더 연구하면 채조직에서의 protein methylation의 역할에 대해 규명할 수 있으리라 사료된다.

결 론

닭 채장을 subcellular fractionation한 후 DEAE-cellulose chromatography, ammonium sulfate precipitation, QAE-Sephadex A-50 chromatography, Sephadex G-75 chromatography, Sephadex G-75 rechromatography의 단계를 통하여 protein methylase II (S-adenosyl-L-methionine : protein carboxyl-O-methyltransferase ; EC 2.1.1.24, PM II)를 정제하였으며, SDS-PAGE를 이용하여 순도를 확인 및 분자량 측정과 isoelectric focusing method로 pI를 측정후, 정제된 PM II의 성질 및 활성을 조사하였다.

1. 닭 채장에서부터 histone type II-As를 기질로 하여 약 221배 정제하였다.

2. SDS-PAGE로부터 추정된 효소의 분자량은 약 46,800 dalton의 monomer이었다.

3. Isoelectric focusing method로 측정된 pI는 5.7이었다.

4. 기질특이성을 확인한 결과 hemoglobin에 대하여 높은 친화성을 나타내었다.

5. 효소의 SAM- ^{14}C 에 대한 K_m 치는 4.67×10^{-6} M, V_{max} 는 37.5 pmoles of methyl- ^{14}C /min./mg enzyme이었다.

6. 효소의 S-adenosyl-L-homocysteine에 대한 K_i 치는 3.23×10^{-5} M이었다.

문 헌

- 1) Kleene, S.J., Toews, M.L. and Adler, J.: Isolation of glutamic acid methylester from an *Escherichia coli* membrane protein involved in chemotaxis, *J. Biol. Chem.* **252**, 3214 (1977).
- 2) Paik, W.K. and Kim, S.: *Protein methylation*, CRC

Press, Inc., Boca Raton, Florida, p.23 (1990).

- 3) Simms, S.A., Stock, A.M. and Stock, J.B.: Purification and characterization of the S-adenosylmethionine: Glutamyl methyl-transferase that modifies membrane chemoreceptor proteins in bacteria, *J. Biol. Chem.* **262**, 8537 (1987).
- 4) Stock, J. and Stock, A.: What is the role of receptor methylation in bacterial chemotaxis?, *Trends Biochem. Sci.* **12**, 371 (1987)
- 5) McFadden, P.N. and Clarke, S.: Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **79**, 2460 (1982).
- 6) Murray, E.D., Jr. and Clarke, S.: Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxymethyltransferase: Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues, *J. Biol. Chem.* **259**, 10722 (1984).
- 7) McFadden, P.N. and Clarke, S.: Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: Implications for the cellular repair of damaged proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 2595 (1987).
- 8) Ishibashi, Y., Sakagami, Y., Isogai, A. and Suzuki, A.: Structures of tremmerogens A-9291-I and A-9291-VIII: Peptidyl sex hormones of *Tremella brasiliensis*, *Biochemistry* **23**, 1399 (1984).
- 9) Stephenson, R.C. and Clarke, S.: Identification of a C-terminal protein carboxyl methyltransferase in rat liver membranes utilizing a synthetic farnesyl cysteine-containing peptide substrate, *J. Biol. Chem.* **265**, 16248 (1990).
- 10) Clarke, S., Vogel, J.P., Deschenes, R.T. and Stock, J.: The mammalian *ras* oncogene protein is modified by new types of carboxyl methylation reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 464 (1988).
- 11) Ota, I.M. and Clarke, S.: Enzymatic methylation of 23~29 KDa bovine retinal rod outer segment membrane proteins: Evidence for methyl ester formation at carboxyl-terminal cysteinyl residues, *J. Biol. Chem.* **264**, 12879 (1989).
- 12) Fung, B.K.K., Yamane, H.K., Ota, I.M. and Clark, S.: The γ subunit of brain G-proteins is methyl esterified at a C-terminal cysteine, *FEBS Lett.* **260**, 313 (1990).

- 13) Yamane, H.K., Farnsworth, C.C., Xie, H., Evans, T., Howald, W.N., Gelb, M.H., Glomset, J.A., Clarke, S. and Fung, B.K.K.: Membrane-binding domain of the small G protein G25K contains an S-(all-trans-geranylgeranyl)cysteine methyl ester at its carboxyl terminus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 286 (1991).
- 14) Hackett, S.F. and Campochiaro, P.A.: Implication of protein carboxymethylation in retinal pigment epithelial cell chemotaxis, *Ophthalmic Res.* **20**, 54 (1988).
- 15) Gagnon, C. and Heisler, S.: Protein carboxyl-methylation: role in exocytosis and chemotaxis, *Life Sci.* **25**, 993 (1979).
- 16) Diliberto, E.J., JR, Viveros, O.H. and Axelrod, J.: Subcellular distribution of protein carboxymethylase and its endogenous substrates in the adrenal medulla: Possible role in excitation-secretion coupling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 4050 (1976).
- 17) Borchardt, R.T., Olsen, J., Eiden, L., Showen, R.L. and Rutledge, C.O.: The isolation and characterization of the methyl acceptor protein from adrenal chromaffin granules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 970 (1978).
- 18) Clarke, S.: Protein carboxyl methyltransferase: Two distinct classes of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 479 (1985).
- 19) Gilad, B.B., Solomon, R., Menczer, J. and Kloog, Y.: High levels of protein carboxyl methyltransferase in well-differentiated human endometrial carcinoma, *FEBS Lett.* **228**, 277 (1988).
- 20) Yee, S.A. and McNamee, M.G.: Effects of carboxymethylation by a purified *Torpedo californica* methylase on the functional properties of the acetylcholine receptor in reconstituted membranes, *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 349 (1985).
- 21) Strittmatter, W.J., Gagnon, C. and Axelrod, J.: Beta adrenergic stimulation of protein carboxymethylation and amylase secretion in rat parotid gland, *J. Pharmacol. Exp. Therapeu.* **207**, 419 (1978).
- 22) Povilaitis, V., Gagnon, C. and Heisler, S.: Stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas: A role of protein carboxymethylation, *Am. J. Physiol.* **240**, G199 (1981).
- 23) Unger, C. and Jahn, R.: Is protein carboxymethylation involved in stimulus-secretion coupling?, *FEBS Lett.* **123**, 211 (1981).
- 24) Barten, D.M., O'Dea, R.F.: The function of protein carboxyl methyltransferase in eucaryotic cells., *Life Sciences.* **47**, 181 (1990).
- 25) Kim, S. and Paik, W.K.: *Adv. Enzymol.*, (A. Meister, ed.) *Protein Methylation: Chemical, enzymological and biological significance*, John Wiley and Sons, New York, 42, p. 227 (1975).
- 26) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-Phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 27) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680 (1970).
- 28) Heukeshoven, J. and Dernick, R.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis* **6**, 103 (1985).
- 29) Billingsley, M.L., Vellerti, P.A., Lovenberg, W., Kuhn, D., Goldenring, J.R. and Delorenzo, R.J.: Is Ca²⁺-calmodulin-dependent protein phosphorylation in rat brain modulated by carboxymethylation?, *J. Neurochem.* **44**, 1442 (1985).
- 30) Aswad, D.W. and Deight, E.A.: Purification and characterization of two distinct isozymes of protein carboxymethylase from bovine brain, *J. Neurochem.* **40**, 1718 (1983).
- 31) Ota, I.M., Gilbert, J.M. and Clarke, S.: Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L-isoaspartyl methyltransferase from human erythrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 1136 (1988).
- 32) Gilbert, J.M., Fowler, A., Bleibaum, J. and Clarke, S.: Purification of homologous protein carboxyl methyltransferase isozymes from human and bovine erythrocytes, *Biochemistry* **27**, 5227 (1988).
- 33) Kim, S.: S-adenosylmethionine: Protein-carboxymethyltransferase from erythrocyte, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 652 (1974).
- 34) Polastro, E.T., Deconinck, M.M., Devogel, M.R., Mailier, E.L., Looza, Y.B., Schnek, A.G. and Leonis, J.: Purification and some molecular properties of protein methylase II from equine erythrocytes,

- Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 920 (1978).
- 35) Iqbal, M. and Steenson, T.: Purification of protein carboxylmethylase from ox brain, *J. Neurochem.* **27**, 605 (1976).
- 36) Trivedi, L., Gupta, A., Paik, W.K. and Kim, S.: Purification and properties of protein methylase II from wheat germ, *Eur. J. Biochem.* **128**, 349 (1982).
- 37) Haklai, R. and Kloog, Y.: Purification and characterization of protein carboxyl methyltransferase from *Torpedo ocellata* electric organ, *Biochemistry* **26**, 4200 (1987).
- 38) Solomon, R., Katzir, O., Egozi, Y. and Kloog, Y.: Identification of two distinct protein carboxyl methyltransferase in eucaryotic cells, *FEBS Lett.* **241**, 131 (1988).
- 39) O'Connor, C.M.: Enhanced carboxyl methylation of membrane-associated hemoglobin in human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* **263**, 1386 (1988).
- 40) O'Connor, C.M. and Clarke, S.: Carboxyl methylation of cytosolic proteins in intact human erythrocytes: Identification of numerous methyl-accepting proteins including hemoglobin and carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.* **259**, 2570 (1984).
- 41) Kim, s. and Paik, W.K.: Studies on the structural requirement of substrate protein for protein methylase II, *Biochemistry* **10**, 3141 (1971).
- 42) Kim, s. and Paik, W.K.: Purification and properties of protein methylase II, *J. Biol. Chem.* **245**, 1806 (1970).