

단백질 메틸화효소류 및 S-아데노실-L-메치오닌 연결효소의 활성도에 미치는 사염화탄소-유발 간독성의 영향

남궁 석민 · 유태무 · 홍성렬* · 이향우#
성균관대학교 약학대학, 농과대학 유전공학과*

(Received January 16, 1992)

Effects of Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity on the Activities of Protein Methylases and SAM-Synthetase in Rat Liver

Suck Min Namkoong, Tae Moo Yoo, Sung Youl Hong* and Hyang Woo Lee#

Department of Biochemistry, College of Pharmacy and Department of Genetic Engineering*
College of Agriculture, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract—In order to test relationships between hepatotoxicity and transmethylation, activities of protein methylases and SAM (S-adenosyl-L-methionine)-synthetase were examined in liver tissues of rats treated with CCl₄. Also the concentrations of SAM and SAH were measured by HPLC in rat liver. The results are as follows. (1). Activities of protein methylases were not significantly changed in 24 hours after CCl₄ treatment. However, in 48 hours, activities of protein methylases were significantly increased in comparison with that of control. (2). Activity of SAM-synthetase was increased steadily in the time course after CCl₄ treatment. (3). S-adenosyl-L-methionine concentration of liver tissues in CCl₄-treated group was elevated in 24 hours, and then declined thereafter. But the SAH concentration was slightly decreased in the time course after CCl₄ treatment. These results indicate that SAM was very actively used in transmethylation reactions of CCl₄ damaged rat liver, suggesting the strong relationships between hepatotoxicity and transmethylation phenomena.

Keywords □ Protein methylase, SAM-synthetase, CCl₄, SAM, SAH, hepatotoxicity

Protein methylation은 posttranslational modification 반응의 하나로서,¹⁾ 지난 30여년간 생화학적 견지에서 많은 연구를 통해 methylation반응으로 생긴 단백질의 구조와 기능변화²⁾가 생체내 여러현상에 끼치는 영향들이 조금씩 밝혀져 왔다. 이러한 protein methylation현상은 procaryote에서 eucaryote까지 다양한 생물체에서 관찰되었으며 methyl donor로써 S-adenosyl-L-methionine을 이용하는 단백질 특이성, group 특이성 methyltransferase와 methylation양상에 따라 protein methylase I, II, III, IV 4가지로

분류할 수 있다.³⁾ 이들은 기질 단백질의 특정 아미노산 잔기에 대한 높은 특이성을 가지며, 이러한 protein methylation이 관계되는 생화학적 현상에는 현재까지 bacterial chemotaxis,^{4,5)} exocytosis,⁶⁻⁸⁾ gene regulation,^{9,10)} muscle contraction,¹¹⁾ electron transport,^{12,13)} 그리고 carnitine 생합성^{14,15)} 등에 관계된다고 알려져 왔다. 특히 protein carboxylmethyltransferase (protein methylase II)는 bacterial chemotaxis와 관련됨이 밝혀진 이래 손상된 protein의 repair mechanism에도 관여하며,^{16,17)} 최근에는 mammalian *ras* oncogene product¹⁸⁾와 brain G-protein의 γ subunit의 C-terminal cysteine residue의 α -carboxyl group이

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

methylation되어 있음이^{19,20)} 보고되고 있다.

Methylation반응에서 methyl donor로 사용되는 S-adenosylmethionine(SAM)은 포유동물의 거의 모든 조직에 분포되어 있으며²¹⁾ protein transmethylation 이외에도 polyamine biosynthesis, ethylene biosynthesis, transsulfuration의 조절,²²⁾ differentiation²³⁾에도 관여하는 것으로 알려져왔다. 또한 SAM-synthetase [ATP:L-methionine S-adenosyltransferase, EC 2.5.1.6]는 L-methionine과 ATP로부터 SAM의 생합성을 촉매하는 효소로서 분자량과 K_m value에 따라 α , β , γ 세가지의 동종효소형태로 존재^{24,25)}한다고 밝혀졌다.

현재까지 간장에서 transmethylation의 생화학적 작용에 관한 연구보고로는 Paik²⁶⁾ 등이 hepatoma에서 protein methylase I activity가 hepatoma의 성장속도와 일치함을 보고하였으며 Duerre²⁷⁾는 흰쥐 간장의 protein methylase II 활성도가 흰쥐의 성장과 일치하며 이 효소의 세포내 농도는 흰쥐의 연령에 의존적이라고 보고하였다. 또한 SAM-synthetase의 경우 Tsukada²⁸⁾ 등은 carcinogenesis도중 γ 체 동종효소는 증가하는 반면, α 와 β 체 동종 효소는 감소하며, 한편 인간의 간경화증에서는 이 효소 활성이 50%정도 감소²⁹⁾ 하는데, 이는 α 체 동종 효소량이 크게 감소한 때문이며 이에 반해 세포내 SAM의 농도는 이 대사산물의 세포내 이용감소로 인해 보상된다는 연구결과가 있다.

Carbon tetrachloride(CCl_4)는 실험적 간장해를 일으키는 약물³⁰⁾로서 체내의 mixed function (cytochrome P-450) oxidase system에 의해 생긴 $CCl_3 \cdot$ free radical이 간 microsome의 막 단백질 thiol기와 결합하여 막의 지질과산화 반응을 촉진하며³¹⁾ 간에서의 단백질 합성 억제, 간 glycogen량의 감소, 혈중으로의 GOT, GPT이탈을 일으키고, 조직학적으로는 간세포의 괴사 및 섬유화등을 일으키는 것으로 알려져있다.

이에 본 실험에서는 이와같은 연구보고를 바탕으로 하여 정상 흰쥐의 간장에서 연령별로 SAM과 SAM의 대사물질인 SAH(S-adenosylhomocysteine)의 농도분포를 살펴본 다음, CCl_4 를 사용하여 실험적으로 흰쥐에 hepatotoxicity를 유발시킨 후 protein methylases 및 SAM-synthetase활성도 변화를 검색하고, 동시에 간조직내의 SAM과 SAH의 농도변화를 HPLC로 분석하여 간기능 변화시 protein transmeth-

ylation에 미치는 영향에 관하여 고찰하고자 하였다.

실험방법

실험동물

체중 200~250g의 건강한 Sprague-Dawley계통의 웅성 흰쥐를 일정기간 cage내에서 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

시약

S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] methionine (specific activity: 56 mCi/mmole), L-[methyl-¹⁴C] methionine (specific activity: 56 mCi/mmole) (Amersham), Histone type II-As, 2,5-diphenyloxazole (PPO), 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOP), 1-octanesulfonic acid sodium salt (Sigma), P-81 ion exchange chromatography paper (Whatman), carbon tetrachloride (Duk San), GOT and GPT kit (Asan), 기타의 시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

기기

Liquid Scintillation Counter (1211 Rackbeta, LKB, U.S.A.), Spectrophotometer (SP-240, Shimadzu, Japan), High Speed Centrifuge (KR-20000T, Kubota, Japan), HPLC (501 Solvent Delivery System, 486 Tunable Absorbance Detector, U6K universal Injector, Waters, U.S.A)를 각각 사용하였다.

흰쥐 간장 조직내 연령별 SAM과 SAH의 농도

흰쥐 간장내 연령별 농도 분포 실험에서는 newborn, 1 week, 2 weeks, 4 weeks되는 흰쥐 간장을 적출한 후 각각 HPLC sample처리 과정을 거친후 HPLC분석을 하였다.

CCl_4 투여로 인한 간독성 유발

대조군은 corn oil을 5.0 ml/kg씩 1회 복강투여 하였으며 CCl_4 투여군은 1.0 ml/kg(in corn oil)씩 대조군과 동일한 방법으로 투여하여 간독성을 유발시켰다.

약물 투여후 간조직의 처리

CCl_4 투여후 24, 48시간 경과시 흰쥐를 단두시켜 실험시킨 후 간조직을 적출하여 냉각된 0.25 M sucrose 용액으로 깨끗이 씻고 수분을 제거하였다. 간조직 일부를 냉각된 0.25 M sucrose용액 9 volume(w/v)으로하여 teflon glass homogenizer로 균질화하고 Cinti 등의 방법³²⁾에 따라 subcellular fractionation을 한후 whole homogenate와 cytosol fraction을 protein

methylases와 SAM-synthetase활성도 측정을 위한 효소원으로 사용하였다.

SGOT 및 SGPT 활성도 측정

혈청중 SGOT 및 SGPT의 활성도는 Reitman-Frankel의 방법³³⁾에 의하여 측정하였으며 GOT, GPT kit를 사용하였다.

Cytochrome P-450 함량측정

Microsomal fraction중의 cytochrome P-450 함량측정은 Omura와 Sato의 방법³⁴⁾을 참조하고 Matsubara 등의 변법³⁵⁾에 준하여 측정하였다.

효소의 활성도 측정

1) **Protein methylases 활성도 측정**—Paik의 방법¹⁾에 따라 기질로써 histone type II-As, methyl donor로써 [methyl-¹⁴C]SAM을 사용하여 protein methylase I, II의 효소활성도를 측정하였다.

2) **SAM-synthetase 활성도 측정**—Geller등의 방법³⁶⁾에 의하여 측정하였다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.3), 20 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM ATP, 0.02 mM BSA, 0.02 mM [methyl-¹⁴C] methionine, 그리고 효소원을 함유하는 total volume 0.1 ml의 incubation mixture를 37°C에서 10분간 incubation 한 후 5 mM methionine을 함유하는 2 M HClO₄ 용액 20 μl를 가하고 빙욕상에서 냉각하여 반응을 정지시킨 후 1,000 × g에서 10분간 원심분리하여 침전을 제거하였다. 상등액 100 μl를 cellulose phosphate paper disc(직경 2.5 cm)에 점적하고 5 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 일정하게 세척하고 건조시킨 후 disc를 10 ml의 scintillation cocktail에 넣어 radioactivity를 측정하여 SAM-synthetase의 specific activity를 산출하였다.

단백질 정량

BSA를 standard protein으로 하여 Lowry 등의 방법³⁷⁾에 의하여 측정하였다.

SAM 및 SAH 농도측정

1) **HPLC sample 처리**—간조직 일부를 세절한 후 0.4 M HClO₄ 용액 2 volume(w/v)으로 하여 teflon glass homogenizer로 균질화한 후 9,000 × g, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 일정량을 0.45 μm filter unit를 사용하여 filtration 한 후 HPLC 정량에 사용하였다.

2) **HPLC 분석 조건**—Column은 μ-Bondapak C₁₈ (3.9 × 300 mm, i.d.)를 사용하였으며 이동상으로는

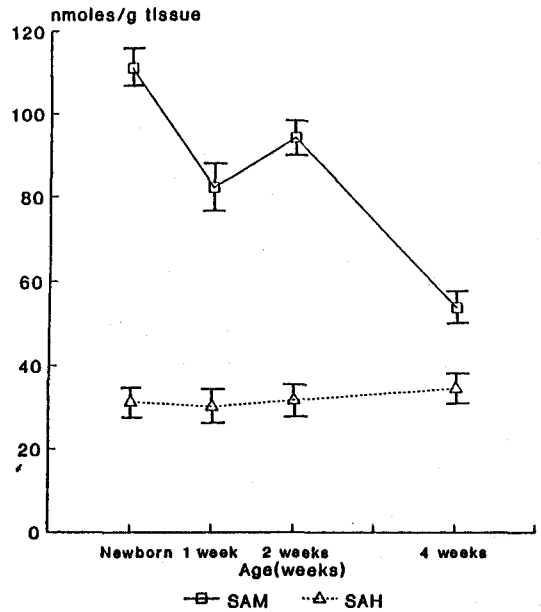


Fig. 1—Effect of age on the concentrations of SAM and SAH in rat liver.

5 mM 1-octanesulfonic acid를 함유한 20% methanol (pH 4.0)을 사용하였고 flow rate는 1.7 ml/min., pressure는 약 2800 psi이며 detector는 UV absorbance (254 nm) detector를 사용하였다. aufs는 0.01이었다. injection volume은 SAM을 정량하기 위하여 50 μl injection 하였고 SAH를 정량하기 위하여 20 μl injection 하였다. SAM 및 SAH의 농도는 SAM과 SAH μg에 대한 peak area의 관계로 검량선을 작성하여 구하였다. SAM과 SAH peak의 확인은 일정량의 standard를 sample에 혼합한 후 injection하여 peak area변화를 비교하여 확인하였으며, SAM peak의 경우에는 [methyl-¹⁴C] SAM을 injection하여 각 peak 위치에서 유출되어 나오는 분획을 scintillation counter로 측정하여 확인하였다.

실험결과

흰쥐 간장 조직내 연령별 SAM 및 SAH 농도 변화

Fig. 1에서 보는 바와 같이 SAM 농도는 newborn (111.16)에서 가장 높았으며, 1주째에 약간 감소(82.02)하고 2주째에 다시 증가(94.00)한 후 4주째에는 상당히 낮은농도(53.99)로 떨어졌다. 이에 반해 SAH의 농도는 흰쥐의연령에 상관없이 거의 일정한

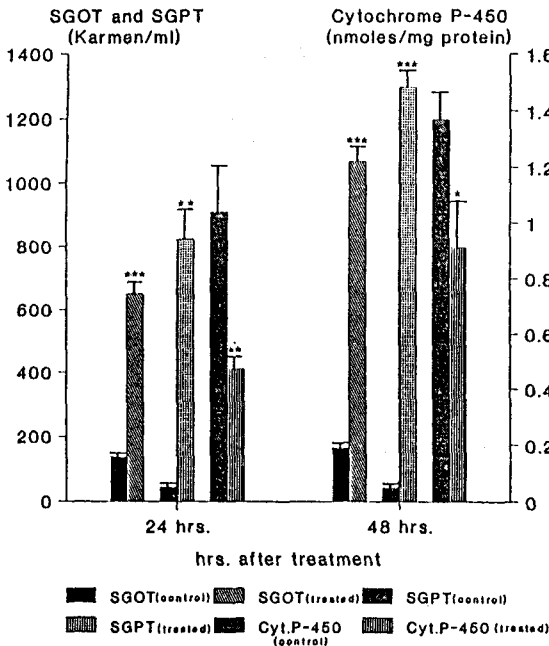


Fig. 2—Changes of SGOT, SGPT and cytochrome P-450 contents after CCl₄ treatment. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

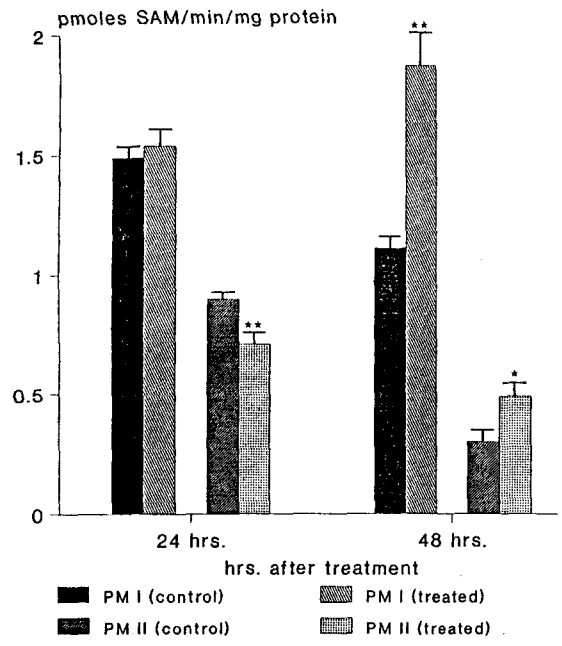


Fig. 3—Changes of protein methylase I and II activities in cytosol after CCl₄ treatment. *p<0.05, **p<0.01

농도를 나타내었다.

CCl₄투여후 SGOT 및 SGPT 활성도 변화

CCl₄투여후 시간별 SGOT 및 SGPT활성도 변화는 투여후 24시간대와 48시간대에서 SGOT, SGPT 모두 지속적인 활성도 증가를 볼 수 있었다.(Fig. 2)

CCl₄투여후 cytochrome P-450의 함량 변화

Fig. 2에서 보는바와 같이 CCl₄ 투여후 24시간대에서 control group(1.04)에 비해 유의성있는 함량감소 (0.47)를 보인 후 48시간대에서는 다시 회복하는 경향 (control group: 1.37, treated group: 0.91)을 보였다.

각 효소의 활성도 변화

1) **Protein methylase I의 활성도 변화**—CCl₄투여 후 protein methylase I의 control group에 대한 활성도 변화는 Fig. 3에서 보는바와 같이 24시간대에서는 이렇다할 활성도 변화를 보이지 않았으며, 48시간대의 cytosol fraction에서 control group(1.11)에 비해 유의성 있는 활성도 증가(1.87)를 보였다.

2) **Protein methylase II의 활성도 변화**—Fig. 3에서 보는바와 같이 CCl₄투여후 protein methylase II의 활성도 변화는 24시간대의 cytosol fraction에서는 활성도 감소를 보인 반면, 48시간대에서는 유의성있는

활성도 증가를 볼 수 있었다.

3) **SAM-synthetase의 활성도 변화**—Fig. 4에서 보는바와 같이 CCl₄투여군에서 SAM-synthetase활성도 변화는 whole homogenate에서는 약간 경향이 다르지만 cytosol fraction의 경우 6시간대를 제외한 나머지 시간대에서 지속적인 활성도 증가를 보였다.

CCl₄투여후 SAM 및 SAH 농도 변화

Fig. 4에서 보는바와 같이 CCl₄투여시 간조직내의 시간별 SAM과 SAH의 농도 변화는, SAM의 경우는 6시간대에서는 농도 감소를 보였으나, 그후 12시간과 24시간대를 걸쳐서 점진적인 농도증가를 보였다가 48시간대에서 다시 농도감소를 보였다. SAH의 경우는 전체적으로 control group에 비하여 낮은 농도를 나타내었으며, 특히 SAM의 농도가 높아지는 시간대인 12시간과 24시간대에서 보다 낮은 농도 감소 경향을 보였다.

고 찰

Protein methyltransferase는 methylation시 SAM-synthetase에 의해 만들어진 methyl donor인 S-ade-

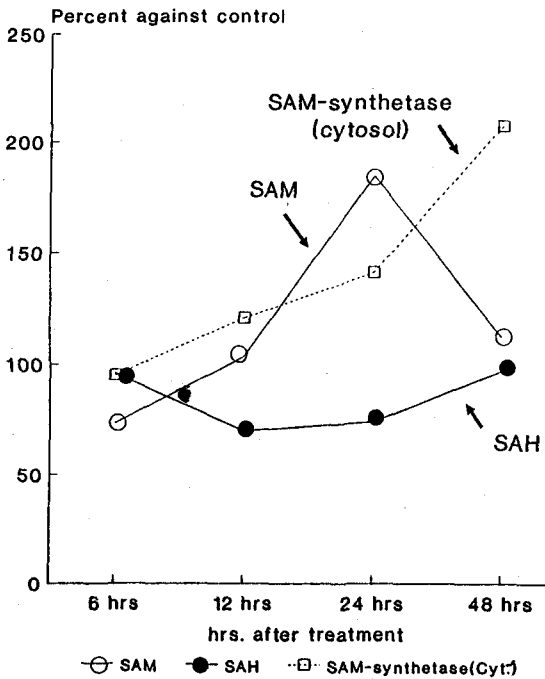


Fig. 4—Changes(%) of SAM and SAH concentrations and SAM-synthetase activity after CCl_4 treatment.

nosylmethionine(SAM)을 이용하며, SAM은 methyl기를 제공한 후 S-adenosylhomocysteine(SAH)으로 바뀌게 된다.

본 실험에서는 이와같은 protein transmethylation의 pathway에 입각하여, 정상 흰쥐 간장 조직내 SAM과 SAH의 연령별 조직 분포를 살펴본 다음, hepatotoxicity를 유발시켜 protein methyltransferase와 SAM-synthetase활성도 변화 및 이들 효소들에 의해 작용받는 대사산물의 간조직내 농도변화를 관찰함으로써 간기능 변화시 transmethylation에 미치는 영향에 관하여 알아보려고 하였다.

Eloranta²¹⁾는 phosphocellulose-column-chromatography방법과 electrophoretic purification을 이용하여 흰쥐 간장에서 SAM농도는 연령에 별 영향을 받지 않고 SAH농도는 연령에 따라 증가한다고 보고한 바 있으나, HPLC를 이용한 본 실험에서는 newborn에서 SAM농도가 가장 높게 나타난후 연령에 따라 점차 감소하는 경향을 보인데 반해 SAH는 연령에 별 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

CCl_4 treatment test에서 SGOT 및 SGPT활성도는

투여후 시간 경과에 따라 지속적인 증가경향을 나타내었으며, cytochrome P-450 함량도 24시간대에서 급격한 함량감소를 나타낸후 차차 회복되는 경향을 보임으로써 1.0 ml/kg의 CCl_4 투여로 확실한 hepatotoxicity를 유발시킬 수 있었다. protein methylase I과 II의 활성도는 24시간대에서는 대조군과 별차이를 보이지 않는 반면, 48시간대에서는 protein methylase I과 II 모두 전반적으로 유의성있는 활성도 증가를 볼 수 있었다. Paik²⁶⁾ 등이 hepatoma에서 protein methylase I 활성도가 hepatoma의 성장시기에 증가함을 보고하였는데, 본 실험의 결과도 간조직이 심한 손상을 받았을때 protein methylases의 활성도 증가를 보였다. SAM-synthetase의 경우는 CCl_4 투여후 시간이 경과할수록 활성도가 점진적으로 증가하였으며, 이는 Cabrero²⁹⁾ 등이 사람의 간경화에서 SAM-synthetase 활성도가 현저히 감소했다고 보고했는데 이러한 연구와 상반되는 결과라고 할 수 있다. SAM과 SAH의 간조직내 농도변화는, SAM농도는 24시간대까지 증가하다가 48시간대에서는 SAM-synthetase의 활성도가 가장높게 나옴에 반해 오히려 SAM 농도는 정상상태까지 떨어졌다. 이처럼 48시간대에서 SAM농도와 SAM-synthetase활성도가 일치하지않는 이유는 48시간대에 protein methylases활성도 증가로 인해 SAM이 transmethylation에 많이 사용되었기 때문이라고 추측된다. SAH농도는 전 시간대에서 대조군보다 낮은 농도를 보였으며 특히 SAM농도가 높은 시간대에서 보다 낮은 농도를 보였다. 48시간대에서 transmethylation의 활성화로인해 SAM농도가 감소될시 SAM의 대사산물인 SAH의 농도가 뚜렷한 증가를 보이지않은 이유는, SAH는 세포내에서 SAH hydrolase의 작용에 의해 빠르게 adenosine과 homocysteine으로 가수분해되어 SAH의 세포내농도가 조절되는데,³⁸⁾ 이러한 이유인것으로 짐작된다.

이상과 같은 결과를 놓고 볼때, CCl_4 의 작용에 의해 급성 간독성이 유발되었을때 protein transmethylation system이 전반적으로 활성화되는 것을 볼 수 있었으며, 좀더 정확한 작용기전을 규명하기 위해서는 간독성이 유발된 상태에서 SAM-synthetase isozyme pattern의 연구, protein methylases의 endogeneous substrate의 확인 및 substrate의 성질과약 등 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

결 론

정상 흰쥐 간장 조직내에서 연령별로 SAM과 SAM의 대사물인 SAH의 농도 분포를 살펴본 다음, 급성 간 독성을 유발시키는 약물인 CCl₄를 투여한 후 protein methylases활성도와 SAM-synthetase활성도 변화 및 간조직내의 SAM과 SAH농도 변화를 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 흰쥐 간장 조직내 연령별 SAM농도는 newborn에서 가장 높았고 연령 증가에 따라 점차 감소했으며, SAH농도는 연령에 별다른 영향을 받지 않았다.
2. CCl₄투여후 protein methylases의 활성도는 24시간대에서는 별 변화가 없었고 48시간대에서 대조군에 비해 유의성있는 활성도 증가를 나타냈다.
3. SAM-synthetase의 활성도는 CCl₄투여후 6시간대에서 48시간대까지 지속적인 활성도 증가를 보였다.
4. 간조직내의 SAM과 SAH농도 변화는, CCl₄투여후 SAM농도는 24시간대까지 증가하다가 48시간대에는 감소했으며 SAH의 경우는 전체적으로 대조군에 비해 낮은 농도를 나타내었다.

문 헌

- 1) Kim, S. and Paik, W.K.: Protein methylation. *Biochemistry: A Series of Monographs*. John Wiley and Sons, New York, p.1(1980).
- 2) Kim, S. and Paik, W.K.: Protein methylation. *Science* **174**, 114(1971).
- 3) Paik, W.K. and Kim, S.: *Protein Methylation*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p.23(1990).
- 4) Stock, J. and Stock, A.: What is the role of receptor methylation in bacterial chemotaxis? *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 371(1987).
- 5) Boyd, A. and Simon, M.: Bacterial chemotaxis. *Ann. Rev. Physiol.*, **44**, 501(1982).
- 6) Diliberto, E.J.Jr. and Axelrod, J.: Characterization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 1701(1974).
- 7) Strittmatter, W.J., Gagnon, C. and Axelrod, J.: Beta adrenergic stimulation of protein carboxymethylation and amylase secretion in rat parotid gland.

- J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **207**, 419(1978).
- 8) Gagnon, C. and Heisler, S.: Protein carboxyl-methylation: Role in exocytosis and chemotaxis. *Life Science* **25**, 993(1979).
- 9) Borun, T.W., Pearson, D. and Paik, W.K.: Study on histone methylation during HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **247**, 4288(1972).
- 10) Lee, H.W., Paik, W.K. and Borun, T.W.: The periodic synthesis of S-adenosylmethionine; protein methyltransferase during the HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4194(1973).
- 11) Trayer, I.P., Harris, C.I. and Perry, S.V.: 3-methyl histidine and adult and foetal forms of skeletal muscle myosine. *Nature*, **217**, 452(1968).
- 12) Polastro, E., Deconinek, M.M., Devogel, M.R., Mailer, E., Looze, Y., Schmeck, A.G. and Leonis, J.: Biological significance of methylation of cytochrome from ascomycetes and yeast. *FEBS Lett.*, **86**, 17(1978).
- 13) Polastro, E., Looze, Y. and Leonis, J.: Study of the biological significance of cytochrome methylation; I. Thermal, acid and guanidinium hydrochloride denaturations of baker's yeast ferricytochromes c. *Biochim. Biophys. Acta.*, **446**, 310(1976).
- 14) Paik, W.K., Nochumson, S. and Kim, S.: Carnitine biosynthesis via protein methylation. *Trends in Biochem. Sci.*, **2**, 159(1977).
- 15) Horne, D.W. and Broquist, H.P.: Role of lysine and ε-N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **218**, 2170(1973).
- 16) 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.*, **84**, 2595(1987).
- 17) Ingrosso, D., Kagan, R.M. and Clarke, S.: Distinct C-terminal sequences of isozymes I and II of the human erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 351(1991).
- 18) Clarke, S., Vogel, J.P., Deschenes, R.T. and Stock, J.: The mammalian *ras* oncogene protein is mediated by new types of carboxyl methylation reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 464(1988).
- 19) 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).
- 20) Tan, E.W., Perez-Sala, D., Canada, F.J. and Rando, R.R.: Identifying the recognition unit for G protein methylation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10719(1991).
- 21) Eloranta, T.O.: Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat; Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem. J.*, **166**, 521(1977).
- 22) Giuliodori, P., Galli-Kienle, M., Catto, E. and Stramentinoli, G.: Transmethylation, transsulfuration and aminopropylation reactions of S-adenosyl-L-methionine *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4205(1984).
- 23) Taber, C.W. and Taber, H.: Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv. Enzymol.*, **56**, 251(1984).
- 24) Okada, G., Teraoka, H. and Tsukada, K.: Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase: Partial purification and characterization. *Biochemistry* **20**, 934(1981).
- 25) Suma, Y., Shimazu, K. and Tsukada, K.: Isozymes of S-adenosylmethionine synthetase from rat liver; Isolation and characterization. *J. Biochem.*, **100**, 67 (1986).
- 26) Paik, W.K., Kim, S., Ezirike, J. and Morris, H.P.: S-adenosylmethionine; Protein methyltransferase in hepatomas. *Cancer Res.*, **35**, 1159(1975).
- 27) Duerre, J.A. and Fetters, H.A.: Protein carboxyl methylation-demethylation system in developing rat livers. *Biochemistry*, **24**, 6848(1985).
- 28) Tsukada, K. and Okada, G.: S-adenosylmethionine synthetase isozyme patterns from rat hepatoma induced by N-2-fluorenylacetylamide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1078(1980).
- 29) Cabrero, C., Duce, A.M., Ortiz, P., Alemany, S. and Mato, J.M.: Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* **8**, 1530 (1988).
- 30) Recknagel, R.O.: A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sciences*, **33**, 401(1983).
- 31) Glende, E.A., Hruszkewycz, A.M. and Recknagel, R.O.: Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose 6-phosphatase. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2163(1976).
- 32) Cinti, D.L., Moldeus, P. and Schenkman, J.B.: Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca^{2+} -sedimented microsomes from rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 3249(1972).
- 33) Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56(1957).
- 34) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes; I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370(1964).
- 35) Matsubara, T., Koike, M., Touchi, A.Y. and Sugeno, K.: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal. Biochem.*, **75**, 596(1976).
- 36) Geller, A.M., Kotb, M.Y.S., Jernigan, H.M., Jr. and Kredich, M.K.: Purification and properties of rat lens methionine adenosyltransferase. *Exp. Eye Res.*, **43**, 997(1986).
- 37) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **93**, 265(1951).
- 38) Hoffman, D.R., Cornatzer, W.E. and Duerre, J.A.: Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can. J. Biochem.*, **57**, 56 (1976).