

膵組織內 Protein Methylases 活性도에 관한 研究

李明然 · 洪性烈 · 李香雨

成均館大學校 藥學大學

(Received October 7, 1983)

Myung Ryun Lee, Sung Ryul Hong and Hyang Woo Lee

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

Studies of the Activities of Protein Methylases in Pancreatic Tissues

Abstract—Among the many protein modifications methylation is being investigated actively with regard to bacterial chemotaxis, gene regulation, muscle contraction, cytochrome c methylation, and the synthesis of the acyl transporter, carnitine. In this study the activities of protein methylase I, II, and III in pancreatic tissues of rat, mouse, and guinea pig were examined. Furthermore, the effect of cholinergic agents on the activity of protein methylases in pancreatic fragment of guinea pig was also examined in order to test the relationship between protein methylation and pancreatic secretion. The results are as follows. 1) The activities of protein methylases were generally high in pancreatic tissues of guinea pig and mouse but low in the tissue of rat. 2) The cholinergic stimulants, acetylcholine and carbachol at a concentration of 10^{-5} M decreased the activities of protein methylase I, II, and III compared with unstimulated control. 3) The inhibitory effect of the cholinergic stimulant on the activities of protein methylases was not blocked by atropine at a concentration of 10^{-5} M.

단백질이 합성된 후 특수한 효소에 의한 생화학적 변형에는 수종이 있는데 그 중에도 phosphorylation, acetylation 그리고 methylation이 중요한 생화학적 변형으로써 많은 연구가 이루어져 왔다. 그중 protein methylation 현상은 생체내에서 이미 합성된 단백질에 S-adenosylmethionine으로 부터 methyl기 ($-\text{CH}_3$)를 받아 단백질 분자내 arginine, lysine, glutamic acid를 methyl화 시킴으로써 그 단백질 작용의 변화를 일으키는 생체내에서 가장 능률적인 생화학적 반응중의 하나로 인정되고 있다.^{1~4)} Protein methylation이 관계되는 중요한 생화학적 현상은 carnitine 생합성^{5,6)}, chemotaxis^{7~9)}, 그리고 cytochrome c methylation^{10~12)} 등이며 또한 histone의 methyl화에 의한 유전인자의 작용에도 영향을 끼친다고 보고되고 있다^{13~15)}.

최근에는 isoproterenol에 의한 타액분비 기전에 protein methylation, 즉 protein carboxyl methylation이 관여하며¹⁶⁾ 췌장에서의 amylase 분비에도 protein carboxyl methylation이 중요한 역할을 한다는 보고가 있다¹⁷⁾.

본 연구 목적은 우선 동물의 췌조직 내의 protein methylation에 관여하는 protein methylase I, protein methylase II, protein methylase III의 활성도 분포를 측정하며 췌액분비 항진 효소를 첨가하여 상기 효소들의 변동 및 amylase 분비 효과와의 상호관계를 검색하므로써 췌액분비 기전에 protein methylation 관여 유무를 밝히고자 한다.

* 이 연구는 1982년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 수행되었음.

實驗 方 法

實驗動物 및 試藥—실험동물로는 몰모트, 쥐, 생쥐 등을 사용하였으며 일정기간 사육한 후 각 동물의 취절편을 절취하여 실험에 사용하였다. 시약으로는 S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine (NEN), Histone type II-A(Sigma), carbachol(Sigma) 등을 사용하였다.

Protein Methylases 活性化 測定—실험동물로 부터 절취한 취조각의 일정부위를 약 0.5g 취하여 0.25M-sucrose 용액 3ml을 가하고 glass homogenizer로 연마하여 일차 cheese cloth를 통과시켜 여과하여 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 약 4°C를 유지하면서 행하였다. Protein methylase I, II, III의 활성화 측정은 Paik의 방법을 사용하였다¹⁸⁾. 활성화 측정방법을 간단히 요약하면 protein methylase의 기질로는 3mg의 histone type II-A, methyl donor로써 0.1ml (10nmole)의 S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] methionine, 그리고 0.5M-phosphate buffer(pH7.2), 0.25M-citrate-phosphate buffer(pH6.0), Tris-HCl buffer(pH9.0) 등을 protein methylase I, II, III의 완충액으로 하여 37°C에서 incubation 한 후 반응을 30% TCA 용액을 가하여 중지시킨다. 과량의 미반응 방사선 물질을 15% TCA로 여러번 닦아 제거하고, nucleic acid를 ethanol로 70°C에서 가열하여 제거한 후 남은 단백질을 counting 용액에 용해시켜 scintillation counter로 radioactivity를 측정하여 활성도를 측정하였다.

Cholecystokinin-Pancreozymin(CCK-PZ), Acetylcholine 및 Carbachol의 影響—CCK-PZ (octapeptide), acetylcholine 및 carbachol 처치로 인한 취조각내 protein methylases 활성화도 변화를 몰모트 취장에서 검색하였다. 즉 몰모트로부터 절취한 취장을 10ml의 Krebs-Ringer bicarbonate 완충액(pH7.2)에 넣어 95% O₂와 5% CO₂ 혼합 gas를 통해주면서 취장조직과 medium의 모든 조건이 equilibrium이 되도록 37°C에서 약 10분간 preincubation시킨 후 조직을 약 400mg의 균등한 절편으로 나누었다. 이 각각의 절편을 4ml의 Krebs-Ringer bicarbonate가 들어있는 시험관에 옮긴 후 CCK-PZ(octapeptide, 0.4μg), acetylcholine(10⁻⁵M) 혹은 carbachol(10⁻⁵M)을 가하고 1시간 혹은 2시간동안 혼합 gas를 통해주면서 37°C에서 incubation하였다. Incubation이 끝난 후 취조각은 homogenize하여 조직내 protein methylases 활성을 측정하였으며 조직을 제거한 medium에서는 취조각으로 부터 분비된 취효소인 amylase의 활성도를 Sumner¹⁹⁾ 법으로 측정하였다. 한편 atropine에 의한 영향은 medium에 atropine(10⁻⁵M)을 가하여 20분간 incubation하여 절취치한 후 CCK-PZ, acetylcholine 혹은 carbachol을 상기와 같이 처치하였다. 단백질 측정은 Lowry 방법²⁰⁾을 이용하였다.

實驗 結 果

數種動物 豚組織內 Protein Methylases 活性化—몰모트, 쥐, 생쥐의 취조각내 protein methylase I, II, III의 활성화도는 Table I에서 보는 바와 같이 일반적으로 몰모트와 생쥐에서 높은 활성도를 보였으며 쥐의 취조각은 비교적 낮은 활성도를 보여주었다. 특히 protein methylase II의 활성화도는 몰모트에서 specific activity가 1.39로 쥐의 0.71의 약 2배 정도 높은 활성도를 나타냈으며 protein methylase I의 경우에도 생쥐가 0.79, 몰모트는 0.68 이나 쥐는 0.25로써 제일 낮은 효소활성도를 나타냈다. Protein methylase III 활성화도는 3종의 동물에서 비교적 그 활성도가 비슷하였다.

Protein Methylases에 대한 Acetylcholine 및 CCK-PZ의 影響—Table II에서 보는 바와 같

Table I-Activity of various protein methylases in pancreatic tissues of animals.

Animals	Specific activity of protein methylases		
	I*	II	III
Guinea pig	0.68±0.038	1.39±0.033	0.45±0.053
Rat	0.25±0.032	0.71±0.025	0.43±0.016
Mouse	0.79±0.031	0.84±0.046	0.50±0.094

* I, II, and III represent protein methylase I (S-adenosylmethionine: protein-arginine N-methyltransferase), protein methylase II (S-adenosylmethionine: protein-carboxyl O-methyltransferase), and protein methylase III (S-adenosylmethionine: protein-lysine N-methyltransferase), respectively. Specific activity is expressed as picomoles of S-adenosyl-L-methionine used per minute per milligram of enzyme protein.

이 acetylcholine($10^{-5}M$) 처치로 취조직내 protein methylase I, II, III 활성화도는 대조실험에 비하여 현저한 효소 활성화도 저하를 가져왔다. 즉, protein methylase I은 대조실험 0.67에 비하여 acetylcholine 처치 실험은 0.51로 저하를, protein methylase II도 1.60에서 1.34로 활성화도 저하를 보였으며 protein methylase III 활성화도는 0.79에 비하여 acetylcholine 처치군은 0.52로 보다 현저한 저하를 보였다. 그러나 medium으로 분비된 amylase의 활성화도는 대조실험에 비하여 acetylcholine 처치 실험은 약 3배의 효소 활성화도 상승을 보였다.

Table II-Effect of acetylcholine or CCK-PZ on the activities of protein methylases in pancreatic tissue of guinea pig.

Compounds added	n	Protein methylases			Amylase in medium
		I	II	III	
		(picomoles SAM/min./mg protein)			(units/ml)
Control	5	0.666 ±0.0238	1.595 ±0.0759	0.793 ±0.0373	7.6 ± 0.97
Acetylcholine($10^{-5}M$)	5	0.508*±0.0695	1.335*±0.0504	0.518**±0.0446	21.9***±3.51
CCK-PZ(20µg)	6	0.607 ±0.0416	1.515 ±1.1062	0.490**±0.0353	18.5***±2.42

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

한편 취효소 분비 hormone인 CCK-PZ(20µg)을 처치한 취조직내 protein methylases 활성화도는 protein methylase III의 경우 유의있는 활성화도 저하를 나타냈으나 protein methylase I 및 II는 별 영향을 보이지 않았다. Medium으로 분비된 amylase 활성화도는 약 2배 이상의 활성화도 상승을 가져왔다.

Protein Methylases에 대한 Atropine의 影響—부교감 신경계의 cholinergic receptor blocking agent인 atropine 전처치 효과를 검색하였다. Table III에서 보는 바와같이 acetylcholine 처치는 protein methylase I, II, III의 활성화도 저하를 가져왔으며 acetylcholine 처치 전에 atropine($10^{-5}M$)을 전처치한 실험에서도 취조직내 protein methylase I 및 II의 활성화도는 atropine에 의한 acetylcholine의 방해효과가 나타나지 않고 오히려 더 심한 효소 활성화도 저하를 관찰할 수 있었다. 그러나 protein methylase III 경우에는 atropine 전처치로 acetylcholine에 의한 효소 활성화도 저하가 방해되었다. 한편 medium내 amylase 활성화도는 atropine 전처치로 acetylcholine에 의한 amylase 분비 향진이 완전히 방해되었다.

Table III-Effect of acetylcholine on the activities of protein methylases in guinea pig pancreatic tissue pretreated with atropine.

Compounds added	n	Protein methylases			Amylase in medium
		I	II	III	
		(picomoles SAM/min./mg protein)			(units/ml)
Control	6	0.565 ± 0.0389	1.253 ± 0.0106	0.738 ± 0.0131	10.5 ± 1.59
Acetylcholine(10 ⁻⁵ M)	4	0.495* ± 0.0035	1.020 ± 0.0212	0.595** ± 0.0075	30.6*** ± 4.35
Atropine + Ach. (10 ⁻⁵ M)	4	0.445** ± 0.0389	0.835** ± 0.1025	0.745 ± 0.1025	12.2 ± 3.23

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Protein Methylases에 대한 Carbachol의 影響—Acetylcholine analog로써 acetylcholinesterase에 대한 저항성이 강하여 작용시간이 긴 carbachol 처치로 인한 쥐조직내 protein methylases 활성도 변화는 Table IV에 표시하였다. Acetylcholine의 효과와 유사하게 cabarchol 처치는 의의있는 protein methylase I, II, 및 III 활성도 저하를 나타냈으며, atropine 단독 처치 실험에서는 더욱 현저한 protein methylases 활성도 저하를 가져왔다. 즉, 쥐조직내 protein methylase I의 대조 활성치 0.90에 비하여 atropine 단독 처치 실험에서는 0.30으로써 1/3로 현저한 활성도 감소를 보였으며 protein methylase II도 1.25에 비하여 atropine 단독 처치로 0.59로 활성도 저하를 나타냈다. 그러나 protein methylase III의 경우에는 carbachol에 의하여 약한 활성도 감소를 보였다. Atropine(10⁻⁵M)으로 전처치한 후 carbachol로 처치한 쥐조직 protein methylase I과 II 활성은 atropine 단독 투여시 효소 활성도와 근사하였다. 그러나 protein methylase III의 활성도는 atropine 전처치 후 carbachol 처치로 대조 활성치 보다 오히려 현저히 상승하였다. 한편 medium으로 분비된 amylase 활성은 carbachol 처치로 약 2배 이상 증가하였으며 atropine 전처치로 이같은 amylase 활성도 증가가 완전히 봉쇄되었다.

Table IV-Effect of carbachol on the activities of protein methylases in guinea pig pancreatic tissue pretreated with atropine.

Compounds added	n	Protein methylases			Amylase in medium
		I	II	III	
		(picomoles SAM/min./mg protein)			(units/ml)
Control	6	0.895 ± 0.0106	1.245 ± 0.0958	0.387 ± 0.0163	7.6 ± 0.89
Carbachol(10 ⁻⁵ M)	5	0.502** ± 0.0420	1.020* ± 0.0071	0.290* ± 0.0353	18.5*** ± 2.52
Atropine(10 ⁻⁵ M)	5	0.300*** ± 0.0071	0.585*** ± 0.0318	0.315 ± 0.0177	7.3 ± 0.79
Atropine + Carbachol	5	0.410*** ± 0.0283	0.605*** ± 0.0530	0.540* ± 0.0283	6.0 ± 0.94

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

考 察

Protein methylase I은 Lee 등²¹⁾에 의하여 calf brain으로 부터 정제된 효소로써 기질 단백질내 amino acid 중 arginine을 methyl화하여 methylarginine을 생성하는 효소이며 주로 세포내 cytosol에 존재한다. protein methylase II도 cytosol enzyme으로써 기질 단백질내 glutamic acid 혹은 aspartic acid를 methyl화하여 methyl ester를 형성하며 Kim과 Paik²²⁾에 의하여 정제되었다.

Protein methylase III는 Paik과 Kim²³⁾에 의하여 부분적으로 정제된 효소로써 주로 핵에 존재하며 기질내 lysine을 methyl화하여 methyllysine을 형성하는 효소이다.

이와같은 protein methylase I, II, III의 동물의 취장 조직내 활성도와 취액 분비와의 관계에 대해서는 아직도 별로 많은 연구가 보고되고 있지 못하다. Unger 및 그의 공동 연구자²⁴⁾들은 쥐의 취장내 protein methylase II 활성도를 생성된 methanol을 정량하여 12 pmole methanol/ μ g DNA라고 보고 하였으며 Povilaitis 및 그의 공동 연구자¹⁷⁾도 쥐의 취조직을 cell fractionation하여 S₄ fraction (cytosol fraction)내에 약 15 pmole/10min/mg protein의 활성도를 나타낸다고 보고하였다. 본연구에서는 몰모트, 쥐, 생쥐의 취장 whole homogenate 내 protein methylase I, II, 및 III의 활성도를 검색한 결과 몰모트 취장에서 protein methylase I, II, III의 활성도가 가장 높았으며 다음은 생쥐 그리고 쥐 취장에서 제일 낮은 protein methylases의 활성도를 보였다. 또한 비교적 protein methylase II가 동물의 취조직내에서 protein methylase I 혹은 III에 비하여 높은 활성도를 나타냈다. Diliberto 및 그의 공동 연구자 그리고 Strittmatter 및 그의 공동 연구자¹⁶⁾들은 isoproterenol로 처치한 parotid gland에서 amylase의 분비 항진과 protein methylase II의 활성도 항진을 관찰하고 protein methylase II가 stimulation-secretion coupling에 직접적인 관계가 있다고 주장하였으며 또한 Povilaitis 및 그의 공동 연구자¹⁷⁾ 등은 protein methylation이 취장의 취효소 분비에 미치는 영향은 일부분에 국한된다고 보고하였다. 반면 Unger 및 공동 연구자²⁴⁾ parotid gland를 isoproterenol로 처치한 후 protein methylase II 활성도와 methyl accepting protein (MAP)양을 DNA mg당으로 검색한 바 오히려 현저한 저하를 관찰하고 carboxymethylation은 stimulus-secretion coupling과는 무관하다고 주장하였다.

본실험에서는 취조직으로부터 취효소의 분비 항진을 일으키는 acetylcholine을 몰모트 취절편에 가하여 amylase 분비 효과와 취조직 protein methylase I, II, III의 활성도를 검색한 바 Table III에서 보는 바와 같이 대조실험에 비하여 acetylcholine을 처치한 취절편내 protein methylase I, II, III 모두 의의있는 활성도 저하를 나타냈다. 그러나 medium으로 유출된 amylase 활성도는 약 3배로 현저한 상승을 나타냈다. 이는 Unger 및 그의 공동 연구자²⁴⁾의 결과와 일치하는 현상으로 아마도 취액 분비와 protein methylation 현상과는 직접적인 관계는 없는 것으로 생각된다. 그러나 왜 반대로 효소의 활성도 저하를 가져왔는지는 본실험 만으로는 추측하기 어렵다.

취효소 분비 hormone인 CCK-PZ 처치로 protein methylase III 활성도는 약간 저하되었으나 protein methylase I과 II 활성도는 별 변화를 나타내지 않아 protein methylation과 취효소 분비와도 직접적인 관계는 없는 것으로 추측된다. 또한 acetylcholine과 동일한 작용을 가지고 있는 carbachol을 처치했을 경우에도 protein methylases의 의의있는 활성도 저하를 초래하였으며 흥미 있는 것은 acetylcholine 및 carbachol의 봉쇄 약물인 atropine을 단독 처치 혹은 전처치했을 경우에도 protein methylase I과 II의 활성도는 의의있는 저하를 나타냈다(Table III, Table IV). 그러나 medium 중 amylase는 acetylcholine이나 carbachol로 항진된 활성도가 atropine 전처치로 완전히 봉쇄되었다. Acetylcholine과 atropine이 상경적으로 세포의 동일한 receptor에 작용한다는 점을 고려할 때 acetylcholine이나 atropine 자체에 의한 protein methylase I 및 II의 활성도 저하는 그 기전이나 의미를 본실험만으로 추측하기 어려우나 주목할 만 하다고 생각된다.

한편 protein methylase III의 경우에는 I 혹은 II와 달리 atropine 전처치로 acetylcholine이나 carbachol 처치로 인한 효소 활성도 저하가 완전히 봉쇄되어 acetylcholine이나 carbachol에 대한 취조직내 protein methylase I, II 및 III의 반응이 서로 상이함을 시사해준다.

結 論

단백질의 methyl화 현상과 취액분비 간의 상호관계를 연구코저 cholinergic stimulant에 의한 취조직내 protein methylases 활성도 변화를 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 취조직내 protein methylase 활성도는 물모트와 생쥐의 취장에서 높은 활성도를 보였으며 쥐에서는 비교적 낮은 활성도를 보였다. 이같은 현상은 특히 protein methylase II가 더욱 현저하였다.

2) Acetylcholine($10^{-5}M$) 처치로 취절편내 protein methylases 활성도는 현저한 감소를 가져왔으며 이같은 활성도 저하는 atropine 전처치로 억압되지 못하였다. 그러나, medium으로 유출된 amylase 활성도는 acetylcholine으로 현저한 분비항진을 가져왔으며 atropine으로 분비항진이 억압되었다.

3) Carbachol($10^{-5}M$) 처치로 인한 취조직내 protein methylases 활성도 변화도 acetylcholine 처치와 유사한 결과를 보였다.

文 獻

1. W.K. Paik and S. Kim, Protein Methylation. Chemistry, Enzymology and Biological Significance. in *Advances in Enzymology*. (A. Meister, Ed.) Vol. 42, 227. John Wiley & Sons, New York, (1975).
2. W.K. Paik and S. Kim. Protein Methylation (Review article) *Science*, 174, 114 (1971).
3. W.K. Paik and S. Kim, The periodic synthesis of S-adenosylmethionine: protein methyltransferase during the HeLa cell cycle. in *Post-Synthetic Modification of Macromolecules* (F. Antoni and A. Fargo Eds.), Vol. 34, 127, FEBS, North-Holland/American Elsevier, (1975).
4. G.L. Cantoni, *Ann. Rev. Biochem.* 44, 437 (1975).
5. D.W. Horne and H.P., Broquist, *J. Biol. Chem.* 248, 2170, (1973).
6. R.A. Cox and C.L. Hoppel, *Biochem. J.* 136, 1083, (1973).
7. J. Adler and M.M. Dahl, A method for measuring the motility of bacteria and for comparing random and non-random motility. *J. Gen. Microbiol.* 46, 161, (1967).
8. J.B. Armstrong, An S-adenosylmethionine requirement for chemotaxis in *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* 18, 1965, (1972).
9. E.N. Kort, M.F. Goy, S.H. Lasen, and J. Alder, Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 3939, (1975).
10. E. Polastro, M.M. Deconick, M.R. Devogel, E. Mailer. Y. Looze, A.G. Schneck and J. Leonis, *FEBS Letter.* 86, 17 (1978).
11. R.J. DeLange, A.N. Glazer and E.L. Smith, Identification and location of ϵ -N-trimethyllysine in yeast cytochrome C. *J. Biol. Chem.* 245, 3325, (1970).
12. P. DiMaria, E. Polasto, R.J. DeLange, S. Kim., and W.K. Paik, Studies on cytochrome C methylation in yeast. *J. Biol. Chem.* 254, 4645 (1975).
13. T. Tidwell, V.G. Allfrey and A.E. Mirsky, The methylation of histone during regeneration of the liver. *J. Biol. Chem.* 243, 707, (1968).
14. T. Borun, D. Pearson and W.K. Paik, Study on histone methylation during HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.* 247, 4288, (1972).
15. H.W. Lee, W.K. Paik and T.W. Borun, The periodic synthesis of S-adenosylmethionine: protein methyltransferase during the HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.* 248, 4194, (1973).
16. W.J. Strittmatter, C. Gagnon and J. Axelrod, Beta adrenergic stimulation of protein carboxymethylation and amylase secretion in rat parotid gland. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 207, 419, (1978).
17. V. Povilaitis, C. Gagnon and S. Heisler, Stimulus-secretion coupling in exocrine pancreas. *Am. J. Physiol.* 240, G199, (1981).

18. W.K. Paik and S. Kim, in *Protein Methylation, Biochemistry A Series of Monographs* (Meister, A., Ed.) Vol. 1, Wiley, New York. (1980).
19. J.B. Sumner, The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylate. *J. Biol. Chem.* 62, 287, (1924).
20. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
21. H.W. Lee, S. Kim, and W.K. Paik, S-adenosylmethionine: protein arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry.* 16, 78, (1977).
22. S. Kim, W.K. Paik, Purification and properties of protein methylase II. *J. Biol. Chem.* 245, 1806, (1970).
23. W.K. Paik, and S. Kim, Solubilization and partial purification of protein methylase III from calf thymus nuclei. *J. Biol. Chem.* 245, 6010, (1970).
24. C. Unger, R. Jahn and H.D. Soling, Is protein carboxymethylation involved in stimulus-secretion coupling? *FEBS Letters.* 123, 211, (1981).
25. Diliberto, Jr., O.H. Viveros and J. Axelrod, Subcellular distribution of protein carboxymethylase and its endogenous substrates in the adrenal medulla; Possible role in excitation coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4050, (1976).