

돼지 간장 조직에서 얻은 단백질 메틸라제 저해제의 정제와 특성

박선미# · 박연호 · 백운기* · 이향우
성균관 대학교 약학대학, *미국템플의대 Fels연구소
(Received February 20, 1993)

Protein Methylase Inhibitor from Porcine Liver: Purification and Properties

Sun-Mee Park#, Youn Ho Park, Woon Ki Paik* and Hyang Woo Lee
Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Sung kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea
*Temple University, School of Medicine Fels Research Inst. Philadelphia, Pa. U.S.A.

Abstract—Protein methylase inhibitor which is a modulator of biological methylation has been purified and characterized from porcine liver soluble fraction by cell fractionation, Sephadex G-25 chromatography, reverse phase HPLC, size exclusion HPLC. The results are summarized as follows. 1) The purified inhibitor shows apparent homogeneity, as judged by HPLC. 2) A molecular weight of the purified inhibitor which is composed of 18 amino acid residues is about 1,400 daltons. 3) A single absorption peak of ultraviolet spectrum was observed at 260 nm. 4) The inhibitor was not inactivated by heating at 100°C until 60 min. and its activity was not influenced by treatment with digestive enzymes, such as trypsin, pepsin, pronase, chymotrypsin, lysozyme, DNase, and RNase. 5) The purified inhibitor inhibited protein methylase I, II, III and phospholipid methyltransferase activities. 6) The purified inhibitor inhibited noncompetitively protein methylase II from porcine liver, spleen, and testis. 7) The K_i values for protein methylase II from porcine liver, spleen, and testis were 300 nM, 250 nM, 297 nM, respectively.

Keywords □ Protein methylase I(PM I), Protein methylase II(PM II) Protein methylase iII(PM III), SAM, SAH, Protein methylase inhibitor.

단백질의 메틸화 현상¹⁾은 생합성된 단백질이 S-adenosyl methionine(SAM)으로 부터 메틸기(CH₃)를 받아 단백질내의 lysine, arginine, histidine, glutamic acid, aspartic acid가 메틸화됨으로써 그 단백질의 구조와 작용의 변화를 일으키는 생화학적 반응중의 하나로 원핵세포에서 진핵세포에 이르는 다양한 종류의 세포에서 일어나며 관여하는 생화학적 반응으로는 화학주성,²⁾ 신호전달체계,³⁾ 유전인자의 조절작용,⁴⁾ 카르니틴 생합성,⁵⁾ myelin 형성⁶⁾ 등 그 작용이 다양하다.

이와 같은 단백질 메틸화 현상을 촉매하는 효소로 PM I, II, 그리고 III 등이 발견되었으며 이 메틸화

현상을 저해하는 물질인 Transmethylase Inhibitor에 관한 연구는 발암성이 있는 DNA나 RNA virus에 의하여 생성된 암세포에서 tRNA methylation이 비정상적으로 높게 일어난다는 사실이 보고⁷⁾된 후 항암제 등의 약물개발의 목적으로, tRNA methylase의 natural inhibitor인 SAH 유사체에 대한 연구를 중심으로 진행되었는데 t-RNA methylase inhibitor로서 비교적 독성이 적으며 oncostatic effect가 큰 sinefungin이 그 대표적인 예이며 그 외 다수가 보고되었다.⁸⁾

S-adenosyl-L-homocysteine(SAH) 및 SAH 유사체 이외에 생체내에 존재하는 단백질성 물질로서 transmethy-lase에 대한 저해를 나타내는 물질이 수종 발견되었다. 1970년 tRNA methylase inhibitor가 쥐의 간에서

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

분리되었으며,⁹⁾ Kim 등이¹⁰⁾ protein methylase II의 natural inhibitor를 발견하였고 순수 분리하여 그의 아미노산 조성을 밝혔으며 또한 phosphatidyl ethanolamine methylase inhibitor¹²⁾와 phospholipid methyltransferase inhibitor¹³⁾의 존재도 보고되었다.

본 실험에서는 생체내에서 중요한 현상으로 알려진 Protein Methylation 현상을 조절하는 역할을 하는 Protein Methylation Inhibitor를 돼지의 간장 조직으로부터 분리정제하여 아미노산의 조성을 확인하고, 나아가 Inhibitor와 SAH와의 상호관계, Inhibitor의 작용 기전, 성질 및 여러 transmethylation과의 상관관계 등을 연구하여 Protein Methylation의 생화학적 의미를 밝히고자 하였다.

실험재료

시약—S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine (specific activity: 56 mCi/mmol), Histone from calf thymus type II-As, Bovine serum albumin, S-adenosyl-L-homocysteine, Sephadex G-25, Phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Deoxyribonuclease A, Ribonuclease A, Acetonitrile (for HPLC), TFA(trifluoro acetic acid), TEA(triethylamine), PITC(phenylisothiocyanate)

기타의 시약은 시판의 특급시약을 사용하였다.

Liquid Scintillation Counter(1211 Rackbeta, LKB, U.S.A.), High Performance Liquid Chromatography (Model 501 Tunable Absorbance Detector, Model 486 Solvent Delivery System, Model U6K Injector, Waters Automated Gradient controller: Waters Associates, U.S.A.), Ultrafiltration equipment (8050, Amicon Corp., U.S.A.), Ultracentrifuge (L8-80M, Beckman, U.S.A.)

실험방법

1. Protein methylase inhibitor의 활성도 측정

Inhibitor의 활성도 측정은 inhibitor 존재 유무시 PM I, II, III, phospholipid methyltransferase의 활성도 차이로서 측정하였다.

1.1. Protein methylase의 활성도 측정—PM I, II, III의 활성도는 Paik 등의¹⁴⁾ 방법에 따라 측정하였다.

1.2. Phospholipid Methyltransferase의 활성도 측정—Castano 등¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다.

2. 간장조직으로부터 Methylation inhibitor의 정제
수원 도축장에서 가지고 온 돼지 간장을 -20°C 에서 보관하였다가 해빙시켜 사용하였다. 6단계의 과정을 거쳐 methyltransferase inhibitor를 정제하였으며, 모든 조작은 4°C 에서 행하였다.

2.1. Tissue preparation과 homogenization—돼지 간장 40g을 취해 세절한 다음 냉각된 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에서 teflon glass homogenizer를 이용하여 1,200 rpm의 속도로 1분간 균질화하여 double layered cheese cloth를 통과시킨 다음 여액을 methyltransferase inhibitor의 정제 과정에 사용하였다.

2.2. Subcellular fractionation—Whole homogenate를 Kubota high speed centrifuge로 10,000×g (rotor RA-3, 10,000 rpm)에서 30분간 원심분리한 후 double layered cheese cloth에 통과시켜 상등액 상부의 지질층 및 cell debris, nuclear, mitochondrial fraction을 제거한 후 상등액을 Beckman L8-80M Ultracentrifuge로 105,000×g(rotor 50 Ti, 40,000 rpm)에서 1시간 원심분리하여 cytosol fraction을 얻었다.

2.3. 가열 및 농축과정—위에서 얻은 시료는 100°C 에서 10분간 가열한 후, 불활성화된 단백질을 25,000×g에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 그 상층은 동결건조하였다.

2.4. Sephadex G-25 chromatography—동결건조한 시료를 2 ml의 buffer A(0.5 mM phosphate buffer, pH 6.5)에 녹인 후 buffer A로 평형시킨 Sephadex G-25 column(2.5 cm, i.d.×145 cm)에 가하고 buffer A를 30 ml/hr의 유속으로 하여 용출시켰다. 4.5 ml씩 분획하여 UV 280 nm에서 흡광도를 측정하고 각 peak를 모아 동결건조하여 농축시키고 동량의 buffer A에 용해하여 inhibitory activity를 측정하였다. 이때 사용한 Sephadex G-25 column은 50~150 μm의 particle size를 가진 gel filtration resin인 Sephadex G-25를 column(2.5 cm, i.d.×145 cm)에 충전한 것이다.

2.5. Reverse phase column을 이용한 HPLC—Sephadex G-25 chromatography에서 얻은 inhibitory activity가 가장 큰 분획을 최소한의 mobile phase에 용해시킨 후 소수성의 성질을 가지는 reverse phase column인 μ Bondapak C₁₈ column을 이용하여 HPLC

정제를 하였다. 이동상은 A액으로는 0.1% TFA, B액으로는 60% acetonitrile을 사용하여 B액이 0%부터 60%까지 분당 1%씩 점차적으로 증가되도록 하였다. UV 214 nm에서 분당 1 ml의 유속으로 용출시켜 peak를 분획하여 냉동건조한 후 각 분획의 inhibitory activity를 측정하였다.

Column	μ Bondapak C ₁₈ (3.9×300 mm, i.d.), particle size 10 μ m, Waters
Mobile phase	A: 0.1% TFA in water B: 60% Acetonitrile
Flow rate	1 ml/min
Detection	214 nm
Gradient program	Linear gradient 0 to 60% B in A over 60 min

2.6. Size exclusion column을 이용한 HPLC— μ Bondapak C₁₈ column을 통과하여 얻은 inhibitory activity 분획을 Size exclusion column인 PROTEIN PAK column을 이용하여 정제하였다. 이동상은 buffer A(0.5 mM phosphate buffer, pH 6.5)로 유속은 분당 1 ml로 하여, 214 nm에서 측정된 peak를 분획한 후 냉동건조하여 inhibitory activity를 측정하였다.

Column	PROTEIN PAK column(M.W. range: 1,000~10,000), 7.8×300 mm, Waters
Mobile phase	0.5 mM phosphate Buffer(pH 6.5)
Flow rate	1 ml/min
Detection	214 nm

3. Inhibitor의 순도 확인

Size exclusion column인 PROTEIN PAK column으로 정제하여 얻은 inhibitory peak의 순수도를 조사하고자 reverse phase column인 μ Bondapak C₁₈ column을 이용하여 확인하였다. 이동상은 0.1% TFA의 solution을 isocratic으로 HPLC하여 순수 단일 peak임을 확인하였다.

4. Amino acid 조성의 검토

4.1. 순수정제된 inhibitor의 가수분해—순수정제된 inhibitor를 105°C에서 24시간 6 N HCl로 가수분해한 후 완전건조시켰다.

4.2. 가수분해된 inhibitor의 유도체화—EtOH, H₂O, TEA, PITC를 7 : 1 : 1 : 1의 비율로 혼합한 후 가수

분해한 inhibitor가 든 tube에 10 μ l 넣고 몇초간 쉬어준 후 실온에서 20분간 방치 후 완전건조시킨다. 여기에 희석액 250 μ l를 tube에 넣어 시료를 완전히 용해시킨 다음 HPLC 하였다.

4.3. HPLC 분석조건 및 정량방법—Column은 silica base의 Waters의 PICOTAG column을 이용하였으며 이동상으로 Eluent A와 B의 gradient system 조건에서 실시하였다. Detector는 UV absorbance detector(269 nm)를 사용하였으며 온도조건은 35°C이며 a. u.f.s.는 0.01이다. Injection volume는 10 μ l씩 injection 하였다.

5. Inhibitor의 성질

5.1. 가수분해 효소처리에 의한 inhibitor의 저해력 변화 검색—Pepsin, chymotrypsin, trypsin, lysozyme, DNase, RNase, Pronase 등의 digestive enzyme 1 unit을 inhibitor 45 pmole에 가하여 다음 표와 같은 조건으로 2시간 incubation하고 100°C에서 5분간 끓여 반응종료 후 protein methylase의 inhibitory activity를 측정하였다. 효소는 돼지 간장의 PM II(S.A.: 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl-¹⁴C) methionine/min/mg) 20 μ l를 사용하였고, 기질은 histone(60 mg/ml) 20 μ l를 사용하였다.

Digestive enzyme	pH	온도
Pepsin	2.0	37°C
Chymotrypsin	7.8	25°C
Trypsin	6.2	25°C
Lysozyme	6.2	25°C
DNase	5.0	25°C
RNase	5.0	25°C
Pronase	7.0	40°C

5.2. Inhibitor 농도 변화에 따른 protein methylase의 inhibitory effect—순수정제된 inhibitor를 이용하여 protein methylase inhibitor에 대한 돼지 간장의 protein methylase II에 대한 억제효과를 검색하였다.

효소는 porcine liver(S.A.: 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl-¹⁴C) methionine/min/mg) 20 μ l를 사용하였고, 기질은 histone(60 mg/ml) 20 μ l를 사용하였다.

5.3. Inhibitor와 SAH의 상관관계—Protein meth-

ylase에 상경적 억제작용을 하는 것으로 알려진 SAH와의 상관관계를 알아보기 위해 정제된 porcine spleen PM II를 이용하였다. 정제된 inhibitor 300 nM의 inhibitor를 동시에 투여한 후 inhibition 정도의 증감을 확인하였다. Enzyme은 porcine liver(S.A.: 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C) methionine/min/mg) 20 μ 를 사용하였고, substrate는 histone(60 mg/ml) 20 μ 를 사용하였다.

5.4. Inhibitor가 효소활성에 미치는 영향—정제된 inhibitor가 효소활성에 미치는 영향은 substrate인 histone 농도 및 inhibitor의 농도를 변화시켜 효소의 활성을 측정하였다. Histone의 농도는 15 mg/ml, 7.5 mg/ml, 3.75 mg/ml이었고 정제된 inhibitor의 농도는 15 pmole, 30 pmole, 45 pmole이었다. 이 때 사용한 효소는 돼지 간장, 비장, 정소 등에서 분리정제 한 PM II로 S.A.는 각각 다음과 같았다. 돼지 간장(S.A.: 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C) methionine/min/mg), 돼지 비장(S.A.: 309 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C) methionine/min/mg), 돼지 정소(S.A.: 297 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C) methionine/min/mg)

5.5. 수종의 SAM-dependent methyltransferase에 대한 inhibitor의 영향—SAM-dependent methyltransferase에 대한 정제된 inhibitor의 영향을 알아보기 위하여 30 pmole의 inhibitor를 가하여 돼지 간장에서 부분정제한 PM I, PM II, PM III, phospholipid methyltransferase의 활성도 변화를 검색하였다. 이때 사용한 효소들은 대조군(inhibitor를 제외한 시료)의 cpm이 4,000에서 5,000의 범위내에 있도록 농도를 조정하였다.

실험결과

1. Inhibitor의 순도 확인

Sephadex G-25 chromatography, μ -Bondapak C₁₈ column, PROTEIN PAK 60 column(MW 1,000~10,000)으로 정제하여 얻은 peak의 순수도를 조사하고자 0.1% TFA의 용액을 isocratic조건으로 하여 μ -Bondapak C₁₈ column에 적용시킨 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 단일 peak를 관찰할 수 있었다.

2. Inhibitor의 amino acid 조성

PITC 유도체를 이용한 아미노산 분석법으로 아미

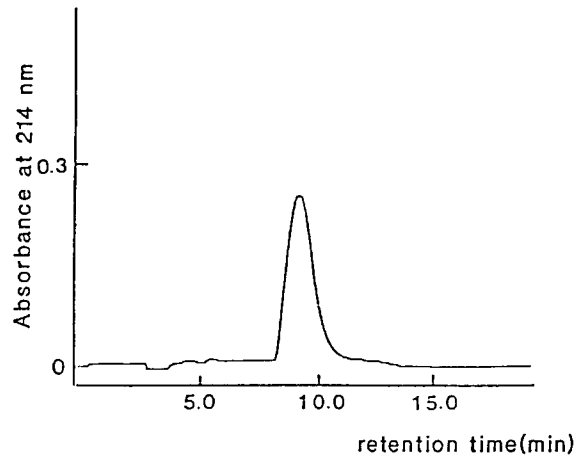


Fig. 1—Rechromatography of protein methylase inhibitor on μ Bondapak C₁₈ column.

The concentrated sample from PROTEIN PAK column was applied to μ Bondapak C₁₈ column and eluted 0.1% TFA in water at a flow rate of 1 ml per min.

노산의 조성을 검토한 결과 18개의 아미노산으로 이루어졌고, alanine과 glycine이 풍부하였으며, 분자량은 약 1,400Da이었다(Table I).

3. Inhibitor의 성질

3.1. 가수분해 효소처리에 의한 inhibitor의 저해력 변화—Pepsin, chymotrypsin, trypsin, lysozyme, DNase, RNase, Pronase 등의 digestive enzyme을 처리한 protein methylase inhibitor의 inhibition 정도는 pepsin, chymotrypsin, trypsin, lysozyme, DNase, RNase, pronase처리한 inhibitor의 activity는 각각 90%, 94%, 99%, 102%, 102%, 94%, 97% 등으로 대조군에 비하여 유의성있는 변화를 보이지 않았다(Table II).

3.2. Inhibitor의 농도 변화에 따른 protein methylase의 inhibitory effect—순수정제된 inhibitor를 이용하여 protein methylase inhibitor에 대한 순수 정제된 돼지 비장의 PM II에 대한 억제효과를 검색하여 Fig. 2에 표시한 바와 같이 600 pmole에 93%, 450 pmole에 91%, 375 pmole에 90%, 300 pmole에 86%, 150 pmole에 80%, 75 pmole에 70%, 60 pmole에 64%, 30 pmole에 46%, 15 pmole에 34% 억제하는 결과를 얻었다(Fig. 2).

3.3. Inhibitor와 SAH(S-adenosyl-L-homocysteine)

Table I—Amino acid composition of protein methylase inhibitor.

Amino acids detected	Minimum number of residues calculated	number of residues	Percentage composition
Aspartic acid	2.01	2	10.98
Glutamic acid	2.38	2	13.00
Serine	0.88	1	4.80
Glycine	2.96	3	16.17
Histidine	1.00	1	5.46
Alanine	5.15	5	2.81
Methionine	1.76	2	9.60
Phenylalanine	1.17	1	6.39
Lysine	1.00	1	5.46
		18	100%

Table II—Effect of various digestive enzymes on protein methylase inhibitor

Digestive enzyme	Inhibition(%)
Control	100
Trypsin	99
Lysozyme	102
DNase	102
RNase	94
Pepsin	90
Pronase	97
Chymotrpsin	94

* Forty five pmole of the purified inhibitor was incubated with digestive enzymes(1 unit) for 2 hr. After incubation, the incubation mixture was boiled. Results are expressed as the percentage inhibition on the control enzyme (porcine liver PMII : S.A. 307 pmole of S-adenosyl-L-(methyl-¹⁴C) methionine/min/mg) activity.

의 상관관계—Protein methylases에 상경적 억제작용을 하는 것으로 알려진 SAH와의 상관관계를 알아보기 위해 정제된 porcine spleen PM II를 이용하였다. Inhibitor 300 nM의 inhibition 정도는 47%이었고 SAH 10 μM 단독의 inhibition 정도는 46%이었다. SAH와 inhibitor를 동시에 넣고 assay하였을 때는 inhibition이 64%로 증가하였다(Table III).

3.4. Inhibitor가 효소활성에 미치는 영향—Protein methylase inhibitor가 효소활성에 미치는 영향은 기질인 histone 농도 및 inhibitor의 농도를 변화시켜 효소의 활성을 측정하여 알아보았다. Histone의 농도는 15 mg/ml, 7.5 mg/ml, 3.75 mg/ml이었고 protein methylase inhibitor의 농도는 15 pmole, 30 pmole, 45 pmole이었다. Porcine liver, spleen, testis에서 정제

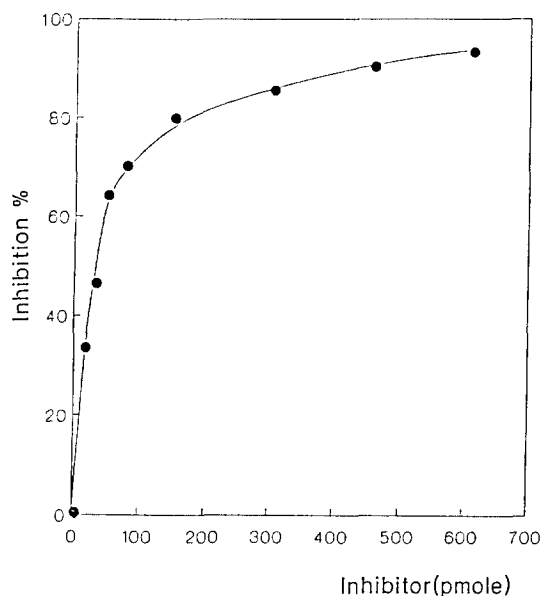


Fig. 2—Relationship between the concentration of protein methylase inhibitor and its inhibitory effect on protein methylase II. Incubation mixture contained 20 μl citrate phosphate buffer, 20 μl histone type II-A(30 mg/ml), 20 μl partially purified PM IIs, ¹⁴C-SAM, and appropriate amounts of inhibitory fraction. The mixture was incubated for 10 min at 37°C and assayed as the routine method.

한 PM II에 대하여 비상경적 억제작용을 하는 것으로 나타났으며, Ki value는 각각 300 nM, 250 nM, 297 nM이었다(Fig. 3)(Table IV).

3.5. 수종의 SAM-dependent methyltransferase에

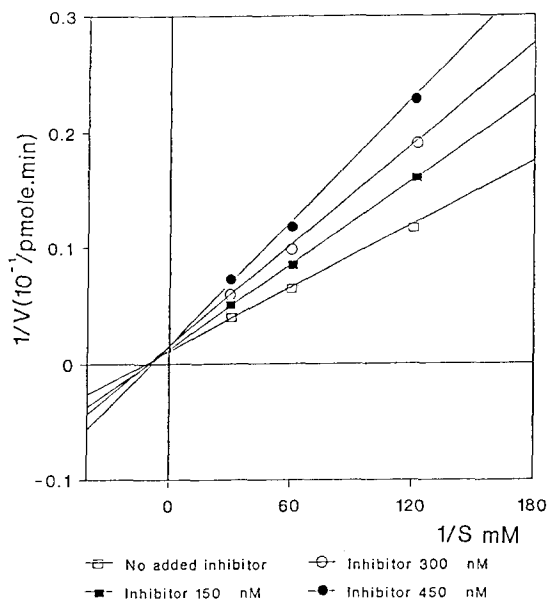


Fig. 3—Effect of protein methylase inhibitor on protein methylase II. Incubation mixture contained 20 μ l citrate phosphate buffer, 20 μ l histone type II-A(30 mg/ml), 20 μ l partially purified PM II, 14 C-SAM, and appropriate amounts of inhibitory fraction. The mixture was incubated for 10 min at 37°C and assayed as the routine method.

Table III—Competition between protein methylase inhibitor and SAH

Inhibitors		Inhibition(%)
Purified inhibitor	SAH	
—	—	0
—	10 μ M	46
300 nM	—	47
300 nM	10 μ M	64

* Incubation mixture contained 20 μ l citrate phosphate buffer(pH 6.0), 20 μ l histone type II-A(60 mg/ml), 20 μ l partially purified protein methylase IIs (porcine liver PM II(S.A. 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C)methionine/min/mg), 10 μ l S-adenosyl-L-[methyl- 14 C]methionine, and 30 μ l of inhibitory fraction. The mixture was incubated for 10 min at 37°C and assayed as the routine method.

Table IV—The Effects of protein methylase inhibitor on various protein methylase II from porcine

Source of protein methylase II	Ki value(nM)
Liver	300
Testis	297
Spleen	250

* Incubation mixture contained 20 μ l citrate phosphate buffer (pH 6.0), 20 μ l histone type II-A(15 mg/ml, 7.5 mg/ml, 3.75 mg/ml), 20 μ l partially purified protein methylase IIs(porcine liver PM II (S.A. 307 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C) methionine/min/mg, porcine spleen PM II(S. A. 309 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C)methionine/min/mg, porcine testis PM II(S.A. 297 pmoles of S-adenosyl-L-(methyl- 14 C)methionine/min/mg), 10 μ l S-adenosyl-L-[methyl- 14 C] methionine, and 30 min. at 37°C and assayed as the routine method.

Table V—Effect of protein methylase inhibitor on various SAM dependent methyltransferase from porcine liver

methyltransferases	Inhibition (%)
Protein methylase I	33
Protein methylase II	47
Protein methylase III	31
Phospholipid methyltransferase	35

* Incubation mixture contained 20 μ l citrate phosphate buffer (pH 6.0), 20 μ l histone type II-A (60 mg/ml), 20 μ l partially purified protein methylase I, II, III, phospholipid methyl-transferase(cpm: 4,000~5,000), 10 μ l S-adenosyl-L-[methyl- 14 C] methionine, and 30 μ l purified inhibitor. The mixture was incubated for 10 min at 37°C and assayed as the routine method.

대한 inhibitor의 영향— 돼지 간장에서 부분정제한 PM I, PM II, PM III, phospholipid methyltransferase에 대한 정제된 methylase inhibitor의 영향을 조사해보면 각각 33%, 47%, 31%, 35%의 억제효과를 나타내었다(Table V).

고 찰

Transmethylation은 생체내에서 methyl donor인 SAM으로부터 methyl기를 받아 methylase의 촉매작용으로 단백질, DNA, phospholipid 등의 기질을 메틸화하여 세포내에서 여러가지 기능을 나타내는 중

요한 생화학적 현상의 하나이다. SAM은 생체내에서 거의 유일한 methyl donor로 세포내 대사 및 기능에 중요한 영향을 끼치는 물질이다.¹⁶⁾ 이에 못지 않게 세포내에서 protein methylation 현상 및 그 조절에 관여 할 것으로 사료되는 또 다른 인자에는 protein methylase inhibitor가 있다. Kim 등¹⁰⁾은 PM II의 정제시 간장내에 natural inhibitor의 존재를 인식하고 PM II inhibitor를 쥐의 간에서 부분정제하였는데 투석막을 통과하지 못하며, 열에 불안정하고 trypsin에 의해서 저해효과가 감소되는 것으로 보아 단백질의 성질을 가지는 물질로 추정하였다. 그러나 본 실험에서 정제한 protein methylase inhibitor는 투석막을 통과하는 열에 안정한 물질로 가수분해 효소에 저해효과가 감소하지 않는 것으로 보아 서로 상이한 물질로 생각된다. Lyon 등¹⁷⁾이 토끼의 간에서 분리한 Methinin도 아미노산의 조성 등으로 비교해 볼 때 본 실험에서 정제한 protein methylase inhibitor와 동일한 물질이 아닌 것으로 추측된다. Chiva와 Mato 등¹³⁾에 의해 쥐 간장의 세포질 분획에서 부분정제한 phospholipid N-methyltransferase inhibitor는 세포질에 존재하며, 열에 안정하고, trypsin 처리에 의하여 저해효과가 저하되지 않는다는 점에서 protein methylase inhibitor와 유사하였다. 1986년 Hong 등¹¹⁾이 흰쥐의 간장내 microsomal fraction으로부터 분리정제한 inhibitor는 UV spectrum과 fluorescence spectrum으로부터 추정된 결과 methinin이 가지고 있는 것과 상이한 chromophore를 함유한다고 하였다. 또한 열에 안정하며, trypsin, chymotrysin, DNase, RNase 등의 처리에 inhibitory activity가 저해되지 않는데, 이러한 점은 본 실험에서 분리정제한 protein methylase inhibitor와 유사하였으나, 아미노산 조성과 UV spectrum은 서로 다르므로 본 실험에서 분리정제한 protein methylase inhibitor와는 성질은 유사하나 구조는 다른 물질로 생각된다.

Salmonella의 flagella protein으로부터 methyllysine이 발견된 이래 과거 30여년간 protein methylation현상에 대한 활발한 연구가 진행되어 세포증식, 유전인자의 조절작용, 카르니틴 생합성, 신경세포의 수초화(myelination), 신호전달체계^{18,19)} 등 중요한 세포내 생화학적 작용에 protein methylation이 관여함이 보고 되었다. 특히 최근 관심의 초점이 되고 있는

ras oncogene은 암조직이나 transformed human cell line에서 거의 공통적으로 발견되는 oncogene으로서 그 products인 p21 protein의 C-말단 시스테인 잔기는 carboxymethylation되어 있으며 또한 palmitic acid와 같은 long chain fatty acid가 결합되어 있는데, 시스테인의 carboxymethylation의 의미는 확실히 밝혀져있지 않으나 세포막에 대한 친화력을 증가시켜 암세포로 변환하게 한다고 한다.¹⁹⁾ 이러한 Oncogene연구의 중요한 목적중의 하나는 높은 특이성과 낮은 부작용의 약물을 개발하는 데 있다. 이와같은 관점에서 볼때 위에서 언급한 일련의 p21 protein의 C-terminal processing현상을 새로운 약물개발에 이용할 수 있다.²⁰⁾ 즉 p21 단백질의 C-terminal processing을 억제함으로써 암세포로의 전환을 저해할 수 있을 것이므로 생체내에 존재하는 p21 단백질 C-terminal processing 억제제의 확인 및 정제는 항암제 연구와 직결된다. 구체적으로 farnesyl-protein transferase inhibitor 혹은 S-farnesylcysteine methyltransferase (protein methylase II의 type III) inhibitor의 확인 및 정제는 위에서 언급한 것과 같은 목적을 달성할 수 있는 가능성이 크다고 할 수 있다.²¹⁾ 본 실험에서 분리정제한 protein methylase inhibitor는 protein methylase I, II, III, phospholipid methyltransferase 등 수종의 SAM dependent methyltransferase에 비특이적으로 억제하는 것으로 보인다. 그러므로 정제된 inhibitor는 역시 ras p.21 product의 processing을 억제하여 항암효과를 가질 것으로 추정된다. 하지만 좀 더 정확한 기전을 알기 위해서는 먼저 p21 단백질의 C-terminal processing에 관여하는 효소인 S-farnesylcysteine methyltransferase에 기질로서 작용할 수 있는 S-trans, trans-farnesyl-L-cysteine(AFC) 등을 합성하고,²⁰⁾ 정제한 inhibitor가 S-farnesylcysteine methyltransferase inhibitor로 작용하는지의 여부를 확인하여야 할 것이다.

앞에서 언급한 바와 같이 동물세포내에서 생리적으로 다양한 기능을 가지고 있는 메틸화 현상을 조절할 것으로 추정되는 분리정제한 protein methylase inhibitor는 protein methylase II에 대하여 비상경적 억제작용을 하므로, 상경적 억제작용을 하는 SAH와는 다른 조절작용을 하는 것으로 볼 수 있으며, incubation time이 증가할수록 저해력이 감소하는 것으로

보아 가역적 억제작용을 하는 것으로 생각된다. 그리고 돼지의 간장, 비장, 정소 등에서 분리정제한 PM II에 대하여 Ki value를 보면 서로 유사한 것으로 보아 조직 특이성은 없는 것으로 볼 수 있다.

또한 본 실험에서 분리정제한 protein methylase inhibitor는 PM I, II, III, phospholipid methyltransferase에 대하여 현저한 저해효과를 나타냈는데, 지금까지 알려진 이러한 protein methylase들이 관여하는 생체내 기능들과 연결하여 볼 때 분리정제한 protein methylase inhibitor는 항암제, 항바이러스제 등의 약물개발 가능성이 매우 높다고 볼 수 있으며, 실제적으로 상경적 억제작용을 하는 SAH와 SAH의 analogue들은 oncogenesis와 관련하여 많은 연구를 하고 있다.

결 론

돼지간장 soluble fraction을 분획화, 가열, sephadex G-25 chromatography, reverse phase HPLC, size exclusion HPLC 등의 방법을 이용하여 protein methylase inhibitor를 분리정제하고 이 inhibitor의 순도, 성질을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정제한 inhibitor는 HPLC에서 단일 peak를 나타냈다.
2. Inhibitor는 18개의 아미노산으로 구성된 분자량 1,400 Da의 peptide로 alanine이 비교적 많았다.
3. Inhibitor는 열에 안정하였으며, Chymotrypsin, Pepsin, Trypsin, DNase, RNase, Lysozyme, Pronase 등의 처리에 저해력이 영향을 받지 않았다.
4. 정제한 inhibitor는 돼지 간에서 정제한 PM I, PM II, PM III, Phospholipid methyltransferase에서 30~40%의 inhibitory effect를 나타내었다.
5. 돼지 간, 비장, 정소 등에서 분리정제한 PM II에 대한 Inhibitor의 효과를 보면 비상경적 억제작용을 하는 것으로 나타났으며, Ki value는 각각 300 nM, 250 nM, 297 nM로 서로 유사하였다.

문 헌

1) Paik, W. K., Kim, S. D. and Lee, H. W.: *Enzymology of protein methylation: Recent development, Biological methylation and drug design*, The Humana

- Press, Clifton, New Jersey p. 15 (1986).
- 2) Springer, W. R. and Koshland, D. E., Jr.: Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 533 (1977).
 - 3) Stock, A., Wylie, D., Mottonen, J., Lupas, A., Schutt, C. and Stock, J., Phosphotransferase networks mediate stimulus-response coupling in bacteria. *C.S.H. S.Q.B.*, **53**, 49 (1988).
 - 4) Murry, K., The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones, *Biochemistry*, **3**, **10**, (1964).
 - 5) Horne, D. W. and Broquist, H. P.: Role of lysin and ϵ -N-trimethyl-lysine in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2170 (1973).
 - 6) Young, P. R. and Waickus, C. M.: Purification and kinetic mechanism of S-adenosylmethionine: myelin basic protein methyltransferase from bovine brain, *Biochem. J.*, **250**, 221 (1988).
 - 7) Chaney, S. Q., Halpern, B. C., Halpern, R. M. and Smith, R. A.: Transfer RNA methylase inhibitors in neoplastic and normal rat tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1209 (1970).
 - 8) Coward, J. K. and Crooks, P. A., In vitro and in vivo effects of S-tubercidinylhomocysteine: a physiologically stable methylase inhibitor. *in transmethylation*, Usdin, E., Borchart, R. T. and Creveling, C. R., Eds., Elsevier/North Holland, New York, 215 (1979).
 - 9) Kerr, S. J.: Natural inhibitor of the transfer ribonucleic acid methylase. *Biochemistry*, **9**, 690 (1970).
 - 10) Kim, S and Paik, W. K.: Natural inhibitor for protein methylase II. *Biochem. Biophys. Acta*, **252**, 526 (1971).
 - 11) Hong, S. Y., Lee, H. W., Desi, S., Kim, S. and Paik, W. K.: Studies on naturally occurring proteinous inhibitor for transmethylation reactions. *Eur. J. Biochem.* **156**, 79 (1986).
 - 12) Hashizume, K. Kobayashi, Yamauchi, K., Ichikawa, K., Haraguchi, K. and Yamada, T.: Evidence for the existence of protein inhibitors for S-adenosyl-L-methionine-mediated methylation of phosphatidylethanolamine in rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 108 (1983).
 - 13) Chiva V. A. and Mato, J. M.: Inhibition of phospho-

- lipid methylation by a cytosolic factor: *Biochem. J.*, **218**, 637 (1984).
- 14) Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*, Posttranslational modifications, Vol. 106A. Academic Press, Inc. New York, p. 265 (1984).
- 15) Castano, J. G., Alemany, S., Nieto, A. and Mato, J. M.: Activation of phospholipid methyltransferase by glucagon in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9041 (1980).
- 16) Paik, W. K. and Kim, S.: *Protein methylation*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p. 23 (1990).
- 17) Lyon, E. S., Mcphie, P. and Jakoby, W. B.: Methinin: A peptide inhibitor of methylation: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 846 (1982).
- 18) Finegold, A. A., Schaffr, W. R., Rine, J., Whiteway, M. and Tamanoi, F.: Common modifications of trimeric F proteins and ras protein: Involvement of Polyisoprenylation: *Reports*, 13, July, 165 (1990).
- 19) Gibbs, J. B.: Ras C-terminal processing enzymes- New drug targets? *Cell*, **65**, 1 (1991).
- 20) Reiss, Y., Goldstein, J. L., Seabra, M. C. Casey, P. J. and Brown, M. S.: Inhibition of purified p.21^{ras} farnesyl: Protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell*, **62**, 81 (1990).
- 21) Volker, C., Miller, R. A. and Stock, J. B.: S-Farnesylcysteine methyltransferase in bovine brain.: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. **1**(3), 283 (1990).