

## 돼지 간 및 정소에서 단백질 카르복실메틸화 현상

조재열 · 김성수 · 이향우\* · 홍성렬#  
성균관대학교 생명공학부 유전공학과, \*약학부  
(Received December 5, 2000; Revised January 10, 2001)

### Protein Carboxyl O-Methylation in Porcine Liver and Testis

Jae Youl Cho, Sungsoo Kim, Hyang Woo Lee\* and Sungyoul Hong#

*Department of Genetic Engineering, Faculty of Life Science and Technology,*

*\*Faculty of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*

**Abstract** — Protein carboxyl O-methylation is a kind of enzymatic reaction producing carboxyl methylester catalyzed by protein carboxyl O-methyltransferases at the carboxyl group of amino acid residues in polypeptide. Since the finding of carboxyl methylester, many studies have been focused on the understanding of biological functions in eukaryotes but still not clear except for roles in Ras attachment to membrane and protein repair. In this study, we investigated the protein carboxyl methylation in porcine liver and testis in respect of identification and characterization of carboxyl methylesters and natural proteinous substrates using pH stability of the esters and electrophoresis under acidic and basic conditions. We detected several kinds of methyl esters, 3 kinds each in cytosolic fractions from liver and testis. Under the treatment of strong acid and base, the ratio between base-stable substrates and unstable ones in liver (4 : 6) was different from the ratio obtained in testis (6 : 4). The methyl accepting capacities were affected by enzymatic proteolysis between the range of 55 to 65% in liver and of 35 to 45% in testis. Separation of the methylated proteins by acidic electrophoresis in the presence of urea and SDS revealed distinctively natural substrates of 26, 33 and 80 kD in the cytosol from liver, and of 14, 25, 32 and 86 kD from testis. Most of the labelling, however, were lost following electrophoresis under moderate alkaline condition, except for molecules of newly detected 7 and 17 kD in liver, and 15, 29, 40 and 80 kD in testis. From these results, it was proposed that protein carboxyl O-methylation in each organs may be catalyzed by different classes of protein carboxyl O-methyltransferases. In addition, it is suggested that the protein carboxyl methylation in liver and testis may have different patterns in respect of natural substrates.

**Keywords** □ Protein carboxyl methyl esters, protein carboxyl O-methyltransferase, natural substrates

생합성된 단백질의 공유적 변형 과정의 하나인 protein carboxyl methylation(PCM)은 12개의 ATP를 소모하면서 기질 단백질내 아미노산 잔기의 carboxyl기에 메틸기를 전달하는 과정이며, 이들 반응에 의해 메틸화 된 단백질은 고유전하 또는 소수성의 차이가 생기게되어 생체내에서의 기능이 변화하는 것으로 추정된다.<sup>1)</sup> 이들 반응은 1 ATP를 소모하는 인산화반응보다 많은 에너지 소모를 수반함으로써 다소

비경제적인 반응으로 여겨지고 있으나, 원핵세포 뿐 아니라 진핵세포 내에서도 널리 확인되는 것으로 보아 중요한 생물학적 역할을 담당할 것으로 예상된다. Protein carboxyl methylation은 특정 단백질과 S-adenosylmethionine(AdoMet)을 기질로 하는 protein carboxyl O-methyltransferase (PCMT, 혹은 protein methylase II; EC 2.1.1.24)에 의해 촉매되는 반응으로서<sup>2)</sup> AdoMet으로부터 메틸기가 유리되어 형성되는 S-adenosylhomocysteine(AdoHcy) 과 일부 장기에서 보고된 천연 단백질 저해제<sup>3-5)</sup> 및 생리적 pH, carboxyl methylesterase 등에 의해 조절되는 것으로 추측된다.<sup>6,7)</sup>

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 031-290-7862 (팩스) 031-290-7895

Protein carboxyl methylation은 메틸화 되는 아미노산 잔기 부위에 따라 네가지 classes로 분류되며 각 class는 각기 다른 효소에 의해 촉매되는 것으로 보고되고 있다.<sup>1)</sup> Class I은 glutamyl 잔기에 carboxyl methylester(CME)가 형성된 것으로 세균의 화학주성 반응에서 관찰되며 알칼리 처리 시에도 안정한 결합력을 나타낸다.<sup>8)</sup> Class II는 특히 PCMT와 동일하다고 여겨지는 protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase(PIMT; E.C. 2.1.1.77)로서 비정상 아미노산 잔기인 L-isoaspartyl 잔기나, D-aspartyl 잔기에 CME가 형성되는 것으로서 단백질의 수복 현상에서 관찰되며 특히 이들 CME는 염기 불안정성을 지니므로 산성 조건에서만 동정된다.<sup>9,10)</sup> Class III는 발암 유전인자 산물의 변형과정에서 발견된 것으로서 yeast mating factor,<sup>11)</sup> ras oncogene product,<sup>12)</sup> G protein,<sup>13)</sup> rhodopsin kinase,<sup>14)</sup> nucleotide phosphodiesterase<sup>15)</sup> 등 신호전달 과정에 참여하는 단백질들의 공통적인 C-말단 cysteine 잔기에 CME가 형성되는 것으로서 지질화 반응과 함께 세포막 부착 과정을 촉매한다. Class IV는 Xie와 Clarke 등에 의해 protein phosphatase 2A catalytic subunit의 C-terminal leucine에 위치하는  $\alpha$ -carboxyl기에서 발견되는 CME로서 이들 효소의 활성을 조절하는 것으로 보고되었으며,<sup>16,17)</sup> 이들 두 CME는 염기조건에서도 매우 안정한 것으로 확인되었으며 각기 선택적인 메틸화 효소에 의해 형성되는 것으로 보고되고 있다.

포유동물의 장기나 조직 혹은 세포내에서 이제까지 알려진 PCM의 생물학적 고유기능은 뇌조직이나, 신경 조직 등의 호르몬이나, 신경 전달물질의 분비과정,<sup>18,19)</sup> 정자의 운동성,<sup>20)</sup> 백혈구나 거식세포와 같은 면역반응에 관여하는 세포들의 운동성,<sup>21)</sup> 혈액내 적혈구나 *Xenopus oocyte*에서 변형 혹은 노화된 단백질의 수복 현상<sup>9,10,22)</sup> 세포 분화<sup>23)</sup> 등에서 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 추측되고 있다.

본 연구실에서는 포유동물내 PCM 기능을 조사하기 위해서 일차적으로 돼지 간 및 정소로부터 PCMT 정제 연구를 실시하여, 이들 장기내에서 PCMT의 활성이 매우 높다는 것을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 돼지 간 및 정소내에서 PCM에 의해 생성된 CME를 동정하고 기질단백질을 확인함으로써 기존 포유동물의 PCM 연구결과들과 비교하고자 하였으며, 아울러 간 및 정소간 PCM의 조직특이적 반응에 관한

가능성을 고찰하고자 하였다.

## 실험방법

**재료 및 기기** - 시료로서 돼지(*Sus scrofa domestica*)의 간장 및 정소를 수원 도축장으로부터 취해서 냉장 운반하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관 후 사용하였다. 간장의 세포질 PCMT는 Kim 등의 방법<sup>24)</sup>으로, 정소 PCMT는 Jung 등의 방법<sup>25)</sup>으로 정제하여 사용하였다. S-adenosyl-L-[methyl- $^{14}\text{C}$ ]methionine( $^{14}\text{C}$  AdoMet, specific activity: 50 mCi/mM)은 ICN Radiochemicals사(Irvine, CA, USA) 제품을 구입하였다. Chymotrypsin, pepsin, phenylmethylsulfonyl fluoride, trypsin과 기타 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

**세포 분획** - 장기들은 Waring blender로 4배량의 sucrose용액(0.25 M)을 이용하여 균질화하고 원심 분리하였다.<sup>26)</sup> 먼저 고속 원심 분리를 이용해서  $600 \times \text{g}$ 로 10분 동안 원심 분리하고, 다시 상등액을  $15,000 \times \text{g}$ 로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 세포질은 상등액을  $105,000 \times \text{g}$ 로 1시간 동안 초원심분리하여 얻었으며, 이들 중 일부로부터 PCMT를 부분 정제하였다. 또한 세포질의 일부는 고체 ammonium sulfate로 80% 포화 처리하였으며, 원심분리하여 얻어진 침전물은 20 mM tris 완충용액(pH 8.0, 0.2 mM EDTA, 15 mM mercaptoethanol), 10 mM imidazole 완충용액(pH 7.0)에서 여러 번 반복하여 투석하였다. 이들을  $15,000 \times \text{g}$ 로 1시간 원심 분리하여 얻어진 분획을 이용하였다.

**Methyl accepting capacity(MAC)의 측정(메탄올 추출법)** - 강알칼리 조건에서 메탄올이 형성되는 CME의 성질을 이용하여 PCMT 활성에서 기인된 기질 단백질들의 MAC를 Diliberto등의 방법<sup>18)</sup>을 변형하여 측정하였다. 간과 정소의 전체 균질액이나  $105,000 \times \text{g}$  상등액 및 농축 세포질 분획(80% ammonium sulfate dialysate) 등을 citrate-phosphate(pH 6.5) 완충용액과 3분 동안  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양시킨 후,  $^{14}\text{C}$ AdoMet 및 동일 비활성을 가지는 PCMT 분획을 각 시간에 따라 배양하였다. 배양 종결은 1.5배의 0.175 M sodium borate 완충용액을 첨가하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 7분 정도 방치하여 실시하였다. 계속해서 30분 이상 얼음 속에서 방치한 후, 1 ml의 isoamyl alcohol을 넣고 10초 동안

충분히 혼화하고 4°C, 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 분리된 상층액의 500 µl을 취해서 scintillation counter로 방사능량을 측정하고, 구하여진 값을 2배하고, 각 단백질 농도에 따라 pmol/mg protein으로 환산하였다. 단백질 농도는 표준 단백질로 bovine serum albumin을 이용하여 Bradford의 방법에 의해 실시하였다.<sup>27)</sup>

**Methyl accepting capacity의 측정(염기 휘발법)** - 전기영동 후, 각 단백질 분획의 MAC 측정은 다음의 방법으로 실시하였다. 80°C에서 한시간 동안 건조된 겔을 0.2 cm씩 절편하여 80 µl의 1 M NaOH 용액이 들어있는 마이크로튜브 속에 넣고, 2.5 ml의 scintillation fluid가 들어있는 6 ml용 scintillation vial에 옮겨 뚜껑을 닫은 후 37°C에서 12시간 이상 배양하였다. 이때 포집된 [<sup>14</sup>C]메탄올을 counter를 이용하여 측정하였다.<sup>28)</sup>

**pH 8.9에서 carboxyl methylester 가수분해 kinetics** - 약염기 조건에서 불안정한 CME의 종류를 동정하기 위해 20분 동안 배양된 배양 혼합물에 4배의 0.1 M tris 완충용액(pH 8.9)을 첨가한 후 0분에서부터 274분까지 37°C에서 배양하고 메탄올 추출법으로 유리된 CME를 정량하였다.<sup>29)</sup> 얻어진 결과는 RSTRIP 프로그램을 이용하여 각 피이크로부터 반감기와 남아있는 양을 계산하였다.

강산 및 강염기 처리에 의한 영향- 강산 및 강염기에서 특이적으로 분해되는 CME를 동정하기 위해 6 N HCl과 0.175 M sodium borate 완충용액(pH 11.0)을 처리하였다.<sup>30,31)</sup> Isoamyl alcohol로 추출한 [<sup>14</sup>C]메탄올을 유도하여 MAC를 측정하였다. 배양 혼합액은 30 µl의 완충용액, 50 µl의 농축 세포질 분획(10 mg/ml), 10 µl의 10 M [<sup>14</sup>C]AdoMet으로 구성되어 있으며, 배양은 37°C에서 2시간 동안 실시하였다. 강염기 불안정성 CME 측정은 배양혼합물 중 40 l를 취해서 80 µl의 sodium borate 완충용액과 30분 배양한 후 isoamyl alcohol을 이용하여 정량하였다. 또한 강산 불안정성 CME 정량은 배양혼합액 40 µl에 80 µl의 6 N HCl을 처리하여 37°C에서 10시간 동안 배양시키고 동일방법으로 측정하였다.

**단백질 가수분해 효소에 의한 영향** - 농축 세포질 분획의 MAC에 대한 단백질 가수분해 효소의 영향은 α-chymotrypsin, pepsin 및 trypsin을 각각 2 unit씩 처리 후, 활성을 억제시킨 다음, [<sup>14</sup>C]AdoMet과

PCMT 분획을 함께 배양시키고 MAC를 측정하여 조사하였다.<sup>30,32)</sup> α-chymotrypsin 처리는 pH 8.0의 tris 완충용액 10 µl, 농축 세포질 분획(20 mg/ml) 30 µl, chymotrypsin 10 µl로 반응 혼합물을 만들고 25°C에서 2.5시간 동안 배양하였다. Trypsin 처리도 pH 6.0의 0.25 M citrate 완충용액을 제외하고 동일한 방법으로 실시하였다. 이들 단백질 분해효소 처리는 3 mM PMSF로 하고 30분 동안 0°C에 방치하여 종결시켰다. Pepsin은 pH 2.0의 0.25 M citric acid-NaOH 완충용액을 같은 방법으로 처리하여 37°C에서 2.5시간 동안 배양시키고 pH 6.0의 배양 완충용액을 첨가하여 종결시켰다. 각 종결된 분획으로부터 15 µl를 취해서 완충용액 20 µl, PCMT 분획 10 µl, [<sup>14</sup>C]AdoMet 5 µl를 넣어 전체 50 µl의 양으로 20분 동안 37°C에서 배양시키고 메탄올 추출법으로 MAC를 정량하였다. 무처리군은 단백 가수분해 효소를 처리하지 않고 농축 세포질분획과 PCMT 분획 및 [<sup>14</sup>C]AdoMet을 동일한 조건에서 배양시켰다.

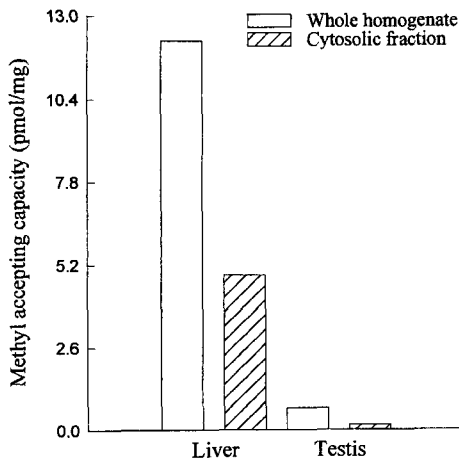
**플리아크릴아마이드 겔 전기영동(산성 조건)** - pH 2.4에서 요소와 SDS등을 함께 혼합함으로써 변성능과 분리능을 높인 Fairbanks와 Avruch의 방법<sup>33)</sup>을 변형하여 1.5 mm-thick vertical slab gels에서 실시하였다. 위에서 언급된 방법으로 배양된 시료는 완충용액 (pH 2.4, 50 mM sodium phosphate, 3% SDS, 8 M urea, 20% glycerol, 30 mM 2-mercaptoethanol, 0.3% pyronin Y 함유)을 이용하여 반응을 종결시키고 상온에서 15분 방치 후 원심분리하여 얻은 상층액을 각 레인에 loading하였다. 70 mA 조건에서 상수로 냉각하면서 tracking 염료가 완전히 겔로부터 빠져나가게 한 후, 염색용액으로 4시간 정도 염색하고 탈색하였다. 겔 건조는 약 1시간 정도 aspiration과 함께 80°C에서 실시하였다. 표준 단백질은 phosphorylase B-97.3 kD, bovine albumin-66 kD, ovalbumin-45 kD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-36 kD, carbonic anhydrase-29 kD, soybean trypsin inhibitor-20.1 kD 및 α-lactalbumin-14.2 kD를 사용하였다.

**플리아크릴아마이드 겔 전기영동(염기성 조건)** - 산성 조건에서 동정된 기질 단백질이 염기조건에서도 확인되는 지를 알아보기 위하여 Laemmli의 방법<sup>34)</sup>에 의해 pH 7.8에서 전기영동을 실시하였다. 표준 단백질은 산성조건과 동일하게 사용하였다.

**실험결과**

**간 및 정소 세포질 분획의 MAC 비교** - 간 및 정소에서 정제된 PCMT는 세포질 분획에서 가장 높은 활성도를 보였으므로, 이들 장기의 세포질(105,000×g 상층액)이 나타내는 MAC를 장기별로 비교 조사하였다. Fig. 1에서 보는 것처럼 간 균질액에서 가장 높은 MAC가 확인되었으며 세포질에서도 균질액과 동일한 경향을 보였다. 또한 세포질은 균질액에 비해 2배 혹은 3배 정도 낮은 MAC를 보였다. 한편 각 장기의 세포질을 ammonium sulfate로 농축하고 투석 후 얻어진 농축 세포질 분획은 세포질에 비해 2배 정도 높은 활성도를 보였다. 따라서 각 장기내 PCM은 농축 세포질 분획을 사용하여 실시하였다.

**pH 8.9 조건에서 CME의 가수분해 kinetics** - CME의 종류 및 비율을 확인하기 위하여 pH 8.9 조건에서 여러 시간에 따른 CME의 가수분해 kinetics를 평가하여 Table I과 Fig. 2에 나타냈다. pH 8.9에서 가수분해된 CME로부터 간과 정소는 3가지 종류의 CME가 동정되었으며 간은 반감기가 0.95(83.4%) 분, 10.68(3.3%) 및 807.37(13.3%) 분이, 정소는 0.86(77.3%), 10.53(6.4%), 458.82(17.3%)분으로 나타났다.

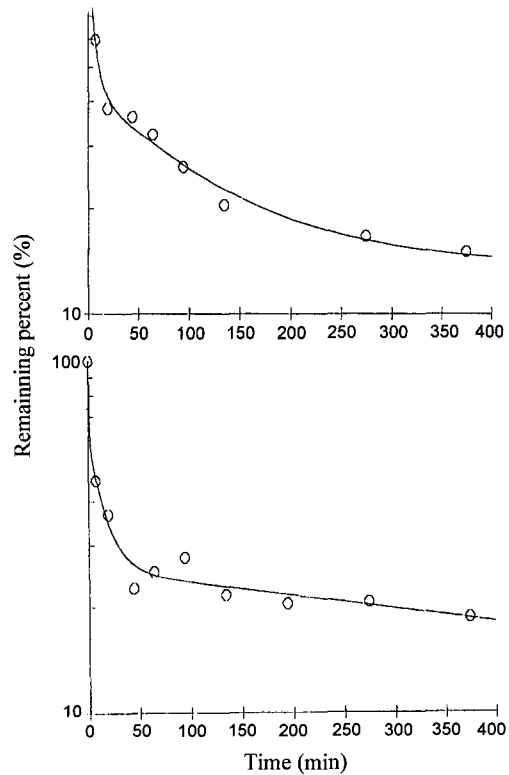


**Fig. 1** - Distribution of methyl accepting capacity for porcine liver and testis. Each fraction was prepared by subcellular fraction. Preparation of mixture was described in Materials and Method. The radioactivity of volatile materials was measured by methanol extraction method as described in Materials and Methods.

**Table I** - The hydrolysis rate of carboxyl methylester from natural substrates in cytosolic fractions by pH 8.9

| Half life          | Liver  |                   | Testis |                   |
|--------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|
|                    | Min    | Remaining percent | Min    | Remaining percent |
| T <sub>1/2</sub> 1 | 0.95   | 83.4              | 0.86   | 77.3              |
| 2                  | 10.68  | 3.3               | 10.53  | 6.4               |
| 3                  | 807.37 | 13.3              | 453.82 | 17.3              |

**HCl처리와 sodium borate 완충용액처리에 의한 효과** - 각 장기간에 PCM 비교를 위해 6N HCl과 sodium borate 완충용액(pH 11.0)을 처리하여 산 불안정성 CME와 염기 불안정성 CME의 비율을 조



**Fig. 2** - Hydrolysis rate of protein carboxyl methylesters (CMEs) at pH 8.9. Fraction was labeled by incubation with 20 μM [<sup>14</sup>C]AdoMet for 20 min at 37°C. Then methylated fraction was transferred to 0.1 M tris buffer, pH 8.9 and incubated at 37 for various lengths of times. The number of methyl esters which remained was determined at each time point as acid-precipitable, base labile organic extractable, volatile radioactivity.

**Table II** – Effect of bases or acids on base-, acid-labile and volatile radioactivity<sup>a</sup>

| Tissue | Treatment                |             |
|--------|--------------------------|-------------|
|        | HCl                      | NaBorate    |
|        | (pmol/mg protein)        |             |
| Liver  | 11.3 (39.4) <sup>b</sup> | 17.4 (60.6) |
| Testis | 5.1 (61.4)               | 3.2 (38.6)  |

<sup>a</sup>Cytosolic fractions were methylated in the presence of 10  $\mu$ M of [<sup>14</sup>C]AdoMet for 2 hr at 37°C and methylated mixture was incubated in 0.175 M sodium borate buffer (pH 11.0), for 30 min at 37°C. For treatment of hydrochloric acid, methylated fractions were hydrolyzed in 6N HCl for 10 hr at 37°C. Then hydrolyzed volatile materials extracted in isoamyl alcohol as described in Materials and Methods.

<sup>b</sup>Percent for total radioactivity

**Table III** – Proteolysis of cytosolic fractions<sup>a</sup>

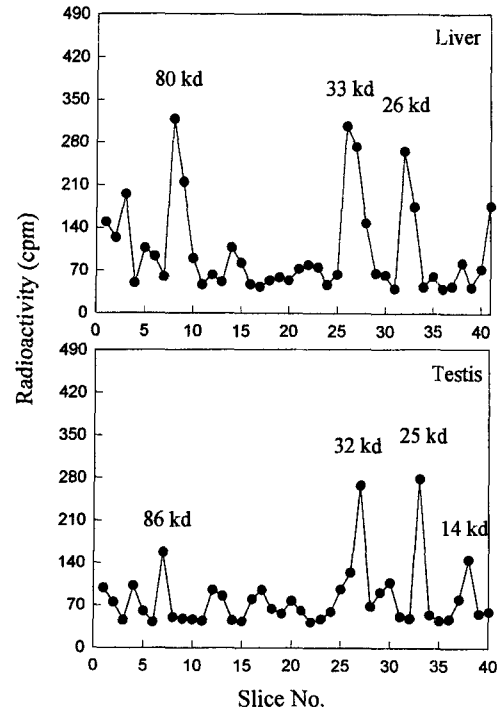
| Tissue | No Treatment (%) | treatment    |        |         |
|--------|------------------|--------------|--------|---------|
|        |                  | Chymotrypsin | Pepsin | Trypsin |
| Liver  | 100              | 47.6         | 34.6   | 33.1    |
| Testis | 100              | 128.2        | 69.9   | 65.6    |

<sup>a</sup>Cytosolic fractions were treated with digestive enzymes as described in Materials and Methods. After inactivation of proteases, the treated fractions were methylated with purified PM II and the MAC was measured as described in Materials and Methods.

성 CME의 비율이 염기 안정성 CME의 비율보다 더 크며, 정소는 산 안정성 CME의 비율이 염기안정성 CME보다 더 큰 경향을 보였다. 간은 전체 방사활성도에 대해 강산처리 및 강염기 처리시 비율은 각각 39.4%와 60.6%였으며, 정소는 61.4% 및 38.6%였다.

**단백질 가수분해 효소에 의한 methyl accepting capacity의 영향** – 여러 가수분해 효소 처리 시 MAC의 영향을 조사하였다(Table III). Sodium borate 및 HCl 처리 결과에서처럼 간 세포질의 MAC 활성은 각 단백질 가수분해 효소에 의해 무처치군보다 45%이하로서 유의적인 감소 경향을 보였다. 정소 세포질 분획은 65% 이상으로 적은 영향을 받았으며, 특히 chymotrypsin 처리는 오히려 MAC 활성을 증가시켰다.

**전기영동에 의한 기질 동정** – 세포질 분획내 메틸화되는 기질을 동정하기 위해 산성조건(pH 2.4) 및 염기조건(pH 7.8)에서 전기영동을 실시하여 염기 휘발법에 의해 방사활성도를 측정하였다(Fig. 3 및 4). 산성조건에서는 각 장기마다 2개에서 4개의 주요 기



**Fig. 3** – Urea/SDS polyacrylamide gel electrophoresis of liver and testis from porcine tissues by acidic condition (pH 2.4). Each fraction contained 120 g of protein was loaded per lane after incubation with [methyl-<sup>14</sup>C]AdoMet and PM II fractions. Dried gel lanes were cut into 0.2 cm slices and mixed with 75  $\mu$ l of 2 M NaOH in a 1.5 ml micro centrifuge tube. This tube was placed into 20 ml scintillation vial containing 5 ml of scintillation cocktail and were incubated at 37°C. Radioactivity was assayed by liquid scintillation counter.

질이 동정되었고, 그 외 3개 이상의 낮은 방사활성을 보이는 기질들이 확인되었다. 간은 26, 33 및 80 kD, 정소는 14, 25, 32 및 86 kD의 기질이 동정되었다. 장기간의 기질을 비교해보면 간과 정소의 기질 형태는 거의 유사하나 분자량이 일치하는 단백질은 없었다. 대부분의 산성조건에서 확인된 기질들은 염기조건에서 방사능 활성도가 거의 소실되었다. 그러나 낮은 방사능 활성도를 보이긴 하나 2~4개의 다른 분자량을 보이는 기질들이 확인되었다. 간은 7 및 17 kD, 정소는 15, 29, 40 및 80 kD의 새로운 기질들이 동정되었다.

## 고 찰

포유동물 여러 장기 및 세포 소기관 등에서 관찰되

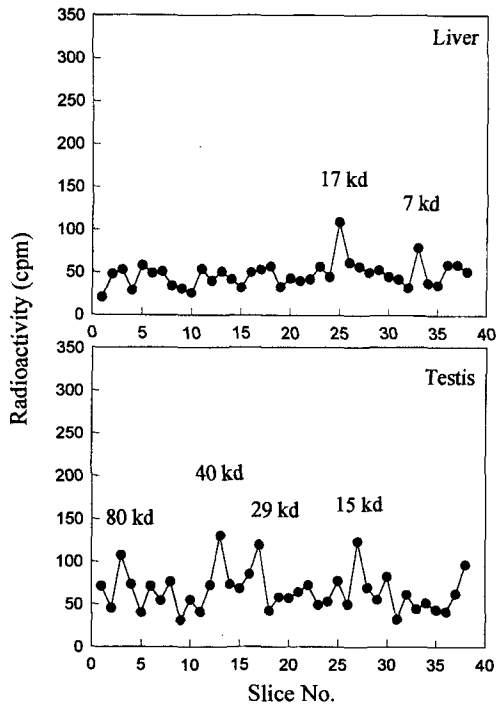


Fig. 4 - SDS polyacrylamide gel electrophoresis of liver and testis from porcine tissues by Laemli method. Each fraction contained 120  $\mu$ g of protein was loaded per lane after incubation with [methyl- $^{14}$ C]SAM and PM II fractions. Dried gel lanes were cut into 0.2 cm slices and mixed with 75  $\mu$ l of 2 M NaOH in a 1.5 ml micro centrifuge tube. This tube was placed into 20 ml scintillation vial containing 5 ml of scintillation cocktail and were incubated at 37°C. Radioactivity was assayed by liquid scintillation counter.

는 PCM은 생체내 천연 기질과 분자 수준의 연구들을 통해 신호전달계나 적혈구 등에서 노화단백질의 수복 현상 등에 관련되는 것으로 밝혀졌다.<sup>1)</sup> 그러나 포유동물의 각 장기의 고유 기능과 관련된 여러 결과들은 현재까지 뚜렷한 증거들이 부족하며, 각 장기간의 PCM 양상을 비교한 실험도 많지 않아 이에 대한 명확한 관련성을 제시하지 못하고 있다.

따라서, 본 연구에서 포유동물의 간 및 정소내 세포질 분획에서 내인성 PCMT에 의해 촉매되는 PCM의 양상을 비교하기 위하여 일차적으로, 형성된 CME를 동정하고자 염기조건(pH 8.9) 및 강산, 강염기를 처리하여 염기안정성 CME와 불안정성 CME의 비율을 조사하였다. 또한, 단백질 가수분해 효소에 의한 기질들이 보이는 MAC 활성도의 변화를 동정하였고, 전기영

동을 통해 각 장기간의 천연기질의 존재를 확인 및 비교하였다.

보고된 바에 의하면 돼지 장기에서 PCMT 활성도는 간보다 정소가 높은 것으로 알려져 있다.<sup>24,25)</sup> 그러나 첨가된 [ $^{14}$ C]AdoMet과 PCMT에 의해 유도된 세포질 분획의 MAC 결과와 이에 대한 배양시간 및 단백질농도에 따른 MAC 변화 결과를 비교해보면 정소에 비해 간의 MAC가 5배 이상 높은 것으로 나타났다. 이것은 장기내 PCM은 천연 단백질 저해제 및 효소 활성 정도에 의해 조절될 수 있다는 사실을 시사한다.

PCM의 중요한 연구 부분의 하나는 기질 단백질내에서 메틸화되는 아미노산 잔기를 확인하는 것이다. 즉 메틸화 부위의 확인은 CME의 종류를 추측 가능하게 하며, 이를 통하여 장기내 PCMT 및 PCM의 간접적 기능 예상을 가능하게 한다. 특히 기질 단백질의 메틸화 부위는 pH 8.9와 같은 약염기 조건에서 CME의 가수분해 kinetics를 통해 정성적 동정이 가능한 것으로 보고되었다.<sup>29)</sup> PM II에 의해 메틸화되는 아미노산 잔기는 크게 세 가지로 분류되며 고유기능인 화학주성, 단백질수복현상 및 신호전달과정 등에서 각각 특이적으로 관련된다.<sup>1)</sup> 이제까지 진핵세포에서 발견된 아미노산 잔기로는 염기조건에서 불안정한 D-aspartyl기나 L-isoaspartyl기와 염기 안정성을 가지는  $\alpha$ -carboxyl기에 메틸화되는 C-terminal cysteine이나 leucine 등이 있다.<sup>9,10,16,17)</sup>

pH 8.9에서 가수분해되는 CME의 kinetics 결과에 의하면 간과 정소는 3 종류의 CME가 형성되는 것으로 나타났다. 간과 정소의 결과는 적혈구의 세포질 및 세포막 단백질에 대한 pH 8.9,<sup>29)</sup> pH 7.55 조건과 6 M HCl처리<sup>30)</sup>에 의한 가수분해 kinetics결과 및 Asward와 Deight 등의 보고<sup>35)</sup>와 유사하였다. 한편 O'Connor와 Clarke등은 동일한 조건에서 반감기가 19분 이내를 가지는 것은 D-aspartyl  $\beta$ -methyl ester와 거의 유사하다고 보고하였으며, 300분이 넘는 것은 단백질의 폴리펩티드내 내재성 aspartyl기 혹은 glutamyl methyl ester에서 기인되는 것으로 보고하였다.<sup>29)</sup> 따라서 Table II에서 보듯 간과 정소에서 보여주는 10분 이내의 CME는 D-aspartyl이거나 L-isoaspartyl기에서 기인되는 것으로 추측되며, 따라서 이들 장기에서 약염기 조건에서 가수분해되는 대부분의 PCM은 class II에서 기인되는 것으로 판단된다.<sup>9,10)</sup> 반감기가 400분이 넘는 CME는 원핵세포에서 발견되는 glutamyl잔기 외

에 염기 안정성을 보이는 C-terminal leucine이나 C-terminal cysteine에서 기인된 것으로 생각된다.<sup>16,17)</sup> 각 장기에서의 반감기 결과로 볼 때 포유동물의 간 및 정소는 2개의 동일한 CME와 각각 다른 염기 안정성 CME를 형성하는 것으로 추측된다.

Najbauer 등은<sup>36)</sup> PC10 세포를 6 N HCl과 sodium borate 완충용액으로 처리했을 때 휘발성 [<sup>14</sup>C]메탄올의 형성이 다르다는 것을 보고하였으며, 전기영동을 통해 18 kD 기질이 sodium borate 처리시 0.01 pmol/mg이던 것이 HCl 처리로 5배 정도 MAC가 증가된 것을 확인하였다. 이는 18 kD 기질의 CME는 염기조건에서 매우 안정하여 [<sup>14</sup>C]메탄올을 형성하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 저자 등은 pH 8.9에서 가수분해 kinetics를 확인한 것과 함께 강산 및 강염기 조건에서 세포질 분획내 기질들이 보이는 MAC의 비율을 확인하여 두 장기간의 경향을 비교해 보았다. pH 8.9처리 결과에서처럼, 간은 정소에 비해 염기 불안정성 CME의 비율이 염기 안정성 CME보다 다소 높게 나타난 것으로 보아 정소보다 L-isoaspartyl 혹은 D-aspartyl기에서 기인되는 염기 불안정성 CME의 비율이 다소 높을 것으로 예상되며, 정소에서는 염기 안정성 CME가 간에 비해 다소 많을 것으로 예측된다. 돼지의 간과 정소에서 분리한 PM II는 *in vitro* 연구를 통해 넓은 기질 특이성이 보고되었다.<sup>24,25)</sup> 각 장기 세포질 분획의 산성조건 전기영동 결과에서도 2개 혹은 3개 이하의 주요 천연기질이 동정되긴 하였지만 넓은 기질 특이성을 확인하였다. 특히 피이크의 형태를 볼 때 간과 정소는 다소 유사한 분자량을 지니는 기질들이 메틸화되는 것으로 사료된다. 그러나 염기조건에서 전기영동을 실시하였을 때 동일 주요 기질들이 가지는 방사능 활성도는 소실되었으며, 다소 활성도가 낮긴 하지만 다른 분자량을 보이는 기질들이 동정되었다. 이것으로 보아 간 및 정소의 기질들은 분자량의 차이는 보이고 있으나, 이들 중 대부분은 염기불안정성을 띠는 D-aspartyl잔기나 L-isoaspartyl잔기에 형성된 CME를 가지고 있는 것으로 추측된다. 또한 pH 8.9 및 6 N HCl 처리결과에서처럼, 염기조건 전기영동에서 염기 안정성 성질을 나타내는 CME를 가지는 일부 기질들이 동정되는 것을 볼 때, 이들 두 장기에서도 C-terminal cysteine이나 leucine 및 그 외 염기안정성 CME를 형성하는 PCM이 동시에 진행되는 것으로 판단된다. 세포질에서 동정된 기질들을 보면 사람

적혈구에서는 38 및 115 kD등이,<sup>29)</sup> 분화되는 흰쥐 간에서는 172, 106, 98, 81, 66, 62, 52 및 38 kD의 non-histone chromosomal protein 등이,<sup>31)</sup> 소뇌에서는 96 및 45 kD 단백질이,<sup>35)</sup> 신장의 경우는 14, 17, 21, 27, 31, 48, 61 및 168 kD등의 다양한 기질들이 발견되었다.<sup>37)</sup>

한편 Terwilliger와 Clarke 등은 trypsin과 chymotrypsin을 처리하여 천연기질의 MAC에 대한 영향을 확인하였는데 trypsin처리는 70, 41.5 및 23.5 kD 기질이, chymotrypsin처리는 23.5 kD 기질이 현저히 감소되는 것을 보고하였다.<sup>30)</sup> 본 연구에서도 세포질 분획을 단백질 가수분해 효소를 처리한 후 PCMT 분획과 함께 메틸화 반응을 유도하여 기질들이 보이는 MAC의 영향을 평가하였다. Table IV에서처럼 간과 정소의 MAC는 단백질 가수분해 처리에 의해 60%와 35%로 각각 감소되었는데, 이와 같은 상반된 결과는 비록 전기영동 형태가 유사하긴 하지만, 각 기질들의 종류는 대부분 다르다는 것을 시사한다. 특히 정소의 세포질 분획은 chymotrypsin처리에 의해 오히려 MAC의 활성이 증가되었는데, 이것은 protein phosphatase catalytic subunit의 메틸화 현상에서처럼 메틸화부위를 지니는 단백질 복합체들이 단백질 분해 효소의 활성으로 인한 기질 부위의 노출에서 기인되는 것으로 생각된다. 이외에도 Fig. 3과 4에서 나타난 단백질 양이나 배양 시간에 대한 MAC의 영향을 보면 간과 정소는 서로 상이한 양상을 보여주었다. 이상의 결과를 보면 간과 정소 세포질에서의 PCM은 적어도 2개의 공통 CME를 가지면서, 서로 다른 염기안정성 CME를 1개씩 형성하는 것으로 생각되며, 이들의 대부분은 class II의 PCM인 것으로 판단된다. 따라서 이들 장기에서의 PCM기능은 적혈구나 뇌 등에서 확인된 노화된 단백질들의 수복 현상을 공통적으로 촉매하는 것으로 사료된다. 그러나 기질단백질의 동정 및 특성조사에서 얻어진 결과에서 보듯, 각 장기내 기질들이 뚜렷한 MAC 차이를 나타내는 것으로 보아, 각 장기에서의 PCM은 독특한 기질을 가짐으로써 조직특이적 역할을 수행할 수 있다는 가능성을 시사한다.

## 문 헌

- 1) Hrycyna, C. A. and Clarke, S. : Modification of eu-

- karyotic signaling protein by C-terminal methylation reactions. *Pharmac. Ther.* **59**, 281 (1993).
- 2) Paik, W. K. and Kim, S. : Protein methylation, John Wiley and Sons, New York, pp. 1 (1980).
  - 3) 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).
  - 4) Kwon, M., Jung, K., Lee, H. Y., Lee, H. W. and Hong, S. : Purification and characterization of protein methylase II inhibitor from porcine liver. *Korean. Biochem. J.* **27**, 569 (1994).
  - 5) Park, S., Lee, H. W., Kim, S. and Paik, W. K. : A peptide inhibitor for S-adenosyl L-methionine-dependent transmethylation reactions. *Int. J. Biochem.* **25**, 1157 (1993).
  - 6) Veeraragavan, K. and Gagnon, C. : Mammalian protein methyltransferase, *Biochem. J.* **260**, 11 (1989).
  - 7) O'Dea, R. F., Viveros, O. H. and Diliberto, E. J., Jr. : Protein carboxyl methylation : Role in the regulation of cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1163 (1981).
  - 8) Stock, J. and Stock, A. : What is the role of receptor methylation in bacterial chemotaxis?. *Trend. Biochem. Sci.* **12**, 371 (1987).
  - 9) Pelletier, J., Desrosiers, R. R. and Beliveau, R. : Age-related changes in carboxyl methylation of proteins in the kidney. *Mech. Ageing. Dev.* **24**, 115 (1996).
  - 10) Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H., Shirasawa, T. : Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys.* **381**, 225 (2000).
  - 11) 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).
  - 12) 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).
  - 13) Rosenberg, S. J., Rane, M. J., Corpier, C. L., Hoffman, J. L. and McLeish, K. R. : Effect of gamma subunit carboxyl methylation on the interaction of G protein alpha subunits with beta gamma subunits of defined composition. *Cell Signal.* **10**, 131 (1998).
  - 14) Inglese, J., Glickman, J. F., Lorenz, W., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. : Isoprenylation of a protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 1422 (1992).
  - 15) Macfarlane, D. E. : Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibit protein carboxyl methylation intact blood platelets. *J. Biol. Chem.* **259**, 1357 (1984).
  - 16) Xie, H. and Clarke, S. : Methyl esterification of C-terminal leucine residues in cytosolic 36-kDa polypeptides of bovine brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 13364 (1993).
  - 17) Lee, J. and Stock, J. : Protein phosphatase 2A catalytic subunit is methyl-esterified at its carboxyl terminus by a novel methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19192 (1993).
  - 18) 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).
  - 19) Diliberto, E. J. and Axelrod, J. : Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. *J. Neurochem.* **26**, 1159 (1976).
  - 20) Gagnon, C., Sherins, R. J., Philips, D. M. and Bardin, C. W. : Deficiency of protein-carboxymethylase in immotile spermatozoa of infertile men. *New Engl. J. Med.* **306**, 821 (1982).
  - 21) Zukerman, S. H., O'Dea, R. F., Olson, J. M. and Douglas, D. S. : Protein carboxymethylation during in vitro culture of human peripheral blood monocytes and pulmonary alveolar macrophages. *Mol. Immunol.* **19**, 281 (1982).
  - 22) O'Connor, C. M. : Regulation and subcellular distribution of a protein methyltransferase and its damaged aspartyl substrate sites in developing *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10398 (1987).
  - 23) Kloog, Y., Axelrod, J. and Spector, I. : Protein carboxyl methylation increases in parallel with differentiation of neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **40**, 522 (1983).
  - 24) Kim, K. S., Hong, S. Y. and Lee, H. W. : purification of porcine liver protein methylase II. *Sungkyun Pharm. J.* **1**, 79 (1989).
  - 25) Jung, K., Kwon, M., Lee, H. Y., Lee, H. W. and Hong, S. : Purification and characterization of protein



- methylase II from porcine testis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 149 (1994).
- 26) Kim, S., Cho, J., Lee, H. W., and Hong, S. : Purification and properties of protein methylase II from porcine spleen. *Korean J. Biochem.* **27**, 179 (1994).
- 27) Bradford, M. E. : A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **42**, 248 (1976).
- 28) Law, R. E., Stimmel, J. B., Damore, M. A., Carter, C., Clarke, S. and Wall, R. : Lipopolysaccharide-induced NF-kB activation in mouse 70Z/3 pre-B lymphocytes is inhibited by mevlinol and 5'-methylthioadenosine: Role of protein isoprenylation and carboxyl methylation reaction. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 103 (1992).
- 29) O'Connor, C. M. and Clarke, S. : Carboxyl methylation of cytosolic proteins in intact human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 2570 (1984).
- 30) Terwilliger, T. C. and Clarke, S. : Methylation of membrane protein in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 3067 (1981).
- 31) Duerre, J. A. and Fetters, H. A. : Protein carboxyl-methylation-demethylation system in developing rat livers. *Biochemistry* **24**, 6848 (1985).
- 32) Janson, C. A. and Clarke, S. : Identification of aspartic acid as a site of methylation in human erythrocyte membrane protein. *J. Biol. Chem.* **255**, 11640 (1980).
- 33) Fairbanks, G. and Avruch, J. : Four gel systems for electrophoretic fractionation of membrane proteins using ionic detergents. *J. Supramol. Struct.* **1**, 66 (1972).
- 34) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 35) Aswad, D. W. and Deight, E. A. : Endogenous substrates for protein carboxyl methyltransferase in cytosolic fractions of bovine brain. *J. Neurochem.* **41**, 1702 (1983).
- 36) Najbauer, J., Johnson, B. A. and Aswad, D. W. : Amplification and detection of substrates for protein carboxyl methyltransferase in PC12 cells. *Anal. Biochem.* **197**, 412 (1991).
- 37) Gingras, D., Menard, P. and Beliveau, R. : Protein carboxyl methylation in kidney brush-border membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* **1066**, 267 (1991).