

GOVP1200507116

M1-0106-00-0074

세포의 항상성 유지를 위한 Protein Arginine
Methylation의 기능 분석

Roles of Protein Arginine Methylation
in Homeostasis of Cells

한국생명공학연구원

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능 분석에 관한 연구 ” 과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 07.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 임 동 수

연 구 원 : 최 시 영

” : 정 초 록

” : 조 원 경

” : 황 경 선

” : 유 진 상

보고서 초록

과제관리번호	M1-0106-00-00 74	해당단계 연구기간	2001.8.1- 2004.5.31	단계 구분	1/3
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업 (분자의과학사업 이관)			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능분석			
연구책임자	임 동 수	해당단계 참여연구원수	총 : 18 명 내부 : 3 명 외부 : 15명	해당단계 연구비	정부: 240,000천원 기업: 0천원 계: 240,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 세포생물학연구실		참여기업명	없음	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수 80
<p>본 연구는 (i) PRMT 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, (ii) PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명하므로써 protein arginine methylation과 세포의 생존 과정 (cellular processes)을 이해하기 위하여 수행되었음. 본 연구에서 PRMT들이 oncogene인 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되고 PRMT1과 PRMT5가 Src가 서로 결합하며, 세포 내에서 colocalization되어 있으며, PRMT의 인산화는 arginine methyltransferase 활성을 저하시키고, PRMT의 인산화는 PRMT와 결합하는 단백질들의 결합능에 영향을 준다는 사실을 밝히므로써 PRMT들의 활성을 조절할 수 있는 세포인자는 Src tyrosine kinase 라는 것을 처음으로 제시할 수 있었음. 또한 PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성요소인 ribosomal proteins S2 (rps2)와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 최초로 발견하였음. 특히 중요한 발견은 rps2가 ubiquitination-proteasome 경로를 통하여 분해되는 데 PRMT3는 rps2와 서로 결합하여 rps2의 ubiquitination-mediated proteolysis를 저해한다는 것임. PRMT3에 의한 rps2의 proteolysis의 저해는 PRMT3의 효소 활성과는 무관하였으며 서로간의 물리적 결합에 의해서 일어났음. 이 결과는 첫째 PRMT3가 자체의 효소활성과 무관하게 세포내 단백질들의 수명 (half-life)을 조절하는 기능을 갖고 있으며, 둘째. rps2가 PRMT3의 효소활성을 조절하는 noncatalytic subunit으로서 기능할 수 있음을 제시하고 있으며, 셋째 rps2가 40S ribosome의 필수적인 구성요소라는 것을 고려하면 PRMT3-rps2 복합체는 ribosome 생성 혹은 단백질의 번역 (translation)에 관여할 수도 있음을 의미하고 있음. 본 연구팀의 이러한 발견은 세포의 생존 및 질환 세포의 발생의 핵심과정을 이해할 수 있는 의미 있는 발견으로 연결될 수 있을 것으로 보임. PRMT3가 PRMT3 효소활성과 무관하게 rps2와 결합하여 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해한다는 발견은 PRMT들이 효소활성과 무관하게 세포내 단백질들의 half-life를 조절할 수 있는 새로운 기능을 갖고 있을 수 있다는 것을 암시함. 또한 일반적으로 ribosomal protein들이 ribosome의 구성요소로서만 기능하는 것으로 생각되었으나 본 연구 결과는 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit으로 작동할 수 있는 가능성을 제시하고 있으므로 rps2가 extraribosomal function 을 가질 수 있음을 보여줌.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	번역후 단백질 변이, 단백질 메틸화, 메틸화 효소, 리보솜 단백질, 단백질 분해			
	영 어	posttranslational modification, protein methylation, protein methyltransferase, ribosomal protein, ubiquitin-mediated proteolysis			

요 약 문

I. 제 목

세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

단백질의 알지닌기의 메틸화(protein arginine methylation)는 단백질이 translation(번역)됨과 동시에 혹은 세포가 외부환경에 반응하여 일어나는 posttranslational covalent modification중의 하나이다. 단백질의 알지닌기가 메틸화되기 위하여는 methyl기를 기질에 전달하는 protein arginine methyltransferase (PRMT) 단백질과 methyl donor로서 S-adenosylmethionine (AdoMet)이 필요하다. 포유 동물세포내에서 발견된 PRMT의 기질(메틸화되는 단백질)들로서는 RNA대사 관련 단백질들, histone과 같은 핵산결합 단백질들, p300, STAT1(signal transducer and activation of transcription)과 같은 전사조절인자, fibroblast growth factor 등을 포함한 200 종 이상의 단백질이 알려져 있으나, 이들이 메틸화되는 생물학적 의미는 부분적으로만 알려져 있다. Protein arginine methylation은 전사조절, 세포신호전달, 단백질-단백질 결합, RNA 대사, 단백질의 세포내외 제자리 찾기 (protein trafficking)등에 관여한다. Protein arginine methylation의 생물학적 의미는 다양하고 중요하여 세포의 항상성 유지에 필수적이고, 질환세포의 발생과 연관되어 있는 것처럼 보인다. Protein arginine methylation을 유도하는 효소들은 최근에 클로닝되기 시작하였고 이들의 세포내 기능들의 실험적인 증거들이 많이 축적되지 않고 있다. 그러나, 이 분야에 대한 국내외 연구자들의 관심의 증가로 인하여 세포내 protein kinase cascade 못지 않은 protein arginine methylation의 새로운 세포내 기능과 질환세포 발생과의 상관성이 규명될 것으로 보인다. 이러한 측면에서 본 연구는 첫째, PRMT 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, 둘째 PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명함으로써, protein arginine methylation이 세포의 항상성 유지에 어떠한 역할을 하는지를 규명하고자 하였다. 이러한 연구를 통하여 세포의 항상성 유지와 질환세포 발생과의 상관성이 보다 상세히 이해될 것으로 보인다. 본 연구에서 얻어지는 결과물들은 질병 발생의 예측인자로서나 (질병의 진단), 신약 개발에 효과적인 표적분자들로 활용될 수도 있으므로 (질병 치료제 개발) 경제산업적인 측면에서 수행될 필요성이 있는 연구이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. PRMT활성을 조절하는 세포인자의 발굴 및 기능 분석

- 가. In vivo 및 in vitro 조건에서 PRMT1 및 PRMT5의 인산화 조사
- 나. PRMT1 및 PRMT5의 인산화를 유도하는 세포인자 규명 및 PRMT와 세포인자간의 결합능 조사
- 다. 인산화된 PRMT들과 SH2 영역을 갖는 단백질들과의 결합능 조사
- 라. 기타 인산화 유도 인자들에 의한 PRMT의 인산화 조사
- 마. PRMT1 및 PRMT5 인산화 유도인자들에 의한 PRMT3 및 PRMT4의 인산화 조사
- 바. PRMT의 인산화에 따른 PRMT 효소 활성 조사

2. PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자 발굴 및 기능 분석

- 가. Protein mass spectrometry에 의한 PRMT1 및 PRMT5 인산화 의존적으로 결합하는 세포인자의 발굴
- 나. PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자의 발굴
- 다. 발굴된 세포인자와 PRMT와 결합의 특이성 검증
- 라 PRMT가 PRMT 와 결합하는 세포인자의 단백질 안정성 기전 조사
- 마. PRMT와 결합하는 세포인자의 결합영역 및 단백질 안정성 결정 영역 조사
- 바. 세포인자와 결합하는 PRMT3 결합 영역 조사 및 효소활성과의 상관성 조사
- 사. PRMT와 결합하는 세포인자의 단백질 분해과정 조사
- 아. PRMT와 결합하는 세포인자간의 복합체 특성 규명
- 자. PRMT와 결합하는 세포인자간의 복합체 형성과 PRMT 효소 활성과의 상관성 조사
- 차. 세포인자의 메틸화 조사
- 카. PRMT 효소활성과 세포 인자의 단백질 안정성과의 상관성 조사
- 타. PRMT의 인산화와 PRMT와 세포인자간의 복합체 형성과의 상관성 조사

IV. 연구개발결과

1. PRMT활성을 조절하는 세포인자의 발굴 및 기능 분석

단백질의 arginine methylation을 일으키는 PRMT의 활성조절인자를 발굴하기 위하여 viral Src tyrosine kinase(vSrc)를 PRMT1 혹은 PRMT5와 함께 발현시켰을 때 PRMT1, PRMT5 각각이 인산화되는 것을 발견하였고, 이 현상은 cellular Src kinase(cSrc)를 사용하였을 때에도 관찰되었으며 cSrc의 dominant negative mutant cSrc (K295M)를 사용하였을 때 인산화되지 않았고, tyrosine phosphatase 저해제 pervanadate를 사용하였을 때 PRMT인산화를 검증할 수 있었고, Src kinase 저해제, PP2를 사용하였을 때 PRMT인산화가 일어나지 않았으며, 정제된 cSrc kinase를 이용한 in vitro 인산화 실험에서 PRMT의 인산화를 확인하였다. 결론적으로 PRMT upstream 활성조절인자로서 Src kinase을 발굴하였고, PRMT인산화는 Src kinase 특이적으로 일어난다는 것을 발견하였다.

PRMT1과 PRMT5를 GST-vSrc kinase 와 함께 각각 293T 세포 내에 발현시킨 후, vSrc kinase를 GST pull-down하였을 때 PRMT들이 검출되었으며 PRMT들을 면역침전시켰을 때 GST-vSrc이 검출되었고, Flag-vSrc kinase를 GFP, GFP-PRMT1 또는 GFP-PRMT5와 함께 각각 293T 세포에 발현시켰을 때 PRMT들과 GST-vSrc가 colocalization되어 있음을 확인하였으며, Flag-PRMT1를 GST 또는 GST-vSrc를 293T 세포에 발현시켜 얻은 세포 추출물을 sedimentation하고 분획한 후 Flag-PRMT1과 GST-vSrc의 존재를 분석한 결과 PRMT1과 Src이 cosediment되는 것을 확인하였다. 이상의 결과들로 PRMT를 인산화시키는 Src kinase는 세포 내에서 서로 결합하고 있음을 검증하였다.

PRMT1 및 PRMT5가 Fyn tyrosine kinase에 의해 인산화되는 것을 밝혔고, PRMT3 및 PRMT4가 Src kinase 혹은 tyrosine phosphatase 저해제인 pervanadate에 의해 인산화된다는 사실을 밝혀, PRMT 계열의 단백질들이 일반적으로 tyrosine kinase의 기질임을 확인하였다. PRMT5의 인산화되는 부위를 결정하기 위하여 PRMT5의 단백질영역을 두 개의 영역으로 나누어 인산화여부를 조사한 결과 전 영역에 존재하는 PRMT5의 tyrosine residue들이 인산화될 수 있다는 것을 검증하였다. 세포신호전달에 관여하는 tyrosine kinase (c-Abl, Fyn), adaptor (Grb2, Nck) 및 PLC- γ 의 SH2영역을 갖는 단백질들이 시험관내에서 인산화된 PRMT5에만 선택적으로 결합한다는 사실을 밝혔고, c-Abl tyrosine kinase의 SH2영역 단백질이 시험관내에서 PRMT3, PRMT4들과도 결합하는 것을 검증하여, 인산화된 PRMT들이 세포신호전달에 관여할 수 있는 가능성을 제시할 수 있었고, PRMT5특이적인 기질인 SmD3나 MBP에 대한 인산화된 PRMT5의 효소활성이 인산화되지 않은 PRMT5에 비해 감소하였고, PRMT1의 기질인 GST-GAR가 인산화된 PRMT1에 의해 methylation되는 정도가 인산화되지 않은 PRMT1에 비해 낮은 것을 검증하여, Src tyrosine kinase에 의한 PRMT인산화가 PRMT활성을 조절할 수 있다는 가능성을 제시하였고 PRMT1 및 PRMT5의 homo-oligomer형성은 PRMT의 인산화와 무관하며, PRMT1 및 PRMT5의 과발현에 의한 것임을 밝혔다.

PRMT들이 Src tyrosine kinase family들의 기질임을 밝히고 PRMT1과 PRMT5가 인산화되면 이들의 효소활성에 영향을 준다는 사실을 확인하고, Src과 PRMT들과의 결합 및 Src에 의한 PRMT들의 인산화와 세포의 생존과의 상관성을 알아보기 위하여 Flag-PRMT5가 항상 발현되는 2종의 헬라세포주와 NIH3T3 (HeLa-PRMT5 및 NIH3T3-PRMT5)를 제작하여 세포주의 특성을 조사한 결과, Flag-PRMT5의 exogenous expression은 세포의 증식에 특이적인 영향을 주지 않는다는 결과를 얻었고, NIH3T3-PRMT5세포주에서 Flag-PRMT5가 실제로 발현되어 cSrc와 결합되어 있는지를 조사한 결과 Flag-PRMT5가 발현되고 cSrc과 결합되어 있다는 것을 면역침전법으로 확인하였고, NIH3T3-PRMT5 세포주를 hydrogen peroxide로 처리한 다음 Flag-PRMT5에 결합한 cSrc를 조사한 결과 hydrogen peroxide로 처리하였을 때 그렇지 않은 경우보다 Flag-PRMT5과 cSrc간의 결합이 증가되어 있는 결과를 얻었다.

2. PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자 발굴 및 기능 분석

인산화되고 인산화되지 않은 PRMT1에 특이적으로 결합하는 세포인자를 면역침전/silver staining 방법을 통하여 인산화되지 않은 PRMT5 혹은 PRMT1에 결합하나 인산화되면 결합하지 못하는 단백질을 발견하고, 질량 분석방법으로 동정한 결과 PRMT5에 결합하는 세포인자가 methylation될 수 있는 RGG domain을 갖고 있는 mRNA splicing에 관여하는 Splicing factor SRp30C일 수 있음을 알았고, PRMT1에 결합하는 인자는 Zinc finger protein 37A일 수 있음을 확인하였다. PRMT3에 특이적으로 결합하는 세포인자로서 40S ribosome의 구성성분이고 arginine methylation되는 RG repeat를 갖는 rps2임을 발견하였고, PRMT3와 rps2가 서로 특이적으로 세포내에서 결합하는 것을 알았고, PRMT3가 rps2의 in vivo half life에 중요한 determinant임을 제시하였다.

6종류의 rps2의 deletion mutant들을 제작하고, PRMT3와 결합하는 영역을 결정된 결과 rps2(100-293) 영역이 중요하였으며, PRMT3와 rps2와의 결합이 rps2 protein stability를 결정함을 알았으며, rps2 arginine methylation과 rps2 protein stability와는 상관성이 없었으며, rps2와 결합하는 PRMT3 단백질 영역을 알아보기 위하여 5종의 PRMT3 deletion mutant들을 제작하여, 실제로 PRMT3 N말단이 효소활성을 갖고 있지 않다는 것을 in vitro methylation assay를 통하여 확인하였고, N말단 104개의 아미노산이 제거된 PRMT3(104-529) 변이체는 효소활성을 나타내었으며, 각각의 Flag-PRMT3 deletion mutant들을 GST-rps2(100-293)와 함께 293T 세포에 발현시킨 후에 rps2와 결합하는 PRMT3의 최소 단백질 영역을 조사한 결과 rps2와 결합하는 PRMT3 영역은 1-134개의 N말단임을 알았다.

효소활성이 없는 PRMT3 N말단 영역 (1-134 혹은 1-264)이 발현될 때 GST-rps2 단백질 양이 현저하게 증가함을 알았으며, 134개의 아미노산 N말단을 함유하는 Flag-PRMT3 변이체들 및 PRMT3 효소활성이 없는 PRMT3 mutant (PRMT3M) 발현시켰을 때 이들이 intrinsic rps2와 결합하고 rps2 protein stability를 증가시켜 PRMT3 효소활성과 rps2 protein stability는 상관되지 않음을 알았으며, rps2가 실제로 ubiquitin-mediated proteolysis에 의해 분해된다는 것을 처음으로 밝혔으며, PRMT3가 rps2의 polyubiquitination을 저해한다는 것을 밝혔으며, PRMT3와 rps2는 in vivo 및 in vitro에서 안정한 복합체를 형성하며 heterodimer의 monomer

혹은 dimer로서 존재할 수 있는 가능성을 제시하였으며, His-PRMT3는 intrinsic rps2와 복합체를 형성하며 복합체는 2 배정도 증가된 효소활성을 나타내는 것을 알았으며, His-PRMT1 및 His-PRMT3는 in vitro에서 GST-rps2를 methylation 시키고, His-PRMT1 및 His-PRMT3에 의해 methylation되는 rps2의 영역은 RG repeat를 갖고 있는 rps2의 N말단(1-60)임을 밝혔으며, 효소활성이 없는 PRMT3 mutant는 세포내에서 rps2의 methylation을 저해하지 못하는 것으로 보아 rps2는 세포내에서 PRMT3만에 의해 특이적으로 methylation되지 않는다는 것을 제시하였으며, Src tyrosine kinase에 의한 PRMT3의 인산화는 PRMT3-rps2와의 복합체 형성을 저해할 수 있다는 결과를 얻었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

단백질의 arginine기의 methylation을 유도하는 단백질들인 PRMT들이 Src tyrosine kinase에 의해 인산화된다는 발견은 국내외적으로 보고된 바 없는 새로운 발견이다. Src tyrosine kinase는 세포의 암화를 일으키는 발암성 유전자이다. Fyn, Lck, Yes 등을 포함하는 10 종 이상의 Src tyrosine kinase family가 포유동물 세포에서 발견되었고, 이 tyrosine kinase들은 세포 증식, cytoskeletal alteration, 세포 분화, 세포 생존, cell adhesion, 세포 이동 등과 같은 다양한 세포의 핵심과정에 관여한다. PRMT들이 Src과 결합하고 인산화되며, 인산화된 PRMT들의 효소활성이 감소된다는 사실은 Src에 의한 세포 조절기능에 PRMT들이 관여할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 또한 인산화되지 않은 PRMT5 혹은 PRMT1에 결합하는 세포인자가 인산화된 PRMT5 혹은 PRMT1에는 결합하지 않으며, 인산화되지 않은 PRMT3에 특이적으로 결합하는 rps2가 인산화되면 그 결합력이 감소된다는 사실은 PRMT들 의한 세포 조절기능은 Src tyrosine kinase에 의해 조절 받을 수 있다는 것을 암시하고 있다. 특히 PRMT들이 SH2 도메인을 갖고 있는 adaptor단백질들과 in vitro에서 특이적으로 결합하였으므로, 이는 PRMT들이 tyrosine kinase cascade에 의한 신호전달과정에 관여할 수 있는 가능성을 강하게 제시하고 있다. 다만 이러한 현상들은 Src 혹은 PRMT들이 과발현된 상황에서 관찰되었기 때문에 향후 생리학적으로 적합한 조건에서 이러한 현상들을 조사할 수 있는 추가 연구를 통하여 Src과 PRMT간의 상호 결합의 의미를 세포증식을 포함하는 세포의 생존 과정(cellular processes)에서 규명되어야 할 것으로 보인다.

PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성요소인 rps2와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 발견하였다. 본 연구는 다음과 같은 측면에서 추가 연구가 필요하다. 첫째, PRMT3와 안정한 복합체를 형성하는 rps2가 단백질 번역에 핵심 세포내 소기관인 40S ribosome 구성 요소라는 고려할 때 PRMT3가 단백질 번역(translation)을 담당하는 ribosome biogenesis에 직간접적으로 관여할 수 있는 가능성을 제시하고, 이에 대한 추가 연구는 세포의 생존과정에서 특히 ribosome biogenesis/translation에서의 PRMT3의 기능을 알 수 있게 할 것이다. 둘째, rps2가 PRMT3와 안정한 복합체를 형성하고 PRMT3 효소활성을 조절할 수 있다는 연구결과는 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit으로 기능할 수 있다는 가능성을 제시하고 이에 대한 추가 연구는 PRMT3-rps2 복합체의 형

성이 PRMT3의 기질 특이성 및 효소활성을 조절하는 데에 rps2가 관여한다는 것을 입증할 수 있게 하고 이는 rps2가 ribosome 구성요소뿐만이 아니라 rps2의 새로운 기능 (extraribosomal function)을 규명하는데 기여할 것이다. 셋째, rps2는 사람 및 동물의 암세포에서 그 발현이 증가되어 있으며, 생쥐의 간이 재생되는 (liver regeneration) 동안에도 그 발현이 증가되는 것으로 보고되었고, rps2가 질환세포의 발생의 biomarker일 수 있다고 주장되고 있다. PRMT3가 PRMT3의 효소활성과 무관하게 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해하여 rps2 protein stability를 조절하는 세포인자라는 본 연구팀의 발견은 rps2의 발현이 증가되는 조건에서 PRMT3의 발현이 어떻게 조절되는지를 조사하는 추가 연구가 중요하며, 이 경우 PRMT3가 rps2와 더불어 그 발현이 증가되는지 혹은 rps2가 발현되는 조건에서 PRMT3의 발현이 감소되는지를 단백질 수준에서 조사하는 것이 중요할 것으로 보인다. 특히 생쥐의 간절제 수술 후 (hepatectomy) 간이 재생되는 동안에 PRMT3 및 rps2에 대한 mRNA 및 단백질 수준에서 이들의 발현량을 조사하는 것은 일차적으로 PRMT3가 간 재생에 positive factor인지 혹은 negative factor인지를 알 수 있게 할 것이다. 더불어서 PRMT3의 발현조절기전을 조사하는 연구가 필요하다. 이러한 추가 연구를 통하여 PRMT3-rps2 복합체 형성과 세포 생존과정 및 질환 세포 발생과의 상관성을 보다 구체적으로 입증할 수 있을 것이다. 이는 질병진단인자 및 신약개발의 분자표적이 될 수 있으며, 세포증식제어기술의 개발에 핵심이 되는 소재가 될 수 있다.

S U M M A R Y

Protein arginine methylation as a post-translational modification has been implicated in a number of cellular processes such as protein trafficking, signal transduction, and transcriptional regulation. Currently, six different kinds of protein arginine methyltransferases (PRMTs) responsible for the arginine methylation have been reported, which transfer the methyl group from S-adenosyl-L-methionine to the guanidino group nitrogen atoms of an arginine residue symmetrically or asymmetrically.

Our specific aims are to search for a cellular factor regulating the activity of PRMTs and to search for and characterize cellular proteins specifically interacting with PRMTs. This study allows us to partly understand the roles of protein arginine methylation in cellular processes and eventually may provide us with a potential biomarker useful for the detection of malfunctioned cells or a molecular target for the treatment of malfunctioned cells.

PRMT3 can methylate substrates similar to those of PRMT1, but its specific role in cellular processes has not been known. The N-terminal 194-amino acid fragment of PRMT3 contains the acidic amino acids-rich region (NAR) including a C2H2 zinc finger motif and a tyrosine phosphorylation consensus sequence. The zinc finger motif is required for the recognition of RNA-associated substrates, but not the enzyme activity. The unique amino-terminal domain was proposed to regulate the enzyme activity and/or substrate specificity of PRMT3. Besides, PRMT3 was suggested to be present as a monomer in rat cells that is different from PRMT1, PRMT4/CARM1, and PRMT5, which are present as a homo-oligomer or associated with other molecules. The structure of catalytic core of PRMT3 revealed a potential dimer formation of the PRMT3 core. However, a cellular factor associated with PRMT3 has not been known that regulates the enzyme activity and/or determines substrate specificity.

Translation is a cellular process to synthesize polypeptides or proteins with structural and/or catalytic properties. The 40S and 60S ribosomes form the core of the translation machinery in eukaryotes. The ribosome components composed of 4 RNA species and 80 different proteins apparently assemble and mature in a temporally and spatially regulated manner. It is largely unknown molecular mechanisms by which the ribosome components co-produce in a coordinated manner and assemble with stoichiometric precision in mammalian cells, although *myc* genes were suggested to function as major regulators of the protein synthesis machinery. Some ribosomal proteins produced in excess or not incorporated into ribosomes are rapidly cleared in the cell, as small, highly charged, nucleic-acid-binding ribosomal proteins could be a danger to the cell. The ribosomal protein S2 (rps2) of rat, which is almost identical to human rps2 at the amino acid level (21), is located at or near the ribosomal P-site and can be cross-linked by UV irradiation to 28S and 18S rRNA and to aminoacyl-tRNA bound to ribosomes. The results suggest that rps2 is an essential component of 40S ribosome. The rps2 contains the

arginine-glycine (RG) repeats region in its N-terminus, in which arginine residues are potentially methylated. The gene expression of rps2 is increased in human or animal cancer samples and cancer cell lines. However, it has not been known molecular mechanism by which the protein level of rps2 is regulated in mammalian cells. The function of rps2 apart from ribosome also has not been known except that *Drosophila* rps2 has *Minute*-like characteristics and is required during oogenesis.

Here we found that PRMT3 associates with rps2 by mass spectrometric analysis of a protein co-immunoprecipitated with FLAG-tagged PRMT3. PRMT3, but not PRMT1 forms a stable heterodimer with rps2 in vivo and in vitro. The association of PRMT3 with rps2 inhibited ubiquitin-mediated proteolysis of rps2 and increased the protein level of it in the cell. The in vitro association of intrinsic rps2 with recombinant PRMT3 or the presence of recombinant rps2 increased modestly the enzyme activity of recombinant PRMT3. The results suggest that rps2 is a potential regulator of the enzyme activity of PRMT3, which regulates post-translationally the protein level of rps2 in the cell.

C O N T E N T S

1. Introduction -----	13
2. Research Trends -----	19
3. Research Contents and Results -----	22
4. Achievements and Contributions -----	62
5. Conclusions and Future Plans -----	66
6. Science and Technology Information-----	68
7. References -----	69

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	22
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	62
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	66
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	68
제 7 장 참고문헌 -----	69

제 1 장 연구개발과제의 개요

단백질의 알지닌기의 메틸화(protein arginine methylation)는 단백질이 translation(번역)됨과 동시에 혹은 세포가 외부환경에 반응하여 일어나는 posttranslational covalent modification 중의 하나이다. 단백질의 알지닌기가 메틸화되기 위하여는 methyl기를 기질에 전달하는 protein arginine methyltransferase (PRMT) 단백질과 methyl donor로서 S-adenosylmethionine (AdoMet)이 필요하다 (그림 1) (1, 2). 단백질의 알지닌기가 메틸화되면 3종류의 생성물(monomethylarginine, symmetric N^G, N^G -dimethylarginine, asymmetric N^G, N^G -dimethylarginine)이 생성된다 (그림 1). 포유 동물세포내에서 발견된 PRMT의 기질(메틸화되는 단백질)들로서는 RNA 대사 관련 단백질들, histone과 같은 핵산결합 단백질들, p300, STAT1(signal transducer and activation of transcription)과 같은 전사조절인자, fibroblast growth factor 등을 포함한 200 종 이상의 단백질이 알려져 있으나, 이들이 메틸화되는 생물학적 의미는 부분적으로만 알려져 있다 (3). Protein arginine methylation은 전사조절, 세포신호전달, 단백질-단백질 결합, RNA 대사, 단백질의 세포내의 제자리 찾기 (protein trafficking) 등에 관여한다 (그림 2).

1.1. Protein arginine methylation과 전사조절 (transcriptional regulation)

Histone 단백질은 chromatin 구조형성에 중요한 역할을 수행하는 단백질이다 (그림 2). 스테로이드, 싸이로이드 호르몬, retinoic acid, 비타민 D등과 결합하는 수용체는 전사조절과 관련된 핵의 호르몬 수용체 (nuclear hormone receptor: NR)이다. 호르몬 수용체에 의한 전사활성화 (transcriptional activation)는 NR의 보조활성화인자 (NR coactivator)에 의해 촉진된다. PRMT4 (coactivator-associated arginine methyltransferase; CARM1)는 NR coactivator 중의 하나인 GRIP1 단백질에 특이적으로 결합한다. PRMT4를 GRIP-1과 함께 발현시킬 경우에만 호르몬 수용체에 의한 전사가 활성화된다. PRMT4는 시험관내에서 histone 3 단백질을 methylation시킨다. Methyltransferase활성을 갖지 못하는 PRMT4 변이체 (mutant)는 호르몬 수용체의 전사활성화기능을 촉진하지 못한다. PRMT1은 histone 4 단백질의 3번 위치에 있는 arginine residue를 특이적으로 methylation시키고, PRMT1 활성을 갖지 못하는 변이체는 호르몬 수용체의 전사활성화 기능을 상실한다. 이러한 사실들은 histone arginine methylation이 세포 전사조절에 중요한 기능을 수행하고 있다는 것을 보여주고 있다.

1.2. Protein arginine methylation과 세포신호전달

PRMT1 유전자는 TIS21과 BTG1과 결합하는 세포인자로서 클로닝되었다. TIS21은 호르몬, 혈청, phorbol ester 등과 같은 mitogenic agent들에 세포가 반응하여 발현하는 세포의 초기발현 유전자 (early-response/immediate early gene)이다 (그림 2). TIS21과 유사한 BTG1은 백혈병 환자의 세포의 염색체의 breakpoint 인접지역에 존재하므로써 발견되었고, 상피세포성장인자에 의해 그 발현이 유도된다. TIS21/BTG1은 세포성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, PRMT1과 TIS21/BTG1과의 상호작용의 생물학적 의미 (biological significance)가 아직도 세포수준에서 규명되지 않고 있다.

Protein arginine methylation이 세포신호전달과정에 관여한다는 직접적인 증거는 PRMT1이 인터페론 수용체, STAT1과 결합하고, STAT1의 arginine residue를 메틸화 한다는 것이다 (4) (그림 2). STAT은 인터페론에 의해 신호가 전달될 때 중요한 기능을 수행하는 전사조절인자이다. Protein arginine methylation이 세포신호전달에 관여한다는 또 다른 증거는 PRMT5가 Janus kinase와 결합한다는 것이다 (5). 그러나, PRMT5와 JAK간의 상호결합의 생물학적 의미가 아직까지 규명되고 있지 않다. 이러한 연구결과들은 protein arginine methylation이 세포의 신호전달계와 연결되어 있으며 arginine methylation의 이상은 질환세포의 발생과 상관성이 있음을 제시해 주고 있다.

1.3. Protein arginine methylation과 단백질의 핵산결합

Protein arginine methylation이 효율적으로 일어나기 위하여는 arginine residue 인접 아미노산이 중요한 데 특히 arg-gly-gly (RGG), gly-arg-gly (GRG), arg-X amino acids-arg (RXR) motif를 갖고 있는 단백질들의 arginine은 methyl화되는 것으로 알려져 있다. 이러한 RGG, GRG, RXR motif는 많은 RNA 결합단백질들에 존재한다. 예를 들면, periobosomal RNA들이 processing될 때 관여하는 핵인 단백질 (nucleolar protein)들인 fibrillarin, 핵인에 존재하는 nucleolin, 40S ribonucleoprotein의 주요구성체인 heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1, Ewing sarcoma protein, poly(A) binding protein들은 glycine-arginine-rich (GAR) 도메인을 갖고 있다 (1) (그림 2). GAR도메인은 핵산 결합요소로서 기능하며, 세포내에서 methyl화된 단백질로 존재하는 것이 규명되었다. GAR도메인이 단일가닥의 핵산에 결합할 때 arginine의 양성부하와 핵산의 인산기의 음성부하간의 이온성 상호작용이 중요할 것으로 생각되고 있다. 단백질과 핵산간의 특이적인 결합은 이러한 비특이적인 salt bridge보다는 arginine의 guanidino nitrogen과 핵산과의 수소결합에 기인할 것이다. Arginine이 methyl화되면 guanidino nitrogen의 양성부하는 거의 영향을 받지 않으나 guanidino nitrogen의 methyl기의 존재는 핵산과 arginine 간의 수소결합의 공간적 변화를 가져와 핵산과 단백질간의 특이적인 결합에 영향을 줄 것으로 생각되고 있다. 그러나, 이러한 가설을 실험적으로 입증한 사례는 거의 없다. 핵산결합 단백질들의 arginine methylation은 RNA 핵산결합의 특이성 및 선택성을 갖게 할 것이고 이들이 RNA 대사에 어떠한 생물학적 효과를 유도할 것으로 추정되나 여전히 RNA 결합단백질들의 arginine methylation의 생물학적 의미는 규명되지 않고 있다.

1.4. Protein arginine methylation과 단백질의 세포내의 제자리 찾기 (protein trafficking)

핵내에 존재하는 많은 단백질들은 세포질에서 합성된 후 핵속으로 이동하기 위하여 nuclear localization signal (NLS)을 갖고 있다. GAR 도메인을 갖고 있는 단백질들은 핵이나 핵인에 자리 잡을 때 중요한 역할을 한다. 예를 들어 nucleolin 단백질은 NLS를 갖고 있어 핵내로 이동하나, 핵내에서 핵인으로 이동하기 위하여는 GAR 도메인과 이와 인접한 RNA 결합도메인이 요구된다. 또 다른 예는 18 kDa의 basic fibroblast growth factor (bFGF)이다 (그림 2). 18 kDa-bFGF는 주로 세포질에 존재하나 분자량이 큰 bFGF (N말단에 GAR도메인을 갖고 있음)는 핵내에 존재하며 methyl화되어 있는 것으로 밝혀졌다. 그런데 세포를 protein

methyltransferase 저해제인 MTA(methylthioadenosine)로 처리하게 되면 GAR도메인을 갖는 bFGF는 더 이상 핵속에 존재하지 않게 된다. Chromosomal translocation에 의해 생성된 Ewing sarcoma (EWS) 단백질은 RNA 결합단백질로서 주로 핵내에 존재하는 데 세포막에 존재하는 EWS 단백질을 분석한 결과 arginine methylation이 일어난 것으로 밝혀졌다 (6). 이러한 결과들은 단백질들의 세포에서의 제자리 찾기에 protein arginine methylation이 관여하고 있음을 제시해 주고 있다. 따라서 protein arginine methylation의 이상은 단백질들의 제자리 찾기에 영향을 줄 것이고 이는 정상세포의 질환세포로의 변이를 유도하는 인자가 될 것으로 보인다.

상기한 바와 같이 protein arginine methylation의 생물학적 의미는 다양하고 중요하여 세포의 항상성 유지에 필수적이고, 질환세포의 발생과 연관되어 있다. Protein arginine methylation을 유도하는 효소들은 최근에 클로닝되기 시작하였고 이들의 세포내 기능들의 실험적인 증거들이 많이 축적되지 않고 있다. 그러나, 이 분야에 대한 국외 연구자들의 관심의 증가로 인하여 세포내 protein kinase cascade 못지 않은 protein arginine methylation의 새로운 세포내 기능과 질환세포 발생과의 상관성이 규명될 것으로 보인다. 이러한 측면에서 본 연구는 첫째, PRMT 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, 둘째 PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명함으로써 (그림 3), protein arginine methylation이 세포의 항상성 유지에 어떠한 역할을 하는지를 규명하고자 하였다. 이러한 연구를 통하여 세포의 항상성 유지와 질환세포 발생과의 상관성이 보다 상세히 이해될 것으로 보인다. 본 연구에서 얻어지는 결과물들은 질병 발생의 예측인자로서나 (질병의 진단), 신약 개발에 효과적인 표적분자들로 활용될 수도 있으므로 (질병 치료제 개발) 경제산업적인 측면에서 수행될 필요성이 있는 연구이다.

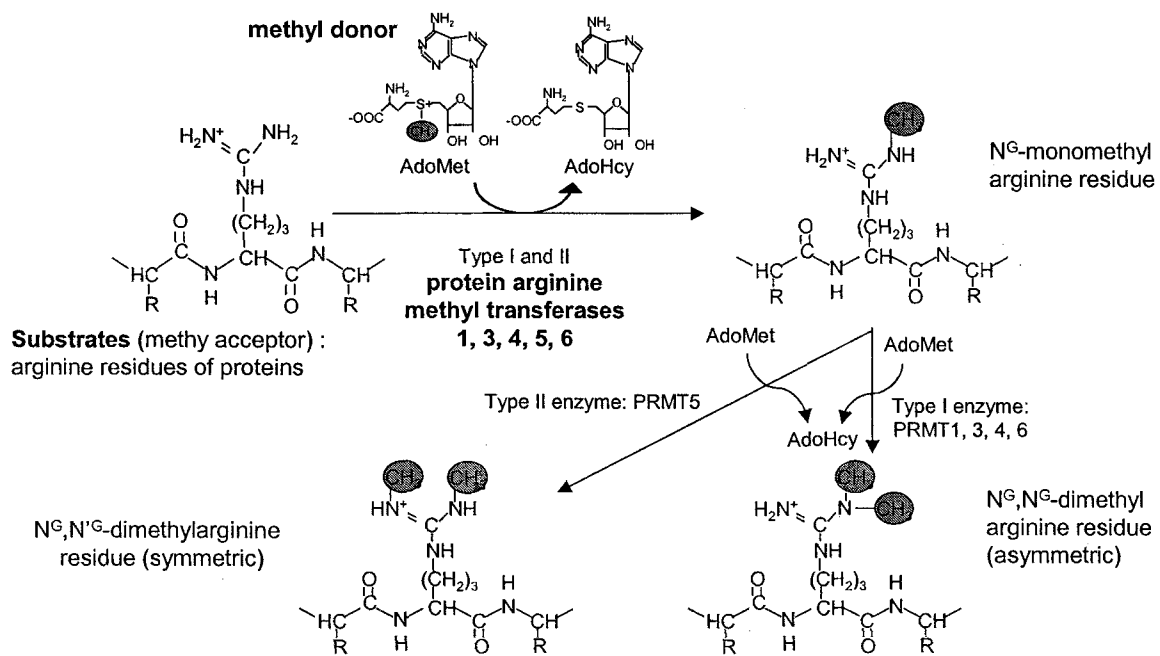


그림 1. Structure of N-methylated arginine residues found in proteins. Protein arginine methyltransferases (PRMT1, 3, 4, 5, and 6) catalyze the transfer of methyl groups from S-adenosylmethionine (AdoMet) to the terminal guanidino nitrogen atoms of arginine residues. Type I PRMT produces asymmetric dimethylarginine, while type II PRMT produces symmetric dimethylarginine.

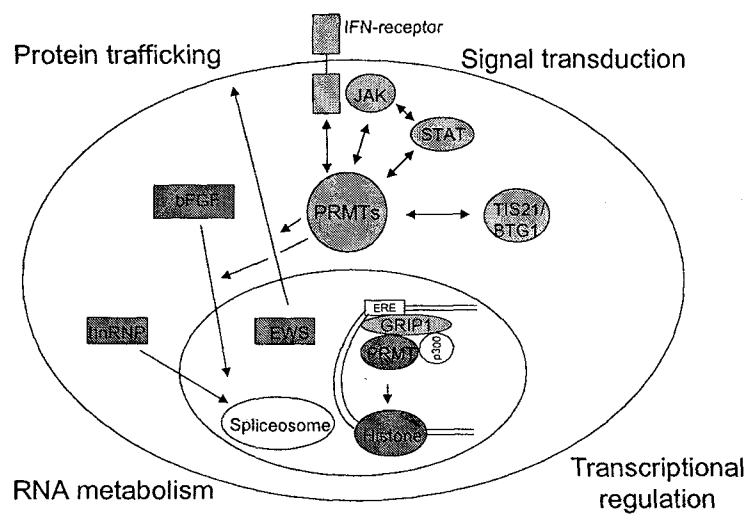


그림 2. Protein arginine methylation is involved in a number of cellular processes including transcriptional regulation, signal transduction, RNA metabolism, and protein trafficking.

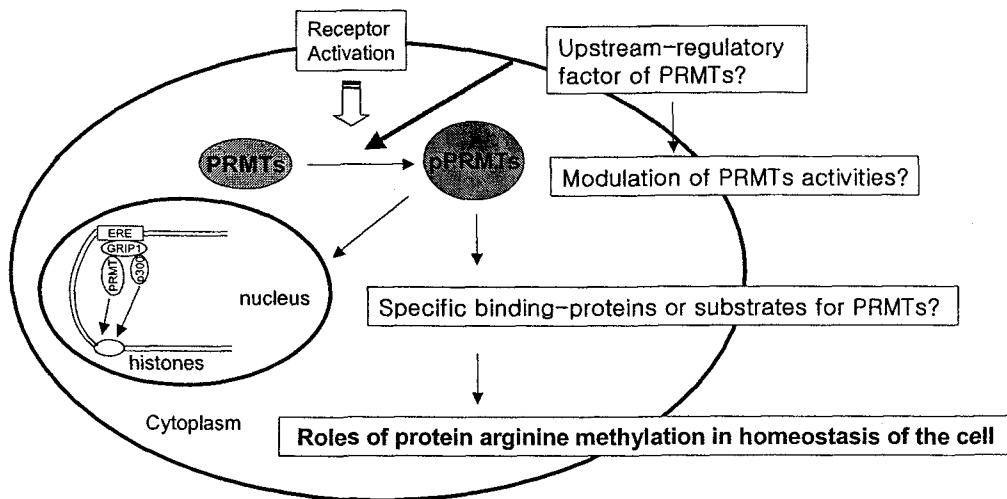


그림 3. Our specific aims are (i) to search for a cellular factor regulating the activity of PRMTs and (ii) to search for and characterize cellular proteins specifically interacting with PRMTs. This study allows us to partly understand the roles of protein arginine methylation in cellular processes and eventually may provide us with a potential biomarker useful for the detection of malfunctioned cells or a molecular target for the treatment of malfunctioned cells.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1996년에 PRMT1 유전자가 처음으로 클로닝된 이후 포유동물세포에서 현재까지 6종류의 PRMT (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT5, PRMT6)들이 밝혀졌다. 각각의 PRMT들의 국외연구동향은 다음과 같다.

PRMT1은 거의 모든 포유동물조직 및 세포에 존재하여 단백질의 asymmetric arginine methylation (그림 1)을 유도한다. 미국 캘리포니아 대학의 M. David 연구팀은 STAT1 단백질의 arginine residue가 PRMT1에 의해 methylation되는 것을 발견하였고, 이 STAT1 단백질의 arginine methylation이 인터페론에 의한 전사활성화에 요구된다는 것을 밝혔다 (4). 대부분의 암세포에 축적되어 있는 methylthioadenosine(MTA)은 methyltransferase의 저해제로서 알려져 있는 바 MTA는 STAT1에 의해 매개되는 인터페론 반응성을 저해하였다. STAT1과 결합하여 STAT1의 기능을 저해하는 PIAS1단백질이 알려져 있다. Arginine methylation이 일어나지 않는 조건에서 인산화된 STAT1 단백질과 PIAS1단백질과 결합하는 정도가 증가되어 인터페론에 의한 STAT1 단백질의 DNA 결합능을 저하시켜 결과적으로 인터페론에 대한 세포 반응성이 저하되었다. 이러한 연구결과는 protein arginine methylation이 전사조절인자의 기능을 조절한다는 것을 제시해 주고 있고, 인터페론에 의해 반응하지 않은 종양세포는 종양세포의 protein arginine methylation의 변화와 관련되어 있을 수 있다는 것을 제시해 주고 있다. 특히 protein arginine methylation이 일어날 때 중요한 motif로서 알려진 RGG, GRG motif가 STAT1 단백질에는 존재하지 않음에도 arginine residue가 methylation된다는 발견은 상당수의 세포 단백질이 arginine methylation될 수 있다는 것을 제시해 주고 있다 (4).

Histone 단백질은 chromatin 구조형성에 중요한 역할을 수행하는 단백질로서 acetylation-deacetylation과 같은 posttranslational modification을 통해서 전사조절에 관여한다는 것은 잘 알려져 있다. Histone 단백질이 인산화나 메틸화에 의해 posttranslational modification된다는 사실도 알려져 있다. 미국 버지니아 대학의 Zhang 연구팀은 PRMT1이 histone 4 단백질의 3번 위치에 있는 arginine residue를 특이적으로 methylation시킨다는 사실을 밝혔다. Histone 4 단백질의 arginine methylation은 p300에 의한 histone 4 단백질의 acetylation을 촉진하였으나, histone 4 단백질의 acetylation은 PRMT1에 의한 histone 4 단백질의 arginine methylation을 저해하였다. 이 결과는 PRMT1에 의한 histone 4 단백질의 arginine methylation이 전사조절에 중요한 역할은 한다는 최초의 직접적인 생화학적 증거이었다 (7).

PRMT2는 에스트로젠 수용체 알파와 결합하나 PRMT2의 효소활성은 규명되지 않고 있다 (8).

PRMT3의 경우 효소활성이외의 세포내 기능은 알려진 바 없었다 (9).

PRMT4 (coactivator-associated arginine methyltransferase; CARM1)는 호르몬 수용체 (nuclear hormone receptor) co-activator중의 하나인 GRIP1 단백질에 특이적으로 결합하며, PRMT4를 GRIP-1과 함께 발현시킬 경우에만 호르몬 수용체에 의한 전사가 활성화되고, PRMT4는 histone 3 단백질을 methylation시킨다. 메틸화 활성을 갖지 못하는 PRMT4 변이체는 호르몬 수용체의 전사활성화 기능을 촉진하지 못하므로 PRMT4 역시 PRMT1과 같이 histone modification을 통한 chromatin remodeling을 통하여 전사조절기능을 나타낸다. 세포 전사조절에 중요한 인자인 CREB-binding protein (CBP)/p300 단백질이 PRMT4에 의해 특이적으로

methylation되고 methylarginine이 전사조절에 스위치로서 작동한다는 사실이 실험적으로 입증되었다 (10). CREB (cAMP response element binding protein)의 KID (kinase inducible domain)과 결합하는 CBP/p300의 KIX domain에 존재하는 arginine이 PRMT4에 의해 methylation되면 CREB 단백질과의 상호결합력이 약해져 cAMP signaling pathway에서는 PRMT4가 corepressor로서 작용하는 반면 steroid, retinoid, thyroid hormone등에 의한 전사조절에서는 PRMT4가 coactivator로서 작동한다. 신경세포성장 인자 (NGF)를 PC12와 같은 신경세포에 처리할 때 CREB가 인산화되어 활성화되고 CREB의존적으로 발현되는 세포사멸억제단백질 Bcl-2가 증가되어 신경세포의 생존성을 향상시킨다. 이 때 PC12세포에 PRMT4를 발현시키면 cAMP 신호전달이 차단되어 (CBP/p300의 methylation에 의한 CREB과 CBP/p300과의 결합이 약해짐) Bcl-2의 발현이 감소하고 결과적으로 PC12세포의 사멸을 유도한다 (11). 이러한 발견은 PRMT4에 의한 CBP/p300의 arginine methylation이 nuclear hormone의존성 혹은 CREB의존성 전사활성화에 중요한 분자 스위치로서 기능한다는 것을 제시하며 이는 의약품개발에 활용될 수 있다. 예를 들어 methylation된 CBP/p300단백질을 demethylation시키고 PRMT4의 활성을 특이적으로 길항시킬 수 있는 약물은 CREB의존성 전사활성화를 촉진할 수 있다. CREB 단백질들은 학습과 기억에 중요한 기능을 하기 때문에 이러한 길항제는 신경세포의 학습과 기억능력을 향상시킬 수 있게 할 수도 있다. 다른 한편으로 PRMT4활성을 촉진시키는 약물들은 스트레스에 대한 저항력을 높일 수 있다.

PRMT5는 본 연구팀이 바이러스 단백질과 결합하는 단백질로서 효모의 two-hybrid 검색체계를 통하여 발견하였고 (12), 동시에 PRMT5는 다른 연구팀에 의해 Janus kinase와 결합하는 단백질로서 발견되었다 (5). 퇴행성 신경질환인 척수근위축증 (spinal muscular atrophy)은 척수에 있는 운동성 신경세포의 퇴화에 의해 발생하는 데 이 질환은 근육이 약화되고 위축되는 증상을 나타낸다. 운동성 신경세포의 생존에 중요한 기능을 수행하는 SMN (survival of motor neuron) 유전자 산물은 척수근위축증 환자의 95%에서 변이 되어있거나 제거되어 있다. SMN 단백질은 snRNP (pre-mRNA slicing machinery) 구성단백질인 SmD1, SmD3단백질과 결합하는 데 특히 sDMA (symmetrical dimethylarginine)을 함유하고 있는 SmD1, SmD3단백질에 효과적으로 결합한다. 단백질의 sDMA를 생성시키는 효소는 PRMT5로서 알려져 있다. 이 결과들은 PRMT5에 의한 SmD1, SmD3단백질의 arginine methylation이 Sm단백질들이 SMN단백질과 함께 복합체를 이루어 snRNP core particle의 형성에 중요한 역할을 하며 arginine methylation이 snRNP assembly를 조절할 수 있다는 것을 제시한다 (13, 14). Cajal body는 small RNA가 생체 내에서 만들어질 때 관여하는 핵 내에 존재하는 소기관 (suborganelle)이다. 핵내에 gem (twin structure)이라는 구조는 SMN 복합체를 고농도로 함유하고 있다. Cajal body(CB)와 gem은 핵 내에 함께 존재하며, 이들 간에 communication은 coilin이라는 CB marker 단백질에 의해 매개되어진다. 이 coilin 단백질은 PRMT5에 의해 methylation되어 SMN과 결합한다. Coilin의 methylation이 저해 받게되면 SMN과의 복합체 형성이 효과적으로 일어나지 않아 세포는 gem구조를 갖게된다. Gem구조를 갖는 세포의 경우 coilin이 hypomethylation 되어있는 반면에, CB를 갖고 있는 세포에서는 coilin이 hypomethylation되어 있지 않다. 또한 Gem 구조를 나타내는 세포 단백질 추출액은 시험관 내에서 coilin이나 Sm 단백질들을 효과적으로 methylation시키지 않았다. 이 결과들은 protein arginine methylation 상태의 변화는 세포 핵 구조의 변화를 유도할 수 있다는 것을 입증하고 있다 (15). PRMT5에 의한 arginine methylation은 Cajal body에 SMN단백질이 localization되는 데에 중요할 뿐만이 아니라 pre-mRNA splicing에도 필요함이 밝혀졌다 (16). PRMT5가 세포주기조절인자 cyclin E promoter에 존재하는 repressor complex 구성 성분으로 존재하여 histone methylation을 통하여 cyclin E promoter의 활성화를 억제하고 결과적으로 세포의 증식을 억제할 수 있으므로, PRMT5가 세포주기 조절인자의 전사 및 세포증식을 조절할 수 있다는 것

이 밝혀졌다 (17). PRMT5는 SPT5를 메틸화시키고 SPT5 메틸화는 RNA 중합효소 II와 복합체 형성에 영향을 주어 전사조절기능을 나타낸다 (18).

PRMT6는 automethylation을 유도하며 핵 내에 존재한다. 이 단백질의 세포내 기능은 알려진 바 없다 (19).

혈관 내피세포에서의 asymmetrical dimethylarginine (ADMA)의 합성이 LDL cholesterol에 의해 증가되고 이는 protein arginine methyltransferase의 활성과 관련되어 있다 (20). 내피세포에서의 nitric oxide는 혈관확장에 중요한 매개체인데 ADMA는 NO생성을 유도하는 nitric oxide synthase의 활성을 저해한다. ADMA의 혈장농도가 고지혈증 환자에서 증가되어 있다. 이러한 결과는 protein arginine methylation이 질환세포 발생과 직간접적으로 관련되어 있다는 것을 제시한다.

본 연구팀은 국내에서 유일하게 PRMT의 세포내 기능을 연구하는 팀으로서 간염, 간경화, 간암의 원인체인 C형 간염바이러스 (hepatitis C virus: HCV)의 비구조 단백질중의 하나인 NS3 단백질과 결합하는 세포인자가 알지닌 메틸화 활성을 갖고 있음을 밝혀 PRMT5로서 명명하였다 (12). 또한 PRMT1에 의해 NS3 단백질(NS3 단백질은 RNA결합 및 RNA helicase 활성을 갖고 있음)의 arginine기가 메틸화된다는 것을 밝혔다 (21).

본 연구는 (i) PRMT 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, (ii) PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명하므로써 protein arginine methylation과 세포의 생존과정 (cellular processes)을 이해하기 위하여 수행되었다. 본 연구에서 PRMT들이 oncogene인 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되고 PRMT1과 PRMT5가 Src kinase와 서로 결합하며, 세포내에서 colocalization되어 있으며, PRMT의 인산화는 arginine methyltransferase 활성을 저하시키고, PRMT의 인산화는 PRMT와 결합하는 단백질들의 결합능에 영향을 준다는 사실을 밝히므로써 PRMT들의 활성을 조절할 수 있는 세포인자는 Src tyrosine kinase 라는 것을 처음으로 제시할 수 있었다. 또한 PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성요소인 ribosomal proteins S2 (rps2)와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 최초로 발견하였다. 특히 중요한 발견은 rps2가 ubiquitination-proteasome 경로를 통하여 분해되는 데 PRMT3는 rps2와 서로 결합하여 rps2의 ubiquitination-mediated proteolysis를 저해한다는 것이다. PRMT3에 의한 rps2의 proteolysis의 저해는 PRMT3의 arginine methylation 효소 활성과는 무관하였으며 서로간의 물리적 결합에 의해서 일어났다. 이 결과는 첫째 PRMT3가 자체의 효소활성과 무관하게 세포내 단백질들의 수명 (half-life)을 조절하는 기능을 갖고 있으며, 둘째 rps2가 PRMT3의 효소활성을 조절하는 noncatalytic subunit으로서 기능할 수 있음을 제시하고 있으며, 셋째 rps2가 40S ribosome의 필수적인 구성요소라는 것을 고려하면 PRMT3-rps2 복합체는 ribosome 생성 혹은 단백질의 번역 (translation)에 관여할 수도 있음을 의미하고 있다. Rps2는 사람의 암세포와 같이 빠르게 증식하는 세포에서 그 발현이 증가되어 있고, 생쥐 간의 재생 (liver regeneration)이 일어날 때도 rps2 발현이 증가되는 것으로 보고되었다 (22-26). 이러한 rps2의 발현이 증가되는 조건에서 PRMT3의 역할은 규명되지 않고 있다. 본 연구팀의 연구결과는 cellular processes에서 PRMT 및 protein arginine methylation의 역할을 알아볼 수 있는 원천 지식을 제공할 수 있는 것으로 보인다. 따라서, 본 연구팀의 이러한 발견들은 세포의 생존 및 질환 세포의 발생의 핵심과정을 이해할 수 있는 의미 있는 발견으로 연결될 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구는 첫째, PRMT활성을 조절하는 세포인자를 1종 이상 발굴하고, 둘째 PRMT의 변환에 따른 세포내 PRMT에 대한 특이적인 기질을 1종 이상 발굴하여 그 기능을 규명함으로써 세포의 항상성 유지와 protein arginine methylation과의 상관성을 조사하기 위한 목적으로 수행되었다. 연구수행결과 첫째, PRMT 활성을 조절할 수 있는 인자는 발암성 유전자 (oncogene)로서 세포의 이상증식과 밀접한 관계가 있는 Src tyrosine kinase이며, 둘째, 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성성분인 ribosomal protein S2 (rps2)가 PRMT3와 특이적으로 결합하며 그 결합은 PRMT3의 인산화에 의해 영향을 받을 수 있다는 연구 결과를 얻었다. 예기하지 않은 연구 결과는 rps2는 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 분해된다는 사실과 PRMT3는 효소활성과 무관하게 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해하며 rps2의 arginine methylation는 proteolysis와 무관하다는 사실이다. rps2는 PRMT3와 heterodimeric complex를 이루어 PRMT3 효소 활성을 조절할 수 있는 기능 (extraribosomal function)을 나타낼 수 있다는 결과도 부분적으로 얻었다. 구체적인 연구 수행 내용 및 결과는 다음과 같다.

제 1 절 PRMT활성을 조절하는 세포인자의 발굴 및 기능 분석

3.1.1. In vivo 및 in vitro PRMT1 및 PRMT5의 인산화

세포의 항상성 유지에 protein arginine methylation이 기능을 한다면 단백질의 arginine methylation을 촉매하는 PRMT의 활성을 조절하는 세포인자가 있을 것으로 예상되었고, 이러한 활성 조절인자는 PRMT의 posttranslational modification에 의해 일어날 수 있을 것으로 추정되었다. 세포의 신호전달에서 kinase cascade는 세포가 외부 환경에 적응하여 생존하는 대표적인 신호전달체계이다. PRMT가 kinase cascade에 의해 조절받는지 알아보기 위하여 PRMT1 및 PRMT5가 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되는 지를 조사하였다. PRMT1과 PRMT5 각각을 Src tyrosine kinase 발현백터와 함께 293T 세포에 발현시키고, PRMT를 면역침전시킨 후 anti-phosphotyrosine 항체로 immunoblotting을 수행하였다 (그림 4). 이때 GST-Sam68 (Sam: Src-associated protein in mitosis) 발현백터를 internal control로 사용하였다. Sam68은 Src에 의해 인산화되는 대표적인 단백질중의 하나이다. 실험 결과 PRMT1 및 PRMT5 모두 vSrc에 의해 인산화된다는 것을 처음으로 발견하였다. PRMT의 인산화가 cSrc kinase 특이적으로 일어나는지를 알아보기 위하여 cSrc의 295-lysine이 methionine으로 치환된 cSrc dominant-negative mutant(K295M)를 사용하였을 때 PRMT1은 인산화되지 않았으며, cSrc에 의한 PRMT5의 인산화는 c-Src(K295M) 변이체에 의해 저해 받았다 (그림 5A).

대장균에서 분리정제된 재조합 His-PRMT1 단백질이 재조합 cSrc 단백질 (Upstate Biotech에서 구입)에 의해 인산화되는 지를 in vitro kinase assay로 검증한 결과 His-PRMT1 단백질이 인산화되는 것을 발견하였다 (그림 5B). 이 경우 enolase 단백질을 positive control로 사용하였다.

PRMT1 및 PRMT5를 각각 293T 세포 내에 발현시키고, tyrosine phosphatase의 저해제인 pervanadate를 처리한 후 시간별로 세포를 수확한 후 anti-Flag antibody로 면역침전시킨

PRMT1 및 PRMT5을 anti-phosphotyrosine (PY20) 항체를 이용하여 immunoblotting을 수행한 결과 pervanadate 처리시간 의존적으로 PRMT1 혹은 PRMT5의 인산화가 증가되었다 (그림 6). 이 조건에서 PRMT의 인산화가 Src tyrosine kinase 특이적으로 일어나는지를 알아보기 위하여 PRMT1 혹은 PRMT5가 발현되는 293 세포주를 pervanadate로 20분간 처리하여 PRMT의 인산화를 유도하고 이 때 다양한 농도의 PP2 (Src tyrosine kinase 저해제)를 가하여 1 시간 동안 세포를 배양한 후 anti-Flag 항체로 PRMT1 과 PRMT5를 면역 침전시킨 후 anti-phosphotyrosine 항체를 이용하여 immunoblotting을 수행한 결과 PRMT1과 PRMT5의 인산화가 PP2 농도 의존적으로 저해되었다 (그림 7). 이 결과들은 PRMT1과 PRMT5가 Src kinase에 인산화되는 기질이라는 것을 제시한다.

3.1.2. Src와 PRMT1 및 PRMT5간의 상호 결합

PRMT가 Src tyrosine kinase의 기질이라면 세포내에서 서로 결합할 것으로 사료되어 Flag-PRMT1 혹은 Flag-PRMT5를 GST-vSrc (viral Src)과 함께 발현시킨 후 glutathione agarose beads에 GST-vSrc를 결합시킨 후 anti-Flag 항체로 immunoblotting하였을 때 Flag-PRMT1 혹은 Flag-PRMT5가 검출되었고, anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 anti-GST 항체로 immunoblotting하였을 때 GST-vSrc단백질이 검출되었다 (그림 8). 이 결과는 PRMT와 Src단백질이 과발현되었을 때 PRMT1 혹은 PRMT5와 vSrc단백질이 서로 결합한다는 것을 제시한다. 세포내에서 PRMT1 혹은 PRMT5가 vSrc kinase와 함께 존재하는지를 알아보기 위하여 (colocalization) Flag-vSrc kinase를 GFP, GFP-PRMT1 또는 GFP-PRMT5와 함께 각각 293T 세포 내에 발현시켰다. 이미 알려진 바와 같이 GFP-PRMT1은 핵에 존재하였으며, GFP-PRMT5과 Flag-vSrc는 세포원형질에 존재하였다 (GFP-PRMT5가 세포 원형질에 존재한다는 것은 본 연구팀이 보고한 바 있음) (그림 9). GFP-PRMT1과 Flag-vSrc를 함께 발현시켰을 때 GFP-PRMT1은 Flag-vSrc과 함께 세포 원형질에 존재하는 것을 알 수 있었고, GFP-PRMT5와 vSrc도 함께 세포 원형질에 존재하는 것을 알 수 있었다. 흥미 있는 현상은 핵에 존재하는 GFP-PRMT1이 Flag-vSrc이 과 발현될 경우 세포 원형질에 존재한다는 사실이었다. 이 결과는 PRMT1가 Src과 결합하거나 인산화되면 PRMT1의 localization에 영향을 줄 수 있다는 것을 제시한다. Flag-PRMT1를 GST 또는 GST-vSrc를 293T 세포 내에 cotransfection한 후, 세포 단백질 추출물을 5-20% sucrose gradient상에서 침강시킨 후 각 분획을 분석한 결과 Flag-PRMT1은 GST와는 cosediment되지 않았지만, GST-vSrc와 함께 cosediment되는 것을 알 수 있었다 (그림 10). Flag-PRMT1은 monomer (MW; 40 kDa)로서 존재하지 않고 homo-oligimer를 형성한다는 것을 본 연구팀이 보고한 바 있으며, 이 실험 결과는 PRMT1 homo-oligimer와 GST-vSrc이 함께 결합할 수 있다는 것을 제시한다.

서로 다른 단백질들을 세포내에서 과발현시킬 경우 과발현에 의한 단백질간에 결합이 일어날 수 있으므로 intrinsic PRMT들과 intrinsic cSrc이 서로 결합하는지를 조사하였으나 PRMT 혹은 cSrc을 효과적으로 면역침전시킬 수 있는 항체가 없었기 때문에 한 종류의 단백질을 발현하는 세포주를 제작하여 PRMT와 cSrc이 서로 결합하는 지를 조사하였다. Flag-PRMT5가 발현되는 NIH3T3 세포주를 제작하고 (NIH3T3-PRMT5) 세포의 단백질 추출액을 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 anti-Src항체로 immunoblotting하였을 때 면역침전물중에 c-Src 단백질이 검출되었다 (그림 11A). NIH3T3-PRMT5 세포주를 tyrosine phosphatase를 저해하는 hydrogen peroxide로 처리하거나 하지 않은 다음 anti-Flag 항체로 면역침전시키고 이 침전물

중에 cSrc이 존재하는 지를 anti-cSrc 항체로 조사하였을 때 hydrogen peroxide로 처리한 세포주에서 얻은 PRMT5 면역침전물에서 그렇지 않은 경우보다 많은 cSrc 단백질이 결합되어 있는 것을 알 수 있었다 (그림 11B). 이 결과는 PRMT5가 intrinsic Src과 세포내에서 서로 결합하고 변환된 PRMT5와 cSrc이 효과적으로 결합한다는 것을 암시하고 있다. Hydrogen peroxide로 처리하였을 때 PRMT5와 cSrc의 인산화여부를 조사하였으나 인산화되는 것을 발견하지 못하였다. 이는 인산화가 낮은 수준으로 일어나 사용한 anti-phosphotyrosine 항체에 의해 감지되지 않은 것으로 추정되었다.

인산화되는 PRMT5 부위를 결정하기 위하여 PRMT5를 두 개의 영역 즉 Flag-PRMT5(N) (1-308 아미노산)과 Flag-PRMT5(C) (308-637 아미노산)로 된 발현 벡터를 제작한 후 (그림 12A), full-length PRMT5, PRMT5(N), PRMT5(C) 각각을 GST-vSrc와 함께 발현시킨 후 anti-Flag 항체로 침전시킨 다음 anti-phosphotyrosine 항체로 immunoblotting하였을 때 PRMT5(N) 및 PRMT5(C) 모두 인산화되었으며, 이들은 각각 GST-vSrc와 결합하였다 (그림 12B). 이 결과는 PRMT5의 22개의 tyrosine residue중 어떤 tyrosine residue가 인산화되는지를 단시간 내에 결정하는 것이 가능하지 않을 것으로 사료되었다.

3.1.3. 인산화된 PRMT5는 SH2 영역을 갖는 단백질들과의 결합

PRMT5의 tyrosine기의 인산화는 세포인자와의 특이적인 결합을 유도할 수 있을 것으로 가정하고 인산화된 tyrosine residue에 특이적으로 결합하는 domain으로 알려진 SH2 domain 단백질들과의 반응성을 조사하였다. SH2(Src homology 2) 영역은 그림 13A에 제시한 바와 같이 -Y-X-X-hydrophobic amino acid로 이루어진 motif의 tyrosine residue가 인산화될 경우 결합이 일어난다는 것은 주지의 사실이다. Grb2, cAbl, Fyn, v-Src, PLC gamma, Nck의 SH2 영역을 갖는 GST-SH2 fusion 단백질들을 대장균에서 발현 분리 정제하고 glutathione-agarose beads에 결합시킨 후 293 세포주에서 발현시킨 PRMT5 혹은 인산화된 pPRMT5를 함유하는 세포단백질 추출액을 각각 반응시킨 후 세척하고 PRMT들이 SH2 domain에 결합되었는지를 anti-Flag 항체로 immunoblotting으로 검증하였다 (그림 13B). 그 결과 인산화된 PRMT5에 인산화되지 않은 PRMT5 경우보다 GST-SH2 융합 단백질들이 강하게 결합하였다. 이 결과는 tyrosine kinase cascade와 연관된 신호전달경로에 PRMT5가 연관될 수 있다는 것을 암시한다.

3.1.4. Fyn tyrosine kinase에 의한 PRMT1과 PRMT5의 인산화

PRMT1과 PRMT5가 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되므로 Src tyrosine kinase family들인 Fyn과 Lck에 의해 인산화되는지를 조사하였다. Flag-PRMT1 혹은 Flag-PRMT5를 Flag-Fyn 혹은 Lck와 함께 발현시킨 후 각각의 단백질들의 발현을 확인한 후 anti-Flag 항체로 Flag-PRMT1, Flag-PRMT5, Flag-Fyn을 면역침전시킨 후 침전물을 immunoblotting으로 검색한 결과, PRMT1 및 PRMT5가 Fyn에 의해 인산화되었으나, Lck에 의해서는 인산화되지 않았다 (그림 14, middle panel). Lck가 PRMT를 인산화시키지 않은 이유는 사용된 Lck가 활성이 낮기 때문일 수도 있고, PRMT들이 Lck의 기질이 아닐 수도 있다는 것을 제시하고 있다. 이 결과는 PRMT들이 Fyn tyrosine kinase들의 기질이라는 것을 암시하고 있다.

3.1.5. Src tyrosine kinase에 의한 PRMT3 및 PRMT4의 인산화

PRMT3나 PRMT4도 Src kinase에 의해 인산화되는지를 조사하여 PRMT의 인산화가 일반적인 현상인지를 조사하였다. Flag으로 tagging된 PRMT1, PRMT3, PRMT4, 혹은 PRMT5 각각을 Src와 함께 293세포주에 발현시키거나 tyrosine phosphatase 저해제인 pervanadate로 처리하여 얻은 단백질 추출물을 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 anti-phosphotyrosine 항체로 immunoblotting하였다 (그림 15). 그 결과 PRMT3 및 PRMT4 모두 인산화된다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 PRMT들은 Src tyrosine kinase의 기질이며 tyrosine kinase cascade에 의해 그 활성이 조절 받을 수 있다는 것을 암시하고 있다. 단백질 발현량과 anti-phosphotyrosine 항체와 결합하는 intensity를 상대적으로 비교하였을 때 Src에 의해 인산화가 효과적으로 일어나는 PRMT는 PRMT3와 PRMT5 이었다.

인산화된 PRMT3, PRMT4들이 GST-SH2cAbl (cAbl kinase의 SH2 영역)에 결합하는지를 알아보기 위해 Flag-PRMT3 및 Flag-PRMT4를 발현하는 세포를 pervanadate로 처리하거나 하지 않은 세포의 단백질 추출물을 GST-SH2cAbl 융합단백질과 반응시킨 후 GST pull-down assay를 수행하여 GST-SH2cAbl 단백질에 결합한 PRMT들을 anti-Flag 항체로 immunoblotting하였다 (그림 16, top panel). 그 결과 인산화된 PRMT3와 PRMT4가 GST-SH2cAbl에 강하게 결합하는 반면에 인산화되지 않은 PRMT들은 GST-SH2cAbl에 거의 결합하지 않았다. 이 결과는 PRMT들이 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되며 SH2 domain을 갖는 단백질들과 서로 결합할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

3.1.6. PRMT의 인산화에 의한 PRMT 효소 활성의 감소

Src tyrosine kinase에 의한 PRMT의 인산화는 첫째, 인산화에 따른 PRMT효소활성에 영향을 줄 수 있고, 둘째, 단백질-단백질간의 상호결합에 영향을 줄 수 있다. 인산화가 PRMT효소활성을 조절하는지를 알아보기 위하여 GST-vSrc 존재유무하에서 발현시킨 Flag-PRMT5를 anti-Flag 항체로 면역침전시키고, 인산화된 PRMT5와 인산화되지 않은 PRMT5 면역침전물을 myelin basic protein (MBP) 혹은 GST-SmD3 단백질과 반응시켰다. 반응생성물을 fluorography를 통하여 검증하였다 (그림 17A, top panel). 효소반응에 사용한 PRMT5 단백질 양이 거의 동등하다는 것을 anti-Flag 면역침전물을 anti-Flag 항체로 immunoblotting하여 검증하였다 (bottom panel). MBP나 SmD3는 세포 내에서 type II PRMT5 (그림 1)에 의해 메틸화된다. 그 결과 인산화된 PRMT5가 인산화되지 않은 PRMT5보다 그 활성이 뚜렷이 감소되었다는 것을 알 수 있었다. Flag-PRMT1을 Src kinase 존재유무하에서 293세포주에 발현시킨 후 anti-Flag-agarose beads를 통하여 분리정제하고 다양한 농도의 GST-GAR (glycine-arginine rich region)를 기질로 하여 PRMT assay를 한 후 반응생성물을 fluorography로 검색하였다. GST-GAR는 fibrillarlin에 존재하는 arginine과 glycine이 반복적으로 존재하는 영역을 GST에 융합시킨 대표적인 PRMT1 기질이다. 그 결과 인산화된 PRMT1은 인산화되지 않은 PRMT1보다 그 효소활성이 20-30% 정도 감소되었음을 알 수 있었다 (그림 17B).

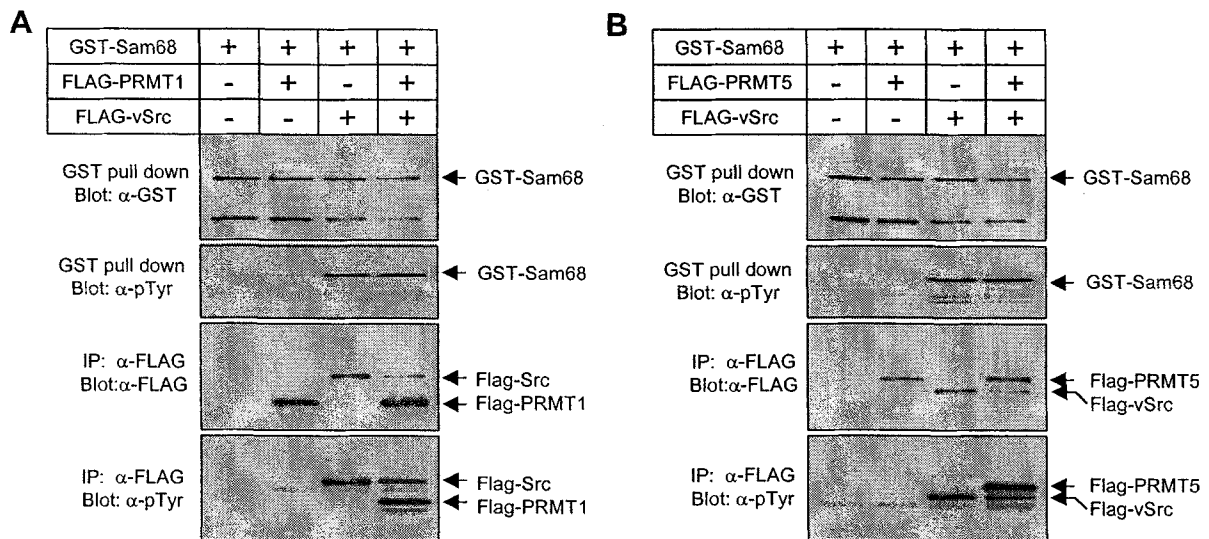


그림 4. vSrc tyrosine kinase phosphorylates PRMT1 (A) and PRMT5 (B) in vivo.

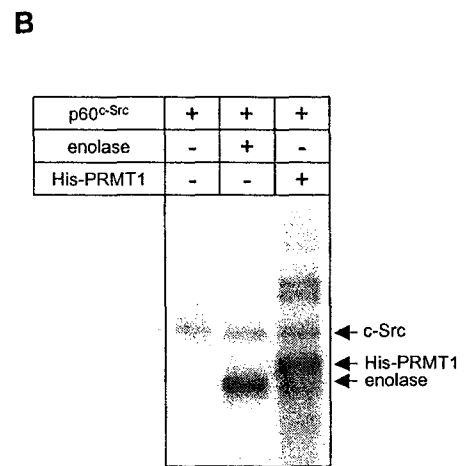
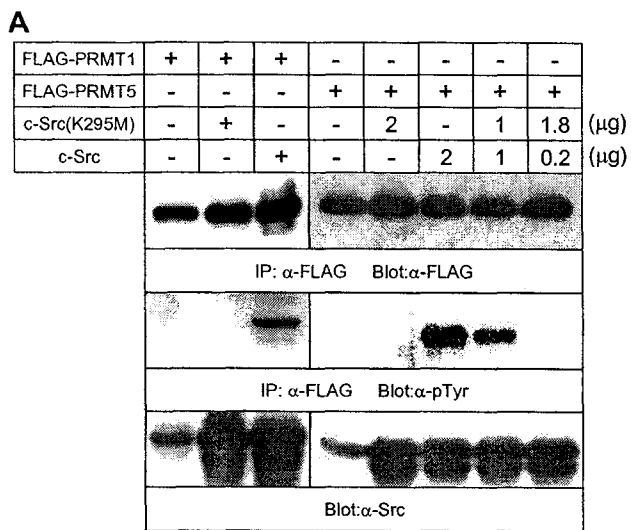


그림 5. cSrc kinase phosphorylates PRMT1 and PRMT5 in vivo (A) and His-PRMT1 in vitro (B).

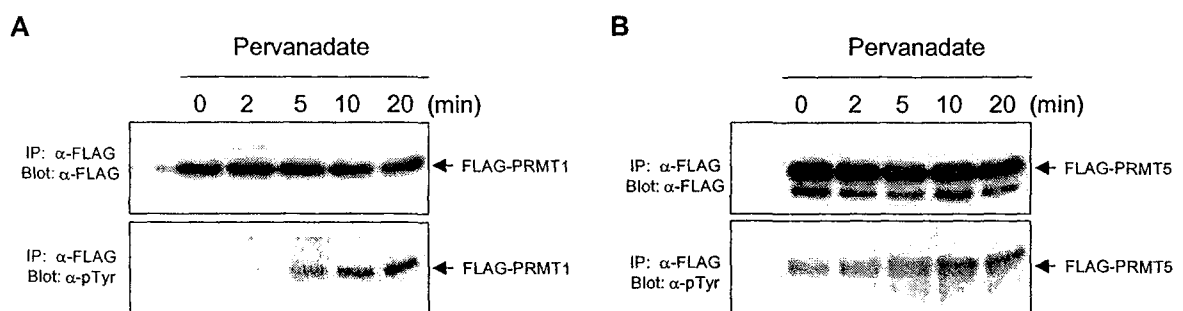


그림 6. Pervanadate, tyrosine phosphatase inhibitor, phosphorylates PRMT1 (A) and PRMT5 (B) in vivo.

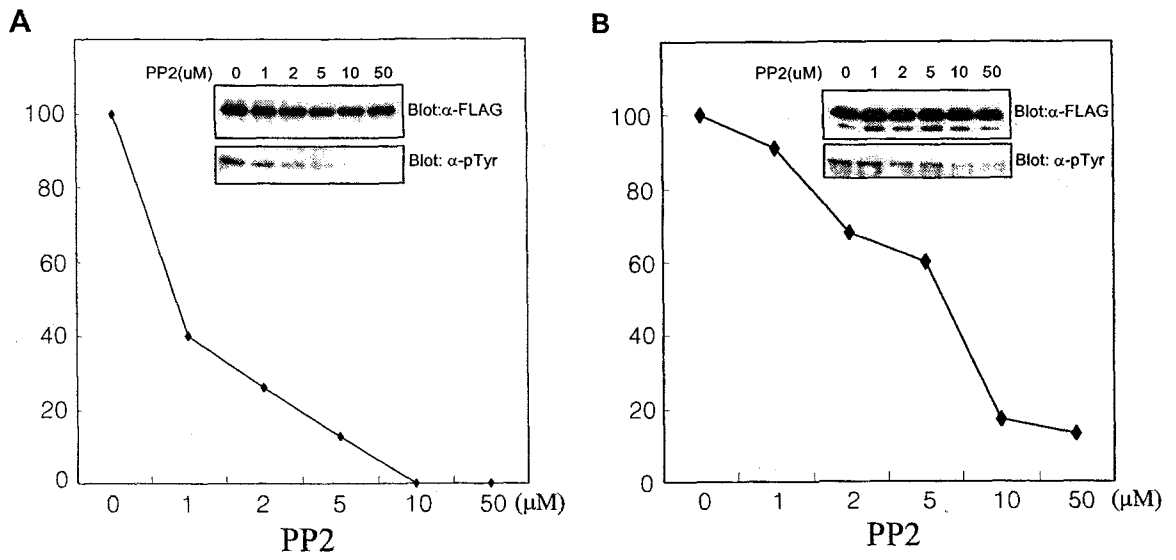


그림 7. PP2, Src kinase inhibitor, inhibits tyrosine-phosphorylation of PRMT1 (A) and PRMT5 (B) in vivo.

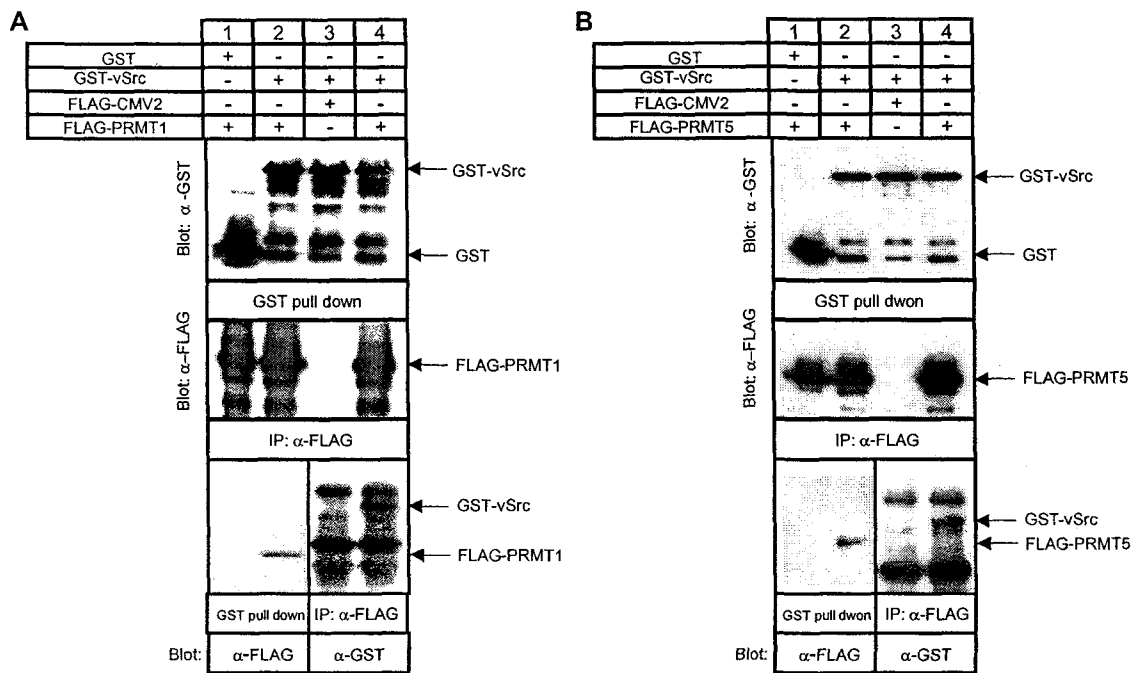


그림 8. vSrc associates with PRMT1 (A) or PRMT5 (B) in vivo.

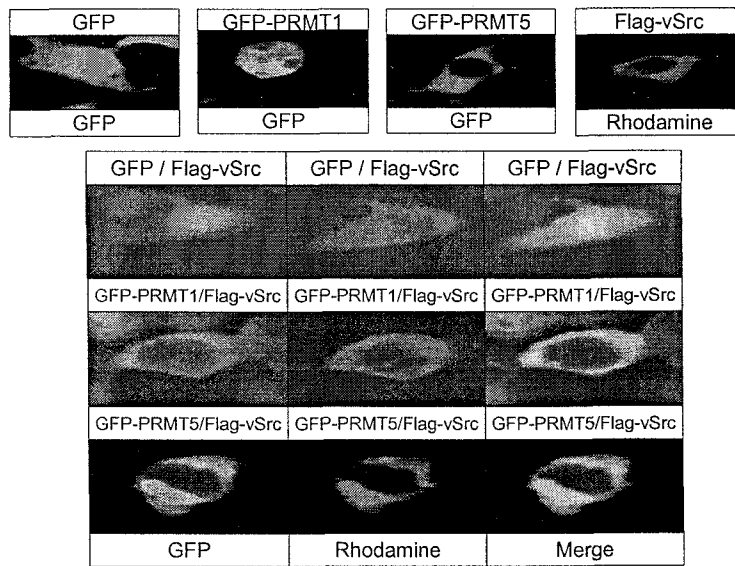


그림 9. vSrc colocalizes with PRMT1 or PRMT5.

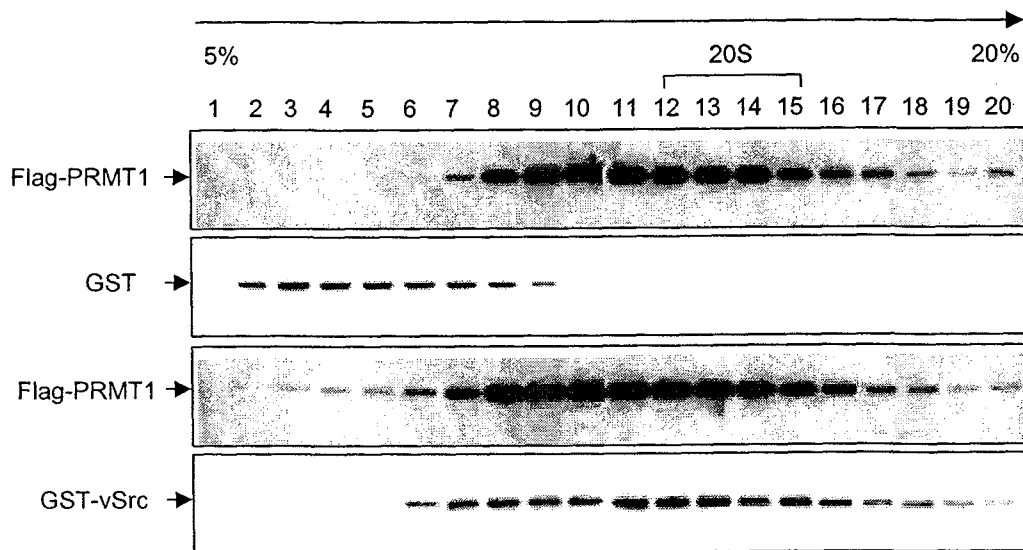


그림 10. PRMT1 cosediments with vSrc on sucrose density gradient.

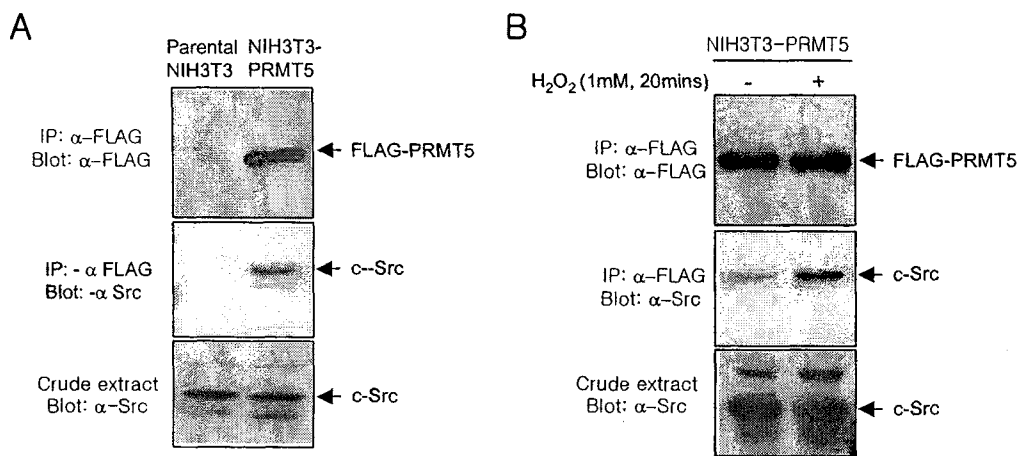
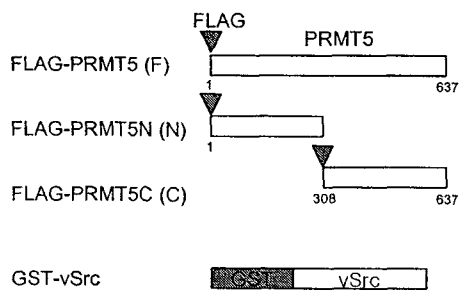


그림 11. (A) Intrinsic cSrc associates with PRMT5. (B) Hydrogen peroxide treatment increases the association of PRMT5 with intrinsic cSrc.

A



B

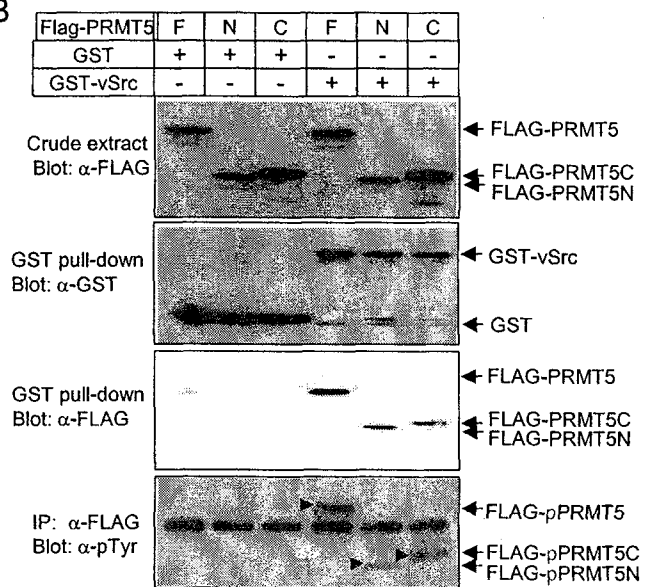


그림 12. vSrc kinase phosphorylates the N- and C-terminals of PRMT5.

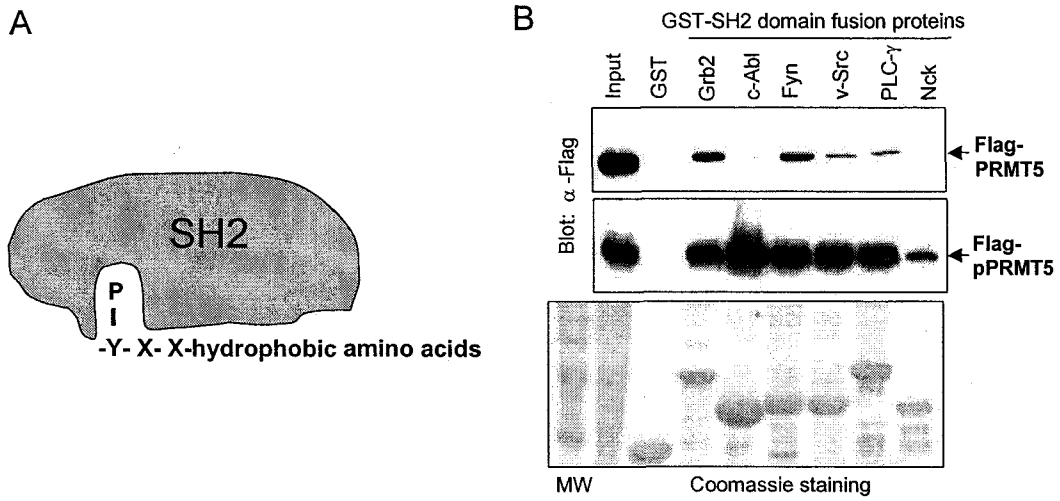


그림 13. Tyrosine-phosphorylated PRMT5 binds preferentially many GST-SH2 proteins in vitro

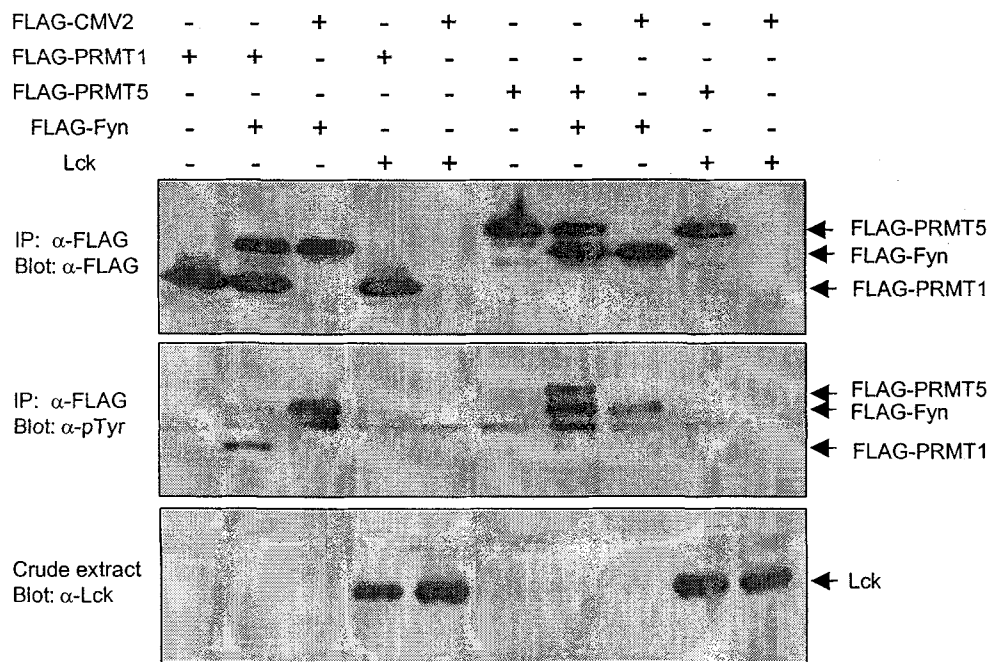


그림 14. Fyn kinase phosphorylates PRMT1 and PRMT5 in vivo.

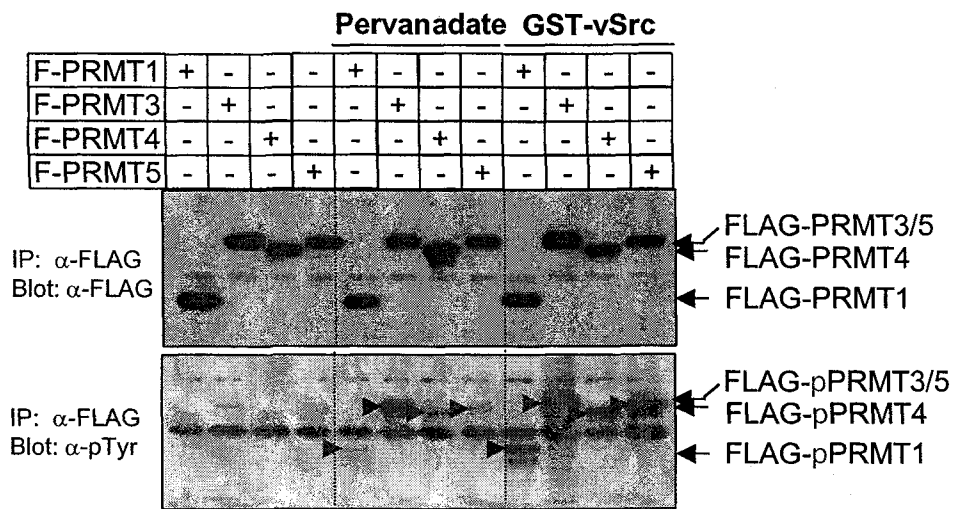


그림 15. PRMT3 and PRMT4 also are tyrosine-phosphorylated by vSrc or pervanadate in vivo.

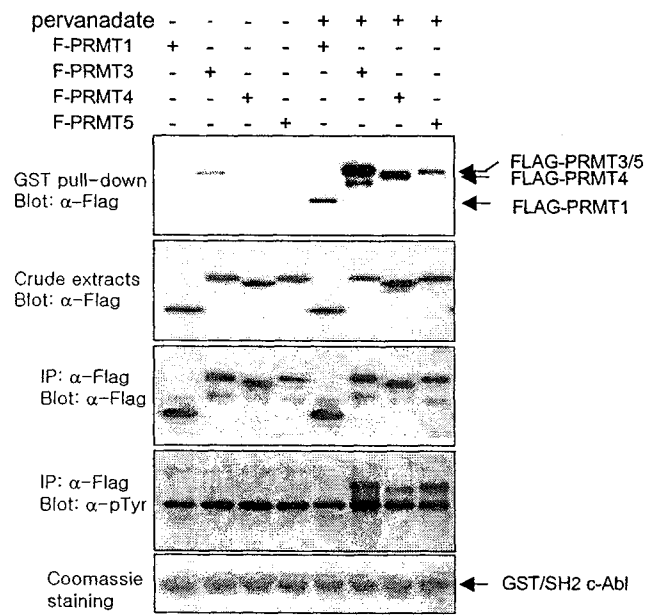


그림 16. Phosphorylated PRMT3 and PRMT4 bind preferentially GST-SH2(cAbl)

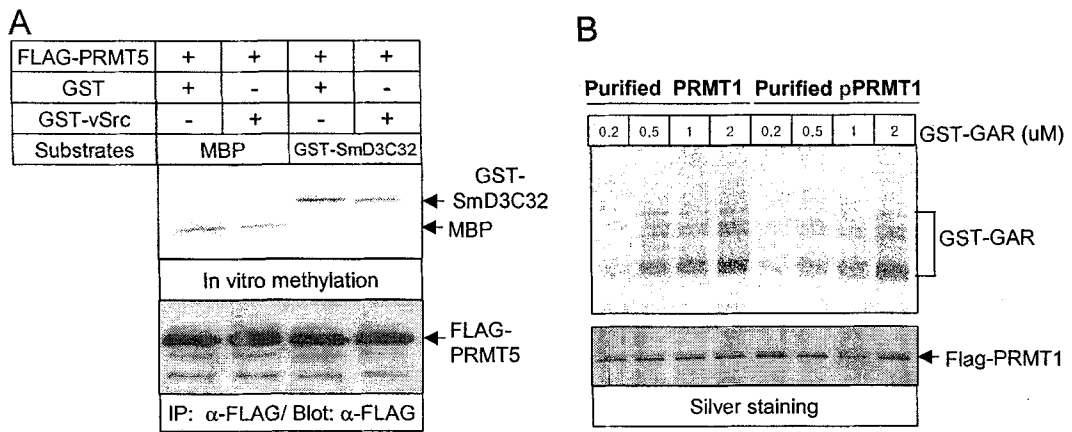


그림 17. Tyrosine-phosphorylation of PRMT5 (A) and PRMT1 (B) decreases activity of methyltransferase.

제 2 절 PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자 발굴 및 기능 분석

3.2.1. PRMT1 혹은 PRMT5와 인산화 의존적으로 결합하는 세포인자의 발굴

PRMT의 인산화가 결합하는 단백질 혹은 기질의 특이성을 결정해 줄 수 있는 지, 또한 만약에 있다면 결합하는 인자는 무엇인지, 그 결합의 의미는 무엇인지를 알아보기 위하여 PRMT5를 GST-vSrc 존재 유무하에서나, PRMT1을 c-Src발현벡터 존재 유무하에서 293T세포 내에 발현시킨 후, anti-Flag항체로 인산화되거나 되지않은 PRMT1 및 PRMT5를 각각 면역침전시킨 후 면역 침전물을 silver staining을 하여 결합된 단백질의 차이가 있는 지를 조사하였다 (그림 18). 그 결과 인산화되지 않은 PRMT5 혹은 PRMT1에 특이적으로 결합하는 단백질을 확인할 수 있었다 (그림 18A, PRMT5-x, 그림 18B, PRMT1-y). PRMT에 특이적으로 결합하는 단백질 밴드를 silver staining된 gel에서 분리하고, 이 단백질의 실체를 질량 분석으로 분석한 결과 PRMT5-x는 mRNA slicing에 관여하는 splicing factor SRp30C로 밝혀졌으며 (Table 1), 이 단백질의 아미노산을 조사한 결과 PRMT들에 의해 arginine methylation이 되는 데에 중요한 RGG motif를 3개 갖고 있음을 알 수 있었다 (그림 19). SRp30C단백질과 PRMT5간에 상호 결합이 세포내에서 일어나는지를 조사하였으나 서로 결합하지 않았다. SRp30C 단백질이 methylation되는지를 조사하였지만 긍정적인 결과를 얻지 못하였다. 비록 PRMT5와 SRp30C간의 상호결합을 확인하지는 못하였지만 PRMT5가 splicing과 관련된 RNA에 결합하는 단백질들과 상호결합하여 복합체를 형성하고 메틸화시키므로 PRMT5는 SRp30C와 직접적으로 결합하지는 않으나 PRMT5복합체 요소중의 하나일 수 있는 가능성을 배제할 수 없다. PRMT1에만 결합하는 후보 PRMT1-y 단백질의 실체를 단백질 질량분석을 통하여 조사한 결과 Zinc finger protein 37A로 밝혀졌으며 (Table 1), 이 단백질의 아미노산 서열을 조사한 결과 RGG motif를 갖고 있지 않았다. 따라서 이 단백질과 PRMT1과의 상호결합은 더 이상 연구되지 않았으며, 이 단백질은 PRMT1의 기질로서 기능하기보다는 활성을 조절할 수 있는 단백질일 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

3.2.2. PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자의 발굴

PRMT1, PRMT3, PRMT5 각각에 특이적으로 결합하여 methylation이 되는 기질들을 발굴하기 위하여 각각의 PRMT들을 발현시킨 후 면역침전시킨다음 mono/dimethylarginine특이적인 항체를 이용하고 동시에 silver staining하여 각각의 PRMT에 특이적으로 결합하는 단백질들이 존재하는 지를 조사한 결과 PRMT3에 특이적으로 결합하는 세포단백질을 확인할 수 있었고 (그림 20, middle and bottom panels, lane 3), 이 단백질의 실체를 단백질 질량분석을 통하여 분석한 결과 40S ribosome의 구성단백질 rps2라는 것을 동정하였다. 이 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 rps2 N말단에 arginine-glycine (RG) repeat가 존재하는 것을 알 수 있었다 (그림 21). 그림 21의 rps2 아미노산 서열에서 밑줄친 부위는 질량분석에서 관찰된 펩타이드들이다.

3.2.3. PRMT3와 rps2는 세포내에서 서로 특이적으로 결합한다.

PRMT3와 rps2간의 결합이 실제 세포내에서 일어나는 지를 알아보기 위하여 사람의 rps2유전자를 GST-융합 단백질로 발현시킬 수 있는 GST-rps2 발현벡터를 제작하였다. PRMT1, PRMT3, PRMT5 각각을 GST-rps2와 함께 발현시키고 GST pull-down 시킨 후 GST-rps2에 결합한 PRMT들을 anti-Flag항체로 immunoblotting 하였을 때 PRMT3만이 rps2와 결합하였다 (그림 20B, upper panel, lane 5). 이 실험에서 새롭게 발견된 사실은 PRMT들의 발현량은 거의 동일하였음에도 불구하고 (그림 20B, bottom panel), GST-rps2의 단백질양이 PRMT1이나 PRMT5의 경우보다 PRMT3가 발현되었을 경우 현저하게 증가되어 있다는 사실이었다 (그림 20B, middle panel, lane 5). 이 사실은 rps2의 세포내 half-life가 PRMT3와의 결합에 의해 영향 받을 수 있음을 암시하였다. Flag-PRMT3와 intrinsic rps2가 혹은 Flag-rps2가 intrinsic PRMT3와 서로 특이적으로 결합하는지를 알아보기 위해서 Flag-epitope로 tagging된 PRMT1, PRMT3, PRMT5, rps2를 각각 발현시킨 후에 anti-Flag항체로 면역침전시키고, anti-PRMT3 항체 혹은 anti-rps2 항체 (K protein의 peptide를 이용하여 만든 항체인데 rps2 단백질을 감지함, 미국 시애틀에 있는 워싱턴대학에서 제공받음)로 immunoblotting을 수행하였다. 그 결과 Flag-PRMT3는 intrinsic rps2와, Flag-rps2는 intrinsic PRMT3와 결합하는 것을 확인하였다 (그림 20C, lane 3, 5). Flag-rps2는 intrinsic rps2보다 SDS-PAGE gel에서 Flag epitope에 기인하여 서서히 이동되었다. 이 결과는 PRMT3가 rps2와 서로 세포내에서 특이적으로 결합한다는 것을 제시하고 있다.

3.2.4. PRMT3는 rps2 protein stability를 증가시킨다.

Rps2 protein stability가 PRMT3 특이적으로 증가되는 지를 알아보기 위해 GST-rps2가 발현되는 조건에서 Flag-PRMT3 혹은 Flag-PRMT1의 발현을 증가시켰을 때, GST-rps2 단백질의 양이 Flag-PRMT3단백질 발현량 의존적으로 증가되는 반면에, Flag-PRMT1의 경우에는 증가되지 않았다 (그림 22A, lanes 4-9, 10-12). 이 때 GST를 internal control로 사용하였고 GST protein stability는 PRMT들의 발현과 무관하게 일정하게 발현되었다 (lanes 7-12). Rps2 protein stability의 증가가 PRMT3 특이적으로 일어나는지를 확실하게 하기 위하여, GST-rps2(1-293) (full-length rps2) 혹은 GST-rps2 (60-293) (RG repeat가 있는 rps2의 N 말단 59개의 아미노산이 제거되어 있음)가 각각 발현되는 조건에서 Flag-PRMT3 단독 혹은 Flag-PRMT1 (그림 22B, lanes 2 and 5)과 Flag-PRMT3를 함께 발현시켰을 경우 (lanes, 3 and 6), GST-rps2 protein stability의 증가는 단지 PRMT3 의존적으로 나타났으며, rps2는 PRMT1이 존재하더라도 PRMT3와 특이적으로 결합하였다 (그림 22B, lane 3 and 6). 이 결과는 free rps2는 세포내에서 proteolysis가 일어나나 rps2와 결합하는 PRMT3가 존재할 경우 proteolysis가 일어나지 않아 안정화된다는 것을 제시하고 있다.

3.2.5. Rps2의 100-293 영역이 PRMT3와의 결합 및 protein degradation을 결정하는 영역이다.

PRMT3와 결합하고 rps2의 protein stability를 결정하는 영역을 알아보기 위해서 6종류의 rps2의 deletion mutant들을 제작하고 (그림 23A), 이들의 PRMT3와의 결합여부를 조사한 결과 GST-rps2(60-293) 및 GST-rps2(100-293) 단백질만이 PRMT3에 결합하였다 (그림 23B, middle panel, lanes 5 and 6). GST-rps2(60-180), GST-rps2(180-293) 혹은 GST-rps2(60-220) 단백질들의 발현은 확인되었지만 Flag-PRMT3와는 결합하지 않았다. 이 결과는 rps2의 100-293 영역이 PRMT3와 결합에 필수적이라는 것을 제시하고 있다. GST-rps2 변이체들이 methylation 되었는지를 anti-mono/dimethylarginine 항체로 immunoblotting한 결과 예상한대로 RG repeat가 있는 N말단 (RGR)영역을 갖는 GST-rps2(1-60)과 GST-rps2(1-293) 단백질만이 methylation되어 있는 것으로 나타났다 (그림 23B, bottom panel, lanes 2 and 8: 이는 in vitro methylation assay 결과와도 일치함; 그림 29 참조). 이 결과는 rps2의 arginine methylation과 protein stability와는 서로 상관되지 않는다는 것을 암시하고 있다. Rps2의 protein stability를 결정하는 영역을 분석하기 위해 각각의 GST-rps2 mutant들을 PRMT3발현벡터 존재 유무하에서 발현시킨 후 세포의 단백질 추출물을 얻은 다음 anti-GST 항체로 immunoblotting하였다 (그림 23C, left panel). 그 결과, GST-rps2(60-293), GST-rps2(100-293), 및 GST-rps2(1-293) 단백질만이 Flag-PRMT3가 발현되지 않았을 경우 단백질 양이 감소되었다. 이 조건에서 GST-rps2의 mRNA를 RT-PCR로 정량하였을 때 각각의 GST-rps2의 mRNA는 Flag-PRMT3가 있거나 없거나 비슷한 수준으로 검출되었다. 이 결과는 rps2의 protein stability를 결정하는 영역은 rps2(100-293)이며 이 영역이 PRMT3와 결합하는 것으로 보아 PRMT3와 rps2간의 상호 결합이 protein stability를 결정한다는 것을 제시하고 있다.

3.2.6. PRMT3의 catalytic domain은 PRMT3와 rps2(100-293)간의 결합에 필수적이지 아니다.

Rps2와 결합하는 PRMT3 단백질 영역을 알아보기 위하여 5종의 PRMT3 deletion mutant들을 제작하였다 (그림 24A). PRMT3는 529개의 아미노산을 갖고 있으며 크게 두 개의 영역으로 구성되어 있다. 하나는 acidic-rich amino acids(NAR) 및 C2H2 type의 zinc finger domain들로 구성된 134개의 N말단이고 (NAR Zn; 이 영역은 PRMT3 효소 활성을 갖고 있지 않음; PRMT3의 기질 특이성과 효소활성을 조절하는 영역으로 추정되고 있음), 다른 하나는 단백질의 알지닌 메틸화 효소활성을 나타내는 catalytic core (135-529)이다. 실제로 in vitro methylation assay를 통하여 PRMT3 N말단이 효소활성을 갖고 있지 않으며, N말단 104개의 아미노산이 제거된 PRMT3(104-529) 변이체는 효소활성을 나타내는 것을 확인하였다 (그림 24B). 각각의 Flag-PRMT3 deletion mutant들을 GST-rps2(100-293)와 함께 293T 세포에 발현시킨 후에 rps2와 결합하는 PRMT3의 최소 단백질 영역을 조사한 결과 rps2와 결합하는 PRMT3 영역은 1-134개의 N말단이었다 (그림 24C, middle panel, lanes 2 and 4). PRMT3 N

말단 영역 (1-134 혹은 1-264)이 발현될 때 GST-rps2 단백질 양이 현저하게 증가되었다 (그림 24C, top panel, lanes 2 and 4). 또한 Flag-PRMT3 deletion mutants 혹은 PRMT3 효소 활성이 없는 PRMT3 mutant (PRMT3M) 발현백터를 293T세포에 과발현시키고 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 침전물들을 silver staining 하였을 때 실제로 134개의 아미노산 N말단을 갖는 Flag-PRMT3 변이체들 및 PRMT3M들이 intrinsic rps2와 결합하고 intrinsic rps2 protein stability를 증가시켰다 (그림 24D, lanes 2, 3 and 6).

3.2.6. Rps2는 ubiquitin-mediated proteolysis에 의해 분해되고 PRMT3는 rps2의 poly-ubiquitination을 저해하여 rps2의 protein stability를 증가시킨다.

Ribosome은 4종류의 RNA와 약 80종의 ribosomal 단백질로 구성되어 있고, 과량으로 발현된 ribosomal protein이나 40S ribosome에 incorporation되지 않은 단백질들은 세포내에서 분해된다. 과발현된 rps2가 실제로 ubiquitin-mediated proteolysis에 의해 분해되는지를 조사하였다. GST-rps2(1-293) 혹은 GST-rps2(60-293)를 6개의 histidine이 tagging되어 있는 ubiquitin (His₆Ub) 발현백터와 함께 293T세포에 발현시키고 다양한 농도의 MG132 (proteasome inhibitor)로 처리하고 세포 추출물을 얻은 후 Ni²⁺-NTA pull-down assay를 하였을 때 ubiquitination된 rps2들이 MG132 농도 의존적으로 증가되었다 (그림 25A). PRMT3가 rps2의 ubiquitination을 저해하는지를 PRMT3를 발현시키는 조건에서 조사한 결과 PRMT3가 존재할 경우 poly-ubiquitination된 rps2가 검출되지 않았으며 (그림 25B, top panel, lanes 3 and 7), 동시에 PRMT3가 존재할 경우 세포내에 GST-rps2 단백질의 양이 증가되었다 (middle panel, lanes 3, 4, 7, and 8). 이 결과는 free rps2는 세포내에서 ubiquitin-mediated proteolysis에 의해 분해되며, rps2는 PRMT3와 결합하므로 ubiquitination되지 않아 세포내에서 안정화된다는 것을 제시한다. 이 경우 methylation이 일어나는 rps2 N말단이 제거된 GST-rps2(60-293)을 사용하였으므로 rps2 proteolysis와 rps2의 arginine methylation과는 상관성이 없는 것으로 결론내릴 수 있었다.

3.2.6. PRMT3와 rps2는 in vivo 및 in vitro 에서 안정한 복합체를 형성한다.

PRMT3와 rps2가 세포내에서 안정한 복합체를 형성하는지를 조사하기 위해 Flag-tagging된 PRMT3와 rps2를 293T세포에 함께 발현시킨 후 단백질 추출물을 sucrose density gradient를 통하여 침강시킨 후 분획하고 각각의 분획을 anti-Flag 항체로 immunoblotting한 결과 Flag-PRMT3는 Flag-rps2와 cosediment되었다 (그림 26). 각각의 분획을 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 면역침전물을 anti-rps2 항체로 immunoblotting 하여 rps2의 존재를 확인하였다 (그림 26). PRMT3-rps2 복합체들이 68 kDa과 240 kDa사이에 침강되는 것으로 보아 PRMT3-rps2는 heterodimer의 monomer (약 97 kDa) 혹은 dimer로서 존재할 가능성이 높다. 이 결과는 PRMT3가 세포내에서 rps2와 안정한 복합체를 형성할 수 있다는 것을 암시하고 있다. 이는 또한 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit로 작동하여 PRMT3 효소활성을 조절할 수 있는 가능성을 암시한다.

PRMT3가 rps2와 시험관내에서 서로 안정한 복합체를 형성하는지를 조사하였다. 우선적으로 대장균에서 발현시킨 rps2와 His-PRMT3를 이용하여 안정한 복합체를 형성하는지를 조사하였으나 대장균에서 발현된 GST-rps2는 His-PRMT3와 시험관내에서 효과적으로 결합하지 않았다. 이는 대장균에서 발현된 rps2가 포유동물세포에서 발현된 rps2와는 conformation이 다른 단백질 구조를 다른 갖고 있음에 기인할 것으로 추정되었다. Rps2는 arginine과 lysine과 같은 염기성 아미노산을 많이 갖고 있다는 점을 고려하고, 포유동물세포에서 아직 규명되지 않은 rps2의 posttranslational modification이 일어날 수 있다는 것을 가정하면 대장균에서 얻은 rps2와 PRMT3간의 상호결합이 효과적으로 일어나지 않을 수 있는 가능성은 충분히 있을 것으로 사료되었다. 이런 이유로 Flag-rps2를 발현시킨 293T 세포의 단백질 추출액 (이 경우 PRMT3 단백질이 제한적으로 존재하기 때문에 proteolysis에 의해 Flag-rps2 단백질량은 적으나 검출할 수는 있었음)과 대장균에서 분리정제한 His-PRMT3를 배양시킨 후 sucrose density gradient상에서 침강시켜 Flag-rps2와 His-PRMT3간의 상호결합이 일어나는지를 조사하였다. 정제된 His-PRMT3와 Flag-rps2를 함유하는 단백질 추출액을 반응시킨 후 Ni²⁺-NTA pull-down assay를 하고 anti-Flag 항체로 immunoblotting한 결과 His-PRMT3와 Flag-rps2가 in vitro에서 복합체를 형성함을 알 수 있었다 (그림 27C, lane 2). Flag-rps2를 발현시킨 세포의 단백질 추출액과 정제한 His-PRMT3를 반응시킨 반응혼합물 (그림 27B)과 Flag-rps2를 함유하는 단백질 추출액 (그림 27A) 각각을 sucrose density gradient상에서 침강시키고 분획한 후 His-PRMT3, Flag-rps2가 어떤 분획에 존재하는지를 해당하는 항체를 이용한 immunoblotting으로 조사하였다. Flag-rps2를 함유한 단백질 추출액의 경우 예상 밖으로 Flag-rps2 (rps2 MW: 약 31 kDa)가 68-240 kDa에서 검출되었다 (그림 27A, top panel, fractions 6-10). 이는 Flag-rps2가 세포 내에서 self-association되어 있거나, intrinsic PRMT3를 포함하는 다른 단백질들과 함께 존재할 수 있음을 제시하고 있다. 이 분획들을 anti-PRMT3 항체로 immunoblotting한 결과 intrinsic PRMT3가 Flag-rps2와 cosediment되는 것을 알 수 있었다 (그림 27A, bottom panel, fractions 6-8). Flag-rps2를 발현시킨 세포의 단백질 추출액과 정제한 His-PRMT3를 반응시킨 반응혼합물의 sucrose sedimentation결과 Flag-rps2와 His-PRMT3가 함께 68-240 kDa에서 cosediment되는 것을 관찰 할 수 있었고 (그림 27B, fractions 6-9), Fractions 9, 10 에서 관찰되었던 Flag-rps2의 band intensity가 PRMT3와 반응시킨 후에는 상대적으로 감소하였고 (그림 27A, top panel), Fractions 7, 8의 Flag-rps2의 band intensity가 상대적으로 증가하였다 (그림 27B, top panel). 이현상은 in vitro에서 Flag-rps2와 His-PRMT3가 stable complex를 형성하였기 때문에 나타난 것으로 사료되었다. 반면에 정제된 His-PRMT3만을 sucrose density gradient 에서 침강시켰을 때 45-68 kDa에서 검출되었다 (이는 His-PRMT3가 monomer로 존재한다는 것을 의미함) (그림 27E, top panel, c1). 그림 27A과 27B의 fraction 8의 일부를 취하여 Ni²⁺-NTA pull-down assay를 하고 anti-Flag 항체로 immunoblotting한 결과 His-PRMT3와 Flag-rps2가 안정한 복합체를 형성하고 있음을 다시 확인할 수 있었다 (그림 27D). 이 결과들은 포유동물세포에서 발현된 rps2가 PRMT3와 in vitro에서 안정한 복합체를 형성한다는 것을 제시하고 있다.

3.2.7. His-PRMT3는 intrinsic rps2와 복합체를 형성하며 복합체는 효소활성을 나타낸다.

정제된 His-PRMT3가 intrinsic rps2와 복합체를 형성하고 형성된 복합체가 효소활성을 나타내는지 알아보기 위하여 Bosc23 세포 단백질 추출물(B23)과 정제된 His-PRMT3를 반응시켰다. 반응물에서 His-PRMT3와 intrinsic rps2가 복합체를 형성하였는지를 반응물 일부와 정제된 His-PRMT3를 Ni²⁺-NTA pull-down assay를 하고 anti-rps2 항체로 immunoblotting한 결과 정제한 His-PRMT3가 intrinsic rps2와 복합체를 형성하고 있음을 알 수 있었다 (그림 27F, top panel, lane c2). 거의 동등한 양의 His-PRMT3가 Ni²⁺-NTA에 결합하였고 (그림 27F, top panel, lanes c1 and c2), 이를 in vitro methylation assay에 이용하였다. 이 때 methyl acceptor로서 GST-GAR를 사용하였다. 반응 생성물을 fluorography로 검색하였을 때 His-PRMT3-intrinsic rps2 복합체가 His-PRMT3 단독보다 약 2배 정도 높은 효소활성을 나타내었다 (그림 27F, third panel). 이 경우 Ni²⁺-NTA agarose에 결합하고 있는 His-PRMT3 혹은 His-PRMT3-intrinsic rps2 복합체에 PRMT1 혹은 PRMT5가 존재하는지 알아보기 위하여 anti-PRMT1 혹은 anti-PRMT5로 immunoblotting을 하였다. 그 결과 His-PRMT3와 세포 단백질 추출액(B23)을 혼합시킨 반응물이나 세포 추출물(B23)에는 PRMT1 (그림 27G, top panel)과 PRMT5 (그림 27G, third panel)가 존재하였으나 Ni²⁺-NTA agarose에 결합한 단백질에는 PRMT1이나 PRMT5가 검출되지 않았다 (그림 27G, second and bottom panels). 이 결과는 Ni²⁺-NTA agarose에 결합한 His-PRMT3 혹은 His-PRMT3-intrinsic rps2 복합체에 의해서 GST-GAR가 methylation되었음을 제시한다.

세포 단백질 추출물과 정제된 His-PRMT3를 혼합하여 얻은 반응물 (상기 실험결과 His-PRMT3와 intrinsic rps2가 복합체를 형성하고 있음)과 정제된 His-PRMT3를 sucrose density gradient상에서 침강시키고 어떤 분획에 His-PRMT3와 intrinsic rps2가 존재하는지를 anti-His 항체로 immunoblotting하였다. 그 결과 정제된 His-PRMT3는 45-68 kDa에서 침강되었고, 이는 His-PRMT3가 monomer로서 존재한다는 것을 제시한다 (그림 27E, top panel, c1, fractions 5, 6). 세포 단백질 추출물과 정제된 His-PRMT3를 혼합하여 얻은 반응물의 경우 His-PRMT3가 68-240 kDa사이에서 침강되었다 (그림 27E, bottom panel, c2, fractions 7-9). 이 결과는 His-PRMT3가 intrinsic rps2와 안정한 복합체를 형성한다는 것을 제시한다. 정제된 His-PRMT3를 sucrose gradient에서 침강시킨 fraction 5와 세포 단백질 추출물과 정제된 His-PRMT3를 혼합하여 얻은 반응물의 sucrose gradient에서 침강시킨 fraction 8의 일부를 취하여 Ni²⁺-NTA pull-down assay를 하고 anti-rps2 항체로 immunoblotting한 결과 역시 His-PRMT3와 intrinsic rps2가 안정한 복합체를 형성한다는 것을 알 수 있었다 (그림 27H, lanes c1-5 and c2-8). 이 경우 거의 동량의 His-PRMT3가 Ni²⁺-NTA agarose에 결합하였고, 이를 in vitro methylation assay에 이용하였다. 이 때 methyl acceptor로서 GST-rps2(1-60)을 사용하였다. 반응생성물을 fluorography로 검색한 결과 His-PRMT3-intrinsic rps2 복합체의 효소 활성이 His-PRMT3 단독보다 2 배 정도 높았다 (그림 27H, third panel). Ni²⁺-NTA agarose에 결합한 단백질중에 PRMT1 혹은 PRMT5가 검출되지 않았다. 이 결과는 His-PRMT3-intrinsic rps2 복합체가 His-PRMT3 보다 증가된 효소활성을 나타낸다는 것을 제시하고 있다.

3.2.8. His-PRMT1 및 His-PRMT3는 GST-rps2를 methylation시킨다.

GST-rps2가 PRMT3 특이적인 기질인지를 알아보기 위하여 대장균에서 분리정제한 GST-rps2가 His-PRMT3에 의해 특이적으로 methylated되는지를 조사하였다. 이 경우 GST-GAR를 control로 이용하였다. 다양한 농도의 GST-GAR 혹은 GST-rps2를 His-PRMT1 혹은 His-PRMT3와 반응시킨 다음 반응생성물을 fluorography를 통하여 검증하였고 (그림 28A) 이를 phosphorimager를 통하여 정량화하였다 (그림 28B). 그 결과 GST-GAR는 His-PRMT1이나 His-PRMT3에 의해 비슷한 정도로 methylation되었으나, GST-rps2는 His-PRMT1보다 His-PRMT3에 의해 2 배정도 많이 methylation되었다. 이 결과는 GST-rps2가 적어도 PRMT3 특이적인 기질은 아니라는 것을 제시한다.

3.2.9. RG repeat를 갖고 있는 rps2의 N말단(1-60)이 methylation되는 영역이다.

Rps2의 어느 영역이 methylation되는지를 알아보기 위하여 GST-rps2(1-60), GST-rps2(60-293), GST-rps2(1-293), myelin basic protein (효소활성이 있음을 보여주기 위한 control) 각각을 methyl acceptor로 하여 in vitro methylation assay를 수행하였다. 이 경우 293세포에서 발현시킨 Flag-PRMT1, Flag-PRMT3, Flag-PRMT5 각각을 anti-Flag 항체로 면역침전시킨 후 침전물을 assay에 사용하였다. 반응생성물을 fluorography를 통하여 검색한 결과 RG repeat를 갖고 있는 GST-rps2(1-60) 및 GST-rps2(1-293)가 methylation되었다 (그림 29).

3.2.10. 효소활성이 없는 PRMT3 mutant는 세포내에서 rps2의 methylation을 저해하지 못한다.

PRMT3 혹은 PRMT1의 효소활성이 없는 변이체들을 세포내에서 과발현시킬 경우 rps2의 methylation이 영향을 받는지를 조사하여 rps2가 PRMT3의 특이적인 기질인지를 조사하였다. PRMT3의 catalytic domain에 amino acids substitution mutation을 유도한 후 이 변이체가 효소활성을 나타내지 않는지를 in vitro methylation assay를 수행하여 조사하였을 때 Flag-PRMT3M은 실제로 효소활성을 나타내지 않았다 (그림 30A). Flag-PRMT1과 효소활성이 없는 Flag-PRMT1M, Flag-PRMT3, 효소활성이 없는 Flag-PRMT3M 각각을 Flag-rps2와 함께 293T세포에 발현시킨 후 anti-Flag 항체로 면역침전시키고 anti-Flag 항체로 immunoblotting하여 각각의 Flag-tagging된 단백질들이 거의 동등한 수준으로 발현되었음을 확인하고 (그림 30B, top panel), 이 면역침전물을 asymmetric dimethylarginine을 갖는 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 이용하여 immunoblotting하였다 (그림 30B). 그 결과 PRMT3M을 과발현시키더라도 Flag-rps2 및 intrinsic rps2는 methylation되어 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 rps2는 세포내에 존재하는 type I PRMT에 의해 methylation된다는 것을 제시하고 있다.

3.2.11. PRMT3의 인산화는 PRMT3-rps2와의 복합체 형성을 저해한다.

PRMT3는 다른 PRMT들에 비해 pervanadate나 Src kinase에 의해 가장 효과적으로 인산화되었고 (그림 15 참조), 본 연구를 통하여 PRMT3에 특이적으로 결합하는 세포인자로서 rps2를 발견하였다. PRMT의 인산화는 효소활성에 영향을 주거나 (그림 17 참조, PRMT의 인산화는 효소활성을 저하시킴), 단백질-단백질간에 결합에 영향을 줄 수 있다. PRMT3와 rps2간의 결합에 PRMT3 인산화가 미치는 영향을 조사하기 위하여 Src tyrosine kinase 존재유무하에서 Flag-PRMT3를 발현시킨 후 anti-Flag 항체로 각각 면역침전시켰다. 면역 침전물을 각각 동등하게 3 분획으로 나누었다. 분획된 면역침전물을 anti-Flag 항체로 immunoblotting하여 인산화된 Flag-PRMT3와 인산화되지 않은 Flag-PRMT3가 동등하게 존재하는지를 조사한 결과, 인산화된 Flag-PRMT3가 인산화되지 않은 Flag-PRMT3에 비해 많이 존재하였다 (그림 31, bottom panel). Src kinase 유무존재하에서 면역침전시킨 Flag-PRMT3가 실제로 인산화되었거나 되지 않았는지를 anti-phosphotyrosine 항체로 immunoblotting하여 검증한 결과 GST-vSrc 존재하에서 발현시킨 Flag-PRMT3가 인산화되어 있음을 확인할 수 있었고 (그림 31, third panel), GST-vSrc의 발현도 확인할 수 있었다 (그림 31, second panel). 분획된 면역침전물을 각각 300, 500, 1000 mM NaCl로 세척한 후 각각의 세척된 면역침전물을 anti-monomethylarginine 항체로 immunoblotting하여 PRMT3에 결합하는 methylated rps2의 양을 조사하였다. 그 결과 인산화된 Flag-PRMT3에 결합하는 methylated rps2의 양이 NaCl 농도 의존적으로 감소되었다 (그림 31, top panel). 이 결과는 PRMT3가 인산화되면 methylated rps2와의 결합력이 저하된다는 것을 제시한다. 이 결과는 또한 인산화가 단백질-단백질간의 결합에 영향을 준다는 것을 암시하고 있다.

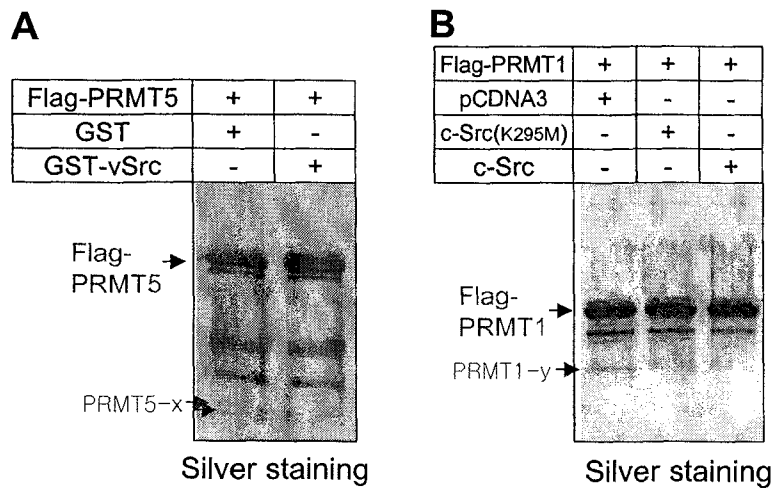


그림 18. Tyrosine-phosphorylation of PRMT5 (A) and PRMT1 (B) modulates their association with cellular proteins.

Table 1. Summary of mass spectrometric analysis of proteins interacting with PRMT5 or PRMT1

Protein bands analyzed	Identified proteins	Identification by MALDI	Number of matched peptide	Sequence coverage	Identification by MS/MS
PRMT5-x	Splicing factor SRp30c	+	24	54%	ND
PRMT1-y	Zinc finger protein 37A	+	17	51%	ND

Amino acids sequence of splicing factor SRp30c (PRMT5-x)

1	msgwadergg	egdgriyvgn	lptdvrekdl	edlfykygri	reielknrhg	lvpfafvrfe
61	dprdaedaiy	grngydygqc	rlrvefprty	ggrggwprgg	rngpptrrsd	frvlvsglpp
121	sgswqdlkdh	mreagdvcy	dvqkdgvvmv	eylrkedmey	alrklddtkf	rshegetsyi
181	rvyperstsy	gysrsrsgsr	grdspyqsr	sphyfspfrp	y	

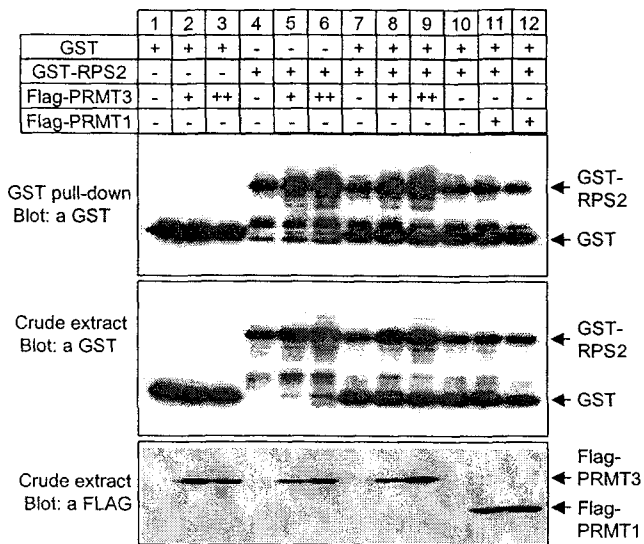
그림 19. Amino acids sequence of SRp30C potentially interacting with PRMT5.

Amino acids sequence of ribosomal protein s2 (RPS2) interacting with PRMT3

1	MADDAGAAGG	PGGPGGPGMG	<u>NRGGFRGGFG</u>	SGIRGRGRGR	<u>GRGRGRGRGA</u>	RGGKAEDKEW
61	MPVTKLGRLV	KDMKIKSLEE	<u>IYLFSLPIKE</u>	<u>SEIIDFFLGA</u>	<u>SLKDEVLKIM</u>	PVQKQTRAGQ
121	RTRFKAFVAI	<u>GDYNGHVGLG</u>	<u>VKCSKEVATA</u>	IRGAILAKL	SIVPVRRGYW	GNKIGKPHTV
181	PCKVTGRCGS	VLVRLIPAPR	<u>GTGIVSAPVP</u>	<u>KKLMMAGID</u>	DCYTSARGCT	ATLGNFAKAT
241	FDAISKTYSY	<u>LTPDLWKETV</u>	<u>FTKSPYQEFT</u>	<u>DHLVKTHTRV</u>	SVQRTQAPAV	ATT

그림 21. Amino acids sequence of rps2. Rps2 contains a number of arginine-glycine (RG) repeats in its N-terminus and are methylated by PRMT1 and PRMT3 in vitro (see Fig. 29). The peptide sequences which are identified by mass-spectrometry are underlined.

A



B

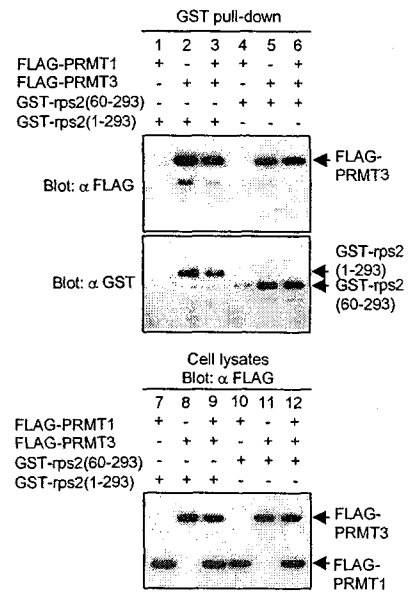


그림 22. PRMT3, but not PRMT1 increases the protein-stability of rps2.

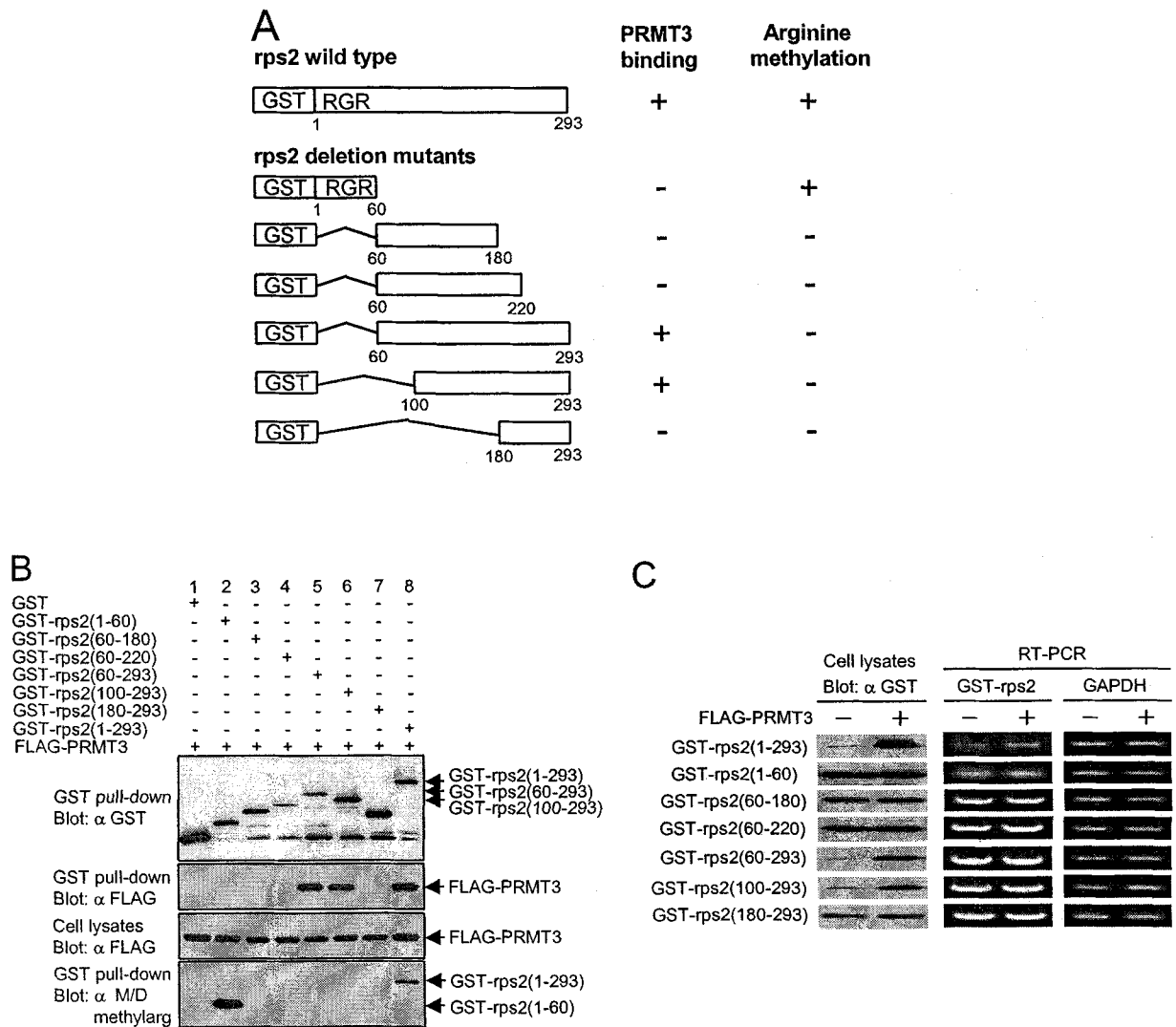


그림 23. (A) Schematic illustration of GST-fused rps2 mutants with the indicated deletions. RGR stands for the RG repeats region. (B and C) GST-rps2(100-293), but not GST-rps2(1-60) is essential for its binding to PRMT3 and determines the protein stability of rps2.

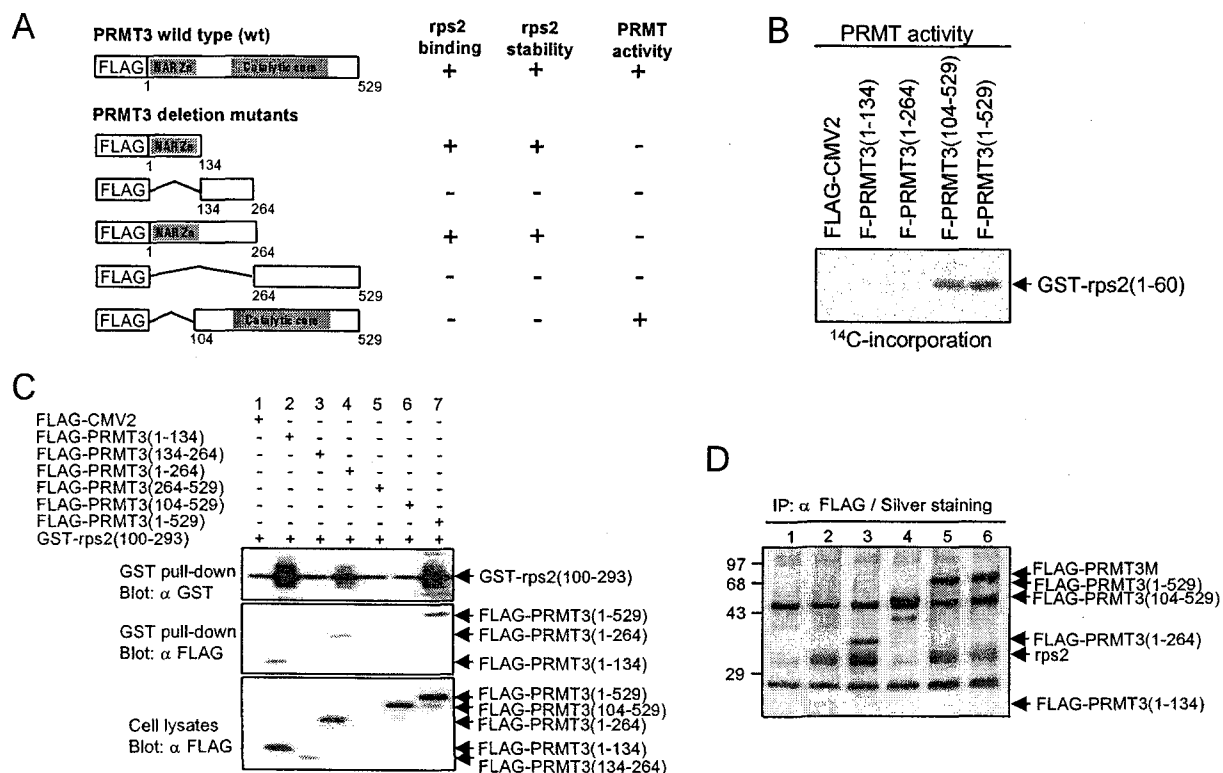


그림 24. (A) Schematic illustration of Flag-tagged PRMT3 mutants with the indicated deletions. NAR Zn stands for the N-terminus acidic amino acids-rich domain and Zn finger motif present in the N-terminus of PRMT3. (B) The N-terminus of PRMT3(1-104) is not required for the methyltransferase activity. (C) The N-terminus of PRMT3(1-134), but not the catalytic domain binds rps2. (D) The N-terminus of PRMT3(1-134) determines the binding to and stability of rps2. PRMT3M is a catalytically inactive mutant (see Fig. 30A). Lanes; 1. pCMV-Flag; 2, Flag-PRMT3(1-134); 3, Flag-PRMT3(1-264); 4, Flag-PRMT3(104-529); 5, Flag-PRMT3(1-529); 6. Flag-PRMT3M. IP stands for immunoprecipitation.

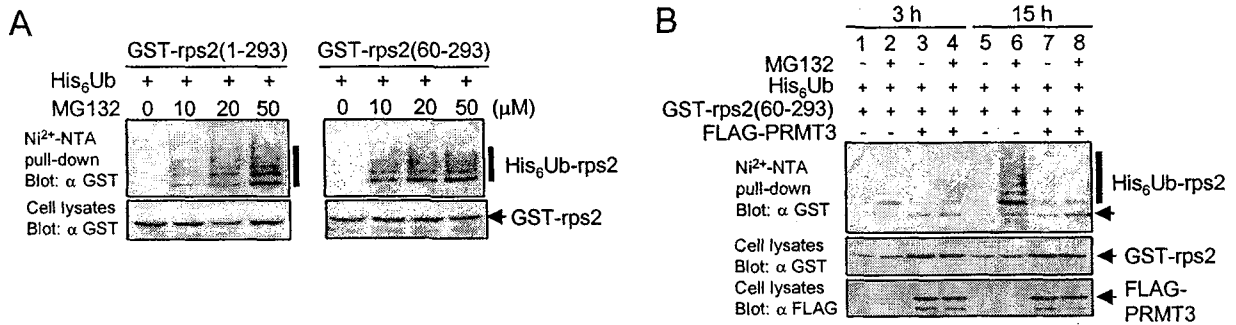


그림 26. (A) Rps2 is degraded via ubiquitination-proteasome pathway. (B) PRMT3 inhibits polyubiquitination of rps2 and thereby stabilizes rps2 protein.

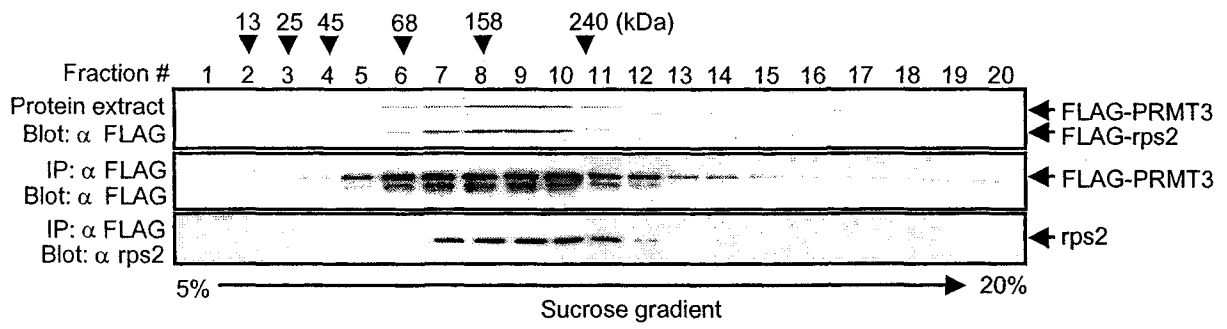


그림 26. PRMT3 forms a stable heterodimer with rps2 in vivo.

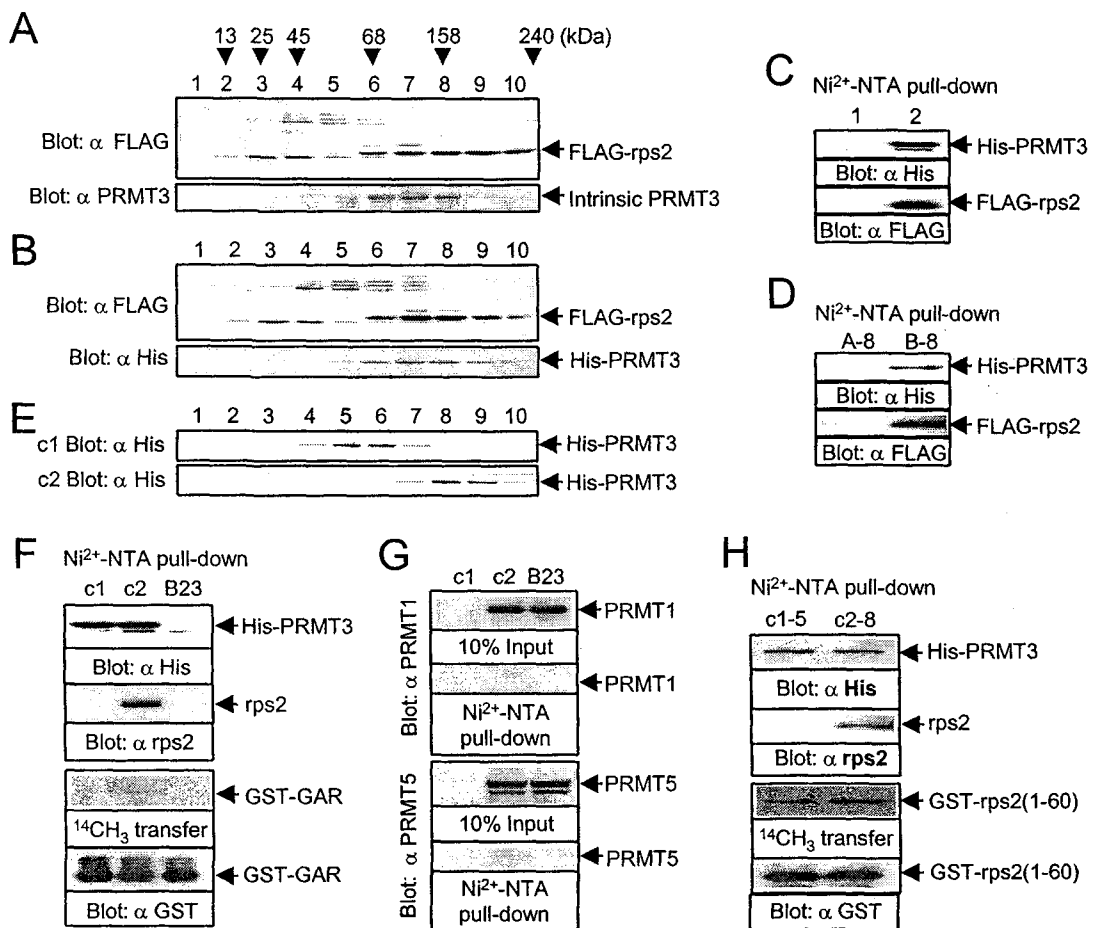
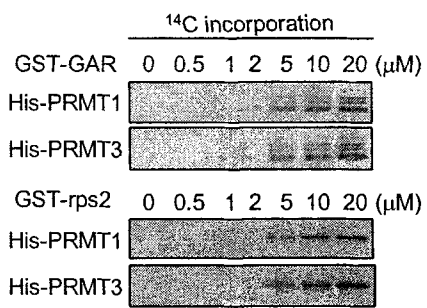


그림 27. (A) Flag-rps2 cosediments with intrinsic PRMT3. (B, C, and D) PRMT3 forms a stable complex with rps2 in vitro. (E) His-PRMT3 forms a stable complex with intrinsic rps2 in vitro. (F, G, and H) His-PRMT3 forms an active enzyme complex with intrinsic rps2.

A



B

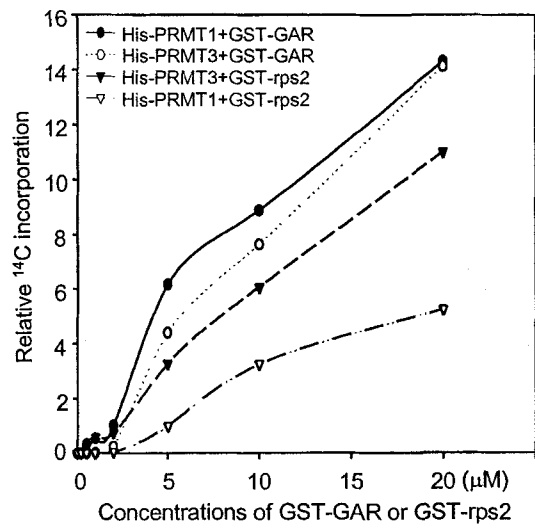


그림 28. His-PRMT1 and His-PRMT3 methylates GST-rps2 and GST-GAR.

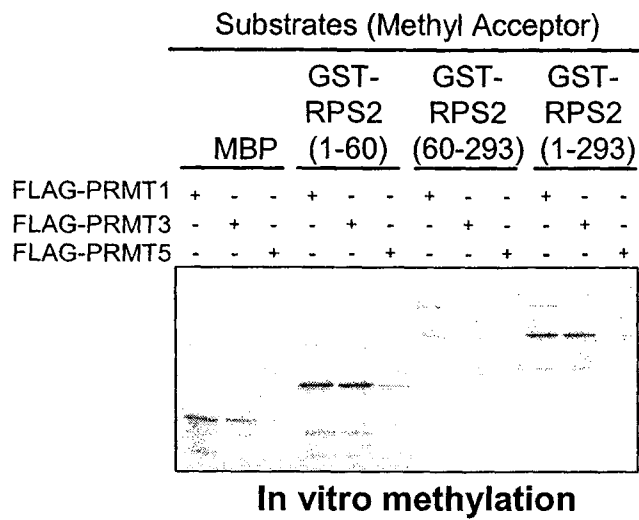


그림 29. The N-terminus of rps2(1-60) is the region methylated by PRMT1 and PRMT3

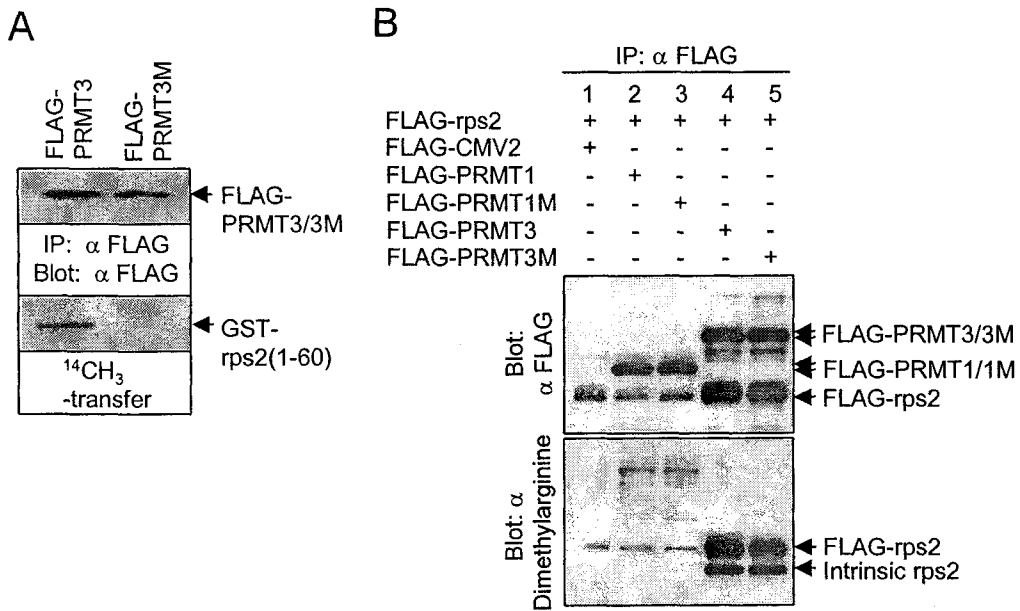


그림 30. (A) PRMT3M is catalytically inactive. (B) The overexpression of PRMT3M does not affect arginine methylation of rps2. The results suggest that rps2 is methylated by a type I arginine methyltransferase in vivo, but not PRMT3 specifically.

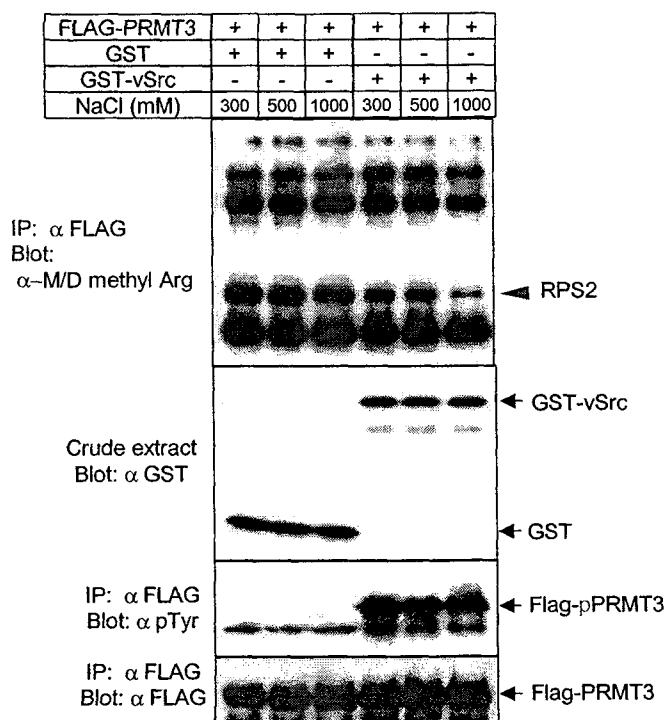


그림 31. The tyrosine-phosphorylation of PRMT3 affects the complex formation of PRMT3 with intrinsic rps2.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1차년도 연구목표 달성도 및 기여도

연구목표	달성도 및 기여도
PRMT변환을 유도하는 upstream 세포인자 1종 이상 발굴 및 PRMT 변환 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 단백질의 arginine methylation을 일으키는 PRMT의 활성조절인자를 발굴하기 위하여 viral Src tyrosine kinase(vSrc)를 PRMT1 혹은 PRMT5와 함께 발현시켰을 때 PRMT1, PRMT5 각각이 인산화되는 것을 발견하였고 (그림 4), - 이 현상은 cellular Src kinase(cSrc)를 사용하였을 때에도 관찰되었으며 cSrc의 dominant negative mutant cSrc (K295M)를 사용하였을 때 인산화되지 않았고 (그림 5A), - tyrosine phosphatase 저해제 pervanadate를 사용하였을 때 PRMT인산화를 검증할 수 있었고 (그림 6). - Src kinase 저해제, PP2를 사용하였을 때 PRMT인산화가 일어나지 않았으며 (그림 7) - 정제된 cSrc kinase를 이용한 in vitro 인산화 실험에서 PRMT의 인산화를 확인하였다 (그림 5B). <p>결론적으로 PRMT upstream 활성조절인자로서 Src kinase을 발굴하였고, PRMT인산화는 Src kinase 특이적으로 일어난다는 것을 발견하였다.</p>
발굴된 PRMT변환 유도 세포인자와 PRMT결합능 검증	<ul style="list-style-type: none"> - PRMT1과 PRMT5를 GST-vSrc kinase 와 함께 각각 293T 세포 내에 발현시킨 후, vSrc kinase를 GST pull-down하였을 때 PRMT들이 검출되었으며 PRMT들을 면역침전시켰을 때 GST-vSrc이 검출되었고 (그림 8), - Flag-vSrc kinase를 GFP, GFP-PRMT1 또는 GFP-PRMT5와 함께 각각 293T 세포에 발현시켰을 때 PRMT들과 GST-vSrc가 colocalization되어 있음을 확인하였으며 (그림 9), - Flag-PRMT1를 GST 또는 GST-vSrc를 293T 세포에 발현시켜 얻은 세포 추출물을 sedimentation하고 분획한 후 Flag-PRMT1과 GST-vSrc의 존재를 분석한 결과 PRMT1과 Src이 cosediment되는 것을 확인하였다 (그림 10). <p>이상의 결과들로 PRMT를 인산화시키는 Src kinase는 세포 내에서 서로 결합하고 있음을 검증하였다.</p>
세포의 mitogenic agents (2종 이상)에 따른 PRMT변환 유도인자와 PRMT변환과의 상관성 검증	<p>세포내 protein arginine methylation을 조절하는 ligand를 알아보기 위하여 일차적으로 Src kinase를 활성화시키는 세포성장인자로 알려진 PDGF 또는 EGF로 PRMT 발현세포주를 처리하고 PRMT를 면역침전시킨 후 PRMT인산화를 anti-phosphotyrosine 항체로 분석하였으나 PRMT인산화를 발견할 수 없었다. 이 결과는 PRMT의 활성화는 PDGF, EGF에 의한 신호전달에 관여하지 않을 수 있다는 가능성을 암시한다.</p>

2차년도 연구목표 달성도 및 기여도

연구목표	달성도 및 기여도
<p>PRMT변환 인자에 의한 PRMT효소활성 규명 (PRMT의 변환과 PRMT homo-oligomer 형성 및 효소활성과의 상관성 규명)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PRMT1 및 PRMT5가 Fyn tyrosine kinase에 의해 인산화되는 것을 밝혔고 (그림 14), PRMT3 및 PRMT4가 Src kinase 혹은 tyrosine phosphatase 저해제인 pervanadate에 의해 인산화된다는 사실을 밝혀 (그림 15), PRMT 계열의 단백질들이 일반적으로 tyrosine kinase의 기질임을 확인 - PRMT5의 인산화되는 부위를 결정하기 위하여 PRMT5의 단백질영역을 두 개의 영역으로 나누어 인산화여부를 조사한 결과 전 영역에 존재하는 PRMT5의 tyrosine residue들이 인산화될 수 있다는 것을 검증 (그림 12) - 세포신호전달에 관여하는 tyrosine kinase (c-Abl, Fyn), adaptor (Grb2, Nck) 및 PLC-γ의 SH2영역을 갖는 단백질들이 시험관내에서 인산화된 PRMT5에만 선택적으로 결합한다는 사실을 밝혔고 (그림 13), c-Abl tyrosine kinase의 SH2영역 단백질이 시험관내에서 PRMT3, PRMT4들과도 결합하는 것을 검증하여 (그림 16), 인산화된 PRMT들이 세포신호전달에 관여할 수 있는 가능성을 제시할 수 있었고, - PRMT5특이적인 기질인 SmD3나 MBP에 대한 인산화된 PRMT5의 효소활성이 인산화되지 않은 PRMT5에 비해 감소하였고, PRMT1의 기질인 GST-GAR가 인산화된 PRMT1에 의해 methylation되는 정도가 인산화되지 않은 PRMT1에 비해 낮은 것을 검증하여 (그림 17), Src tyrosine kinase에 의한 PRMT인산화가 PRMT활성을 조절할 수 있다는 가능성을 제시하였고 - PRMT1 및 PRMT5의 homo-oligomer형성은 PRMT의 인산화와 무관하며, PRMT1 및 PRMT5의 과발현에 의한 것임을 밝혀 제시한 당해연도 연구목표를 달성.
<p>PRMT에 결합하는 세포인자 1종이상 발굴 (변환된 PRMT에 대한 특이적 기질 발굴 및 발굴한 PRMT 기질의 특이성 규명)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 인산화되고 인산화되지 않은 PRMT1에 특이적으로 결합하는 세포인자를 면역침전/silver staining 방법을 통하여 인산화되지 않은 PRMT5 혹은 PRMT1에 결합하나 인산화되면 결합하지 못하는 단백질을 발견하고 (그림 18), 질량 분석방법으로 동정한 결과 PRMT5에 결합하는 세포인자가 methylation될 수 있는 RGG domain을 갖고 있는 mRNA splicing에 관여하는 Splicing factor SRp30C일 수 있음을 알았고, PRMT1에 결합하는 인자는 Zinc finger protein 37A일 수 있음을 확인 (table 1, 그림 19) - PRMT3에 특이적으로 결합하는 세포인자로서 40S ribosome의 구성성분이고 arginine methylation되는 RG repeat를 갖는 rps2임을 발견하였고 (그림 20A) - PRMT3와 rps2가 서로 특이적으로 세포내에서 결합하는 것을 알았고 (그림 20B, C) - PRMT3가 rps2의 in vivo half life에 중요한 determinant임을 제시 (그림 22) 하였으므로 <p>PRMT에 결합하는 세포인자 1종 이상을 발굴하고 결합의 특이성 및 그 특성을 규명한 결과 rps2가 RG repeat를 함유하는 단백질 영역을 갖고 있으므로 PRMT의 기질일 수 있다는 것을 알았고, 예기치 않은 결과로서 rps2 protein stability를 결정하는 인자가 PRMT3일 수 있는 실험적 증거들을 제시하였다.</p>

3차년도 연구목표 달성도 및 기여도

연구목표	달성도 및 기여도
<p>발굴된 PRMT upstream 조절인자와 PRMT의 세포의 항상성 유지에서의 기능 규명</p>	<p>1, 2차년도 연구를 통하여 PRMT들이 Src tyrosine kinase family들의 기질임을 밝히고 PRMT1과 PRMT5가 인산화되면 이들의 효소활성에 영향을 준다는 사실을 확인하고, Src과 PRMT들과의 결합 및 Src에 의한 PRMT들의 인산화와 세포의 생존과의 상관성을 알아보기 위하여 Flag-PRMT5가 항상 발현되는 2종의 헬라세포주와 NIH3T3 (HeLa-PRMT5 및 NIH3T3-PRMT5)를 제작하여 세포주의 특성을 조사한 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - Flag-PRMT5의 exogenous expression은 세포의 증식에 특이적인 영향을 주지 않는다는 결과를 얻었고, - NIH3T3-PRMT5세포주에서 Flag-PRMT5가 실제로 발현되어 cSrc와 결합되어 있는지를 조사한 결과 Flag-PRMT5가 발현되고 cSrc과 결합되어 있다는 것을 면역침전법으로 확인하였고 (그림 11A) - NIH3T3-PRMT5 세포주를 hydrogen peroxide로 처리한 다음 Flag-PRMT5에 결합한 cSrc를 조사한 결과 hydrogen peroxide로 처리하였을 때 그렇지 않은 경우보다 Flag-PRMT5과 cSrc간의 결합이 증가되어 있는 결과를 얻었음 (그림 11B). Hydrogen peroxide로 처리하였을 때 cSrc과 Flag-PRMT5간의 결합력의 증가가 Src과 PRMT5의 인산화에 따른 것인지를 조사하였으나 인산화되는 것을 검증하지 못하였음. 그 이유는 알 수 없지만 적어도 Src과 PRMT5가 서로 결합하여 특정 기능을 수행할 수 있다는 가능성을 제시함 - 세포내에서 발현되는 PRMT3 및 PRMT5의 단백질 수준을 감소시킬 수 있는 PRMT3, PRMT5의 siRNA를 제작하여 세포증식에서의 PRMT들의 기능을 조사하고 있음
<p>발굴된 PRMT 기질의 세포의 항상성 유지에서의 기능 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> - PRMT5에 결합하는 세포인자가 methylation될 수 있는 RGG domain을 갖고 있으며, mRNA splicing에 관여하는 splicing factor SRp30C일 수 있음을 발견하고 (Table 1, 그림 18, 19), SRp30C에 PRMT5가 결합하는지를 in vivo 에서 조사하였으나 서로 결합하지 않았고, PRMT5에 의해 methylation되지를 조사하였으나 methylation되는 것을 발견할 수 없었음. - PRMT1에 결합하는 인자는 Zinc finger protein 37A일 수 있음을 발견하고 (Table 1, 그림 18, 19), PRMT1에 결합할 수 있는 Zinc finger protein 37A의 아미노산 서열 분석결과 RG repeat를 갖고 있지 않았으므로 PRMT1과 이 단백질과의 상호결합 및 특성 규명에 관한 연구는 더 이상 수행되지 않았고, - PRMT3에 특이적으로 결합하고, RG repeat를 갖고 있는 rps2가 PRMT3 특이적인 기질인지를 조사하고 (rps2는 PRMT3 특이적인 기질이 아닐 수 있음을 발견), PRMT3-rps2 복합체의 특성을 알아보기 위한 연구가 집중적으로 수행되었음

3차년도 연구목표 달성도 및 기여도

연구목표	달성도 및 기여도
<p>발굴된 PRMT 기질의 세포의 항상성 유지에서의 기능 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 6종류의 rps2의 deletion mutant들을 제작하고, PRMT3와 결합하는 영역을 결정한 결과 rps2(100-293) 영역이 중요하였으며, PRMT3와 rps2와의 결합이 rps2 protein stability를 결정함을 알았으며, rps2 arginine methylation과 rps2 protein stability와는 상관성이 없었으며 (그림 23) - rps2와 결합하는 PRMT3 단백질 영역을 알아보기 위하여 5종의 PRMT3 deletion mutant들을 제작하여 (그림 24A), 실제로 PRMT3 N말단이 효소활성을 갖고 있지 않다는 것을 in vitro methylation assay를 통하여 확인하였고, N말단 104개의 아미노산이 제거된 PRMT3(104-529) 변이체는 효소활성을 나타내었으며 (그림 24B), 각각의 Flag-PRMT3 deletion mutant들을 GST-rps2(100-293)와 함께 293T 세포에 발현시킨 후에 rps2와 결합하는 PRMT3의 최소 단백질 영역을 조사한 결과 rps2와 결합하는 PRMT3 영역은 1-134개의 N말단임을 알았으며 (그림 24C) - 효소활성이 없는 PRMT3 N말단 영역 (1-134 혹은 1-264)이 발현될 때 GST-rps2 단백질 양이 현저하게 증가함을 알았으며 (그림 24C) - 134개의 아미노산 N말단을 함유하는 Flag-PRMT3 변이체들 및 PRMT3 효소활성이 없는 PRMT3 mutant (PRMT3M) 발현시켰을 때 이들이 intrinsic rps2와 결합하고 rps2 protein stability를 증가시켜 PRMT3 효소활성과 rps2 protein stability는 상관되지 않음을 알았으며 (그림 24D) - rps2가 실제로 ubiquitin-mediated proteolysis에 의해 분해된다는 것을 처음으로 밝혔으며 (그림 24A) - PRMT3가 rps2의 polyubiquitination을 저해한다는 것을 밝혔으며 (그림 25B) - PRMT3와 rps2는 in vivo 및 in vitro에서 안정한 복합체를 형성하며 heterodimer의 monomer 혹은 dimer로서 존재할 수 있는 가능성을 제시하였으며 (그림 26, 27) - His-PRMT3는 intrinsic rps2와 복합체를 형성하며 복합체는 2 배정도 증가된 효소활성을 나타내는 것을 알았으며 (그림 27) - His-PRMT1 및 His-PRMT3는 in vitro에서 GST-rps2를 methylation 시키고 (그림 28) - His-PRMT1 및 His-PRMT3에 의해 methylation되는 rps2의 영역은 RG repeat를 갖고 있는 rps2의 N말단(1-60)임을 밝혔으며 (그림 29) - 효소활성이 없는 PRMT3 mutant는 세포내에서 rps2의 methylation을 저해하지 못하는 것으로 보아 rps2는 세포내에서 PRMT3만에 의해 특이적으로 methylation되지 않는다는 것을 제시하였으며 (그림 30) - Src tyrosine kinase에 의한 PRMT3의 인산화는 PRMT3-rps2와의 복합체 형성을 저해할 수 있다는 결과를 얻었으며 (그림 31) - PRMT-rps2 복합체의 세포증식에서의 기능을 일차적으로 알아보기 위하여 PRMT3가 과발현되는 세포주의 제작을 시도하고 있으나 현재까지 PRMT3가 과발현되는 세포주를 얻지 못하고 있음. 이는 PRMT3가 세포 증식과 관련성이 있다는 것을 제시하며 PRMT3의 mRNA는 세포주기 의존적으로 조절받는 반면에 rps2 mRNA는 항상 발현되고 있다는 예비 연구 결과를 얻고 있음.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

5.1. PRMT활성을 조절하는 세포인자 Src tyrosine kinase

단백질의 arginine기의 methylation을 유도하는 단백질들인 PRMT들이 Src tyrosine kinase에 의해 인산화된다는 발견은 국내외적으로 보고된 바 없는 새로운 발견이다. Src tyrosine kinase는 발암성 레트로바이러스인 Rous sarcoma virus (RSV)가 세포의 형질전환 (cellular transformation)을 유도하는 기전을 조사하는 과정 중에 밝혀진 단백질이다. RSV가 갖고 있는 vSrc단백질은 세포의 암화를 일으키고, 인체의 모든 조직에 발현되는 cSrc단백질의 변이체인 것으로 밝혀졌다. Fyn, Lck, Yes 등을 포함하는 10 종 이상의 Src tyrosine kinase family가 포유동물 세포에서 발견되었고, 이 tyrosine kinase들은 세포 증식, cytoskeletal alteration, 세포 분화, 세포 생존, cell adhesion, 세포 이동 등과 같은 다양한 세포의 핵심과정에 관여한다. PRMT들이 Src과 결합하고 인산화되며 (PRMT들은 Fyn에 의해서도 인산화됨), 인산화된 PRMT들의 효소활성이 감소된다는 사실은 Src에 의한 세포 조절기능에 PRMT들이 관여할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 또한 인산화되지 않은 PRMT5 혹은 PRMT1에 결합하는 세포인자가 인산화된 PRMT5 혹은 PRMT1에는 결합하지 않으며, 인산화되지 않은 PRMT3에 특이적으로 결합하는 rps2가 인산화되면 그 결합력이 감소된다는 사실은 PRMT들 의한 세포 조절기능은 Src tyrosine kinase에 의해 조절 받을 수 있다는 것을 암시하고 있다. 특히 PRMT들이 SH2 도메인을 갖고 있는 adaptor단백질들과 in vitro에서 특이적으로 결합하였으므로, 이는 PRMT들이 tyrosine kinase cascade에 의한 신호전달과정에 관여할 수 있는 가능성을 강하게 제시하고 있다. 다만 이러한 현상들은 Src 혹은 PRMT들이 과발현된 상황에서 관찰되었기 때문에 향후 생리학적으로 적합한 조건에서 이러한 현상들을 조사할 수 있는 추가 연구를 통하여 Src과 PRMT간의 상호 결합의 의미를 세포증식을 포함하는 세포의 생존 과정(cellular processes)에서 규명되어야 할 것으로 보인다.

5.2. PRMT와 특이적으로 결합하는 세포인자 발굴 및 특성 규명

PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성요소인 rps2와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 발견하였다. 본 연구는 다음과 같은 측면에서 추가 연구가 필요하다. 첫째, PRMT3와 안정한 복합체를 형성하는 rps2가 단백질 번역에 핵심 세포내 소기관인 40S ribosome 구성 요소라는 고려할 때 PRMT3가 단백질 번역(translation)을 담당하는 ribosome biogenesis에 직간접적으로 관여할 수 있는 가능성을 제시하고, 이에 대한 추가 연구는 세포의 생존과정에서 특히 ribosome biogenesis/translation에서의 PRMT3의 기능을 알 수 있게 할 것이다. 둘째, rps2가 PRMT3와 안정한 복합체를 형성하고 PRMT3 효소활성을 조절할 수 있다는 연구결과는 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit으로 기능할 수 있다는 가능성을 제시하고 이에 대한 추가 연구는 PRMT3-rps2 복합체의 형성이 PRMT3의 기질 특이성 및 효소활성을 조절하는 데에 rps2가 관여한다는 것을 입증할 수 있게 하고 이는 rps2가 ribosome 구성요소뿐만 아니라 rps2의 새로운 기능 (extraribosomal function)을 규명하는데 기여할 것이다. 셋째, rps2는 사람 및 동물의 암세포에서 그 발현이

증가되어 있으며, 생쥐의 간이 재생되는 (liver regeneration) 동안에도 그 발현이 증가되는 것으로 보고되었고, rps2가 질환세포의 발생의 biomarker일 수 있다고 주장되고 있다. PRMT3가 PRMT3의 효소활성과 무관하게 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해하여 rps2 protein stability를 조절하는 세포인자라는 본 연구팀의 발견은 rps2의 발현이 증가되는 조건에서 PRMT3의 발현이 어떻게 조절되는지를 조사하는 추가 연구가 중요하며, 이 경우 PRMT3가 rps2와 더불어 그 발현이 증가되는지 혹은 rps2가 발현되는 조건에서 PRMT3의 발현이 감소되는지를 단백질 수준에서 조사하는 것이 중요할 것으로 보인다. 특히 생쥐의 간절제 수술 후 (hepatectomy) 간이 재생되는 동안에 PRMT3 및 rps2에 대한 mRNA 및 단백질 수준에서 이들의 발현량을 조사하는 것은 일차적으로 PRMT3가 간 재생에 positive factor인지 혹은 negative factor인지를 알 수 있게 할 것이다. 더불어서 PRMT3의 발현조절기전을 조사하는 연구가 필요하다. 이러한 추가 연구를 통하여 PRMT3-rps2 복합체 형성과 세포 생존과정 및 질환 세포 발생과의 상관성을 보다 구체적으로 입증할 수 있을 것이다. 이는 질병진단인자 및 신약개발의 분자표적이 될 수 있으며, 세포증식제어기술의 개발에 핵심이 되는 소재가 될 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국외 protein arginine methylation의 연구사례를 종합적으로 분석평가하면 다음과 같은 결론에 도달한다. 첫째 protein arginine methylation은 전사조절, 세포신호전달, 단백질-단백질 결합, 단백질-핵산 결합, 단백질의 세포내외 제자리 찾기 (protein trafficking)등에 관여하며, 다양하고 중요한 생물학적 의미를 나타낼 것으로 예측되고 있다. 둘째 protein arginine methylation은 세포의 항상성 유지에 필수적이고, 질환세포의 발생과 연관되어 있을 가능성이 크다. 셋째 이 분야에 대한 국외 연구자들의 관심의 증가로 인하여 세포내 protein kinase cascade 못지않은 protein arginine methylation의 새로운 기능과 질환세포 발생과의 상관성이 규명될 것으로 보인다. 이러한 측면에서 protein arginine methylation에 관한 연구는 국내외적으로 초기단계에 있는 것처럼 보인다. 본 연구를 통하여 밝혀진 두가지 핵심적인 새로운 발견 (PRMT-*Src* interaction 및 PRMT3-*rps2* interaction)들은 국내외적으로 보고된 바 없는 새로운 연구결과물들로서 생명과학분야에서 국제적인 경쟁력을 제고시키는데 기여할 수 있을 것으로 보인다.

제 7 장 참고문헌

1. Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 65-131, 1998.
2. McBride AE, Silver PA. State of the Arg⁺ protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106, 5-8, 2001.
3. Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, Richard S. A Proteomic Analysis of Arginine-methylated Protein Complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2, 1319-1330, 2003.
4. Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α / β -induced transcription. *Cell* 104, 731-741, 2001.
5. Pollack BP, Kotenko SV, He W, Izotova LS, Barnoski BL, Pestka S. The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 274, 31531-31542, 1999.
6. Belyanskaya LL, Gehrig PM, Gehring H. Exposure on cell surface and extensive arginine methylation of ewing sarcoma (EWS) protein. *J Biol Chem.* 276, 18681-18687, 2001.
7. Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293, 853-857, 2001.
8. Qi C, Chang J, Zhu Y, Yeldandi AV, Rao SM, Zhu YJ. Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 277, 28624-28630, 2002.
9. Tang J, Gary JD, Clarke S, Herschman HR. PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 273, 16935-16945, 1998
10. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177, 1999.
11. Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294, 2507-2511, 2001
12. Rho, J. Choi S, Seong YR, Cho WK, Kim SH, Im DS. PRMT5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J. Biol. Chem.* 276, 11393-11401, 2001
13. Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Molecular Cell* 7, 1111-1117, 2001.
- 14 Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van Duyne G, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol* 21, 8289-8300, 2001.

15. Hebert MD, Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Developmental Cell* 3, 329-337, 2002.
16. Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, Cleroux P, Bachand F, Autexier C, Richard S. Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol.* 159, 957-969, 2002.
17. Fabbrizio E, El Messaoudi S, Polanowska J, Paul C, Cook JR, Lee JH, Negre V, Rousset M, Pestka S, Le Cam A, Sardet C. Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO reports* 3, 641-645, 2002.
18. Kwak YT, Guo J, Prajapati S, Park KJ, Surabhi RM, Miller B, Gehrig P, Gaynor RB. Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell* 11, 1055-1066, 2003.
19. Frankel A, Yadav N, Lee J, Branscombe TL, Clarke S, Bedford MT. The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem.* 277, 3537-3543, 2002.
20. Rainer H. Boger, Karsten Sydow, Jurgen Borlak, Thomas Thum, Henrike Lenzen, Bibiana Schubert, Dimitrios Tsikas, and Stefanie M. Bode-Boger LDL Cholesterol Upregulates Synthesis of Asymmetrical Dimethylarginine in Human Endothelial Cells : Involvement of S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. *Circulation Research* 87, 99-105, 2000.
21. Rho J, Choi S, Seong YR, Choi J, Im D-S. The arginine-1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* 75, 8031-8044, 2001.
22. Chiao PJ, Shin DM, Sacks PG, Hong WK, Tainsky MA. Elevated expression of the ribosomal protein S2 gene in human tumors. *Mol. Carcinog.* 5, 219-231, 1991.
23. Shin DM, Chiao PJ, Sacks PG, Shin HJ, Hong WK, Hittelman WN, Tainsky MA. Activation of ribosomal protein S2 gene expression in a hamster model of chemically induced oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 163-166, 1993.
24. Liliensiek B, Rocha M, Umansky V, Benner A, Lin J, Ziegler R, Nawroth PP, Schirmacher V. Identification of four genes in endothelial cells whose expression is affected by tumor cells and host immune status--a study in ex vivo-isolated endothelial cells. *Blood* 92, 3394-3404, 1998.
25. Loging WT, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes, L37, RPP-1 and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8, 1011-1016, 1999.
26. Kowalczyk P, Woszczyński M, Ostrowski J. Increased expression of ribosomal protein S2 in liver tumors, posthepactomized livers, and proliferating hepatocytes in vitro. *Acta Biochim. Pol.* 49, 615-624, 2002.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국책연구개발사업		
	세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)		
과제명	세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능분석			
연구기관	한국생명공학연구원	연구책임자	임 동 수	
총연구기간	2001년 8월 1일 ~ 2004년 5월 31일 (34개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	240,000	0	240,000	
기술분야	생명공학기술			
참여기업	없음			
공동연구기관	없음			
위탁연구기관	없음			
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전 ()	3. 후속연구추진 ()	4. 타사업에 활용 ()
	5. 선행 및 기초연구 ()	6. 기타목적활용 (교육, 연구) ()	7. 활용중단(미활용)(√)	8. 기타 ()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2004년 7월 31일

연구책임자 : 임 동 수 (인)
연구기관장 : 양 규 환 (직인)

과학기술부장관 귀하

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

단백질의 알지닌 (arginine)기가 메틸화되는 protein arginine methylation은 전사조절, 신호전달, 단백질 제자리 찾기 등과 같은 세포의 항상성 유지에 필수적이고, 질환세포의 발생과 연관되어 있다. 본 연구는 첫째, 단백질의 알지닌 메틸화를 유도하는 protein arginine methyltransferase (PRMT)의 활성을 조절하는 세포인자를 1 종 이상 발굴하고, 둘째 PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명함으로써 protein arginine methylation이 세포의 항상성 유지에 어떠한 역할을 하는지를 규명하고자 하였다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록 : 해당사항 없음

나. 프로그램 등록목록 : 해당사항 없음

다. 노하우 내역 : 해당사항 없음

라. 발생품 및 시작품 내역 : 해당사항 없음

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
J Biol Chem	PRMT3, protein arginine methyltransferase 3, inhibits ubiquitin-mediated proteolysis and forms an active enzyme complex with ribosomal protein s2	2004년 pending		미국생화학 및 분자생물학회	미국	게재
계: 1 건수						

○ 학술회의 발표 실적 : 해당사항 없음

3. 연구성과

본 연구는 (i) PRMT 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, (ii) PRMT에 특이적으로 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명함으로써 protein arginine methylation과 세포의 생존과정 (cellular processes)을 이해하기 위하여 수행되었다. 본 연구에서 PRMT들이 oncogene인 Src tyrosine kinase에 의해 인산화되고 PRMT1과 PRMT5가 Src가 서로 결합하며, 세포내에서 colocalization 되어 있으며, PRMT의 인산화는 arginine methyltransferase 활성을 저하시키고, PRMT의 인산화는 PRMT와 결합하는 단백질들의 결합능에 영향을 준다는 사실을 밝히므로서 PRMT들의 활성을 조절할 수 있는 세포인자는 Src tyrosine kinase 라는 것을 처음으로 제시할 수 있었다. 또한 PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의 구성요소인 ribosomal proteins S2 (rps2)와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 최초로 발견하였다. 특히 중요한 발견은 rps2가 ubiquitination-proteasome 경로를 통하여 분해되는 데 PRMT3는 rps2와 서로 결합하여 rps2의 ubiquitination-mediated proteolysis를 저해한다는 것이다. PRMT3에 의한 rps2의 proteolysis의 저해는 PRMT3의 methyltransferase 효소 활성과는 무관하였으며 서로간의 물리적 결합에 의해서 일어났다. 이 결과는 첫째 PRMT3가 자체의 효소활성과 무관하게 세포내 단백질들의 수명 (half-life)을 조절하는 기능을 갖고 있으며, 둘째, rps2가 PRMT3의 효소활성을 조절하는 noncatalytic subunit으로서 기능할 수 있음을 제시하고 있으며, 셋째 rps2가 40S ribosome의 필수적인 구성요소라는 것을 고려하면 PRMT3-rps2 복합체는 ribosome 생성 혹은 단백질의 번역 (translation)에 관여할 수도 있음을 의미하고 있다. 본 연구팀의 이러한 발견은 세포의 생존 및 질환 세포의 발생의 핵심과정을 이해할 수 있는 의미 있는 발견으로 연결될 수 있을 것으로 보인다.

PRMT3가 PRMT3 효소활성과 무관하게 rps2와 결합하여 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해한다는 발견은 PRMT들이 arginine methyltransferase 효소활성과 무관하게 세포내 단백질들의 half-life를 조절할 수 있는 새로운 기능을 갖고 있을 수 있다는 것을 암시한다. 또한 일반적으로 ribosomal protein들이 ribosome의 구성요소로서만 기능하는 것으로 생각되었으나 본 연구 결과는 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit으로 작동할 수 있는 가능성을 제시하고 있으므로 rps2가 extraribosomal function을 가질 수 있음을 보여준다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구의 수행으로 얻어진 연구결과물들을 기술이전이 가능한 실용적인 연구성과물로 현실화 하기 위하여는 지속적인 연구가 필요하나 (본 연구는 2001년 8월 1일부터 시작되었음), 연구 지원이 중단되므로서 당해연도 연구 활용 계획은 없다.

나. 활용방법

PRMT들과 결합하는 단백질들을 발굴, 분석한 결과 단백질 번역에 필수적인 40S ribosome의

구성요소인 rps2와 PRMT3가 안정한 복합체를 형성하는 것을 발견하였다. 본 연구는 다음과 같은 측면에서 추가 연구가 필요하며 이를 통하여 본 연구결과의 실용성여부를 알 수 있게 될 것이다. 첫째, PRMT3와 안정한 복합체를 형성하는 rps2가 단백질 번역에 핵심 세포내 소기관인 40S ribosome 구성 요소라는 고려할 때 PRMT3가 단백질 번역(translation)을 담당하는 ribosome biogenesis에 직간접적으로 관여할 수 있는 가능성을 제시하고, 이에 대한 추가 연구는 세포의 생존과정에서 특히 ribosome biogenesis/translation에서의 PRMT3의 기능을 알 수 있게 할 것이다. 또한 ribosome biogenesis는 종양세포와 같은 빠르게 증식하는 세포에서 활성화되어 있으므로 추가연구를 통하여 이를 제어하는 기술의 개발로 연결시킬 수 있다. 둘째, rps2가 PRMT3와 안정한 복합체를 형성하고 PRMT3 효소활성을 조절할 수 있다는 연구결과는 rps2가 PRMT3의 noncatalytic subunit으로 기능할 수 있다는 가능성을 제시하고 이에 대한 추가 연구는 PRMT3-rps2 복합체의 형성이 PRMT3의 기질 특이성 및 효소활성을 조절하는데 rps2가 관여한다는 것을 입증할 수 있게 하고 이는 rps2의 새로운 기능(extraribosomal function)을 밝히는데 기여할 수 있을 것으로 보인다. 셋째, rps2는 사람 및 동물의 암세포에서 그 발현이 증가되어 있으며, 생쥐의 간이 재생되는 (liver regeneration) 동안에도 그 발현이 증가되는 것으로 보고되었고, rps2가 질환세포의 발생의 biomarker일 수 있다고 주장되고 있다. PRMT3가 PRMT3의 효소활성과 무관하게 rps2의 ubiquitin-mediated proteolysis를 저해하여 rps2 protein stability를 조절하는 세포인자라는 본 연구팀의 발견은 rps2의 발현이 증가되는 조건에서 PRMT3의 발현이 어떻게 조절되는지를 조사하는 추가 연구가 중요하며, 이 경우 PRMT3가 rps2와 더불어 그 발현이 증가되는지 혹은 rps2가 발현되는 조건에서 PRMT3의 발현이 감소되는지를 단백질 수준에서 조사하는 것이 중요할 것으로 보인다. 특히 생쥐의 간절제 수술 후 (hepatectomy) 간이 재생되는 동안에 PRMT3 및 rps2에 대한 mRNA 및 단백질 수준에서 이들의 발현량을 조사하는 것은 일차적으로 PRMT3가 간 재생에 positive factor인지 혹은 negative factor인지를 알 수 있게 할 것이다. 이러한 추가 연구는 PRMT3-rps2 복합체 형성과 세포 생존과정 및 질환 세포 발생과의 상관성을 보다 구체적으로 입증할 수 있을 것이다. 이는 질병진단인자 및 신약개발의 분자표적이 될 수 있으며, 세포증식제어기술의 개발에 핵심이 되는 소재가 될 수 있다.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 단계에서 얻어진 연구 결과물들은 일차적으로 세포생존과정에서 PRMT들의 활성을 조절하는 인자를 발굴하고, PRMT들과 결합하는 인자를 발굴하여 그 특성을 규명하는 주로 생화학적 측면에서 연구가 진행되었고, 차년도에 본 연구의 지원이 이루어진다면 PRMT의 기능을 배양세포 및 생쥐 모델에서 조사하는 연구를 수행하여 질환세포 발생과 PRMT의 기능을 보다 구체적으로 밝히므로써 질병진단용 biomarker 혹은 질병 치료용 분자 표적으로서의 유용성을 입증하는 연구를 수행한다. 이를 통하여 실용성이 입증될 경우 기술이전 혹은 산업화를 추진한다.

5. 기대효과

가. 기술적 측면

- PRMT와 특이적으로 결합하는 단백질을 발굴하고 특성을 규명하므로써 세포생존 (cellular processes) 및 재생과정 등의 일련의 생명현상의 원리를 발견하고 지식을 축적하므로써 학문적 진보에 기여 (BT산업 인력 양성 효과)
- 세포내 protein arginine methylation 반응에 필수적인 PRMT의 세포내 기능 연구를 통한 세포 생존 및 질환세포발생의 원리 규명에 기여

나. 경제·산업적 측면

- PRMT가 특정 단백질의 half-life를 조절하는 현상의 생물학적 의미를 규명하므로써 PRMT의 세포내 기능과 질환세포 발생 혹은 세포 재생과의 상관성 규명을 통한 관련 소재의 특허화
- PRMT의 새로운 기능 연구를 통한 질환세포발생의 원리를 규명하여 이를 질병진단의 표지인자 혹은 약물탐색체계에 활용 혹은 세포증식제어기술에 활용
- 생명산업관련 고급인력 양성 및 신규인력 고용창출에 기여

6. 문제점 및 건의사항 (연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

없음

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0106-00-0074			
과제명	세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능분석			
사업명	국책연구개발사업			
세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	정부출연연구소	
참여기관(기업)	없음			
총연구기간	2001. 08. 01 - 2004. 05. 31			
총연구비	정부(240,000)천원 민간(0)천원 합계(240,000)천원			
연구책임자 1	성명	임동수	주민번호	
	근무기관 부서	한국생명공학연구원 세포생물학연구실	E-mail	imdongsu@kribb.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	042 860 4172
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	임동수	소속/부서	
	직위/직급	책임연구원	E-mail	imdongsu@kribb.re.kr
	전화번호	042 860 4172	FAX	042 860 4597
	주소	(305-333) 대전시 유성구 어은동 52		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

단백질의 알지닌기의 메칠화를 유도하는 기술
(단백질 알지닌 메칠화 효소 및 메칠화 기질 생산 분리 정제 및 효소활성 측정)

<기술적 특징>

- (1) 효소활성 검증 기술
- (2)
- (3)

[용도 · 이용분야]

- (1) 기초 연구 및 연구 소재 (항체 제작 등) 개발에 활용
- (2)
- (3)

■ 기술의 분류

[기술코드] (412) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(V로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업 기계설비 소재 정밀화학·공정 생명과학
 원자력 자원 에너지 항공·우주 해양
 교통 보건·의료 환경 기초·원천 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(V로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발 신공정개발 기존제품개선 기존공정개선
 기 타 (기초 연구에 활용)

[기술의 용도] (복수 선택(로 표시)가능합니다)

- 기계설비 부품소자 원료재료 소프트웨어
 가공처리기술 자동화기술 불량률 감소 등 현장애로기술
 제품설계기술 공정설계기술 기 타 (기초 연구에 활용)

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한): 없음

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	단백질 알지닌 메틸화 효소의 새로운 세포 기능 분석
개발단계	<input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	단백질 알지닌 메틸화 효소의 새로운 기능 분석을 통한 질병 관련성 조사

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호	M1-0106-00-0074			
과제명	세포의 항상성 유지를 위한 protein arginine methylation의 기능 분석			
사업명	국책연구개발사업			
세부사업명	분자및세포기능디스커버리사업(분자의과학사업 이관)			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	정부출연연구소	
참여기관(기업)	없음			
총연구기간	2001.08.01-2004.05.31.			
총연구비	합계 : (240)백만원 - 정부 : (240)백만원 민간 : (0)백만원			
연구책임자	소속	한국생명공학연구원	성명	임 동 수
	전화번호	042 860 4172	E-mail	imdongsu@kribb.re.kr
연구개발 주요내용				
<p>단백질의 알지닌기의 메틸화를 유도하는 기술 (단백질 알지닌 메틸화 효소 및 기질 생산 분리, 정제, 효소활성 측정)</p>				