

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫：蛋白質精胺酸甲基轉移酶 PRMT1v3 與 v4 的活性和生 *
* 名稱：理功能 *
* ***** *

執行計畫學生： 葉書鋒
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-033-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 李娟

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年03月31日

目錄

摘要	p.2
序論	p.3
研究動機和研究問題	p.6
研究方法與步驟	p.8
結果	p.9
討論	p.16
參考文獻	p.17

摘要

PRMT1 是第一個被發現的蛋白質精胺酸甲基轉移酶，在真核生物中被廣泛的發現，人體裡大約有 85% 的酵素活性由 PRMT1 所催化，在演化上具有高度保留性且是目前最主要的精胺酸甲基轉移酶之一。先前實驗室在斑馬魚系統中發現如果抑制 PRMT1 表現，會造成原腸胚時期胚胎表現出缺陷；在 *prmt1* 基因剔除 (knock-out) 老鼠的實驗中，早期的胚胎在第 6.5 天就會死亡。PRMT1v3 是在人體中最常見的 PRMT1 的型式，而 PRMT1v4 N 端序列與其相同，但因 exon 6 及 exon 7 缺失，造成形成雙聚體的部分缺失。PRMT1v4 其活性和生理功能都尚未了解，藉由本計劃，將先前所構築好的 PRMT1v3 和 PRMT1v4 的表現載體，接上包括了 GFP、FLAG 及 GST 標籤，在細胞內及體外（試管中）進行重組蛋白細胞內位置的觀察、兩者之間活性的交互影響及鑑定 PRMT1v3 和 PRMT1v4 可能結合的蛋白。實驗結果發現，PRMT1v3 和 PRMT1v4 蛋白接分佈在細胞質和細胞核，而 PRMT1v3 則有明顯顆粒聚集；活性部份，PRMT1v4 對於 PRMT1v3 的甲基化酵素活性並不會有明顯的影響。實驗結果也發現，PRMT1v3 無法接上 β -actin，但可以和 serbp1 結合。本計畫研究成果有助於了解 PRMT1v3 及 v4 對於人體的影響，對 PRMT1v3 及 v4 有助研究上初步的瞭解與貢獻。

序論

1. PRMT 家族

蛋白質轉譯後修飾(Post-translational modification)，使蛋白質在結構上有局部的改變進而調整其功能；其中，蛋白質甲基化是生物中重要的轉譯後修飾，此修飾可以發生在離胺酸(lysine)、精胺酸(arginine)、組胺酸(histidine)、脯胺(proline)以及羧基(carboxyl group)等。蛋白質精胺酸甲基化是藉由蛋白質精胺酸甲基轉移酶(Protein arginine N-methyltransferase ; PRMT)家族所催化[1]，其作用機制為將甲基從 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet)轉移到 terminal guanidino 的氮離子上。依照甲基化受質形成的結果，將蛋白質精胺酸甲基轉移酶分為三型(圖 A)；第一型和第二型皆會催化單甲基精胺酸(monomethylarginine ; MMA)的形成；第一型精胺酸甲基轉移酶(PRMT1、2、3、4、6、8)可催化非對稱性雙甲基精胺酸(asymmetrical dimethylarginine ; ADMA)的形成；第二型精胺酸甲基轉移酶(PRMT5、9)可催化對稱性甲基精胺酸(symmetrical dimethylarginine ; SDMA)的形成；第三型精胺酸甲基轉移酶(PRMT7)僅會催化形成單甲基精胺酸。

2. PRMT1 的特性

PRMT1 是第一個被發現的蛋白質精胺酸甲基轉移酶，在真核生物中被廣泛的發現，人體裡大約有 85% 的酵素活性由 PRMT1 所催化[2]，在演化上具有高度保留性且是目前最主要的精胺酸甲基轉移酶之一。PRMT1 是最主要的第一型酵素活性，其主要的受質包括一些 RNA 結合蛋白，像是 fibrillarlin、Sam68 (Src-associated substrate)以及 hnRNPs。這些受質包含了 arginine rich (GAR motif)、RGG motif 或是 RXR 序列[3]。

在細胞分布方面，PRMT1 可以存在並且流動於細胞質和細胞核中，對於一些穿梭於細胞質跟細胞核之間的蛋白像是 hnRNPA2、Sam68 和 hnRNPQ 等等的甲基化，會影響到它們在細胞內的分布[4-6]。在訊息傳遞方面，PRMT1 參與了 Interferon gamma (IFN- γ) signaling 後期階段 STAT1 轉錄活性的調節[7]。

在活性探討方面，由 *prmt1* 基因剔除 (knock-out) 老鼠的實驗中發現，早期的胚胎在第 6.5 天就會死亡，但其分離的胚胎幹細胞能可以存活 [8]。PRMT1 會在受質的 histone H4 arginine 3 (H4R3) 位點形成雙甲基；實驗室之前利用 standard anti-sense morpholino (AMO) 注射斑馬魚胚胎，發現原腸胚時期胚胎表現出缺陷，並且 H4R3 的甲基化現象減少 [9]，所以可以知道 *prmt1* 基因在胚胎早期扮演很重要的角色。

Prmt1 的基因包含了 12 個 exon，並且有 7 種 RNA variant (PRMT1 variant1-7)，這些 variant 轉譯生成的蛋白質 isoform 最大的差別在於 N 端的區域，造成 PRMT1 不同的活性，表現在不同組織 [10]。

3. PRMT1v3 及 v4 的差異

PRMT1 包括了 1-10 及 a、b 共 12 個 exon，exon a 和 exon b 是在人類與老鼠中會看到的選擇性剪接；透過選擇性剪接可生成 7 種 RNA variant1-7。exon 1 與 exon 2 是 PRMT1 最主要的變異區；exon 3 到 exon 10 則是高度保留區 [10]。

PRMT1 isoform 3 (PRMT1v3 ; GI:359338975) 是在人體中最常見的，而其酵素活性主要以雙聚體的型式存在 (圖 B) [11]；PRMT1v3 序列包含了 1-10 個 exon，相較於 isoform 3，PRMT1 isoform 4 (PRMT1v4 ; GI:359338973) 的 N 端序列相同，但 exon 6 及 exon 7 有缺失 (圖 C)，而這段區域與 PRMT1 是否能形成雙聚體有關。實驗室莊立勤學長在碩士論文資料中收集資料時以 NCBI 搜尋即可找到此 PRMT1 isoform 4，將其核酸序列與 EST database 進行 BLAST 分析發現其有相關 RNA 存在 neuroblastoma [12]。由於早期 PRMT1 研究並未有此 PRMT1 isoform 報導，所以想進一步了解兩者在體內對於細胞的影響。

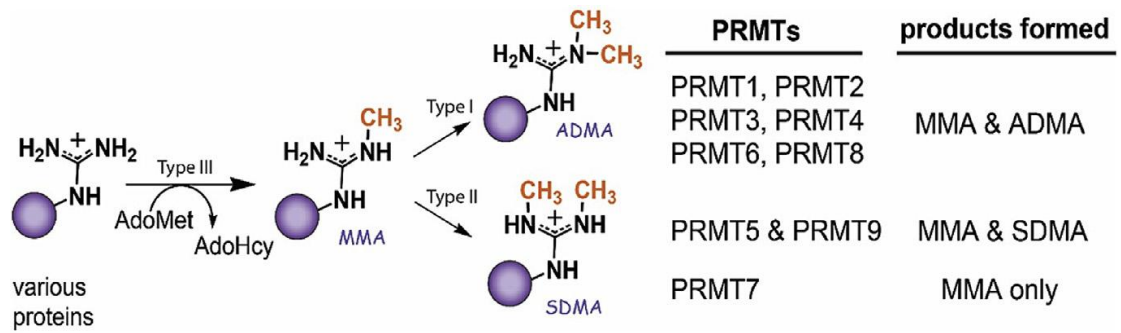


圖 A、PRMT 催化精胺酸甲基化之反應 ([Arch Biochem Biophys.](#) 2016 Jan 15;590:138-52)

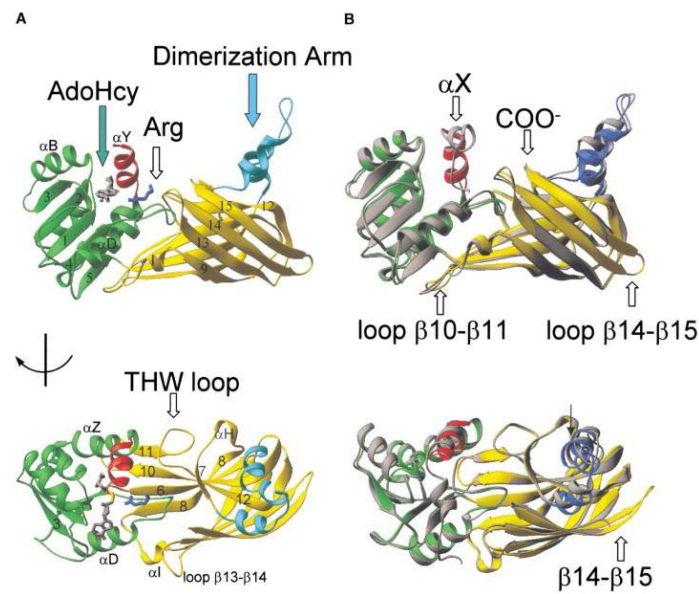


圖 B、PRMT1 結構圖 (A)為 PRMT1 單體結構視圖(頂部和底部面板)；N 端的 helix Ay 標示為紅色，AdoMet binding domain 標示為綠色，裡面底部包含著結合的 AdoHcy 與硫原子連接的模型，β 筒狀區標示為黃色，其中包含了一個二聚體的區域。(B)為 PRMT1 雙聚體結構 (引用[11]Fig.)。

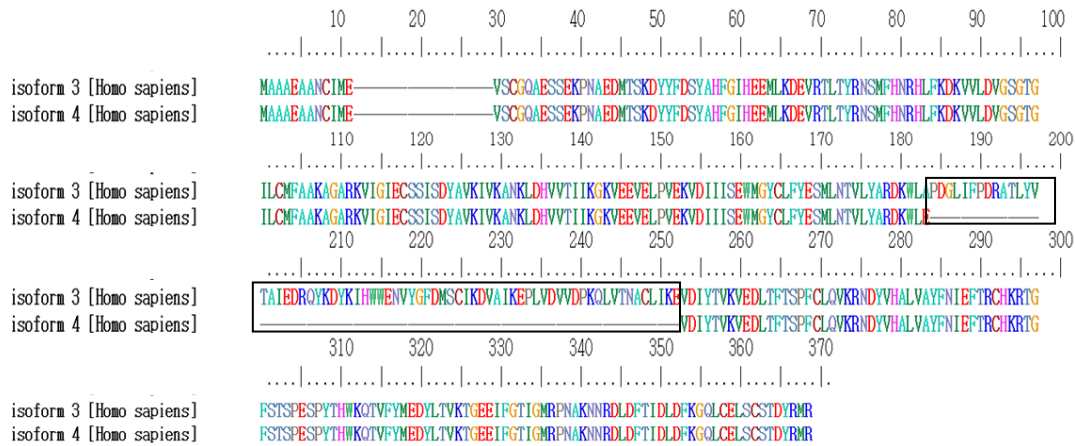


圖 C、PRMT1v3 與 v4 胺基酸序列之差異比較

研究動機和研究問題

人體裡大約有85%的酵素活性由 PRMT1所催化，而 PRMT1v3是在人體中最常見的 PRMT1的型式，其影響作用的位置幾乎橫跨大部份的組織，包括腦、心臟、腎、肝、肺、骨骼肌、脾臟等等；先前有很多PRMT1的研究，主要著墨於 PRMT1v3；實驗室莊立勤學長在 NCBI 搜尋均可找到此 PRMT1 isoform 4，碩士論文中提及。而對於 PRMT1v4的相關酵素活性及功能還不是很了解，由於兩者的 PRMT1v3和 v4序列相似，僅形成雙聚體的功能有差異，所以想對 PRMT1v4有更進一步的了解。

在細胞方面，為了觀察 PRMT1v3 和 PRMT1v4 的表現位置，實驗室李侑蓁學姐構築了 GFP-PRMT1v3 及 v4 的載體。而 PRMT1v3 和 PRMT1v4 與其它蛋白質的結合能力方面，實驗室構築了 FLAG-PRMT1v3 及 v4 載體，藉由將兩者送入細胞內，以 FLAG 免疫沉澱法捕捉細胞內的總蛋白，並進行蛋白鑑定。相關構築結果示意圖如圖 D。



圖 D、 Human PRMT1v3 及 v4 與 FLAG、GFP 構築結果示意圖

透過由螢光顯微鏡觀察 GFP-PRMT1v3 及 v4 的表現位置，實驗室李侑蓁學姐觀察到 PRMT1v3 和 PRMT1v4 在細胞內的位置皆均勻分布在細胞核和細胞質中（圖 E）。

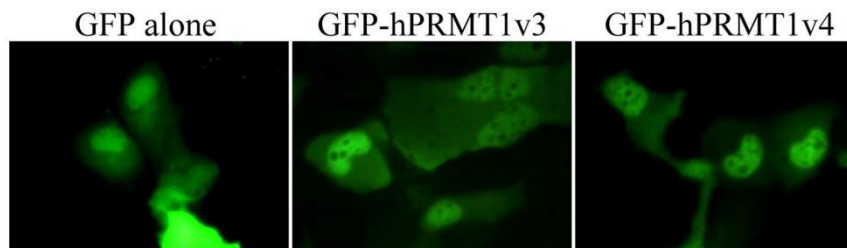


圖 E、 GFP-PRMT1v3 及 v4 的表現位置 PRMT1v3 及 v4 在細胞內的表現位置幾乎相同。

除了細胞層面，實驗室想進一步了解 PRMT1v3 和 PRMT1v4 在體外是否也具有相同的酵素活性及作用，因此我構築了 GST-PRMT1 v3 及 v4 載體，送進大腸桿菌 BL21 中進行培養，進行 IPTG 誘導，產生需要的 GST-PRMT1v3 及 v4 蛋白，經過純化和西方點墨法(Western blot)的確認，進一步證實了純化的結果。

由於 PRMT1 有酵素活性時是以雙聚體的形式存在，因此想了解當 PRMT1v4 缺少可以形成雙聚體的序列時，是否仍能形成雙聚體，是否可以產生酵素活性；或者在 PRMT1v4 存在時，是否可以和 PRMT1v3 形成雙聚體影響酵

素活性；此外 PRMT1v4 是否會與細胞內蛋白有特殊結合。我將在本計畫中對這些問題進行探討。

研究方法與步驟

1. GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白純化條件測試

將構築好的 GST-PRMT1v3 及 v4 載體，送進大腸桿菌 BL21 中進行培養，等到菌液於吸光值 OD 600 時的值介於 0.6~0.8 之間時，分別加入 1mM、0.5mM、0.1mM 不同濃度之 IPTG，再分別放進 30°C 及 37°C 培養箱於 200 rpm 下進行培養，透過不同溫度及不同濃度的 IPTG 進行誘導，測試在哪個條件下，可以獲得較多的重組蛋白產量。

2. GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白之催化甲基化能力

透過 In vitro Methylation，我們可以直接在試管內進行甲基化能力測試。將純化好的 GST-PRMT1v3、v4 及兩者混合為甲基化酵素，加入有放射線 Sam 標誌的甲基提供者，利用含 arginine-rich 的蛋白序列當受質(實驗室魏宏銘學長先前建構完成之 His-tag GAR)，接著在 37°C 中進行反應，測試兩者是否有活性，並觀察是否 v4 會有 Dominant Negative 的現象。

3. GFP-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白於細胞內表現位置

將 GFP-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白載體轉染到 HeLa 細胞，利用散發出來的綠螢光，透過顯微鏡觀察兩者在細胞內表現的位置。

4. FLAG-PRMT1v3 重組蛋白與其他蛋白結合之能力

將 FLAG- PRMT1v3 載體送入細胞內表現後，使用免疫沉澱法。當 FLAG-PRMT1v3 捕捉到目標蛋白時，利用 anti-FLAG 專一性的將 FLAG-PRMT1v3 蛋白質複合體沉澱，接著進行蛋白鑑定。

結果

GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白純化條件

將不同條件誘導出來的菌液，分別於 2 小時、4 小時、6 小時各取 1mL 於吸光值 OD600 時記錄其數值，接著 13000rpm 離心 1 分鐘收集沉澱，依吸光值加入適當二次水使每管菌液濃度相同，進行跑膠觀察結果；由於 GST-PRMT1v3 已於先前測的較佳條件，其誘導較佳條件為 37°C 、IPTG 1Mm；而 GST-PRMT1v4 的較佳條件為 30°C 、IPTG 0.5Mm；藉由本次實驗結果，往後所需之重組蛋白，皆會以此條件製備（圖一 B.C）。

依照上述所測誘導條件，我製備了大量的 GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白；將兩者沉澱物用 lysis buffer 打散，分別進行超聲波破菌，條件為 Amp60% 3 分鐘（on 10 秒/off 20 秒）兩次輪流，接著通過 GST column 進行純化，可以發現 GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白是有被成功純化出來的（圖一 D）。

GST-PRMT1v4 對於 GST-PRMT1v3 重組蛋白的甲基化能力並無顯著影響

純化出來的 GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白，我將進一步探討兩者之間酵素活性的交互影響，透過不同比例的 GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白，觀察是否隨著比例的改變，酵素活性產生一個梯度的變化。一開始我先確認重組蛋白是否有活性，實驗結果發現，GST-PRMT1v3 重組蛋白確實有甲基化的活性；而 GST-PRMT1v4 重組蛋白因為缺少形成雙聚體的部分，無法形成有活性的狀態，因此沒有甲基化的活性；而單純只有受質 GAR 的部分也可證實酵素活性並不是其他因素的影響（圖二 A）。

證實了 GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白的酵素活性，我進一步觀察兩者之間酵素活性的關係；一開始的實驗（總酵素含量 200ng）結果發現，GST-PRMT1v3 的

酵素活性太強，導致沒有明顯的梯度差別（圖二 B）。調降了總酵素含量（40ng）後，隨著 GST-PRMT1v3 比例下降，GST-PRMT1v4 比例的上升，有了明顯的梯度差，但兩者之間酵素活性並沒有顯著的交互影響（圖二 C）。

GFP-PRMT1v3 及 v4 在細胞內皆分佈於細胞質和細胞核

除了 PRMT1v3 及 v4 重組蛋白的酵素活性，接下來我要探討兩者對於細胞的影響。首先利用 GFP-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白觀察在細胞內的表現位置，實驗結果發現，GFP-PRMT1v3 及 v4 在細胞內皆分佈於細胞質和細胞核；GFP-PRMT1v3 在大部分細胞的細胞核周圍會形成較大的顆粒聚集；GFP-PRMT1v4 僅在少部分細胞的細胞核周圍有顆粒聚集，而且相對較小較鬆散(圖三)。

FLAG-PRMT1v3 重組蛋白與其他蛋白結合之觀察

為了探討細胞內可以與 PRMT1v3 結合的蛋白，我利用 FLAG-PRMT1v3 重組蛋白做免疫沉澱，先前研究顯示 serbp1 可能和 PRMT1v3 有關係，於是我選用 β -actin、serbp1 做為目標蛋白；一開始我利用西方點墨法先確認 HeLa 細胞內有這些蛋白，然而當時 β -tubulin 並沒有明顯表現出來（圖四 A）；接著透過免疫沉澱，利用 anti-FLAG 專一性的將 FLAG-PRMT1v3 重組蛋白和其他蛋白結合的複合體抓下來；西方點墨法實驗的結果可以發現，利用 anti-FLAG 和 anti-PRMT1 抗體的組別，有送進 FLAG-PRMT1v3 的細胞，FLAG-PRMT1v3 重組蛋白都有表現出來；anti- β -actin 那組，並沒有任何表現，表示 FLAG-PRMT1v3 重組蛋白並不會和 β -actin 結合；而 serbp1 的組別，不管是送進 FLAG-PRMT1v3 還是單純送進 FLAG 的細胞，都皆有表現，但是送進 FLAG-PRMT1v3 的細胞相對是明顯很多的。（圖四 B）。



(A)

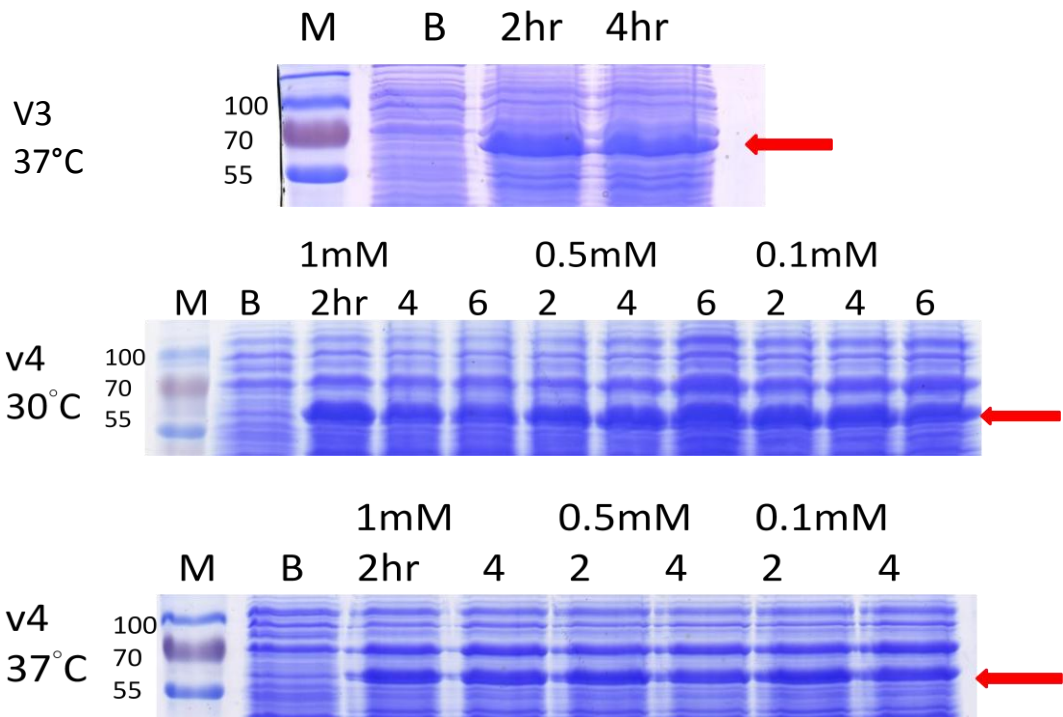
GST-hPRMT1 v3

	2hr	4hr
37°C IPTG 1mM	1.0889	1.2589

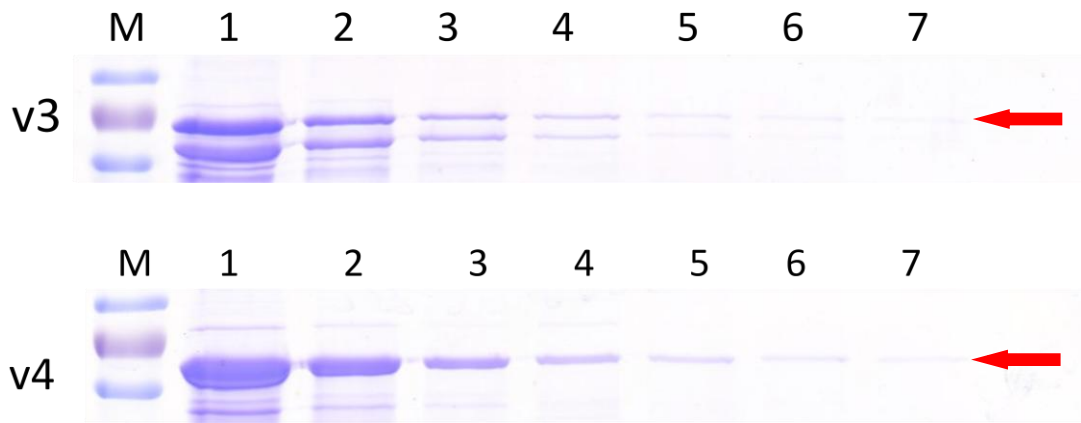
GST-hPRMT1 v4

	2hr	4hr	6hr
30°C IPTG 1mM	1.1008	1.4150	1.5636
30°C IPTG 0.5mM	1.1143	1.4312	1.5907
30°C IPTG 0.1mM	1.1268	1.4518	1.5907
37°C IPTG 1mM	1.3066	1.5150	
37°C IPTG 0.5mM	1.2724	1.5391	
37°C IPTG 0.1mM	1.3011	1.5396	

(B)



(C)



(D)

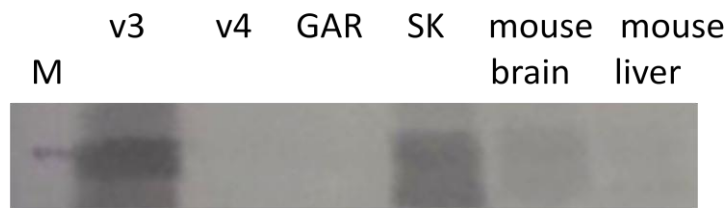
圖一、 Human PRMT1v3 及 v4 與 GST 構築和重組蛋白純化

(A) GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白示意圖。(B) GST-PRMT1v3 及 v4 之測試條件及所測 OD600 之吸光值。由於先前已測得 GST-PRMT1v3 的條件，所以本次僅以 37°C 、IPTG 1mM 進行誘導。(C) GST-PRMT1v3 及 v4 進行誘導結果跑膠確認。(D) GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白純化結果。

GST-hPRMT1v3 重組蛋白大小約為 65.83kDa；GST-hPRMT1v4 重組蛋白大小約約為 57.35kDa。

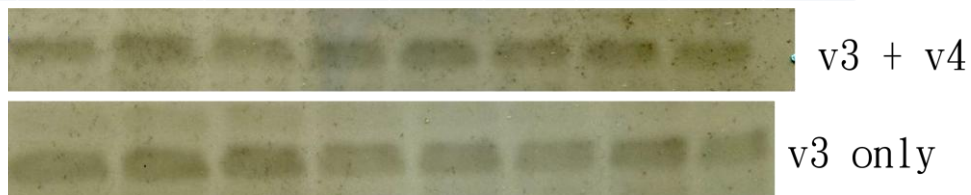
(A)

		濃度 (μg/λ)	need
受質	GAR E12	0.139	200 ng
酵素	hPRMT1 v3 E1	0.16	200 ng
	hPRMT1 v4 E1	0.18	200 ng
	SK cell	3.13	25 μg
	Mouse brain		50 μg (3.3λ)
	Mouse liver		50 μg (1.4λ)



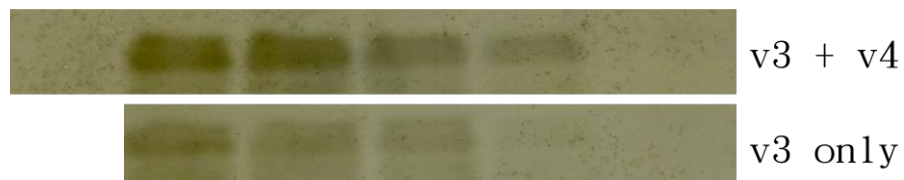
(B)

v3	200	175	155	125	100	75	50	25	0	ng/每管
v4	0	25	50	75	100	125	150	175	200	ng/每管



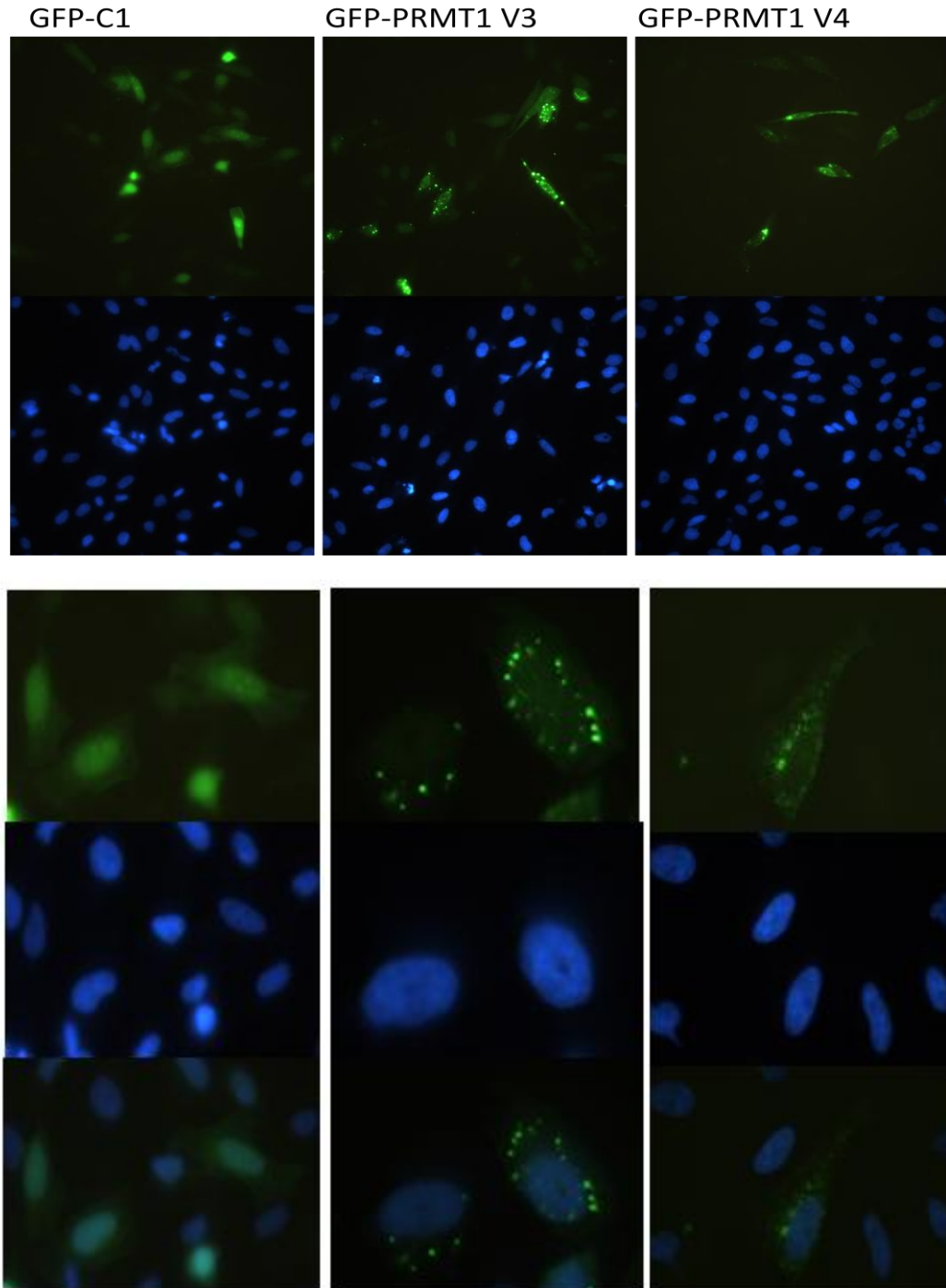
(C)

V3	GAR	40	30	20	10	0	ng/每管
V4		0	10	20	30	40	ng/每管



圖二、GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白之催化甲基化能力

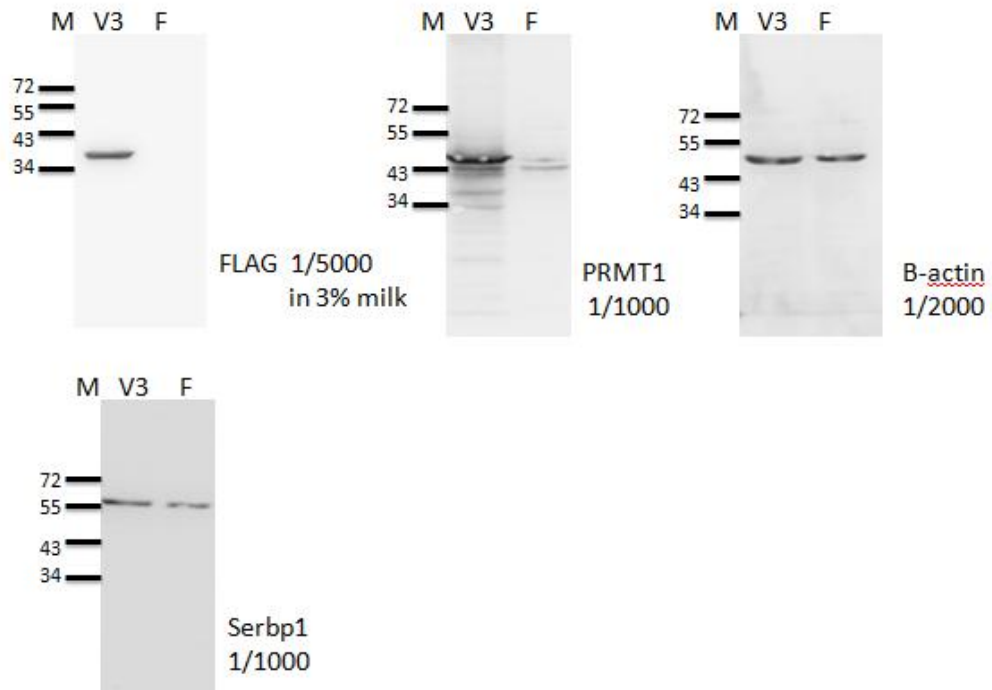
(A) GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白活性測試。SK 細胞、老鼠腦組織細胞、老鼠肝組織細胞為 positive control。(B)(C) GST-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白依不同比例的混合，其甲基化程度之比較。



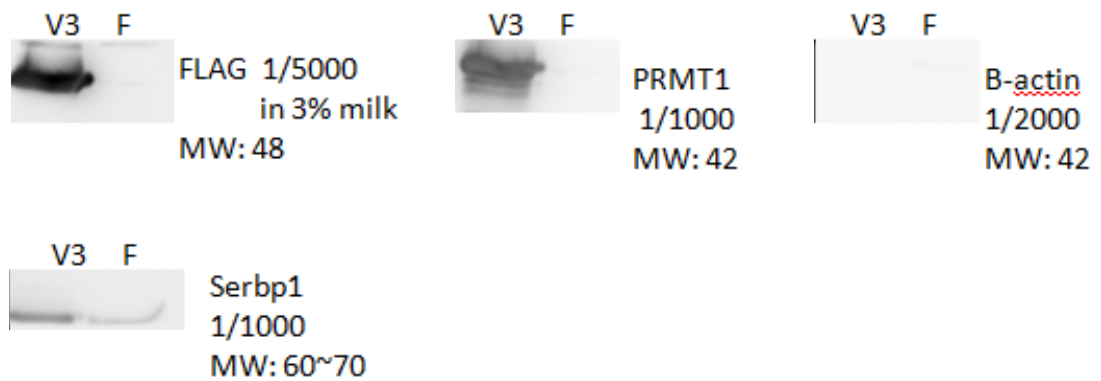
圖三、GFP-PRMT1v3 及 v4 重組蛋白細胞內位置

將 GFP-PRMT1v3、v4 及 GFP-C1 送進 HeLa 細胞，透過綠螢光表現，觀察三者細胞內的位置。GFP-C1 做為 control 組。GFP 表現為綠色；DAPI 表現為藍色。(分別利用放大倍率 400x 及油鏡觀察)

(A)



(B)



圖四、FLAG-PRMT1v3 重組蛋白與其他蛋白之結合

透過西方點墨法，觀察含有 FLAG-PRMT1v3 (v3) 和單純 FLAG (F) 的細胞與其他蛋白結合之結果。

討論

PRMT1v3 是在人體中最常見的，而其酵素活性主要以雙聚體的形式存在；PRMT1v4 的 N 端序列相同，但 exon 6 及 exon 7 有缺失，而這段區域與 PRMT1 是否能形成雙聚體有關；於對 PRMT1v3 的了解，先前已經有許多相關的實驗結果，所以在進行 PRMT1v3 的活性及功能探討時，可以清楚的做出相關實驗的比較；而 PRMT1v4 的活性及功能尚未了解，但其在人體細胞內是確實存在的。

藉由體外甲基化的實驗，可以觀察到加入 PRMT1v4 不會對 PRMT1v3 有顯著的影響，雖然形成雙聚體的部分缺失，亦不會對 PRMT1v3 進行甲基化的能力有副調控的作用，未來會將兩者與 SK 細胞和 SAS 細胞的萃取液進行進一步的酵素活性實驗。

在細胞表現的部分，PRMT1v3 和 PRMT1v4 皆會在細胞核形成顆粒狀的聚集，未來會進一步探討此顆粒性是否是因為外源性基因的送入，還是因為本身內源性基因所生成的 PRMT1v3 和 PRMT1v4 就有聚集的現象，而其顆粒性聚集的組成也會加以探討。

在免疫沉澱部分，本次僅已 PRMT1v3 先進行先一步的確認，然而實驗結果與實際狀況有明顯誤差；單純送進 FLAG 的細胞經過免疫沉澱後，實際上是沒有 PRMT1v3 的，但結果卻和送進 FLAG-PRMT1v3 一樣蛋白同時都有表現出來，我將探討是否是因為抗體的原因還是有其它因素，待結果符合預期後，將進一步觀察 PRMT1v3 和 PRMT1v4 和其它蛋白結合之能力

參考文獻

1. Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, J.H., Cook, J.R., Pestka, S., Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 2007. Jan. 113(1):50-87.
2. Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., Herschman, H.R., The Mammalian Immediate-early TIS21 Protein and the Leukemia-associated BTG1 Protein Interact with a Protein-arginine N-Methyltransferase. *J Biol Chem*, 1996 Jun 21. 271(25):15034-44.
3. Smith, J.J., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder M., Herschman, HR, Wahle, E., Unusual Sites of Arginine Methylation in Poly(A)-binding Protein II and in Vitro Methylation by Protein Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J Biol Chem*, 1999 May 7. 274(19):13229-34.
4. Passos, D.O., Quaresma, A.J., Kobarg, J., The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006 Jul 28. 346(2):517-25.
5. Côté, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T., Richard, S., Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell*, 2003 Jan. 14(1):274-87.
6. Nichols, RC, Wang, X.W., Tang, J., Hamilton, B.J., High, F.A., Herschman, H.R., Rigby, W.F., The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res*, 2000 May 1. 256(2):522-32.
7. Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R., David, M., Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*, 2001 Mar 9. 104(5):731-41.

8. Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., Ruley, H.E., Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol*, 2000 Jul. 20(13):4859-69.
9. Tsai, Y.J., Pan, H., Hung, C.M., Hou, P.T., Li, Y.C., Lee, Y.J., Shen, Y.T., Wu, T.T., Li, C., The predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 is critical for zebrafish convergence and extension during gastrulation. *FEBS J*, 2011 Apr. 278(6):905-17.
10. Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., Côté, J., Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem*, 2007 Nov 9. 282(45):33009-21.
11. Zhang, X., Cheng, X., Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure*, 2003 May 11(5):509-20.
12. Chung, L.C., (2014) 高度保留的PRMT1和PRMT8的蛋白質分布，基因結構和選擇性剪接(Protein distribution, gene structures and alternative splicing of highly conserved PRMT1 and PRMT8.) 中山醫學大學生物醫學科學系碩士論文