

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

RGG 蛋白之精氨酸甲基化研究 (I, II, III)

Investigation of the arginine methylation on RGG proteins

計畫編號：NSC 89-2316-B-040-003-, NSC 89-2320-B-040-072-, NSC
90-2320-B-040-031

執行期限：八十八年八月一日至九十一年七月三十一日

主持人：李娟 中山醫學大學生命科學系 cli@mercury.csmc.edu.tw.

計畫參與人員：黃宏明 陳大晃中山醫學大學醫學研究所（碩士生）；林怡欣（學士級專任助理）；洪健仁 沈逸婷 林怡薇 蕭文凱 等 中山醫學大學生命科學系（大學部兼任助理）

一、中文摘要

有許多參與RNA處理及核糖體生成的RNA結合蛋白含富於精氨酸及甘氨酸(GAR 或 RGG)的區段，且精氨酸上有甲基化。而此種甲基轉移酶近來發現和訊息傳遞某些蛋白相連；為什麼RGG蛋白的精氨酸要甲基化，而這種甲基化是否可微調其蛋白質功能尚不清楚。進一步研究此甲基化的甲基接受蛋白及甲基轉移酶的調節和分布，應為了解此種蛋白質修飾的關鍵。本計畫我們以對淋巴母細胞蛋白質甲基化的研究為基礎，以兩大方向探討精氨酸甲基化。(一)進一步研究甲基接受蛋白——這些甲基接受蛋白如何被甲基化？精氨酸甲基化和無甲基化的RGG蛋白有何不同？我們以一核仁RGG蛋白fibrillarlin為模式受質來研究。我們也繼續淋巴母細胞細胞內蛋白質甲基化的研究。(二)繼續探討蛋白甲基轉移酶活性的調控——我們鑑定不同細胞系統及豬腦中不同細胞成分中此蛋白甲基轉移酶。希望透過這些研究，可以對這些蛋白為什麼要甲基化及這種蛋白

修飾反應在細胞內如何調控會有更完整的了解。

關鍵詞：蛋白質甲基化，RGG蛋白，精氨酸甲基化

Abstract

Many RNA binding proteins involved in RNA processing and ribosome biogenesis contain glycine and arginine rich motifs (GAR or RGG box) with modified arginine residues as N^G -monomethylarginine or N^G, N^G -dimethylarginine. Type I protein arginine N -methyltransferase activities responsible for the methylation might be related to certain signal transduction pathways. Why the RGG proteins are specifically methylated and whether the arginine methylation of the RNA binding RGG box proteins might be tightly regulated to fine-tune the function of the proteins is unclear. Further analyses of the specific methylaccepting substrates and the regulation of the distribution and the activity of arginine methyltransferase would be crucial for the understanding of the

modification widely present in eukaryotic RGG proteins. Based on our previous investigations of protein arginine methylation in lymphoblastoid cells, we pursued the protein arginine methylation in two directions: (1) To further investigate the methylaccepting substrates—How the methylaccepting polypeptides are methylated? What are the differences between the methylated and unmodified RGG proteins? We used a nucleolar RGG protein fibrillarin as a model substrate to study arginine methylation. We also continued the analyses of the methylaccepting polypeptides in lymphoblastoid cells. (2) To further investigate the regulation of the protein arginine methyltransferase activity—We further characterize and partial purified the activity in different cellular compartments in lymphoblastoid cells and porcine brain. We also would like to know what are the other polypeptides in the high molecular weight arginine methyltransferase complex and if they are involved in the regulation of the activity of the enzyme. Through our analysis of the methylaccepting substrates and the methyltransferases, we contributed to the understandings of why these proteins are methylated and how the modification is regulated in cells.

Keywords: protein methylation, RGG proteins, arginine methylation

二、緣由與目的

蛋白質精胺酸甲基化 (arginine methylation) 是真核細胞中常見的轉譯後修飾 (posttranslational modification) 作用之一，它和訊號傳遞、RNA splicing、轉錄活化等過程均有關。此一反應係由精胺酸甲基轉移酶 (arginine methyltransferase) 所催化進行，以 S-adenosyl- L-methionine (SAM) 作為甲基提供者，將其甲基轉移至精胺酸的 guanidino group 上。在細胞中含有 RGG motifs (arginin- and glycine-rich) 的 RNA 結合蛋白會被細胞中具專一性的蛋白質精胺酸甲基轉移酶催化形成精胺酸甲基化¹。我們先前的資料顯示將淋巴母細胞養在含 AdOx (一種間接的甲基轉移酶抑制劑) 的培養基中，可獲得大量低甲基化的受質^{1,2}。我們的資料亦顯示蛋白質精胺酸甲基轉移酶及其受質皆廣泛的分布於淋巴母細胞的不同 fractions 中。最近的資料亦顯示精胺酸甲基化與蛋白間的交互作用及某些甲基接受蛋白於細胞內的分佈有關³。

由蛋白質精胺酸甲基轉移酶 (PRMT) 催化的蛋白質精胺酸甲基化是一種轉譯後修飾作用。第一型的甲基轉移酶催化甲基接受蛋白形成單甲基和不對稱型雙甲基化，而第二型的甲基轉移酶能催化其它的甲基接受蛋白形成單甲基和對稱型雙甲基化。一直到最近定出 6 種不同 PRMT 基因前，以生化法定出的各種生物來源的第一型和第二型的甲基轉移酶的分子量皆介於 275 kDa 到 500 kDa 之間^{5,6}。而這些 PRMT 單體的分子量卻只在 40 kDa 到 70 kDa 間，因此 PRMT 單體可能是甲基轉移酶複合體中的催化次單元。為了對精胺酸甲基轉移酶及甲基接受蛋白的特性有更進一步的了解，所以本實驗室以含有高 PRMT1 活性且易取得的豬腦組織進行有關甲基轉

移酶的研究。

三、結果與討論

1. Analyses of arginine methylation of recombinant mouse fibrillarin: 蛋白質精胺酸的甲基化，常見於一些 RNA 結合蛋白，且是發生於 arginine-glycine-glycine (RGG) 重複的序列中，如 fibrillarin。在之前的研究中，雖已證實 fibrillarin 確為精胺酸甲基接受蛋白，但對於其發生甲基化的機制與特性，卻仍不清楚。在我們的實驗中，利用重組的 fibrillarin，進行 *in vitro* 甲基化反應，配合蛋白內切酶與 fluorography 的結果，針對 fibrillarin 發生於其 RGG domain 中的精胺酸甲基化現象，作了進一步的探討。

2. Proteomic analyses of stable protein methylation in lymphoblastoid cells: 之前研究已知淋巴母細胞中富含精胺酸甲基接受蛋白，為了更進一步研究這些蛋白，在我們的實驗中，利用了蛋白體 (Proteomic) 分析的技術，使用了二維膠電泳 (2-dimensional gel electrophoresis) 及 MALDI-TOF-MS 的分析，對這些蛋白作了進一步的鑑定。我們配合使用甲基轉移酶抑制劑 AdOx，獲取低甲基化狀態的萃取蛋白，方便進行 *in vitro* 甲基化分析。將淋巴母細胞培養在加入或不加入 AdOx 的環境中，取得的萃取蛋白在跑完 2D gel 後，以分析軟體進行比對，但未見彼此間有顯著的差異性。而在以 +AdOx 的淋巴母細胞萃取蛋白，利用重組之酵母菌甲基轉移酶 PRMT1 進行完 *in vitro* 甲基化反應，以 2D gel 進行分析後，根據 fluorography 的結果，取有甲基化反應的蛋白 spots，使用蛋白內切

酶作 *in gel* digestion，再將產物進行 MALDI-TOF-MS 的分析。之後以線上軟體，至資料庫中鑑定這些蛋白。但其中的 Protein disulfide isomerase (PDI) 在後續的研究中，無法進一步確認有精胺酸甲基化的反應，而另外二點鑑定出的 hnRNP A2/B1，則是和過去已知的甲基化研究相符合。最後，我們並以 mass 分析的資料，對 hnRNP A2/B1 發生甲基化的位置，提供了初步的證據。

3. Characterization and purification of arginine methyltransferase from porcine brain and lymphoblastoid cells: 本研究中，我們使用生化法來純化、分析豬腦中的精胺酸甲基轉移酶。以不同的離心速度將組織蛋白萃取液分 fraction，所得之上清液和沉澱物分別命名為 S1、S2、S3 和 P1、P2、P3。而以超高速離心得到沉澱物 P3 回溶於含有 0.5 M KCl 的萃取液中再離心一次得到 S4 和 P4。大多數的 PRMT 活性 (以第一型甲基化的受質 fibrillarin 來做測試) 在 S3 (cytosolic)，而在 S4 fraction 卻有最高的比活性。將淋巴母細胞萃取液或 P3 fraction 加入 0.5 M KCl 後 PRMT 活性亦顯著的增加，而將 S4 fraction 中的 KCl 透析後則 PRMT 活性下降。因此證實 0.5 M KCl 會影響 PRMT 活性。然而，在 S3 中卻含有較 S4 大量的 PRMT1 (在哺乳動物系統中最主要的的第一型蛋白質精胺酸甲基轉移酶)，且重組的 PRMT1 活性不受 0.5 M KCl 影響。因此有可能高濃度 (0.5 M) 的 KCl 會讓 P3 中與甲基轉移酶結合的抑制者分開而使得 S4 中的甲基轉移酶有較高的比活性。經陰離子交換樹脂 (Mono Q) 分離後兩個 fractions 中的第一型甲基化活性幾乎出現在同樣的位置。因此現在我們試著

去純化這兩個 fractions 中的酵素去瞭解它們的成分。

4. Subcellular localization of arginine methylaccepting proteins: 在此實驗中我們將淋巴母細胞分為不同的 fractions 來研究含有 RGG 的蛋白 (例如: FMRP, hnRNP-A1, 和 hnRNP-A2/B1) 分布情形是否會受甲基轉移酶抑制劑 AdOx 影響。運用西方點墨法來分析這些蛋白, 我們看到 FMRP、hnRNP-A2/B1 及一些甲基接受蛋白在以 AdOx 處理和正常細胞內的分佈情形有所差異。未來我們將進一步以細胞免疫螢光染色和二維電泳來研究精胺酸甲基接受蛋白的甲基化狀態與其在細胞內分佈情形的相關性, 以提出更多關於這方面的資料。

四、計畫成果自評

本計畫對 lymphoblastoid cell 其甲基接受蛋白質之分析已建立系統, 整理其結果之論文 "Protein N-arginine methylation in subcellular fractions of lymphoblastoid cells" 已發表於 *Journal Biochemistry* 中。Fibrillarlin 之甲基化分析結果所整理之論文 "Arginine methylation of recombinant murine fibrillarlin by protein arginine methyltransferase" 已為 *Journal of Protein Chemistry* 所接受。另外 "Proteomic analyses of stable protein methylation in lymphoblastoid cells" 整理投稿 *Journal Biochemistry* 也已接受。已發表之會議壁報亦有四篇。另有蛋白質甲基轉移酵素分析等之結果整理準備投稿中有二篇。同時本計畫所發展 2-D 蛋白電泳系統及蛋白純化系統亦為後續實驗, 奠立良好基礎。

五、參考文獻

1. Li, C., Ai, L. S., Lin, C. H., Hsieh, M., Li, Y.C. and Li, S.Y. (1998). Protein N-arginine methylation in adenosine dialdehyde-treated lymphoblastoid cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 53-59.
2. Lin, C. H., Hsieh, M., Li, Y. C., Li, S. Y., Pearson, D. L., Pollard, K. M. and Li, C. (2000). Protein N-arginine methylation in subcellular fractions of lymphoblastoid cells. *J. Biochem (Tokyo)*. **128**, 493-498.
3. Lin, W. J., Gary, J. D., Yang, M. C., Clarke, S. and Herschman, H. R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **271**, 15034-15044.
4. Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *Biochem J.* 1994b Dec 15;304 (Pt 3):903-9.
5. Rawal N, Rajpurohit R, Paik WK, Kim S. Purification and characterization of S-adenosylmethionine -protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *Biochem J.* 1994 Jun 1;300 (Pt):483-9.