

## ウシ水晶体における Protein Carboxyl-o-Methyltransferase に関する研究

北村 公一

札幌医科大学整形外科学講座 (主任 石井清一 教授)

大黒 浩\*

札幌医科大学学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

### Studies on Protein Carboxyl-o-Methyltransferase in Bovine Lens

Kouichi KITAMURA

*Department of Orthopaedic Surgery, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. S. ISHII)

Hiroshi OHGURO

*Department of Biochemistry (Section I), Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. T. AKINO)

**Abstract** It has been established that the long-lived proteins of the mammalian eye lens slowly accumulate D-aspartyl(D-Asp) and L-isoaspartyl(L-Isoasp) residues as an apparent consequence of aging. Protein carboxyl-o-methyltransferase(PCMT) [EC. 2.1.1.24], which is widely distributed in mammalian tissues, has been found to selectively methylate the  $\beta$ -carboxyl group of the uncommon D-Asp and L-Isoasp residues in proteins. Considering these findings, it has been proposed that PCMT plays a role in the repair or degradation of the abnormal amino acid residues that accumulate in aged proteins.

PCMT has been detected in the bovine eye lens, however, the enzyme in the lens has not been characterized in detail. In the present study, we studied the properties and structure of the enzyme in the bovine lens.

1. Type II of PCMT(PCMT-II) was purified more than 13,000-fold from the cytosol of bovine lens. The apparent molecular weight of the PCMT-II on SDS-PAGE was approximately 27,000. The activity of type I of PCMT, which was not absorbed on DEAE-cellulose, was extremely low in the bovine lens.

2. The PCMT-II from the lens was composed of at least two molecular species, II a and II b, which were separated by a Mono-Q column. The pI was 5.8 for II a and 5.6 for II b. The two molecular species were found to have similar  $K_m$  and  $V_{max}$  values. The optimum pH of II a activity

---

\* 現所属：札幌医科大学眼科学講座 (主任：中川 喬 教授)

#### Abbreviations:

PCMT, Protein carboxyl-o-methyltransferase

D-Asp, D-aspartic acid

L-Isoasp, L-isoaspartic acid

AdoMet, S-adenosyl-L-methionine

AdoHcy, S-adenosyl-L-homocysteine

SDS-PAGE, Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

was about 6.5, II b activity showed a clearly lower pH optimum of less than 6.0.

3. The relative rates between PCMT-II a and II b activities were very similar with five proteins as methyl accepting substrates. Crystallin, the main protein constituent in the lens, gave the largest methylating rate of any protein examined here.

4. Antibody raised against PCMT-II from bovine lens crossreacted with PCMT-I and II from bovine brain, and PCMT from human erythrocyte.

5. The amino acid compositions of PCMT-II a and II b from bovine lens and PCMT-II from bovine brain were very similar. The HPLC profiles of lyslendopeptidase digests of PCMT-II a and II b from bovine lens and PCMT-II from bovine brain were also very similar, suggesting that similar sequences are present among these three enzymes.

6. The amino acid sequence in each peak of the lyslendopeptidase digests of PCMT-II a from bovine lens was almost identical with that of PCMT-I from bovine brain and PCMT-II from human and bovine erythrocytes reported by other investigators. These results suggest that PCMT-I and II of various organs from different mammalian species may have nearly identical structures. Therefore, differences in pI and pH optimum between PCMT-II a and II b from bovine lens may be due to the structural modification of the enzyme. (Received September 11, 1990 and accepted October 18, 1990)

**Key words:** Protein carboxyl methyltransferase, Aging, Isozyme, D-Amino acid, L-Isoaspartic acid

## 1 緒 言

加齢に伴って哺乳動物眼の水晶体蛋白質中にD-アスパラギン酸 (D-Asp) 残基が蓄積することが知られている<sup>1,2)</sup>。これは蛋白質のL-アスパラギン酸残基が化学的ラセミ化をうけてD型へ変化すると考えられ<sup>3)</sup>、加齢はこのラセミ化を促進すると考えられる。最近、水晶体蛋白質のように代謝回転の遅い蛋白質のみならず、代謝回転がそれ程遅くない脳<sup>5)</sup>や赤血球膜蛋白質<sup>6)</sup>にもD-Asp残基の存在が示されている。

一方、哺乳動物組織に広く分布するprotein carboxyl-o-methyltransferase [EC. 2. 1. 1. 24] (以下PCMT)は、蛋白質中のD-Asp残基<sup>5,6)</sup>およびL-isoアスパラギン酸 (L-Isoasp) 残基<sup>7-9)</sup>のβ-カルボキシル基をメチル化基質とすることが明らかとなった。ラセミ化により生体蛋白質分子中に生じたD-Asp残基あるいはアスパラギンの脱アミドにより生じたL-Isoasp残基<sup>10)</sup>は、PCMTの作用によりそのカルボキシル基がメチル化を受けた後、L-アスパラギン酸へ修復される<sup>5,11)</sup>ことが示唆されており、加齢に伴ったPCMT活性の増加が報告されている<sup>12)</sup>。これらの結果として、本酵素の主たる機能は老化などで生じた変性蛋白質の修復であると提唱されている<sup>10)</sup>。

PCMTはS-adenosyl-L-methionine (AdoMet)をメチル供与体とし、さまざまな蛋白質基質のカルボキ

シル基をメチル化する酵素である<sup>10)</sup>。このメチル化反応はsubstoichiometricで、蛋白質へ転移したメチル基は速やかに加水分解されてメタノールを生成する<sup>10,13)</sup>。本酵素は各組織に広く分布するが、脳における酵素活性が最も高いと報告されている<sup>14)</sup>。現在までに、いくつかの動物種の種々の臓器からPCMTは精製されている<sup>10)</sup>。脳<sup>15,16)</sup>及び赤血球<sup>17,18)</sup>細胞質に存在する本酵素には、DEAE-celluloseカラムに吸着しないタイプ (I型)と吸着するタイプ (II型)の二つのisozymeが存在することが示され、それぞれが精製されて、その性質が比較検討された。I型(PCMT-I)のpIは約6.0-6.5、II型(PCMT-II)のpIは約5.0-5.6で等電点は約1.0違うが、両者の電気泳動上の分子量はともに26,500で、構造上の相同性は極めて高いことが最近報告された<sup>16)</sup>。I型とII型PCMTの相対比は、組織によってかなり異なることが知られている<sup>15)</sup>。

D-Asp残基の蓄積が注目された水晶体におけるPCMTの精製は、McFadden *et al.*<sup>19)</sup>により報告され、agingにより水晶体中に蓄積した変性蛋白質の修復に本酵素が寄与していることが示唆された。しかし、水晶体PCMTのI型とII型の相対比及びその性質と構造など詳細は不明であった。本研究は生体におけるPCMTの機能を探る手がかりとして、水晶体におけるPCMTの性状を明らかにすることを目的とした。その結果、ウシ水晶体PCMTはII型が大部分であり、II型はさらに

二つの分子種 (IIa 及び IIb) に分離されることを見出し、両分子種の性質と構造を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 実験材料

ウシ眼球は帯広畜産公社より購入、ウシ脳は江別畜産公社より入手した。S-adenosyl-L-[methyl(<sup>3</sup>H)]methionine ([methyl-<sup>3</sup>H] AdoMet) は Amersham 社、S-adenosyl-L-methionine (AdoMet), S-adenosyl-homocysteine (AdoHcy), aminoethyl-Sephadex は Sigma 社製、lysylendopeptidase (Achromobacter litics protease 1) は和光純薬工業社製を使用した。

### 2.2 ウシ水晶体から II 型 PCMT の精製

水晶体 PCMT の分離精製は McFadden *et al.*<sup>19)</sup> の方法を一部変更して行った。特に断わらない限り、全ての操作は 4℃ にて行った。新鮮なウシ眼球を赤道面で切断し、水晶体を被膜ごと摘出した。ついで被膜と水晶体を分離、水晶体皮質を中心部の核より分離し使用した。水晶体皮質 15g を 4 倍量の緩衝液 A (20 mM Tris·HCl, 0.25 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM Na<sub>3</sub>, pH 8.6) に懸濁し、ポッター型ホモゲナイザーでホモゲナイズした後、100,000×g で 30 分間遠心 (日立 RP-45 ローター) し、その上清 (細胞質画分) を回収、粗酵素抽出液とした。粗抽出液を緩衝液 A で 2 倍に希釈し、あらかじめ緩衝液 A で平衡化した DEAE-cellulose (Whatman 社製) カラム (7×30 cm) に添加した。緩衝液 A でカラムを洗浄後、0.4 M NaCl を含む緩衝液 A による NaCl 濃度勾配によりカラムに吸着した蛋白質 (II 型 PCMT を含む) を溶出 (流速, 50 ml/h) し、伝導度 0.5-1.1 mmho の画分を回収した (計 50 ml)。この DEAE-cellulose 溶出画分をあらかじめ緩衝液 B (20 mM Tris·HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.9) で平衡化した Sephadex G-100 (Pharmacia 社製) カラム (5×100 cm) に添加し同緩衝液で溶出 (流速, 20 ml/h), 分子量 35,000-20,000 相当の画分を回収した (計 50 ml)。この溶出液に NaCl を加えて 1.5 M NaCl 溶液とし、緩衝液 C (10 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.4) であらかじめ平衡化した Phenyl Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製) カラム (1×8 cm) に添加した。10 倍量の緩衝液 C にて洗浄後、NaCl を含まない緩衝液 C で溶出した (流速, 20 ml/h)。各溶出画分の伝導度を

測定し、5 mmho 以下の画分を回収した (計, 30 ml)。この溶出画分には高濃度の NaCl が存在するため、NaCl を除去する目的で緩衝液 D (10 mM sodium phosphate, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.2) で透析した。Kim *et al.*<sup>20)</sup> の方法に従い AdoHcy をリガンドとしたアフィニティカラム (1×5 cm) を作製、あらかじめ緩衝液 D でこのカラムを平衡化した後、上記の透析した試料を添加した。カラム容積の 10 倍量の緩衝液 D でカラムを洗浄後、50 mM Tris·HCl (pH 9.0) で PCMT を溶出し (流速, 10 ml/h), ウシ水晶体から II 型 PCMT を精製した。

### 2.3 ウシ脳の I 型及び II 型 PCMT の分離精製

ウシ脳からの I 型及び II 型 PCMT の分離精製は Aswad and Deight<sup>15)</sup> の方法に準じて行った。ウシ脳 100,000×g 上清画分を硫酸沈澱後、その沈渣を溶解、DEAE-cellulose カラムに添加し、カラムに吸着しない I 型画分と吸着する II 型画分に分離した。それぞれの画分から I 型及び II 型 PCMT を AdoHcy をリガンドとしたアフィニティカラムクロマトグラフィーで精製した。

### 2.4 ヒト赤血球 PCMT の分離

成人男子より末梢血を採取し、Kim<sup>21)</sup> の方法に従って行った。

### 2.5 Mono-Q カラムによる II 型 PCMT 分子種の分離

Mono-Q (Pharmacia 社製) カラム (5×50 mm) を、FPLC システム (Pharmacia 社製) に装着して用いた。まずカラムをあらかじめ緩衝液 E (10 mM Tris·HCl, pH 8.6) で平衡化した後、2.2 の方法で精製した水晶体 II 型 PCMT を緩衝液 E に対して透析した後、カラムに吸着させた。緩衝液 E でカラムを洗浄後、0 から 1 M の NaCl の直線濃度勾配により溶出 (流速 2 ml/min), PCMT-II 分子種を分離した。

### 2.6 PCMT 活性の測定法

PCMT はさまざまな蛋白質あるいはペプチドのメチル化を触媒するが、本研究では McFadden *et al.*<sup>19)</sup> の方法に従いメチル基受容体として ovalbumin を使用した。反応緩衝液 (0.14 M sodium citrate, pH 6.2) 60 μl 中、ovalbumin 40 mg/ml, AdoMet 10 μM (1000 dpm/pmol) とし、20 μl の酵素溶液を加えて反応を開始した。37℃, 15 分間インキュベート後、Kim<sup>21)</sup> の方法に従い氷冷 10% トリクロル酢酸を 500 μl 加えて、反応を停止した。未反応の [methyl-<sup>3</sup>H] AdoMet を除去するため 10,000 rpm で 5 分間遠心、この上清を捨て再び氷冷 10% トリクロル酢酸を加えて沈渣を懸濁させ

た後遠心した。この操作を3回繰り返して、沈渣を洗浄した。この沈渣に100  $\mu$ lの10%トリクロル酢酸を加えて再び懸濁し、次いで0.5 N NaOH (200  $\mu$ l)を加えて、pH 11の条件下で5分間放置することにより、[methyl-<sup>3</sup>H] AdoMet から基質蛋白質に転移したメチル基を加水分解した。再び、氷冷10%トリクロル酢酸(100  $\mu$ l)を加えた後遠心し、上清の水溶性画分(300  $\mu$ l)をACS-II (Amersham 社) 8 mlに加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS9000) で測定した。

## 2・7 Sodium dodesylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Leammliの方法<sup>22)</sup>に準じて、蛋白質試料(40  $\mu$ l)に10% SDSを8  $\mu$ l, 0.05% bromphenol blueを含む75% glycerolを5  $\mu$ l, 及び2-mercaptoethanol 2  $\mu$ lを加えて90°C, 5分間処理後ゲルに添加した。13%の分離ゲル(厚さ1 mm)を作製し、電気泳動は25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS 緩衝液を使用し、20 mA(定電流)で5時間行った。分子量マーカーには、低分子量マーカーキット (Pharmacia 社製)を使用した。泳動後、ゲルは0.1% Coomassie brilliant blue (C. B. B.), 5% methanol及び10%酢酸混液中で染色し、C. B. B.を含まないmethanol, 酢酸混液中で脱色した。一方、銀染色は銀染色キット (第一化学社製)を用いた。

## 2・8 二次元電気泳動

O'Farrellの方法<sup>23)</sup>を一部変更して行った。分離ゲルは最終濃度で、5% acrylamide, 0.25% bis-acrylamide, 2% ampholine (pH 3.5-10), 2% ampholine (pH 5-7), 0.004% riboflavinとなるように調製し、充分脱気後直径5 mm, 長さ12 cmのガラス管に10 cmの高さまで満たし、水を重層後蛍光下で3時間光重合した。試料はampholine 2%, glycerol 30%, 全量で120  $\mu$ lになるように調製、その上に保護液を重層した。0.01 N リン酸溶液を陽極, 0.02 N NaOHを陰極として300 Vで8時間、次いで400 Vで1時間電気泳動を行った。SDS-PAGEによる2次元目の展開は、取り出したゲルを前記のSDS-PAGE 泳動緩衝液にて充分平衡化した後行った。

## 2・9 抗ウシ水晶体II型 PCMT 抗体の作製

ウシ水晶体II型 PCMT (10  $\mu$ g)を等容量の Freund's complete adjuvant とともに乳濁化した後、6週齢の BALB/c マウスの腹腔内に投与した。投与後2週目に、II型 PCMT (10  $\mu$ g)を Freund's complete adjuvant とともに再び投与、さらに4週目にII型 PCMT (10

$\mu$ g) 溶液を腹腔内に投与し、その3日後に抗血清を得た。

## 2・10 Western blotting

Towbin *et al.*<sup>24)</sup>の方法に準じて、電気泳動後のゲルをニトロセルロース膜(東洋濾紙, pore size 0.45  $\mu$ m)にトランスブロットした。転写後のシートをスキムミルク緩衝液(1% スキムミルク, 1% Triton X-100, 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.4)にて37°C, 1時間処理した後、スキムミルク緩衝液で100倍希釈したウシ水晶体II型 PCMT 抗血清をシート上にマウントし、37°C, 2時間反応させた。次いでスキムミルク緩衝液にて洗浄後、HRP-labeled anti-mouse IgG (生化学工業社製)を2  $\mu$ g/mlの濃度で、37°C, 1.5時間反応させた後、スキムミルクを含まない緩衝液にて洗浄した。洗浄後、3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を基質として50 mM リン酸緩衝液(pH 7.4), 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中にて発色させた。

## 2・11 免疫組織学的検討

ウシ及びヒト脳のパラフィン薄切切片をABC法により免疫組織染色した。一次抗体にはウシ水晶体II型 PCMT 抗血清、二次抗体にはビオチン化抗マウス IgG (Vector 社製)を用いた。

## 2・12 High-performance liquid chromatography (HPLC) による分析

装置は655A-11 liquid chromatography pump, L-5000 LC controller, 655A variable wave length monitor (日立社製)を使用した。アミノ酸分析用試料の調製にはC<sub>8</sub>逆相カラム Nucleosil 10C8 (4.6×250 mm, ガスクロ工業社製), ペプチドマッピングにはC<sub>18</sub>逆相カラム TSK-gel ODS 120T (4.6×250 mm, 東ソ社製)を使用した。流速1 ml/minで0.1%トリフルオロ酢酸を含む5%から95%までのアセトニトリルによる直線濃度勾配によりペプチドを溶出し、215 nmにおける吸光度で溶出ペプチドの検出を行った。

## 2・13 精製 PCMT のアミノ酸分析

Mono-Q カラムで分離後、HPLCにて精製したII型 PCMT 分子種を凍結乾燥した。6 M HClに溶解後脱気し、減圧下に封管、110°Cで24時間加水分解を行った。この試料を自動アミノ酸分析装置 (model KLA-2B, Hitachi custom Ion-Exchange Resin 2618, 日立社製)を用いて分析した。

## 2・14 Lysylendopeptidase 分解による精製 PCMT のペプチドマッピング

Mono-Q カラムで分離後、HPLCで精製した水晶体II型 PCMT 及び脳II型 PCMT を5分間、沸騰水浴

中で加熱変性させた後再び冷却し, lysylendopeptidase を基質: 酵素比 200:1 になるように加え, 37°C で 4 時間インキュベートした. 反応終了後, 酵素分解で得られたペプチド断片を C<sub>18</sub> 逆相カラムを装着した HPLC にて分離した.

### 2.15 アミノ酸シーケンス分析

2.14 で得られたペプチドを凍結乾燥後 50% 酢酸に溶解し, 477 A 型気相シーケンサー (Applied Biosystem 社製) にて自動 Edman 分解を行った. 切断されたフェニルチオヒダントイン (phenylthiohydantoin: PTH) 化したアミノ酸を PTH アナライザー-120A (Applied Biosystems 社製) にて同定し, ペプチドのアミノ末端側からのアミノ酸配列を解析した<sup>25)</sup>.

### 2.16 その他の分析法

蛋白質定量はウシ血清アルブミンを標準蛋白質とし, Biuret 法<sup>26)</sup> あるいは Lowry 法<sup>27)</sup> にて行った.

## 3 成 績

### 3.1 ウシ水晶体 PCMT の精製

水晶体全湿重量の 30% 以上は crystallin を主とする蛋白質なので, PCMT の精製には混在蛋白質除去のために四段階の過程を必要とした. ウシ水晶体 PCMT の分離は 2.2 に述べた方法で行った. 100,000×g 上清の DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィで,  $\alpha$ -crystallin の塩基性画分及び  $\gamma$ -crystallin はカラムに吸着しないので, カラムに吸着した PCMT 活性の主ピーク (II 型 PCMT に相当する) とは分離された. DEAE-cellulose カラムより PCMT の主活性は 0-0.4 M NaCl 直線濃度勾配で 0.1 M 相当, 伝導度 0.5-1.1 mmho の画分に溶出された (Fig. 1). カラム素通り画分の PCMT 活性 (I 型 PCMT に相当する) は非常に低かったので, この画分から PCMT は分離せず, カラムに吸着し NaCl と共に溶出される PCMT 活性画分から, II 型 PCMT (PCMT-II) の精製を試みた.  $\beta$ -crystallin は PCMT 活性と共に溶出されたが,  $\alpha$ -crystallin の酸性蛋白質画分はこれにやや遅れて溶出した. 次に PCMT 主活性画分を回収, Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィにかけた. PCMT 活性は分子量 40,000 から 25,000 の位置に一つのピークを形成して溶出された. これにより, void 容量に溶出される  $\alpha$ -crystallin 及び分子量の比較的大きい  $\beta$ -crystallin の一部は除去し得た. ゲル濾過で回収した PCMT 活性画分に NaCl を加えて 1.5 M NaCl 溶液とした後, Phenyl Sepharose カラムクロマトグラフィを行った. PCMT 活性は 1 M NaCl 相当, 伝導度 5 mmho 以下の画分に溶出され, 大部分の  $\beta$ -

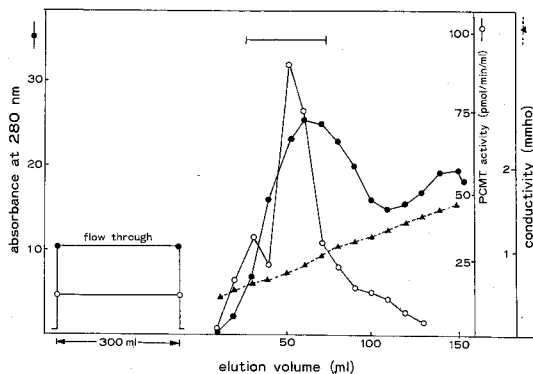


Fig. 1 Chromatographic separation of bovine lens cytosolic PCMT on DEAE-cellulose. 100,000×g supernatant from 15 g of bovine lens was applied on DEAE-cellulose column (7×30 cm). After eluting with 300 ml of buffer A (20 mM Tris-HCl, 0.25 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pH 8.6), PCMT was eluted with a gradient of 0-0.4 M NaCl in buffer A at flow rate of 50 ml/h. The PCMT activity (○ —○) of each fraction was determined by the assay method described in Materials and methods.

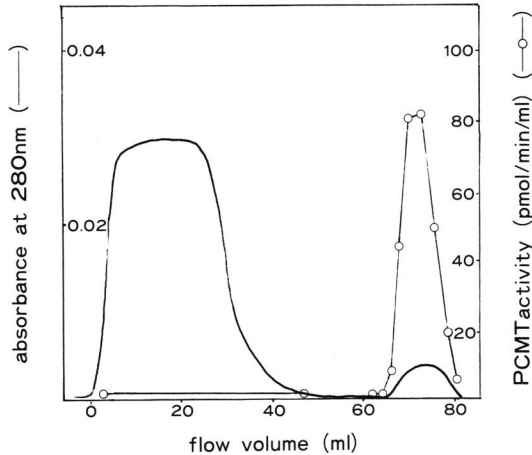
crystallin と分離し得た. Phenyl Sepharose カラムから溶出した PCMT 活性画分は高濃度 NaCl を含むので, 緩衝液 D に対して透析した後, AdoHcy をリガンドとしたアフィニティカラムに添加した. 10 倍量の緩衝液 D でカラムを洗浄後, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) で PCMT を溶出した (Fig. 2). PCMT 活性画分の蛋白質は, SDS-PAGE 上 C. B. B. 染色及び銀染色で分子量 27,000 の単一バンドを示した (Fig. 3). 以上の操作により, ウシ水晶体 100,000×g 上清から PCMT-II は 13,040 倍に精製され, 比活性は 15,000 pmol/min/mg であった (Table 1).

### 3.2 ウシ脳より I 型および II 型 PCMT の分離精製

ウシ脳 100,000×g 上清から, I 型及び II 型 PCMT は, それぞれ 166 倍, 331 倍に精製され, 比活性は I 型が 11,000 (pmol/min/mg), II 型が 22,000 (pmol/min/mg) であった (Table 2). I 型及び II 型 PCMT とともに, SDS-PAGE 上分子量 27,000 に相当する単一バンドを示した (Fig. 4). 最終的に得られた I 型と II 型 PCMT の相対比は 2.3:1 で, 他の報告<sup>15,16)</sup> と同じように脳では I 型が主 PCMT であった. 以下, この脳 PCMT-II と対比しながら, 水晶体 PCMT-II 酵素の性質を検討した.

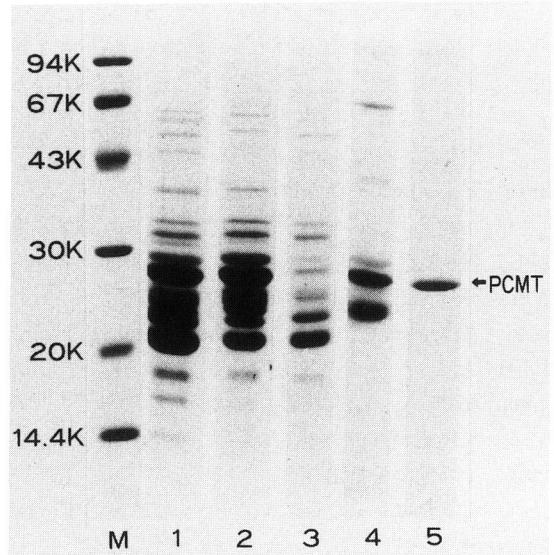
### 3.3 ウシ水晶体 II 型 PCMT の分子種とその性質

PCMT 精製過程の DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィにおいて, PCMT 活性のピークは二峰性で



**Fig. 2** Affinity chromatography of bovine lens PCMT-II by immobilized AdoHcy on Sepharose CL-4B resin. PCMT rich fractions obtained from Phenyl Sepharose column chromatography were dialyzed against buffer D (10 mM sodium phosphate, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.2) and applied on AdoHcy-Sepharose CL-4B column (1×5 cm). The column was washed with buffer D at flow rate of 20 ml/h and bound enzyme was then eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 at flow rate of 10 ml/h. The absorbance at 280 nm is shown as solid line and open circle indicates PCMT activity of each fraction.

あった。このことはII型 PCMT に表面荷電の異なる分子種の存在を示唆する。Mono-Q カラムより PCMT は NaCl 濃度が 85 mM, 100 mM, 115 mM, 130 mM の位置に四つのピークとして溶出された(低いイオン強度で溶出される順に Peak II a, Peak II b, Peak II c および Peak II d とした)(Fig. 5, A)。いずれのピークも還元状態の SDS-PAGE 上, 分子量が 27,000 の単



**Fig. 3** Purification of PCMT-II from bovine lens. Samples from a typical purification were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate and the polypeptide bands were visualized with Coomassie blue (lane 1-3) and silver (lane 4-5) stains. Lane M shows molecular weight markers. Samples included 100,000×g supernatant (lane 1), PCMT fractions from DEAE-cellulose column (lane 2), PCMT fractions from Sephadex G-100 column (lane 3), PCMT fractions from Phenyl Sepharose column (lane 4) and affinity-purified PCMT (lane 5). The position of the PCMT band ( $M_r=27,000$ ) is indicated with an arrow at the right.

一バンドを示した。しかし、非還元状態で Peak II d は分子量 48,000 を示すので、二量体を形成していると思われた。精製 PCMT の二次元電気泳動で、Peak II a (以下 II a) は等電点が 5.8, Peak II b (以下 II b) は

**Table 1** Purification of type II of PCMT from bovine eye lens cortex.

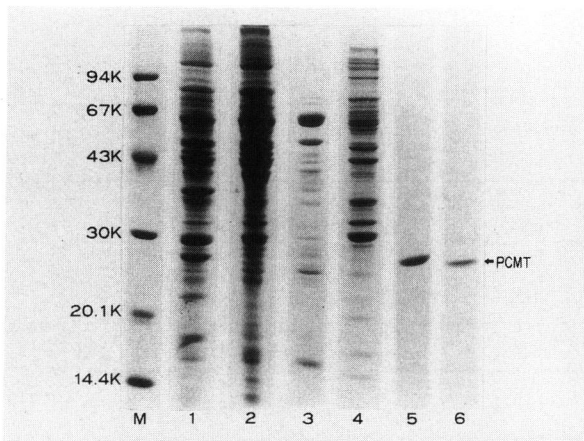
Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Specific activity (pmol/min/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
1. 100,000×g supernatant	50	4,000	1.15	1	100
2. DEAE-cellulose column chromatography	50	800	4.7	4	82
3. Gel filtration	52	104	27	24	62
4. Phenyl Sepharose column chromatography	30	0.75	1,600	1,390	28
5. AdoHcy affinity column chromatography	10	0.02	15,000	13,040	7

a: The polypeptide compositions of these fractions are shown in Figure 3.

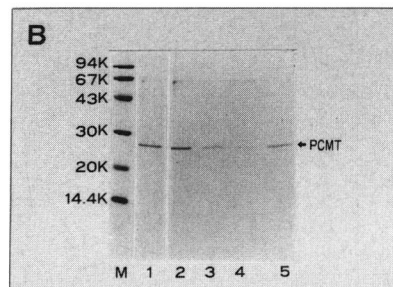
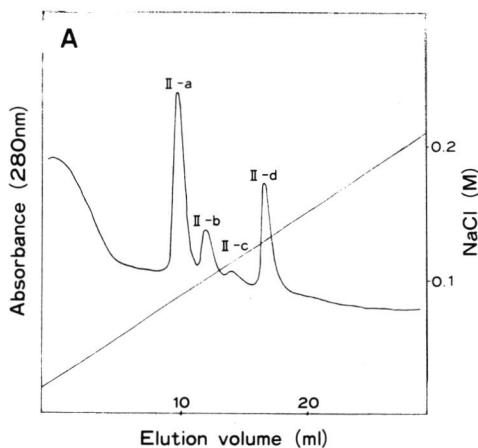
**Table 2** Purification of types I and II of PCMT from bovine brain.

Step		Volume (ml)	Protein (mg)	Specific activity (pmol/min/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
1. 100,000×g supernatant		400	1,520	53.1	1	100
2. Ammonium sulfate precipitation		50	1,073	80.2	1.5	106
3. DEAE-cellulose column chromatography	I	220	81	315.2	6.0	31
	II	100	275	95.0	1.8	33
4. AdoHcy affinity chromatography	I	37	0.61	11,000	165.7	8
	II	14	0.26	22,000	331.3	7

a: The polypeptide compositions of these fractions are shown in Figure 4.



**Fig. 4** Purification of type I and II enzymes of PCMT from bovine brain. Samples from a typical purification were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate and the polypeptide bands were visualized with Coomassie blue stain. Lane M shows molecular weight markers. Samples included 1000,000×g supernatant (lane 1), ammonium sulfate precipitate (lane 2), PCMT-I fraction from DEAE-cellulose column (lane 3), PCMT-II fraction from DEAE-cellulose column (lane 4), affinity-purified PCMT-I (lane 5) and affinity-purified PCMT-II (lane 6). The position of the PCMT band ( $M_r=27,000$ ) is indicated with an arrow at the right.



**Fig. 5** A: Mono-Q column chromatography of affinity-purified PCMT-II from bovine lens. The affinity-purified PCMT fraction was dialyzed against buffer E (10 mM Tris·HCl, pH 8.6) and applied on Mono-Q column (5×50 mm) equipped with FPLC. Proteins were eluted with a linear gradient of 0-1.0 M NaCl in buffer E at flow rate of 2 ml/h. Four peaks were obtained at apparently 85 mM, 100 mM, 115 mM and 130 mM NaCl, respectively.

B: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the four peaks separated on Mono-Q column chromatography. Polypeptide bands were visualized with silver stain. Lane M shows molecular weight markers. Samples included affinity-purified PCMT (lane 1), peak II a (lane 2), peak II b (lane 3), peak II c (lane 4) and peak II d (lane 5).

等電点が5.6のスポットを示した(Table 3). Peak II dは還元状態で, 等電点が5.8及び5.6の二つのスポットを示すので, II aとII bよりなる二量体と考えられた. 以上の結果, ウシ水晶体II型 PCMT は表面荷電の異なる少なくともII a及びII b二つの分子種に分離されることが示された.

次にII a及びII bのII型 PCMT 分子種のメチル基転移活性を, ovalbumin を基質蛋白質として比較検討した. II a, II bともに, AdoMet 濃度が $2\mu\text{M}$ ではほぼ飽和に達する曲線が得られ, この曲線のLineweaver-Burk Plot から AdoMet に対する $K_m$  値を求めると, II aでは $2.2\mu\text{M}$ , II bは $1.3\mu\text{M}$ であった(Table 3).  $V_{\text{max}}$  値 (pmol/min/mg) は, II aが20,000, II bは21,000であった. 脳のII型 PCMT の等電点,  $K_m$  値及び $V_{\text{max}}$

値は, 水晶体 PCMT II b に非常に似ていた(Table 3). ついで水晶体 PCMT 活性のpH 依存性を測定したところ, II aとII bの間にpH 依存性の顕著な違いが認められた(Fig. 6, A). すなわちII aがpH 6.5付近で最大の活性を示すのに対し, II bの活性はpH 6.0以上で低値を示した. 脳 PCMT-II はpH 6.9で最大活性を示し(Fig. 6, B), 水晶体 PCMT-II b のpH 依存性とは明らかに異なっていた.

水晶体 PCMT-II a 及びII bのメチル基転移活性における基質蛋白質の比較検討を行った. ovalbumin に対する相対比活性で比較すると, PCMT 精製時に得られた $\alpha$ ,  $\gamma$ -crystallin を多く含む画分及び $\beta$ -crystallin を含む画分は, その他の調べられた蛋白質基質よりも優れたメチル化基質であった (Table 4). しかし, 測

Table 3 Properties of PCMTs from bovine lens and its comparison to type II enzyme of PCMT from bovine brain.

Isozyme		pI value	$K_m$ for AdoMet ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (pmol/min/mg)
Lens PCMT	IIa	5.7	2.2	20,000
	IIb	5.5	1.3	21,000
Brain PCMT	II	5.4	1.3	22,000

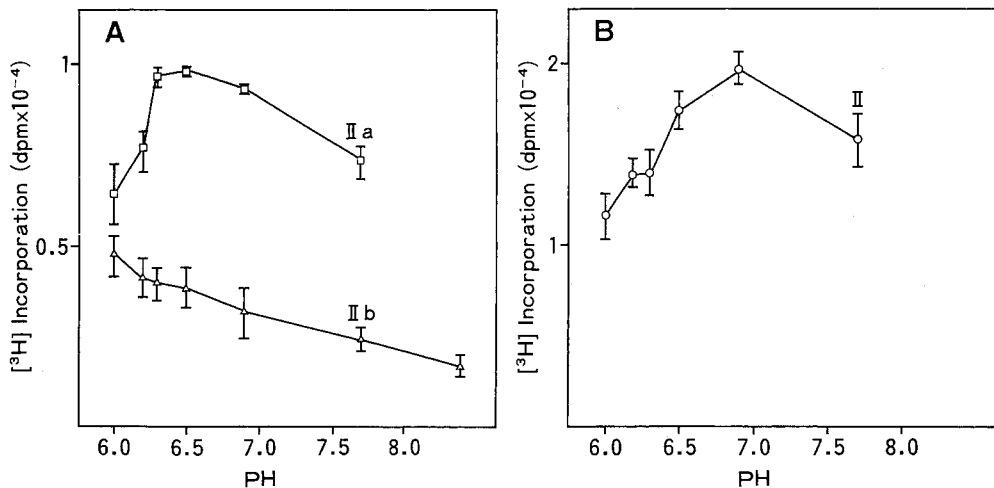


Fig. 6 pH dependence of ovalbumin methylation by PCMTs from bovine lens (A) and brain (B). Carboxymethylation assay was conducted with  $4\mu\text{M}$  [methyl- $^3\text{H}$ ] AdoMet (800,000 dpm), 33 mg/ml of ovalbumin,  $60\mu\text{l}$  of enzyme solution and  $60\mu\text{l}$  of buffer solutions whose pH values varied from 5.5 to 8.5. Each point represents mean from triplicate analyses and vertical bar represents S. D.

A: Lens PCMT. PCMT-II a ( $\square$ — $\square$ ) and PCMT-II b ( $\triangle$ — $\triangle$ ).

A: Brain PCMT. PCMT-II ( $\circ$ — $\circ$ ).



Table 4 Substrate specificities of bovine lens PCMTs

Substrate	Methylation activity (pmol/min/mg)		Activity relative to ovalbumin	
	PCMT-IIa	PCMT-IIb	PCMT-IIa	PCMT-IIb
Ovalbumin	2,850	2,780	1.00	1.00
$\alpha$ -, $\gamma$ -Crystallin fraction	11,500	10,500	4.04	3.67
$\beta$ -Crystallin fraction	18,000	16,500	6.32	5.94
Calmodulin	1,175	1,100	0.42	0.40
Fibroin	2,850	2,600	0.74	0.94
Bovine serum albumin	2,325	2,210	0.82	0.80

a: Initial rates were measured under conditions of the standard assay with 0.5 mg/ml of the indicated substrate and 2.5  $\mu$ g/ml of enzyme.

定された蛋白質の全てが PCMT のメチル化基質となり得ること、及び II a と II b の間で、メチル化基質に対する活性の顕著な違いはないことが判明した。

### 3.4 抗ウシ水晶体 PCMT-II 抗体による免疫交叉性の検討

ウシ水晶体 PCMT-II に対するマウス抗血清による western blotting の結果、抗ウシ水晶体 PCMT-II 抗

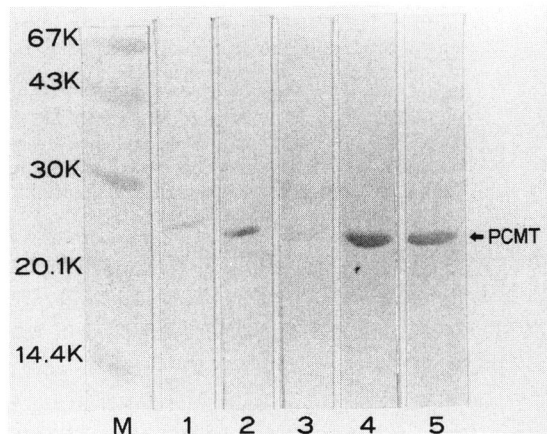


Fig. 7 Immunoblot analysis of PCMTs from human erythrocytes and bovine brain and lens by the antiserum raised against bovine lens PCMT-II. PCMTs isolated from human erythrocyte and bovine brain and lens were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins in the gel were electrophoretically transferred to a nitrocellulose sheet. Lane M shows molecular weight markers. Samples included human erythrocyte PCMT (lane 1), bovine lens PCMT-II a (lane 2), bovine lens PCMT-II b (lane 3), bovine brain PCMT-I (lane 4) and bovine brain PCMT-II (lane 5). Lane M was stained with amide black. Lanes 1-5 were immunostained with the antiserum against bovine lens PCMT-II. Any PCMTs were not stained with control mouse serum (data not shown).

体はウシ脳 I, II, ヒト赤血球 PCMT を明らかに認識した (Fig. 7). またウシ水晶体 PCMT-II 抗血清による免疫組織学的検討でこの抗体は、ウシ及びヒト脳神経細胞の細胞質及び軸索を免疫染色することが認められた (data は示さない). この PCMT の神経細胞における局在は、ラット脳 PCMT 抗体を用いて得られた Billigsley and Balaban<sup>29)</sup> の結果と一致する. Western blotting の結果と合わせて考えると、抗ウシ水晶体 PCMT-II 抗体は臓器及び動物種が異なる PCMT に対して、広い免疫交叉性があり、PCMT 間の構造上の相同性が示唆された。

### 3.5 ウシ水晶体 PCMT-II の構造解析

3.4 の結果より各 PCMT 間には構造上かなりの相同性があると考えられたが、水晶体 PCMT-II a 及び II b と脳 PCMT-II の間には kinetics 及び荷電に若干の差を認めたことから、それぞれの PCMT 間の構造上の違いを検討した。まず Mono-Q により分離精製されたウシ水晶体 PCMT-II a, 及び II b を、C<sub>8</sub> 逆相カラムを装着した HPLC でさらに精製し、それぞれのアミノ酸組成を分析した (Table 5)。その結果、水晶体 II a, II b のアミノ酸組成はきわめてよく一致しており、また脳 PCMT-II のアミノ酸組成との間にも顕著な差は認めなかった。各 PCMT のアミノ末端アミノ酸残基はブロックされており、検出不能であった。次いで、lysylendopeptidase 分解による peptide mapping 及び得られたペプチド断片のアミノ酸配列の分析を行った。水晶体 PCMT-II a 及び II b と脳 PCMT-II の lysylendopeptidase 分解後に得られたペプチド断片の HPLC による溶出パターンを Fig. 8 に示す (ペプチド断片は水晶体 PCMT-II a の溶出順序に従って番号を記した)。水晶体 PCMT-II a, II b 及び脳 PCMT-II のペプチド断片の溶出パターンはきわめて類似しており、この三

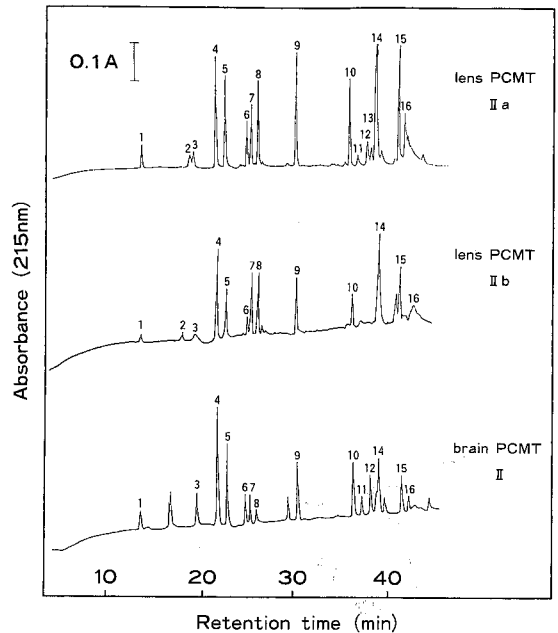
**Table 5** Amino acid composition of PCMTs from bovine lens and its comparison to type II enzyme of PCMT from bovine brain.

Amino acid	Molar ratio(%)		
	Bovine lens PCMT IIa	Bovine lens PCMT IIb	Bovine brain PCMT II
Asx	12.0	10.6	11.0
Thr	2.9	3.0	3.1
Ser	7.8	8.8	7.6
Glx	11.0	10.6	10.0
Pro	5.0	5.1	5.2
Gly	12.7	13.7	12.1
Ala	7.7	8.7	9.4
Val	7.1	6.2	7.0
Met	0.6	2.6	1.2
Ile	5.8	4.7	5.3
Leu	10.0	8.8	9.5
Tyr	2.6	3.1	3.0
Phe	2.3	2.2	2.5
Lys	7.0	5.6	6.6
His	1.9	2.7	2.9
Arg	3.6	3.6	3.6

者間における構造上の類似性が強く示唆された。水晶体 PCMT-IIa のペプチドマッピングにより得られた各ペプチド断片のアミノ末端側からのアミノ酸配列の解析結果を、従来報告されているウシ脳 PCMT-I<sup>16)</sup> の一次構造及びウシ及びヒト赤血球 PCMT-II のトリプシン処理後のペプチド断片のアミノ酸配列<sup>18)</sup> と比較検討した (Fig. 9)。その結果、解析し得た 154 アミノ酸残基中、同定不能 1 残基で、ウシ脳 PCMT-I と異なるアミノ酸残基は 1 個であり、相同性は 99.4% であった。ウシ赤血球 PCMT-II とは相互に解析し得たアミノ酸残基 94 個中、いずれかが同定不能であった 7 残基をのぞいて、アミノ酸残基は全く一致した。

#### 4 考 察

PCMT は現在まで、ヒト<sup>17,30)</sup>、ウシ<sup>30)</sup>、ラット<sup>31)</sup> の赤血球、ウシ<sup>15,16,32)</sup>、ラット<sup>33)</sup> の脳、ウシ胸腺<sup>31)</sup>、ラット睪丸<sup>29)</sup>、ウシ水晶体<sup>19)</sup> より分離精製されている。動物種および臓器間で若干の違いはあるが、分子量約 25,000-30,000 のモノマーで、pI が 4.5-6.5、AdoMet に対する  $K_m$  が 1-2  $\mu\text{M}$  と報告されている<sup>10)</sup>。ヒトおよびウシ赤血球<sup>17,18)</sup>、ウシ脳<sup>15)</sup> からは、DEAE-cellulose カラムへ吸着しない I 型酵素 (PCMT-I) と吸着する II 型酵素 (PCMT-II) が分離されている。本研究の結



**Fig. 8** High-performance liquid chromatographic separation of lysylendopeptidase digests of PCMT-II a and II b from bovine lens. Purified PCMTs were digested with lysylendopeptidase and the fragments separated by reverse-phase  $C_{18}$  column (4.6×250 mm), and eluted with a linear gradient of 5-95% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid at flow rate of 1 ml/min. The peptides were detected with an absorbance at 215 nm. Peaks are numbered in order of their elution.

果ではウシ水晶体には PCMT-I は少なく、大部分が PCMT-II であった。またウシ脳では PCMT-I が PCMT-II の 2.3 倍であった。肝臓では大部分が II 型であるが、骨格筋では I 型が主であるといわれている<sup>15)</sup>。このような臓器により I 型と II 型の分布は異なることが知られている。これらの isozyme の等電点は PCMT-I は pI 約 6.5-6.0、PCMT-II は約 5.7-5.0 で明らかに異なるが、両者の間には kinetics 及び基質特異性に著明な違いはないといわれており<sup>18)</sup>、両者の isozyme の機能および臓器間分布の違いの意義は不明である。本研究でウシ水晶体及び脳より分離したいずれの PCMT も SDS-PAGE 上、分子量は 27,000 であり、AdoMet に対する  $K_m$  は約 1-2  $\mu\text{M}$  と類似していた。しかし、メチル基転移活性の至適 pH は、水晶体 PCMT-II a が約 pH 6.5 付近、PCMT-II b が pH 6 以下で明らかに異なることが注目される。水晶体の主たる II 型酵素は II a であり、脳 PCMT-II における酵素活性の pH 依存性とよく一致している。水晶体 II 型酵素の量的に少な

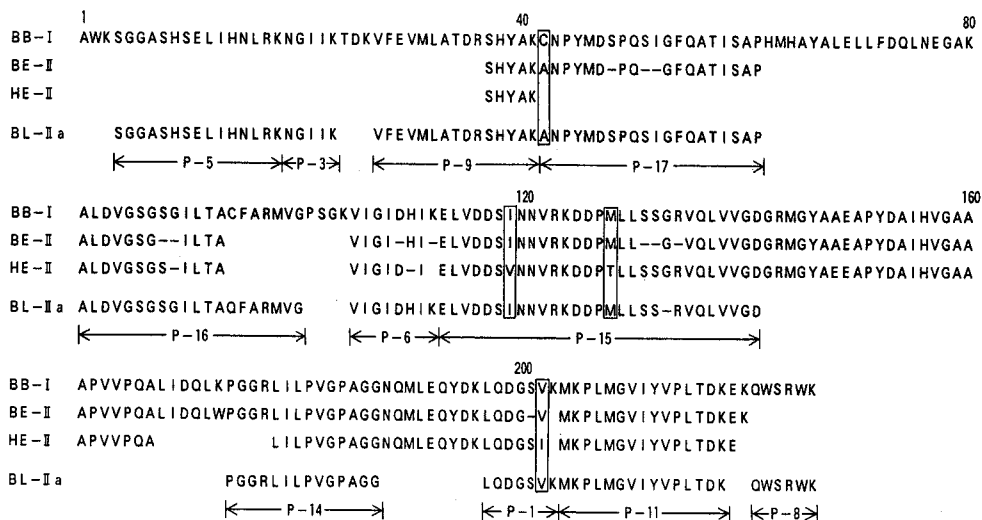


Fig. 9 Amino acid sequences of peptide fragments obtained by lyslendopeptidase digestion of bovine lens PCMT-II a and its comparison to those of PCMT-I from bovine brain, and PCMT-II from bovine and human erythrocytes. The arrow indicates identified amino acid sequence of peptide fragments obtained by lyslendopeptidase digestion of bovine lens PCMT-II a. A hyphen indicates unidentified residue. Differences between the isoenzyme, human and bovine forms are indicated by a square.

BB-I : bovine brain PCMT-I  
 BE-II : bovine erythrocyte PCMT-II  
 HE-II : human erythrocyte PCMT-II  
 BL-II a : bovine lens PCMT-II a

い PCMT-II b は、活性の至適 pH が他の II 型酵素より明かに低いことから、特殊な条件で、つまり酸性環境になった時に作用するのかも知れない。

現在までに分離された PCMT に共通しているのは基質蛋白質に対する特異性の低さである<sup>10)</sup>。本研究においても、ウシ水晶体 PCMT-II a 及び II b は、ovalbumin, bovine serum albumin, calmodulin, fibroin, crystallin をメチル化基質とし、両酵素分子種の間大きな活性の違いはなかった。この中で、特に crystallin は ovalbumin に比べ 4-6 倍もメチル化を受けることが注目される。Crystallin の中でも  $\alpha$ -crystallin はアスパラギン残基が多く、加齢に伴った脱アミノ化が進行すること<sup>34)</sup>及び水晶体では加齢と共に D-アスパラギン酸が増加すると報告<sup>1,2)</sup>されている。Crystallin がメチル化を受け易いことは、これらの結果と無関係ではないと思われる。

最近、ウシ脳 PCMT の cDNA クローンが分離され、一次構造が報告された<sup>35)</sup>。一方、蛋白質化学の手法を用いて PCMT-I の全アミノ酸配列が決定された<sup>16)</sup>。しかし、ウシ水晶体から PCMT 精製の報告<sup>19)</sup>はあるが、その isozyme 及び構造についての検討は本報告が最初

である。抗ウシ水晶体 PCMT-II 抗体は、臓器及び動物種が異なる PCMT に対して広い免疫交叉性があり、それぞれの PCMT 間に構造上の相同性が示唆された。事実、水晶体 PCMT-II a 及び II b と脳 PCMT-II のアミノ酸組成はきわめて類似しており、また lyslendopeptidase 分解のペプチド断片のペプチドマッピングはよく一致していた。すなわち、脳 II 型 PCMT の構造及び水晶体 II 型 PCMT の両分子種の構造に著明な違いはないと思われた。ついで、lyslendopeptidase 分解後に得られた各ペプチド断片のアミノ酸配列を分析すると、Henzel *et al.*<sup>16)</sup>が報告したウシ脳 PCMT-I の全アミノ酸配列、及び Gilbert *et al.*<sup>18)</sup>が報告したウシ及びヒト赤血球 PCMT-II の部分アミノ酸配列と、本研究でウシ水晶体 PCMT-II a から得た 16 のペプチドのアミノ酸配列は殆ど一致した。以上の結果は、PCMT の一次構造は動物種及び臓器間の違いを越えて保持されていることを示すと考えられる。

臓器間における PCMT 構造に高い類似性があるにも拘らず、等電点の異なった I 型及び II 型の isozyme が存在することは、酵素蛋白質の化学修飾による可能性が示唆される。Gilbert *et al.*<sup>18)</sup>は、赤血球 PCMT の

I型とII型における約1.0の等電点の違いは、両者のアミノ酸配列の僅かな違いからは説明し得ないとしている。Aswad and Deight<sup>15)</sup>は脳II型PCMTをphosphoprotein phosphatase処理したが、I型には変換しなかったという。本研究ではじめて示されたII型PCMTの二つの分子種II a, II bも、おそらく何らかの化学修飾によって等電点及び酵素の諸性質の違いが発現すると思われる。

水晶体中の代謝回転の違い蛋白質のアスパラギン酸残基がラセミ化によってD-Aspに変換し、加齢とともに蓄積することが報告されて以来、脳<sup>4)</sup>や赤血球膜<sup>5)</sup>などにもD-Aspの存在が示された。一方、蛋白質中のアスパラギン残基の脱アミドも、加齢とともに進行することが示されている<sup>34)</sup>。加齢など何等かの機構で、生体蛋白質分子のアスパラギン酸あるいはアスパラギン残基に異性体が生成すると、PCMTがこれを認識し、そのβ-カルボキシル基をメチル化する。生成したカルボキシメチル化アミノ酸残基はメタノールを放出し、L-型アミノ酸残基に戻ると考えられている。現在、哺乳動物の細胞質に存在するPCMTの主たる機能は、この変性蛋白質の修復機構であろうとClarkeは提唱している<sup>10)</sup>。PCMTは広く分布しているので種々の組織における老化等に基因する疾患の際、PCMTによる変性蛋白質の修復が障害されている場合の可能性も考えられる。

最近、ras蛋白質のC末端システイン残基のファルネシル化とともにカルボキシル基をメチル化するもう一つのPCMTの存在が報告された<sup>36)</sup>。このPCMTは、細胞質PCMTとは基質特異性が明らかに異なる。筆者らのグループは最近、ras蛋白質と同じくGTP結合蛋白質であるトランスデュースンのγ-サブユニットC末端のシステイン残基が、ファルネシル化とともにカルボキシメチル化されていることを見出した<sup>37)</sup>。このファルネシル化はトランスデュースン機能の発現に必須であるが、カルボキシメチル化によってこの活性は調節されていることを示し、第二のPCMTの機能の重要性を指摘している。

## 5 結 論

加齢に伴って蛋白質中にD-Asp及びL-Isoasp残基が蓄積することが知られている水晶体から、D-Asp及びL-Isoasp残基をL-Aspへ修復する機能を持つことが推定されている酵素、PCMTを精製し、その性質を検討した。

1. ウシ水晶体の100,000×g上清から、DEAE-

cellulose, Sephadex G-100, Phenyl Sepharose, AdoMetをリガンドとしたアフィニティカラムの四段階をへて、SDS-PAGE上分子量27,000の単一バンドを示すPCMT-IIを分離した。DEAE-celluloseに吸着しないPCMT-Iは水晶体では非常に少なかった。

2. 水晶体PCMT-IIはMono-Qカラムで荷電の異なる四つのピーク、II a, II b, II c, II dに分離した。II a, II bの等電点は5.8及び5.6、II dはII aとII bからなる二量体であった。II aとII bの間でAdoMetに対する $K_m$ ,  $V_{max}$ 及び等電点に若干の違いが認められたが、メチル基転移活性の至適pHは非常に異なり、II aはpH 6.5付近、II bは6以下であった。

3. 水晶体PCMT-II a, II b間で基質蛋白質に対する選択性の違いはなく、両者ともに水晶体の主蛋白質であるcrystallinへのAdoMetからのメチル基転移を強く促進した。

4. ウシ水晶体PCMT-II抗体は、ヒト赤血球、脳及びウシ水晶体、脳のPCMTに対して広い免疫交叉性を示した。

5. 水晶体PCMTII a, II b及び脳PCMT-IIのアミノ酸組成は類似しており、またlysylendopeptidase分解後に得られるペプチド断片のマッピングもよく一致したので、この三者の構造は、きわめて相同性が高いと考えられた。

6. ウシ水晶体PCMT-II aのlysylendopeptidase分解ペプチド断片のアミノ酸配列は、他研究者の報告したウシ脳PCMT-I、ウシ赤血球PCMT-II及びヒト赤血球PCMT-IIのアミノ酸配列と殆ど一致したので、PCMTの構造は動物種及び臓器間の違いをこえて保持されていると考えられた。PCMT-II aとII bは、何らかの化学修飾によって等電点及び酵素の諸性質の違いが発現すると考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導頂きました本学生化学第1講座秋野豊明教授並びに本学整形外科講座石井清一教授に深く感謝いたします。また、終始有益な御助言をいただきました本学生化学第1講座の諸先生に感謝します。本研究の一部は、北海道老年医学研究振興会の助成金によって行われた。本研究の要旨は第61回日本生化学会大会(京都, 1989)において発表した。

## 文 献

1. Master, P. M., Baba, J. L. and Zigler, J. S. : Aspartic acid racemization in the human lens dur-

- ing aging and cataract formation. **Nature** **268**, 71-73 (1977).
2. Muraoka, S., Fujii, N., Tamanoi, I. and Harada, K.: Characterization of a protein containing D-aspartic acid in aged mouse lens. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **146**, 1432-1438 (1987).
  3. Garner, W. H. and Spector, A.: Racemization in human lens: Evidence of rapid insolubilization of specific polypeptides in cataract formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**, 3618-3620 (1978).
  4. Man, E. H., Sandhouse, M. E., Burg, J. and Fisher, G. H.: Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. **Science** **220**, 1407-1408 (1983).
  5. McFadden, P. N. and Clarke, S.: Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**, 2460-2464 (1982).
  6. Freitag, C. and Clarke, S.: Reversible methylation of cytoskeletal and membrane proteins in intact human erythrocytes. **J. Biol. Chem.** **256**, 6102-6108 (1981).
  7. Johnson, B. A., Murry, E. D., Clarke, S., Glass, D. B. and Aswad, D. W.: Protein carboxyl methyltransferase facilitates conversion of atypical L-isoaspartyl peptides to normal L-aspartyl peptides. **J. Biol. Chem.** **262**, 5622-5629 (1987).
  8. Aswad, D. W.: Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. **J. Biol. Chem.** **259**, 10714-10721 (1984).
  9. Murry, E. D. and Clarke, S.: Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. **J. Biol. Chem.** **259**, 10722-10732 (1984).
  10. Clarke, S.: Protein carboxyl methyltransferases: Two distinct classes of enzymes. **Annu. Rev. Biochem.** **54**, 479-506 (1985).
  11. McFadden, P. N. and Clarke, S.: Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: Implications for the cellular repair of damaged proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 2595-2599 (1987).
  12. Barber, J. R. and Clarke, S.: Membrane protein carboxyl methylation increases with human erythrocyte age. **J. Biol. Chem.** **258**, 1189-1196 (1983).
  13. Axelrod, J. and Daly, T.: Pituitary gland: Enzymatic formation of methanol from S-adenosyl methionine. **Science** **150**, 892-893 (1965).
  14. Diliberto, E. J. and Axelrod, J.: Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. **J. Neurochem.** **26**, 1159-1165 (1976).
  15. Aswad, D. W. and Deight, E. A.: Purification and characterization of two distinct isozymes of protein carboxymethylase from bovine brain. **J. Neurochem.** **40**, 1718-1726 (1983).
  16. Henzel, W. J., Stults, J. T., Hsu, C. and Aswad, D. W.: The primary structure of a protein carboxyl methyltransferase from bovine brain that selectively methylates L-isoaspartyl sites. **J. Biol. Chem.** **264**, 15905-15911 (1989).
  17. Ota, I. M., Gilbert, J. M. and Clarke, S.: Two major isozymes of the protein D-aspartyl/L-aspartyl methyltransferase from human erythrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **151**, 1136-1143 (1988).
  18. Gilbert, J. M., Fowler, A., Bleibaum, J. and Clarke, S.: Purification of homologous protein carboxyl methyltransferase isozymes from human and bovine erythrocytes. **Biochemistry** **27**, 5227-5233 (1988).
  19. McFadden, P. N., Horwits, J. and Clarke, S.: Protein carboxyl methyltransferase from cow eye lens. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **113**, 418-424 (1983).
  20. Kim, S., Nochumson, S., Chin, W. and Paik, W. K.: A rapid method for the purification of S-adenosylmethionine: Protein carboxyl-o-methyltransferase by affinity chromatography. **Analyst Biochem.** **84**, 415-422 (1978).
  21. Kim, S.: S-adenosylmethionine: Protein carboxyl methyltransferase from erythrocyte. **Arch. Biochem. Biophys.** **161**, 652-657 (1974).
  22. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685 (1970).
  23. O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** **250**, 4007-4021 (1975).
  24. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 4350-4354 (1979).
  25. Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. and Dreyer, W. J.: A gas-liquid solid phase polypeptide and protein sequenator. **J. Biol.**

- Chem.** **256**, 7990-7997 (1981).
26. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.** **177**, 751-766 (1949).
27. Lowry, O. H., Rosebough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**, 256-275 (1951).
28. John, F. R. and Kuncke, Jr.: Composition of the lens. In: Betrows, J. B.: Cataract and abnormalities of lens. 69-96, Grune & Stratton, New York (1975).
29. Billingsley, M. L. and Balaban, C. D.: Protein-o-carboxylmethyltransferase in the rat brain: High regional levels in the substantia nigra, locus coeruleus and paraventricular nucleus. **Brain Res.** **358**, 96-103 (1985).
30. Saido, T., Toyosima, S. and Osawa, T.: Protein-o-carboxylmethyltransferase from cytosol and membranes of chicken erythrocytes. **J. Biochem.** **102**, 319-326 (1987).
31. Kim, S.: Purification and properties of protein methylase II. **Arch. Biochem. Biophys.** **157**, 476-484 (1973).
32. Diliverto, E. J. and Axelrod, J.: Characterization and substrate specificity of a protein carboxy methylase in the pituitary gland. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **71**, 1701-1704 (1974).
33. Billingsley, M. L., Velletri, P. A., Roth, R. H. and DeLorenzo, R. J.: Carboxymethylation of calmodulin inhibits calmodulin-dependent phosphorylation in rat brain membranes and cytosol. **J. Biol. Chem.** **258**, 5352-5357 (1983).
34. Van Kleef, F. S. H., DeJong, W. W. and Hoenders, H. J.: Stepwise degradations and deamidation of the eye lens protein  $\alpha$ -crystallin in aging. **Nature** **258**, 264-266 (1975).
35. Sato, M., Yosida, T. and Tuboi, S.: Primary structure of rat brain protein carboxyl methyltransferase deduced from cDNA sequence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **161**, 342-347 (1989).
36. Clarke, S., Vogel, J. P., Deschenes, R. J. and Stock, J.: Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: Evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 4643-4647 (1988).
37. Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yosizawa, T., Akino, T. and Shimonisi, Y.: Farnesylated  $\gamma$ -subunit of photoreceptor G-protein is dispensable for GTP-binding. **Nature** **346**, 658-660 (1990).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学整形外科学講座 北村公一