

28L-pm06S

Protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) の新規活性検出系の開発

○木村 勇亮¹, 小松 徹^{1,4}, 長野 哲雄², 花岡 健二郎¹, 浦野 泰照^{1,3} (¹東大院薬,
²東大創薬イノベーションセンター, ³東大院医, ⁴JSTさきがけ)

【目的】 Protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) は、タンパク質中の L-isoaspartyl 基の側鎖を特異的に認識し、メチル化する酵素である。近年この酵素が、がん、アルツハイマー病、てんかんなど様々な疾患と関連していると報告されており、重要なバイオマーカー、創薬標的となり得るため、その活性の検出には非常に意義があると考えられる。しかし、現行の PIMT 活性検出法は、放射性同位体ラベル化基質を用いる方法であり、煩雑な操作、安全性と低いスループット性の問題点を有している。そこで我々は、PIMT 活性を蛍光強度の変化によって高感度に検出可能な有機小分子蛍光プローブの開発を目的として研究を行った。

【方法・結果】PIMT 活性の検出原理には、caspase-3 の基質認識能を利用した coupled assay を用いた。まず、PIMT により、メチル化を受けることで、加水分解酵素 caspase-3 となる基質となるペプチド配列を見出した(図参照)。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を蛍光制御原理として、見出したペプチド配列に基づいた有機小分子蛍光プローブを設計、合成した。開発したプローブは期待通り、PIMT 存在下においてのみ、caspase-3 の添加によって蛍光強度の大きな上昇を示した。また、開発した本活性検出系を用いて、生体サンプルにおける PIMT 活性の検出に成功すると共に、阻害剤スクリーニングへの応用が可能であることも明らかにした。

