

28M-pm18

有機小分子蛍光プローブを用いた SAM 高感度検出系の開発とその応用
○荻原 洲介¹, 小松 徹¹, 浦野 泰照^{1,2,3} (¹東大院薬, ²東大院医, ³AMED CREST)

【目的】SAM (*S*-adenosylmethionine) は、DNA や Histone のメチル化などメチル基転移反応の主要なメチル基ドナーであり、細胞内の SAM 濃度がメチル基転移反応速度を決定し、細胞内の DNA、タンパク質のメチル化状態を直接的に制御していると考えられている。細胞内の SAM 濃度の変化は癌などの疾患の成り立ちにも関与していることが示唆されており、その分子機構を詳細に調べることは、疾患の成り立ちの理解やその治療法の開発に重要な意義を持つと考えられる。そこで本研究では、生細胞の SAM 濃度の変化を高感度かつハイスループットに検出する実験系を開発することで、生細胞レベルで SAM 濃度を制御する化合物の探索を実現するスクリーニング系を開発することを目指した。

【方法・結果】当研究室では、SAMを補酵素に持つ酵素PIMT (Protein L-isoadaspartyl methyltransferase) の活性を、Caspase-3 の Coupled Assay により蛍光検出する FRET 型蛍光プローブ ISOp-2 の開発に成功している (Kimura et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**)。演者は、本蛍光プローブの蛍光上昇が、SAM を量論的に消費して起こることに着目し、これを SAM の検出系に利用できると考えた。しかしながら、ISOp-2 は SAM 非依存下での加水分解が起こり、低濃度の SAM の検出に十分な S/N を得ることが難しかったため、SAM 非依存下での加水分解を大幅に抑えて S/N を向上させるプローブの構造最適化をおこない、目的に合う蛍光プローブの開発に成功した。更に、FRET のペアを変えることにより、蛍光増大型、蛍光波長変化型のそれぞれ異なる応答を示す蛍光プローブの開発に成功した。本検出系を用いることで、培養した細胞を可溶化後、酵素およびプローブの添加のみによって細胞内に存在している SAM の迅速な蛍光検出が可能となることが期待される。