

22PO-am106

有機化学反応を利用したヒストンメチル化酵素機能解析法の構築

岡崎 優祐¹, ○平野 智也¹, 森 修一¹, 影近 弘之¹ (¹医科歯科大生材研)

【目的】DNA と複合体を形成するヒストンメチル化酵素の活性検出法は、生理機能解析、阻害剤開発に有用である。演者らは、抗体を用いずに、安価で簡便な検出法となりえる有機化学反応を利用する検出法の構築を目指した研究を行ってきた。これまでの研究により、3-nitro-4-fluoroacetophenone がリシンと比較して、メチル化されたリシン残基と優先的に S_NAr 反応を起こし、結合を形成することを見出していた。この反応性を高感度な蛍光による検出法へと展開するため、3-nitro-4-fluoroacetophenone と蛍光団 Bodipy とをリンカーを介して結合させたプローブを合成し、アビジンコートされたマイクロプレートとともにアッセイ法の構築を試みた。しかし、プローブの脂溶性の高さ等の問題により、酵素反応を検出することが困難であった。そこで今回、種々の改良を行うことによりアッセイ系の構築を目指した。

【結果・考察】リンカー構造を PEG 鎖としてプローブの脂溶性を低減させる改良、固定化、洗浄効率が高いという利点を有する磁気ビーズを利用した結果、基質ペプチド濃度を $110 \mu\text{M}$ としてもリシンのメチル化を検出できることを見出した。さらに、未反応のプローブを洗浄する溶液を種々検討したところ、アセトニトリルと PBST との 1:1 の混合溶液を用いることにより、基質ペプチド濃度を $2 \mu\text{M}$ まで落としてもメチル化の有無を検出できることを見出した。本条件を用いることにより、ヒストンメチル化酵素 Set7/9 による基質のメチル化を検出できること、さらにその際の蛍光変化が阻害剤により抑えられることも見出した。