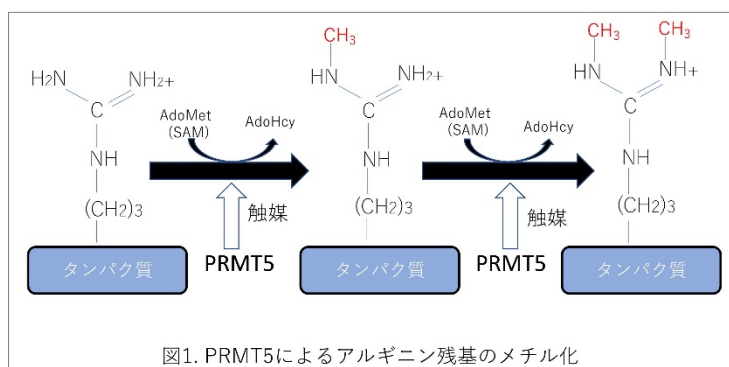


放射性同位体炭素 14 を用いたタンパク質メチル化酵素の活性測定

工学研究院 鈴木敦

炭素 14 (^{14}C) は炭素 12 (^{12}C) の放射性同位体 (radioisotope; RI) であり、地球上の炭素全体の 1.2×10^{-10} % を占めます。その原子核は 6 個の陽子と 8 個の中性子からなるために不安定であり、放射線を放出して窒素 (^{14}N) へと変換することで減じていく性質があります。その半減期は約 5730 年であり、この性質を利用して、考古学などの学問領域では試料中の炭素同位体 12/14 比から年代を推定する放射性炭素年代測定がしばしば行われます。一方で、 ^{14}C は生命科学の分野でも重要なツールとして利用されています。特に、栄養学や代謝学の分野においては、標的となる有機酸を ^{14}C で標識し、生体内における輸送などを追跡する研究が盛んに行われています。本研究では、そのような利用方法とは少し違った手法として、 ^{14}C を用いたタンパク質メチル化酵素の活性測定について紹介したいと思います。

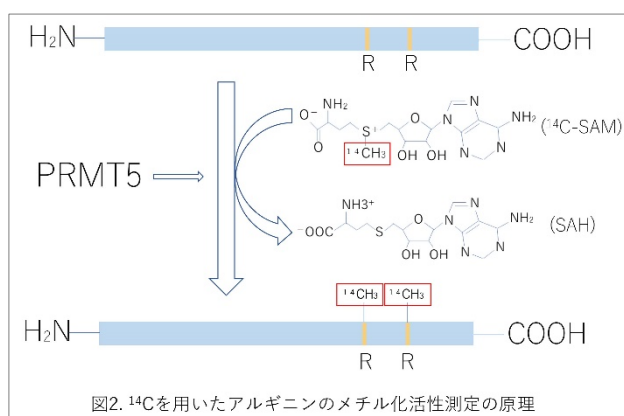
タンパク質のメチル化は翻訳後修飾の一つであり、通常、アミノ酸配列のアルギニンまたはリシン残基に起こることが知られています。私達の研究室では、アルギニンをメチル化する酵素である protein arginine methyltransferase (PRMT5) の研究を行ってきました。PRMT5 は S-アデノシルメチオニン (SAM) から標的タンパク質のアルギニン残基へとメチル基の転移を触媒することが知られています。この酵素の触媒効果によって N 末端に 1 回のメチル化が起きると非対称性ジメチルアルギニンが、2 回起きると対称性ジメチルアルギニンが生成されます (図 1)。PRMT5 は哺乳類の卵形成に重要な役割を持つことが知られていますが、その標的タンパク質の全容は未だに不明です。そこで、私達は PRMT5 のメチル化活性を測定する実験系を確立し、標的候補タンパク質へのメチル化活性を解析しようと考えました。



そこで、私達は PRMT5 のメチル化活性を測定する実験系を確立し、標的候補タンパク質へのメチル化活性を解析しようと考えました。

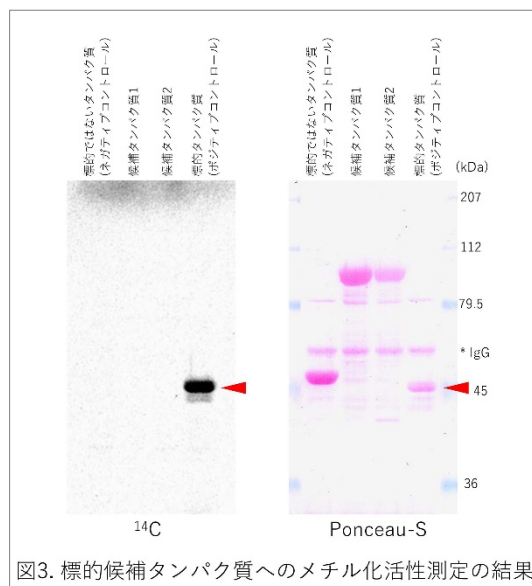
まず、培養細胞に強制発現させた PRMT5 を免疫沈降により回収します。これに標的候補のリコンビナント・タンパク質と ^{14}C で標識した SAM (^{14}C -SAM) を加えて 37°C でインキュベーションすると、候補タンパク質が確かに標的であった場合は、PRMT5 によってアルギニン残基 (R) に ^{14}C -SAM からメチル基が転移されます (図 2)。反応後の溶液を SDS-PAGE により分離した後にウエスタンブロッティングによりメンブレンに転写し、イメージングプレートと蛍光検出機器 FLA9000 を用いて放射線エネルギーの強さを

検出します。以上のような実験の結果は図3に示すような画像として得ることができます。「Ponceau-S」では溶液中に含まれるタンパク質全てを染色しており、この内、矢頭で示したタンパク質にのみ ^{14}C の取り込みが見られます。つまり、既知の標的タンパク質にはメチル基が転移されており、この実験系が機能していることが分かります。



一方で、候補タンパク質1と2は両方ともネガティブコントロールと同様に ^{14}C の取り込みが見られないことから、残念ながら、これらのタンパク質はPRMT5の標的ではないことが明らかになりました。以上のように、 ^{14}C を用いてタンパク質のメチル化活性を測定することが可能であり、この手法はPRMT5に限らずにタンパク質メチル酵素の活性を解析する上で有効であると考えられます。

近年、様々なメチル化を認識する抗体の開発が進んだことで non-RI の手法が広く浸透しました。その結果、放射性同位体の利用量は減少傾向にあります。しかし、生体内で希少なメチル化に対する抗体の開発は未だに進んでいない上に、放射性同位体の利用は「間違いなくこの物質が転移している（または、輸送されている）」ことを示す強力な手段です。よって、今後も一定の需要があるツールであると考えられます。



参考文献

- [1] Wang Y, et al. *Sci Rep.* 2015;5:11031.
- [2] Stopa N, et al. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(11):2041-59.