

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		S-アデノシルメチオニンのイメージング法の開発とメチル化制御解析への応用			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of FRET-based biosensor for the detection of S-adenosyl methionine			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	ニシカワ	ケイゾウ	研究期間 B	2016 ~ 2017 年
	漢字 CB	西川	恵三	報告年度 YR	2017 年
	ローマ字 CZ	Nishikawa	Keizo	研究機関名	大阪大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任准教授			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、骨代謝を担う破骨細胞の分化調節因子である S-アデノシルメチオニン(SAM)の蛍光可視化法の開発に取り組んだ。近年、SAM の蛍光可視化手段として、RNA アプタマーの有用性が報告された(<i>Science</i> 2012)。しかし、当該論文の方法では破骨細胞内の SAM を検出するには感度が低いことを確認している。そこで、RNA アプタマーの代替手段として、Fluorescent resonance energy transfer(FRET)の原理を利用した SAM に対するバイオセンサーの作製に取り組んだ。まず最初に、SAM のセンサー領域の選別を試みた。結晶構造が報告されている SAM 結合ドメインのなかで、SAM 結合依存的に構造が大きく変化することが予想される細菌並びにヒト由来の SAM 結合ドメイン 2 種を選出した。次に、SAM 結合ドメインの両側に、Cyan fluorescent protein の改良タンパク質 mseCFP・11 と yellow fluorescent protein (YFP)の改良蛍光タンパク質 Venus を接続することで FRET センサープロトタイプ の cDNA を構築した。当該 cDNA を導入した大腸菌の発現ベクターを構築し、得られた組み換え蛋白質を用いて、SAM 添加に伴う FRET シグナルの変化を検討した。その結果、ヒト由来に比べて、細菌由来の SAM 結合ドメインをもつプロトタイプでは、SAM の濃度に応じた FRET シグナルの増加が観察された(ダイナミックレンジ 24.9%)。続いて、SAM センサープロトタイプの応答性を改善するために、(1)リンカー配列の改変、(2)蛍光蛋白質の円順列変異体の利用、(3)SAM 結合ドメインの点変異導入によって約 200 種類のプロトタイプを作製した。その結果、高感度型 SAM センサーの作製に成功した(ダイナミックレンジ 52.8%)。</p>					
キーワード FA	SAM	破骨細胞	細胞内代謝	イメージング	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}	西川恵三							
	書名 ^{HC}	マクロファージのすべて(松島綱治 編集)							
	出版者 ^{HB}	医歯薬出版	発行年 ^{HD}	2	0	1	6	総ページ ^{HE}	268
図書	著者名 ^{HA}	Kikuta J, Nishikawa K and Ishii M							
	書名 ^{HC}	<i>Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation</i> (Masahiro Miyawaki and Kiyoshi Takatsu edition)							
	出版者 ^{HB}	Springer	発行年 ^{HD}	2	0	1	6	総ページ ^{HE}	702

欧文概要^{EZ}

In this study, I attempted to develop fluorescence imaging probe for S-adenosyl methionine (SAM), which is a key metabolite in the regulation of osteoclasts. Recently, it has been shown that RNA aptamer is useful for detecting SAM in bacteria (Science 2012). However, I could not visualize endogenous SAM in osteoclast using RNA aptamer method. Alternatively, I tried to develop FRET-based biosensor for the detection of SAM. First of all, I attempted to screen for SAM binding domains. Based on the crystal structure of SAM binding proteins, I focused on bacteria- and human-derived SAM binding domains whose structure is predicted to change in response to SAM. Next, FRET sensor prototype was constructed by fusing mscFP11 and Venus to both ends of the SAM binding domains. The prototype carrying bacteria-derived SAM binding domain was moderate with a sensitivity of dynamic range, 24.9%, while the prototype carrying SAM binding domain derived from human has poor dynamic range. I further improved sensitivity and specificity of bacteria-based prototype by (1) modification of linker sequence, (2) use of circular permutation mutant of fluorescent protein, and (3) introduction of point mutation of SAM binding domain. As a result, I have succeeded in developing a highly sensitive and specific FRET-based biosensor for the detection of SAM (dynamic range, 52.8%).