

様式3

令和元年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和元年2月28日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：奈良県立医科大学

部局・職名：医学部・講師

氏名：秦野 修

1. 研究課題

多彩で重篤な表現型異常に関与する SIK3 キナーゼに結合するヒトタンパク質の同定

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 秦野 修	奈良県立医科大学・医学部	講師	研究統括と AlphaScreen アッセイ等
研究分担者 竹田浩之	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター	准教授	AlphaScreen アッセイ系構築
竹森 洋	岐阜大学・工学部	教授	SIK3 高次評価系開発・阻害剤調査

3. 研究成果

別紙のとおり

別紙

研究目的

分担者・竹森はステロイド産生に影響を及ぼす因子の探索から塩誘導キナーゼ SIK1, 2, 3 を単離した。SIK1, 2, 3 は AMPK ファミリーに属し、SIK3 欠損マウスは、代謝異常（低血糖、低脂肪、低体重）、軟骨形成異常（低身長）、ステロイド合成酵素群の発現異常などの多彩で重篤な異常を呈した。本研究はヒト SIK3 に結合し、SIK3 シグナル伝達に関与するヒトタンパク質を、キナーゼ群アレイ、転写因子群アレイから同定することを目的とし、新たな創薬開発につなげる。又、メラニン産生抑制/ステロイド合成抑制に関与する化合物 11-OH KA に結合するヒトタンパク質の同定も行う。

本研究により、多彩で重篤な異常に関与する SIK3 の結合因子が同定されることにより、SIK3 シグナル経路を標的とした生活習慣病（脂質、糖代謝異常）、軟骨形成異常、ステロイド代謝異常等の改善を目指す新たな創薬開発につながることを期待される。

研究成果

SIK3 および SIK3 結合タンパク質の無細胞合成（H30 年度共同研究成果）

2018 年度は SIK3 および SIK3 に結合することが報告されている既知結合タンパク質 4 種について無細胞合成を試みた。当初、竹森研究室において pEU-bl_s-MCS ベクターに SIK3 遺伝子を挿入したところ予想外の塩基が挿入された。そのため、竹田研究室において Inverse PCR と Gibson Assembly を用いて余分な挿入塩基の除去を試み、pEU-bl_s-SIK3 発現プラスミドを得た。bl_s-SIK3 および、既知 SIK3 結合タンパク質（CRTC1、CRTC2、HDAC4、HDAC5）の無細胞合成を試みた。既知 SIK3 結合タンパク質はプロテオサイエンスセンターで作製した、FLAG-GST 融合転写因子アレイからピックアップした鋳型をもちいて合成した。Western blotting により合成確認を行ったところ、いずれのタンパク質も良好な合成結果を得た（図 1）。

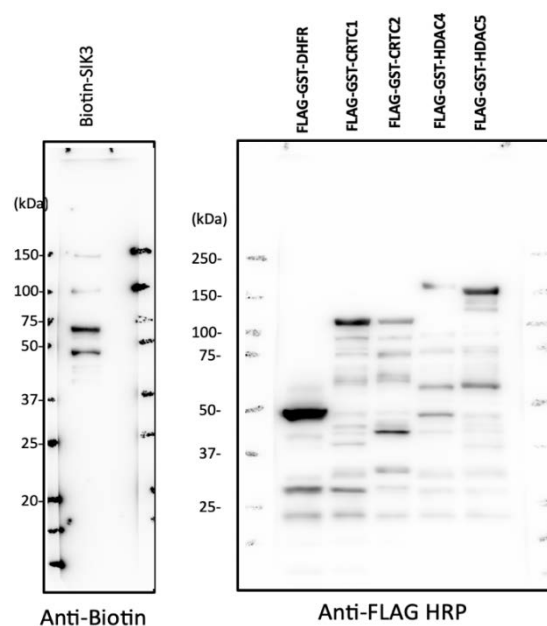


図 1. SIK3 および SIK3 結合タンパク質の無細胞合成。

SIK3 相互作用 AlphaScreen 系の検討 (H30 年度共同研究成果)

無細胞合成した SIK3 および既知の SIK3 結合タンパク質を用いて、AlphaScreen アッセイ系の検討を行った。無細胞合成に用いるコムギ胚芽抽出液 (WEPRO7240/WEPRO1240) およびアッセイ系へのタンパク質添加量などの条件を振って AlphaScreen を実施し、S/B 比 7~8 のシグナル値を得た (図 2)。

Binding of SIK3 to Transcription co-factors

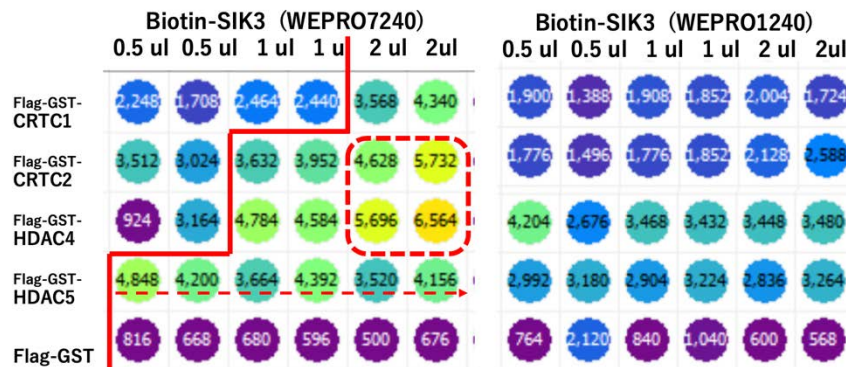


図 2. SIK3 AlphaScreen アッセイ系検討

プロテインアレイを用いた SIK3 相互作用パートナー探索 (令和元年度共同研究成果)

構築した AlphaScreen アッセイ条件とプロテインアレイを用いて、SIK3 の相互作用タンパク質の探索を実施した。プロテインキナーゼ 470 種、転写因子 1300 種を含む約 4000 種のヒトタンパク質を搭載したプロテインアレイと SIK3 を総当たりで反応させ (n=1)、相互作用を AlphaScreen で検出した。その結果、SIK3 は 4000 種ヒトタンパク質の大多数とは相互作用しなかったが、一部のタンパク質とは強く結合した (図 3)。これにより、既知の SIK3 結合タンパク質よりも強く相互作用するパートナー候補タンパク質が数十種類見出された。

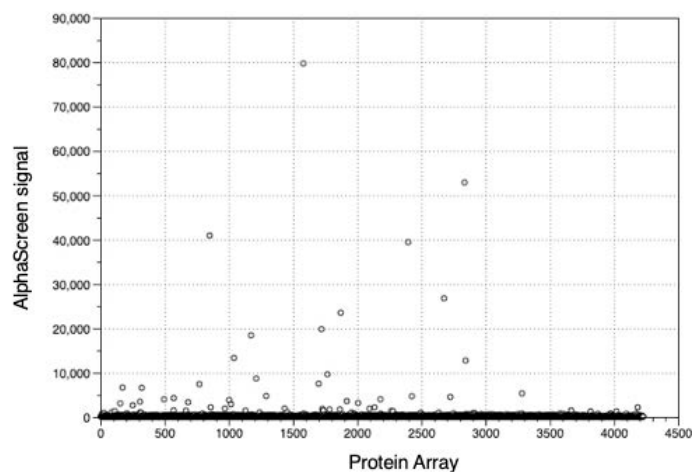


図 3. SIK3 と 4000 種ヒトタンパク質の相互作用スクリーニング結果

又、本スクリーニングの追試のため、スクリーニングで SIK3 への強い結合が見出された上位 19 種類のタンパク質を追加合成し、AlphaScreen による SIK3 との相互作用試験を実施した。19 種のパートナー候補タンパク質のうち、13 種で強い結合が確認された。

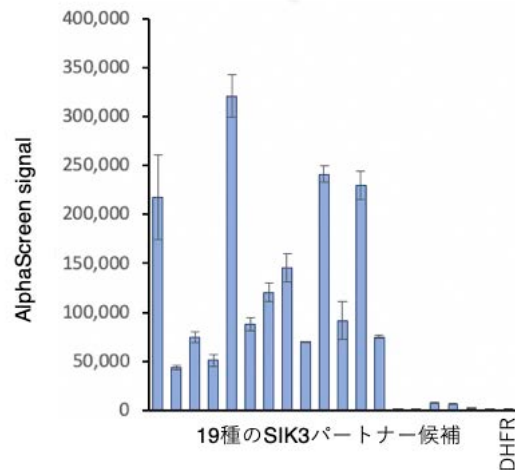


図 4. SIK3 と 19 種のパートナー候補タンパク質の相互作用試験 (n=3)

研究発表

特になし

今後の課題

- 1) 見出した相互作用パートナーの機能について調査し、SIK3 の機能と相関がありそうなパートナーについて詳細な機能解析を進める。
- 2) SIK3 と新規同定パートナーの相互作用を阻害する薬剤スクリーニングの可能性について検討を行う。
- 3) メラニン産生抑制/ステロイド合成抑制に関与する化合物 (110H-KA) のプロテインアレイを用いた標的タンパク質探索を行うため、同化合物のビオチン化ラベル条件検討を行う。