

様式3

令和2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3年3月1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、特に 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 SIK1, 2, 3 に結合し、SIK 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ことを目標とする。

本研究により、多彩で重篤な異常に関与する SIK 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が期待される。

研究成果

SIK3 および SIK3 結合タンパク質の無細胞合成

令和元年度は、コムギ胚芽無細胞合成した SIK3 キナーゼドメインと、4000 種のヒトプロテインアレイ（キナーゼ群アレイ、転写因子群アレイを含む）を用いて、AlphaScreen アッセイを行い、SIK3 相互作用タンパク質をスクリーニングし、SIK3 に結合するタンパク質 13 種を見出した。令和2年度は、更に SIK1, 2 を無細胞合成し、SIK3 と相互作用パターンの比較を行った。

えひめかずさプロテインアレイに収録された SIK1, 2 の全長、およびキナーゼドメインを PCR で増幅し、pEU-His-bls ベクターへサブクローニングした後、コムギ胚芽無細胞合成を行い、全ての SIK 分子種の合成を確認した（図 1）。

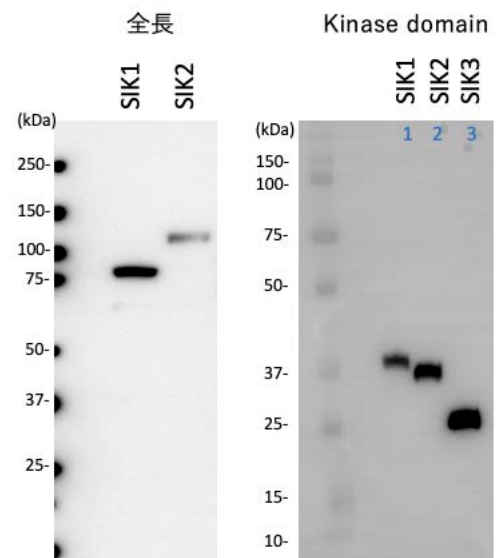


図 1. 左：無細胞合成した SIK1, 2 の全長タンパク質 右：無細胞合成した SIK1, 2, 3 の kinase domain

SIK1, 2, 3 の相互作用応答性の比較

合成した SIK1, 2, 3 キナーゼドメインを用いて AlphaScreen を実施した。既知の SIK 基質 4 種との AlphaScreen では全般に反応が低かった（図 2）。その中でも、CRTC1, CRTC2, HDAC4 と SIK1 が比較的高いシグナルを示した。また、令和元年度の共同研究で見出した SIK3 結合タンパク質に対する AlphaScreen も実施した。SIK1 < SIK2 < SIK3 の順、また逆の順で結合性が高くなるもの、SIK1 で突出した結合シグナルが得られたものなど、SIK1, 2, 3 とタンパク質の組み合わせによって異なる結果が得られた（図 3）。

SIK1, 2, 3 のそれぞれで相互作用の強さが異なったことから、それぞれの SIK 分子種に、より特異的な相互作用パートナーが存在する可能性が示唆された。この結果を受け、今後は SIK1, 2, 3 の全長タンパク質、およびキナーゼドメイン、合計 6 種類をペイ

トとして、4000 種のヒトプロテインアレイに対してスクリーニングを実施し、SIK キナーゼを介したシグナル伝達系の解明と創薬標的の同定を試みる予定である。

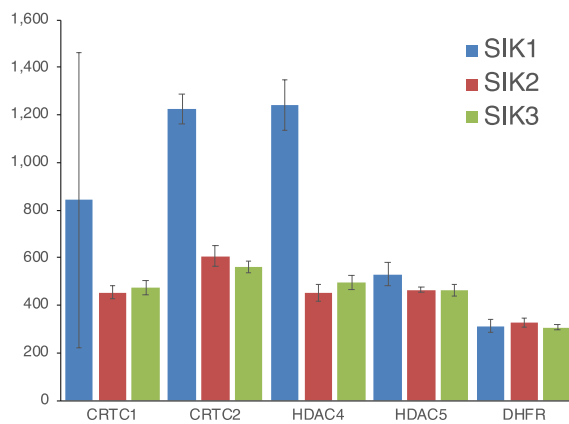


図 2. 既知 SIK 基質との AlphaScreen

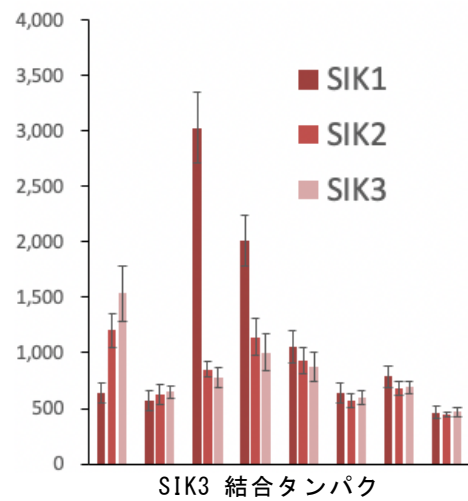


図 3. 新規 SIK3 結合タンパクとの AlphaScreen

研究発表

特になし

今後の課題

- 1) SIK1, 2, 3 の全長タンパク質およびキナーゼドメインと相互作用するタンパク質を 4000 種のヒトプロテインアレイ（キナーゼ群アレイ、転写因子群アレイを含む）からスクリーニングする。
- 2) 取得した相互作用解析データより、各 SIK キナーゼを介したシグナル伝達系を解明する。また、同定した相互作用タンパク質と各 SIK 分子種間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。