

研究題目 近接依存性ビオチン化酵素を用いたヒト塩誘導キナーゼに結合する細胞内タンパク質の同定

研究組織

研究代表者：秦野 修（奈良県立医科大学・医学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学・先端酵素学研究所）

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）

研究分担者：竹森 洋（岐阜大学・工学部）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

本研究は多彩で重篤な疾患に関与する塩誘導キナーゼ (SIK1,2,3) の機能発現機構を明らかにすることを目的とし、SIK1,2,3 各種に強く結合する細胞内タンパク質を同定する。このため、新規・近接依存性ビオチン化酵素 AirID cDNA に SIK1, SIK2, SIK3 の各々の cDNA を融合させた発現プラスミドを細胞内に導入し、ビオチン化されるタンパク質 (SIK 結合タンパク質と推定) の同定を LC-MS/MS 法で行う。

[1-2] 研究の方法・経過

多彩な表現型異常をもたらす SIK1,2,3 の機能発現機構を明らかにすることを目的として、SIK 各種に特異的に結合する因子群を網羅的に同定するために、第一段階として分担者・竹田らが構築した 8,300 種ヒトタンパク質アレイ (えひめ・かずさアレイ：転写関連因子群、キナーゼ群などを機能別にほぼ網羅的に含む約 8,300 種のアレイ) を用いた SIK 結合タンパク質の AlphaScreen 法によるスクリーニングを行ったところ (in vitro)、SIK1,2,3 各種に強く結合するヒトタンパク質約 20 種を同定したが、SIK1,2,3 間での大きな違いは認められなかった。しかしながら SIK1,2,3 の各欠損マウスは、各々、異なる多彩な表現型異常を呈している。そこで、本研究では、より in vivo に近い培養細胞内での、各 SIK 種特異的な結合タンパク質を同定するために、愛媛大学・澤崎らにより開発された、近接 (<10 nm) 依存性ビオチン化酵素：AirID を用いて、AirID-SIK 融合タンパク質を培養細胞 (in vivo) に導入し、ビオチン化されるタンパク質 (SIK 結合タンパク質と推定) を LC-

MS/MS 法で網羅的に同定を行なった。

ヒト HEK293A 細胞に、以下の 7 種の発現プラスミドを導入し、導入直後から 30 時間後までの種々の時間帯に、ビオチン添加 (5 μ M) を行った後に、6-24 時間培養後、細胞を回収して細胞抽出液を得た。これらの細胞抽出液を SDS 電気泳動後、Anti-Biotin 抗体と、Anti-ASIA Tag 抗体を用いて、Western Blotting 解析を行った。又、同細胞抽出液は、徳島大学・小迫研究室において、トリプシン分解後、Tamavidin 2-REV-Beads を用いてビオチン化ペプチドを回収し、LC-MS/MS 法でビオチン化タンパク質を網羅的に同定した。

7 種の発現プラスミドの各構成は、以下の通りである。① AGIA-AirID-SIK1、② AGIA-AirID-SIK2、③ AGIA-AirID-SIK3 および、④ SIK1-AGIA-AirID、⑤ SIK2-AGIA-AirID、⑥ SIK3-AGIA-AirID、⑦ SIK インサートのない pcDNA3.1-AGIA-AirID ベクター

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

6 種の AirID 融合 SIK 発現プラスミド (SIK1-AirID, SIK2-AirID, SIK3-AirID, AirID-SIK1, AirID-SIK2, AirID-SIK3) と、対照実験として、pcDNA3.1-AGIA-AirID ベクター (AirID のみを発現) を、HEK293A に導入して、ビオチン化されるタンパク質を Western Blot 法で調べたところ、SIK1,2,3 の N 末端に AirID を接続した AirID-SIK1, AirID-SIK2, AirID-SIK3 の方が、逆の C 末端に AirID を接続した SIK1-AirID, SIK2-AirID, SIK3-AirID に比べて、ビオチン化されるタンパク質量が多かった (図 1)。そこで、以降の実験において、AirID-SIK1,2,3 の順のプラスミドを導入した細胞を用

いて、ビオチン添加後の細胞抽出液をトリプシン分解後、**Tamavidin 2-REV** を用いてビオチン化ペプチドを回収し、**LC-MS/MS** 法でビオチン化タンパク質を網羅的に同定した。その結果、**control** の **AirID** 単独導入に比べて、**AirID-SIK** 融合タンパク質導入時において強くビオチン化されるタンパク質が明らかになった。**AirID-SIK/AirID** のビオチン化量比で **50** 以上のものは、
AirID-SIK1/AirID 比 : **50** 以上 **17** 個
AirID-SIK2/AirID 比 : **50** 以上 **16** 個
AirID-SIK3/AirID 比 : **50** 以上 **11** 個
のタンパク質が同定された。又、これらの **SIK/AirID** 比の高いタンパク質群の中には、**卵巣機能** に関与する同一ファミリーに属する **2** 種のタンパク質 (**X1, X2**) が含まれていた。

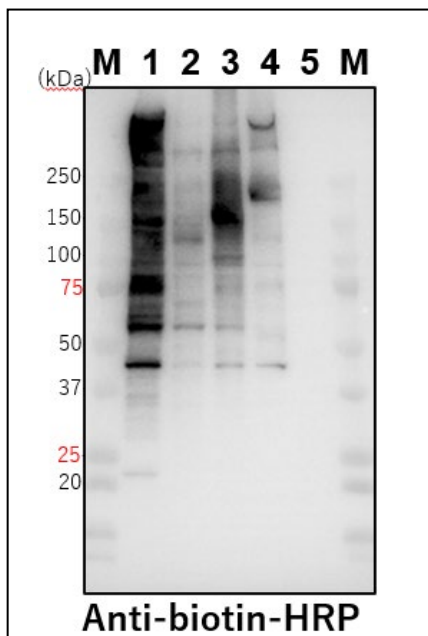


図 1. Western blotting analysis of biotinylated proteins from AirID-, AirID-SIK1-, AirID-SIK2-, and AirID-SIK3- expressing HEK293A cells by anti-biotin-HRP staining.
M: Marker, 1: AirID (biotin addition 24-30h), 2: AirID-SIK1 (biotin addition 24-30h), 3: AirID-SIK2 (biotin addition 24-30h), 4: AirID-SIK3 (biotin addition 24-30h), 5: biotin only added for 18h.

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

SIK2 と **SIK3** は、**卵巣の排卵機能**において、逆の作用を持ち **SIK3** は排卵促進、**SIK2** は排卵抑制に関与する。本研究では **AirID-SIK2** と **AirID-SIK3** 導入時に強くビオチン化されるタンパク質について、**卵巣機能**に関与する同一ファミリータンパク質が **2** 種同定された。一方、これら **2** 種のタン

パク質 (**X1, X2**) は、**AirID-SIK1** 導入時におけるビオチン化の程度は低かった (**X1, X2** 共に **AirID-SIK1/AirID** 比 : **1** 未満)。これら **2** 種のタンパク質が、**SIK2, SIK3** を介する排卵機能に関与するかどうかについて、興味もたれる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後、**SIK** 阻害剤等の添加による **SIK** 結合タンパク質の変動を解析すると共に、結合タンパク質の**卵巣**における局在分布と変動などについて明らかにしていきたい。