

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 の 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。

又、SIK 阻害剤を合成し、本 AirID-SIK 実験系に添加して SIK 結合タンパク質の変動から SIK シグナル伝達系の解析を行う。特に SIK2 阻害による卵巣生殖機能の活性化による不妊治療への臨床応用への展開となることをめざしたい。

[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 (in vitro)。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である AirID を用いて、AirID-SIK 融合タンパク質を HEK293A ヒト培養細胞 (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。

又、本 AirID-SIK 実験系に、SIK 阻害剤を導入することにより、SIK 結合タンパク質の変動を解析する。このため、2024 年度は、既知の SIK 阻害剤 (ARN-3261, ARN-3230, ARN-3236 等) を合成すると共に、新奇の SIK 阻害剤の開発を行っている。

【2】研究成果

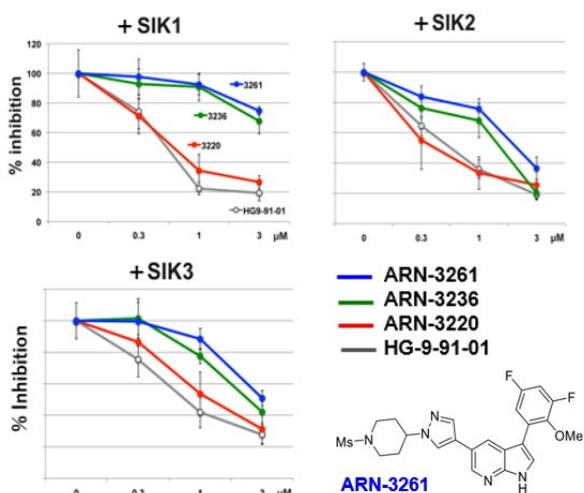
[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

6 種の AirID 融合 SIK 発現プラスミド (①AirID-SIK1, ②AirID-SIK2, ③AirID-SIK3, ④SIK1-AirID, ⑤SIK2-AirID, ⑥SIK3-AirID,) と、対照実験として、pcDNA3.1-AGIA-AirID ベクター (AirID のみを発現) を、ヒト HEK293A 細胞に導入して、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 ①AirID-SIK1, ②AirID-SIK2, ③AirID-SIK3 の方が、逆の C 末端に AirID を接続した ④SIK1-AirID, ⑤SIK2-AirID, ⑥SIK3-AirID に比べて、ビオチン化されるタンパク質量が多かった。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。

一方、SIK2-, SIK3-欠損マウスの解析から、卵巣機能 (排卵) において SIK3 は排卵促進 (欠損マウスは排卵阻害される)、SIK2 は排卵抑制 (欠損マウスは排卵に促進的に機能) に関与することが明らかになった。そこで、SIK2 特異的な阻害剤を開発すれば、女性不妊治療への新たな選択肢が提供されうると考え、現在、明らかになっている数種の SIKs 阻害剤 (ARN-3261, ARN3236, ARN-3220, HG-9-91-01) を合成し、SIKs の機能である転写因子 CREB の転写阻害活性の変動を、CRE-Luc レポーターアッセイにより解析したところ、ARN-3220, HG-9-91-01 添加では、SIK1,2,3 の 3 種を同様に阻害したが、ARN-3261, ARN3236 添加では、SIK2 の阻害活性が強く認められた (図 1)。又、ARN-3261, ARN3236 添加では、SIK1 阻害は認められなかったが、高濃度添加で、ある程度の SIK3 阻害が認められた。

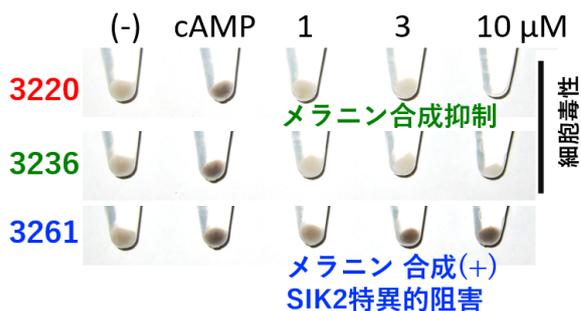
図 1. CRE-Luc レポーターアッセイ、Forskolin(cAMP)添加



又、SIK2 欠損マウスの解析から、SIK2 はメラニン合成を抑制する作用も有することが明らかになっているため、メラニン産生細胞 (B16F10 melanoma cells) で、ARN-3261, ARN3236, ARN-3220 のメラニン合成促進活性を調べたところ、ARN-3261 においてのみ、濃度依存的にメラニン合成が促進された。一方、ARN3236, ARN-3220 では、メラニン合成の促進 (SIK2 活性の阻害) は認められず、又、高濃度添加 (10 μM) で細胞毒性 (細胞死) が認められた。 (図 2)

このことから ARN-3261 の化学構造を基本に、より SIK2 特異的に阻害活性を有する新たな化合物の開発を現在、行っている (ARN-3261 のベンゼン環部位を主に改変)。合成された 2 種の新規

図 2. Inhibition of SIK2 by ARN-3261 promotes eumelanogenesis in B16F10 melanoma cells



ARN-3261 改変化合物 (N-H 及び N-Ms) は、cAMP 添加による CRE-Promoter 活性化の SIK2 共存状態での阻害活性を、抑制した。

[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、SIK3 は排卵促進、SIK2 は逆に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どのように関与するかについて、興味もたれる。

又、SIK3 を阻害せず、SIK2 を特異的に阻害する化合物の開発を行っており、この化合物が開発できれば、SIK2 特異的阻害による卵巣生殖機能の活性化を介する不妊治療への臨床応用への展開となることを期待される。

[3] 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

なし

[4] 今後の課題等

今後、より低濃度で SIK2 を特異的に阻害する化合物を開発すると共に、阻害化合物添加による AirID-SIK 実験系における SIK1-3 相互作用分子の変動を解析していきたい。