

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2022
課題番号：17K09887
研究課題名（和文）質量分析イメージングと標的プロテオミクスによるステロイドホルモン産生異常の解析

研究課題名（英文）Analysis of abnormal steroid hormone production by mass spectrometry imaging and targeted proteomics

研究代表者
秦野 修（Hatano, Osamu）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40164850
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：塩誘導キナーゼ（Salt-inducible Kinases: SIK1,2,3）は、当初、ステロイドホルモン産生に影響を及ぼす因子として単離され、後に多様な表現型異常に関与することが明らかになった。本研究は塩誘導キナーゼ各種に起因する異常をもたらすシグナル伝達機構を明らかにする目的で、SIK1,2,3各種に結合するタンパク質を、ヒトタンパク質アレイからAlphaScreen法によって網羅的な同定を試みた。又、SIK欠損マウスを用いて、ステロイド産生組織である卵巣の排卵機能等におけるSIKの役割を解析し、SIK3は排卵に促進的に、SIK2は逆に排卵機能を抑制していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物におけるステロイドホルモンは、生殖機能、糖代謝、電解質代謝などに関与する。本研究では塩誘導キナーゼ（SIK2,3）欠損マウスの解析により、SIK3欠損が卵巣の排卵機能異常（無排卵や多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）様）に関与することが示された。すなわち、正常な SIK3 は排卵機能に促進的に、又、SIK2 は逆に排卵機能に抑制的に働くことが明らかになった。これら SIK種の違いによる機能発現機構を明らかにするために、SIK各種と相互作用する結合因子の同定を行っており、SIK2, SIK3 の機能阻害や促進による卵巣機能異常/促進に伴う不妊などの治療に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Salt-inducible kinases (SIK1,2,3) were initially isolated as factors affecting steroid hormone production and later shown to be involved in diverse phenotypic abnormalities. In this study, in order to elucidate the signalling mechanism of Salt-inducible kinases, we attempted to comprehensively identify proteins that bind to SIK1,2,3 by AlphaScreen method using human protein arrays. In addition, the role of SIKs in the ovulatory function of the ovary was analysed using SIK2- and SIK3-deficient mice. It was found that SIK3 positively regulates ovulation, while SIK2 conversely suppresses ovulatory function.

研究分野：内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン 塩誘導キナーゼ AlphaScreen コムギ胚芽無細胞タンパク質合成 卵巣 排卵

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、ステロイド産生組織におけるステロイドホルモン類の質量分析イメージング法が開発されて間がない時期であったが、申請者らを含めて、ステロイドホルモン類の Girt 試薬による on-tissue 誘導体化法によって、組織切片上のケトン基を含むステロイドホルモン複数種の同時検出による組織内分布解析が可能となった。又、塩誘導キナーゼは、当初、副腎皮質のステロイドホルモン産生に影響を及ぼす因子として単離されたが、SIK1,2,3 の3種が同定されると共に、ステロイド産生以外にも、糖代謝、軟骨形成、睡眠などの多様な機能に参与することが明らかになった。

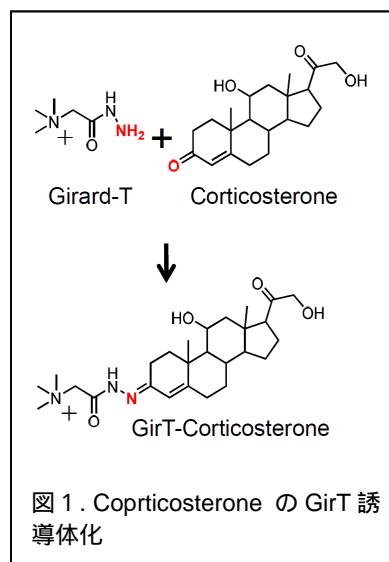
2. 研究の目的

哺乳動物のステロイドホルモンは、主に副腎、卵巣、精巣などで産生され、生殖機能、糖質代謝、高血圧、免疫系などに関与する。塩誘導キナーゼ (SIK1,2,3) は、当初は副腎皮質のステロイド産生に影響を及ぼす因子として単離されたのちに、欠損マウスの作成などから、生殖異常、糖代謝異常、軟骨形成異常、睡眠異常などの多様な機能に参与することが明らかになった。本研究は、塩誘導キナーゼ (SIK) の主にステロイドホルモン産生組織における機能発現機構を明らかにする目的で、塩誘導キナーゼ (SIK) に結合するタンパク質因子を、ヒトプロテインキナーゼ群、転写因子群等から AlphaScreen 法により、ほぼ網羅的な探索を行うと共に、主に卵巣の排卵機能における塩誘導キナーゼの役割に関する解析を行った。

3. 研究の方法と研究成果

ステロイドホルモンの質量分析イメージング

副腎、卵巣、精巣の未固定凍結切片に Girard-T 試薬をスプレーで噴霧して (on-tissue 誘導体化 (図1))、引き続き CHCA マトリックスをスプレーで噴霧した後に MALDI 質量分析機 (Bruker 社 Solarix: 超高質量分解能, 100 万) を用いて 50-70 μ m 間隔で 2 次元レーザー照射スキャンを行い、質量分析イメージング像 (m/z 値 ± 0.001 の精度) を得た。副腎 (ウサギ、ラット、マウス)、卵巣 (ラット、マウス) の Cortisol, Corticosterone, Aldosterone, Progesterone などが、組織切片上での 2 次元分布が検出された。副腎皮質では、Cortisol (ウサギ) は、束状層・網状層に、Corticosterone (マウス、ラット) は、束状層・網状層に検出された。Progesterone は、ウサギ、ラット、マウスともに束状層、網状層に検出された。Aldosterone については存在量が少なく、カリウム誘導されたラットの球状層にのみ検出された。又、マウス精巣ライディッヒ細胞の Testosterone 検出を試みたが、存在量が少ないため検出されなかった。



ヒト SIK1,2,3 の無細胞合成と AlphaScreen 結合アッセイ

えひめかずさプロテインアレイに収録されたヒト SIK1,2,3 cDNA のキナーゼドメイン、および SIK1,2 の全長 cDNA 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、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成を行ない、Western Blot 法で、上記 SIK 分子種の合成を確認した (図2)。又、コムギ胚芽無細胞合成したヒト SIK3 キナーゼドメインをビオチン化した後、約 4,000 種 (当時) のヒトプロテインアレイ (プロテインキナーゼ群、転写因子群等をほぼ網羅的に含み、Flag タグ標識されている) を用いて、AlphaScreen 結合アッセイを行い (図3)、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 (図4)。更にヒト SIK1,2 キナーゼドメインを無細胞合成し、SIK3

キナーゼドメインとの相互作用パターンの比較を行った。又、SIK1,2,3 の全長タンパク質についても同様にコムギ胚芽無細胞タンパク質合成を行い、8,300 種のヒトタンパク質アレイを用いて、AlphaScreen 結合実験を行っている。一方、これらの AlphaScreen 結合実験は *in vitro* で合成されたタンパク質同士の結合アッセイであるため、より生体に近い培養細胞中での SIK1,2,3 結合タンパク質を同定するために、最近、開発された近接依存性ビオチン化酵素(AirID)と SIK1,2,3 との融合タンパク質 cDNA を培養細胞中にトランスフェクションして、SIK1,2,3 に相互作用するタンパク質をより生体に近い状態で同定する準備をしている。

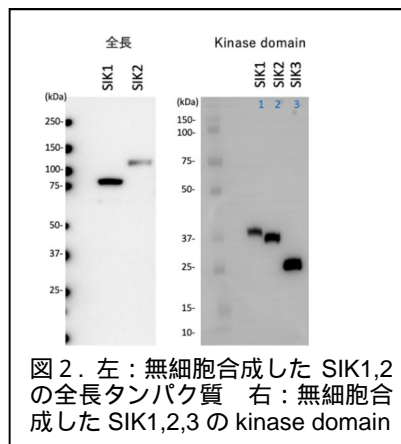


図2. 左：無細胞合成した SIK1,2 の全長タンパク質 右：無細胞合成した SIK1,2,3 の kinase domain

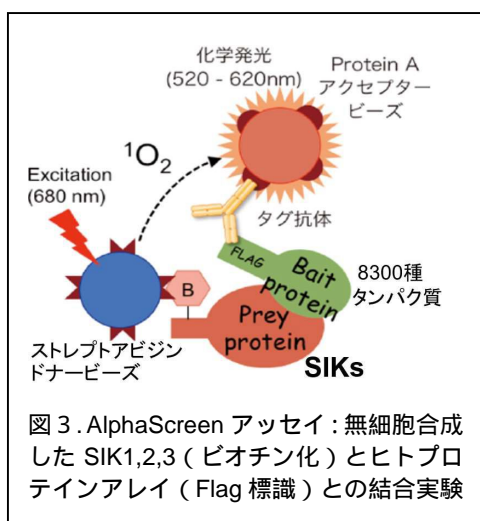


図3. AlphaScreen アッセイ：無細胞合成した SIK1,2,3 (ビオチン化) とヒトプロテインアレイ (Flag 標識) との結合実験

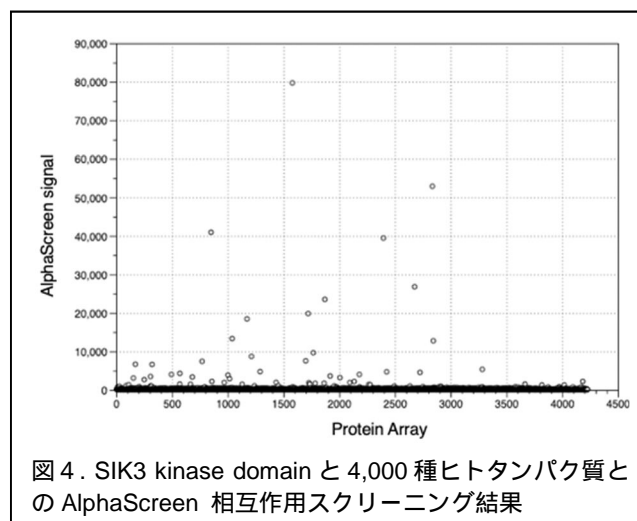


図4. SIK3 kinase domain と 4,000 種ヒトタンパク質との AlphaScreen 相互作用スクリーニング結果

SIK 欠損マウスの卵巣等の解析

卵巣の生殖機能における SIK の役割を探索する目的で、卵巣における 3 種の SIK 種 (SIK1, SIK2, SIK3) の組織内発現を比較したところ、全ての SIK 種の発現を認めたが、各 SIK 種により異なる分布パターンが認められ、卵胞顆粒層細胞では SIK3 と SIK2 は、SIK1 より多量の発現を認めた。又、SIK3 欠損メスマウスは不妊で、その卵巣は野生型マウスの卵巣に比べて小さく (図5) 卵胞内出血がしばしば認められた (図6 右上)。又、黄体の形成を認めず、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)様の組織像であった (図6)。一方、SIK2 欠損マウスメスは、ゴナドトロピン投与による過排卵処理により、野生型マウスの約 3 倍の過排卵数を認めた (約 90 個から最大数 120 個)。これらの結果から、SIK3 は排卵機能に促進的に、SIK2 は逆に排卵機能に抑制的に働いていることが明らかになった。又、SIK2 の機能阻害薬の開発は、不妊治療 (排卵機能の促進) に役立つことが期待される。



図5. SIK3 欠損マウス (右) と野生型マウス (左) の卵巣と子宮

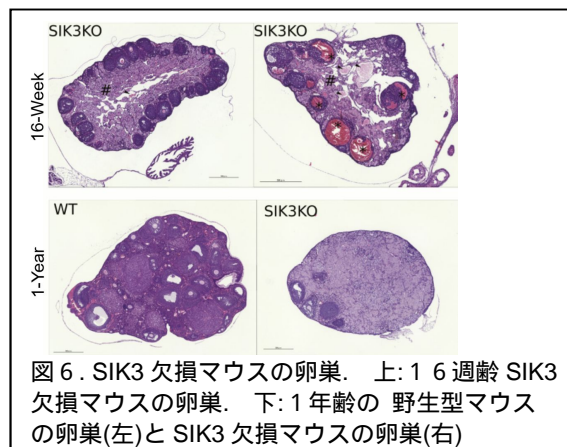


図6. SIK3 欠損マウスの卵巣. 上: 16 週齢 SIK3 欠損マウスの卵巣. 下: 1 年齢の野生型マウスの卵巣 (左) と SIK3 欠損マウスの卵巣 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayazaki M, Hatano O, Shimabayashi S, Akiyama T, Takemori H, Hamamoto A.	4. 巻 34(6)
2. 論文標題 Zebrafish as a new model for rhododendrol-induced leukoderma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pigment Cell Melanoma Res.	6. 最初と最後の頁 1029-1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pcmr.13005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda M, Suzuki M, Takashima S, Sasaki T, Oh-Hashi K, Takemori H.	4. 巻 562
2. 論文標題 The new live imagers MitoMM1/2 for mitochondrial visualization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Marah Armouti, Nicola Winston, Osamu Hatano, Elie Hobeika, Jennifer Hirshfeld-Cytron, Juergen Liebermann, Hiroshi Takemori, and Carlos Stocco.	4. 巻 161(7)
2. 論文標題 Salt-inducible Kinases Are Critical Determinants of Female Fertility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqaa069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeda-H	4. 巻 1868
2. 論文標題 Autoantibody Profiling Using Human Autoantigen Protein Array and AlphaScreen.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 93-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8802-0_10.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Osamu Hatano, Masumi Hayazaki, Akie Hamamoto, Hiroshi Takemori, Hikaru Takaya, Takafumi Shano, Ken Ohnishi, Masaharu Nakamura.
2. 発表標題 CLEM imaging of rhododendrol-induced leukoderma in zebrafish and catalytic oxidation of Japanese cedar wood.
3. 学会等名 ABiS Symposium: Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging, Okazaki, Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秦野 修、磯崎勝弘、竹森 洋、西村裕志、竹田浩之、岩崎哲史、大西 健.
2. 発表標題 ステロイドホルモンの質量分析イメージング解析とラット副腎皮質の再生
3. 学会等名 第1回再生学異分野融合研究会 (岡崎市)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦野 修、磯崎勝弘、竹森 洋、大西 健、岩崎哲史、片桐昌直、川崎英也、一柳優子、荒川隆一
2. 発表標題 SALDIと誘導体化によるステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用
3. 学会等名 第68回イオン反応研究会 / 第157回質量分析関西談話会 / 第6回イオン移動度研究会・合同研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹田 浩之 (Takeda Hiroyuki) (40609393)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹森 洋 (Takemori Hiroshi) (90273672)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	2018-2022年度
研究分担者	大西 健 (Ohnishi Ken) (50152195)	茨城県立医療大学・保健医療学部・教授 (22101)	2017-2021年度
研究分担者	三宅 牧人 (Miyake Makito) (80601400)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Illinois			