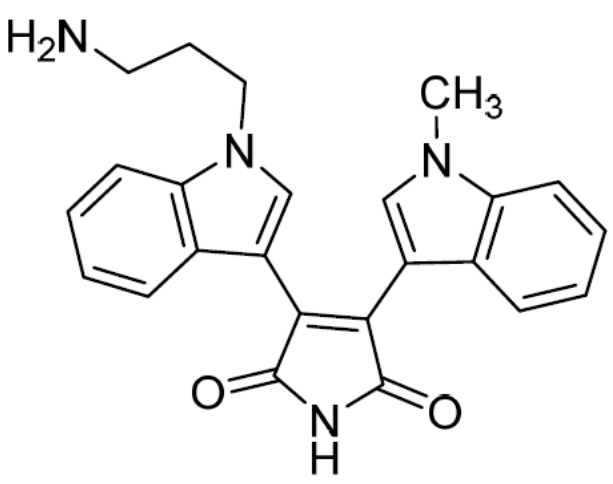


キナーゼ阻害剤の新規標的タンパク質の同定

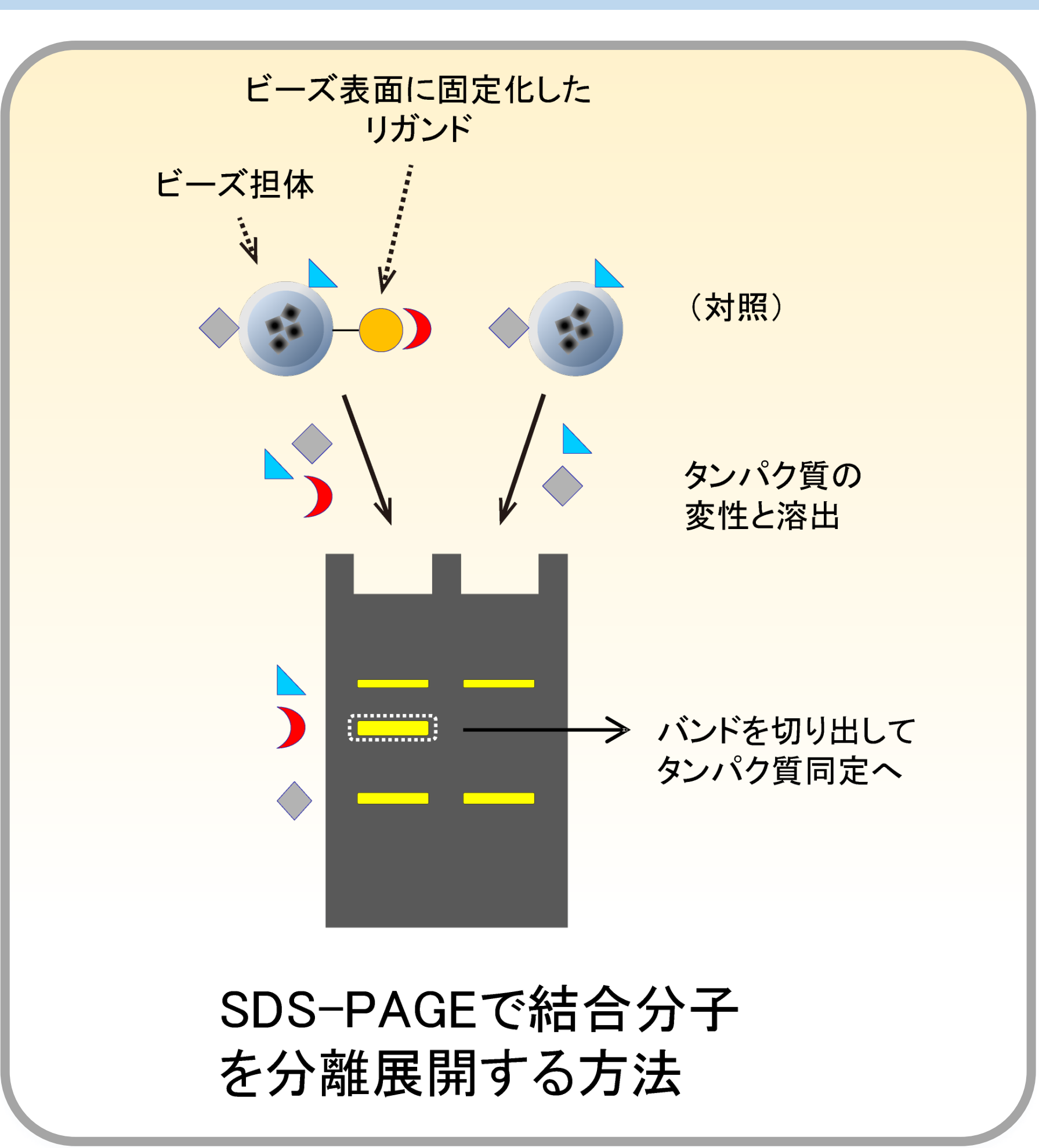
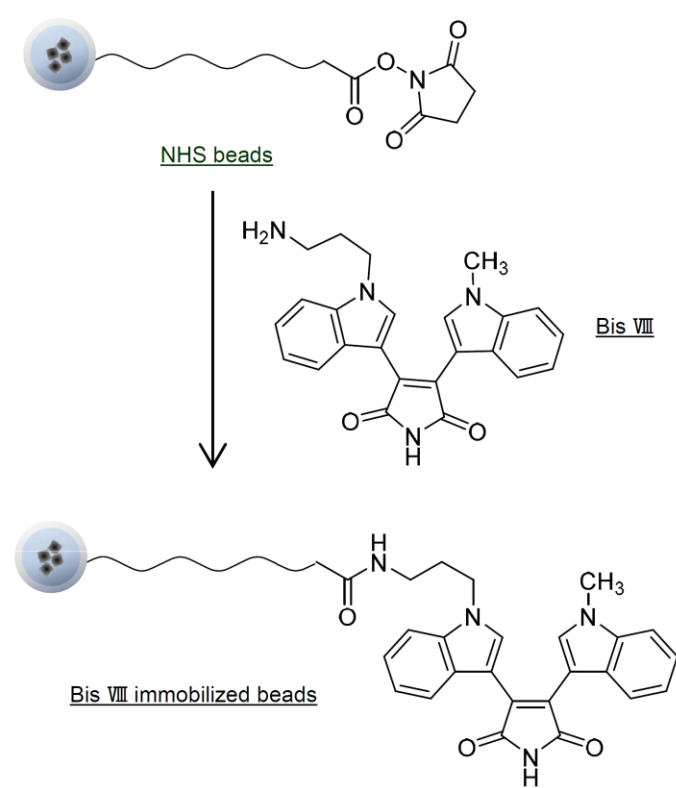
キナーゼ阻害剤 Bisindolylmaleimide VIII (Bis VIII) を FG beads に固定化し、HeLa細胞抽出液から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。精製したタンパク質を2種類の方法でそれぞれ分析しました。アフィニティ精製までは多摩川精機が担当し、それ以降の操作はメディカル・プロテオスコープにて実施しました。

Bisindolylmaleimide VIII

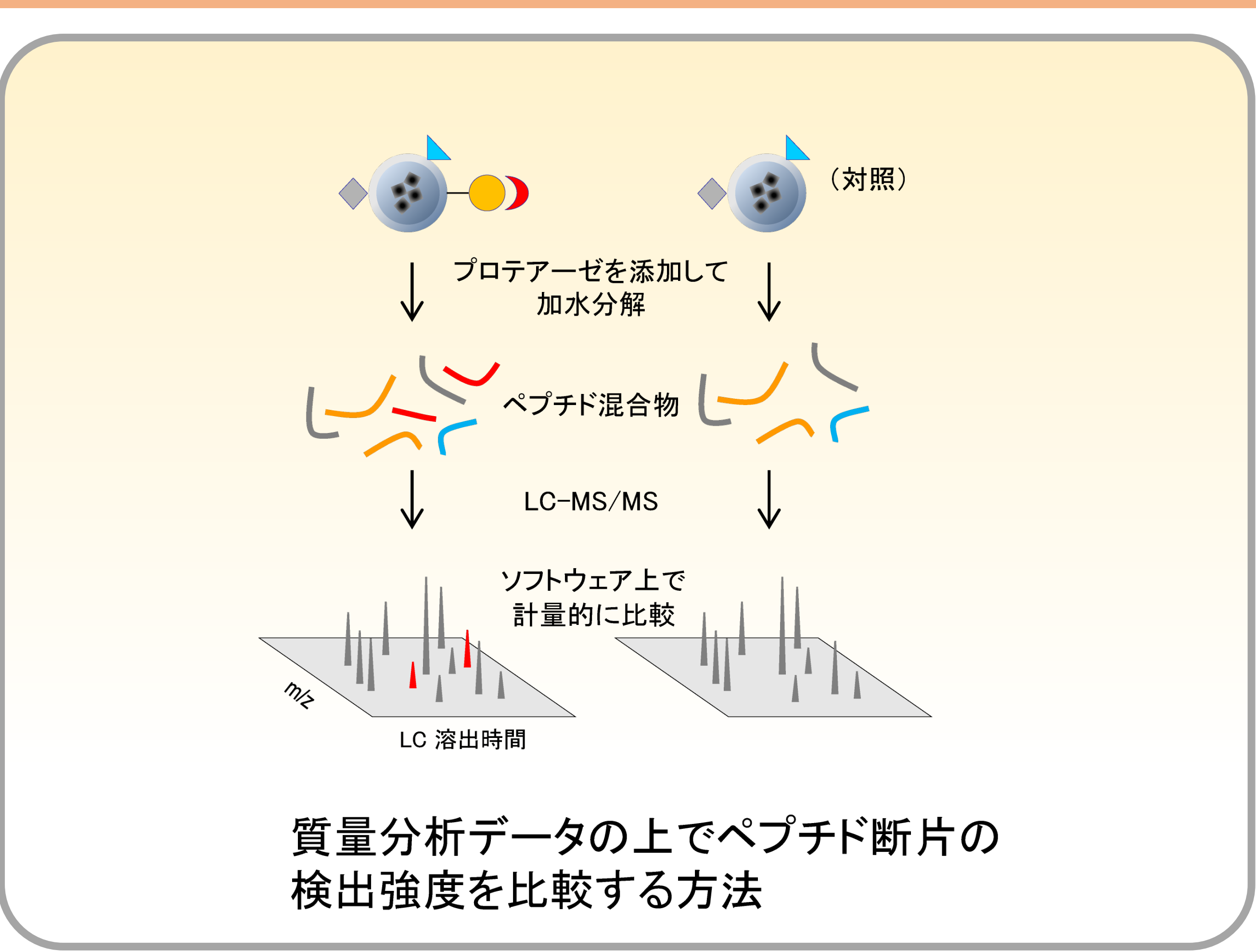


Bisindolylmaleimide VIIIは、プロテインキナーゼC (PKC) の強力な阻害剤として知られています。また、GSK3α/β1、CDK、Rsk3など他キナーゼに対しても阻害活性があることが報告されています。

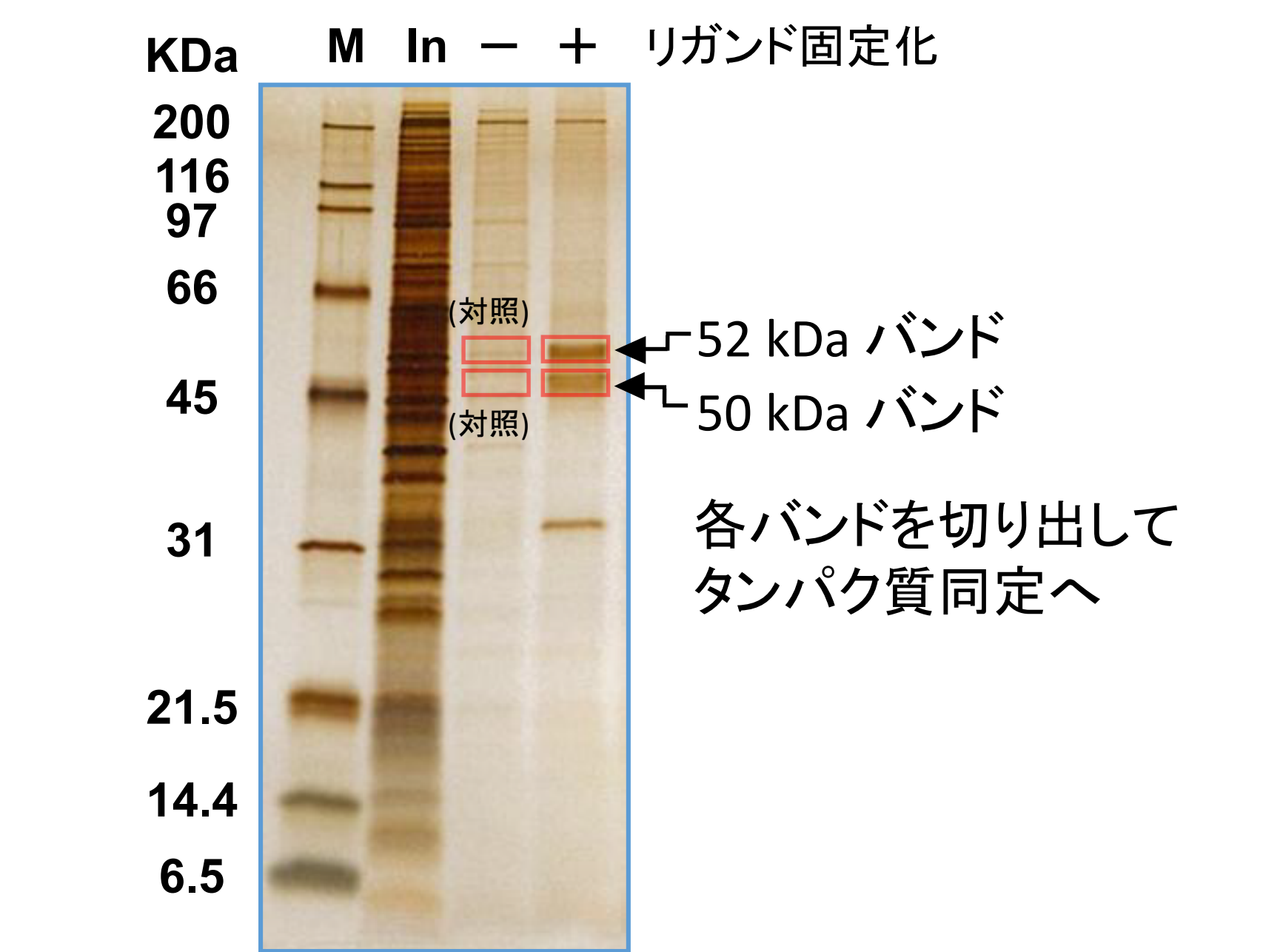
FG beadsへの薬剤の結合



SDS-PAGEで結合分子を分離展開する方法



質量分析データの上でペプチド断片の検出強度を比較する方法



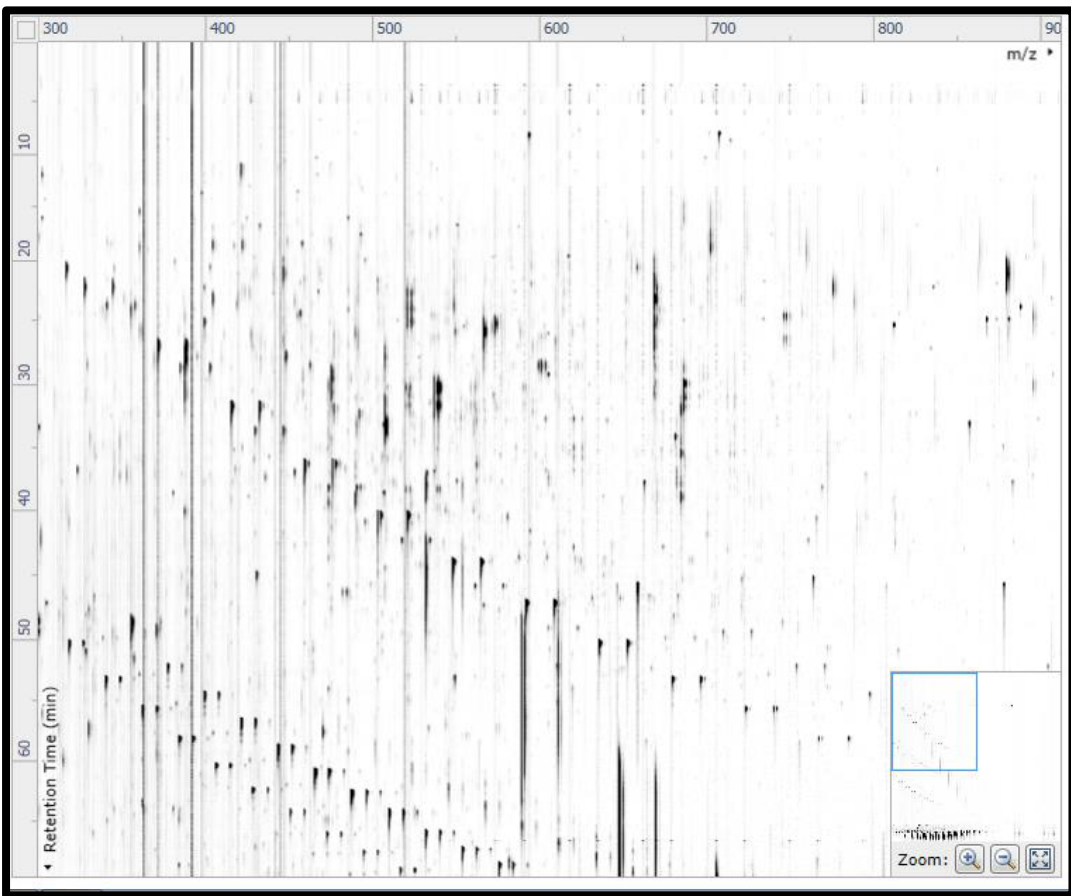
52 kDa バンド

同定タンパク質	分子量 (10 ³)	同定ペプチドの数	
		リガンドあり	リガンドなし (対照)
Glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3α)	51	9	0
Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β)	47	5	0
Tubulin alpha-1B chain	50	3	1
Dermcidin	11	3	3

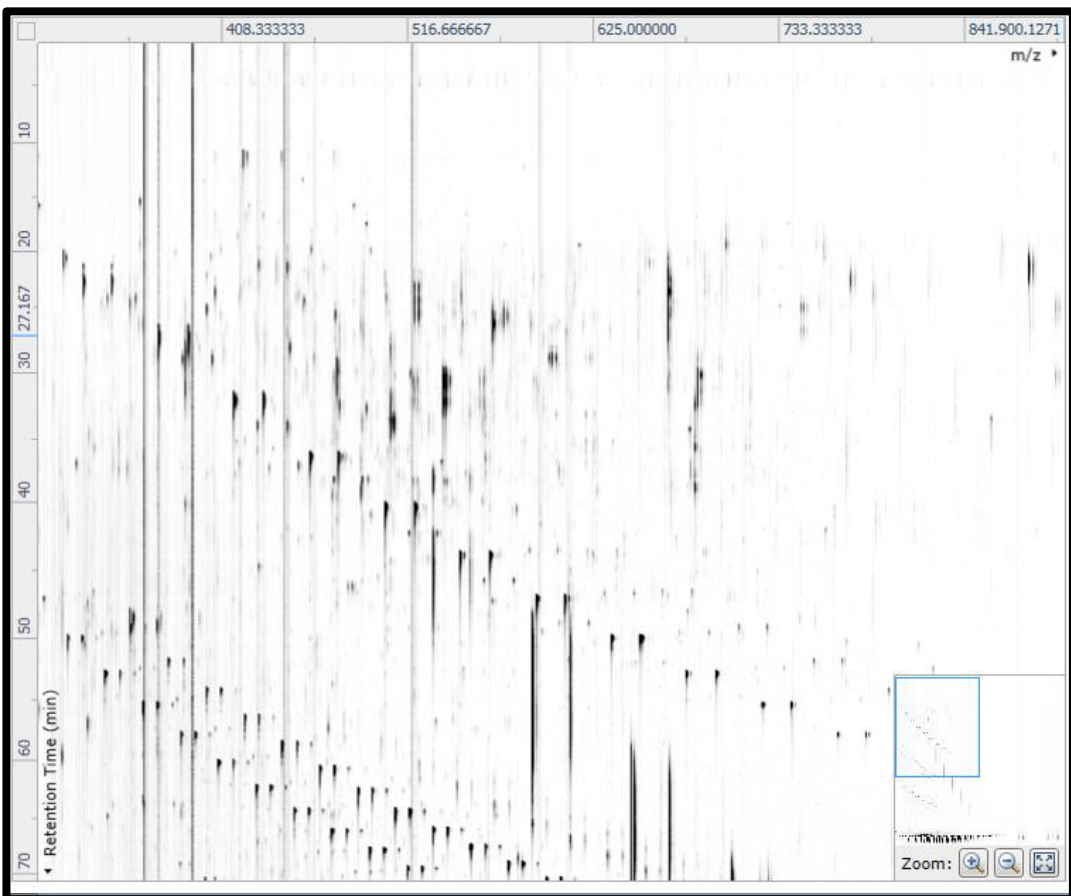
50 kDa バンド

同定タンパク質	分子量 (10 ³)	同定ペプチドの数	
		リガンドあり	リガンドなし (対照)
Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β)	47	14	0
Actin, cytoplasmic 1	42	3	2
Dermcidin	11	2	2
Elongation factor 1-alpha 1	50	2	1
Glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3α)	51	1	0
Desmoplakin	332	0	4

リガンドあり



リガンドなし

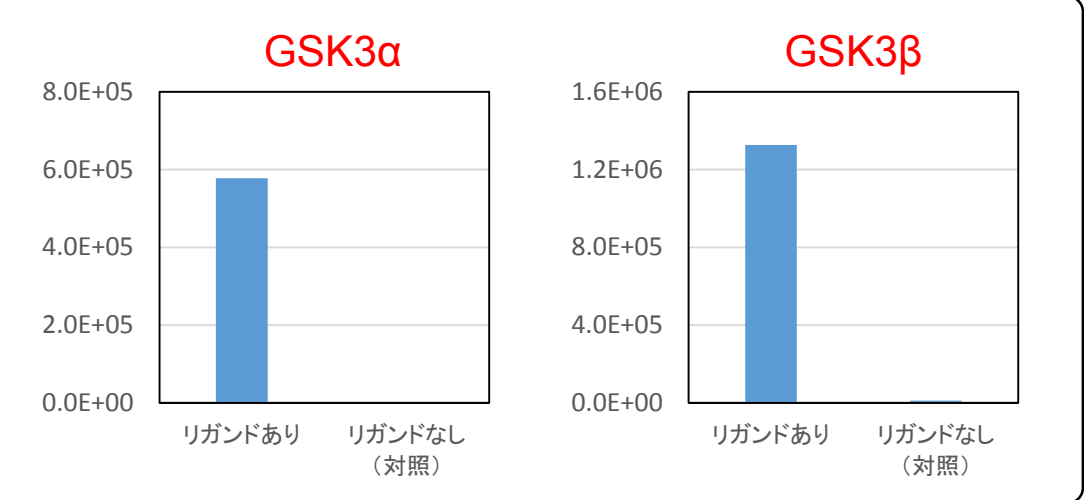


比較

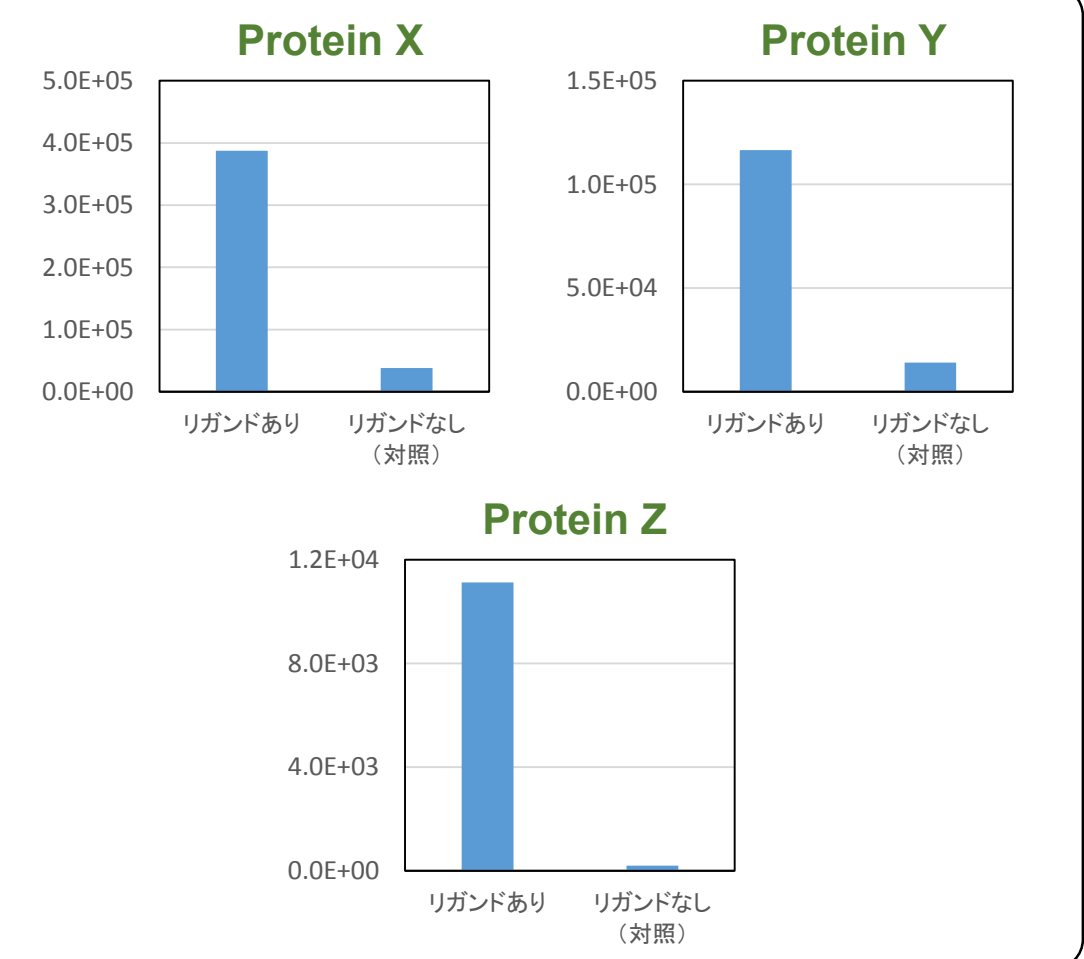
ペプチド分離プロファイル

タンパク質	分子量 (10 ³)	タンパク質の計量値		倍数值
		リガンドあり	リガンドなし (対照)	
Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β)	51	1.3E+06	1.1E+04	118.5
Glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3α)	47	5.8E+05	4.4E+02	1299.9
Secretory carrier-associated membrane protein 3	38	5.0E+05	1.3E+05	3.8
Protein X	37	3.9E+05	3.8E+04	10.1
Protein Y	469	1.2E+05	1.4E+04	8.3
Dermcidin	11	7.1E+04	2.9E+04	2.5
eIF-2-alpha kinase activator GCN1	293	6.3E+04	2.1E+04	3.1
Dynamin-binding protein	177	4.1E+04	1.6E+04	2.5
Uncharacterized protein NCBP2-AS2	11	3.0E+04	1.7E+04	1.8
Fatty acid desaturase 1	52	1.3E+04	3.8E+03	3.5
Protein Z	64	1.1E+04	1.9E+02	58.5
Protein RER1	23	1.0E+04	3.7E+03	2.8
Elongation of very long chain fatty acids protein 1	33	7.8E+03	4.9E+03	1.6
Hornerin	282	2.9E+03	2.0E+03	1.4
Corneodesmosin	52	1.2E+03	9.8E+02	1.2
Fibrinogen alpha chain	95	5.3E+01	2.1E+01	2.5

・既知標的タンパク質



・新規結合タンパク質



2種類のタンパク質バンドからそれぞれ複数のタンパク質が同定されました。対照バンドとの同定ペプチド数の比較によって、52 kDaバンド、50 kDaバンドの主要なタンパク質をそれぞれGSK3α、GSK3βとみなしました。GSK3α、GSK3βはBis VIIIの標的タンパク質としてすでに報告されています。一方、質量分析でイオン検出強度を比較する方法では、一度の解析で16種類の計量情報が得られました。ここから、対照試料の間で検出強度を比較し、タンパク質を5種類まで絞り込みました。このうちの2種類はバンドの分析結果と同じ、GSK3αとGSK3βでしたが、他の3種類は今までに報告のない結合タンパク質でした。新規標的タンパク質の可能性あります。