

第 1 章

PI 3-kinase p85 制御サブユニットと結合する 新規シグナル分子 p125 の同定

<緒言>

これまで我々は、FRTL-5 細胞を長時間 cAMP 処理 (cAMP を生成するホルモン、薬剤、あるいは cAMP アナログで処理することを指す) した際に、分子質量 125kDa のタンパク質 p125 がチロシンリン酸化されること、p85 と結合することなどを明らかにしてきた。

序章でも述べたように、当研究室の福嶋により、抗リン酸化チロシン抗体を用いて p125 の部分精製が試みられた。これまで p125 は非変性条件ではリン酸化チロシン抗体によって免疫沈降することができなかったが、その理由として他のタンパク質との結合などで p125 のリン酸化チロシン部分が覆われ、抗体が認識できないためと考えられていた。そこで、24 時間 Bt₂cAMP 処理した FRTL-5 細胞より、SDS を含む buffer を用いた強い変性条件で細胞抽出液を調製した。次に還元剤 dithiothreitol を加えて煮沸後、N-ethylmaleimide を反応させてチオール基をマスク、分子内共有結合を防いだ。SDS の濃度を希釈操作によって抗原抗体反応を阻害しないレベルまで下げ、抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行った (Fig. 1- introduction A) 後、沈降物を SDS-PAGE に供し、銀染色を行ったところ、p125 と推定されるバンドの検出に成功した (Fig. 1- introduction B)。このバンドを切り出し、ゲル内で還元剤処理とチオール基の修飾を行った後にトリプシンでタンパク質を消化、ゲルより溶出した消化産物のペプチドを質量の違いで分離できる MALDI-TOF/MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) に供したところ、cAMP 処理をしていないコントロールと比較して特異的なピークが検出された (Fig. 1- introduction C)。特異的ピークについて peptide mass fingerprinting (PMF) 解析

を行ったところ、p125 は KIAA1914 (Accession No. XM_217643.2) であることが示唆された (福嶋 博士論文, 2005)。

しかしこの分子は、annotation program によって予測された遺伝子であり、イントロンの配列がエクソンとして含まれている可能性や、全体が偽遺伝子の可能性も残されており、残念ながら完全な同定には至っていない。

そこで本章では、まず p125 を異なる手法で部分精製し、p125 の完全な同定を試みた。すなわち、Bt₂cAMP 24 時間処理した FRTL-5 細胞抽出液より抗 p85 抗体で免疫沈降を行い、共免疫沈降されるタンパク質から p125 を SDS-PAGE で分離、MALDI-TOF/MS による同定を行った。同定結果をもとに p125 の DNA 配列を取得し、エクソン構造の解析を行った。予想されるアミノ酸配列からドメイン構造を予測、系統樹解析から相同分子を抽出、遺伝子ファミリーの推定を行った。その後得られたアミノ酸配列をもとに抗 p125 抗体を作製し、これを用いて p125 の免疫沈降に成功した。更に、この抗体を用いて p125 と p85 との結合と、p125 に結合した PI 3-kinase 活性の検出を試みた。最後に p125 各組織における発現パターン解析を行い、p125 が甲状腺に限らず広範な組織で機能している可能性を示した。

<結果>

第1節 p85 と結合する p125 の MALDI-TOF/MS 法を用いた同定

p85 と共沈降してくる p125 はチロシンリン酸化されていると予想されたが、リン酸化のような電荷を有する修飾を受けたペプチドは MALDI-TOF/MS 法でのピークの検出が困難であり、また非特異的なピークの原因となる。そこでトリプシン消化後に脱リン酸化反応を行った。

Dibutyl cAMP (Bt₂cAMP) を含む培地、あるいは含まない培地で 24 時間培養した FRTL-5 細胞から抗 p85 抗体を用いた免疫沈降物を調製した。また、Bt₂cAMP を含む培地で 24 時間培養した FRTL-5 細胞から非免疫血清 (NIS) を用いた免疫沈降物を調製した。これらの沈降物を SDS-PAGE に供し、銀染色によって沈降したタンパク質を可視化した (Fig. 1-1B)。その結果、Bt₂cAMP 処理した細胞由来の抗 p85 抗体免疫沈降物から分子質量 125kDa のタンパク質が検出された一方で、NIS を用いた免疫沈降物や Bt₂cAMP 処理しなかった細胞由来の免疫沈降物では 125kDa のタンパク質は確認されなかった。この 125kDa の位置のゲルを切り出した後、ゲル内トリプシン消化を行った。ゲルから回収したペプチドを半分に分け、一方のみを脱リン酸化処理し、それぞれ MALDI-TOF/MS に供した。

それぞれ NIS を用いた免疫沈降物由来のペプチドのピーク (data not shown) と比較して、脱リン酸化しないサンプルからは 21 個、脱リン酸化したサンプルからは 13 個の特異的なピークが検出された (Fig. 1-C)。これらピークの m/z 値を MS-Fit にて検索、PMF 解析したところ、脱リン酸化しないサンプルからは 6 個、脱リン酸化したサンプルからは 3 個の m/z 値が KIAA1914 と一致した。同定したピークが帰属するペプチドのアミノ酸残基数に対する KIAA1914 の全アミノ酸残基数の割合は 8.0%であった。

第2節 p125 ラット遺伝子の取得と塩基配列情報の解析

ラット p125 cDNA 配列の決定

KIAA1914 は *in silico* に予測された遺伝子であるため、抗 p125 抗体の抗原部位の決定、配列の種間比較、ドメイン構造推定、siRNA の作製のためにラット p125 の cDNA を取得、塩基配列を決定した。Bt₂cAMP で 24 時間処理した FRTL-5 細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。6 つの増幅産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した。開始コドンは含まないが終始コドンを含む p125 cDNA の 2523bp を決定した。決定した p125 cDNA 配列を XM_217643.2 の DNA 配列と比較したところ、配列の一致しない部分が存在し、XM_217643.2 の DNA 配列にはイントロンと考えられる配列が含まれていることが明らか

となった (Fig. 1-2) 。また、増幅産物のうち 1286-1978bp と 1681-2523bp に由来した配列には、他の増幅産物と比較して一部分が欠失した産物が増幅され、splicing variant であると考えられた。

エクソン構造の解析

決定したラット p125 cDNA 配列を MegaBLAST にて検索し、相同性が認められる p125 遺伝子を含むゲノム配列 (Accession No. NW_047569) をデータベースより取得した。GENETYX にて p125 の cDNA とゲノム配列の相同性検索を行い、エクソン構造を決定した。決定した配列の範囲は開始コドンを含まないが、ラット p125 は 18 個以上のエクソンで構成されることが明らかとなった。また、BLASTN にて示されたマウス p125 cDNA のエクソン構造を Ensembl のサイト Mouse TransView を参考にして決定した。Genbank に登録されたマウス KIAA1914 の複数の cDNA 配列を比較することで、3 種のスプライシングバリエーションが存在することが明らかとなった。これらの mRNA バリエーションからは、3 種類のアイソフォームが生合成されると予測された (Fig. 1-3) 。

ラット p125 の種間比較と種内比較

BLASTN によるラット p125 とマウス、ヒト p125 ホモログとの DNA 配列の相同性はそれぞれ 92% と 82% であった。それぞれの遺伝子座は Table1-1 の通りで、ラット、マウス、ヒトの間で配列が相同な染色体領域に存在し、シンテニーが保存されていた。

決定したラット p125 cDNA 配列に基づいてアミノ酸配列を予測し、BLASTP にて相同性検索を行ったところ、ラット p125 とマウス、ヒト p125 オーソログとのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 92% と 82% であった。他にゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、ニワトリ、イヌ、ウシの 5 種の脊椎動物に p125 オーソログが存在した。

BLASTP にて高い相同性の示された分子について系統樹を作成した (Lennon et al., 1996) 。ラット由来の分子の中でも、p125 オーソログと弱い相同性を示す分子が 2 種類存在した。1 種類は Actin Filament Associated Protein (AFAP) -110 (Accession No. NP_543176) であり、もう 1 種類は Similar to AFAP-110 (Accession No. XP_238021) であった (Fig.1-4) 。

p125 と p125 ファミリーのドメイン構造の予測

マウス p125 DNA 配列をもとにドメイン構造の予測を行った結果、まず 2 つの PH ドメインの存在が予測された。また p125 には 20 個のチロシン残基があり、ラット、マウス、ヒトの p125 の間で保存されていた (Fig. 1-5) 。この中でチロシンリン酸化されると p85 の SH2 ドメインと結合するモチーフと考えられている YXXM 配列の条件を満たしている

チロシン残基は 72 番目のチロシン残基のみだった。他に、141, 142, 475, 477 番目のチロシン残基は AFAP-110 においても保存されており (Fig. 1-6)、AFAP-110 の場合はいずれもチロシンリン酸化を受けることが報告されている (Guappone et al., 1998)。中でも 142 番目と 475 番目のチロシン残基は SH2 ドメインと結合するモチーフといわれている Y-E/D-E/D- Ψ 配列を満たしていた。他に、C 末端側に AFAP-110 と相同性の高い領域 coiled-coil ドメインが存在した。また、116-122 番目の残基が Proline-rich region と予測された。

第 3 節 p125 と結合する PI 3-kinase 活性の確認

抗 p125 抗体の作製

ラット p125 アミノ酸配列をもとに抗体を作製することにした。免疫沈降や免疫染色に適した抗体を作製するためには、タンパク質が立体構造を形成している際に表面に露出した部分のペプチドを抗原に選択する必要がある。まず、疎水性アミノ酸残基はタンパク質内部に、親水性アミノ酸残基が表面に位置する可能性が高いことから、Kyte-Doolittle 法によって親水性領域を予測した。またターン構造をとる部分が表面に露出する可能性が高いため、Chou-Fasman 法によってタンパク質の二次構造予測を行った。これらの予測には GENETYX を用い、surface probability については SCANSITE を参考にした (data not shown)。以上の結果から、p125 の C 末端部分の配列が最も良い候補と判断した。

さらにラットだけでなくマウスやヒトの p125 とも反応する抗体を作製するために、この C 末端部分の 20 残基 NH₂-VTGKGTVLQKAKEWEKKG AS-COOH について種間配列を比較したところ、ラット、マウス、ヒトで全て一致した。またこの配列は、p125 以外の分子と高い相同性を示さなかったため、p125 特異的抗体を作製できると期待された。

作製したウサギポリクローナル抗体が、Bt₂cAMP 処理に応答してチロシンリン酸化した p125 を検出し p85 を共沈降してくるか、免疫沈降と immunoblotting によって検討した。Bt₂cAMP を含む、あるいは含まない培地で 24 時間培養した FRTL-5 細胞から細胞抽出液を調製し、作製した抗体を用いて免疫沈降を行った。この際、抗原ペプチドを抗血清と予め反応させ、細胞抽出液中のタンパク質が抗体と結合するのを中和したものをネガティブコントロールとした。免疫沈降物と、免疫沈降前と沈降後の細胞抽出液を SDS-PAGE に供し抗リン酸化チロシン抗体あるいは抗 p85 抗体で immunoblotting した。その結果、125kDa の位置にチロシンリン酸化されたバンドを特異的に免疫沈降することに成功した。また、p125 免疫沈降物に p85 を検出することができた。中和抗体では 125kDa のチロシンリン酸化されたバンドを沈降することができず、また p85 を共免疫沈降することができなかった (Fig. 1-7A)。

続いて、Bt₂cAMP を含む、あるいは含まない培地で培養した FRTL-5 細胞から細胞抽出

液を調製し、抗 p85 抗体を用いて免疫沈降した際に、p125 が共沈降されるか検討した。作製した抗体を用いた immunoblotting により、Bt₂cAMP で処理した時にのみ、共免疫沈降物中に 125kDa のタンパク質が検出された (Fig. 1-7B)。

p125 免疫沈降物に含まれる PI 3-kinase 活性の測定

次に、TSH を含む培地、Bt₂cAMP を含む培地、これらを含まない培地で 24 時間培養した FRTL-5 細胞から細胞抽出液を調製し、それぞれ抗 p125 抗体を用いて免疫沈降した。Bt₂cAMP、TSH 処理によって p125 のタンパク量とチロシンリン酸化量が増加した。p125 のチロシンリン酸化量を反映して、p125 と共免疫沈降される p85 の量も増加した (Fig. 1-8A)。

更に、p125 免疫沈降物の PI 3-kinase 活性を測定した。Bt₂cAMP、TSH 処理共に何も処理しなかった場合と比較して有意に PI 3-kinase 活性が上昇した (Fig. 1-8B)。

第 4 節 p125 発現組織の解析

生後 3 ヶ月の成体オスラットより total RNA を抽出し、RT-PCR を行なって p125 の発現組織の解析を行った。p125 は甲状腺の他に心臓、脾臓、腎臓、小腸、精巣で発現していた。更に、肺でも弱く発現が観察された (Fig. 1-9A)。

また、本研究グループで頻繁に用いている各細胞株における p125 の発現を検討した。RT-PCR により、3T3-L1 脂肪細胞で発現が確認されたが、L6 筋管細胞では発現が認められなかった (Fig. 1-9B)。

<考察>

p125 の同定

本章において、まず p85 に結合した p125 を MALDI-TOF/MS によって同定した。p125 を同定する方法として、cAMP 処理によって p125 がチロシンリン酸化されていることを当研究室の福岡は利用した。すなわち抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降し、p125 のバンドを抽出、MALDI-TOF/MS と PMF 法により p125 を同定した (Fig. 1-introduction)。これに対し、本研究では cAMP 処理によって p125 が p85 と結合することを利用し、抗 p85 抗体を用いて免疫沈降し、p125 を精製した。その後は MALDI-TOF/MS と PMF 法により p125 を同定し、福岡の結果と同様に p125 が KIAA1914 であることを支持する結果を得た (Fig. 1-1)。

KIAA1914 が p125 であることをタンパク質化学的に検証するためには、少なくとも cAMP 経路の長時間刺激に応答して、1) 分子質量が 125kDa 付近のタンパク質がチロシンリン酸化され、2) そのチロシンリン酸化 p125 が p85 と結合し、同時に 3) p125 と結合する PI 3-kinase 活性が検出されることが必要である。そこで KIAA1914 に対する抗体を作製し、その免疫沈降物について解析した。

その結果、cAMP 処理した FRTL-5 細胞の抽出液より、作製した抗体を用いて免疫沈降された 125kDa のタンパク質はチロシンリン酸化され、p85 と共免疫沈降した (Fig. 1-7A)。この際に抗 p85 抗体を用いて免疫沈降すると、同様に cAMP 処理に応答して KIAA1914 を検出することができた (Fig. 1-7B)。このような共免疫沈降を反映して、p125 免疫沈降物は PI 3-kinase 活性を有していた (Fig. 1-8B)。以上の結果から、KIAA1914 は我々がこれまでに得ている情報に基づく p125 の条件を少なくとも満たしており、p125 が KIAA1914 であると結論した。

Fig. 1-8A に示した結果からは、細胞内で cAMP 濃度を上昇させる TSH 刺激によって、cAMP アナログ刺激の場合と同様に p125 がチロシンリン酸化されること、p125 と p85 の結合量が増加することを示すことができた。

p125 遺伝子構造

ラット KIAA1914 の cDNA 配列はデータベースに存在せず、XM217643.2 の配列は annotation program によってゲノム配列からエクソン構造を予測した遺伝子に過ぎない (Lennon et al., 1996)。正確な p125 の cDNA 配列情報は、特異的抗体の作製、タンパク質ドメイン構造の推定、siRNA の設計のために欠かせない。そこで p125 に対する RT-PCR と塩基配列の決定を行った。解読した p125 cDNA 配列と XM_217643.2 の配列を比較して、

XM_217643.2 の配列には数多くのイントロン配列がエクソンとして登録されていることが明らかとなった (Fig. 1-2) 。これは、KIAA19114 の予測方法と同じプログラムによって多くの遺伝子が Genbank に予測登録されているが、正確な配列は cDNA を解析して取得しなければならないことを示している。

ラット p125 とマウス p125 のエクソン構造を比較すると、15 個のエクソン構造が完全に一致していた (data not shown) 。また、ラット p125 において 2 ヶ所の splicing variant が見出されたが、12 番目のエクソンについては配列が挿入された mRNA が alternative splicing であること、14 番目のエクソンについては配列が挿入されていない mRNA が alternative splicing であることが明らかとなった。

マウス p125 のエクソン構造解析からは新たな splicing variant が示されたが、開始コドンの位置から大きく 2 種類に分けることができる。最初のエクソンに存在する開始コドンから翻訳される全長型 p125 を発現する場合と、全長 p125 で数えて 74 番目のメチオニン残基から翻訳される欠失型 p125 を発現する場合である (Fig. 1-3) 。p125 ドメイン構造の予測結果と併せて考えると、後者の欠失型タンパク質は特に 72 番目の YXXM モチーフを構成するチロシン残基を欠いている。従って欠失型 p125 は全長型 p125 と競合し、PI 3-kinase 活性化に対して dominant negative 体に働く可能性がある。あるいは PI 3-kinase 活性化以外の役割を 2 章で推定する AFAP-110 のような機能を担っている可能性も考えられる。欠失型 p125 の役割を明らかにするためには、タンパク質の強制発現による全長型 p125 との競合阻害実験と、内在性欠失型 p125 の発見と解析を待たねばならない。

このような p125 の発現機構を明らかにするために、マウスとヒトの p125 遺伝子の上流の DNA 配列を TFsearch によって解析し、p125 の発現を誘導するエンハンサー領域を探索した。cAMP 処理によって p125 タンパク量が増加することから、cAMP responsible element (CRE) が重要なのではないかと考えたが、CRE を含め、マウスとヒトの間で保存されたエンハンサー領域は発見できなかった。

p125 の推定アミノ酸配列情報に基づいた分子進化とドメイン構造の推定

p125 の配列相同性解析の過程で、p125 の種間保存性と family を形成していると考えられる類似分子が発見された (Fig. 1-4) 。p125 はヒトなど哺乳類、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュといった爬虫類以外の脊椎動物に存在した。そして同一の動物種由来の配列で p125 と相同性を示す分子 AFAP-110 (Flynn et al., 1993) と Similar to AFAP-110 が存在した。これら p125 に相同な分子は配列が互いに異なっており、p125 は 2 種類の分子と family を形成していると考えられた。いずれも 2 つの PH ドメインが保存されていることから、脊椎動物に進化した後に p125 family の祖先遺伝子を一つ獲得し、3 種の p125 family 分子が分かれ、その後魚類と両生類が分かれたと考えられる。しかし YXXM

モチーフを有するのは p125 のみであり、PI 3-kinase を活性化する役割は p125 family が分岐した後に獲得した機能かもしれない。

p125 に予測された構造として、72 番目のチロシン残基の他に、AFAP-110 において Src によってリン酸化されるチロシン残基 (Guappone and Flynn, 1997; Guappone et al., 1998) が p125 にも保存されていた。また Proline-rich domain として機能しうる配列が存在するため、Src の SH3 ドメインと相互作用する可能性も考えられる (Fig. 1-7, 8)。Src キナーゼと p125 との関係については次章で検討する。Similar to AFAP-110 タンパク質では 475, 477 番目のチロシン残基に相当する残基は保存されていたため、これらのチロシン残基の役割は各 p125 family に共通のものかもしれない。しかし 141, 142 番目に相当する残基は SH2 結合モチーフの YYEEA のみが保存され、その前後の配列は保存されていないため、機能しているかどうか不明である。

この他に p125 の C 末端側には AFAP-110 と高い相同性を有する coiled-coil ドメインが存在する。AFAP-110 では、このドメインは F-actin との結合と、ホモ二量体化の役割が報告されている (Qian et al., 1998, 2004)。しかし p125 では、AFAP-110 では二量体化に重要ではないかと考えられるロイシンジッパー様の構造が p125 では保存されていないため、二量体化はおきないと考えている。F-actin との結合については次章で検討する。

p125 の発現組織分布と各組織での役割

ここまで述べてきたように p125 は甲状腺由来細胞である FRTL-5 で発見され、FRTL-5 の細胞抽出液を用いて同定された。しかし p125 が甲状腺でのみ発現し、TSH の刺激を受けて甲状腺特有の機能のみ担うのか、それとも他の組織で、他の刺激によっても機能を発揮する普遍性のある分子なのかを知るために、RT-PCR によって様々な組織での p125 の発現を調べた (Fig. 1-9)。p125 の発現は広範な組織で観察され、いろいろな臓器で多様な役割を有していると考えられた。RT-PCR で明らかにした生後 3 ヶ月のオスラット以外での p125 の発現情報を明らかにするために、p125 の同一遺伝子と考えられる相同配列の発現情報と、UniGene にて p125 と同一遺伝子として登録された EST の発現情報を、データベースより取得して Table 1-2 にまとめた。これまで明らかでなかった発生段階の組織でも p125 が発現しており、発生においても p125 が重要な役割を果たしている可能性を示した。また脳や後根神経節といった神経系においても p125 が発現していた。これまで p125 の生理作用として DNA 合成の増強が示唆されてきたが、細胞の増殖頻度が低い神経系で p125 が発現していることは新たな生理作用の存在を示唆している。

p125 の機能解析を行うためには、FRTL-5 細胞以外のモデル細胞が必要と考え、本研究グループで汎用している細胞株での p125 の発現を検討した。このうち、3T3-L1 脂肪細胞では TSH 処理によって 125kDa のタンパク質がチロシンリン酸化されることが既報にて示

されていたが (Bell et al., 2002) 、本研究により p125 の発現が確認されたことから、既報のチロシンリン酸化タンパク質が p125 と同一である可能性がある。ただし 3T3-L1 は FRTL-5 と同じく遺伝子導入が困難であるため、p125 を外部から導入して解析するためには適当な細胞ではない。そこで遺伝子導入の容易な細胞について更に検討した。L6 筋管細胞の他、immunoblotting により 293T 腎線維芽細胞、MCF7 乳腺細胞、CHO 卵巣線維芽細胞の p125 の発現解析を行ったが、いずれの細胞でも内在性 p125 は発現していなかった (data not shown) 。したがって、これらの細胞は p125 を強制発現して性質を調べる *in vitro* 解析に用いることができると考えた。

本章で得られた結果をまとめると、長年我々が同定を試みてきた p125 は KIAA1914 であることを証明した。p125 の配列情報を解析することでタンパク質のドメイン構造を予想し、また PI 3-kinase 活性化能を持たない欠失型バリエーションの存在を示唆した。そして p125 は様々な組織で発現しており、普遍的な役割を担っている可能性が考えられた。

Table1-1 p125遺伝子の種間比較

	rat	mouse	human
ratとの相同性	—	92%	82%
遺伝子座	1q55	19D2	10q25.3
遺伝子の長さ	36.8k-	95.9k	109.93k

Table1-2 GenBankに登録されたp125の発現組織情報

ラットp125 cDNA配列をBLASTNで検索し、高い相同性 (expect) を示したため同一遺伝子と考えられた配列の発現情報を記した。

species	Accession No.	expect	tissue	developmental stage
mouse	AK048649	2196	head cDNA	16 days embryo
mouse	AK220430	2189	brain	fetal
mouse	BC031515	2189	infiltrating ductal carcinoma.	5 month old
mouse	AK087449	2181	eyeball	0 day neonate
human	BC033212	1544	pancreas, epithelioid carcinoma	
human	AK027470	1544	teratocarcinoma	
human	BC024314	1544	pancreas, epithelioid carcinoma	
mouse	AK053222	1334	lung	0 day neonate
human	AK123108	1233	cerebellum	
human	BC016403	763	anaplastic oligodendroglioma	
mouse	AK087809	365	ovary	2 days pregnant adult
human	BC035713	256	ovary	adult
human	AB067501	202	brain	
macaque	AB168393	194	adult testis	

rat Unigeneで同一遺伝子として登録されていたEST配列の発現情報を記した。

Accession No.	tissue	developmental stage
AW144024	embryo	8, 12, 18 days embryo
CB581141	Chung Model Ipsilate	
CO383322	ovary	8 weeks
BG672071	dorsal root ganglion	adult
CB703436	placenta	17 days embryo
CV108959	placenta	21 days of pregnant

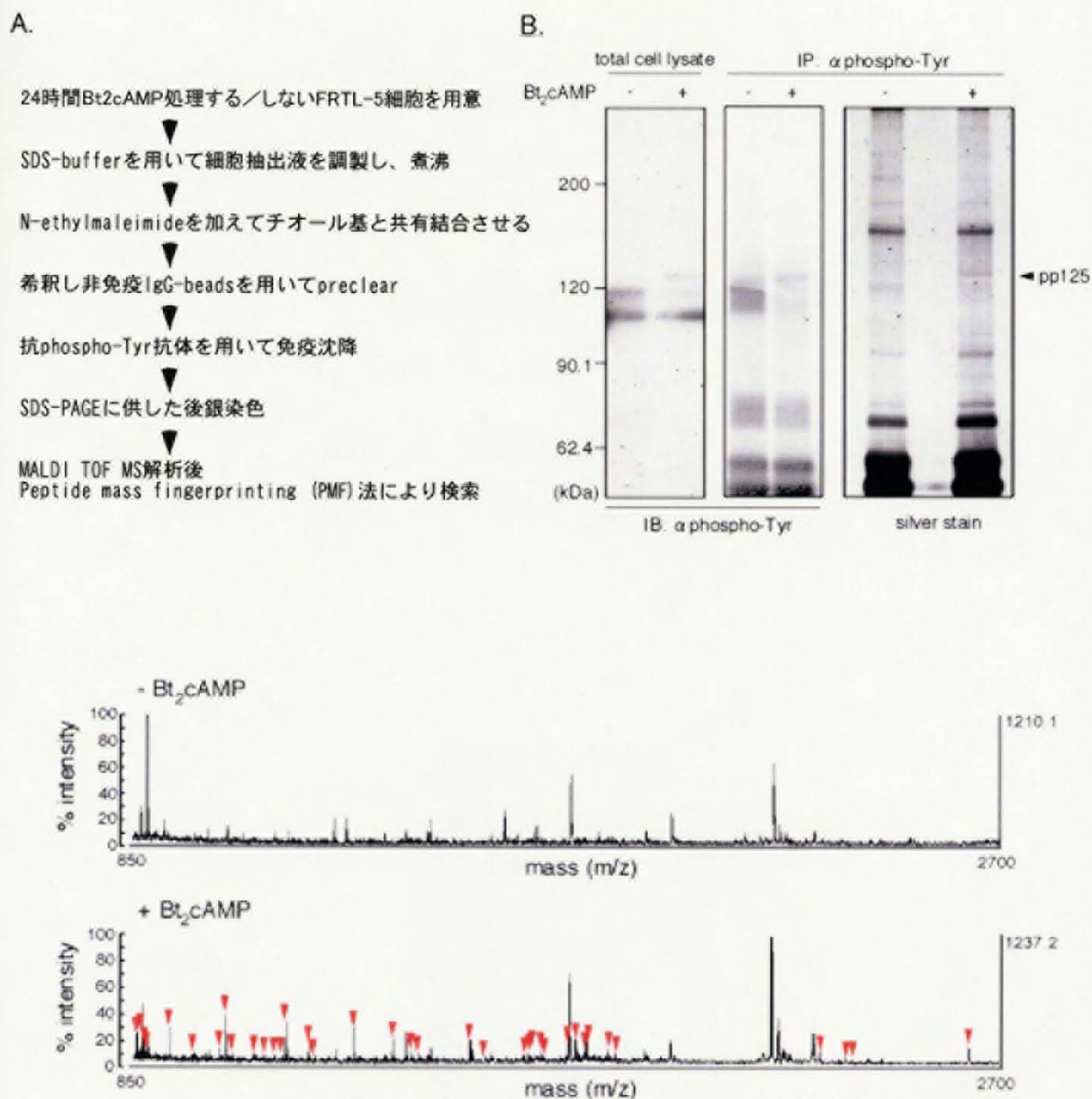


Fig. 1-introduction 抗リン酸化チロシン抗体を用いたp125の免疫沈降とPMF法による同定

FRTL-5細胞の処理方法からPMF法に至るp125の同定の手順(A)に従って全細胞抽出液(左)、抗リン酸化チロシン抗体を用い免疫沈降したもの(中)、抗リン酸化チロシン抗体を用い免疫沈降し、銀染色を行った(右)(B)。(B)で銀染色されたp125、およびBt₂cAMP処理しないサンプルから同様の泳動度のゲル片を切り出し、脱染色後トリプシン消化しMALDI-TOFMSのサンプルに用いた。Bt₂cAMP処理したサンプルでのみ検出されたピークを赤い矢印で示した。得られたMSデータを用い、MSCOT、およびMS-Fitによるデータベースサーチを行った。

A.

24時間Bt₂cAMP処理する／しない
FRTL-5細胞より細胞抽出液を調製
▼
抗p85抗体を用いて免疫沈降
▼
SDS-PAGE、銀染色による検出・切り出し
▼
トリプシンによるゲル内消化と産物の抽出
▼
抽出物を二分割し、半分をホスファターゼ処理
▼
それぞれをMALDI-TOFMS解析
▼
得られた特異的ピークを併せてPMF法により検索

B.

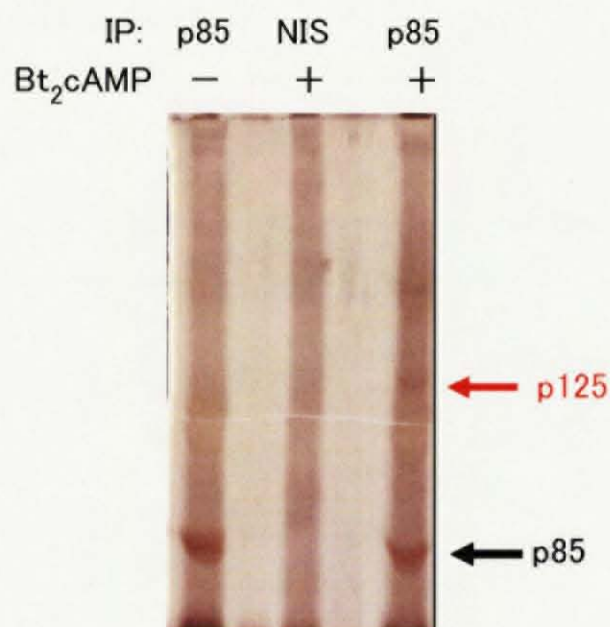
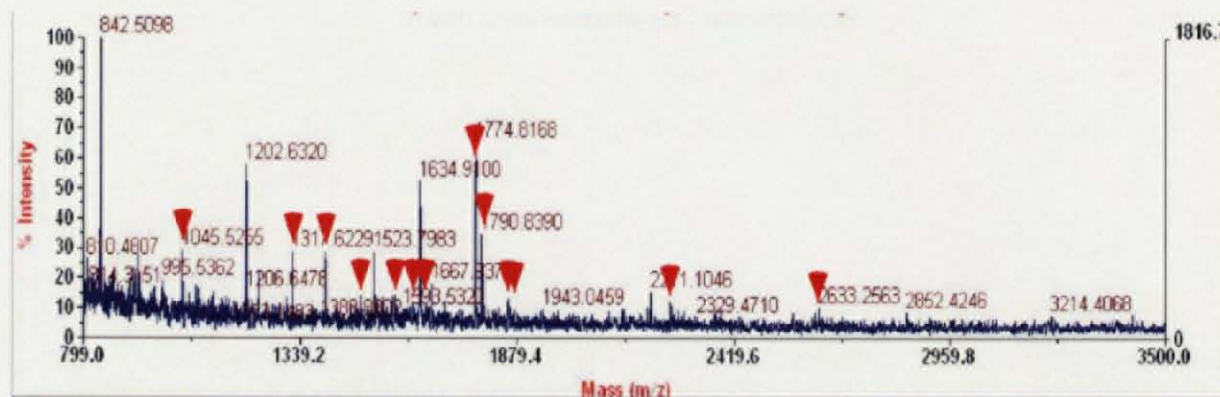


Fig. 1-1 抗p85抗体を用いたp125の共免疫沈降とPMF法による同定 (続く)

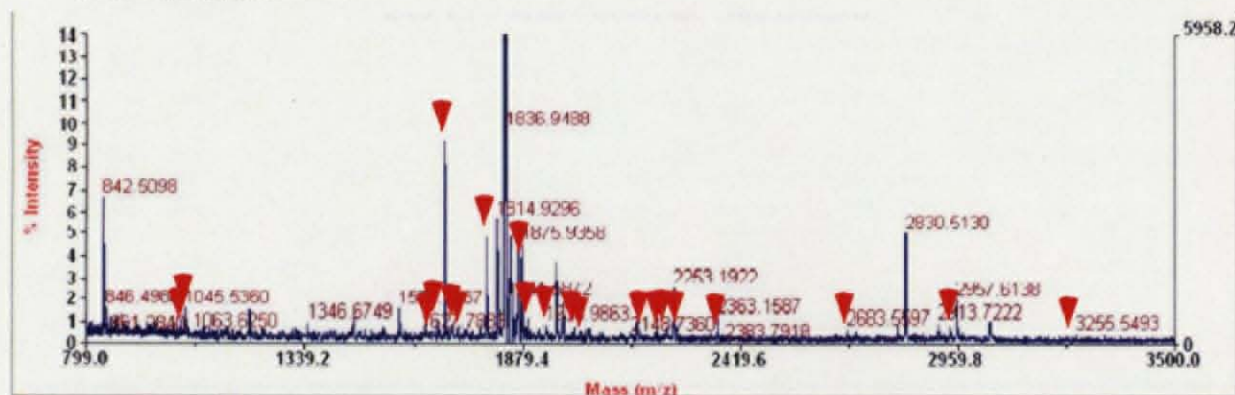
Fig.1-introductionにて示した方法とは異なり、抗p85抗体を用いたp125の同定の手順 (A)。 (A) に従って調製し、銀染色を行った。対照としてBt₂cAMPを含む培地で培養したFRTL-5細胞より調製した細胞抽出液を非免疫血清 (NIS) を用いて免疫沈降を行った (B)。

C.

脱リン酸化処理 -



脱リン酸化処理 +



D.

Acc. #: 34864550 Species: RATTUS NORVEGICUS Name: similar to expressed sequence AU041783

Index: 1842748 MW: 121310 Da pI: 5.6

9/34 matched peaks (26%). sequence cover : 8.0% (88/1094AA's) of the protein

m/z Submitted	[M+H] ⁺ Matched	Delta Da	Modifications	Start	End	trypsin Missed Cleavages	Sequence
1045.5255	1045.5061	0.019		337	344	0	(K)DQAEQWLR(V)
1045.5360	1045.5061	0.030		337	344	0	(K)DQAEQWLR(V)
1045.5255	1045.6252	-0.100		833	842	1	(R)VTSAEIKLGK(N)
1045.5360	1045.6252	-0.089		833	842	1	(R)VTSAEIKLGK(N)
1317.6229	1317.5971	0.026		543	552	0	(R)DSLHIFYQDR(N)
1400.8053	1400.7856	0.020		794	805	1	(R)VTTVKLQAEQQR(I)
1700.7667	1700.8887	-0.120	1Met-ox	1075	1090	1	(K)VMDLADNPAPVKSSIK(Q)
1717.8467	1717.9384	-0.092		1026	1041	1	(K)VKAGDPVTVFTHPPR(A)
1773.8190	1773.8290	-0.010	pyroGlu	778	793	0	(R)QPEGQEPSEPIEPTPR(V)
1773.8681	1773.8290	0.039	pyroGlu	778	793	0	(R)QPEGQEPSEPIEPTPR(V)
1790.8390	1790.8555	-0.017		778	793	0	(R)QPEGQEPSEPEEPTPR(V)

Fig. 1-1 抗p85抗体を用いたp125の共免疫沈降とPMF法による同定 (続き)

(B) で銀染色されたp125、および対照から同様の泳動度のゲル片を切り出し、脱染色後トリプシン消化し抽出したペプチドの半量を脱リン酸化処理した後処理しないペプチドと共にMALDI-TOFMSのサンプルに用いた。それぞれBt₂cAMP処理したサンプルでのみ検出されたピークを赤い矢印で示した (C)。得られたMSデータを用いMS-Fitに入力、PMF法解析を行った。Met-ox: メチオニンの酸化、pyroGlu: ピログルタミン酸 (D)。

```

rat p125      0 ----- 0
XM_217643.2  1 ATGACTCAGGACAACTGGCTTGGACAGAAAGGAACCAAGAGGAGCATGGGAAATGAGCTG 60

rat p125      0 ----- 0
XM_217643.2  61 GAAAGAGAGGCTCTCTCCAGCTTCTGCTGCTCTCTCTGAACTGCTGCTTGTGACT 120

rat p125      0 ----- 0
XM_217643.2  121 ATGACTACGGAAAGCTGTGGCTCAGATCAACCATCACAGCTTGATGGAAATGCTGCCAGCC 180

rat p125      0 ----- 0
XM_217643.2  181 AACAGACTGCAGACAGCAAGGCCTTTGAAGCTGGACTTGCTGTCACTACTCTCTGGGGTT 240

rat p125      1 ----- 19
XM_217643.2  241 GCAATTGAGTGGGCCCTGGAGCAGCTGCTGACAGAGCTGGA CGACTTCTCTCAAGGTTCTA 300

rat p125      20 ----- 79
XM_217643.2  301 SACCAGGAGAACCTGAGCAGTGCAGCCGTGGTGAAGAAAAGCGGCTTGCTGGAGCTCCTG 360
SACCAGGAGAACCTGAGCAGTGCAGCCGTGGTGAAGAAAAGCGGCTTGCTGGAGCTCCTG

rat p125      80 ----- 139
XM_217643.2  361 CGACTTTACACCAAGAGCAGCAGTTCTGATGAGGAATATATTTACATGAACAAAAGTGGA 420
CGACTTTACACCAAGAGCAGCAGTTCTGATGAGGAATATATTTACATGAACAAAAGTGGA

rat p125      140 ----- 199
XM_217643.2  421 GTCAACAAGGAAACAGAACCCAGCATCTCCAGACAAAGTTCTGAGGAGAGCAGGGTCCA 480
GTCAACAAGGAAACAGAACCCAGCATCTCCAGACAAAGTTCTGAGGAGAGCAGGGTCCA

rat p125      200 ----- 259
XM_217643.2  401 CTGACCAATGGGGAGCCAGCCAGCAGCACCTCGGCCCTCAGAAAGAGCTTCCAGACCTC 540
CTGACCAATGGGGAGCCAGCCAGCAGCACCTCGGCCCTCAGAAAGAGCTTCCAGACCTC

rat p125      260 ----- 319
XM_217643.2  541 CCTCCACCCAAAGATGATTCCAGAGAGGAAACAGCCTACCATTCCAAAGATTGA 600
CCTCCACCCAAAGATGATTCCAGAGAGGAAACAGCCTACCATTCCAAAGATTGA

rat p125      320 ----- 379
XM_217643.2  601 GAGGGCTACTATGAAGAGGGCTGAGCCATTGACACATCCATCAACGAGGATGGAAGGGCT 660
GAGGGCTACTATGAAGAGGGCTGAGCCATTGACACATCCATCAACGAGGATGGAAGGGCT

rat p125      380 ----- 439
XM_217643.2  661 GTGAGCAGCTCCTATGAGTCTTACGACGAGGAGGAGAGCAGCAAAAGGCAAGACAGCCCC 720
GTGAGCAGCTCCTATGAGTCTTACGACGAGGAGGAGAGCAGCAAAAGGCAAGACAGCCCC

rat p125      440 ----- 499
XM_217643.2  721 TACCAAGTGGCCCTCGCCTGAGGCCAGCATTGAGCTGATGCGTGACGCCCGCATCTGTGCC 780
TACCAAGTGGCCCTCGCCTGAGGCCAGCATTGAGCTGATGCGTGACGCCCGCATCTGTGCC

rat p125      500 ----- 559
XM_217643.2  781 TTCTGTGGCGCAAGAAAGTGCTAGGCCAGTGGGCCAAGCAGCTCTGTGTGATCAGGGAC 840
TTCTGTGTGGCGCAAGAAAGTGCTAGGCCAGTGGGCCAAGCAGCTCTGTGTGATCAGGGAC

rat p125      560 ----- 619
XM_217643.2  841 ACCAGGCTTTTGTGTGATCAAAATCGTCCAAAGACACAGTCCCTCAGCTGGATGTGAACCTG 900
ACCAGGCTTTTGTGTGATCAAAATCGTCCAAAGACACAGTCCCTCAGCTGGATGTGAACCTG

rat p125      620 ----- 679
XM_217643.2  901 CTGGGCAAGCAGTGTCTGTCACAAAGGAGAAACAAAGTGCGCAACAAAGAGCACAAGCTCAAG 960
CTGGGCAAGCAGTGTCTGTCACAAAGGAGAAACAAAGTGCGCAACAAAGAGCACAAGCTCAAG

rat p125      680 ----- 739
XM_217643.2  961 ATCATGCCAATGAACGCCGACGTGATGCTGCTGGGCCGTCAGAGCAAGGACAGGCTGAG 1020
ATCATGCCAATGAACGCCGACGTGATGCTGCTGGGCCGTCAGAGCAAGGACAGGCTGAG

rat p125      740 ----- 757
XM_217643.2  1021 CAGTGGCTTCGGGT ATC 1080
CAGTGGCTTCGGGT ATC

rat p125      757 ----- 757
XM_217643.2  1081 ACCACAACTCTTGCTGGAGGTTCCAAAGACAAGAGTGCTATTCAAGCAGACACAGATCTG 1140

rat p125      757 ----- 757
XM_217643.2  1141 TGTCTAAGCTGCCACAGAGGAGCTTTTCCCCCTGGTCAGATGAATGTAGAGGTAGCCCT 1200

rat p125      758 ----- 775
XM_217643.2  1201 GACTCAGAGAAAGCTGCTCACCCCTGTAGCAGGGTTGGTCATC CAGGAGGTGAGTGGCCTG 1260
GACTCAGAGAAAGCTGCTCACCCCTGTAGCAGGGTTGGTCATC CAGGAGGTGAGTGGCCTG

rat p125      776 ----- 835
XM_217643.2  1261 CCTTCTGAAGGAGCCTCGGAGGGAAACCAAGTACACACAGATGCCAGCGCCTGAACCTG 1320
CCTTCTGAAGGAGCCTCGGAGGGAAACCAAGTACACACAGATGCCAGCGCCTGAACCTG

rat p125      836 ----- 895
XM_217643.2  1321 CAGAAACCAAGACATAGCTGAGAAAGTACATGTCAAGCTCGGAGTACGGGATCACCCTGAT 1380
CAGAAACCAAGACATAGCTGAGAAAGTACATGTCAAGCTCGGAGTACGGGATCACCCTGAT

rat p125      896 ----- 923
XM_217643.2  1381 GGCCATCCTGAGATCCCAGAGACAGAG 1440
GGCCATCCTGAGATCCCAGAGACAGAG

rat p125      924 ----- 961
XM_217643.2  1441 ATCAGAGAAACAATGCTATCCC AGCTCAAGAAAGAAATGTTCTGCTGGCCCTCAAGCTGAGC 1500
ATCAGAGAAACAATGCTATCCC AGCTCAAGAAAGAAATGTTCTGCTGGCCCTCAAGCTGAGC

rat p125      962 ----- 1021
XM_217643.2  1501 AACCTTATGAACCTGGGCAGGAGAAATCTACCTCACTGGAGCCCCAGACAGATCCCTC 1560
AACCTTATGAACCTGGGCAGGAGAAATCTACCTCACTGGAGCCCCAGACAGATCCCTC

rat p125      1022 ----- 1081
XM_217643.2  1561 GAGACATCCAGCTACCTGAACGTGCTGGTGAACAGTCAGTGAAGTCACGCTGGTGCTTT 1620
GAGACATCCAGCTACCTGAACGTGCTGGTGAACAGTCAGTGAAGTCACGCTGGTGCTTT

```

Fig. 1-2 決定したラットp125のDNA配列とKIAA1914のDNA配列との比較 (続く)

静止期FRTL-5細胞を1mM BtzAMPを含む培地で24時間培養しtotal RNAを回収した。XM_217643.2の配列を元にプライマーを設計し、RT-PCRを行った。増幅産物をサブクローニング、シーケンスして得られた配列を比較してラットp125 cDNA配列を決定した。決定したp125の配列とXM_217643の配列のalignmentを図示した。枠内は相同配列を示す。なおrat p125配列は開始コドンを含んでいない。

rat p125	1082	TTTAGAGACAGCCACCTGCACCTTTTACCAGGACCGGAAACCGGGGCAAGATGGCCACAG	1141
XM_217643.2	1621	TTTAGAGACAGCCACCTGCACCTTTTACCAGGACCGGAAACCGGGGCAAGATGGCCACAG	1680
rat p125	1142	CCCCTCAGCCTGGTGGTTGTGATGTGCTTCGGATCCACAGCCCTGACCACCTGTACTCC	1201
XM_217643.2	1681	CCCCTCAGCCTGGTGGTTGTGATGTGCTTCGGATCCACAGCCCTGACCACCTGTACTCC	1740
rat p125	1202	TTCCGTATCTCTCCACAAATGGCGAGGAGTTGGCCAAAGCTTGAGGCCAAGTCATCAGAGG	1261
XM_217643.2	1741	TTCCGTATCTCTCCACAAATGGCGAGGAGTTGGCCAAAGCTTGAGGCCAAGTCATCAGAGG	1800
rat p125	1262	ATGGGTCACTGGCTAGGCTCTGCTCTCAGAGTCCGGCTCCAAAGACAGACCCGGAAGAG	1321
XM_217643.2	1801	ATGGGTCACTGGCTAGGCTCTGCTCTCAGAGTCCGGCTCCAAAGACAGACCCGGAAGAG	1860
rat p125	1322	CTCACCTATGACTATGTGGATGCTGAAAGGGTTTCCTGCATTGTCTAG-----	1368
XM_217643.2	1861	CTCACCTATGACTATGTGGATGCTGAAAGGGTTTCCTGCATTGTCTAGTGCAGCCAAACC	1920
rat p125	1369	-----TGCACCAAAACCTCTCTCTTACTGATGCAAGGAAATTCTCGAGCCCAAC	1420
XM_217643.2	1921	TCTCTCTTGCACCAAAATATGCTCTCTTACTGATGCAAGGAAATTCTCGAGCCCAAC	1980
GGACCCATATATGCTTCCAG			
rat p125	1421	ACATACATTGATGGCTGCCAGCCGGGACTGCCAGGAAGAGCTGTATGATGATGTGGAG	1480
XM_217643.2	1981	ACATACATTGATGGCTGCCAGCCGGGACTGCCAGGAAGAGCTGTATGATGATGTGGAG	2040
rat p125	1481	ATGTCAGAGCTGATGGCGGGCTGGAGCTGCTGAGGAAGCCACCTAGCTGGGGATGCC	1540
XM_217643.2	2041	ATGTCAGAGCTGATGGCGGGCTGGAGCTGCTGAGGAAGCCACCTAGCTGGGGATGCC	2100
rat p125	1541	ACCCCTGCTGTGGATGCCAACAGTGGCAGTGACTTAGACCGAGTATACCTGGATCTCACA	1600
XM_217643.2	2101	ACCCCTGCTGTGGATGCCAACAGTGGCAGTGACTTAGACCGAGTATACCTGGATCTCACA	2160
rat p125	1601	CTGTCAAGTCTTCTCTGATAATACCAAGTGAAGTCCAGGTGCCAGGCTCTCTCCACGC	1660
XM_217643.2	2161	CTGTCAAGTCTTCTCTGATAATACCAAGTGAAGTCCAGGTGCCAGGCTCTCTCCACGC	2220
rat p125	1661	GTGCCACATCTGGATGACGTAGCTGAGACCCCTCACAGTAGACCCAAAGCCAGGCACACC	1720
XM_217643.2	2221	GTGCCACATCTGGATGACGTAGCTGAGACCCCTCACAGTAGACCCAAAGCCAGGCACACC	2280
rat p125	1721	CCAGAGGAGCCCTGCCACAGAGTCTCCAGGAGGCCAGGAGATGCAACAGAGCCAGCCAGAG	1780
XM_217643.2	2281	CCAGAGGAGCCCTGCCACAGAGTCTCCAGGAGGCCAGGAGATGCAACAGAGCCAGCCAGAG	2340
rat p125	1781	GGTCAAGAGCCTTCGGAGCCCATCGAGCCACCCCGAGAGTCAACACGGTTAAGCTGCAG	1840
XM_217643.2	2341	GGTCAAGAGCCTTCGGAGCCCATCGAGCCACCCCGAGAGTCAACACGGTTAAGCTGCAG	2400
rat p125	1841	GCCGAGCAGCAGAGAATCTCCTTCCAGCCAACTGCCAGACACCATGGCTTCTGTCCCC	1900
XM_217643.2	2401	GCCGAGCAGCAGAGAATCTCCTTCCAGCCAACTGCCAGACACCATGGCTTCTGTCCCC	2460
rat p125	1901	ATCAGTGCCAGCCACCTGTGAAGGACAAGCTGAGGGTGACCACTGCAGAAATCAAACCT	1960
XM_217643.2	2461	ATCAGTGCCAGCCACCTGTGAAGGACAAGCTGAGGGTGACCACTGCAGAAATCAAACCT	2520
rat p125	1961	GGGAAGAACCAGACAGAGGCGGAAGTGAAGCGGTACACGGAGGAAGAGAGGAGGCTGGAG	2020
XM_217643.2	2521	GGGAAGAACCAGACAGAGGCGGAAGTGAAGCGGTACACGGAGGAAGAGAGGAGGCTGGAG	2580
rat p125	2021	AGGAGTAAGGAGGATTCGAGGACACCTGGCTCAGCTCCGAGGGAGAGAGGAGGCTC	2080
XM_217643.2	2581	AGGAGTAAGGAGGATTCGAGGACACCTGGCTCAGCTCCGAGGGAGAGAGGAGGCTC	2640
rat p125	2081	AAGGAGACCTGTTAAGATGCACAG-----ATAAGGGAATTGTG	2119
XM_217643.2	2641	AAGGAGACCTGTTAAGATGCACAGCAAGTTTGATCCTCTCTACAGATAAGGGAATTGTG	2700
rat p125	2120	GCCAAAGCTGAGACAGGCAATTGAAGAGAAATAGATGAGGAATGCCGCTGGAGGAGAGCAGG	2179
XM_217643.2	2701	GCCAAAGCTGAGACAGGCAATTGAAGAGAAATAGATGAGGAATGCCGCTGGAGGAGAGCAGG	2760
rat p125	2180	CGTGTGGACCTCGAGCTCAGCATCGTGGAGGTGAAGGACAACCTGAAGAAGGCAGAGGCT	2239
XM_217643.2	2761	CGTGTGGACCTCGAGCTCAGCATCGTGGAGGTGAAGGACAACCTGAAGAAGGCAGAGGCT	2820
rat p125	2240	GGGCTGTGACCCCTGGGCACCACTGTGGATACCAACCCAGCTGGACAACATGAGCCCTCGT	2299
XM_217643.2	2821	GGGCTGTGACCCCTGGGCACCACTGTGGATACCAACCCAGCTGGACAACATGAGCCCTCGT	2880
rat p125	2300	CCAGAGCCFAAAAGCTGCCACCTCCAC-----CTCCACTC-CAGACTC	2340
XM_217643.2	2881	GTG-ACTGCTGGGCTCTGGGCTCTCTCTGAGCTCTATACAGGGTCTCCCTGCCACAGACTC	2939
rat p125	2341	TACGCCAGTCAACTCTGCATCCGTGCTTAAGAAACAGGCCTCTTCCGTCATGGTACAGG	2400
XM_217643.2	2940	TACGCCAGTCAACTCTGCATCCGTGCTTAAGAAACAGGCCTCTTCCGTCATGGTACAGG	2999
rat p125	2401	CAAAAGCACTGTCTGCAGAAAGCGAAG-----	2429
XM_217643.2	3000	CAAAAGCACTGTCTGCAGAAAGCGAAGTTCTTCCATCAAAACCAAGAGAGCCAGGGA	3059
rat p125	2429	-----	2429
XM_217643.2	3060	CAAAAGGCTCAATAAAGTAAAGCAGGGCCCTGATCCCGTGACAGTTTTTACCCACCCCC	3119
rat p125	2430	-----AATGGGAGAGAAA	2443
XM_217643.2	3120	CAGGGCAAAAGGAGAAAGCCCTGTTAATCCATAACTCAC TGGTACAG AATGGGAGAGAAA	3179
rat p125	2444	GGAGCCA GTTAGGAAAC AAGATTTGCTTAAAGACTCTTATAAGGTCATGGATCTTGCTGA	2503
XM_217643.2	3180	GGAGCCA GTTAGGAAAC AAGATTTGCTTAAAGACTCTTATAAGGTCATGGATCTTGCTGA	3239
rat p125	2504	CAATCCTGCTCCGGTCAAGT-----	2523
XM_217643.2	3240	CAATCCTGCTCCGGTCAAGTCTTCCATAAAACAGCAGCAACTCTGA	3285

Fig. 1-2 決定したラットp125のDNA配列とKIAA1914のDNA配列との比較 (続き)

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt2cAMPを含む培地で24時間培養しtotal RNAを回収した。XM_217643.2の配列を元にプライマーを設計し、RT-PCRを行った。増幅産物をサブクローニング、シーケンスして得られた配列を比較してラットp125 cDNA配列を決定した。決定したp125の配列とXM_217643の配列のalignmentを図示した。枠内は相同配列を示す。alternative splicing される配列を赤字と赤下線で示した。

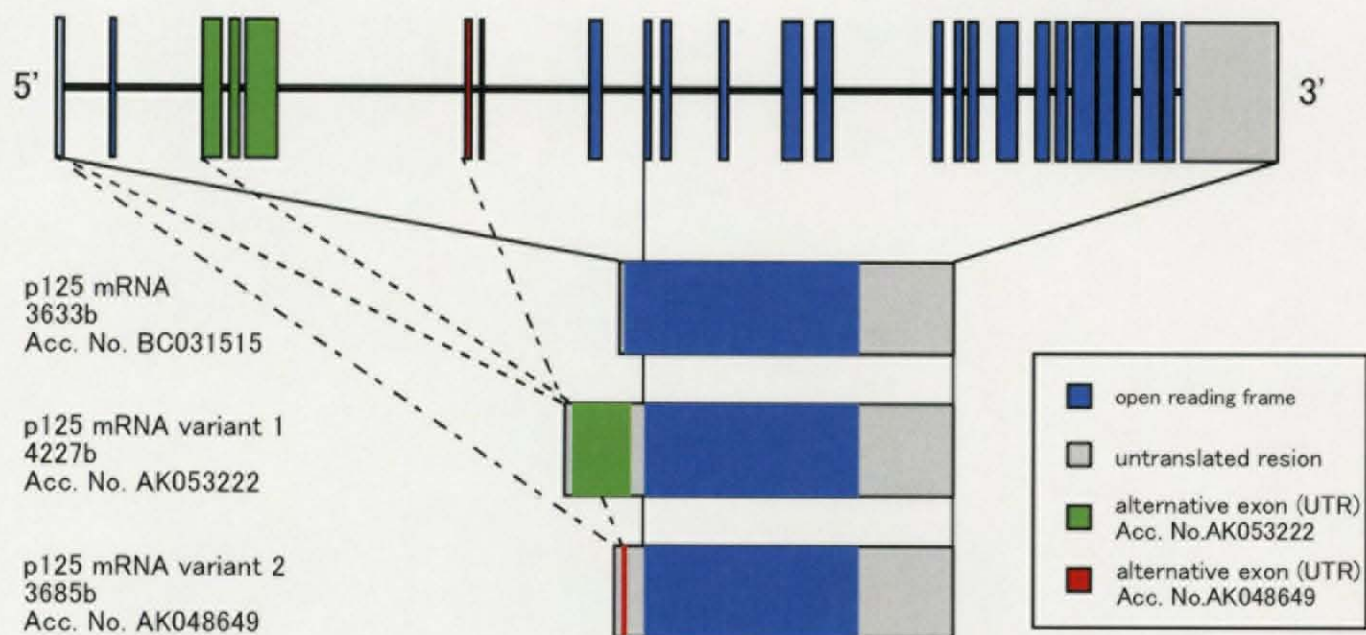


Fig. 1-3 マウスp125エクソン構造図と予測転写産物

上段にマウスp125のエクソン構造を示した。イントロンはエクソンの1/12の長さとなっている。
下段にGenbankに登録された3種類のマウスp125の配列をエクソン構造と対応させて示した。

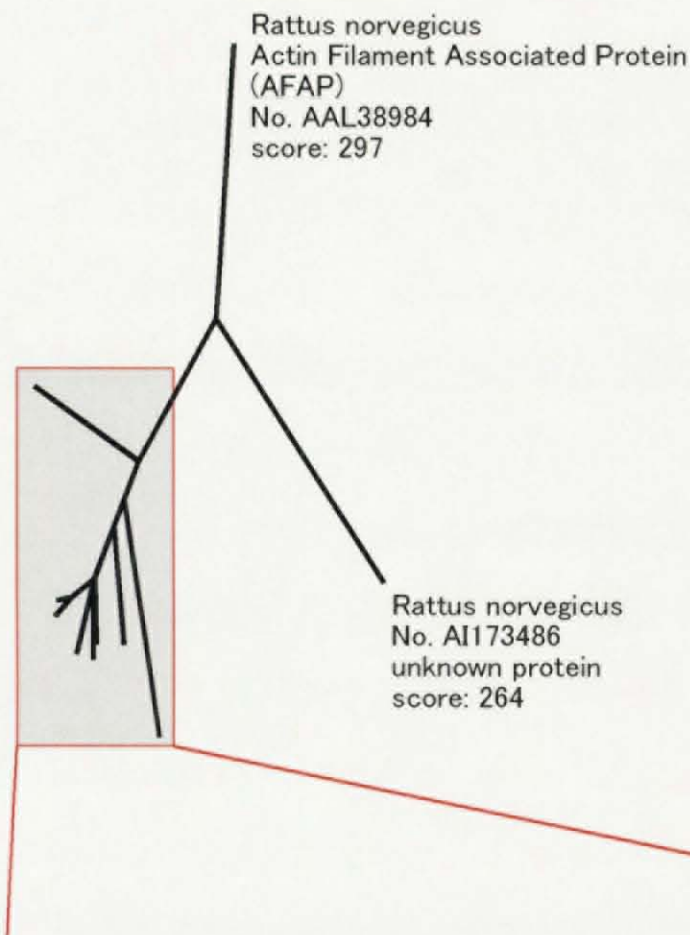
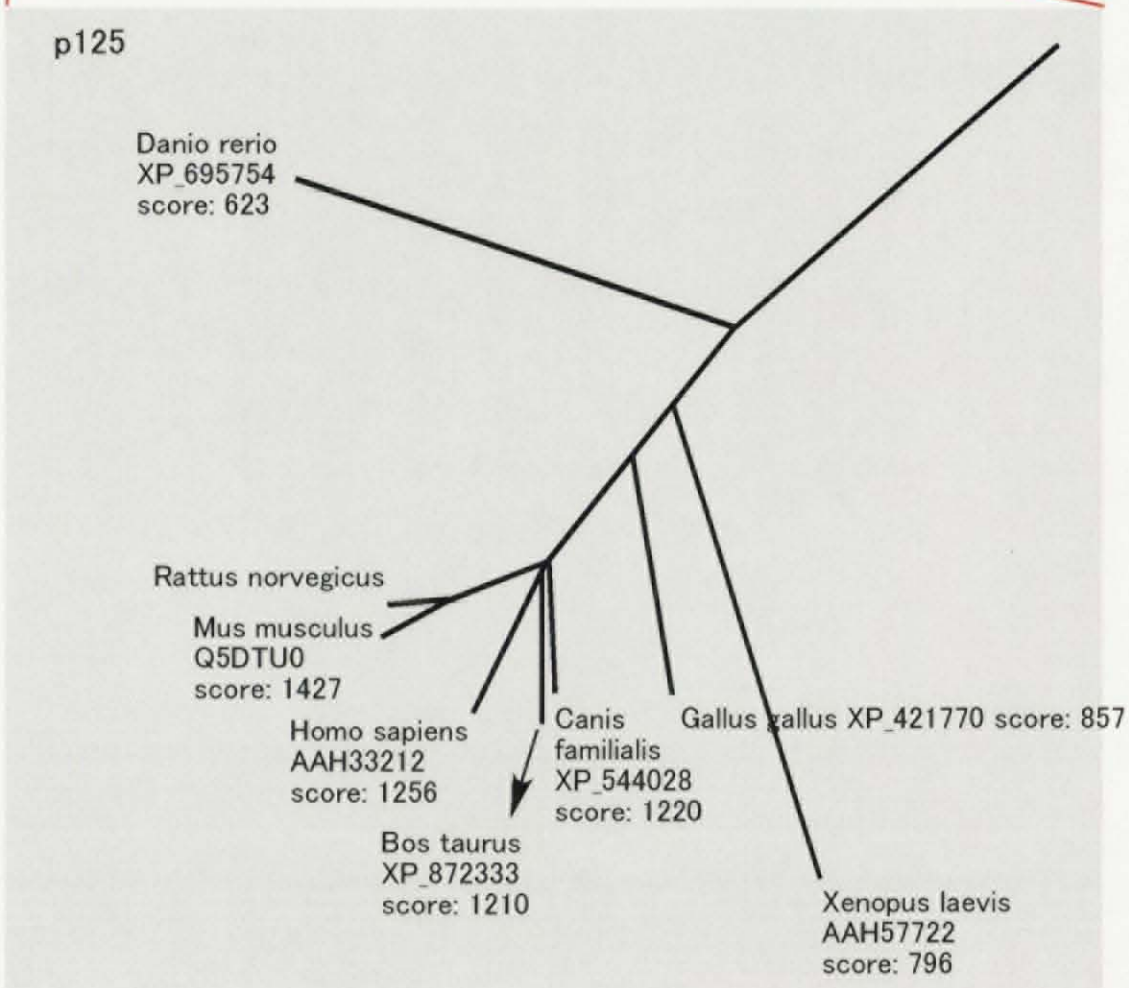


Fig. 1-4 分子系統樹に基づいたp125ファミリータンパク質の検索と種間比較

ラットp125の予想されるアミノ酸配列をBLASTPIによって相同性検索を行い、ラット由来の分子でp125と低い相同性を有する分子との系統樹を作製した。またラット以外の種でp125と高い相同性を有する分子をp125オーソログと考え、拡大して図示した。それぞれ種名、Accession No.、ラットp125とのBLASTPIによる相同性scoreを示した。



10 20 30 40 50 60 70
 MERYKAQGCCCLVVQRRILQVSASLEQLLTELDDFLKVLDQENLSSAAVLKKSGLSELLRLYTKSSSSDE
 80 90 100 110 120 130 140
 EYIYMNKVSVNGEQNSASPDKVPEEQGPLTNGEPSQHSSAPQKSLPDLPPPKMI PERKQPTVPKIESPEG
 150 160 170 180 190 200 210
 YYEEAEPFDRSINEDGEAVSSSYESYDEDEDENSKGKAAPYQWPSPEASIELMRDARICAFLLWRKKWLQQWA
 220 230 240 250 260 270 280
 KQLCVIRDTRLLCYKSSKDHSPQLDVNLRGSSVVHKEKQVRKKGHKLKIPMNADVIVLGLQSKDQAEQW
 290 300 310 320 330 340 350
 LRVIQEVSGLPSEGASEGNQYTPDAQRLNCQKPDIAEKYLSAAEYGITINGHPEIPETKDVKKKCSAGLK
 360 370 380 390 400 410 420
 LSNLMNLGRKKSTSLEPPERLETSSYLNVLVNSQWKSRCFVRDHLHFYQDRNRSKVAQQPLSLVGCD
 430 440 450 460 470 480 490
 VLPDPSPDHLYSFRILHNGEELAKLEAKSSEEMGHWLGLLLSESGSKTDPEELTYDYVDAERVSCIVSAA
 500 510 520 530 540 550 560
 KTSLLLMQRKFSEPNTYIDGLPSRDCQDDLYDDVEVSELI AVVEPAEEAAPAVDANS GSEPDRVYLDLTP
 570 580 590 600 610 620 630
 VKSFLHSSSEAQAQASLPVPHQDDVAETLTVDPKPGTTPEEPHTESPGDPEVQQRQPEVQESSEPIEPT
 640 650 660 670 680 690 700
 PRITMVKLQAEQQRISFPANCPDTMASAPIAASPPVKEKLRVTSAEIKLGKNRTEAEVKRYTEEKERLER
 710 720 730 740 750 760 770
 SKEEIRGHLAQLRREKRELKETLLRCTDKGVLAKLEQTLKKIDEECRMEESSRRVDLELSIMEVKDNLKKA
 780 790 800 810 820 830 840
 EAGPVTLTGTTVDTHLDNMSRPQPKAATPNPPDSTPVNSASVLKNRPLSVMVTGKGTVLQKAKEWEEK
 843
 GAS

Proline-rich region: 116-121

PH domain: 193-289, 371-465

coiled-coil: 675-772

YXXM チロシンリン酸化されてp85と結合しうるYXXMモチーフ

Y リン酸化が予測されるチロシン残基

抗p125抗体の抗原として用いた配列

Fig. 1-5 マウスp125の予測されたアミノ酸配列とドメイン構造

DNA配列から予測されたアミノ酸配列をドメイン構造予測サイトScansite、Prositeで検索し、予測されたドメイン、モチーフと、既報のAFAP-110解析結果から明らかにされたモチーフを併せて図示した。

・ p125



・ AFAP-110



Srcによってチロシン残基がリン酸化される
coiled-coil domain でF-actinと結合する
coiled-coil domain でホモダイマーを形成する

・ similar to AFAP (unknown protein)



PHドメインの配列は種間でよく保存されている
C末端側にGEF ATPase domainが予想される

Proline-rich region

PH domain

coiled-coil

GEF ATPaseが予測される領域

Y チロシンリン酸化されてp85と結合しうるYXXMモチーフ

リン酸化が予測されるチロシン残基

Fig. 1-6 p125ファミリー分子のドメイン構造

系統樹解析の結果p125とファミリーを形成すると考えられる分子のドメイン構造を模式的に示した。それぞれ上段にリン酸化されうるチロシン残基のアミノ酸番号を示し、下段に各ドメインのアミノ酸番号を示した。

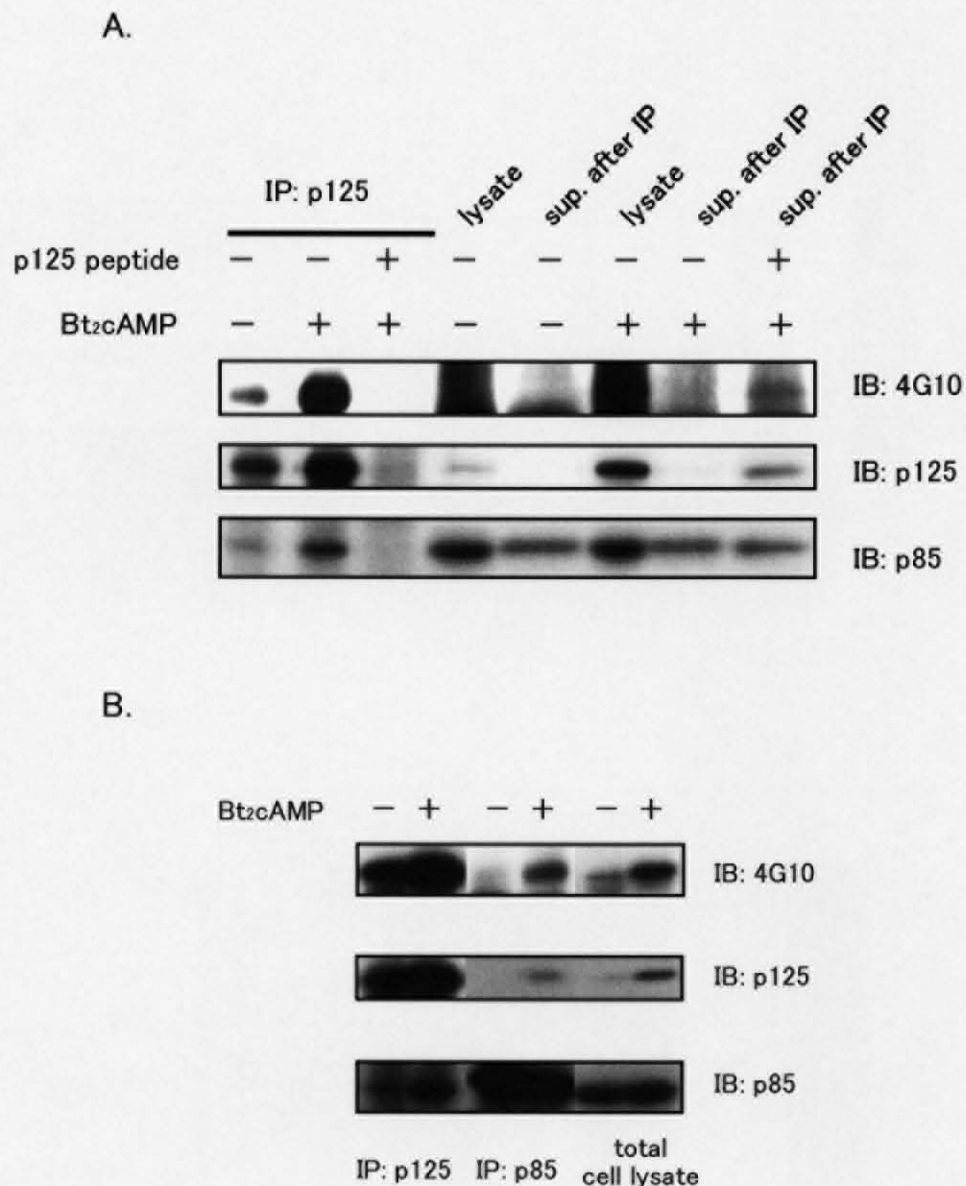
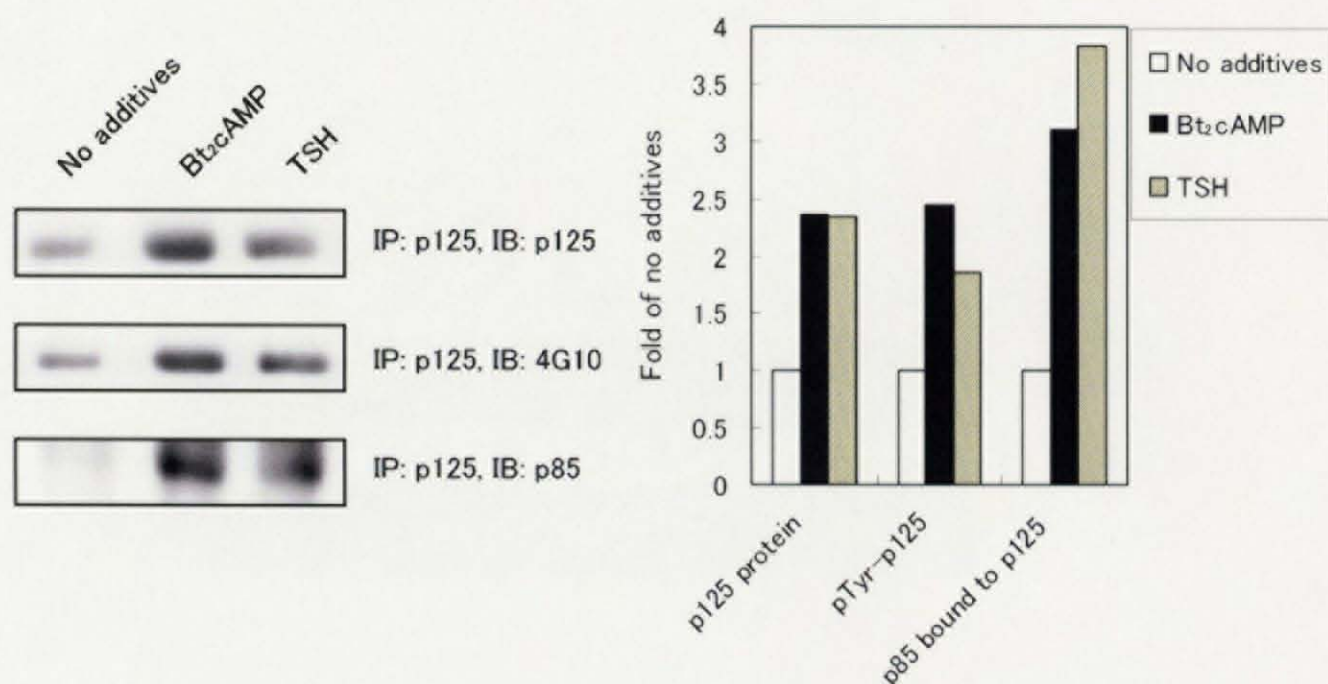


Fig. 1-7 作製した抗p125抗体を用いたp125とp85の共免疫沈降の検出

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt₂cAMPを含む、あるいは含まない培地で24時間培養し、KIAA1914のC末端アミノ酸配列を抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。この時抗原ペプチドを予め抗体と反応させて免疫沈降に用いてネガティブコントロールとした。免疫沈降前の細胞抽出液と沈降後の上清を沈降物と共に抗リン酸化チロシン4G10抗体、作製した抗p125抗体、抗p85抗体でimmunoblottingした(A)。または抗p85抗体を用いて免疫沈降を行い、同様に図示した抗体でそれぞれimmunoblottingした(B)。

A.



B.

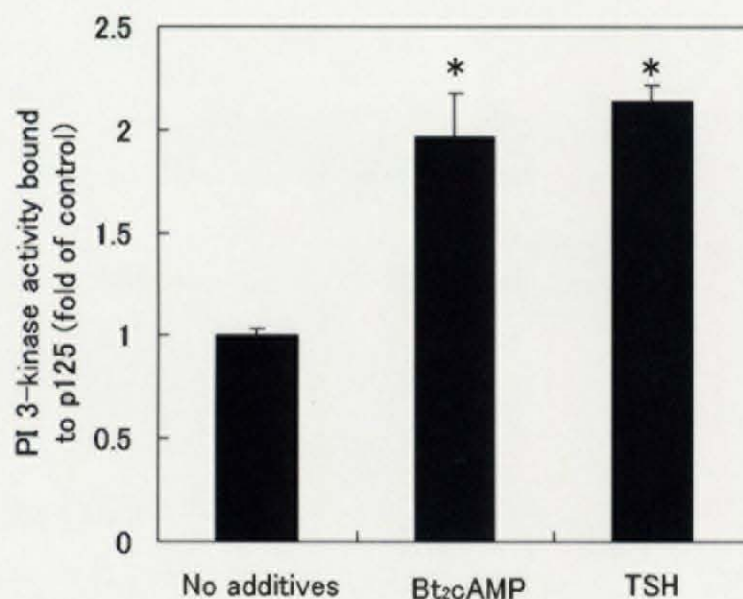
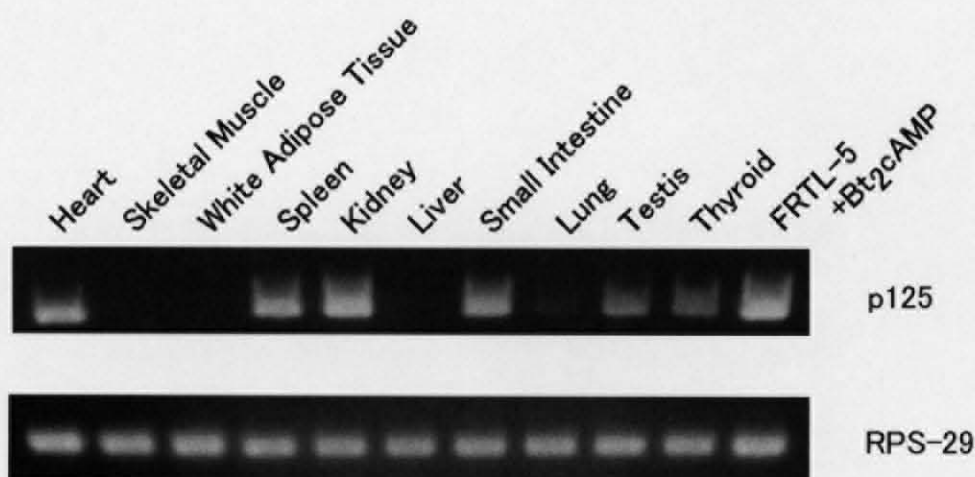


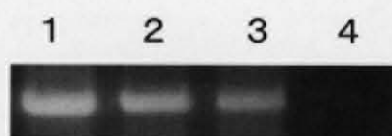
Fig. 1-8 抗p125抗体を用いた免疫沈降物中のPI 3-kinase活性の検出

静止期FRTL-5細胞を1mM Bt₂cAMPを含む培地、1nM TSHを含む培地、これらを含まない培地で24時間培養した。抗p125抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物を抗リン酸化チロシン4G10抗体、抗p125抗体、抗p85抗体でそれぞれimmunoblottingし、得られたバンドを定量した(A)。またこの免疫沈降物を用いてPI 3-kinase assayを行った。Bt₂cAMP処理した細胞抽出液を非免疫血清を用いて免疫沈降したときの値をbackgroundとし、無処理時の値を1としたmean±S.E.M (n=3)を示した。(*; $P < 0.02$ vs No additives, Student t-test) (B)。

A.



B.



1: positive control
2: FRTL-5; Bt₂cAMP treatment
3: 3T3-L1脂肪前駆細胞; Bt₂cAMP treatment
4: L6; serum medium

Fig. 1-9 p125発現組織の解析

生後3ヶ月の成体オスラットより各組織を採取し、total RNAを抽出した。p125に対するプライマーを用いてRT-PCRを行い、増幅産物を検出した。コントロールとしてリボソームプロテインの一種RPS-29のmRNAを増幅するプライマーを用いてPCRを行った(A)。また1mM Bt₂cAMPを含む培地で24時間培養したFRTL-5細胞と3T3-L1細胞、10% FBSを含む増殖培地にて培養したL6細胞よりtotal RNAを抽出し、(A)と同様にRT-PCRを行った。ラットp125 cDNAを取得する際に用いた逆転写産物を鋳型としてRT-PCRのポジティブコントロールとした(B)。