

材料と方法

以下の順に記す。

細胞培養

- FRTL-5 細胞
- 293T 細胞

免疫沈降と immunoblotting

Peptide MASS Fingerprinting (PMF) 法によるタンパク質の同定

RNA の解析

- RNA 抽出
- RT-PCR
- Northern blotting

遺伝子操作

in silico 解析

抗 p125 抗体の作製

PI 3-kinase 活性の測定

免疫染色

遺伝子導入

- リン酸カルシウム法－293T 細胞
- Lipofectamine2000 法－FRTL-5 細胞
- DEAE-dextran 法－FRTL-5 細胞

siRNA の設計

DNA 合成の測定

統計処理

細胞培養

・ FRTL-5 細胞

ラット甲状腺濾胞上皮由来の株化細胞 FRTL-5 (ATCC No. CRL8305) は、Dr. Lenard Kohn (National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Disease; NIDDK, NIH, U.S.A., 現 Ohio University School of Osteopathic Medicine and Edison Biotechnology Institute, U.S.A.) より御恵与頂いた。

使用した培地

NBS 培地: Coon's modified Ham's F12 medium (Sigma), 5% Newborn Bovine Serum (日水製薬), 1 mU/ml bovine TSH (Sigma), $10 \mu\text{g/ml}$ bovine insulin (Sigma), $5 \mu\text{g/ml}$ human transferrin (Sigma), 2.785mg/ml NaHCO_3 , 0.33mg/ml glutamine, $1 \times \text{MEM}$ non-essential amino acids (NEAA, ICN biochemicals), 抗生物質 4 種 [50IU/ml penicillin (萬有製薬), $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin (nacalai tesque), $0.5 \mu\text{g/ml}$ amphotericin B (ブリストル・マイヤーズ・スクイブ), $100 \mu\text{g/ml}$ kanamycin (nacalai tesque)]

BSA 培地: Coon's modified Ham's F12 medium, 0.1% bovine serum albumin (BSA, nacalai tesque), 2.785mg/ml NaHCO_3 , 0.33mg/ml glutamine, $1 \times \text{NEAA}$, 上記の抗生物質 4 種

HBSS: Hanks' balanced salt solution (日水製薬), 0.2mg/ml NaHCO_3 ,

Sodium citrate solution: phosphate buffered saline (PBS, 日水製薬), 0.08M trisodium citrate dihydrate

細胞培養は 150cm^2 flask (IWAKI) を用い、 37°C 、湿度 100%、 CO_2 濃度 5% のインキュベータ内で行った。培地は、NBS 培地を用い、2-3 日おきに交換した。

細胞継代は、約 2 週間おきに次のような方法で行った。まず、フラスコ中で細胞を Sodium citrate solution に数分間浸した後、フラスコをたたき細胞を剥離した。ここに、等量以上の NBS 培地を加え、細胞塊を回収し、遠心、上清を除去した。その後、ピペッティングにより細胞塊をほぐし、新たに NBS 培地を加えて細胞を希釈した。トリパンブルー染色により生細胞数を計数し、 2.5×10^5 cells/ml となるよう播種した。なお、実験には、継代回数 30 回以下の細胞を用いている。

実験に用いた細胞は、まず 60 mm dish (IWAKI) に 1.0×10^6 cells/dish の密度で播種し、上記の細胞培養法に従って培養した (ただし、DNA 合成の測定用には、細胞を 48well microplate (IWAKI) へ 5×10^4 cells/well の密度で播種した)。5-6 日後、subconfluent に達したところで、細胞を HBSS で 2 回洗浄した後、BSA 培地を用いて 48 時間培養し、血清飢

餓により静止期に同調した。次に cAMP アナログである dibutyryl cAMP (Bt₂cAMP; N6, 2'-o-Dibutyryladenine-3': 5' cyclic monophosphate Sodium Salt, nacalai tesque) を 1mM 含む、もしくは含まない BSA 培地で 24 時間前培養した後、HBSS で 3 回以上洗浄し、更に IGF-I [human IGF-I: 大熊利明博士 (アステラス製薬株式会社) より御恵与頂いた] 100ng/ml を含む、もしくは含まない BSA 培地で 24 時間培養した。TSH で処理する場合には、National Hormone and Pituitary Program (NIDDK, NIH, U.S.A.) より御恵与頂いた精製済みのものを用い、図示した濃度で 24 時間処理した。阻害剤の使用濃度は Src family kinase 阻害剤 PP1 (BIOMOL) と PP2 (BIOMOL)、actin 重合阻害剤 latrunculin B (Calbiochem) が図示した濃度、PKA 阻害剤 H89 (生化学) が 30 μ M、チロシンキナーゼ阻害剤 genistein (Sigma) が 30 μ g/ml、PI 3-kinase 阻害剤 LY294002 (Sigma) が 50 μ M、mTOR 阻害剤 rapamycin (Sigma) が 1 μ g/ml、MEK1 阻害剤 PD98059 (Cell Signaling) が 20 μ M で行った。なお阻害剤を用いる場合は、Bt₂cAMP で刺激する 30 分前から阻害剤の入った BSA 培地で細胞を培養した。

・ 293T 細胞

HEK 293T 細胞は東京大学大学院農学生命科学研究科塩田邦郎博士から御供与いただいた。培養は増殖用培地 [DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 日水製薬), 10% Fetal Bovine Serum (JRH Bioscience), 1.4mg/ml NaHCO₃, 4.5mg/ml glucose, 50IU/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin B] 20ml 中で、細胞培養は 150cm² flask (IWAKI) を用い、37℃、湿度 100%、CO₂ 濃度 5% のインキュベータ内で行った。培地交換は 1 日おきに行った。継代は subconfluent に達したところで培地を除き、フラスコをたたいて細胞を剥離した。新たな培地を加え、ピペッティングにより細胞塊をほぐし、1/4 から 1/8 を新たなフラスコに播種した。

免疫沈降と immunoblotting

・ 細胞抽出液の調製

60mm dish から培地を除去、氷冷 PBS (-) で洗浄した後、氷上で Tris-Triton buffer [50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM NaF, 1.5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 500 μ M Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, 20 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 KIU/ml aprotinin, 10 mg/ml p-nitrophosphoric acid (PNPP)] を 100-200 μ l 加えて細胞を溶解し、溶解液を cell scraper (Nunc) を用いてかき集め、パストールピペットを用いて 30 回ピペッティングし、15,000 \times g、4℃で 10 分遠心した後、上清を -80℃で保存した。この細胞抽出液を融解した後、Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD) を用いてタンパク質濃度を測定した。

全細胞抽出液を SDS-PAGE に供する場合には、Tris-Triton buffer を用いてタンパク質濃度が

2.5mg/ml となるよう希釈し、1/2 量の 3×Laemmli's buffer (30mM Tris-HCl pH 7.8, 9% SDS, 15% glycerol, 6% 2-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) を加えて 5 分間煮沸して調製した。

・免疫沈降

上記の細胞抽出液を融解し、タンパク質の濃度を定量後、すべてのサンプルのタンパク量が 1mg/ 1 ml になるよう Tris-Triton buffer で希釈し、抗体あるいは抗血清を加え、4℃で 2-3 時間反応させた。その後、ラビット抗体を用いた場合には rProtein A-Sepharose (GE Healthcare) を、マウス抗体を用いた場合には Protein G-Sepharose (GE Healthcare) を 10 μ l 添加し、さらに 4℃で 1-2 時間反応させた。反応後 3,000×g で遠心し、沈降物を 1 ml の Tris-Triton buffer で 3 回洗浄した。

Flag 融合タンパク質を沈降物から溶出する際には、洗浄後の沈降物に 200ng/ml 3xFLAG peptide (Sigma) を 40 μ l 加えて混合し、4℃で 30 分反応させた後に上清を回収した。

洗浄後の沈降物や溶出物には 3×Laemmli's buffer 10 μ l を加えて 5 分間煮沸し、上清を SDS-PAGE に供した。

・SDS-PAGE

SDS-PAGE は Hoefer Standard Slab Gel Units SE600 (GE Healthcare)、あるいは AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (ATTO) を使用して、添付のプロトコールに従って行った。泳動用 buffer として 50mM Tris-NaOH pH 8.75, 380mM glycine, 2mM EDTA, 0.1% SDS を用いた。

・タンパク質の PVDF メンブレンへの転写

SDS-PAGE の終了後、PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore) への転写は Trans Blot Cell (Bio-Rad) を用い、200mA の定電流下で行った (50kDa 以下のタンパク質の転写は 4 時間, 50-100kDa で 4.5 時間, 100-150kDa で 5 時間, 150kDa 以上で 5.5-6 時間)。転写用 buffer には 25mM Tris, 192mM glycine, 20% (v/v) methanol, 0.075% SDS を用いた。

・メンブレンの blocking と immunoblotting

転写終了後、PVDF メンブレンを TBS buffer (20mM Tris-HCl pH 7.6, 137mM NaCl, 1mM EDTA) で洗浄後、blocking buffer (TBS buffer + 3% bovine serum albumin, 0.025% NaN₃) を用いて室温で 1 時間、あるいは 4℃で一晩 blocking した。その後 blocking buffer で希釈した抗体液とともにパッキングし、室温で 2 時間、あるいは 4℃で一晩インキュベートした。続いて、TBS-T (TBS buffer + 0.1% Tween 20) で 10 分間 1 回、5 分間 2 回洗浄を行った。次に、horseradish peroxidase (HRP) を結合した抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体を TBS-T で

希釈した液とともにパッキングし、40分-2時間インキュベートした後、TBS-Tで先と同様に洗浄した。

- ・バンドの検出

Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, PerkinElmer Life Sciences) を用いて発光反応を開始し、X線フィルム (X-Omat, Kodak) に露光し、現像した。分子量マーカー (nacal tesque) との位置関係から目的のバンドを特定した。バンドの定量化は、ImageJ (NIH) を用いて行った。

- ・抗体の stripping

PVDF メンブレンから抗体を剥がす場合は、PVDF メンブレンを stripping buffer (200mM glycine pH 2.8, 500mM NaCl) で 15 分間 2 回洗浄し、さらに TBS-T で 10 分間 2 回洗浄した。再度 immunoblotting に供する場合は、上記の blocking の操作より行った。

- ・使用した抗体

免疫沈降、immunoblotting に使用した抗体は以下の通りである。

抗 PI 3-kinase p85 subunit 抗体 (MILLIPORE) 、抗 Flag M2 抗体 (Sigma) 、抗 Src GD11 抗体 (MILLIPORE) 、抗 Shc 抗体 (BD Biosciences) 、抗 phospho-Akt (Ser 473) 抗体 (Cell Signaling) 、抗 Akt 抗体 (Cell Signaling) 、抗 beta-actin 抗体 (Sigma)、抗マウス IgG-HRP 抗体 (GE Healthcare) 、抗ウサギ IgG-HRP 抗体 (GE Healthcare)

抗リン酸化チロシン 4G10 抗体はハイブリドーマ細胞の培養上清を用いた。

peptide mass fingerprinting (PMF) 法によるタンパク質の同定

- ・免疫沈降と SDS-PAGE

前述の免疫沈降法を元に一部改変して行った。1mM Bt₂cAMP で 24 時間処理した FRTL-5 細胞より細胞抽出液を調製し、タンパク質 50mg を含む細胞抽出液に 100 μ l の rProteinA-Sepharose を加えて 4℃で 2-3 時間攪拌し、preclear を行った。上清を回収し、30 μ l の抗 p85 抗体あるいはウサギ非免疫血清 (NIS) と 4℃で一晩攪拌した。30 μ l の rProteinA-Sepharose を加えて 4℃で 3 時間攪拌した。沈降物を回収し、10ml Tris-Triron buffer で 5 回洗浄した後 1ml Tris-Triron buffer で 5 回洗浄した。沈降物に 30 μ l の 3×Laemmli's buffer を加え、5 分煮沸して上清を SDS-PAGE に供した。なおアクリルアミドゲルは、重合反応を 2 時間以上かけて行った。

- ・銀染色と脱染色

電気泳動の終了後、SilverQuest (Invitrogen) を用いて銀染色を行った。染色された分子質量 125kDa の部分のゲルを切り出した。ネガティブコントロールとして NIS で免疫沈降した際同じ移動度の部分のゲルを切り出した。切り出したゲルを 1mm 角に刻んだ後、SilverQuest に添付されたプロトコルに従って脱染色を行った。

- ・還元・アルキル化処理

DW と CH₃CN は関東化学の HPLC grade を用いた。脱染色後のゲル片を 100 μ l の 50mM NH₄NCO₃ 中で 15 分間攪拌し、次に 100 μ l の 50mM NH₄NCO₃/ 50% CH₃CN 中で 15 分間攪拌することを 2 回繰り返した。その後遠心濃縮機でゲル片を 30 分間乾燥させ、乾燥したゲル片に 50 μ l の 10mM DTT/ 25mM NH₄NCO₃ を加え 56°C で 60 分間インキュベートした。溶液を除き、50 μ l の 55mM Iodoacetamide (IAA; Sigma) / 25mM NH₄NCO₃ を加え遮光して 30 分間室温で攪拌し、ゲル内のタンパク質をアルキル化した。

- ・ゲル内タンパク質のトリプシン消化

ゲル片を 100 μ l の 50mM NH₄NCO₃ 中で 15 分間攪拌し、続いて 100 μ l の 50mM NH₄NCO₃/ 50% CH₃CN 中で 15 分間攪拌することを 2 回繰り返した。遠心濃縮機でゲル片を 45 分間乾燥させ、乾燥したゲル片に 10-20 μ l のトリプシン消化液 [10 μ g/ml Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade (Promega) , 50mM NH₄NCO₃, 5mM CaCl₂] を加え、氷上で 45 分間静置しゲルを完全に膨潤させた。ゲル片に吸収されなかった消化液を捨て、37°C で約 16 時間反応させた。

- ・ゲル片からのペプチドの回収と濃縮

酵素消化したゲル片に 50 μ l の 5% trifluoroacetic acid (TFA, Applied biosystems) / 50% CH₃CN を加え、5 分間室温で攪拌した後、20 分間超音波処理を行い、上清を回収した。同様の操作を 25 μ l の 5% TFA/ 50% CH₃CN を用いて続けて行った。遠心濃縮機で 10 μ l まで濃縮した。

- ・脱リン酸化処理

濃縮したペプチド溶液を等分し、片方には DW、1 μ l calf intestine alkaline phosphatase (CIAP; Takara) 1 μ l、10×AP buffer 1.5 μ l を加えて 15 μ l に調製した。37°C で 20 分反応させ、5% TFA を 4 μ l 加えた。なおネガティブコントロールとしてペプチド溶液を加えないで調製し、その後同様に操作して、TOFMS の結果、特異的ピークが現れないことを確認した。

- ・ サンプルの脱塩と結晶への封入

サンプルの脱塩は以下のように行った。Zip Tip μ C18 (MILLIPORE) をピペットマンに取り付け、0.1% TFA/ 50% CH_3CN 約 $10\mu\text{l}$ の吸引・排出を 3 回繰り返した。次に 0.1% TFA/ 2% CH_3CN 約 $10\mu\text{l}$ の吸引・排出を 6 回繰り返し、樹脂を平衡化した。続いて、サンプルに $1\mu\text{l}$ の 5% TFA を加え、平衡化した Zip Tip μ C18 で 20 回吸引・排出し、ペプチドを樹脂に吸着させた。その後、0.1% TFA/ 2% CH_3CN 約 $10\mu\text{l}$ の吸引・排出を 6 回繰り返し、脱塩した。あらかじめ別のシリコナイズチューブに $1.0\mu\text{l}$ の 0.1% TFA/ 66% CH_3CN を入れておき、その溶液中で Zip Tip μ C18 の吸引・排出を 10 回行い、最後に MALDI-TOFMS 用サンプルプレート (Applied Biosystems) に溶出・滴下した。続いて、溶出済みの Zip Tip μ C18 を用い、 $1.0\mu\text{l}$ のマトリックス溶液 [10mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α CHCA; Sigma), 0.2% TFA, 60% CH_3CN] を吸引し、先ほど滴下したサンプルの上に重ねて滴下し、室温で乾燥させた。

- ・ MALDI-TOF/MS 分析

質量分析計には、MALDI-TOF/MS タイプの Voyager-DE STR (Applied Biosystems) を用いた。peptide-sensitivity reflector モードに設定し、1500-2400 のレーザーの強度で 500 回レーザーをあて、700m/z から 3500m/z までを測定した。得られたスペクトルは、外部または内部標準として測定されるトリプシンの自己消化ペプチド (842.5100m/z と 2211.1046m/z) を用いて補正した。

- ・ PMF 法によるタンパク質の同定

Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 法によるタンパク質の同定には、MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsf.html4.0/msfit.htm/>)を使用した。NCBI データベースを用いて検索した。検索パラメーターに関しては、種は *rattus*、測定誤差は 0.3Da 以内とし、ペプチドの修飾としてシステイン残基の IAA 修飾を考慮した。

RNA の解析

- ・ RNA 抽出

Trizol (Invitrogen) を用いて添付のプロトコルに従い total RNA を抽出した。p125 の発現組織解析のためには、生後 3 ヶ月成体オスラットから 0.1g の様々な組織 (ただし脂肪組織のみ 0.3g) から調製した。ラット p125 cDNA 配列の決定のためには、60mm dish (IWAKI) 上で 24 時間 1mM Bt_2cAMP 処理した FRTL-5 細胞から調製した。肝臓から抽出する際には、イソプロパノール沈殿後のペレットに 4M LiCl $600\mu\text{l}$ を加えてピペッティングして糖分を溶解し、遠心したペレットをエタノール沈殿した。

・ RT-PCR

RNA 抽出の項目で調製方法を記した $2\mu\text{g}$ の total RNA を鋳型に、Oligo dT₁₅ primer を逆転写プライマーとして用いて SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) の添付のプロトコルに従い逆転写反応を行った。

PCR 反応は標準的なプロトコルにしたがって行った。PCR プライマーとして、p125 の発現組織解析の際には forward primer として 5'-GGAAGAAATCTACCTC ACTGGA、reverse primer として 5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG を用いた。PCR 反応のポジティブコントロールとして、ribosomal protein S29 の配列を増幅し、forward primer として 5'-TGAAGGCAAGATGGGTCACCAGCAGC 、 reverse primer と し て 5'-CAGGGTAGACAGTTGGTTTCATTGGG を用いた。

また rat p125 cDNA サブクローニングの際には、第 1 章で示した cDNA の範囲 (bp) (Fig. 1-4) における、以下に記した組み合わせの逆転写プライマーと PCR プライマーを用いた。

cDNA の 範囲	逆転写プライマー	Forward primer	reverse primer
1-692	5'-TCATTGGCATGATCTTGAGCTT	5'-CGACTTCCTCAAGGTTCTAGAC	5'-TCATTGGCATGATCTTGAGCTT
935-753	5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG	5'-GAGGCTGAGCCATTTGACAC	5'-TCACCTCCTGGATGACCAAC
335-1389	5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG	5'-GAGGCTGAGCCATTTGACAC	5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG
956-1389	5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG	5'-GGAAGAAATCTACCTCACTGGA	5'-CAGTCTGGAAGACATATATGGG
1286-1978	5'-ACTTGACCGGAGCAGGATTG	5'-CTCTCAGAGTCCGGCTCCAA	5'-CTCTGTCCGGTTCTTCCCAA
1681-2523	5'-ACTTGACCGGAGCAGGATTG	5'-AGCTGAGACCCTCACAGTAG	5'-ACTTGACCGGAGCAGGATTG
1286-2523	5'-ACTTGACCGGAGCAGGATTG	5'-CTCTCAGAGTCCGGCTCCAA	5'-ACTTGACCGGAGCAGGATTG

・ Northern blotting

1. RNA の変性と泳動

total RNA $30\mu\text{g}$ を遠心乾燥機で乾燥させた後、変性 buffer ($10\times\text{MOPS buffer}$ (後述) $1.8\mu\text{l}$, deionized formamide $9\mu\text{l}$, formaldehyde $0.50\mu\text{l}$, $400\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide $1.8\mu\text{l}$, loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 1mM EDTA, 30% glycerol) $2\mu\text{l}$, distilled water $4.9\mu\text{l}$) $20\mu\text{l}$ に希釈した。55 °C で 10 分間インキュベートした後、氷上に置き、RNA を変性させた。続いて、サブマリン型泳動装置 (マリソル) を用いて、0.35M formaldehyde を含む 1.5% agarose ゲル中で 165 V、2 時間泳動した。泳動バッファーには $1\times\text{MOPS buffer}$ (20mM MOPS pH 7.0, 5mM CH₃COONa, 1mM EDTA) を用いた。泳動後に、トランスイルミネーター上で UV 照射し、18S、28S rRNA のバンド濃度が試料間で等しいことを確認した。

2. RNA のナイロンメンブレンへの転写と固定

泳動後のゲルを DW に浸して 5 分間振騰した後、50mM NaOH に浸して 20 分間振騰した。さらに 20×SSC (1×SSC: 15mM trisodium citrate dihydrate, 150 mMNaCl) に浸して 45 分間振騰した。その後添付のプロトコルに従ってナイロンメンブレン (GeneScreen Plus, NEN life science products) に転写した。約 20 時間の転写の終了後、ナイロンメンブレンを 6×SSC で洗浄し、UV crosslinker [ハイブリダイゼーション用オープン (IWAKI) に付属] を用いて 0.12MJ で固定した。固定後、風乾し、-20℃で保存した。

3. Northern blotting 用プローブの作製

マウス p125 cDNA を鋳型として用いた。pCMV・SPORT6 からマウス p125 cDNA を *Eco*RI と *Xho*I 処理し、電気泳動して切り出し精製した。ランダムプライム法により、Megaprime DNA labeling Kit (GE Healthcare), [α -³²P]dCTP (GE Healthcare) を用いて、kit に添付されていたプロトコルに従い標識プローブを作製した。作製したプローブは MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare) を用いて精製し、比活性を確認したのち熱変性し、hybridization に供した。

4. hybridization

ナイロンメンブレンを prehybridization buffer [20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.75M NaCl, 2.5mM EDTA, 50% formamide, 5×Denhardt (0.1% bovine serum albumin, 1% Ficoll 4000, 1% polyvinylpyrrolidone), 10% dextran sulfate, 100 μ g/ml salmon sperm (熱変性済)] に浸し、42℃で 2 時間以上ハイブリダイゼーション用オープン内でインキュベートした後、標識した cDNA probe (5×10⁵ cpm/ml) を添加し、さらに 42℃で 12 時間以上インキュベートした。

その後、室温でナイロンメンブレンを 1×SSC, 0.1% SDS で 5 分間洗浄し、さらに 0.2×SSC, 0.1% SDS で 5 分間、さらに必要な場合は、65℃まで徐々に温度をあげて洗浄した。バックグラウンドの放射活性の十分な減少を確認したのち、プラスチックバックに密封し、イメージングプレート (富士フィルム) に感光させた。LAS3000 Bio Image Analyzer (富士フィルム) によって検出した。

遺伝子操作

・DNA の取り扱い

DNA の制限酵素による切断、ligase による結合、T4 DNA polymerase による末端平滑化、alkaline phosphatase による脱リン酸化、PCR、アガロースゲル電気泳動、大腸菌の形質転換などの操作は標準的なプロトコルに従った (Sambrook *et al.* 2001)。アガロース電気泳動後の DNA の精製には QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いた。大腸菌からのプラスミ

ドの精製には Quantum PrepPlasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) を用いた。塩基配列の決定には dideoxy 法に基づいたキット BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と capillary sequencer Avant 3100 (ABI) を用いた。

・大腸菌株と培地

本研究では大腸菌株 DH5 α [遺伝子型; *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] を用いた。通常の培養には LB 培地 (1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH7.0) を用いた。ベクターの持つ抗生物質耐性マーカーにより、培地に ampicillin (50 μ g/ml) または kanamycin (liquid; 50 μ g/ml, plate 15 μ g/ml) を加えた。固定培地は上記の培地に agar を 1.5% 加えて作製した。

・プラスミド

本研究に用いたプラスミドの説明または作製方法を以下に示す。

pBleuscript KS+ (Stratagene)

ラット p125 をサブクローニングして配列決定するために用いた。

pCMV・SPORT6 (Invitrogen)

IMAGE クローンのベクターとして用いられており、Invitrogen より購入したマウス p125 ホモログの cDNA (Accession No. BC031515) はこのベクターに *EcoRI* と *XhoI* で挿入されている。

pShuttle2 (Clontech)

当研究室の柴田によって開始コドンの下流、マルチクローニングサイトの上流に 3x FLAG あるいは 2x myc を付加されたベクターを用いた。マウス p125 ホモログの cDNA インサートを鋳型に、p125 の全長と欠失変異体発現のためのインサートを PCR にて増幅した。以下のプライマーに対しそれぞれ *SalI* サイトを forward primer に、*XbaI* サイトを reverse primer に付加し、PCR と制限酵素処理を行い、*SalI* と *XbaI* で切断したベクターに結合した。ただしアミノ酸残基 184-843 の部分のコンストラクト作製は次のように行った。下表に記した配列にそれぞれ *SalI* サイトを付加したプライマーに、pShuttle2-p125 全長コンストラクトを鋳型として PCR を行い、p125 の 561-2543bp 部分のインサートとプラスミドを増幅した。増幅産物を *SalI* で切断後 self ligation を行って作製した。

作製する 変異体 (アミノ酸 残基)	BC031515 上の場所 (bp)	forward primer	reverse primer
1-843 (全長)	8-2543	5'-GGGATGGAGCGCTACAAAGCA	5'-CTAACTGGCTCCTTTCTTC
1-510	8-1541	5'-GGGATGGAGCGCTACAAAGCA	5'-GCCATCGATGTATGTGTT
511-843	1542-2543	5'-CTGCCCAGCCGGGATTGC	5'-CTAACTGGCTCCTTTCTTC
1-185	8-566	5'-GGGATGGAGCGCTACAAAGCA	5'-CTCGGGCGAGGGCCACTGG
186-510	567-1541	5'-GCCAGCATTGAGCTGATG	5'-GCCATCGATGTATGTGTT
654-843	1971-2543	5'-ACCATGGCTTCTGCCCCC	5'-CTAACTGGCTCCTTTCTTC
184-843	561-2543	5'-CCCGAGGCCAGCATTGAGCT	5'-GCGGTCGACGAATTCCGC

pcDNA3-*Src*

当研究室の山中が FRTL-5 細胞を材料に RT-PCR を行ってラット *Src* cDNA を取得し、pcDNA3 (Invitrogen) にクローニングして作製された。

・ラット p125 cDNA のサブクローニング

FRTL-5 細胞を 24 時間 1mM Bt₂cAMP 処理し、前述の方法で total RNA の精製と RT-PCR を行った。増幅産物は *EcoRV* で切断した pBleuscript KS+にサブクローニングし、T7 プライマーと T3 プライマーを用いてシーケンスした。

in silico 解析

総合的な配列解析

アラインメント、プライマー設計、Chou-Fasman アミノ酸配列二次構造解析、Kyte-Doolittle アミノ酸配列疎水性解析などは GENETYX (Genetyx corporation)を用いた。

相同性検索

核酸、アミノ酸相同性解析には BLAST サーバー <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> を利用した。

ラット p125 アミノ酸配列に対する相同性解析結果を元にした系統樹解析は <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/> を利用した。

ドメイン・モチーフ検索は

SCANSITE; <http://scansite.mit.edu/> 、

Pfam; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml> 、

ScanPROSITE; <http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>

上記のサーバーにアミノ酸配列を入力し、得られたドメイン・モチーフ構造予想を比較した。

抗 p125 抗体の作製

抗原ペプチドの NH₂-CVTGKGTVLQKAKEWEKKGAS-COOH は Operon Biotechnologies に合成を依頼した。キャリアタンパク質としては KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; nacalai tesque) を用い、MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester; MP Biomedicals) によってペプチドと結合した。これをアジュバントと共に 11-15 日間隔で 4 回、メスのニュージーランドホワイトラビットに免疫した。その他詳細は定法通りに行った。

PI 3-kinase 活性の測定

免疫沈降物を各 1ml の LiCl buffer (100mM Tris-HCl pH 7.5, 500mM LiCl)、DW、TNE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA)、reaction buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.5mM EGTA) の順に洗浄した。ここに基質として 20 μ g phosphatidylinositol (Avanti) / 45 μ l reaction buffer を加え、25°C で 10 分間インキュベートした後、5 μ l の反応開始混合液 (0.1 μ M [γ -³²P] ATP (4 μ Ci / mmol), 30 μ M ATP, 20mM MgCl₂, 1mM DDT) を加え、15 分間インキュベートした。その後、反応停止液 (32% CHCl₃, 65% methanol, 3% HCl) を 100 μ l 加え、よく混合して反応を停止させた。次に、遠心した後、下層から 20 μ l 取り、薄層クロマトグラフィー (TLC) 用シリカゲルプレート (MERCK) にスポットし、展開 buffer (46% CHCl₃, 41% MeOH, 1.6% NH₄OH, 11.4% H₂O) を用いて TLC 展開を行った。溶媒の先端がスポット位置から 4cm まで展開したところで、槽から取り出し、ドライヤーを用いてよく風乾後、イメージングプレート (富士フィルム) に感光させた。LAS3000 Bio Image Analyzer によって検出した。得られた結果の解析は Image Gauge (富士フィルム) を用いて行った。

免疫染色

FRTL-5 細胞を前述の通り 35mm dish へ播種し、トランスフェクション後、静止期に同調、細胞処理を行った。培地を除去し、氷冷 PBS (-) で洗浄後、4% paraformaldehyde/ PBS (-) を加えて室温で 15 分振騰した。PBS (-) で 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100/ PBS (-) を加えて室温で 15 分振騰した。さらに 3% BSA/ PBS (-) に入れ替え、室温で 1 時間振騰した。ウェットボックス上で、Can Get Signal immunostain Solution A (TOYOBO) で希釈した抗 p125 抗体、抗リン酸化チロシン 4G10 抗体、抗 myc 9E10 抗体 (MILLIPORE) をカバーガラスの上に加え、4°C で一晩反応させた。翌日 0.2% TritonX-100/ PBS (-) を加えて 10 分間振騰して洗浄し、これを 3 回繰り返した。ウェットボックス上で、CanGetA で希釈した二次抗体と 40 μ M phalloidin-TRITC (Sigma) をカバーガラスの上に加え、4°C で 1 時間以上反応させた。二次抗体には、p125 には抗 rabbit IgG-FITC 抗体 (Jackson ImmunoResearch)、myc には抗

mouse IgG-FITC 抗体を用いた。反応後 0.2% TritonX-100/ PBS (-)を加えて 10 分間振騰して洗浄し、これを 3 回繰り返した。最後にカバーガラスを DW ですすぎ、VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium (Vector Laboratories) を用いてマウントした。共焦点顕微鏡 FV-500 (Olympus) を用いて観察した。

遺伝子導入

・リン酸カルシウム法—293T 細胞

60mm dish に 293T 細胞を 1.0×10^6 cells/dish の密度で播種した。翌日 70% confluent まで培養した。3.3 μ g の DNA を含む DW 167 μ l、2 \times HBS (42mM HEPES, 290mM NaCl, pH7.1) 167 μ l、70mM Na₂HPO₄ 3.3 μ l を混合し、さらに 2.5M CaCl₂ 16.7 μ l を振り混ぜて室温で 1 分放置した。その後 dish に加え、4 時間培養後に培地交換を行い、さらに一晩培養した。

・Lipofectamine2000 法—FRTL-5 細胞

プラスミドと siRNA 導入のために Lipofectamine2000 (Invitrogen) の標準的な方法を一部改変して行った。48well microplate に 5×10^4 cells/well の密度で播種し、2 日以上培養を行って 70% confluent まで培養した。1well あたり、Opti-MEM (Invitrogen) 25 μ l に plasmid の場合 0.4 μ g、siRNA の場合 25pmol を加えた。別に Opti-MEM 25 μ l に Lipofectamine2000 を 1 μ l 加え、ピペッティングによって混合し、室温で 5 分放置した。それぞれを混ぜて室温で 20 分放置した。4 種の抗生物質を含まない NBS 培地 150 μ l を加えて反応を停止した。well の培地を除き、このトランスフェクション溶液を加えて 6 時間培養した。その後 NBS 培地に交換し、半日培養した後、実験に用いた。

なお、35mm dish を用いて行う場合、48well の 12 倍量で行った。

・DEAE-dextran 法—FRTL-5 細胞

35mm dish に coverglass (松浪ガラス) を敷いて、 5×10^5 cells/well の密度で播種し、70-90% confluent まで培養した。2 μ g の DNA を含む Dulbecco's PBS (Invitrogen) 574 μ l と 10mg/ml DEAE-dextran PBS 14.7 μ l を混ぜ、室温で 1 分放置した。430 μ l の NBS を加えて反応を止め、dish の培地を除き、このトランスフェクション溶液を加えて 3 時間培養した。その後 NBS 培地に交換し、半日培養した後、実験に用いた。

siRNA の設計

siDirect [(株) RNAi] <http://www.rnai.co.jp/index.html> を用いて設計した。決定したラット p125 DNA 配列を用いて検索し、候補として示された配列の中から他の遺伝子との相天性が低い配列、RNA 分子内二次構造をとりにくい配列を選択した。sense_strand

5'-GUCACGCUGGUGCUUUGUUAG、antisense_strand 5'-AACAAAGCACCAGCGUGACUU
を選択した。設計した siRNA の化学合成は(株) RNAi に発注した。ネガティブコントロール配列としては Naito-1 (sense_strand 5'-GUACCGCACGUCAUUCGUAUC、antisense_strand 5'-UACGAA UGACGUGCGGUACGU)を用いた。この Naito-1 は(株) RNAi によって設計された配列である。G/CUACC で始まるために RISC 形成能が高いが、ゲノム配列に対してミスマッチが 4 以下の相同配列が存在しない。さらに miRNA 配列との相同性がほとんど存在しないことから、非特異的な遺伝子発現抑制が起こらないことが明らかとなっている。

DNA 合成の測定

FRTL-5 細胞を前述の通り 48well microplate へ播種し、トランスフェクション後、静止期に同調、細胞処理を行った。IGF-I 処理の最終 4 時間に、 $1\ \mu\text{Ci/ml}$ [*methyl*- ^3H]thymidine (GE Healthcare) を加え、新規に合成される DNA を標識した。500 μl の 1 M アスコルビン酸を加えて細胞の thymidine 取り込みを停止し、氷冷 PBS で 2 回洗浄した後に 10% 氷冷トリクロロ酢酸に 30 分間浸す作業を 2 回繰り返した。その後液を除去し、200 μl の 0.2 M NaOH, 0.1% SDS を加え 37°C で約 1 時間インキュベートして沈殿物を溶解した。溶液をクリアゾル II (nacalai tesque) 5ml とよく混和し、その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka) を用いて測定した。

統計処理

同じ処理をした試料各 3 点の値に対して Student t-test を行い、両側検定によって有意差を計算した。図中には標準誤差を記した。