

図11

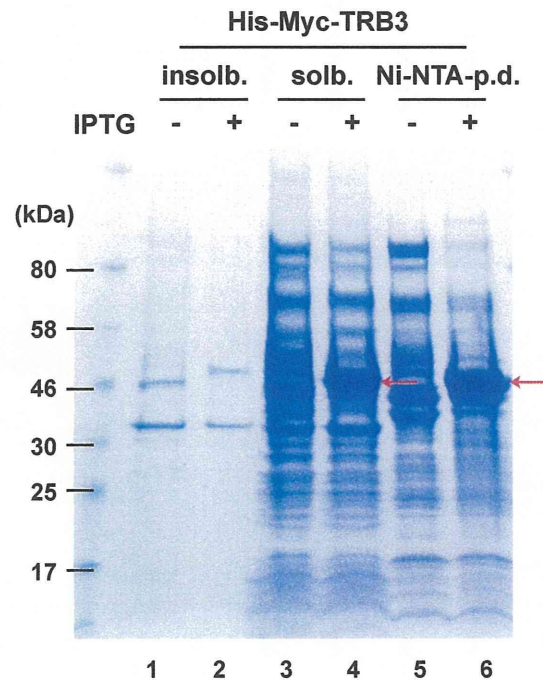


図11. 変性条件におけるMyc-TRB3全長リコンビナントタンパク質の精製
 pET-Myc-TRB3をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30℃で4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を尿素を含んだ変性可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はNi-NTA agarose担体により精製した (Ni-NTA-pull down: Ni-NTA-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。
 (赤矢印: His-Myc-TRB3)

図12

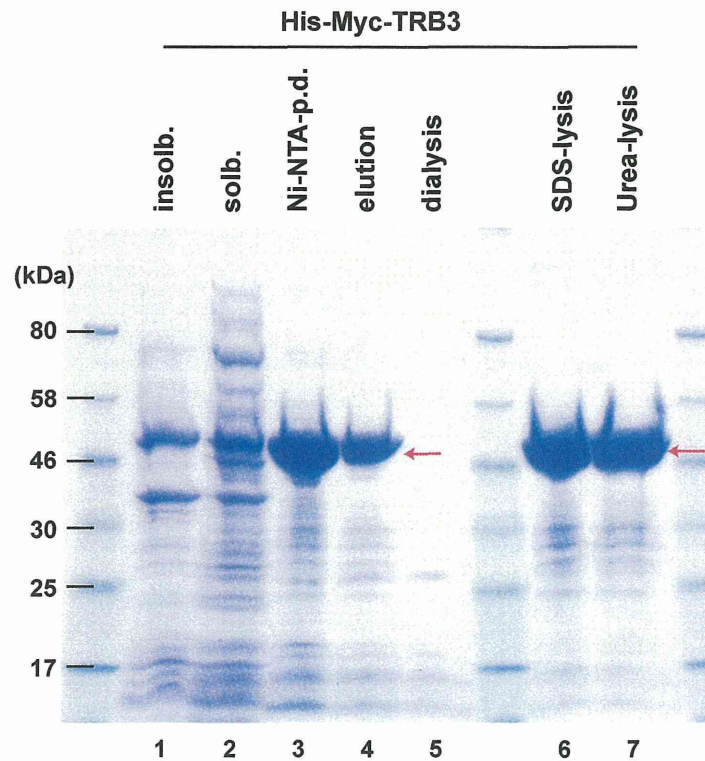


図12. 変性条件におけるMyc-TRB3全長リコンビナントタンパク質の精製
 pET-Myc-TRB3をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30°Cで4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を尿素を含んだ変性可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はNi-NTA agarose担体により精製した (Ni-NTA-pull down: Ni-NTA-p.d.)。その後、Ni-NTA agarose担体からHis-Myc-TRB3を0.25Mイミダゾールを含む溶出バッファーで溶出し (elution)、透析 (dialysis) を行った。透析で析出した沈殿物をSDSを含むバッファー、Ureaを含むバッファーでそれぞれ溶解した (SDS-lysis, Urea-lysis)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: His-Myc-TRB3)

図13

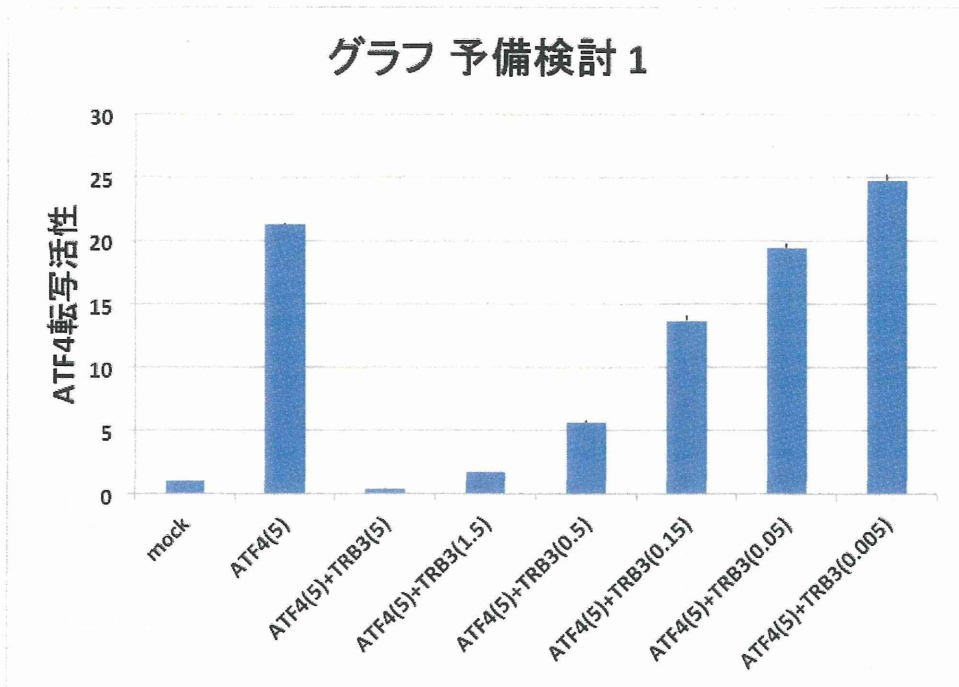


図13 レポーターアッセイスクリーニング系の予備検討 1

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、48時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。ATF4とTRB3の発現ベクターの量は図のような比率でトランスフェクションした。

図14

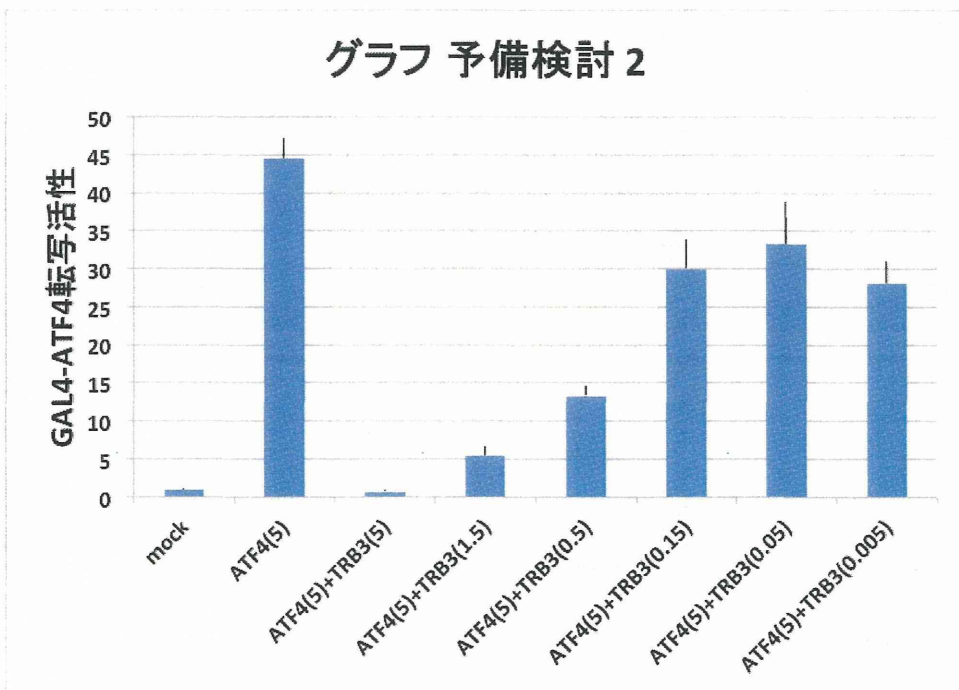


図14 レポーターアッセイスクリーニング系の予備検討 2

HeLa細胞に、GAL4結合配列であるUAS配列を含むレポーター遺伝子、GAL4-ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、48時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。GAL4-ATF4とTRB3の発現ベクターの量は図のような比率でトランスフェクションした。

資料11

図15

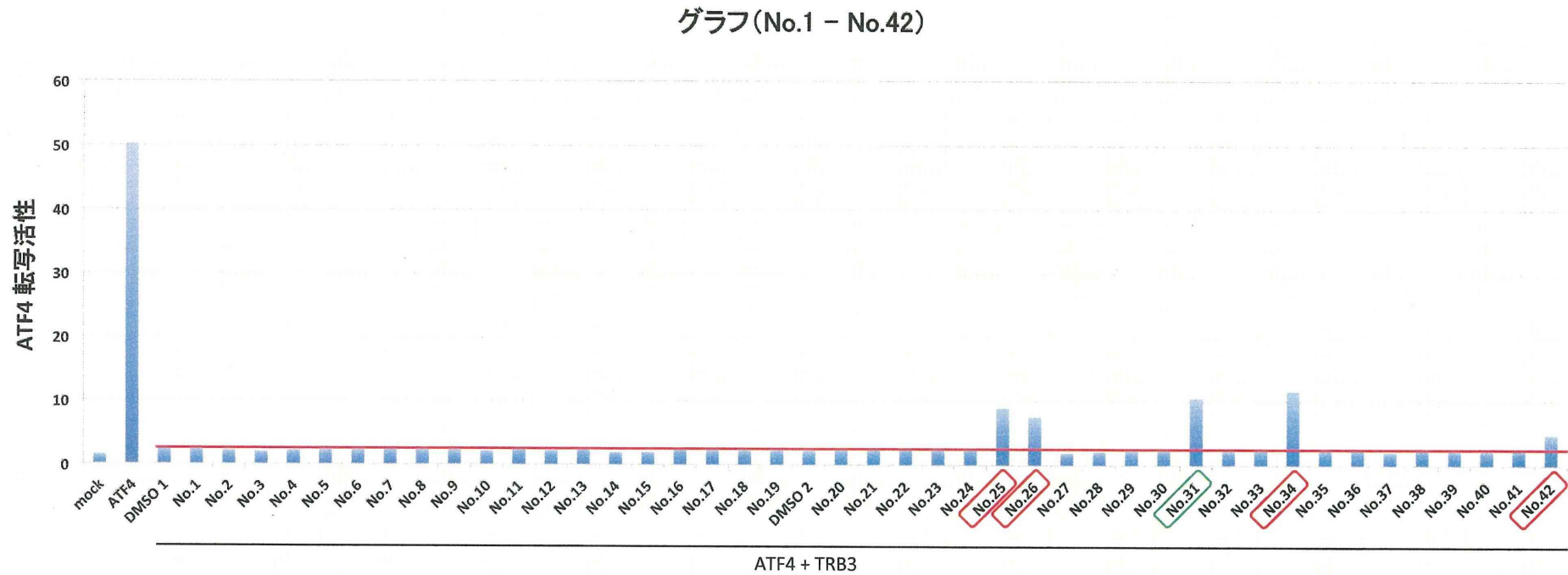


図15 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 1

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料12

図16

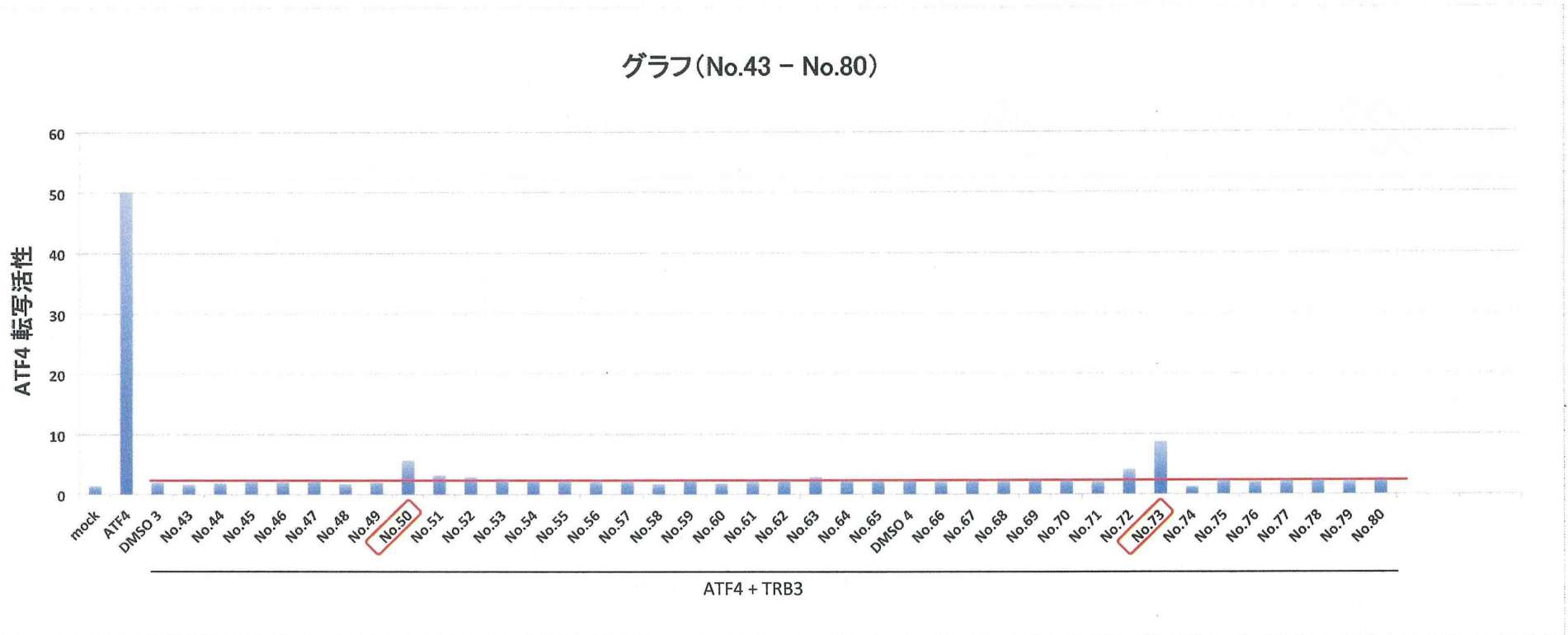


図16 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 2

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料13

図17

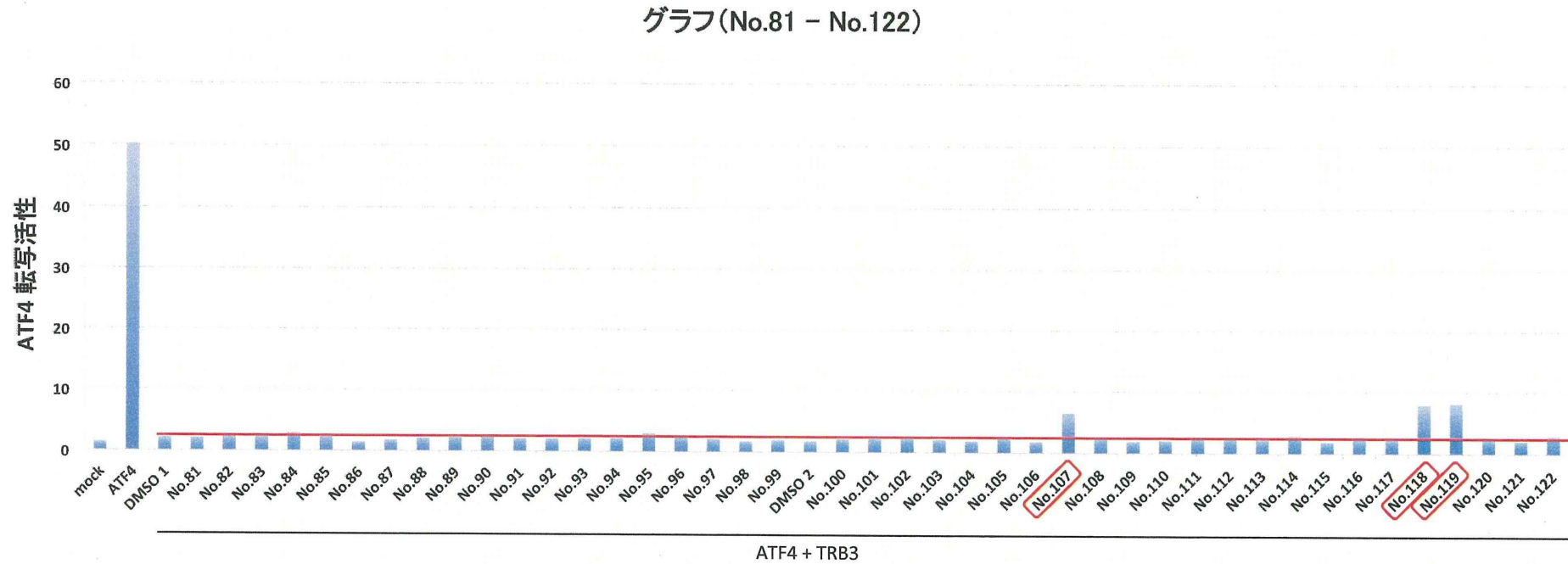


図17 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 3

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料14

図18

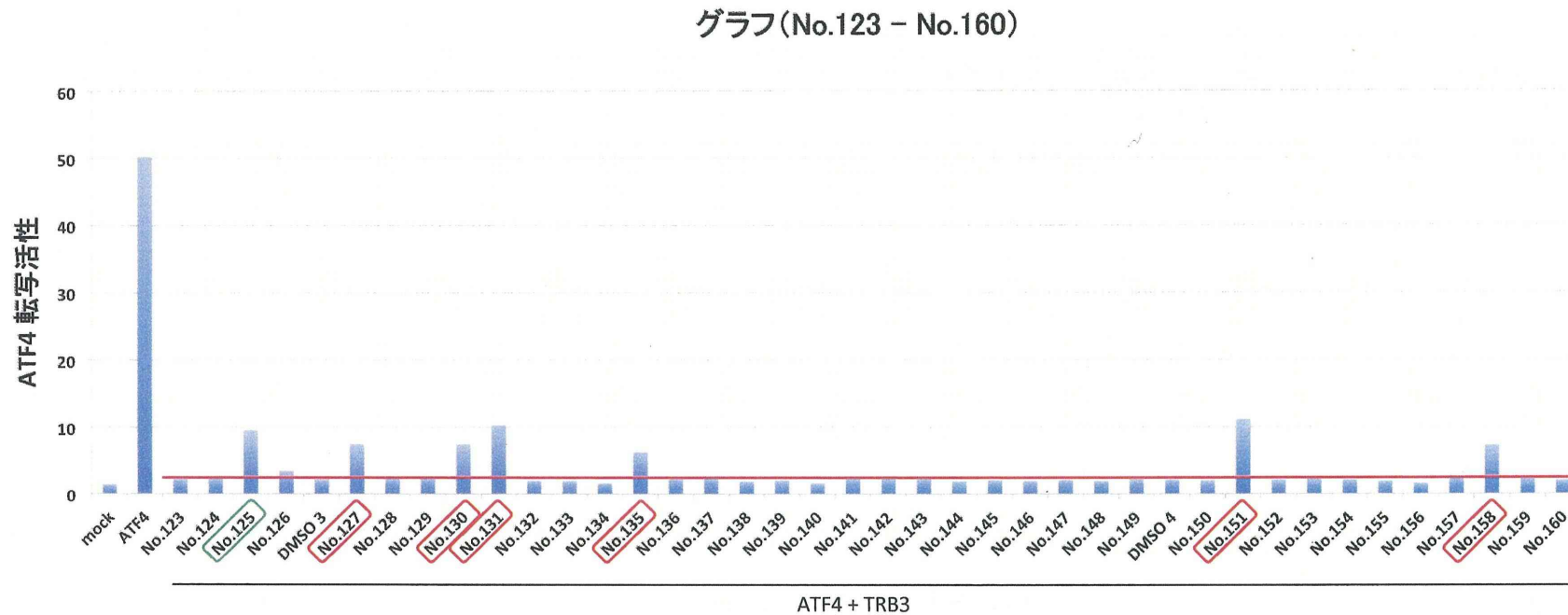


図18 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 4

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料15

図19

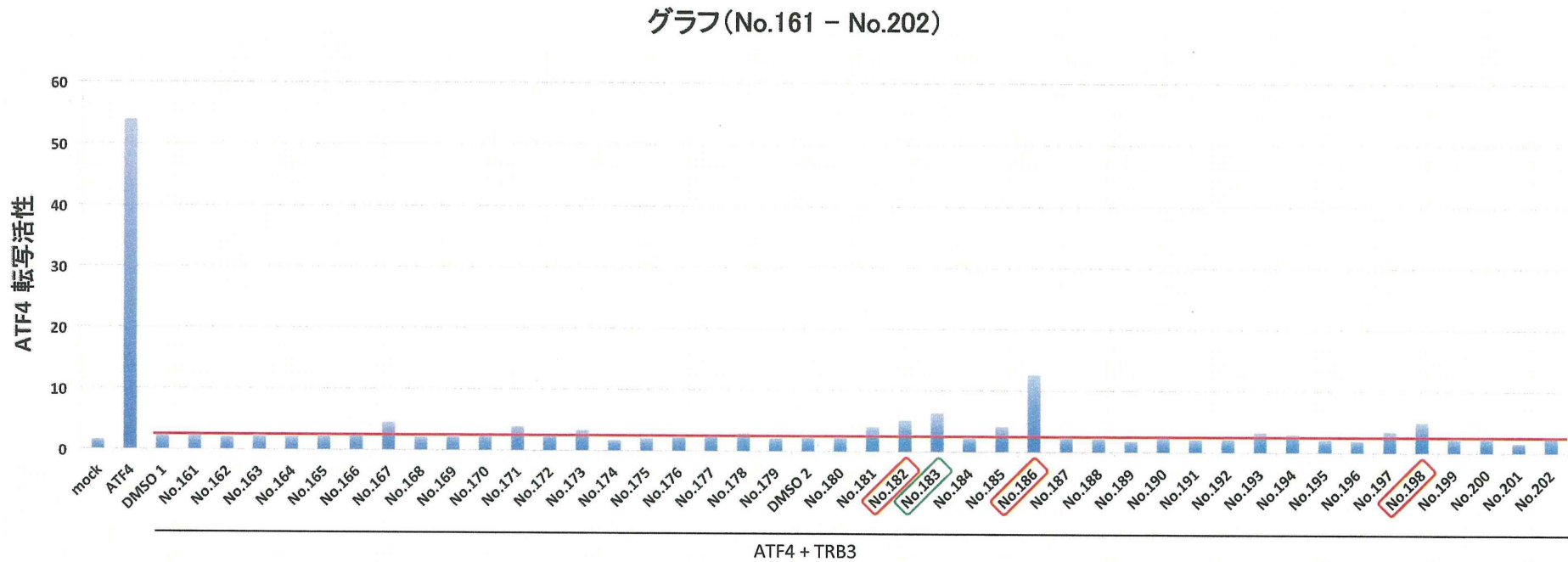


図19 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 5

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料16

図20

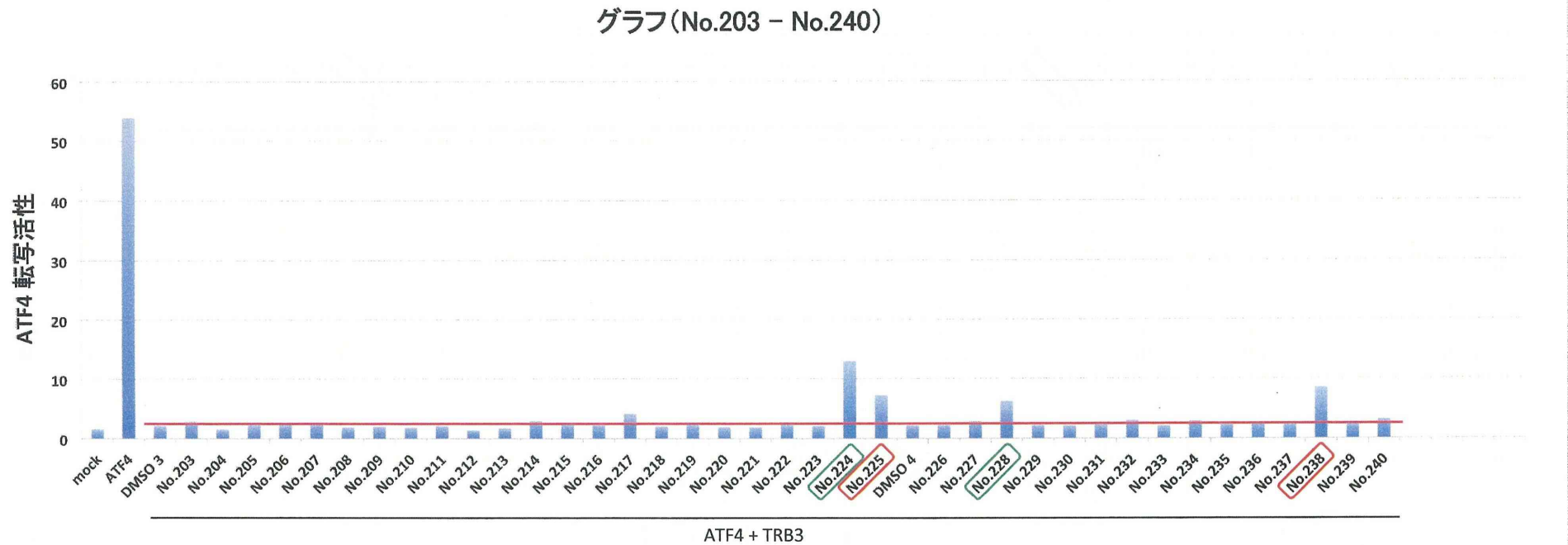


図20 レポーターアッセイスクリーニング (ATF4標的遺伝子) 6

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料17

図21

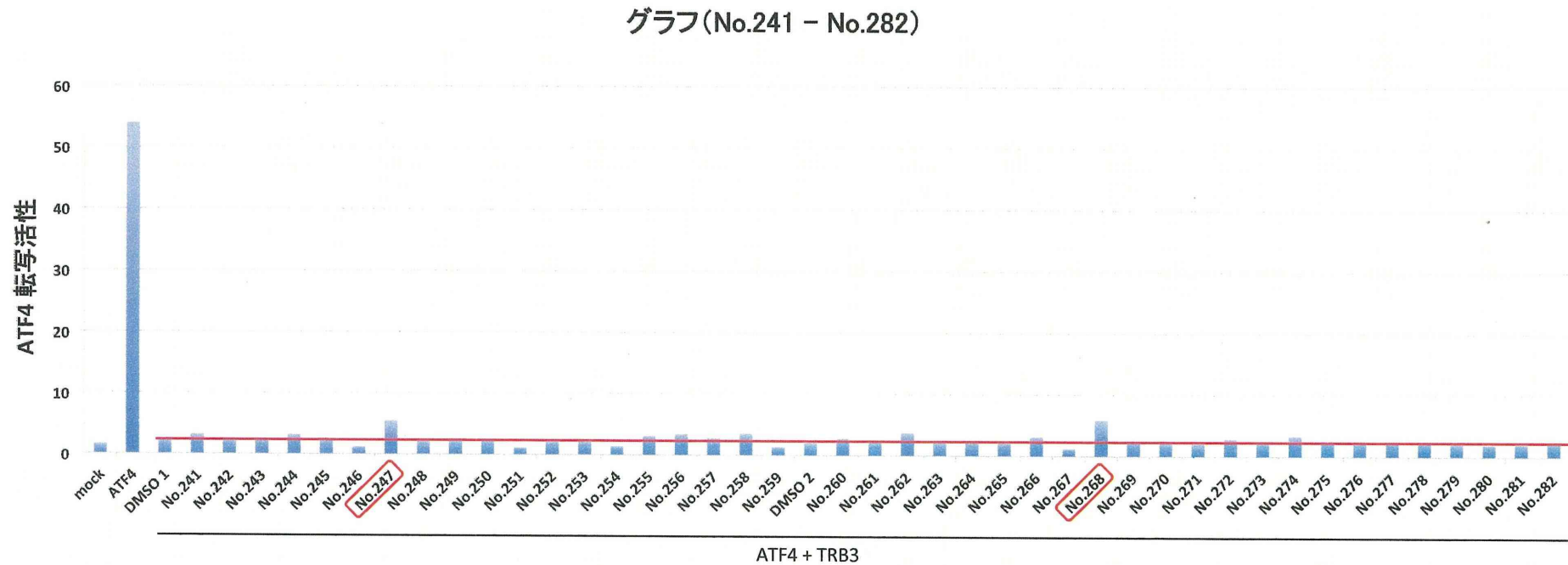


図21 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 7

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料18

図22

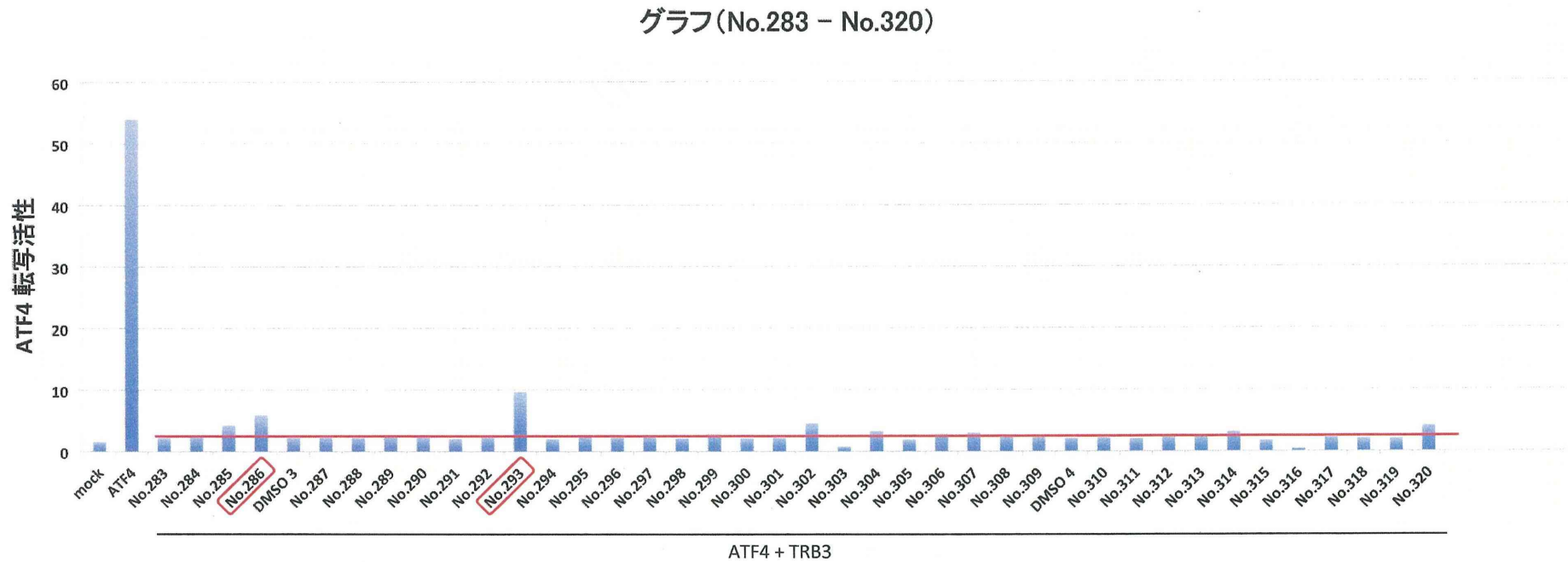


図22 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 8

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料19

図23

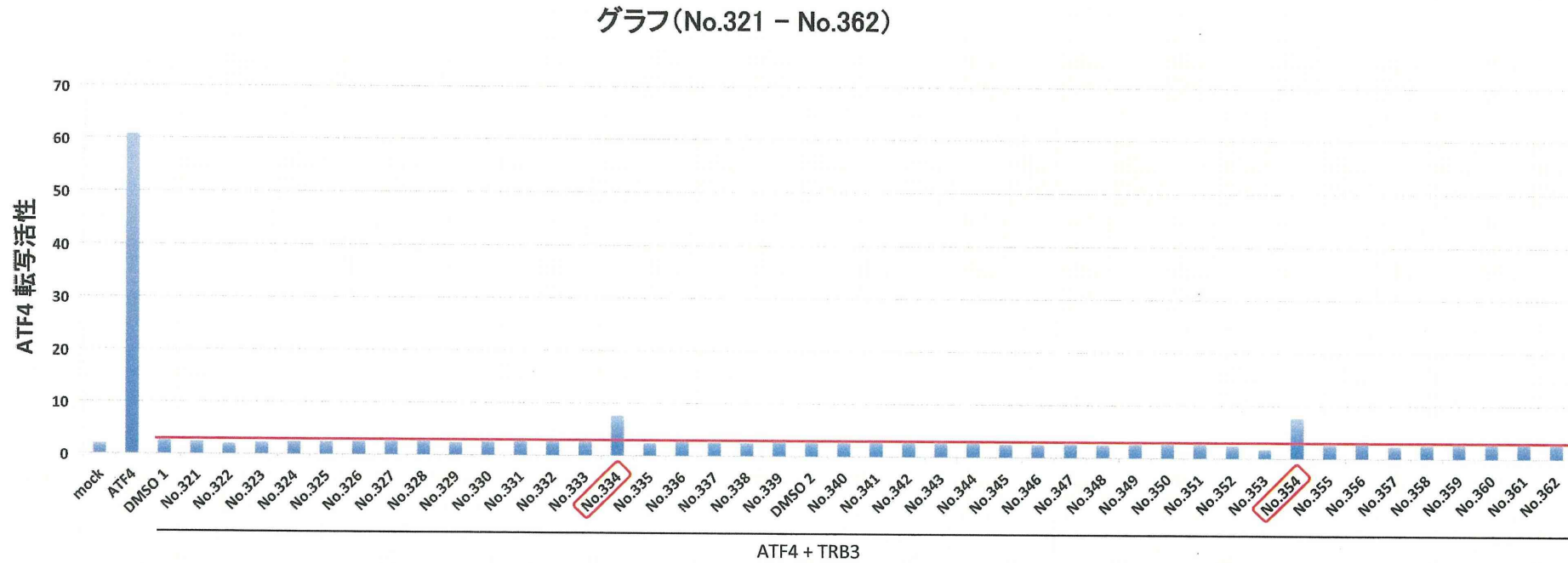


図23 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 9

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料20

図24

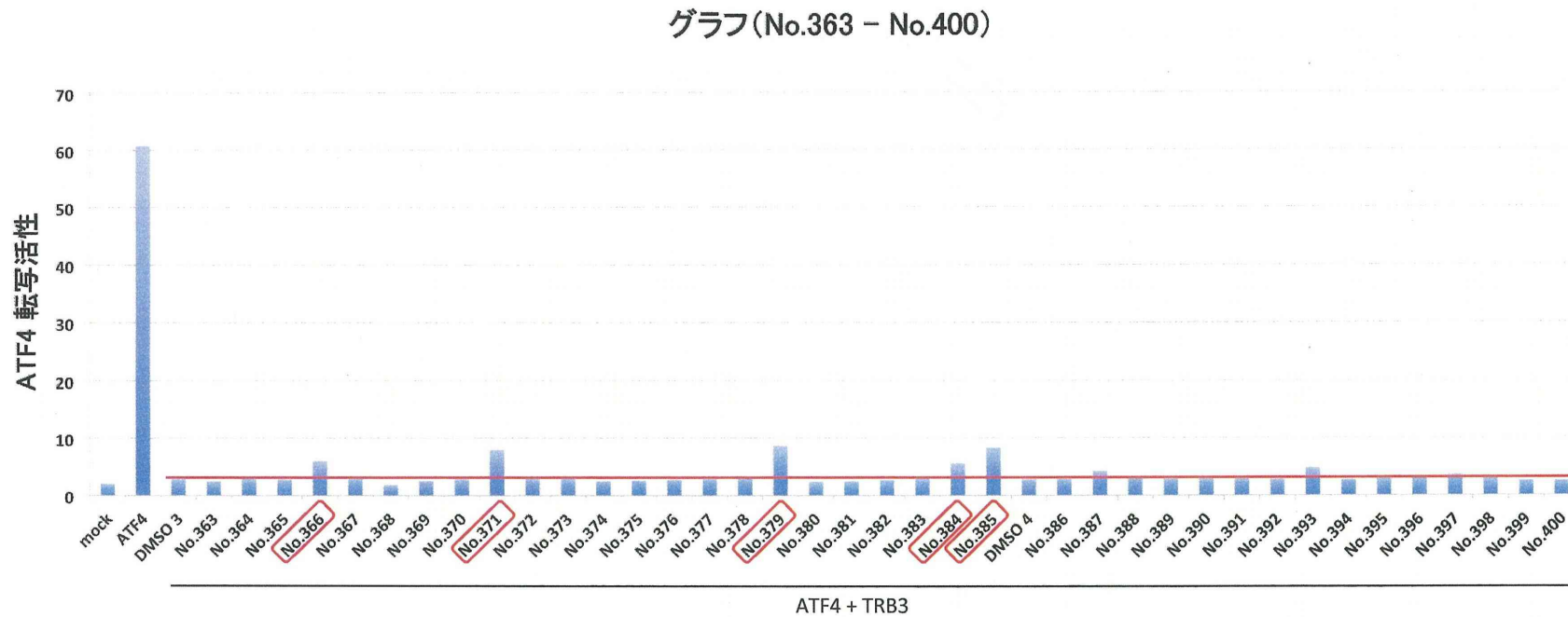


図24 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 10

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料21

図25

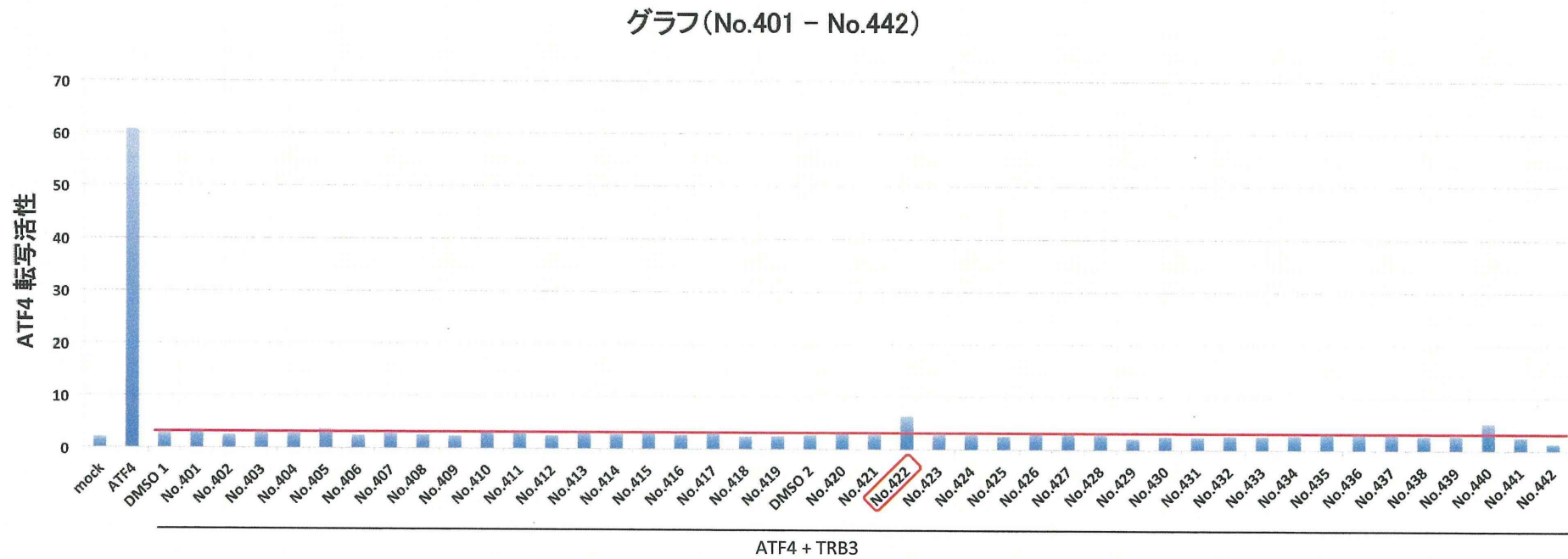


図25 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 11

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料22

図26

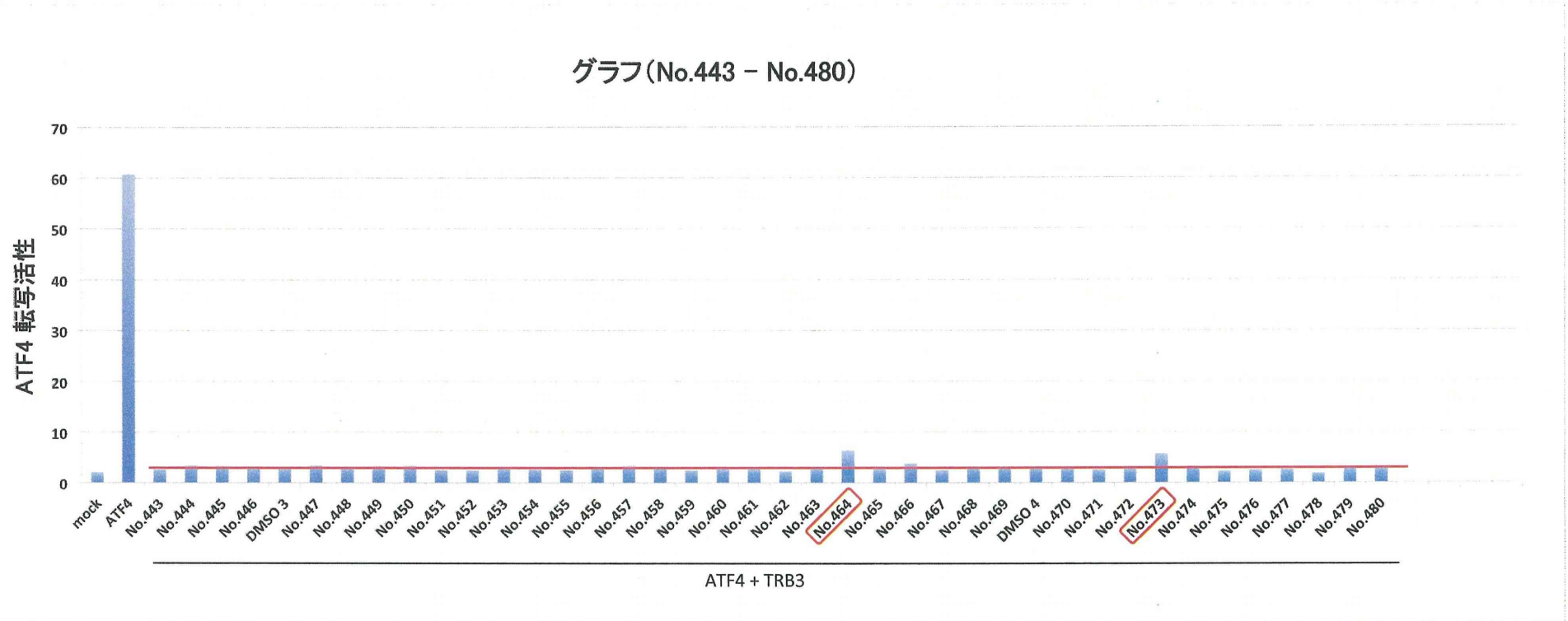


図26 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 12

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料23

図27

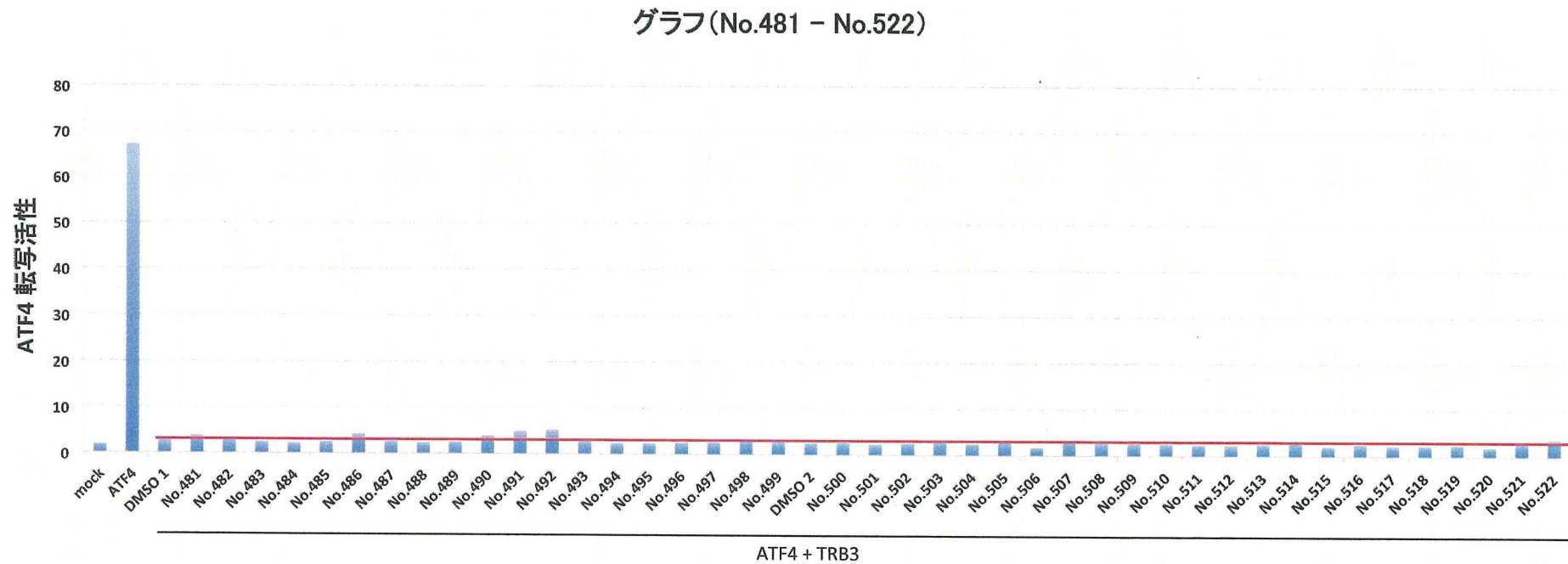


図27 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 13

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料24

図28

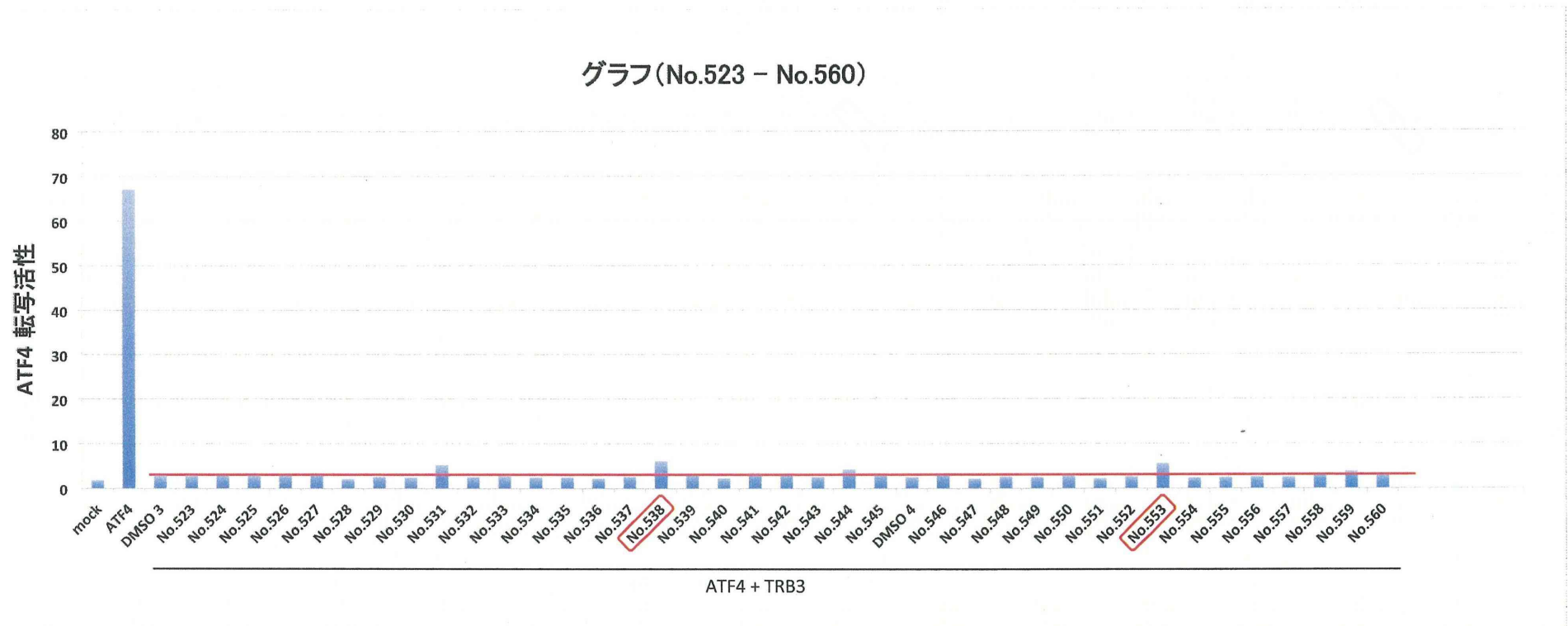


図28 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 14

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料25

図29

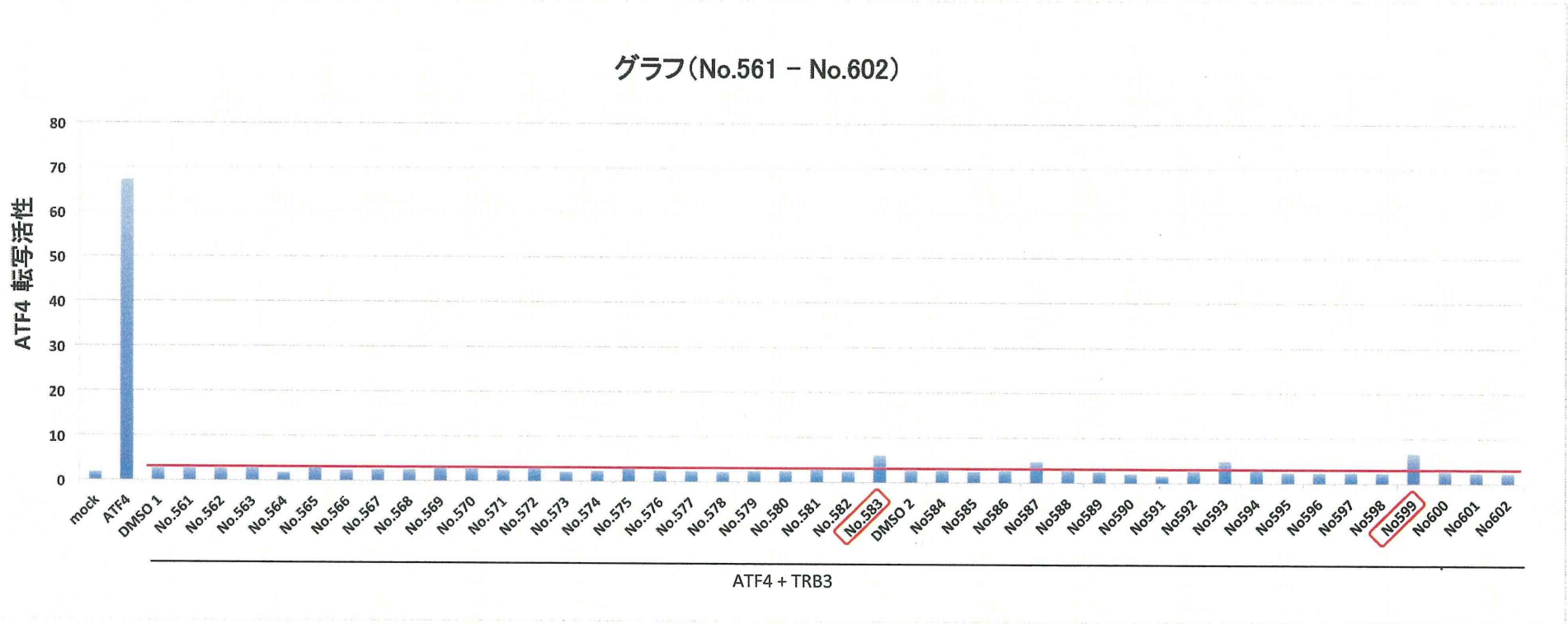


図29 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 15

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料26

図30

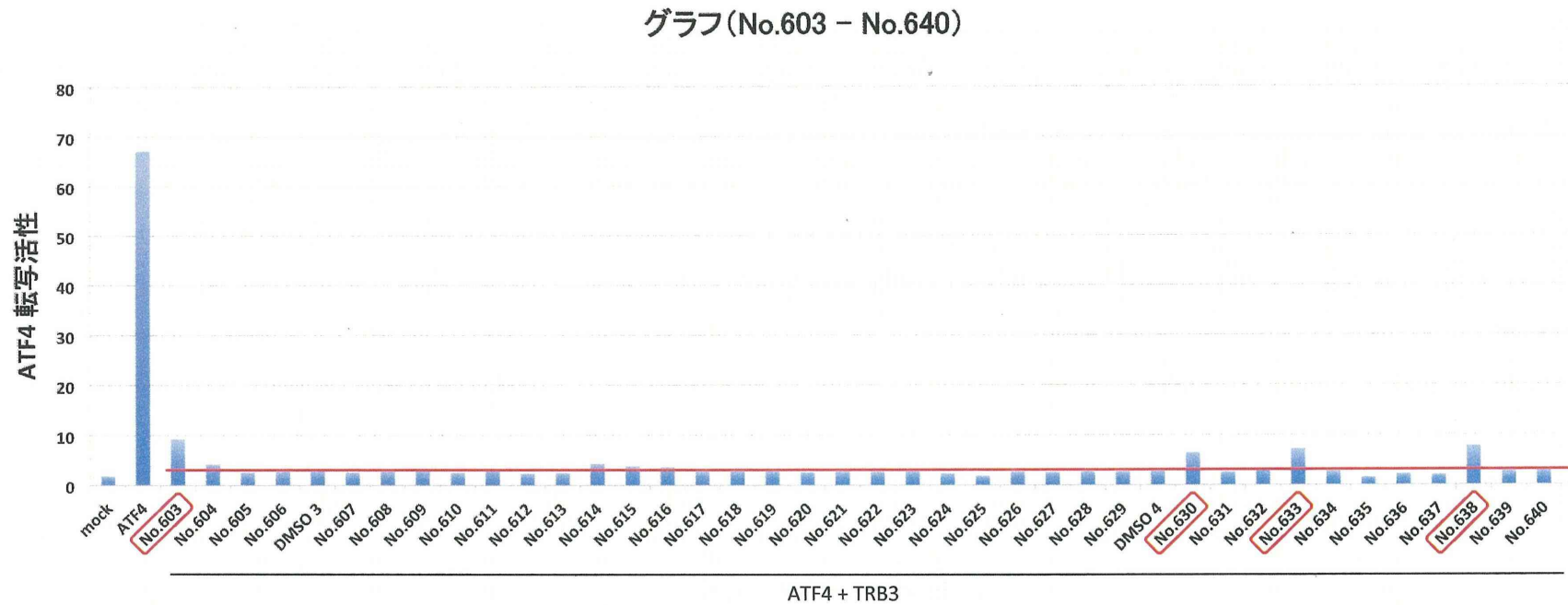


図30 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 16

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)

資料27

図31

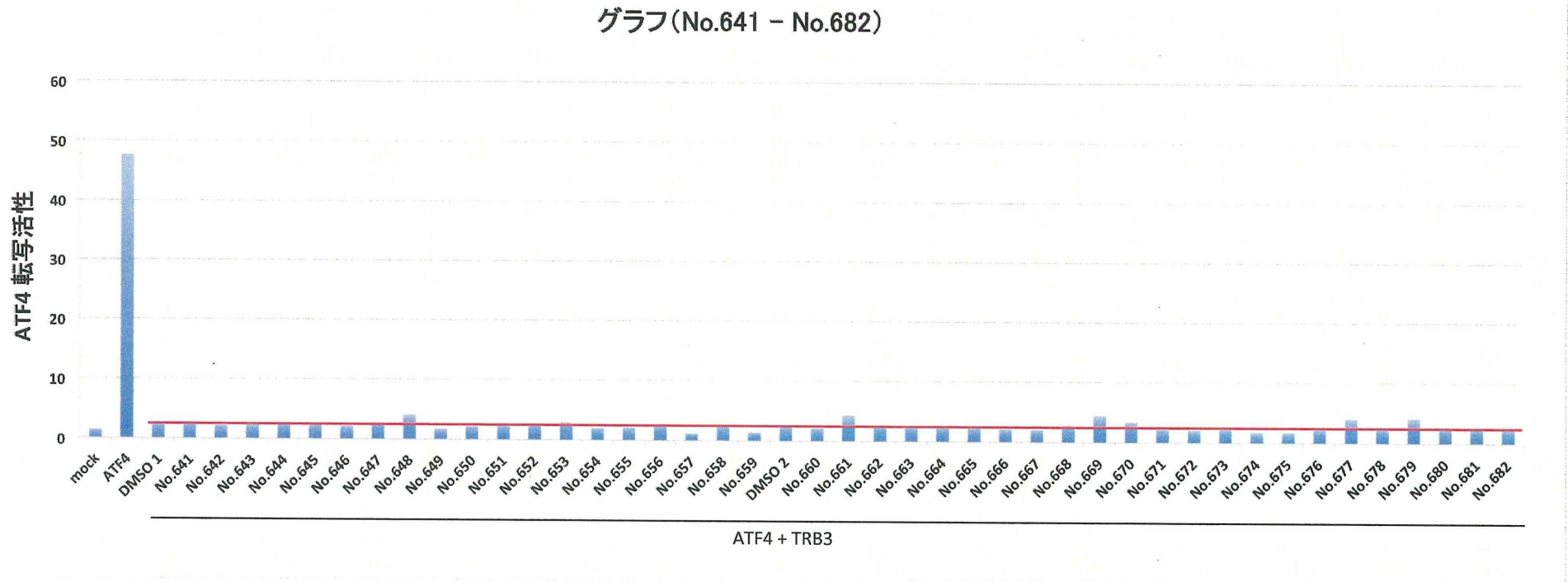


図31 レポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子) 17

HeLa細胞に、ATF4標的遺伝子であるTRB3のプロモーターを含むレポーター遺伝子、ATF4とTRB3の発現ベクター、ウミシイタケコントロールレポーター遺伝子をトランスフェクションし、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 μ Mになるように処理した。さらに16時間後、ルシフェラーゼアッセイを行った。左からレーン1は空ベクターを、レーン2はATF4を、レーン3以降はATF4とTRB3をトランスフェクションした。レーン1、2はDMSOを、レーン3以降はDMSOもしくは記載No.の化合物で処理した。(グラフ中の赤枠、緑枠に関する記載は本文中)