

No.477	2.59	60.77	2.82	-0.39
No.478	1.87	60.77	2.82	-1.63
No.479	3.03	60.77	2.82	0.37
No.480	3.04	60.77	2.82	0.38

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

# 資料37

	A	B	C	抑制度(%)
mock	1.92			
ATF4	67.14			
DMSO 1	2.74	67.14	2.74	0.00
No.481	3.76	67.14	2.74	1.60
No.482	3.15	67.14	2.74	0.65
No.483	2.44	67.14	2.74	-0.45
No.484	2.21	67.14	2.74	-0.81
No.485	2.50	67.14	2.74	-0.37
No.486	4.24	67.14	2.74	2.34
No.487	2.64	67.14	2.74	-0.14
No.488	2.35	67.14	2.74	-0.60
No.489	2.49	67.14	2.74	-0.38
No.490	3.97	67.14	2.74	1.92
No.491	4.90	67.14	2.74	3.36
No.492	5.26	67.14	2.74	3.92
No.493	2.88	67.14	2.74	0.22
No.494	2.31	67.14	2.74	-0.66
No.495	2.37	67.14	2.74	-0.57
No.496	2.55	67.14	2.74	-0.29
No.497	2.61	67.14	2.74	-0.20
No.498	3.28	67.14	2.74	0.84
No.499	2.87	67.14	2.74	0.21
DMSO 2	2.55	67.14	2.55	0.00
No.500	2.66	67.14	2.55	0.16
No.501	2.30	67.14	2.55	-0.39
No.502	2.56	67.14	2.55	0.00
No.503	3.07	67.14	2.55	0.80
No.504	2.47	67.14	2.55	-0.14
No.505	2.99	67.14	2.55	0.68
No.506	1.79	67.14	2.55	-1.19
No.507	3.19	67.14	2.55	0.99
No.508	2.85	67.14	2.55	0.46
No.509	2.70	67.14	2.55	0.22
No.510	2.59	67.14	2.55	0.05
No.511	2.47	67.14	2.55	-0.13
No.512	2.38	67.14	2.55	-0.27
No.513	2.57	67.14	2.55	0.02
No.514	2.96	67.14	2.55	0.63
No.515	2.14	67.14	2.55	-0.65

No.516	2.56	67.14	2.55	0.01
No.517	2.28	67.14	2.55	-0.43
No.518	2.29	67.14	2.55	-0.41
No.519	2.43	67.14	2.55	-0.20
No.520	2.01	67.14	2.55	-0.84
No.521	2.90	67.14	2.55	0.54
No.522	3.72	67.14	2.55	1.81
DMSO 3	2.80	67.14	2.80	0.00
No.523	2.82	67.14	2.80	0.04
No.524	3.01	67.14	2.80	0.34
No.525	2.93	67.14	2.80	0.20
No.526	2.94	67.14	2.80	0.23
No.527	3.36	67.14	2.80	0.88
No.528	2.16	67.14	2.80	-0.99
No.529	2.60	67.14	2.80	-0.30
No.530	2.43	67.14	2.80	-0.57
No.531	5.31	67.14	2.80	3.90
No.532	2.55	67.14	2.80	-0.39
No.533	2.70	67.14	2.80	-0.16
No.534	2.44	67.14	2.80	-0.55
No.535	2.48	67.14	2.80	-0.49
No.536	2.25	67.14	2.80	-0.86
No.537	2.61	67.14	2.80	-0.29
No.538	6.24	67.14	2.80	5.36
No.539	3.00	67.14	2.80	0.32
No.540	2.30	67.14	2.80	-0.77
No.541	3.45	67.14	2.80	1.01
No.542	3.33	67.14	2.80	0.82
No.543	2.60	67.14	2.80	-0.30
No.544	4.31	67.14	2.80	2.36
No.545	2.94	67.14	2.80	0.23
DMSO 4	2.54	67.14	2.54	0.00
No.546	3.34	67.14	2.54	1.24
No.547	2.18	67.14	2.54	-0.56
No.548	2.62	67.14	2.54	0.12
No.549	2.51	67.14	2.54	-0.04
No.550	2.86	67.14	2.54	0.50
No.551	2.24	67.14	2.54	-0.46
No.552	2.63	67.14	2.54	0.15
No.553	5.67	67.14	2.54	4.85
No.554	2.40	67.14	2.54	-0.22
No.555	2.45	67.14	2.54	-0.14
No.556	2.58	67.14	2.54	0.06

No.557	2.53	67.14	2.54	-0.01
No.558	3.28	67.14	2.54	1.15
No.559	3.83	67.14	2.54	2.01
No.560	3.10	67.14	2.54	0.86

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

# 資料38

	A	B	C	抑制度(%)
mock	1.92			
ATF4	67.14			
DMSO 1	2.72	67.14	2.72	0.00
No.561	2.71	67.14	2.72	-0.02
No.562	2.67	67.14	2.72	-0.09
No.563	2.91	67.14	2.72	0.29
No.564	1.87	67.14	2.72	-1.33
No.565	3.17	67.14	2.72	0.70
No.566	2.36	67.14	2.72	-0.57
No.567	2.51	67.14	2.72	-0.33
No.568	2.51	67.14	2.72	-0.34
No.569	3.11	67.14	2.72	0.60
No.570	2.79	67.14	2.72	0.10
No.571	2.48	67.14	2.72	-0.39
No.572	2.91	67.14	2.72	0.29
No.573	2.16	67.14	2.72	-0.88
No.574	2.35	67.14	2.72	-0.58
No.575	3.20	67.14	2.72	0.74
No.576	2.49	67.14	2.72	-0.36
No.577	2.39	67.14	2.72	-0.51
No.578	2.22	67.14	2.72	-0.78
No.579	2.43	67.14	2.72	-0.45
No.580	2.49	67.14	2.72	-0.37
No.581	2.93	67.14	2.72	0.32
No.582	2.41	67.14	2.72	-0.49
No.583	6.08	67.14	2.72	5.21
DMSO 2	2.64	67.14	2.64	0.00
No584	2.67	67.14	2.64	0.04
No585	2.44	67.14	2.64	-0.32
No586	2.66	67.14	2.64	0.03
No587	4.73	67.14	2.64	3.24
No588	2.83	67.14	2.64	0.30
No589	2.49	67.14	2.64	-0.23
No590	2.12	67.14	2.64	-0.81
No591	1.73	67.14	2.64	-1.42
No592	2.65	67.14	2.64	0.01
No593	4.90	67.14	2.64	3.50
No594	2.97	67.14	2.64	0.50
No595	2.41	67.14	2.64	-0.37

No596	2.39	67.14	2.64	-0.39
No597	2.41	67.14	2.64	-0.36
No598	2.36	67.14	2.64	-0.44
No599	6.76	67.14	2.64	6.38
No600	2.68	67.14	2.64	0.06
No601	2.40	67.14	2.64	-0.38
No602	2.32	67.14	2.64	-0.50
No.603	9.27	67.14	2.64	10.28
No.604	4.26	67.14	2.64	2.51
No.605	2.57	67.14	2.64	-0.11
No.606	2.77	67.14	2.64	0.20
DMSO 3	2.88	67.14	2.88	0.00
No.607	2.55	67.14	2.88	-0.50
No.608	2.74	67.14	2.88	-0.22
No.609	2.94	67.14	2.88	0.10
No.610	2.51	67.14	2.88	-0.57
No.611	2.95	67.14	2.88	0.11
No.612	2.36	67.14	2.88	-0.81
No.613	2.48	67.14	2.88	-0.62
No.614	4.35	67.14	2.88	2.28
No.615	3.83	67.14	2.88	1.48
No.616	3.62	67.14	2.88	1.15
No.617	2.71	67.14	2.88	-0.27
No.618	2.77	67.14	2.88	-0.16
No.619	2.83	67.14	2.88	-0.07
No.620	2.58	67.14	2.88	-0.47
No.621	2.77	67.14	2.88	-0.17
No.622	2.65	67.14	2.88	-0.35
No.623	2.80	67.14	2.88	-0.13
No.624	2.31	67.14	2.88	-0.88
No.625	1.96	67.14	2.88	-1.43
No.626	2.63	67.14	2.88	-0.38
No.627	2.60	67.14	2.88	-0.43
No.628	2.66	67.14	2.88	-0.34
No.629	2.67	67.14	2.88	-0.32
DMSO 4	2.74	67.14	2.74	0.00
No.630	6.55	67.14	2.74	5.91
No.631	2.57	67.14	2.74	-0.26
No.632	3.37	67.14	2.74	0.98
No.633	7.30	67.14	2.74	7.08
No.634	2.70	67.14	2.74	-0.06
No.635	1.55	67.14	2.74	-1.85
No.636	2.21	67.14	2.74	-0.82

No.637	2.09	67.14	2.74	-1.01
No.638	7.83	67.14	2.74	7.91
No.639	2.69	67.14	2.74	-0.08
No.640	2.82	67.14	2.74	0.13

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

# 資料39

	A	B	C	抑制度(%)
mock	1.47			
ATF4	47.67			
DMSO 1	2.68	47.67	2.68	0.00
No.641	2.73	47.67	2.68	0.09
No.642	2.21	47.67	2.68	-1.06
No.643	2.33	47.67	2.68	-0.79
No.644	2.55	47.67	2.68	-0.30
No.645	2.52	47.67	2.68	-0.36
No.646	2.19	47.67	2.68	-1.10
No.647	2.75	47.67	2.68	0.14
No.648	4.10	47.67	2.68	3.14
No.649	1.73	47.67	2.68	-2.12
No.650	2.20	47.67	2.68	-1.09
No.651	2.40	47.67	2.68	-0.63
No.652	2.52	47.67	2.68	-0.36
No.653	2.89	47.67	2.68	0.46
No.654	1.93	47.67	2.68	-1.67
No.655	2.09	47.67	2.68	-1.33
No.656	2.53	47.67	2.68	-0.34
No.657	1.22	47.67	2.68	-3.26
No.658	2.63	47.67	2.68	-0.13
No.659	1.46	47.67	2.68	-2.73
DMSO 2	2.59	47.67	2.59	0.00
No.660	2.17	47.67	2.59	-0.92
No.661	4.31	47.67	2.59	3.82
No.662	2.65	47.67	2.59	0.13
No.663	2.58	47.67	2.59	-0.02
No.664	2.51	47.67	2.59	-0.17
No.665	2.34	47.67	2.59	-0.55
No.666	2.17	47.67	2.59	-0.92
No.667	2.01	47.67	2.59	-1.28
No.668	2.80	47.67	2.59	0.46
No.669	4.44	47.67	2.59	4.10
No.670	3.38	47.67	2.59	1.77
No.671	2.24	47.67	2.59	-0.77
No.672	2.09	47.67	2.59	-1.11
No.673	2.31	47.67	2.59	-0.61
No.674	1.77	47.67	2.59	-1.81
No.675	1.74	47.67	2.59	-1.88



No.676	2.30	47.67	2.59	-0.64
No.677	4.07	47.67	2.59	3.29
No.678	2.52	47.67	2.59	-0.15
No.679	4.17	47.67	2.59	3.51
No.680	2.59	47.67	2.59	0.01
No.681	2.48	47.67	2.59	-0.23
No.682	2.41	47.67	2.59	-0.40
DMSO 3	2.56	47.67	2.56	0.00
No.683	2.33	47.67	2.56	-0.51
No.684	2.05	47.67	2.56	-1.13
No.685	3.86	47.67	2.56	2.88
No.686	2.65	47.67	2.56	0.20
No.687	2.49	47.67	2.56	-0.16
No.688	4.01	47.67	2.56	3.22
No.689	2.25	47.67	2.56	-0.69
No.690	2.01	47.67	2.56	-1.21
No.691	2.20	47.67	2.56	-0.80
No.692	3.23	47.67	2.56	1.50
No.693	1.99	47.67	2.56	-1.27
No.694	1.89	47.67	2.56	-1.47
No.695	1.89	47.67	2.56	-1.49
No.696	2.01	47.67	2.56	-1.21
No.697	3.97	47.67	2.56	3.13
No.698	2.23	47.67	2.56	-0.73
No.699	1.88	47.67	2.56	-1.49
No.700	2.00	47.67	2.56	-1.24
No.701	1.73	47.67	2.56	-1.84
No.702	1.94	47.67	2.56	-1.38
No.703	2.45	47.67	2.56	-0.23
No.704	2.36	47.67	2.56	-0.45
No.705	2.35	47.67	2.56	-0.45
DMSO 4	1.75	47.67	1.75	0.00
No.706	3.16	47.67	1.75	3.07
No.707	3.68	47.67	1.75	4.21
No.708	1.96	47.67	1.75	0.47
No.709	2.01	47.67	1.75	0.56
No.710	2.10	47.67	1.75	0.77
No.711	1.98	47.67	1.75	0.50
No.712	2.54	47.67	1.75	1.73
No.713	2.10	47.67	1.75	0.77
No.714	2.16	47.67	1.75	0.88
No.715	2.20	47.67	1.75	0.99
No.716	2.28	47.67	1.75	1.16

No.717	1.34	47.67	1.75	-0.89
No.718	1.94	47.67	1.75	0.40
No.719	3.43	47.67	1.75	3.66
No.720	2.72	47.67	1.75	2.11
No.721	2.28	47.67	1.75	1.16

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

# 資料40

	A	B	C	抑制度(%)
mock	1.26			
ATF4	39.29			
DMSO 1	2.26	39.29	2.26	0.00
No.722	2.23	39.29	2.26	-0.07
No.723	1.40	39.29	2.26	-2.30
No.724	2.08	39.29	2.26	-0.48
No.725	2.34	39.29	2.26	0.22
No.726	1.93	39.29	2.26	-0.89
No.727	1.88	39.29	2.26	-1.02
No.728	2.44	39.29	2.26	0.51
No.729	2.21	39.29	2.26	-0.13
No.730	2.16	39.29	2.26	-0.25
No.731	2.19	39.29	2.26	-0.19
No.732	1.47	39.29	2.26	-2.13
No.733	2.32	39.29	2.26	0.18
No.734	2.19	39.29	2.26	-0.19
No.735	1.89	39.29	2.26	-0.98
No.736	6.23	39.29	2.26	10.73
No.737	2.55	39.29	2.26	0.80
No.738	7.23	39.29	2.26	13.42
No.739	6.03	39.29	2.26	10.18
No.740	2.55	39.29	2.26	0.78
DMSO 2	2.11	39.29	2.11	0.00
No.741	2.10	39.29	2.11	-0.02
No.742	7.96	39.29	2.11	15.73
No.743	7.52	39.29	2.11	14.57
No.744	2.47	39.29	2.11	0.98
No.745	7.43	39.29	2.11	14.32
No.746	6.36	39.29	2.11	11.44
No.747	6.51	39.29	2.11	11.83
No.748	7.97	39.29	2.11	15.76
No.749	6.70	39.29	2.11	12.37
No.750	7.03	39.29	2.11	13.24
No.751	2.33	39.29	2.11	0.62
No.752	1.81	39.29	2.11	-0.79
No.753	1.26	39.29	2.11	-2.28
No.754	5.88	39.29	2.11	10.14
No.755	2.17	39.29	2.11	0.16
No.756	3.95	39.29	2.11	4.97

No.757	3.02	39.29	2.11	2.47
No.758	0.30	39.29	2.11	-4.86
No.759	4.17	39.29	2.11	5.54
No.760	2.47	39.29	2.11	0.97
No.761	3.38	39.29	2.11	3.42
No.762	2.59	39.29	2.11	1.30
No.763	3.04	39.29	2.11	2.52
DMSO 3	2.35	39.29	2.35	0.00
No.764	3.02	39.29	2.35	1.81
No.765	2.01	39.29	2.35	-0.90
No.766	6.86	39.29	2.35	12.21
No.767	2.39	39.29	2.35	0.12
No.768	4.74	39.29	2.35	6.48
No.769	0.32	39.29	2.35	-5.48
No.770	2.13	39.29	2.35	-0.57
No.771	3.76	39.29	2.35	3.82
No.772	2.85	39.29	2.35	1.37
No.773	2.53	39.29	2.35	0.49
No.774	2.57	39.29	2.35	0.59
No.775	2.67	39.29	2.35	0.87
No.776	2.02	39.29	2.35	-0.89
No.777	13.19	39.29	2.35	29.36
No.778	3.34	39.29	2.35	2.69
No.779	1.61	39.29	2.35	-2.00
No.780	2.52	39.29	2.35	0.46
No.781	2.24	39.29	2.35	-0.29
No.782	2.00	39.29	2.35	-0.93
No.783	2.07	39.29	2.35	-0.74
No.784	2.29	39.29	2.35	-0.14
No.785	10.63	39.29	2.35	22.43
No.786	4.42	39.29	2.35	5.63
DMSO 4	2.38	39.29	2.38	0.00
No787	2.33	39.29	2.38	-0.13
No788	3.17	39.29	2.38	2.13
No789	0.74	39.29	2.38	-4.46
No790	2.91	39.29	2.38	1.43
No791	2.97	39.29	2.38	1.60
No792	1.40	39.29	2.38	-2.66
No793	1.86	39.29	2.38	-1.40
No794	2.06	39.29	2.38	-0.86
No795	2.21	39.29	2.38	-0.46
No796	2.73	39.29	2.38	0.94
No797	3.79	39.29	2.38	3.81

No798	2.84	39.29	2.38	1.25
No799	7.07	39.29	2.38	12.71
No800	2.58	39.29	2.38	0.55
No801	4.06	39.29	2.38	4.55
No802	10.47	39.29	2.38	21.91

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

# 資料41

図35

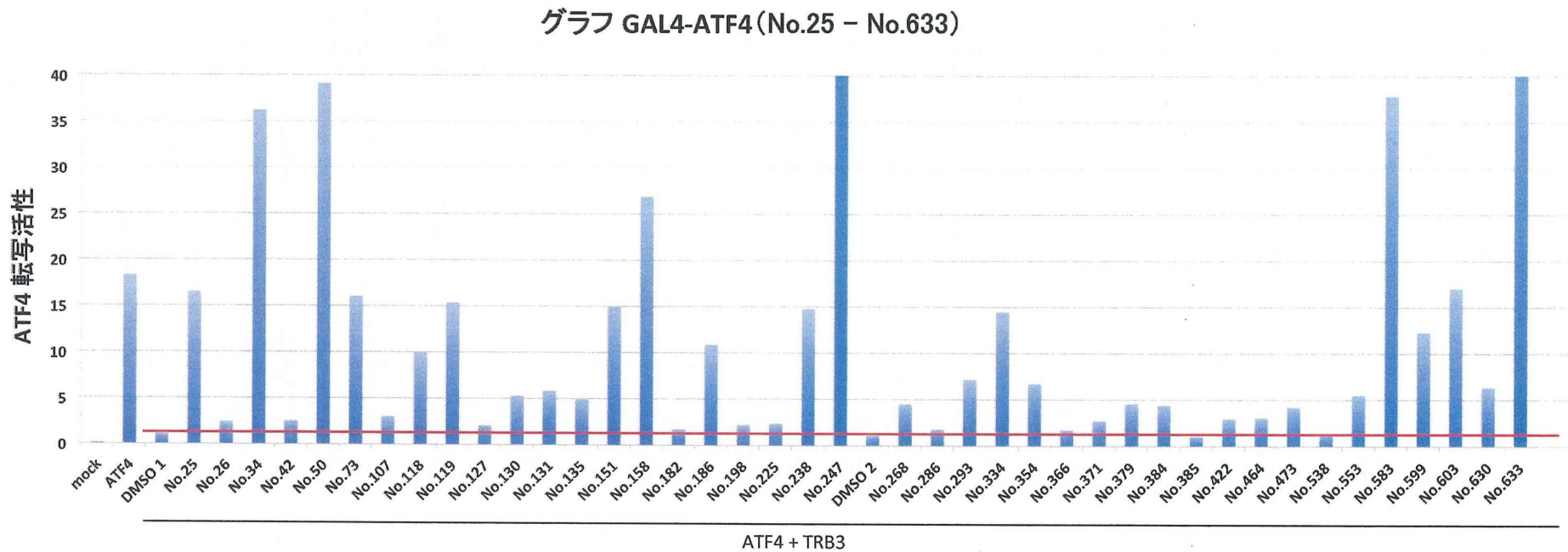


図35 レポーターアッセイスクリーニング (GAL4-ATF4) 1

HeLa細胞に、GAL4結合配列であるUAS配列を含んだレポーター遺伝子、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、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 $\mu$ 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GAL4-ATF4を、レーン3以降はGAL4-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。

# 資料42

図36

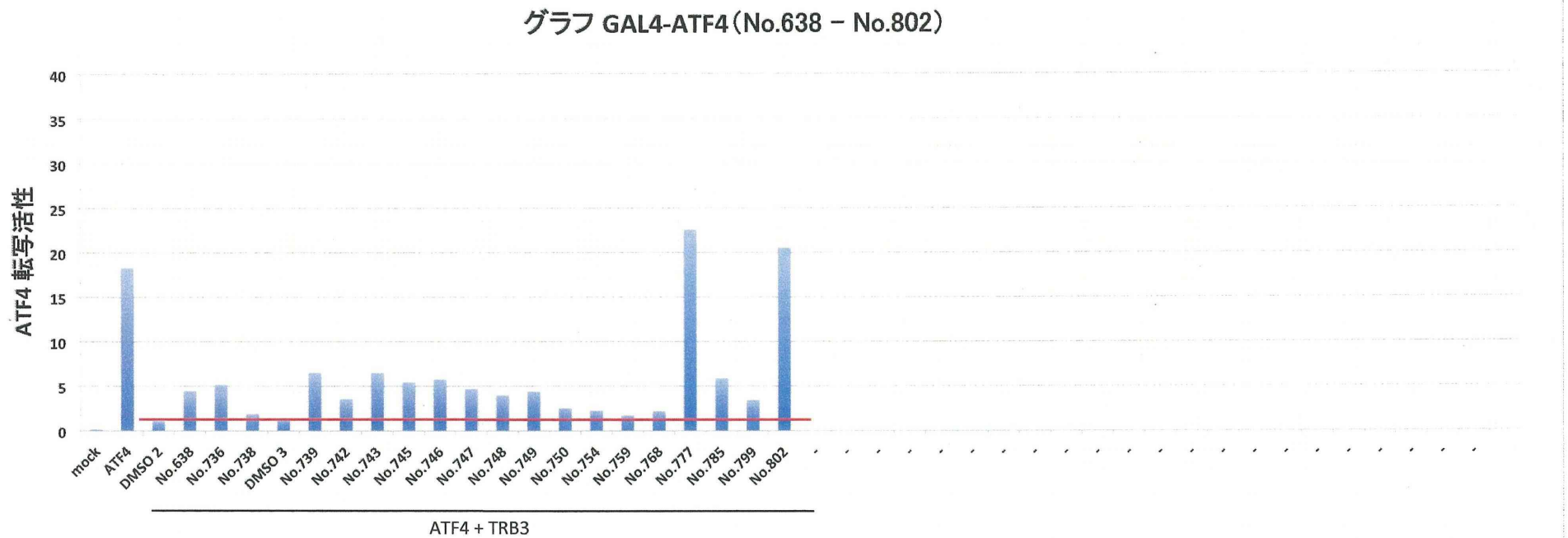


図36 レポーターアッセイスクリーニング (GAL4-ATF4) 2

HeLa細胞に、GAL4結合配列であるUAS配列を含んだレポーター遺伝子、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、24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 $\mu$ 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GAL4-ATF4を、レーン3以降はGAL4-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。

# 資料43

	A	B	C	抑制度(%)
mock	0.13			
ATF4	18.32			
DMSO 1	1.12	18.32	1.12	0.00
No.25	16.49	18.32	1.12	89.32
No.26	2.44	18.32	1.12	7.69
No.34	36.22	18.32	1.12	204.04
No.42	2.55	18.32	1.12	8.34
No.50	39.13	18.32	1.12	220.96
No.73	16.05	18.32	1.12	86.78
No.107	2.99	18.32	1.12	10.90
No.118	9.99	18.32	1.12	51.58
No.119	15.34	18.32	1.12	82.68
No.127	2.10	18.32	1.12	5.68
No.130	5.31	18.32	1.12	24.34
No.131	5.86	18.32	1.12	27.56
No.135	4.93	18.32	1.12	22.14
No.151	14.97	18.32	1.12	80.50
No.158	26.86	18.32	1.12	149.63
No.182	1.72	18.32	1.12	3.50
No.186	10.87	18.32	1.12	56.67
No.198	2.23	18.32	1.12	6.48
No.225	2.38	18.32	1.12	7.31
No.238	14.75	18.32	1.12	79.23
No.247	131.39	18.32	1.12	757.23
No.268	4.50	18.32	1.12	19.68
DMSO 2	1.10	18.32	1.10	0.00
No.286	1.79	18.32	1.10	4.01
No.293	7.17	18.32	1.10	35.26
No.334	14.48	18.32	1.10	77.68
No.354	6.70	18.32	1.10	32.52
No.366	1.71	18.32	1.10	3.54
No.371	2.73	18.32	1.10	9.46
No.379	4.54	18.32	1.10	19.99
No.384	4.41	18.32	1.10	19.19
No.385	1.04	18.32	1.10	-0.33
No.422	2.94	18.32	1.10	10.71
No.464	3.07	18.32	1.10	11.46
No.473	4.22	18.32	1.10	18.10
No.538	1.24	18.32	1.10	0.83



No.553	5.50	18.32	1.10	25.57
No.583	37.87	18.32	1.10	213.53
No.599	12.30	18.32	1.10	65.05
No.603	17.03	18.32	1.10	92.51
No.630	6.31	18.32	1.10	30.25
No.633	53.28	18.32	1.10	303.02
No.638	4.45	18.32	1.10	19.46
No.736	5.16	18.32	1.10	23.59
No.738	1.87	18.32	1.10	4.49
DMSO 3	1.31	18.32	1.31	0.00
No.739	6.54	18.32	1.31	30.72
No.742	3.55	18.32	1.31	13.17
No.743	6.52	18.32	1.31	30.65
No.745	5.44	18.32	1.31	24.26
No.746	5.74	18.32	1.31	26.05
No.747	4.65	18.32	1.31	19.64
No.748	3.97	18.32	1.31	15.62
No.749	4.39	18.32	1.31	18.12
No.750	2.53	18.32	1.31	7.19
No.754	2.25	18.32	1.31	5.54
No.759	1.71	18.32	1.31	2.36
No.768	2.20	18.32	1.31	5.24
No.777	22.55	18.32	1.31	124.87
No.785	5.91	18.32	1.31	27.02
No.799	3.44	18.32	1.31	12.51
No.802	20.54	18.32	1.31	113.01

A: ATF4転写活性

B: ATF4のみ発現させたときのATF4転写活性

C: ATF4とTRB3を発現させ、DMSOを加えたときのATF4転写活性

$$\text{抑制度(\%)} = 100 - \{ (B-A) / (B-C) \times 100 \}$$

小数点以下2桁まで表示

図37

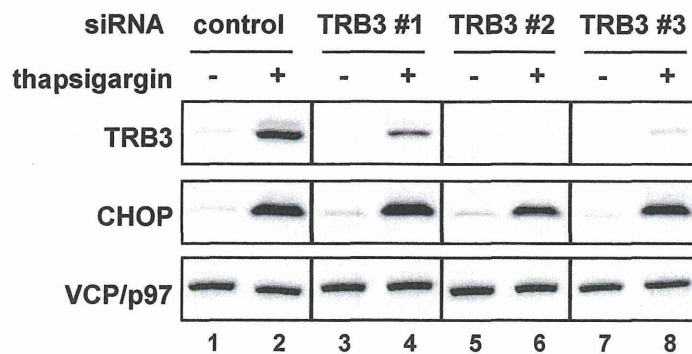


図37. 3種類のTRB3に対するsiRNAを用いてTRB3ノックダウン効率を調べた。HeLa細胞に、図に示すようにcontrol siRNA, もしくはTRB3 siRNA (#1, #2, #3)をトランスフェクションした。36時間後、100nM thapsigarginで6時間処理し、細胞のlysateを回収した。図に示したタンパク質の発現をそれぞれの抗体を用いたイムノプロットにより解析した。(CHOPは小胞体ストレスマーカー、VCP/p97はローディングコントロールとして用いた。)

資料45

図38

グラフ TRB3 ノックダウン

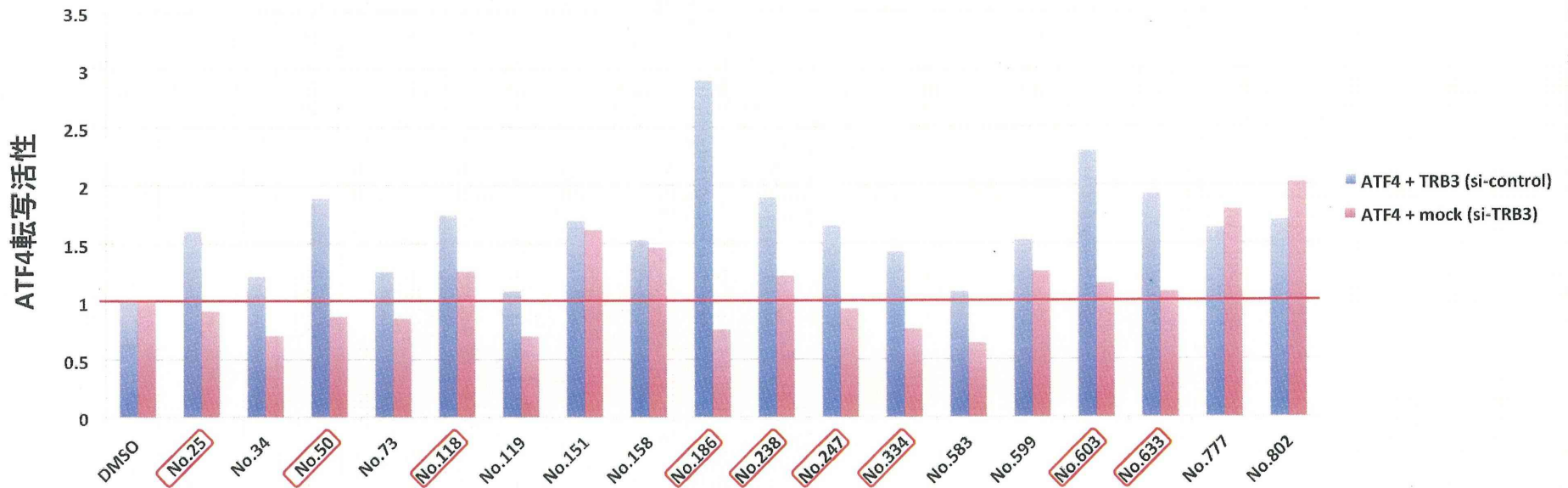


図38 TRB3をノックダウンしたときのレポーターアッセイスクリーニング(ATF4標的遺伝子)

HeLa細胞に、control siRNAもしくはTRB3 siRNA(#2)をトランスフェクションした。24時間後、control siRNAをトランスフェクションしたのものには、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(青バーグラフ)、TRB3 siRNAをトランスフェクションしたのものには、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、空ベクター、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た(赤バーグラフ)。24時間後、DMSOもしくはライブラリー化合物を終濃度20 $\mu$ 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。TRB3を発現させた状態(青バーグラフ)及びTRB3をノックダウンした状態(赤バーグラフ)のDMSO処理時の値を1として、それぞれ化合物を加えたときの相対的な値を算出し、グラフ化した。

図39

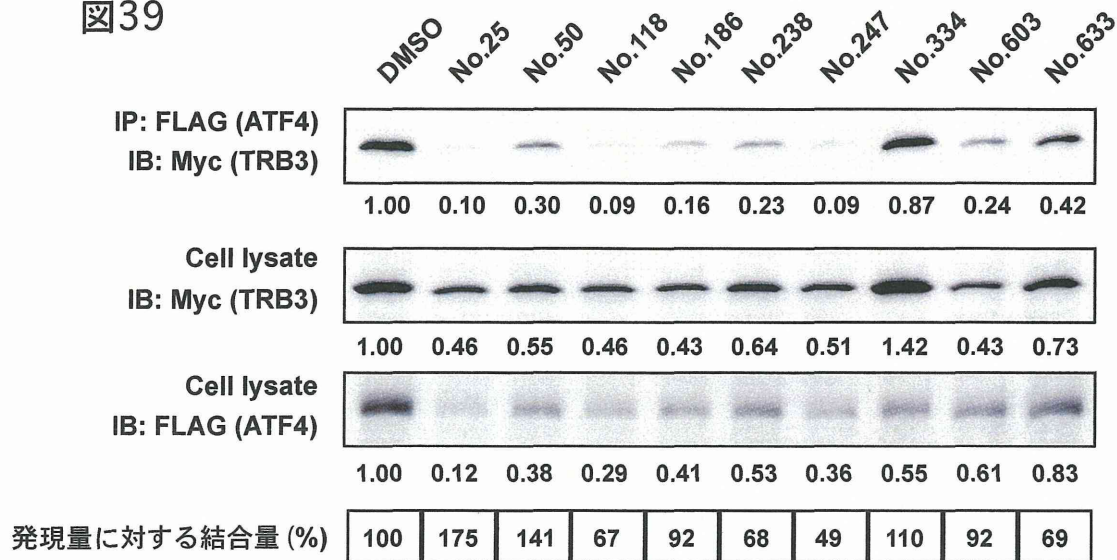


図39. 選別された化合物添加によるTRB3とATF4の結合への影響を調べた。

HeLa細胞に、Myc-TRB3及びFlag-ATF4をトランスフェクションした。24時間後、図に示す様にDMSOもしくはそれぞれ終濃度20 $\mu$ Mの化合物で16時間処理した。細胞をlysisし、さらに終濃度200 $\mu$ Mとなるように化合物を添加後、anti-FLAG抗体で免疫沈降し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロットを行った。それぞれのバンドの発光強度を定量化し、DMSO添加時に対する相対的な量をバンドの下に示した。また、Myc-TRB3及びFlag-ATF4の発現量を考慮したDMSO添加時に対する相対的なTRB3-ATF4結合量を算出し(%)、図の下に表記した。