

## II. 実験方法

### 1. 材料

合成 PACAP38 (ペプチド工業, 大阪)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、ウシ胎児血清、ウマ血清 (GIBCO, USA)、プラスミド抽出キット 'Plasmid Midi kit' (QIAGEN, Germany)、RNA 抽出試薬 ISOGEN (日本ジーン, 富山)、ハイブリダイゼーション用ナイロンメンブラン 'Gene Screen Plus'、DNA ラベリングキット 'NEN Hybridization probe labeling system' (Du Pont, USA)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (Amersham, UK)、各種制限酵素、コンピテント細胞 'JM109'、5'末端ラベリングキット 'MEGALABEL' (宝酒造, 東京)、DNA 精製キット 'Gene Clean II kit' (BIO 101, USA)、poly [dI-dC] (SIGMA, USA)、スーパーシフト分析用特異抗体；抗 c-Fos, FosB, c-Jun, JunB, JunD, CREB (Santa Cruz Biotechnology, USA) は購入して使用した。

ゲル移動度シフト分析に使用したオリゴヌクレオチドプローブは DNA カスタム合成サービス (日清紡, 東京) の受注委託生産により入手した。

ノーザンブロット分析に使用した cDNA プローブ；ヒト c-fos (中別府雄作博士, 九州大学)、ヒト fra-1, fra-2, ラット fosB (松井南博士, 理化学研

研究所 DNA バンク) , ヒト *c-jun*, *junB*, *junD* (野村信夫博士, かずさ DNA 研究所) は、プラスミドあるいはファージ中にクローニングされた状態で譲り受けた。プラスミドにクローン化された cDNA は、42°C, 45 秒間の熱ショック法でコンピテント細胞にトランスフェクションし、アンピシリン添加 LB 培地で選択的に増菌した。M13 ファージにクローン化されている cDNA は、LB 寒天培地にコンピテント細胞と共に培養しプラークを作り、プラークを白金線で拾いアンピシリン添加 LB 培地で選択的に増菌した。集菌後プラスミド, ファージを抽出・精製し、制限酵素処理, アガロースゲル電気泳動にて目的 cDNA を確認した後、ゲル中から DNA を切り出し精製した。また、PC12 細胞は理化学研究所細胞バンク (つくば市) から譲り受けた。

その他の試薬・器具類は遺伝子工学操作に適した等級のものを用いた。

## 2. PC12 細胞培養と PACAP 刺激

### 2-1. PC12 細胞の調整

ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞は、適宜継代培養して用いた。

−80℃で保存された PC12 細胞を 37℃の水浴中ですばやく溶解し、ただちに氷冷した。ウマ血清 (10%) , ウシ胎児血清 (5%) 添加 DMEM 10 ml 中に細胞を浮遊し、1000 rpm (200-300 g) 1 分間遠心分離、上清を吸引除去後、新しい培地に細胞を浮遊し 25 cm<sup>2</sup> フラスコを使用し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37℃のインキュベータ中で培養した。

一日置きに培地を交換しながら細胞の増殖を観察し、100%コンフルエントに達したときは、細胞をカルシウムフリーリン酸緩衝生理食塩液 (pH 7.2) [PBS(-)] で洗淨、0.25%トリプシン処理にて細胞をフラスコ表面から遊離し、再度 PBS(-) で洗淨後、複数のフラスコに分けて継代培養した。

PACAP による刺激実験のときには 35 mm 培養シャーレを使用し培養した。約 80%コンフルエントの状態時に PACAP 刺激などの実験に供した。

### 2-2. PACAP 刺激実験

乾燥凍結された合成 PACAP38 を滅菌精製水を使用し 100 μM に希釈、保存液

として小分けし $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

PC12 細胞の刺激実験には、PACAP 用量依存性では  $0.1\text{ nM}\sim 10\text{ nM}$  の濃度に培養メディウムを用い調整した。その他、経時的变化を観察するような実験には、明らかな効果を示した PACAP  $3\text{ nM}$  濃度にメディウムで希釈調整し、培地交換と共に細胞の PACAP 刺激を行った。

### 3. ノーザンブロット分析

PACAP の PC12 細胞における初期応答遺伝子発現効果を確認するため、ノーザンブロット分析を実施した。

PACAP 刺激した PC12 細胞は、メディウムを吸引除去し PBS (-) で一度洗浄した。ただちにフェノール・グアニジン法に基づく RNA 抽出試薬 'ISOGEN' を 1 ml 加え 1.5 ml マイクロチューブに移し、使用手順にしたがって細胞内から総 RNA として抽出し、アルコール沈殿法で濃縮・精製した。RNA は 260 nm の吸光度測定により定量し、各 10  $\mu$ g に統一してノーザンブロット分析のサンプルとした。

RNA サンプルは 95°C, 2 分間で熱変性後、1%アガロースホルムアルデヒド変性ゲルにて電気泳動 (1× MOPS Buffer, 80 V, 2 時間) して分画した。電気泳動後のアガロースゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射により 18S, 28S-リボソーム RNA の量的な差が無いことを確認した。

電気泳動ゲルを滅菌精製水で洗浄した後、10×SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Sodium Citrate) を用いてハイブリダイゼーション用ナイロンメンブランへ RNA をトランスファーした。メンブランは 80°C, 120 分間のインキュベートでペー

キング固定して保存した。

ナイロンメンブランをプレハイブリダイゼーション溶液で 42°C, 3 時間処理している間、ランダムプライマー法によりプローブ cDNA を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で標識した。プレハイブリダイズに続いて、標識プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液で 42°C, 16 時間インキュベートしてプローブ cDNA をハイブリダイズした。

反応後のメンブランは、洗浄液①(2×SSC, 1% SDS)で 50°C, 15 分間の洗浄を 5 回行い、6 回目は 65°C で 60 分間、さらに、洗浄液②(0.1×SSC, 0.1% SDS)で 50°C, 15 分間の洗浄操作を 2 回行った。洗浄後のメンブランをハイブリダイゼーションバッグ中に密封し、イメージングプレート上に 16 時間露光した。画像分析および放射活性の定量化は BAS-2000 イメージングアナライザー (富士フィルム, 東京) を使用した。

## 4. ゲル移動度シフト分析およびスーパーシフト分析

### 4-1. 核蛋白質の抽出

PACAP 刺激した PC12 細胞は、メディウムを吸引除去し PBS (-) で一度洗浄した。1 ml の PBS (-) 中にセルスクレパーにより細胞を浮遊し、1.5 ml マイクロチューブに移した。マイクロ遠心機で 5000 rpm, 1 分間遠心分離、上清を吸引除去後、細胞溶解液 A (10 mM HEPES pH 7.8, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1mM PMSF) 500  $\mu$ l に浮遊しピペットチップ内でよく混和した。0°C, 15 分間静置した後、10% NP40 を 50  $\mu$ l 添加した。細胞浮遊液をボルテックスミキサーでよく攪拌した後、4°C, 15000 rpm, 10 分間遠心分離し、上清吸引後の沈殿物に細胞溶解液 B (20 mM HEPES pH 7.8, 0.4M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, 1 mM PMSF) 200  $\mu$ l を加え、0°C, 15 分間インキュベートした。サンプルは 4°C, 15000 rpm, 15 分間遠心分離し、上清を粗製核蛋白質抽出液として採取した。核蛋白質サンプルは 280, 320 nm 吸光度からおおよその蛋白質量を測定し -80°C で保存した。

### 4-2. ゲル移動度シフト分析

PACAP により発現増強した初期応答遺伝子産物と TH 5'-flanking 領域に存

在するシスエレメントとの関連を確認するため、TRE, CRE 配列を持つオリゴヌクレオチドプローブによるゲル移動度シフト分析を実施した。

合成オリゴヌクレオチド（ラット TH-TRE; 5'-GAGGATGATTCAGAGGCAGG-3', ラット TH-CRE; 5'-GGCTTTGACGTCAGCCTGGC-3'）をプローブ、あるいは競合反応用の競合物として使用した。オリゴヌクレオチドはセンス、アンチセンス鎖をアニーリングして2本鎖DNAとし、5'末端ラベリングキットのT4 polynucleotide kinaseにより [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (3000 Ci/mmol)を標識した。

核蛋白抽出液（各5 $\mu\text{g}$ ）を反応緩衝液（10 mM HEPES pH 7.8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.7 mM PMSF, 5% glycerol, 3 $\mu\text{l}$  poly-[dI-dC]）20 $\mu\text{l}$ で0 $^{\circ}\text{C}$ 、15分間プレインキュベートし、標識プローブ（0.5 ng）を添加して室温にて30分間反応させた。

反応サンプルは、5%ポリアクリルアミドゲルをスラブ型電気泳動装置で電気泳動（0.5 $\times$ TBE, 100 V, 3~5時間）して分画した。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを精製水で2回洗浄した後、ゲルをラッピングバッグ中に密封した状態でイメージングプレート上に16時間露光した。画像解析および放射活性の定量化はBAS-2000 イメージングアナライザー（富士フィルム、東京）



を使用した。

#### 4-3. スーパーシフト分析

DNA-核蛋白複合体中の関連蛋白を特定するため、各種核蛋白質に対する特異的抗体を用いたスーパーシフト分析を行った。

核蛋白抽出液 (各  $5\mu\text{g}$ ) を反応緩衝液 (10 mM HEPES pH 7.8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.7 mM PMSF, 5% glycerol,  $3\mu\text{l}$  poly- [dI-dC] )  $20\mu\text{l}$  に加え、さらに各種特異的抗体を各々  $1.5\mu\text{l}$  添加し、室温で 30 分間インキュベートした。その後、標識オリゴヌクレオチドプローブ (0.5 ng) を反応させ、上記と同様のゲル移動度シフト分析を行った。特異的抗体が結合する場合、DNA-核蛋白-特異抗体複合体が形成し、移動度のさらに遅いバンドを確認することができる。

#### 4-4. ニコチンとの比較

PACAP の作用とニコチンの作用を比較するため、ニコチンの最大効果濃度  $10\mu\text{M}$  で PC12 細胞を刺激し、上記と同様のゲル移動度シフト分析、スーパーシフト分析を行った。