論文題目　血液細胞における Tec tyrosine kinase の解析

指導教官　　矢崎義雄教授

平成２年４月　入学

東京大学大学院医学系研究科
第３種博士課程（医学）
第一臨床医学専攻

佐　藤　　誠

①

論文題目　血液細胞におけるTec tyrosine kinaseの解析

指導教官名　　矢崎義雄教授

平成２年４月　入学
東京大学大学院医学系研究科
第３種博士課程（医学）
第一臨床医学専攻

氏名　佐藤　謙

目次

第１章　研究の背景・・・

第１章　研究の背景

Tecはマウスの血液細胞と肝細胞で高発現が認められる非受容体型tyrosine kinaseである（１、２）。N末端側からunique domain、src homology 3（SH3）domain、src homology 2（SH2）domain、catalytic domainというc-Srcと類似した構造を持っている。しかし、N末端のunique domainが長くミリスチリン酸結合部位が無いことやC末端にkinase活性を抑制する働きのあるc-Srcの527番のtyrosine残基に相当するtyrosine残基を持たないことなどの点でc-Srcとは異なっている（図１）。マウスTec蛋白質はalternative splicingにより4種類のサブタイプ（type I-IV）が存在し、それらはunique domainのN末側、SH3 domainのC末側領域からSH2 domainのN端までの間、およびC末端の領域がそれぞれ異なっている（図２）。Tec type Iの最初のunique domainのmethionineから14アミノ酸残基が、他のtypeでは別の95アミノ酸残基に置換されている。SH3 domainはtype IVが通常のSH3 domainに相当する60アミノ酸残基からなるSH3 domain（以下SH3Lとする）を持つのに対して、他のtypeはSH3LのC末端側の19アミノ酸とtype IVに存在するSH3 domainとSH2 domainの間の3アミノ酸残基、併せて22アミノ酸が欠損している。C末端に関してはtype IIのC末端の21アミノ酸残基が他のtypeでは別の27アミノ酸残基に置換されている。

最近、Tec類似のtyrosine kinaseであるItk/Tsk（３、４）およびBtk（５、６）のcDNAが相次いでクローニングされ、これらが非受容体型tyrosine kinaseのなかでサブファミリーを形成していることがわかった。興味深いことにこれらのtyrosine kinaseは血液細胞で強く発現している点が共通している。*itk/tsk*はＴ細胞に特異的に発現がみられ、IL-2で発現が誘導される72 KDaのtyrosine kinaseをコードしている遺伝子で、IL-2の情報伝達に関与している可能性がある（３）。*btk*は分子量77 KDaのtyrosine kinaseをコードしている遺伝子で、免疫グロブリン産生異常を引き起こすヒトのX-linked agammaglobulinemia（XLA）（５、６）やマウスのX-linked immunodeficiency（XID）（７、８）の責任遺伝子と考えられている。実際、ヒトXLAでは*btk*の発現が欠失している症例（６）やkinase domainをコードしている領域の点突然変異により

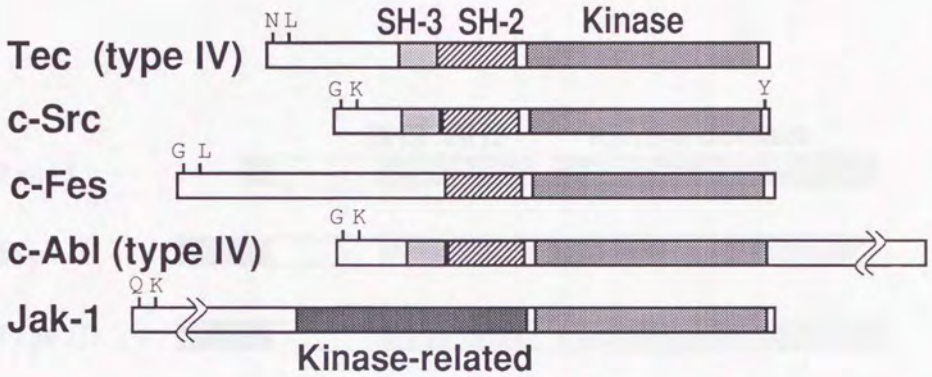


図１　非受容体型tyrosine kinase

各tyrosine kinaseのdomain構造を図示する。また、各tyrosine kinaseの第2番、第7番アミノ酸残基、およびc-Srcの第527番のアミノ酸残基であるtyrosineを示す。

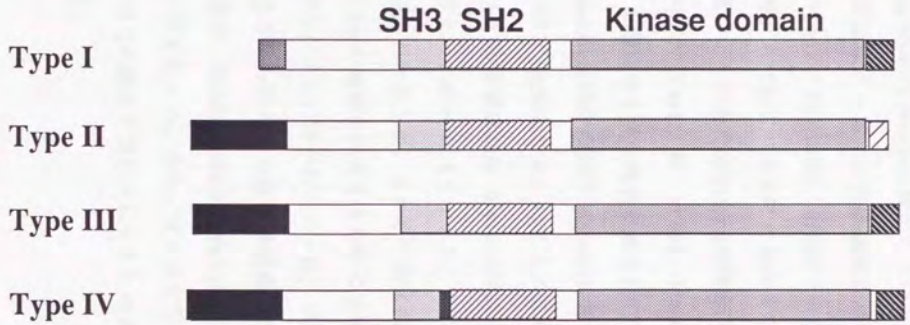


図２　alternative splicingから予想されるマウスTec kinaseの構造

alternative splicingによりIはunique domainが、IIはC末端側が、IVはSH3 domainがそれぞれ他のtypeと異なっている。

Btkのkinase活性が失われている症例（５）などが報告されている。マウスXIDではBtkのN末端のunique domainをコードしている領域に点突然変異があり、種を越えて保存されているコドン28のarginineがcysteineに変化している例が報告された（７、８）。従って、BtkはB細胞における免疫グロブリン産生機構において重要な役割を果たしていると考えられる。Tecファミリーのtyrosine kinaseであるItk/TskやBtkが上記のように血液細胞内で重要な役割を果たしていると考えられるため、Tecの血液細胞での機能に興味が持たれる。最近、いくつかのcyotokineの細胞内情報伝達系にTecが関与している可能性が示されつつあり（Tang, B. *et al.*、Mano, H. *et al.*, data in submission）、細胞が増殖する際に何らかの機能を果たしていると考えられる。

また、マウスTecのSH3 domainは通常のSH3 domainに相当するSH3LとC末端側の19アミノ酸が欠損したもの（以下SH3Sとする。41アミノ酸残基からなる。）の2種類が存在する。SH3Sで欠損している領域はSH3 domainが他の蛋白質と相互作用するうえできわめて重要な領域と考えられている（９－１２）ため、Tecにおける２種類のSH3 domainが異なる機能を持つのかどうか、きわめて興味深い。

私はヒト血液細胞におけるTecの役割を解析するためにまずヒト*tec* cDNAをクローニングし、その一次構造を明らかにし、得られたヒト*tec* cDNAをprobeとして血液細胞株および各種造血器腫瘍患者から得られた骨髄単核細胞における*tec*遺伝子およびTec蛋白質の発現を調べた。次に、fluorescence *in situ* hybridization（FISH）によりヒト*tec*遺伝子の染色体マッピングを行った。また、マウスで発現している異なったSH3 domainを持つTecの血液細胞内での機能を明らかにするために２種類のSH3 domainの機能についても解析を行った。

第２章　研究材料と方法

２－１．実験に用いた細胞株および培養法

ヒト血液細胞株KG1（１３）、HL60（１４）、JOSK-K（１５）、HEL（１６）、KU812（１６）、K562（１７）、F36E（１８）、DAUDI（１９）、RAJI（２０）、IM9（２１）、MOLT4（２２）、HPBALL（２３）、CCRF-CEM（２４）、JURKAT（２５）、PEER（２６）はRPMI1640（GIBCO）培養液中でウシ胎児血清（FCS）を10　%添加して培養した。エリスロポエチン依存性血液細胞株、F36Eではさらにエリスロポエチン（キリンビール株式会社より供与）を20 U/mlとなるように添加した。

IL-3依存性血液細胞株、FDC-P1細胞（２７）はFCSを10　%、マウスIL-3（キリンビール株式会社より供与）を25 U/ml添加したRPMI1640培養液中で培養した。

COS細胞（２８）はDulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（GIBCO）培養液中でFCSを10 %添加して培養した。

２－２．cDNAクローニングとsequencing

Total　RNAをヒトT細胞株であるCCRF-CEMとPEERからguanidinium　thiocyanate-phenol-chloroform法（２９）で抽出し、poly　$(A)^+$　RNAをoligo　(dT)-cellulose　column（Pharmacia　LKB　Biotechnology）を用いて純化した（３０）。poly　$(A)^+$　RNAからcDNAを合成し（３１）、λZAPII（Stratagene）をベクターとしてcDNAライブラリーを作製した。マウス*tec* cDNAの5'側の800 bpをprobeとして、このcDNAライブラリーをスクリーニングした。

Prehybridizationは40 % formamide、5 x SSC（1 x SSC: 0.15 M NaCl、0.015 M Na-citrate）、5 x denhardt's solution（1 g/l polyvinyl-pyrrolidone、1 g/l Ficoll 400、1 g/l bovine serum albumine）、50 mM $NaPO_4$、pH 7.0、0.1 % SDS、および100 μg/ml

heat-denatured salmon sperm DNAを含む溶液で42 ℃、2時間行った。hybridizationは[α^{32}P] dCTPで標識されたマウス*tec* cDNAをprobeとして上記の溶液に加え、42 ℃、16時間行った。フィルターの洗浄は室温で2 x SSC、0.1 % SDSを含む溶液で行った。得られたポジティブクローンのcDNA insertsはプラスミドベクターpBluescript SK(+)（Stratagene）にサブクローニングし、ヘルパーファージVCS-M13を用いて1本鎖DNAを回収し（３２）、Sequenase（US Biochemical Corp）をもちいてdideoxy termination法で核酸配列を決定した（３３）。

２－３．Northern blot法

ヒト血液細胞株（KG1、HL60、JOSK-K、HEL、KU812、K562、F36E、DAUDI、RAJI、IM9、MOLT4、HPBALL、JURKAT、CCRF-CEM、PEER）および各種造血器腫瘍患者の骨髄単核細胞からguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform法でtotal RNAを抽出した。total RNAをformaldehydeを含む1.2 % agarose gelで展開し、nylon filter（Hybond N; Amersham）にブロットした。このフィルターをhybridization buffer（50 % formamide、5 x SSC、5 x denhardt's solution、50 mM $NaPO_4$、pH 7.0、0.1 % SDS、100 μg/ml heat-denatured salmon sperm DNA）中で42 ℃で2時間prehybridizationを行った後、[α^{32}P] dCTPで標識されたヒト*tec* cDNA全長をprobeとして加え、さらに12時間hybridizationを行った。Wash buffer（1 x SSC、0.1 % SDS）で室温で2回、42 ℃で2回フィルターを洗浄した後、autoradiographyで解析した。

２－４．Western blot法

血液細胞株FDC-P1、HEL、JURKATおよびCOS細胞のtotal cell lysate 20 μgを8 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）で展開した後、semidry blotting 装置

（Pharmacia LKB Biotechnology）を用いてフィルター（Immobilon; Millipore）に吸着させた。フィルターをblocking buffer（1 % bovine serum albuminを含むTBST（20 mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20））に浸し、4 ℃で一晩blockingした。フィルターをTBSTで洗浄後、一次抗体溶液（抗血清を含むTBST）中で室温で1時間反応させた。TBSTでフィルターを洗浄後、アルカリフォスファターゼと結合した抗ラビット免疫グロブリン抗体（Promega）を二次抗体として含むTBST中で室温で1時間反応させた。TBSTでフィルターを洗浄後、bromochloroindolyl phosphate（BCIP; Promega）とnitro blue tetrazolium（NBT; Promega）を加え特異バンドを検出した（３４）

２－５．トランスフェクション

プラスミドベクターpBluescript SK(+)にサブクローニングされていたヒト*tec* cDNA（λhtec2）をEcoRIで切り出し、発現ベクターpSSRαにサブクローニングした（pSSRα/htec）。発現ベクターpSSRαはプラスミド、pUC18、にpcDLSRα（３５）のSRαプロモーターとクローニング部位と翻訳終結部位をサブクローニングしたベクターである。COS細胞へのトランスフェクションはDEAE Dextran法（３６）で行った。すなわち、前日に直径10 cmのdishに播かれた1 x 10^6個のCOS細胞をリン酸緩衝液（PBS）で２回洗浄した後、2 μgのpSSRαあるいはヒト*tec* cDNAがサブクローニングされたpSSRαを加えた50 mMのTris-HCl、pH 7.5、および0.4 mg/mlのDEAE Dextran（Pharmacia）を含む4 mlのDMEM培養液中で37 ℃で4時間培養した。再び、PBSで洗浄した後、0.1 mMのchloroquineと2 %のFCSを含む5 mlのDMEM培養液中で37 ℃で3時間培養した。PBSで洗浄後、10 %のFCSを含むDMEM培養液中で37 ℃で培養し、72時間後にトランスフェクトされたCOS細胞からtotal cell lysateを調整した。

２－６．fluorescence *in situ* hybridization（FISH)によるヒト*tec*遺伝子の染色体マッピング

ヒト*tec*遺伝子の染色体での局在部位を決定するためにFISHを行った。R-bandingのた

めにthymidine synchronization, bromodeoxyuridine release technique（３７）で（前）有糸分裂期の染色体を得た（３８）。Nick translation法によりヒト*tec* cDNA全長をbiotin-16-dUTP（Boehringer）で標識後、染色体とhybridizationさせた。hybridizationは2 x SSC、50 % formamide、10 % dextran sulfate、0.5 μg/μl salmon sperm DNA、0.5 μg/μl E. coli tRNAを含む溶液に25 ng/μlのbiotin化されたDNAをprobeとして加えて行った。37 ℃で16時間反応後、37 ℃で50 % formamideおよび2 x SSCを含む溶液中で、次に2 x SSCで、最後に室温で1 x SSCでそれぞれ１５分間ずつ洗浄した。hybridization signalはFITC-avidin（Boehringer）とbiotin化されたanti-avidin（Vector）を用いて検出した（３９）。スライドをpropidium iodide（PI; 1 mg/ml)で二重染色した後、 B-2A filterの付いたNikon FXA fluorescent microscopeでFITC signalとPIで染色された染色体を同時に観察した。

２－７．glutathione S-transferase（GST）融合蛋白質の合成と純化

１）polymerase chain reaction（PCR）

GSTとSH3Lとの融合蛋白質を得るために、5'-TAAAGGGAGACAGTGTACAA-3'をanti-sense primerとして20 pmol、FDC-P1細胞のtotal RNA 1 μg、RNase inhibitor（宝酒造）25 U、マウス逆転写酵素（MMLV-Reverse Transcriptase; BRL）200 Uを25 mM Tris-HCl、pH 8.3、37.5 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$、各々250 nMのdATP、dGTP、dCTP、dTTP、10 mM dithiothreitolを含む反応液に加え（全量25 μl）、37 ℃で1時間反応させて*tec* cDNAのfirst strandを合成した。この反応液に20 pmolのsense primer（5'-AGTTACCAGTGTTGTAGACA-3'）、10 mM Tris-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、各々250 nMのdATP、dGTP、dCTP、dTTP、25 U/mlのAmpliTaq DNA polymerase（Perkin Elmer Cetus）からなる反応液25 μlを加え、92 ℃ 1分、 37 ℃ 1分、72 ℃ 2分という条件で40回のPCRを行った。得られたPCR産物を10倍に希釈したものから1 μlを取り、内側のprimerのセット、sense; 5'-TGAAGGGATCCTTGTAGCGA-3'とanti-sense; 5'-

TGTTGGAATTCCTGCAGTAC-3'を用いて、92 ℃ 1分、 37 ℃ 1分、72 ℃ 2分という条件で40回のPCRを行った。発現ベクターpGEX-3X（Pharmacia LKB Biotechnology）へのサブクローニングのために制限酵素BamHIとEcoRIで切断できるように内側のプライマーセットは下線で示した部分を変更した。GSTとSH3Sとの融合蛋白質のためにはSH3Sを持つ*tec* cDNAを鋳型に、内側のプライマーのセットを用いて先と同一条件でPCRを行った（図３）。

２）GST融合蛋白質

PCRで合成されたcDNAを制限酵素BamHI、EcoRIで切断し、pGEX-3Xにサブクローニングした後、大腸菌NM522（Stratagene）を形質転換した。対数増殖期の形質転換されたNM522の培養液にisopropyl-β-D-thiogalactopyranoside（IPTG）を0.1 mMになるように加えGST融合蛋白質を発現させた（４０）。遠心により集菌した大腸菌をPBSET（20 mM $NaPO_4$、pH 7.0、150 mM NaCl、50 mM EDTA、1% Triton X-100）に懸濁し、氷上で超音波器で破菌した。再び遠心にて可溶画分と不溶画分を分離した。次に、不溶画分を8 M Urea / 0.1 M Glycine、pH 9.0で可溶化した後PBSE（20 mM $NaPO_4$、pH 7.0、150 mM NaCl、50 mM EDTA）に対して透析を行った。glutathione-Sepharose 4B（Pharmacia LKB Biotechnology）のカラムに透析後のGST融合蛋白質を含む溶液を加えGST融合蛋白質を純化した。

２－８．細胞のmetabolic labeling

１）[^{35}S] methionineによるmetabolic labeling

FDC-P1細胞を透析済みのFCS（GIBCO）を10 %、マウスIL-3を25 U/mlおよび[^{35}S] methionine（Tran-^{35}S-label; ICN Biomedicals）を7.4 MBq/ml添加したmethionine-free RPMI1640培養液（Flow Laboratories, Inc.）中で2時間培養し細胞をmetabolic labelした。

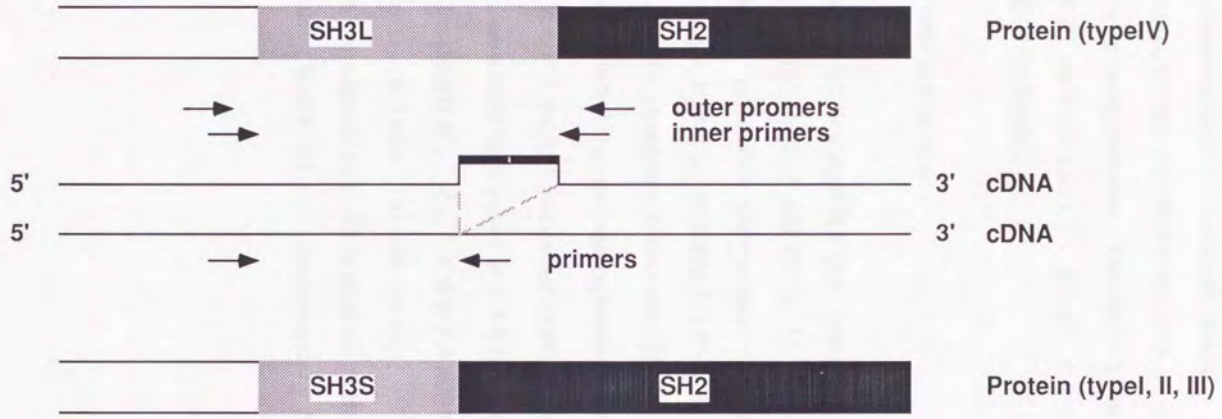


図3　それぞれのSH3 domainをコードするcDNAのPCRによる増幅

鋳型となるcDNAとそれぞれがコードする蛋白質を示す。
矢印はPCRに用いたprimerの位置。

2） [^{32}P] orthophosphateによるmetabolic labeling

FDC-P1細胞をIL-3を加えずに9時間培養した後、phosphate-free RPMI1640培養液（GIBCO）に [^{32}P] orthophosphate（Amersham）37 MBq/ml、透析済みFCSを10 %を加えて2時間培養しmetabolic labelした。さらに、マウスIL-3を25 U/mlとなるように加えFDC-P1細胞を10分間刺激した。

2－9． *in vitro* binding assay

metabolic labelされたFDC-P1細胞をlysis buffer（10 mM Tris-HCl、pH 7.6、1 % Triton X-100、50 mM NaCl、5 mM EDTA、30 mM sodium pyrophosphate、50 mM sodium fluoride、0.1 mM sodium orthovanadate、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、200 U/ml aprotinin）に懸濁し、20分間氷上に置いた後、7,000 x *g*で10分間遠心し可溶画分を得た。GSTとglutathione-Sepharoseに非特異的に会合する蛋白質を除くために10 μgのGSTを結合させたglutathione-Sepharoseをtotal cell lysateに加え、4 ℃で1時間混和した。遠心によりGSTとglutathione-Sepharoseおよびそれらに会合した蛋白質を除去した後、glutathione-Sepharoseと結合させた10 μgのGSTあるいはGST融合蛋白質を加え4 ℃で1時間混和し、それらと会合する細胞内蛋白質を純化した。純化された蛋白質をSDS-sample buffer（100 mM Tris-HCl、pH 6.8、200 mM dithiothreitol、4 % SDS、0.2 % bromophenol blue、20 % glycerol）を添加し、boilすることで溶出し、8 % SDS-PAGEにて展開後（41）、autoradiographyで検出した。

第３章　結果

３－１．ヒト*tec* cDNAクローニングとその解析

CCRF-CEMとPEERから作製したcDNAライブラリーをマウス*tec*　cDNAをプローブとしてそれぞれ1 x 10^6 pfuをスクリーニングし、ポジティブクローンがそれぞれより１クローンずつ得られた（λhtec1、λhtec2）。各ファージより単離されたinsert、htec1およびhtec2、はほぼ同じ3.6　kbの長さを持ち、制限酵素マップでは単一のメッセージに由来したクローンと考えられた。htec2の核酸配列を決定した結果、全長は3650 bpで、翻訳領域はnucleotide（nt）118から120の開始コドンATGからnt 2011から2013の終止コドンTAAまでで、5'側には117　bp、3'側には1637　bpの非翻訳領域およびpoly-A tailを含んでいた（図４）。しかし、nt 118から120の開始コドンATGより上流にin-frameの終止コドンが存在せず、ヒトTec蛋白質がより長いN末領域を持つ可能性は否定できない。また、poly-A　tailの近傍にポリアデニル化シグナルのコンセンサス配列は存在せず（４２）、より下流にポリアデニル化シグナルが存在する可能性も考えられる。htec2はマウスのcDNAであるtec IIと5'側の非翻訳領域で43%、翻訳領域で88%、3'側の非翻訳領域で40%の相同性が認められた。htec2の3'側の非翻訳領域中の1024　bp（nt 2626-3650領域、以下ヒト特異的配列と呼ぶ）はtec IIと相同性がみられなかった。図４には核酸配列とともに予想されるアミノ酸配列を示した。ヒト*tec* cDNAは631アミノ酸からなるヒト*tec*遺伝子産物をコードしていると考えられ、その予想される分子量は73,624であった。このアミノ酸配列はマウスのTec kinase type IVと各領域とも90%以上の相同性があり、得られたクローンはヒト*tec* cDNAであると考えられた。ヒトTec蛋白質はN末側からunique　domain（アミノ酸、以下aaとする、1-183）、SH3 domain（aa 184-243）、SH2 domain（aa 247-346）、catalytic domain（aa 351-620）という構造を持っている。Tecファミリーのtyrosine　kinaseとのアミノ酸配列の比較を図５に示す。マウスTec　type　IVと比較してアミノ酸で178番目の位置に

図4　ヒト*tec* cDNAの核酸配列と予想されるアミノ酸配列

———— ; pleckstrin homology domain　　— — — ; SH3 domain

— — —· ; SH2 domain　　▭ ; ATP結合部位のコンセンサス配列

═══ ; **自己リン酸化部位**　　* ; 終止コドン

太文字; non-Srcファミリーのtyrosine kinaseで保存されているアミノ酸

```
  1 CGGCGGCCGCGGATCCCGGCGGCGATCCGACCTCGCAGTCTCCCCAGGTCCGCCAGCAGCCGGTTCAGCCAG
 73 AATACTGGGATCTTCAGTGGCAGGAGGAGTAATCAGAAGACGGAGATGAATTTTAACACTATTTGGAGGAG
                                                   1 M  N  F  N  T  I  L  E  E

145 ATTCTTATTAAGAGGTCACAGCAGAAAAAGAAGACATCGCCCTTAAACTACAAAGAGAGACTTTTTGTACTT
 10 I  L  I  K  R  S  Q  Q  K  K  K  T  S  P  L  N  Y  K  E  R  L  F  V  L

217 ACAAAGTCCATGCTAACCTACTATGAGGGTCGAGCAGAGAAGAAATACAGAAAGGGGTTTATTGATGTTTCA
 34 T  K  S  M  L  T  Y  Y  E  G  R  A  E  K  K  Y  R  K  G  F  I  D  V  S

289 AAAATCAAGTGTGTGGAAATAGTGAAGAATGATGATGGTGTCATTCCCTGTCAAAATAAGTATCCATTTCAG
 58 K  I  K  C  V  E  I  V  K  N  D  D  G  V  I  P  C  Q  N  K  Y  P  F  Q

361 GTTGTTCATGATGCTAACACACTTTACATTTTTGCACCTAGTCCACAAAGCAGGGACCTGTGGGTGAAGAAG
 82 V  V  H  D  A  N  T  L  Y  I  F  A  P  S  P  Q  S  R  D  L  W  V  K  K

433 TTAAAAGAAGAAATAAAGAACAACAATAATATTATGATTAAATATCATCCTAAATTCTGGACAGATGGAAGT
106 L  K  E  E  I  K  N  N  N  N  I  M  I  K  Y  H  P  K  F  W  T  D  G  S

505 TATCAGTGTTGTAGACAAACTGAAAAATTAGCACCCGGATGTGAAAAATACAATCTTTTTGAGAGCAGTATA
130 Y  Q  C  C  R  Q  T  E  K  L  A  P  G  C  E  K  Y  N  L  F  E  S  S  I

577 AGAAAAGCACTACCTCCAGCACCAGAAACAAAGAAGCGAAGGCCTCCCCCACCAATTCCACTAGAAGAAGAA
154 R  K  A  L  P  P  A  P  E  T  K  K  R  R  P  P  P  P  I  P  L  E  E  E

649 GATAATAGTGAAGAAATCGTTGTAGCCATGTATGATTTCCAAGCAGCAGAAGGACATGATCTCAGATTAGAG
178 D  N  S  E  E  I  V  V  A  M  Y  D  F  Q  A  A  E  G  H  D  L  R  L  E

721 AGAGGCCAAGAGTATCTCATTTTAGAAAAGAATGATGTGCATTGGTGGAGAGCAAGAGATAAATATGGGAAT
202 R  G  Q  E  Y  L  I  L  E  K  N  D  V  H  W  W  R  A  R  D  K  Y  G  N

793 GAAGGATATATCCCAAGTAATTACGTAACGGGAAAGAAATCAAACAACTTAGATCAATATGAATGGTATTGC
226 E  G  Y  I  P  S  N  Y  V  T  G  K  K  S  N  N  L  D  Q  Y  E  W  Y  C

865 AGAAATATGAATAGAAGCAAGGCAGAGCAACTCCTCCGCAGTGAAGATAAAGAAGGTGGTTTTATGGTAAGG
250 R  N  M  N  R  S  K  A  E  Q  L  L  R  S  E  D  K  E  G  G  F  M  V  R

937 GATTCCAGTCAACCAGGCTTGTACACAGTCTCCCTTTATACCAAGTTTGGAGGAGAAGGTTCATCGGGTTTT
274 D  S  S  Q  P  G  L  Y  T  V  S  L  Y  T  K  F  G  G  E  G  S  S  G  F

1009 AGGCATTATCATATAAAGGAAACAACAACATCTCCAAAGAAGTATTACCTAGCTGAAAAACATGCTTTTGGC
298 R  H  Y  H  I  K  E  T  T  T  S  P  K  K  Y  Y  L  A  E  K  H  A  F  G

1081 TCCATTCCTGAGATTATTGAATATCATAAGCACAATGCAGCAGGACTTGTCACCAGGCTTCGGTACCCAGTT
322 S  I  P  E  I  I  E  Y  H  K  H  N  A  A  G  L  V  T  R  L  R  Y  P  V

1153 AGTGTGAAAGGGAAGAATGCACCCACCACTGCAGGATTCAGCTATGAGAAATGGGAGATTAACCCTTCAGAA
346 S  V  K  G  K  N  A  P  T  T  A  G  F  S  Y  E  K  W  E  I  N  P  S  E

1225 CTGACCTTTATGAGGGAATTGGGAAGTGGACTGTTTGGAGTGGTGAGGCTTGGCAAATGGCGAGCCCAGTAC
370 L  T  F  M  R  E  L  G  S  G  L  F  G  V  V  R  L  G  K  W  R  A  Q  Y
```

図4（続き）

```
1297 AAAGTCGCAATCAAAGCTATTCGGGAAGGTGCAATGTGCGAGGAGGACTTTATAGAAGAAGCTAAAGTGATG
 394 K  V  A  I  K  A  I  R  E  G  A  M  C  E  E  D  F  I  E  E  A  K  V  M

1369 ATGAAGCTGACACACCCGAAGTTAGTGCAGCTTTATGGTGTGTGCACCCAGCAGAAACCAATATACATTGTT
 418 M  K  L  T  H  P  K  L  V  Q  L  Y  G  V  C  T  Q  Q  K  P  I  Y  I  V

1441 ACTGAGTTCATGGAAAGGGGCTGCCTTCTGAATTTCCTCCGACAGAGACAAGGTCATTTCAGTAGAGACGTA
 442 T  E  F  M  E  R  G  C  L  L  N  F  L  R  Q  R  Q  G  H  F  S  R  D  V

1513 CTGCTGAGCATGTGTCAGGATGTGTGTGAAGGGATGGAGTATCTGGAGAGAAACAGCTTCATCCACAGAGAT
 466 L  L  S  M  C  Q  D  V  C  E  G  M  E  Y  L  E  R  N  S  F  I  H  R  D

1585 CTGGCTGCCAGAAATTGTCTAGTAAGTGAGGCGGGAGTTGTAAAAGTATCTGATTTTGGAATGGCCAGGTAT
 490 L  A  A  R  N  C  L  V  S  E  A  G  V  V  K  V  S  D  F  G  M  A  R  Y

1657 TTTCTGGATGATCAGTACACAAGTTCTTCTGGTGCTAAGTTTCCTGTGAAGTGGTGTCCACCTGAAGTGTTT
 514 F  L  D  D  Q  Y  T  S  S  S  G  A  K  F  P  V  K  W  C  P  P  E  V  F

1729 AATTACAGCCGCTTCAGCAGCAAATCAGATGTCTGGTCATTTGGTGTTTTAATGTGGGAAGTATTCACGGAA
 538 N  Y  S  R  F  S  S  K  S  D  V  W  S  F  G  V  L  M  W  E  V  F  T  E

1801 GGCAGAATGCCTTTTGAAAAATACACCAATTATGAAGTGGTAACCATGGTTACTCGAGGCCACCGACTCTAC
 562 G  R  M  P  F  E  K  Y  T  N  Y  E  V  V  T  M  V  T  R  G  H  R  L  Y

1873 CAGCCGAAGTTGGCGTCCAACTATGTGTATGAGGTGATGCTGAGATGTTGGCAGGAGAAACCAGAGGGAAGG
 586 Q  P  K  L  A  S  N  Y  V  Y  E  V  M  L  R  C  W  Q  E  K  P  E  G  R

1945 CCTTCTTTCGAAGATCTGCTGCGCACAATAGATGAACTAGTTGAATGTGAAGAAACTTTTGGAAGATAAGTG
 610 P  S  F  E  D  L  L  R  T  I  D  E  L  V  E  C  E  E  T  F  G  R  *

2017 ATGTGTGACCAGTGGCTCCCAGATTCCCAAGCACAAGGAAGGATGGGCATTTTGTGGCTTTTAATTTATTGA
2089 GCACTTGGACATGTAGATCATTTTACTTATACAGTGGAAACACATAAATAATTTGCTTCTAGACCAGCCTCT
2161 GTCTAGACTTGCTTCTAGACAGAATCTCCCAGAGTGTGGAAATGTTGCCTTAGAAATGGTGATTAAAATCAC
2233 TCATTTCTATTCATTCCTCAGGCACTTGAGTGACAGTTGTTTACCAGGGCACTGTGTGTAGCCCCAGGGTTTG
2305 GCCATTCAGGGGTGCACACATGGGACCATGTTAGCTGATGCCAGTTGAAGGCCAGGGTATTTGGGAAGGGGA
2377 AGGGTATTAGAGTCATGACCAAGCAACCCTTCTTTTTCCCTTTGACTTCTACAGAAATCTGGGCCTGAGACA
2449 TTGTCTACAATTGGGTTCTAGATACATCAGGAACCCATCTTGGATAAATAAATACCTATCTTTTGTTTTGAA
2521 AACATCTCAGTTTTCAAGACTGCTCTTAGTATTACATGAACAATATTTGTATGCTGTATATATTGTAAATAT
2593 ATATAATATATAAAGTTATATATTTATGAGAAACACGAATTGTCTTTTAATTGAAACTTTTAATCCTGTAGT
2665 ATAGGAGTTCACCTTCTTAGGACTAGAGACTGTGCCTTATAGCTGTTAATTCATTTCCCCCTGAACATCAAA
2737 TATGCCTGAAGAGAAGAAAGTCTAGATTCTTCTATGAGTAACGCCCCCTCCTCACTCAGGTAAATGTGTCTG
2809 GGGATGCCTGTCCAGCTTAACCACGTGCATTTGGCCTATGTAATCCTGCCCATGGTGGCCGCAGCTAATCAG
2881 AATCAGATGGAAAATTAAACCGGGTAATCTACTTCTAAGCCTTAAGAATATTCCCTGGGACACAGACACTAT
2953 AATTGGAAGTGCTGAGCTCTGGGGCAGAAGGATCAGGTGACCTTCGCAACAAAGTTTGCCCCCACCTCACAT
3025 AGGACCCGGAAGCAGCCTGAGCTGTGGCGGAGGATCCAGGAAGCTACGGAGAGAAGCAGCCAGCATGGTGTT
3097 CCGTGCCTCCCGGACGTTTTTCAGGAGGCCTGGTTGGACTTGGGTTCCTGGATGGTGGGATTGTTGTACAGC
3169 CTCTCAGGAGACCCTGCTGTCAAGACTGTGTGTGTGGATTTCCCACCCTTAGAAGCTCTACTAAGACATCAA
3241 CGGAATTAGGGCCTTCCTTTTTGCCTTGTGAGCGCCAAGGAAAAGAAACTATCTCGGTCACGTGAGCGCCAC
3313 GAAAGAAACTGTATCAGTCATCCAGAGACCGTTTATTGCCCAACACGTTATTCTTGCTGTTGGTGGGGTAAC
3385 TAGCCGAGGAAGACACAGCGCCTTCCCTTCAGGAGTTGCGTCTCCTCTGCAGGCCACGATGGTCTGCTCTGG
3457 AGCATTGGGTGAACACACAGGCTGGCTGCTCTGGGCAGCGCCTTCACTCTGACCCTGGAGAACCATTTCATT
3529 TCATCCTGGTCAGTCTAGAGTCTGTGCACCAGGCAGTCCATCCACTGAAGGCTGTGTTTATTCTTTTCCTGT
3601 GCCCCTCATAATGGAAGAAAGTAAACTGCTTATCCCGAGCCTTAAAAAAA
```

```
                 PH domain
human Tec  MNFNTIL EEI LIKRSQQKKKTSPLNYKERLFVLTKSMLTYYEGRAEKKYR    KGFIDVSKIKCVEIVKNDDGV     IP       73
mouse Tec  ------- --- ------------L-------C--P--V-S-----------    --V--I---------------     --       73
mouse Itk  --NF --L--Q ---K----RR---S-F-V-F-----AS-A-F-D-HG-- -T  L--S-EL-R--------S-IS      --       73
human Btk  -AAV -- -S-F- -------------F-K---L--VHK-S---YDF-RG -RGSK--S---E--T---T-VPEKNPPPERQ--RRGEE  75

human Tec      CQNK      YPFQ      VVHDANTLYIFAPSPQSRDLWVKKLKEEIKNNNNIMIKYHPKFWTDGSYQCCRQTEKLAPGCEKY  146
mouse Tec      ----      F---      -------------------R-------------------------A-------------------  146
mouse Itk      -HY-      ----TLVYLQ----NYL--V---DCE--QR--LT----TR---SLVS----N--M--RWR--S-L--P-V--AP-  152
human Btk  SSEME-ISIIERFP----      --Y-EGP--V-S-TEEL-KR-IHQ--NV-RY-SDLVQ----C--I--Q-L--S--A-N-M--QIL  168

                                                                 SH3 domain
human Tec  NLFE      SSI   RKALPPAPET    KKRRPPPPIPLEEEDNSEEI VVAMYDFQAAEGHDLRLER GQEYLILEKNDVHWWRA  219
mouse Tec  ----      RC-   --T------I    ----------P--- -T---  ---------TEA------- ----I------L-----  218
mouse Itk  DPSK      NAS   K-P---T--D    N --SFQ  EP --TL      -I-L--Y-TNDPQE-A- -CDE--YL-DSSEI----V  217
human Btk  ENRNGSLKPG--H--TK-P---T--EDQIL--PL--E-AAAPVS T-- LKK---L--YMPMNAN--Q- -K-D--F---ESNLP----  254

                                    SH2 domain
human Tec  RDKYGNEGYIPSNY VTGKK SNNLDQYHWYCRNMNRSKAEQLLRSEDKEGGFMVRDSSQPGLYTVSLYTKFGGEGSSGFRHYHIKETT  306
mouse Tec  -----S-------- ----- -------------T----------T-----------------------------------------A  305
mouse Itk  Q--N-H---A--S-L-EKSP  ---ET----NKSIS-D---K--LDTG---A------RT--T----VF--AIISENPCIK-------N  304
human Btk  ---N-Q-------- --EAED- IHM----SKH-T--Q-----KQ-G-----I-----KA-K----VFA-ST-DPQGVI---VVCS-P  341

human Tec  TSPKKYYLAEKHAFGSIPEIIEYHKHNAAGLVTRLRYPVSVKGKNAPTTAGFSYEKWEINPSELTFMRELGSGLFGVVRLGKWRAQYKV  395
mouse Tec  ----------------------------------------T---------A---D---------------------------------  394
mouse Itk  D---R--V---YVFD---LL-Q--QY-GG----------CSWRQK--V---LR-G--V-Q------VQ-I---Q--L-H--Y-LNKD--  393
human Btk  Q-Q -------L-ST---L-N--Q--S---IS--K---QQN----S---LG-GS---D-KD---LK---T-Q----KY----G--D-  428

human Tec  AIKAIREGAMCEED FIEEAKVMMKLTHPKLVQLYGVCTQQKPIYIVTEFMERGCLLNFLRQRQGHFSRDVLLSMCQDVCEGMEYLERN  483
mouse Tec  ------------------------------------------------------------------M------------------  482
mouse Itk  ---T-Q----S--- -----E-----S-----------LE-A--CL-F----H---SDY--S---L-AAET--G--L------A---KA  481
human Btk  ---M-K--S-S --E---------N-S-E----------K-R--F-I--Y-AN-----Y--EMRHR-QTQQ--E--K----A-----SK  516

human Tec  SFIHRDLAARNCLVSEAGVVKVSDFGMARYFLDDQYTSSSGAKFPVKWCPPEVFNYSRFSSKSDVWSFGVLMWEVFTEGRMPFEKYTNN  572
mouse Tec  F-------------N-------------V---------C-----------------------------------I----------N---  571
mouse Itk  CV------------G-NQ-I-------T-FV--------T-T------AS----SF--Y-----------------S--KI-Y-NRS-S  570
human Btk  Q-------------NDQ---------LS--V---E----V-S----R-S----LM--K------I-A-------IYSL-K--Y-RF--S  606

human Tec  EVVTMVTRGHRLYQPKLASNYVYEVMLRCWQEKPEGRPSFEDLLRTIDELVECEETFGR  631
mouse Tec  ------------HR-----K-L----------R-------------------------  630
mouse Itk  ---EDIST-F---K-R---CH--QI-NH--K----D--P-SQ--SQLA-IA-A   -L  625
human Btk  -TAEHIAQ-L---R-H---EK--TI-YS--H--ADE--T-KI--SN-LD -MD--S    659
```

図5　ヒトTec蛋白質と他のTecファミリーのkinaseとのアミノ酸配列の比較。
各ドメインを矢印で示す。太文字は保存されているアミノ酸配列。—；ヒトTecと同じアミノ酸

aspartic acidの挿入がみられる。ヒトTec蛋白質のN末側のunique domainの２番目のアミノ酸はasparagine、７番目のアミノ酸はleucineで、マウスの場合と同様にmyristylation signalは存在しない（４３）。アミノ酸KYHPKFWTDG（H; histidine, T; threonine、ヒトTecではaa 119-128）およびアミノ酸KALPPAPE（aa 156-162）はTecファミリーのkinase間で非常に良く保存されている。また、アミノ酸RRPPPPPIP（I; isoleucine、aa 166-173）はヒトTecとマウスTecの間で完全に保存されている。この配列に相当するアミノ酸配列ははItk/TskやBtkには存在しない。SH3 domainは60アミノ酸残基からなり、マウスのSH3Lに相当する。SH3 domainを持つ蛋白質の中で非常に良く保存されているアミノ酸配列ALYDY（A; alanine、L; leucine、Y; tyrosine、D; aspartic acid）に対応する箇所（aa 186-189）はヒトTecではマウスと同様にAMYDF（M; methionine、F; phenylalanine）という配列である。aa 377-382はGSGLFG（G; glycine、S; serine）、398番のアミノ酸はlysineでATP結合部位を形成していると考えられる（４４）。aa 489-494にDLAARN（R; arginine, N; asparagine）、aa 528-535にPVKWCPPE（V; valine, W; tryptophan, C; cysteine, E; glutamic acid）というnon-Srcファミリーのtyrosine kinaseで非常に良く保存されているアミノ酸配列が存在する（４４）。また、c-Srcの自己リン酸化部位の416番目のtyrosine残基に相当するTecのtyrosine残基は519番にみとめられる（図の下線を引いたtyrosine）。マウスTecと同様にkinase活性を制御する働きのあるc-Srcの527番のtyrosine残基に相当するtyrosineは存在しない（４５）。

Tecファミリーのkinaseの間では各領域ともアミノ酸レベルで高い相同性が認められた。各領域間のホモロジーは（図６）unique domainではマウスのTec kinase type IVと91 %、マウスItk/Tskと59 %、ヒトBtkと48 %と高い相同性があった。Srcファミリーのkinaseがunique domainにほとんど相同性を持たないのと対照的であった。SH3 domainではマウスのTec kinase type IVと90 %、マウスItk/Tskと50 %、ヒトBtkと62 %の相同性があり、Srcとは40 %であった。SH2 domainではマウスのTec kinase type IVと97%、マウスItk/Tskと57 %、ヒトBtkと59 %の相同性があり、Srcとは37 %であった。kinase domainではマウスのTec kinase type IVと97 %、マウスItk/Tskと71 %、ヒトBtkと68 %の相同性があり、Srcとは45 %であった。ヒトTecはItk/Tsk、Btkと比較

してunique　domainも含め、全長にわたりきわめて相同性の高い非受容体型tyrosine kinaseであることがわかった。

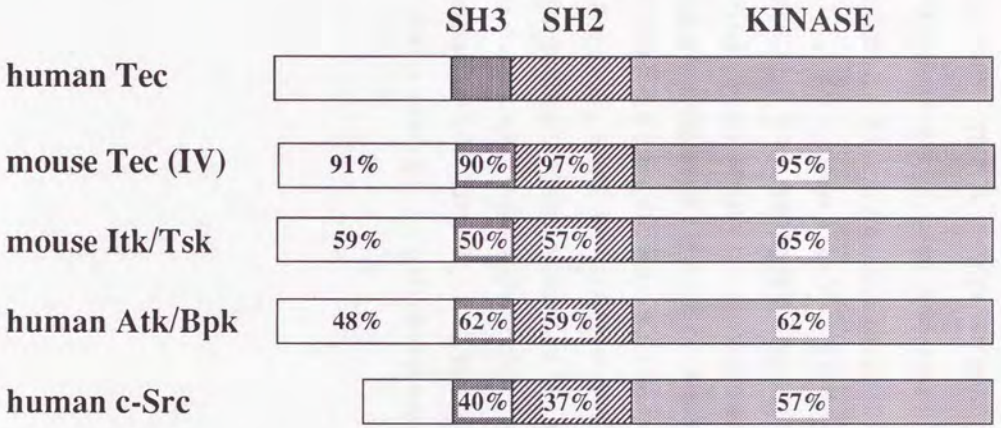


図６　ヒトTecと他のkinaseとの各領域間のホモロジー

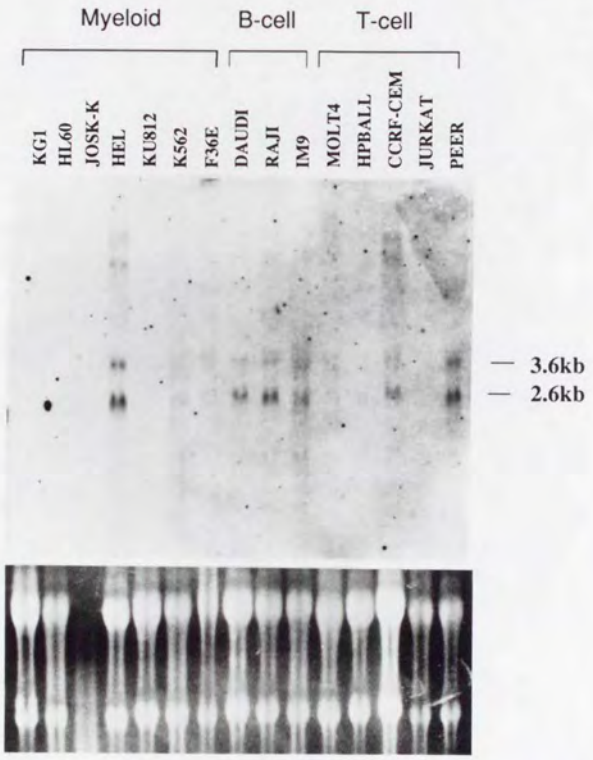
unique domain、SH3 domain、SH2 domain、kinase domainにおける
アミノ酸配列のホモロジー

３－２．ヒト血液細胞株における*tec* mRNAの発現

骨髄球系（KG1、HL60、JOSK-K、HEL、KU812、K562、F36E）、B細胞系（DAUDI、RAJI、IM9）、T細胞系（MOLT4、HPBALL、CCRF-CEM、JURKAT、PEER）のそれぞれの細胞から得られたtotal RNA 10μgをもちいてヒト*tec* cDNA全長をprobe（full-tec probeとする）としてNorthern blot法により*tec*遺伝子の転写産物の発現を調べた（図７）。マウスでは約2.8 kbの大きさの単一の転写産物がみられることが知られているが（１）、ヒトの血液細胞株では約2.6 kbと約3.6 kbの大きさの2種類の転写産物が認められ、一部の細胞株ではこれらの転写産物に加えて約10.0 kbおよび約8.2 kbの大きさの転写産物が弱く認められた。今回単離されたcDNAは全長3650 bpで3.6 kbの転写産物に由来するものと考えられた。*tec*の発現は調べた15種類の細胞株のうち骨髄球系ではHEL、K562、F36Eの7種類中3種類に、B細胞系ではDAUDI、RAJI、IM9の3種類中3種類に、T細胞系ではMOLT4、HPBALL、CCRF-CEM、PEERの5種類中4種類にみとめられた。発現がみられたすべての細胞株で2.6 kbの転写産物は3.6 kbの転写産物に比べ発現が強かった。また、HELとCCRF-CEMではこれらに加えて約10.0 kbおよび約8.2 kbの大きさの転写産物が弱く認められた。

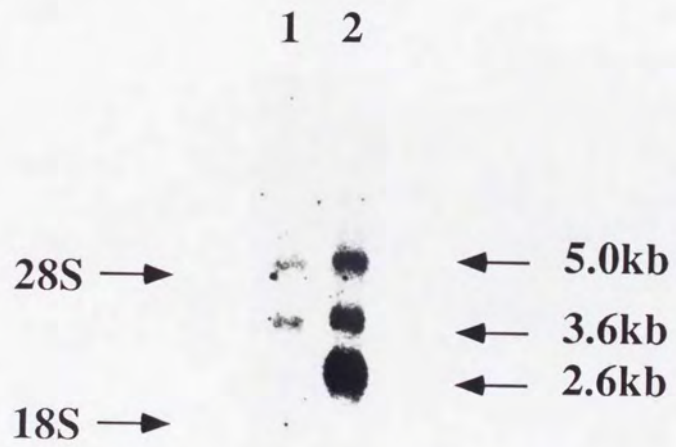
図7　Northern blotによるヒト血液細胞株における*tec*遺伝子の発現の解析。

上段；各血液細胞株から得られたtotal RNA（10 μg）を電気泳動で展開し、nylon filterにブロットし、full-tec probeでhybridizationを行った。3.6 kb、2.6 kbの転写産物位置を示す。下段；28S RNAと18S RNAのethidium bromide染色。



約2.6 kbと約3.6 kbの大きさの2種類の転写産物の大きさの差は1024 bpからなるヒト特異的配列の大きさにほぼ等しいことから、両者の差がヒト特異的配列の存在の有無による可能性が考えられた。このことを確認するためにヒト*tec* cDNA全長とヒト特異的配列に含まれる3056番から3650番の595 bpの核酸配列（3'-tec probeとする）をそれぞれprobeとしてPEERの5 μgのpoly $(A)^+$ RNAを用いてNorthern blotを行った。図8に示すようにfull-tec probeでは2.6 kbおよび3.6 kbの転写産物を検出できたのに対して、3'-tec probeでは3.6 kbの転写産物は検出されたが、2.6 kbの転写産物は検出できなかった。従って、2.6 kbと3.6 kbの転写産物の大きさの違いはalternative splicingによるヒト特異的配列の挿入の有無によるものと考えられた。また、この実験ではどちらのprobeでも図7のtotal RNAを用いた実験では検出できなかった5.0 kbの転写産物を新たに検出することができた。この転写産物はリボゾームRNAとほぼ同じ大きさであり、total RNAを用いた先のNorthern blot解析では検出できなかった可能性がある。5.0 kbの転写産物の発現量は3.6 kbの転写産物とほぼ等しかった。HELとCCRF-CEMで弱く認められた約10.0 kbと約8.2 kbの大きさの転写産物はこの実験に使われたPEERでは認められず、細胞株間でalternative splicingが異なるものと考えられる。

図8　ヒト血液細胞株における*tec* mRNAのalternative splicingの解析。PEERの5 μgのpoly (A)$^+$ RNAを電気泳動で展開し、nylon filterにブロットし、3'-tec probe（lane 1）とfull-tec probe（lane 2）を用いてhybridizationを行った。図の左側に28S RNAと18S RNAの位置を矢印で示す。図の右側に2.6 kb、3.6 kb、5.0 kbの３種類の転写産物の位置を矢印で示す。

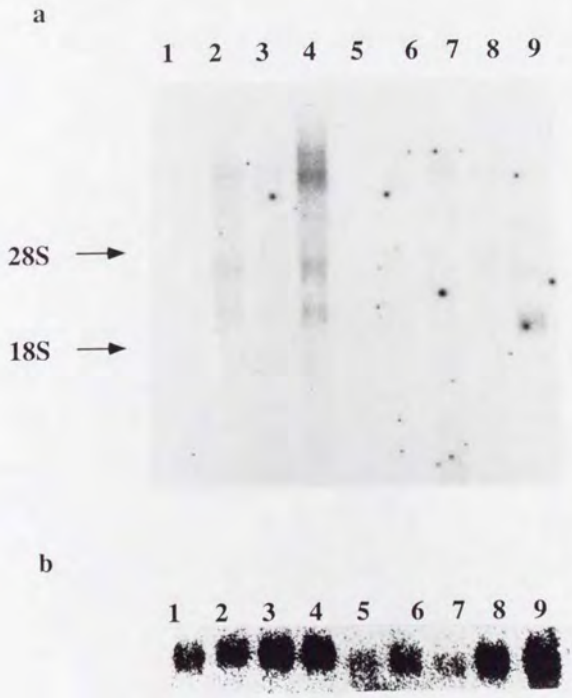


3－3．各種造血器腫瘍患者の骨髄単核細胞における*tec*遺伝子の発現

ヒト*tec*遺伝子が血液細胞の腫瘍化に関与しているかどうかを調べるために、各種造血器腫瘍患者の骨髄細胞より単核細胞を分離し、それらからtotal RNA 20 μgを抽出しfull-tec probeを用いて*tec*遺伝子の発現を調べた。対象は骨髄異形成症候群（MDS）のrefractory anemia with excess of blast（RAEB）の症例が1例、MDS由来の急性白血病の症例が2例、急性単球性白血病（French-American-British[FAB]分類；M5）の症例が1例、急性赤白血病（FAB分類；M6）の症例が1例、急性リンパ球性白血病（FAB分類；L2）の症例が2例であった。図9に示すように検討したMDS（lane 2-4）の3例中3例と急性リンパ性白血病の2例中1例（lane 7）の患者検体で2.6 kb、3.6 kb、および8.2 kbの長さの転写産物を検出することができた。lane 2とlane 4はMDS由来の急性白血病の患者検体で、lane 3はRAEBの患者検体である。これに対して*tec*遺伝子の発現は健康人の末梢血単核細胞（lane 1）、4例中3例の*de novo*急性白血病（lane 5；M5、lane 6；M6、lane 8；L2）ではほとんど検出できなかったため、非常に発現が弱いと考えられた。なお、lane 9はコントロールとして用いたPEERのtotal RNAである。

図９　造血器腫瘍患者骨髄単核細胞における*tec*遺伝子の発現

a; 健康人末梢血単核細胞（lane 1）とMDS由来の急性骨髄性白血病（lane 2と4）、RAEB（lane 3）、急性単球性白血病（M5；lane 5）、急性赤白血病（M6；lane 6）、急性リンパ性白血病（L2；lane　7と8）の骨髄単核細胞および血液細胞株PEER（lane 9）のtotal　RNA（20　μg）を電気泳動で展開し、nylon　filterにブロットし、full-tec probeでhybridizationを行った。図の左側に28S RNAと18S RNAの位置を矢印で示す。
b; aのフィルターのactin cDNAをprobeとしたNorthern hybridization。

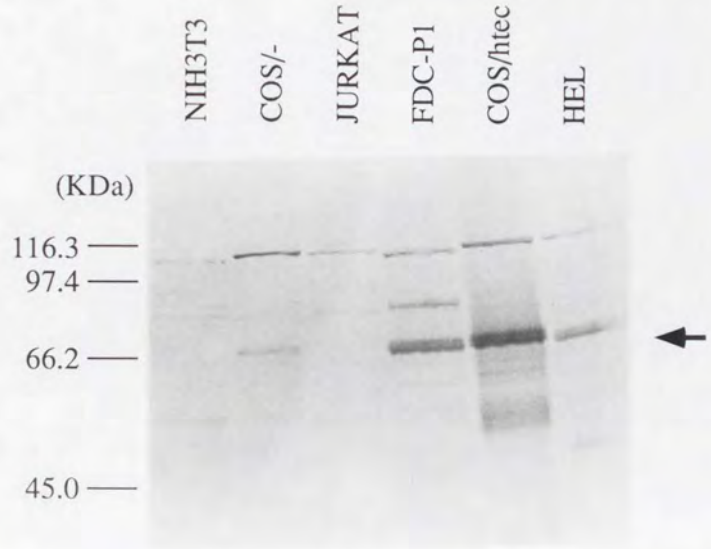


3－4．ヒトTec蛋白質

ヒトTec蛋白質の解析を抗マウスTec血清（Mano, H. *et al.* data in submission）を用いてWestern blot法によりおこなった。NIH3T3（ane 1）はTec蛋白質を発現していないnegative controlで、FDC-P1（lane 4）はTec蛋白質を発現しているpositive controlである。pSSRα/htecをトランスフェクトしたCOS細胞（COS/htec）ではpSSRαのみをトランスフェクトしたCOS細胞（COS/-）と比較して、マウスTec蛋白質（lane 4）とほとんど同じ大きさの72 KDaの蛋白質が強く検出された（図10；lane 2およびlane 5）。COS/-にも弱く72 KDaの蛋白質が検出され、内在性のTec蛋白質と考えられた。従って、この抗血清はヒトTec蛋白質にも反応することがわかった。ヒトTec蛋白質の大きさは核酸配列から予想された分子量にほぼ一致した。従って、得られたcDNAは翻訳領域全長を含んでいる可能性が高い。また、Northern blot法による解析結果に一致して、*tec*遺伝子の発現が認められたHEL（lane 6）にはTec蛋白質の発現がみられ、*tec*遺伝子の発現が認められなかったJURKAT（lane 3）ではTec蛋白質の発現を検出することができなかった。

図１０　抗マウスTec血清によるヒトTec蛋白質の発現の解析。

NIH3T3（lane 1）、COS/-（lane 2）、JURKAT（lane 3）、FDC-P1（lane 4）、COS/htec（lane 5）、HEL（lane 6）のtotal cell lysate 30 μgを8 % SDS-PAGE gelで展開後、フィルターにブロットし、抗マウスTec血清を用いてTec蛋白質を検出した。左側に分子量マーカーの位置を示す。



3－5．*tec*遺伝子の染色体マッピング

有糸分裂期の62細胞について検討した。図11に示すように、これらのうち11細胞では両方の染色体の4p12の同じ位置にdouble spotが認められた。また14細胞では片方の染色体の4p12上にdouble spotが、残りの染色体の4p12上にsingle spotが認められた。他の染色体には有意なシグナルは認められなかった。従って、ヒト*tec*遺伝子は染色体4p12に局在していることがわかった。

図１１　FISHによるヒト*tec*遺伝子の染色体マッピング。

シグナルは染色体４番の4p12に検出された。

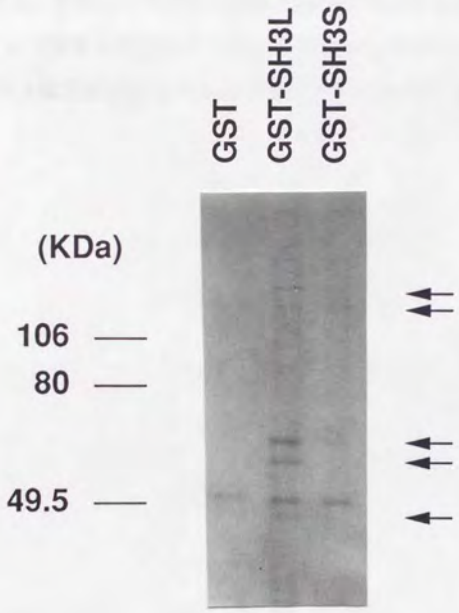
3－6．Tec-SH3 domain会合蛋白質の解析

Tecの２種類のSH3 domainの機能を検討するためにそれぞれと会合する細胞内蛋白質をGSTとの融合蛋白質（GST-SH3LおよびGST-SH3S）を用いて、[^{35}S] methionineあるいは[^{32}P] orthophosphateでmetabolic labelされたFDC-P1細胞より純化した。

[^{35}S] methionineでmetabolic labelした実験ではGSTと比較してGST-SH3Lでは130 KDa、110 KDa、58 KDa、54 KDa、48 KDaの大きさの蛋白質との会合が認められた（図12、矢印）。それに対してGST-SH3Sでは110 KDa、58 KDaの大きさの蛋白質との会合が認められた（図12）。GST-SH3Sと110 KDa、58 KDaの大きさの蛋白質との会合はGST-SH3Lと会合する同じ大きさの分子量を持つ蛋白質との会合よりも弱かった。50 KDaの大きさの蛋白質はGST、GST-SH3LおよびGST-SH3Sのいずれでも認められ、SH3 domainに特異的に会合する蛋白質ではないと考えられた。

図12　[^{35}S] methionineでmetabolic labelしたFDC-P1細胞をもちいたTec-SH3 domain会合蛋白質の検出。

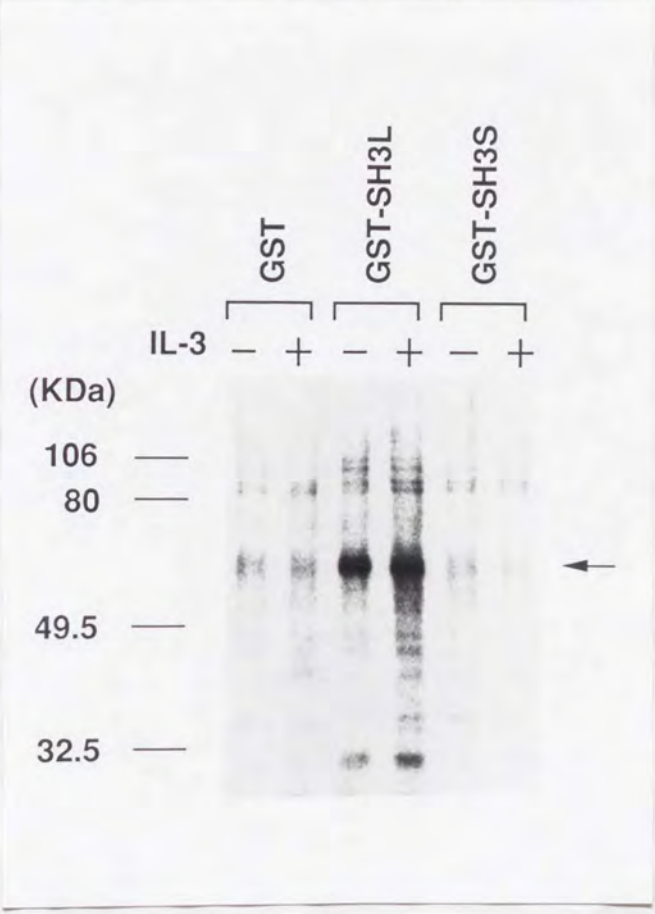
[^{35}S] methionineでmetabolic labelしたFDC-P1細胞のtotal cell lysateをGST、GST-SH3LおよびGST-SH3Sと反応させ、それぞれと会合した蛋白質を8 % SDS-PAGE gelで展開し、autoradiographyで検出した。左側に分子量マーカーの大きさを、右側に130 KDa、110 KDa、58 KDa、54 KDa、48 KDaの会合蛋白質の位置を矢印で示す。



次に [^{32}P] orthophosphateによるmetabolic labelingをもちいてIL-3の刺激によりそれぞれのSH3 domainと会合するリン酸化蛋白質を解析した。FDC-P1細胞をIL-3を加えずに9時間培養した後、[^{32}P] orthophosphateを加えて2時間培養しmetabolic labelした。これにマウスIL-3を25 U/mlとなるように加えFDC-P1細胞を10分間刺激した。GSTと比較してGST-SH3Lでは58 KDaの大きさの強くリン酸化された蛋白質（pp58）との会合が認められた（図13、矢印）。このリン酸化蛋白質は先の [^{35}S] methionineでmetabolic labelした実験で認められた58KDの蛋白質と電気泳動上ほぼ同じ位置にあり、同一の蛋白質の可能性がある。また、このGST-SH3Lとpp58との会合およびpp58のリン酸化レベルはIL-3刺激により影響を受けなかった。それに対してGST-SH3SではIL-3刺激によらず、特異的なリン酸化蛋白質との会合は検出できなかった（図13）。

図13　[^{32}P] orthophosphateでmetabolic labelしたFDC-P1細胞をもちいたTec-SH3 domain会合蛋白質の検出。

[^{32}P] orthophosphateでmetabolic labelしたFDC-P1細胞のtotal cell lysateをGST、GST-SH3LおよびGST-SH3Sと反応させ、それぞれと会合した蛋白質を8 % SDS-PAGE gelで展開し、autoradiographyで検出した。左側に分子量マーカーの大きさを、右側に58-KDaの会合蛋白質を矢印で示す。－；IL-3刺激なし、＋；IL-3刺激あり。GST-SH3Lでみられる31 KDaのバンドは実験に用いたGST-SH3Lそのものの非特異的リン酸化である。



第4章　考案

以上の実験から次の結果が得られた。

1）ヒトTecはマウスItk/TskやヒトBtkと全長を通して高い相同性がある。

2）血液細胞ではヒトTecは骨髄球系、B細胞系、T細胞系など各系統で主に2.6 kbおよび3.6 kbの転写産物の発現が認められる。他に、HEL、CCRF-CEMでは10.0 kbおよび8.2 kbの転写産物、PEERでは5.0 kbの転写産物の発現が認められた。

3）ヒトTecの発現は健康人末梢血および*de novo*急性骨髄性白血病骨髄細胞ではほとんど検出できなかったのに対して、MDS 3例中3例および急性リンパ性白血病2例中1例では高発現が認められた。特に高発現が認められた4例の症例では2.6 kb、3.6 kbおよび8.2 kbの転写産物の発現が認められ、8.2 kbの転写産物の発現の強さは2.6 kbおよび3.6 kbの転写産物の発現と同程度であった。

4）ヒトTec蛋白質はWestern blot法では72 KDaの蛋白質として検出された。

5）ヒト*tec*遺伝子は染色体4p12に局在していた。

6）マウスTecの2種類のSH3 domainのうちSH3Lは数種類の細胞内蛋白質と会合し、その一部はリン酸化蛋白質であった。SH3SではSH3Lと比較して細胞内蛋白質との会合は弱く認められ、リン酸化蛋白質との会合は検出できなかった。

4－1．ヒトTec kinase

核酸配列から予想されるヒトTec kinaseの構造は4種類のマウスTec kinaseのうちtype IVと最も相同性が高い。すなわち、unique domainは180アミノ酸からなり、SH3 domainはSH3Lと同様の構造を持っており、C末端のアミノ酸配列は1アミノ酸を除きtypeIVのアミノ酸配列と一致している。

SrcファミリーのkinaseとTecファミリーのkinaseのN末側のunique domainは良く保存されている。最近、protein kinase Cの基質であるplecksrinの両端にある100アミノ酸残基程の配列と相同性の高い配列が細胞内情報伝達系に関与する蛋白質であ

るVav、Bcr、Sos、phosopholipase C-γ（PLCγ）、Ras-Guanine nucleotide releasing factor（Ras-GRF）、3BP2などに存在することがわかり、pleckstrin homology（以下PHとする）と呼ばれている（４６－４８）。興味深いことに、Tecファミリーの3種類のkinaseにも同様の配列がunique domainの中に存在することがわかった。*btk*の点突然変異はBtkのPH中のアミノ酸を変化させ、マウスのXIDを引き起こす（７）ことが報告されており、Tecの同領域の機能にも興味が持たれる。unique domainのN末側から115アミノ酸残基にPH domainは相当する。ヒトTecのこの領域アミノ酸配列はマウスのTec type IVと92％、マウスItk/Tskと63％、ヒトBtkと54％の相同性が認められた。ヒトTecのaa 119-128のアミノ酸KYHPKFWTDG（H; histidine, T; threonine）およびaa 156-162のアミノ酸KALPPAPEはTecファミリーのkinase間で非常に良く保存されている。これらはいわゆるPH domainには含まれておらず、Tecファミリーのkinaseに固有の機能に関与しているものと考えられる。また、aa 166-173のprolineに富むアミノ酸配列RRPPPPIP（I; isoleucine）はヒトTecとマウスTecの間で完全に保存されている。この配列に相当するアミノ酸配列はItk/TskやBtkには存在しない。この配列はc-AblのSH3 domainと会合する蛋白質としてクローニングされた3BP1、3BP2に存在するSH3 domainとの会合領域と考えられているXPXXPPPΦXP（P; proline、Φ; 疎水性アミノ酸、X; 保存されていないアミノ酸）というprolineに富むアミノ酸配列にきわめて類似している（４９）。実際にマウスTecのN末端unique domainのaa 94-181（以下NTec2領域とする）とGSTとの融合蛋白質GST-NTec2を用いて、FDC-P1細胞の細胞内蛋白質とNTec2領域との会合を調べた実験では複数の細胞内蛋白質がこの領域に会合することが示されている（Mano, H. *et al.* data in submission）。これらの会合蛋白質のうちいくつかはIL-3刺激によりtyrosine残基がリン酸化される。興味深いことに、Srcファミリーのprotein-tyrosine kinaseであるLynはGST-NTec2と会合し、特にそのSH3 domainとGSTとの融合蛋白質GST-SH3Lynは*in vitro*でGST-NTec2と会合することが示されており（Mano, H. *et al.* data in submission）、LynはそのSH3 domainを介してTecのunique domainと会合しうることがわかった。従って、TecはそのN末側の

unique domainを介して細胞内のSH3 domainを持つ蛋白質と相互作用している可能性がある。

Northern blot法による解析ではヒト*tec*遺伝子の転写産物は主に2.6 kbと3.6 kbの2種類が存在することがわかった。3'側の非翻訳領域内の配列をprobe（3'-tec probe）として用いたNorthern blotより、2.6 kbと3.6 kbの転写産物の大きさの違いは3'側の非翻訳領域内のalternative splicingによるものと考えられた。血液細胞株ではこれら以外に一部の細胞株では5.0 kbあるいは10.0 kbと8.2 kbの転写産物の発現もみとめられた。細胞株に特異的なalternative splicingにより生成される転写産物の可能性や未熟な転写産物の可能性がある。

ヒト*tec*遺伝子は他のTecファミリーのBtkが主にB細胞に（５、６）、Itk/TskがT細胞特異的に発現している（３、４）のとは異なり、血液細胞の系統によらず発現が認められる。したがって、Tecは血液細胞の種々の系統に共通な情報伝達系に関与している可能性が示唆される。

造血器腫瘍の患者検体では*tec*遺伝子の発現はMDSの症例３例中３例に、急性骨髄性白血病の症例２例中０例、急性リンパ性白血病の症例２例中１例に認められた。健康人の末梢血単核細胞ではTecの発現は検出できなかった。また、このNorthern blotでは血液細胞株PEERでは2.6 kbの転写産物が強く3.6 kbの転写産物が弱く発現していたのと比較して、発現の認められた患者検体では全例で2.6 kbの大きさの転写産物とほぼ同じ強さで3.6 kbと8.2 kbの転写産物の発現がみとめられた。

MDSの病因は明らかになっていないが、血液幹細胞の段階での腫瘍化と考えられている。*tec*遺伝子が血液細胞株で広く発現していることと、MDSで高発現しているということからTecが血液幹細胞あるいはそれに近い未熟な血液細胞の増殖に深く関与している可能性を示唆していると思われる。造血器腫瘍における非受容体型protein-tyrosine kinase遺伝子の発現については*hck*遺伝子が急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、および急性単球性白血病の芽球で（５０）、*fgr*遺伝子が急性骨髄単球性白血病および急性単球性白血病の芽球で高発現している（５１）という報告がなされている。*tec*遺伝子はMDSの患者検体全例で発現がみられたが、MDSの

芽球で高発現のみられた非受容体型protein-tyrosine kinase遺伝子の初めての例である。

ヒトの造血器腫瘍で4p12 locusの染色体異常は、現在まで4例の報告がある。1例はホジキン病に対する放射線および化学療法後のMDS由来の急性非リンパ球性白血病、他の3例は非ホジキンリンパ腫の症例である（５２－５５）。我々の検討した症例ではTecが高発現している症例を含めて4p12に異常の認められる症例はなかった。しかし、Tecが高発現している症例では高発現の原因として*tec*遺伝子の点突然変異や遺伝子再構成が起こっている可能性もあり、今後の検討課題である。

４－２．Tec-SH3 domainの機能

SH3 domainは細胞内情報伝達に関与する蛋白質や細胞骨格蛋白質の多くに存在しているが（５６）、その機能については不明な点が多い。SH3 domainに変異のあるSrcはkinase活性やトランスフォーメーション活性に変化がみられることより、tyrosine kinaseに存在するSH3 domainはkinase活性を調節する働きがあることが報告されている（５７、５８）。

c-ablのSH3 domainと会合する蛋白質としてクローニングされた3BP1は低分子量G蛋白質であるRhoに対するGTPase activating protein（GAP）の一部と相同性が高い構造を持っている（５９）。また、GRB2のSH3 domainはRasのGuanine nucleotide releasing factorのひとつであるSOSとそのプロリンに富むアミノ酸配列を介して会合している（６０－６２）。GTP-hydrolyzing microtubule-associated enzymeであるdynaminはphosphatidilinositol 3'-kinase（PI 3-kinase）のp85 subunitのSH3 domainと会合する（９）。これらはSH3 domainがtyrosine kinaseからRasなどの低分子量G蛋白質への情報の伝達に関与していることを示すものである。

最近、PI 3-kinaseのp85 subunitはv-SrcやT細胞に発現しているFynのSH3 domainとprolineに富むアミノ酸配列を介して会合していることが報告され（１０、１１）、PI 3-kinaseが関与する情報伝達系においてもSH3 domainが重要な役割を担っている可能性がある。

PLC-γの欠損体を用いた実験より、PLC-γはそのSH3 domainを介してアクチン細胞骨格と会合していることがわかり（１２）、SH3 domainがSH3 domainを含む蛋白質の細胞内の局在の決定に関与していることを示している。

以上みてきたようにSH3 domainにはtyrosine kinaseの活性の調節、Rasなどの低分子量G蛋白質への情報の伝達、PI 3-kinaseが関与する情報伝達への関与、蛋白質の細胞内の局在の決定など多彩な機能が認められるが、これはSH3 domainのリガンドの多彩さによるものと思われる。TecのSH3 domainはalternative splicingによりSH3LとSH3Sの２種類存在する。それぞれのリガンドを明らかにすることは、異なるSH3 domainを持つTecの細胞内での機能を解析するために重要であると考えられる。図14にマウスTec、PI 3-kinaseのp85 α subunitおよびspectrinのSH3 domainのアミノ酸配列（図14a）と予想される構造（図14b）を示す（９）。アミノ酸配列の比較からTecのSH3 domainはspectrinのSH3 domainと類似した構造を持っていると考えられる。SH3 domainは５つのβ strandからなっていると考えられているが（９）、SH3Sは図14bのspectrinのSH3 domainの47番以降のアミノ酸しているに対応するアミノ酸が欠損しており、SH3Lと比較してC末端側の2つのβ strandが欠損していると考えられる。この欠損していると考えられる領域はp85 subunitのSH3 domainがそのリガンドであるdynaminとの会合部位の一部を成すと考えられている（９）。*C. elegans*のSem-5ではSH3Sで欠損しているふたつのβ strandに対応する領域内におこる点突然変異によって種々の発生異常が生じることが知られている。Sem-5のコドン49のprolineがleucineに変化する突然変異では91 %が致死的で、81 %にsex myoblastのmigrationの異常が起こる（６３）。コドン201のglycineがarginineに変化する突然変異では全例でsex myoblastのmigrationの異常とともにvulval inductionも起こらない（６３）。これらの事実からSH3SとSH3Lでは大きな機能の差があることが推測される。実際、FDC-P1細胞をmetabolic labelした実験ではGST-SH3Lと会合する蛋白質は複数認められたのに対し、GST-SH3Sでは会合する蛋白質の種類も少なく、その会合も弱いものであった。

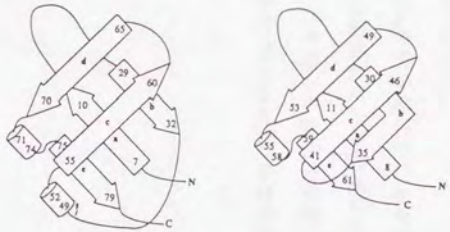
このことはSH3Sはリガンドとの会合能力を欠いているか弱い可能性を示唆する。したがって、SH3 domainを介した蛋白質間相互作用にはSH3Sで欠損しているC末端側の2つのβ strandの存在が重要であることがわかる。alternative splicingにより異なったSH3 domainを持つ他のtyrosine kinaseとしてc-Srcがある。組織特異的なalternative splicingによって神経系に発現しているneural Src（n-Src）は他の組織のc-Srcと比較してSH3 domain内に6アミノ酸の挿入がある（６４）。*in vitro*ではc-SrcのSH3 domainが3BP1、3BP2、dynaminと会合できるのに対して、n-SrcのSH3 domainはこれらの蛋白質とは会合できなくなる（９、４９、５９）。このことから*in vivo*でも両者のSH3 domainの構造の違いが会合する蛋白質の違いを生み、両者の機能の違いに結び付く可能性がある。従って、SH3 domainの異なるTecは細胞内で異なった機能を果たしている可能性がある。

また、GST-SH3Lとリン酸化蛋白質pp58との会合はIL-3の刺激の影響は受けなかった。GRB2とSOSとのSH3 domainを介する会合もconstitutiveであり、GRB2とSOSではこれらの複合体がepidermal growth factor（EGF）の刺激にともないEGF受容体およびRasと会合しEGFの刺激がRasに伝えられる（６０－６２）。TecのSH3 domainとそれと会合する蛋白質との複合体も同様の機構で他の蛋白質と相互作用をしている可能性がある。

a

Mouse Tec Type IV	EENTEEIVVAMYDFQATEAHDLRLERGQEYI ILEKN DLHWWRARDKY GSEGYIPSNYVTGKKSNNLD
Mouse Tec Type I-III	EENTEEIVVAMYDFQATEAHDLRLERGQEYI ILEKN DLHWWRARDKY G
Chicken brain αSpectrin	DETGKEL**VLAL**YDYQEKSPREVTMKKGD**ILT** **LLN**ST NKD**WWKVEV**N DR**QGFV**PAAYV**KKL**DPA
Bovine p85α	MSAEGY**QYRA**LYDYKKEREEDIDLHLGD**ILTV**NKGSLVALGFSD GQEAKPEEIG**WLNGYN**ETTG**ERGDFP**GTYVEYIGRK

b



p85α spectrin

図14　SH3 domainの構造（文献９より引用。一部改変。）

a　アミノ酸配列の比較。太字はβ strandを構成するアミノ酸を示す。

b　SH3 domainの構造。矢型はβ strandを示す。

第5章　今後の展望

Tecは非受容体型tyrosine kinaseの中では新しいメンバーであり、まだ細胞内での役割に関して不明な点が多い。ヒトXLAおよびマウスXIDの責任遺伝子がTecファミリーのBtkであり、Tecファミリーのtyrosine kinaseのN末端のunique domainに細胞内情報伝達に関与する他の蛋白質と共通の新しいpleckstrin homologyが見つかるなどTecの細胞内情報伝達系における役割はますます興味深いものになりつつある。ヒトの血液細胞では他のTecファミリーのtyrosine kinaseと異なり広範な系統の血液細胞で転写産物の発現がみられることを示した。Tecは広範な系統の血液細胞の増殖機構において重要な役割を果たしていると考えられる。これからは、Tecを介する情報伝達系がいかなるものであるかについて検討していきたい。

TecファミリーのBtkの異常がヒトXLAを引き起こすことが報告されているが（5、6）、おそらく他にもtyrosine kinaseが関係している疾患は存在すると思われ、Tecの異常が血液細胞の増殖や機能に異常を引き起こし疾患を発症させる可能性も否定できない。血液疾患におけるTecの発現の異常やkinase活性の変化などについての検討を行いたい。

発表予定論文

1. Sato, K., Mano, H., Ariyama, T., Inazawa, J., Yazaki, Y., and Hirai, H., Molecular cloning and analysis of the human Tec protein-tyrosine kinase. 投稿中

2. Sato, K., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H., Characterization of cellular proteins associated with Tec-SH3 domain in a hematopoietic cell line. 投稿準備中

関連論文

1. Mano, H., Sato, K., Yazaki, Y., and Hirai, H., The Tec protein-tyrosine kinase is involved in the IL-3 signaling pathway in a murine myeloid cell line. 投稿中

2. Mano, H., Sato, K., Yazaki, Y., and Hirai, H., Tec protein-tyrosine kinase associates with Lyn protein-tyrosine kinase though its N-terminal unique domain. 投稿中

引用文献

1 H. Mano, F. Ishikawa, J. Nishida, H. Hirai and F. Takaku; A novel protein-tyrosine kinase, *tec*, is preferentially expressed in liver, Oncogene, 5: 1781-1786, 1990

2 H. Mano, K. Mano, B. Tang, M. Kohler, T. Yi, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and J. N. Ihle; Expression of a novel form of *Tec* kinase in hematopoietic cells and mapping of the gene to chromosome 5 near Kit, Oncogene, 8: 417-424, 1993

3 J. D. Siliciano, T. A. Morrow and S. V. Desiderio; *itk*, a T-cell-specific tyrosine kinase gene inducible by interleukin 2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11194-11198, 1992

4 S. D. Heyeck and L. J. Berg; Developmental regulation of a murine T-cell-specific tyrosine kinase gene, *Tsk*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 669-673, 1993

5 D. Vetrie, I. Vorechovsky, P. Sideras, J. Holland, A. Davies, F. Flinter, L. Hammarstrom, C. Kinnon, R. Levinsky, M. Bobtoe, C. I. E. Smith and D. R. Bently; The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the *src* family of protein-tyrosine kinases, Nature, 361: 226-233, 1993

6 S. Tsukada, D. C. Saffran, D. J. Rawlings, O. Parolini, R. C. Allen, I. Klisak, R. S. Sparkes, H. Kubagawa, T. Mohandas, S. Quan, J. W. Belmont, M. D. Cooper, M. E. Conley and O. N. Witte; Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia, Cell, 72: 279-290, 1993

7 D. J. Rawlings, D. C. Saffran, S. Tsukada, D. A. Largaespada, J. C. Grimaldi, L. Cohen, R. N. Mohr, F. Bazan, M. Howard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and O. N. Witte; Mutation of Unique Region of Bruton's Tyrosine Kinase in Immunodeficient XID Mice, Science, 261: 358-361, 1993

8 J. D. Thomas, P. Sideras, C. I. E. Smith, I. Vorechovsky, V. Chapman and W. E. Paul; Clocalization of X-Linked Agammaglobulinemia and X-Linked Immunodeficiency Genes, Science, 261: 355-58, 1993

9 G. W. Booker, I. Gout, A. K. Downing, P. C. Driscoll, J. Boyd, M. D. Waterfield

and I. Campbell; Solution Structure and Ligand-Binding Site of the SH3 Domain of the p85α Subunit of Phosphatidylinositol 3'-Kinase, Cell, 73: 813-822, 1993

10 X. Liu, L. M. Marengere, C. A. Koch and T. Pawson; The v-Src SH3 Domain Binds Phosphatidylinositol 3'-Kinase, Mol. Cell. Biol., 13: 5225-5232, 1993

11 K. V. S. Prasad, O. Janssen, R. Kapeller, M. Raab, L. C. Cantley and C. E. Rudd; Src-homology 3 domain of protein kinase $p59^{fyn}$ mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 909: 7366-7370, 1993

12 D. Bar-Sagi, D. Rotin, A. Batzer, V. Mandiyan and J. Schlessinger; SH3 Domains Direct Cellular Localization of Signaling Molecules, Cell, 74: 83-91, 1993

13 H. P. Koeffler, R. Billing, A. J. Lusis, R. Sparkes and D. W. Golde; Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Lines Responsive to Colony-Stimulating Activity, Science, 200: 1153-1154, 1978

14 S. J. Collins, R. C. Gallo and R. E. Gallagher; Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, Nature, 270: 347-349, 1977

15 M. Ohta, Y. Furukawa, C. Ide, N. Akiyama, T. Utakaji, Y. Miura and M. Saito; Establishment and characterization of four human monocytoid cell lines (JOSK-I, -S, -M, -K) with capabilities of monocyte-macrophage lineage differentiation and constitutive production of Interleukin 1, Cancer Res., 46: 3067-3074, 1986

16 M. P. Bodger, G. L. Mounsey, J. Nelson and P. H. Fitzgerald; A monoclonal antibody reacting with human basophils, Blood, 69: 1414-1418, 1987

17 C. B. Lozzio and B. B. Lozzio; Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome, Blood, 45: 321-334, 1975

18 S. Chiba, F. Takaku, T. Tange, K. Shibuya, C. Misawa, K. Sasaki, K. Miyagawa, Y. Yazaki and H. Hirai; Establishment and Erythroid Differentiation of a Cytokine-Dependent Human Leukemic Cell Line F-36: A Parental Line Requiring Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor or Interleukin-3, and a Subline Requiring Erythropoietin, Blood, 78: 2261-2268, 1991

19 J. Spira, S. Povey, F. Wiener, G. Klein and M. Anderson-Anvret; Chromosome banding, isoenzyme studies and determination of Epstein-Barr virus DNA content on human Burkitt lymphoma/mouse hybrids, Int. J. Cancer, 20: 849-853, 1977

20 R. J. V. Pulvertaft; Cytology of Burkitt tumor (African lymphoma), Lancet, 1: 238-239, 1964

21 J. L. Fahey, D. N. Buell and B. H. C. Sox; Proliferation and differentiation of lymphoid cells; studies with human lymphoid cell lines immunoglobulin synthesis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 190: 221-234, 1972

22 J. A. V. Boxel and D. N. Buell; IgD on cell membranes of human lymphoid cell lines with multiple immunoglobulin classes, Nature, 251: 443-444, 1974

23 I. D. Theodorou, L. Boumsell, C. F. Calvo, H. Gouy, H. M. Beral and P. A. D. Debre; Stimulation of human T cell lines induces a rapid increase in the intracellular free Ca^{2+} concentration and the production of IL-2, J. Immunol., 144: 2518-2523, 1990

24 R. E. McCarthy, V. Junius, S. Farber, H. Lazarus and G. E. Foley; Cytogenetic Analysis of Human Lymphoblasts in Continuous Culture, Exp. Cell Res., 40: 197-200, 1965

25 U. Schneider, H. U. Schwenk and G. Bornkamm; Characterization of EBV-genome negative "Null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, Int. J. Cancer, 19: 621-626, 1977

26 Z. Ravid, N. Goldblum, R. Zaizov, M. Schlesinger, T. Kertes, J. Minowada, W. Verbi and M. Greaves; Establishment and characterization of a new leukemic T-cell line (PEER) with an usual phenotype, Int. J. Cancer, 25: 705-710, 1980

27 T. M. Dexter, J. Garland, D. Scott, E. Scolnick and D. Metcalf; Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines, J. Exp. Med., 152: 1036-1047, 1980

28 Y. Gluzman; SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, Cell, 23: 175-182, 1981

29 P. Chomczynski and N. Sacchi; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal. Biochem., 162: 569-574, 1987

30 A. Jacobson; Purification and fractionation of poly $(A)^+$ RNA, Method. Enzym., 152: 254-261, 1987

31 C. J. Watson and J. F. Jackson; An alternative procedure for the synthesis of double-stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vectors. In: DNA cloning Volume I. D. M. Glover (ed.) IRL press: Oxford, 79-88

32 M. Russel, S. Kidd and M. R. Kelley; An improved filamentous helper phage for generate single-stranded plasmid DNA, Gene, 45: 333-338, 1986

33 F. Sanger, S. Nicklwn and A. R. Coulson; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977

34 E. Harlow and D. Lane; Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 502-510, 1988

35 Y. Takebe, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Holy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida and N. Arai; SRα Promoter: an Efficient and Versatile Mammalian cDNA Expression System Composed of the Simian Virus 40 Early Promoter and the R-U5 Segment of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat, Mol. Cell. Biol., 8: 466-472, 1988

36 J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis; Molecular Cloning (second edition), Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 16.42-16.44, 1989

37 J. Inazawa, T. Saito, T. Ariyama, T. Abe and Y. Nakamura; High-resolution cytogenetic mapping of 342 new cosmid markers including 43 RFLP markers on human chromosome 17 by fluorescence *in situ* hybridization, Gemonics, 17: 153-162, 1993

38 H. Takahashi, T. Hori, P. O'Conell, M. Leppert and R. White; R-banding and nonisotopic *in situ* hybridization: precise location of the human type II collagen gene (COLA2A1)., Human Genet, 86: 14-16, 1990

39 D. Pinkel, T. Straum and J. W. Gray; Cytogenic analysis using quantitative, high-sensitive, fluorescent *in situ* hybridization., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4358-4362, 1989

40 D. B. Smith and K. S. Johnson; Single-step purification of polypeptides expressed in Esherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase, Gene, 67: 31-40, 1988

41 U. K. Laemmli; Cleavage of structural proteins during the assembly of the bead of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685, 1970

42 M. Wickens and P. Stephenson; Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation, Science, 226: 1045-1051, 1984

43 J. M. Kaplan, G. Mardon, J. M. Bishop and H. E. Varmus; The first seven amino acids encoded by the v-*src* oncogene act as a myristylation signal: lysine 7 is a critical determinant, Mol. Cell. Biol., 8: 2435-2441, 1988

44 S. K. Hanks, A. M. Quinn and T. Hunter; The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains, Science, 241: 42-52, 1988

45 T. Hunter; A tail of two src's: mutatis mutandis, Cell, 49: 1-4, 1987

46 B. J. Mayer, R. Ren, K. L. Clark and D. Baltimore; A Putative Modular Domain Present in Diverse Signaling Proteins, Cell, 73: 629-630, 1993

47 R. J. Haslam, H. B. Koide and B. A. Hemmings; Pleckstrin domain homology, Nature, 363: 309-310, 1993

48 A. Musacchio, T. Gibson, P. Rice, J. Thompson and M. Saraste; The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signaling proteins, Trends Biochem. Sci., 18: 343-348, 1993

49 R. Ren, B. J. Mayer, P. Cicchetti and D. Baltimore; Identification of a ten-amino

acid proline-rich SH3 binding site, Science, 259: 1157-1161, 1993

50 N. Quintrell, R. Lebo, H. Varmus and J. M. Bishop; Identification of a human gene (*HCK*) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells, Mol. Cell. Biol., 7: 2267-2275, 1987

51 C. L. Willman, C. C. Stewart, J. K. Griffith, S. J. Stewart and T. B. Tomasi; Differential expression and regulation of the c-*src* and c-*fgr* protooncogenes in myelomonocytic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4480-4484, 1987

52 E. G. Levine, D. C. Arthur, G. Frizzera, B. A. Peterson, D. D. Hurd and B. C. D; There are Differences in Cytogenetic Abnormalities Among Histlogic Subtypes of the Non-Hodgkin's Lymphomas, Blood, 66: 1414-1422, 1985

53 M. M. Le Beau, K. S. Albain, R. A. Larson, J. W. Vardiman, E. M. Davis, R. R. Blough, H. M. Golomb and J. D. Rowley; Clinical and Cytogenetic Correlations in 63 Patients With Therapy-Related Myelodysplastic Syndromes and Acute Nonlymphocytic Leukemia: Further Evidence for Characteristic Abnormalities of Chromosomes No. 5 and 7, J. Clinical Oncol., 4: 325-345, 1986

54 N. Maseki, Y. Kaneko, M. Sakurai, M. Kurihara, K. Sampi, K. Shimamura and S. Takayama; Chromosome Abnormalities in Malignant Lymphoma in Patients from Saitama, Cancer Research, 47: 6767-6775, 1987

55 M. A. Kosmo, R. T. Mitsuyasu, R. S. Sparkes and R. P. Gale; Trisomy 12 in Burkitt-like Lymphoma Associated with Acquired Immunodeficiency Syndrome, Cancer Genet. Cytogenet., 29: 245-251, 1987

56 T. Pawson and G. D. Gish; SH2 and SH3 domains: From structure to function, Cell, 71: 359-362, 1992

57 W. M. Potts, A. B. Reynolds, T. J. Lansing and J. T. Parsons; Activation of $pp60^{c\text{-}src}$ Transforming Potential by Mutations altering the Structure of an Amino Terminal Domain Containing Residues 90-95, Oncogene Research, 3: 343-355, 1988

58 C. Seidel-Dugan, B. E. Meyer, S. M. Thomas and J. S. B. rugge; Effects of SH2

and SH3 Deletion on the Functional Activities of Wild-Type and Transforming Variants of c-Src, Mol. Cell. Biol., 12: 1835-1845, 1992

59 P. Cicchetti, B. J. Mayer, G. Thiel and D. Baltimore; Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho, Science, 257: 803-806, 1992

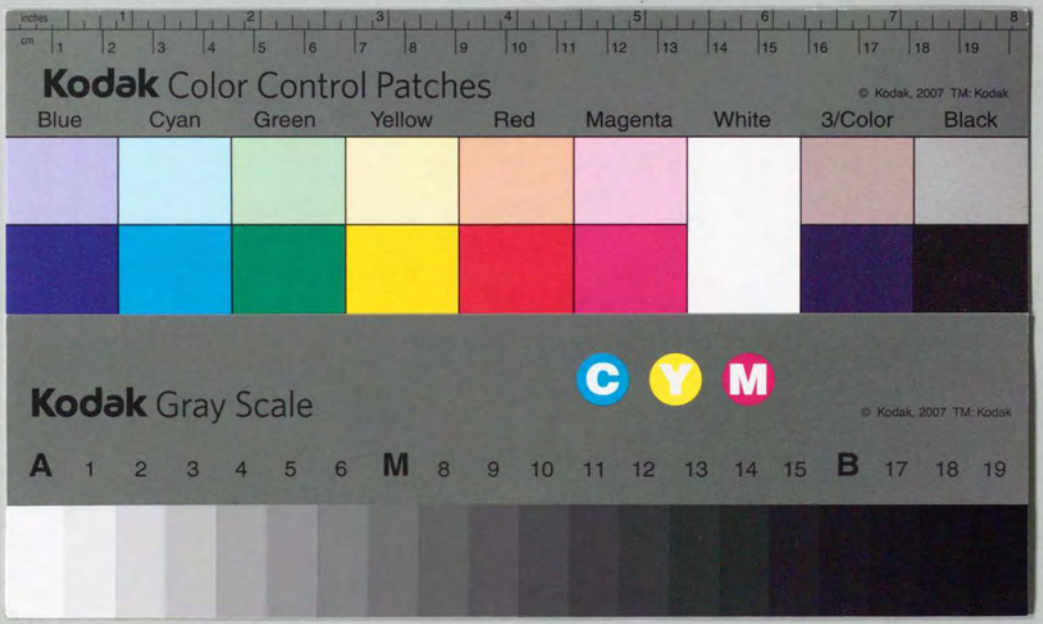
60 S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland and R. A. Weinberg; Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation, Nature, 363: 45-51, 1993

61 M. Rozakis-Adcock, R. Fernley, J. Wade, T. Pawson and D. Bowtell; The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSOS, Nature, 363: 83-85, 1993

62 N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis and J. Schlessinger; Guanine-nucleotide-releasing factor hSOS binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinase to Ras signalling, Nature, 363: 85-88, 1993

63 S. G. Clark, M. J. Stern and H. R. Horvitz; *C. elegans* cell-signaling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains, Nature, 356: 340-344, 1992

64 J. B. Levy, T. Dorai, L. H. Wang and J. S. Brugge; The structurally distinct form $pp60^{c\text{-}src}$ detected in neuronal cells is encoded by a unique c-*src* mRNA, Mol. Cell. Biol., 7: 4142-4145, 1987


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19