博士論文

G-CSF 刺激により誘導される 好中球分化における Gab2 の役割

2020年9月

趙 香琳

岡山大学大学院 自然科学研究科

目次

第一章 要旨1
第二章 序論3
第一節 血液細胞
第1項 血液細胞の分類とその機能 3
第2項 好中球 4
第二節 好中球5
第1項 サイトカイン 5
第2項 好中球の増殖と分化 6
第三節 G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)6
第1項 G-CSF 6
第2項 G-CSF 受容体を介するシグナル伝達7
第四節 DOS/Gab ファミリ 8
第1項 Gab タンパク質9
第2項 Gab2と好中球の増殖と分化10
第3項 Gab2 のシグナル伝達と Gab2 の RSK 介する負のフィードバック
第五節 本研究の目的 11
第三章 方法と材料12
第一節 材料 12
第二節 方法 17
第四章 結果
第1節 Gab3 タンパク質の発現が GM−I62−1 の分化への影響 26
第1項 前駆細胞 GM−I62−1 に導入し安定発現株の樹立 26
第2項 Gab3 発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

第3項 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化......27 第2節 Gab2-3 キメラタンパク質の過剰発現が GM の分化への影響..... 29 第1項 Gab2-3 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築...... 29 1、EF-1αのプロモーターを持ち、C末に Flag タグを付加する動物発 2、Gab2-3-300 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築 30 (2) Gab2-3-300 キメラタンパク質発現プラスミドの構築 31 3、Gab2-3-200 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築 33 (2) Gab2-3-200 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築 34 第2項 抗 Gab2-3 抗体の精製 36 3、抗体用 GST-Gab2-3 タンパク質発現の確認...... 40 (2)抗体用 GST-Gab2-3 タンパク質発現の確認......40 4、抗 Gab2-3 抗体の精製...... 42 (1)glutatine-sepharose-GST-Gab2-3-300-C'の作製......42 (2)抗 Gab2-3 抗体の精製...... 43 5、抗 Gab2-3 抗体の確認...... 45 第3項 Gab2-3 キメラタンパク質の安定発現株の樹立......46 1、COS-7 でタンパク質の発現の確認 46 2、前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立......46 第4項 各発現株の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化47 1、Gab タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 47 2、Gab2-3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化 47 第5項 各発現株における Gab タンパク質のリン酸化 49 第3節 Gab3 タンパク質の発現が LGM-Y4 の分化への影響..... 51 第1項 前駆細胞 LGM-Y4 に導入し安定発現株の樹立 51 第2項 Gab3 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態

1、Gab3 発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線
2、Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化 52
第4節 Gab2 タンパク質の過剰発現が GM-I62-1 の分化への影響 55
第1項 Gab2 タンパク質過剰発現 GM-I62-1 細胞の Gab2 発現量の確認 55
第2項 Gab2 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 55
第3項 Gab2 タンパク質過剰発現株における核の形態変化 56
第5節 変異型 Gab2 および変異型 Gab3 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の
増殖曲線及び核の形態変化58
第1項 変異型 Gab2 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核
の形態変化 58
1、Gab2-STAT3(-)タンパク質の発現プラスミドの構築58
(1) Gab2-STAT3(-)の変異部分の構築58 (2) Gab2-STAT3(-)の登現プラスミドの構築59
2、COS-7 でタンパク質の発現の確認
3、変異型 Gab2 発現プラスミドを前駆細胞 GM−I62−1 に導入し安定発現
株の樹立61
(1)Gab2−PI3K(−)タンパク質61 (2)前駆細胞 GM−I62−1 に導入し安定発現株の樹立61
4、変異型 Gab2 発現細胞の G−CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化 61
第2項 Gab3-PI3K(-)タンパク質発現細胞のG-CSF依存の増殖曲線及び核
の形態変化 62
1、Gab3-PI3K(-)タンパク質過剰発現 GM-I62-1 細胞の Gab2 発現量の確
認62
2、Gab3-PI3K(-)タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 63
3、Gab3-PI3K(-)タンパク質発現株における核の形態変化63
4、G-CSF 刺激後 GM-Gab3、GM-Gab3-PI3K(-)の Akt 及び MAPK リン酸化の
経時変化の比較65
第6節 変異型Gab2-3-300キメラタンパク質の発現がGM-I62-1の分化への
影響
第1項 変異型 Gab2−3−300 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築 66

1、Gab2-3-300 の S211A 変異部分の構築 6	6
2、Gab2-3-300-S211A の発現プラスミドの構築 6	38
第2項 COS−7 でタンパク質の発現の確認 6	38
第3項 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立6	3 9
第4項 Gab2-3-300-S211A タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲紙	Į
及び核の形態変化	'0
1、Gab2-3-300-S211A タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 . 7	'0
2、Gab2−3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化	'0
第7節 Gab2−3−300 タンパク質過剰発現細胞の再調査7	'2
第1項 Gab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞 stock を取り出し7	'2
第 2 項 Gab2-3-300 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核	Ē
の形態変化の再調査	'2
1、Gab2-3-300 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 7	'2
2、Gab2−3−300 タンパク質発現株における核の形態変化	'3
第8節 Gab3FF タンパク質の発現が GM−I62−1 の分化への影響7	'5
第1項 Gab3FF タンパク質の発現プラスミドの構築	'5
1、Gab3FF の変異部分の構築 7	'5
2、Gab3FF の発現プラスミドの構築 7	7
第2項 COS-7 でタンパク質の発現の確認7	'8
第3項 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立	'8
第4項 Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形	1
態変化	'9
1、Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線	'9
2、Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化 8	30
第9節 GM-I62-1 細胞内 Gab2 と Gab3 及び Gab3FF の発現量の比較 8	32
第1項 Flag タグを付加する Gab2 プラスミドの構築 8	32
第 2 項 COS-7 にプラスミドの導入 8	33
第3項 GM-I62-1 細胞の内在性 Gab2 の量と GM-Gab3 細胞の外来性	
Gab3-F1ag の相対比	33

第10節 各発現株における細胞内他のシグナル伝達因子のリン酸化及び Gab タンパク質と SHP 2 との結合 86 第2項 G-CSF 刺激後 GM-Gab3、GM-Gab3FF の Gab2、Gab3 のリン酸化と SHP2 第11節 MAPK 抑制剤によって、Gab3 過剰発現細胞の分化阻害の回復...89 第1項 MAPK 抑制剤の効果について......89 第2項 10μM U0126 を加える場合 MAPK のリン酸化状況と GM-Gab3 の増 1、10 μ M U0126 を加える場合 MAPK のリン酸化状況 90 2、10 μ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲 3、10 µ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化92 第12節 Gab3、Gab3FF タンパク質の発現が L-G 細胞の分化への影響...94 1、Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線 ...94 2、前駆細胞 L-G に導入し安定発現株の樹立......96 3、Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変 (1) Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線97 第13節 各発現株における細胞内Lynのリン酸化及びGabタンパク質とLyn の結合......100 第1項 Lyn 抑制剤を加える場合 Lyn のリン酸化状況 100 第2項 各発現株におけるLynのリン酸化及びLynとGabタンパク質との

結合	·	101
第五章	総結及び今後の展望	103
第六章	参考文献	106

第一章 要旨

好中球は最も多い白血球であり、体に侵入した微生物に対して最初の防御 系を提供する。G-CSFは成熟好中球への分化を誘導する重要なサイトカインで ある。Gab2はスカフォールドタンパク質の一つである。好中球前駆細胞 GM-I62-1では主にGab2が発現し、Gab3もわずかに存在する。GM-I62-1細胞 をG-CSFで刺激すると、多くのタンパク質のチロシンリン酸化が起り、Gab2 もチロシンリン酸化されるタンパク質のひとつである。GM-I62-1細胞はG-CSF の存在下に培養すると、数日間増殖した後、増殖停止と核の分葉化を伴う成熟 好中球への分化が誘導される。

G-CSF 刺激による好中球分化誘導のシグナル伝達反応における Gab2 の働き を明らかにするために、Gab2 と構造が類似した Gab3 に注目し好中球前駆細胞 GM-I62-1 に Gab3 を過剰発現させる事により、Gab2 の作用を抑制した時の好中 球への分化誘導への影響を解析した。Gab3 の過剰発現細胞 GM-Gab3 を樹立し、 G-CSF 存在下での好中球への分化誘導への影響を解析したところ、GM-Gab3 細 胞は G-CSF を含む培地の中で増殖停止が見られず、成熟好中球特有の核の分葉 化も見られなかった。したがって、Gab3 過剰発現により G-CSF 依存の好中球 への分化誘導の阻害が見られた。

Gab3 過剰発現による好中球分化誘導の阻害機構における Gab3 と内在性 Gab2 の働きのちがいを解析した。Gab3 過剰発現細胞 GM-Gab3 では、G-CSF 刺 激により Gab3 がチロシンリン酸化をうけ、一方で Gab2 のチロシンリン酸化は 抑制された。したがって、G-CSF 刺激によるシグナル伝達反応において過剰発 現した Gab3 が Gab2 のリン酸化を競合的に抑制している事が明らかになった。

他の研究グループによる他の細胞を用いた研究により、EGF 刺激による Gab2 のチロシンリン酸化による SHP2 の Gab2 への結合は、SHP2 の下流で働く Ras-MAPK-RSK 又は RSK 以外のリン酸化酵素による Gab2 の Ser(又は Thr)残基 のリン酸化により、ネガテイブフィードバックを受ける事が報告された。Gab2 と Gab3 のアミノ酸配列を比較すると、Gab3 には Gab2 で RSK によりリン酸化 を受ける Ser 残基が存在しない事から、Gab3 のチロシンリン酸化はネガテイ ブフィードバックを受けない事が予想された。これを確認するために、Gab2 を主に発現する親株 GM-I62-1 と Gab3 過剰発現により、Gab3 が主に働き、Gab2 のリン酸化が抑制される GM-Gab3 細胞において、G-CSF 刺激による Gab2、Gab3 のチロシンリン酸化の経時変化、チロシンリン酸化による Gab2、Gab3 への SHP2 の結合の経時変化、および Gab2 又は Gab3 への SHP2 の結合により活性化され る Ras-MAPK 経路の MAPK のリン酸化の経時変化を解析した。Gab2 を主に発現 する親株の GM-I62-1 細胞では、G-CSF 刺激による一時的な Gab2 のチロシンリ ン酸化、SHP2のGab2への結合し、その下流で働くMAPKの一時的なリン酸化 (活性化)が見られ、20分後にはこれらの反応の低下が見られた。したがっ て Gab2 を介するシグナル伝達反応にネガテイブフィードバック機構が働いて

いる事が明らかになった。一方でGab3を過剰発現したGM-Gab3細胞では、G-CSF 刺激依存に継続したGab3のチロシンリン酸化、継続したSHP2のGab3への結 合、継続したMAPKのリン酸化(活性化)が見られた。以上の結果から、Gab3 過剰発現による GM-Gab3 細胞での G-CSF 依存の好中球への分化誘導の阻害は Gab3 タンパク質のチロシンリン酸化のネガテイブフィードバック機構の欠除 による、継続した MAPK の活性化による事が示唆された。

この事を確かめるために Gab3 の SHP2 結合部位に変異を導入した Gab3-SHP2(-)遺伝子を構築し、GM-I62-1 細胞で過剰発現させ、Gab3 を介する SHP2 -Ras-MAPK 経路の活性化が起こらない細胞株 GM-Gab3-SHP2(-)を樹立し、 G-CSF 刺激による好中球への分化における影響で調べた。GM-Gab3-SHP2(-)細 胞では、G-CSF 刺激による Gab3-SHP2(-)(又は内在性の少量の Gab3)への SHP2 の結合が見られなかった。さらに、GM-Gab3-SHP2(-)細胞では G-CSF 刺激によ る継続した MAPK のリン酸化(活性化)も見られず、低下した一時的なリン酸 化が観察された。さらに GM-Gab3-SHP2(-)細胞では、野生型 Gab3 の過剰発現 により見られた G-CSF 依存の好中球への分化誘導阻害が見られず、親株 GM-I62-1 細胞と同様に G-CSF による好中球への分化が誘導された。したがっ て、Gab3 過剰発現による G-CSF 依存の好中球への分化誘導の阻害は Gab2 によ って見られた一過性の MAPK の活性化とは異なり Gab3 による継続した MAPK の 活性化による事が示唆された。

さらに、この事を示すために、好中球への分化誘導が阻害された GM-Gab3 細胞において阻害剤により MAPK を部分的に阻害する事で、再び G-CSF 依存の 好中球への分化能が回復するかを調べた。分化が阻害される Gab3 過剰発現細 胞 GM-Gab3 を、MAPK の上流の MEK の阻害剤 U0126 存在下で、G-CSF 含有培地で 培養したところ、分化時に見られる増殖の停止と核の分葉化が再び観察され、 MEK 阻害剤により MAPK を阻害することで GM-Gab3 の G-CSF 依存の好中球への 分化能が回復する事が示された。

以上の現象が好中球前駆細胞 GM-I62-1 細胞にだけの特有の事ではない事を 示すために、他の好中球前駆細胞 L-G においても Gab3 過剰発現細胞 LG-Gab3、 及び、Gab3 を通した MAPK の活性化が起こらない SHP2 結合部位変異型 Gab3 (Gab3-SHP2(-))の過剰発現細胞 LG-Gab3-SHP2(-)を樹立し、G-CSF 依存の 好中球への分化誘導を調べた。GM-I62-1 細胞の時と同様に、野生型 Gab3 過剰 発現細胞 LG-Gab3 では G-CSF 依存の好中球への分化誘導が阻害されたが、 LG-Gab3-SHP2(-)細胞ではその阻害が見られず、成熟好中球への分化誘導が観 察された。

以上の結果から、好中球前駆細胞中の Gab2 は G-CSF 刺激により一時的に SHP2-Ras-MAPK シグナル経路を活性化させるが、その後の MAPK の活性化を低 下される事が G-CSF 依存の好中球分化誘導に必要である事が明らかになった。 このネガテイブフィードバック機構を持たない Gab3 が過剰に存在すると、 G-CSF 依存に継続した MAPK の活性化がおこり、好中球への分化が阻害された。

第二章 序論

第一節 血液細胞

血液中には多種類の細胞があり、酸素の輸送から抗体の生産まで実に広範 な機能を営んでいる。これらの細胞には、血管系内だけで機能するものと、血 管をたんなる移動手段として使うだけで、ほかの場所で機能を果たすものとが ある。しかし、どの血液細胞も生活史が似ている。寿命が限られており、個体 の一生の間たえず生産され続けなければならない。最も注目すべきは、血液細 胞はいずれも骨髄で造血幹細胞から分化・成熟したものである^[1]。つまり、造 血幹細胞は多能性であり、最終分化した血液細胞だけでなく、後述する破骨細 胞も作り出す。

第1項 血液細胞の分類とその機能

血液細胞は赤血球と白血球に分類される。(Table. 2-1-1)

細胞の種類	主な機能
赤血球 (erythrocyte)	02 と CO2 の輸送
白血球 (leucocyte)	
顆粒球(granulocyte)	
好中球(neutrophil)(多形核白血 球, polymorphonuclear leucocyte)	侵食細菌を捕食し殺す
好酸球 (eosinophil)	大型の寄生生物を殺し,アレルギー性炎症反 応に関与する
好塩基球 (basophil)	特定の免疫応答においてヒスタミンとセロト ニンを放出する
単球 (monocyte)	組織内でマクロファージになり,侵入した微 生物や異物,老化した細胞を捕食,消化する
リンパ球 (lymphocyte)	
B 細胞	抗体を作る
T 細胞	ウイルスに感染した細胞を殺し,他の白血球 の活性を調節する
ナチュラルキラー(NK)細胞 (natural killer cell)	ウイルス感染細胞や一部の腫瘍細胞を殺す
血 小 板 (platelet) (骨 髄 の 巨 核 球 [megakaryocyte] から生じる細胞断片)	血液凝固を開始する

Table. 2-1-1 細胞の種類とその機能^[2]

赤血球は血管内に局在して 02 をヘモグロビンに結びつけて運ぶ^[3]。白血球 は感染と戦い,場合によっては異物の破片を捕食し消化するので,赤血球とは 異なり毛細血管壁を通り抜けて組織に移動できる^[4]。血液には,このほかに多 数の血小板がある。これは完全な細胞ではなく,巨核球とよばれる大きな細胞の細胞皮層から分離してできる小さな細胞断片,つまり"ミニ細胞"である。 血小板は傷ついた血管内壁の内皮細胞に特異的に付着して血管壁の修復を助 け、血液の凝固を促進する^[5]。

赤血球は1種類で、分化成熟の道筋がみな同じである。これは血小板にも あてはまる。しかし、白血球には多くの種類があり、末梢血内には顆粒球・リ ンパ球・単球があり、顆粒球はギムザ染色による染色のされ方の違いによって 好中球、好酸球、好塩基球の3つに分類される^[4]。

顆粒球には、おびただしい数のリソソームと分泌小胞(顆粒)があり、これらの小器官の形態や染まり方でさらに3種類に分類できる。染色性の違いは、化学的・機能的な差を反映している。好中球が数多く見られる白血球で、微生物、特に細菌を捕食して殺し、細菌感染に対する自然免疫で重要な役割を果たす^[6]。好塩基球はヒスタミンを分泌して炎症反応を起こす細胞で、造血幹細胞由来でありながら結合組織に存在する肥満細胞とよく似ている^[7]。好酸球は寄生生物の殺傷を介助し、アレルギー性の炎症反応に関与する。

単球は血流を離れると成熟してマクロファージになる。単球は、表皮に散 在するランゲルハンス細胞などの樹状細胞も生み出す。マクロファージと同様 に樹状細胞も遊走細胞で、外来の物質や生物を捕食できる。しかし食作用はそ れほど活発ではなく、むしろ、リンパ球に外来抗原を提示して免疫応答を引き 起こす細胞として専門化している。たとえばランゲルハンス細胞は表皮で見つ けた外来抗原を捕食して、リンパ節にもち帰りリンパ球に提示する^[8]。

リンパ球には2種類あり、いずれも免疫応答に関係している。B細胞(B リンパ球ともいう)は抗体を作り、T細胞(Tリンパ球)はウイルス感染細胞 を殺したり、ほかの白血球の活性を調節したりする。その他、ある種の腫瘍細 胞やウイルス感染細胞を殺すナチュラルキラー(NK)細胞とよぶリンパ球様細 胞もある^[9]。

第2項 好中球

好中球(核に多数の突出部があるので多形核白血球ともいう)は、白血球の 中の顆粒球に属する食食細胞である。自然免疫で最も数が多く重要な構成細胞 であり、末梢白血球中の約70%を占め、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor)によって、好中球前駆細胞からの増 殖と分化で生成され、数時間血流中を循環すると毛細血管から出て結合組織や 他の特定部位へ移り、そこで数日間生存したのち死に、マクロファージに消化 される。働きとしては、体内に侵入してきた細菌の食食する事で細菌の感染防 御に働いている。

マクロファージと好中球は体内の"食専門細胞"であり、どちらも、新た に作られた食胞(ファゴソーム)と融合する特有のリソソームをもつ。そして、 捕食した微生物を酵素が作る活性酸素や次亜塩素酸などの非常に反応性の高 い分子や、食胞で活性化されたリソソーム加水分解酵素の濃い混合物などにさ らして始末する。マクロファージは好中球よりもはるかに大きくて寿命も長く、 いろいろな組織の中で老化したり死んだり傷害を受けた細胞を見つけて取り 除く。また、原生動物などの大型微生物も捕食できる^[9]。

第二節 好中球

血液細胞はすべて、骨髄中の一つの細胞(多能性幹細胞)から生じる。正常 状態では多能性幹細胞は低頻度で分裂し、多能性幹細胞を自己再生産するか、 方向づけられた前駆細胞(コロニー形成細胞: CFC 又は CFU)を生じる。後者は 1種類か数種類の血液細胞しか生産しないよう方向づけられている。前駆細胞 は特異的な成長因子によって増殖を繰り返し、やがて最終分化をした細胞にな り分裂能力を失う。最終分化をした細胞は通常、数日ないし数週間しか生存で きない。血液細胞の生成には複雑な制御が働き、需要の変化に応じて骨髄スト ローマ細胞や、様々なサイトカインと呼ばれるホルモンの刺激によって調節さ れている。^[10]

第1項 サイトカイン

サイトカイン(cytokine)とは、 細胞から放出され、種々の細胞間情報伝 達分子となる 微量生理活性タンパク質で、通常低分子量(分子量は8万以下、 3万以下が多数)で、 糖鎖を持つものが多い。体液を通って細胞表面の高親 和性受容体などに結合し、 多面的な生物活性を発現させる。

サイトカイン	主な機能
增殖因子	血清や組織抽出液に含まれている細胞の増殖を促進するタ ンパク質
神経栄養因子	神経細胞の維持、増殖、分化を行うタンパク質
リンホカイン	ヘルパーT細胞から産生されるサイトカインでB細胞からの 抗体産生を促進し、食細胞である細菌やマクロファージなど を殺す酵素を持った顆粒球の増殖分化を促進し、細胞機能の 調節を行うタンパク質
造血因子	血液細胞の増殖分化を制御するタンパク質

Table. 2-1-2 サイトカインの種類とその機能^[2]

働きは、免疫、炎症に関係したものが多く知られるが、細胞の増殖、分化、 細胞死、あるいは創傷治癒など作用は多様(多面的生物活性)であり、 異構 造のサイトカインでも共通活性を示すことがある(重複性作用)。 さまざまな 細胞内シグナル伝達経路をへて、細胞のDNAやRNA変異やタンパク質合成 のパターンを変化させ、細胞の働きを変えるが、 解明されていない部分が非 常に多い。(Table. 2-1-2)



Fig. 2-1-1 血液細胞の分化について[11]

好中球は他の成熟血球細胞と同様に,自己複製能と多分化能を併せ持つ造 血幹細胞に由来する。骨髄中の造血幹細胞から分化が始まると,増殖の制御を 受けると同時に多分化能を段階的に失い,特定の分化の方向に運命付けられて いく。2 種類の食専門細胞,好中球とマクロファージは,顆粒球マクロファー ジ前駆細胞(granulocyte/macrophage progenitor cell, GM 前駆細胞)とよば れる共通の前駆細胞から生じる。好中球造血においても,造血幹細胞から前駆 細胞への分化の過程で,赤血球や血小板,リンパ球,単球・マクロファージと いう他の系統への分化能を失った後に,好中球としての成熟が進む。

好中球はほかの顆粒球(好酸球や好塩基球)と同様に,数時間血流中を循 環すると毛細血管から出て結合組織などの特定部位へ移り,そこで数日間生存 した後アポトーシスにより死んで,マクロファージに消化される。これに対し てマクロファージは,血流の外で数か月,場合によっては数年も生き続け,局 所的なシグナルによって活性化され,ふたたび増殖する。

好中球の成熟段階は形態学的に分類が可能である。最も未熟なものから, 骨髄芽球 (myeloblasts),前骨髄球 (promyelocytes),骨髄球 (myelocytes), 後骨髄球 (metamyelocytes),桿状核球 (band cells),分葉核球 (segmented cells) と呼ばれ,一般的には桿状核球以降を成熟好中球という。^[12] (Fig. 2-1-1)

第三節 G-CSF(顆粒球コロニー刺激因子)

第1項 G-CSF

顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF) は好中球造血を刺激するサイトカインとして同定された。G-CSF は,生体内で は線維芽細胞,血管内皮細胞や骨髄の間質細胞,マクロファージなどで発現が 認められ,分泌された後に標的細胞の細胞表面に存在する受容体を介して造血 細胞(好中球前駆細胞)内にシグナルを伝える。 G-CSF が定常状態の好中球数の維持に中心的な役割を果たしていることが 示唆される。G-CSF は定常状態のみならず,好中球の需要が亢進する感染時に おいても骨髄での好中球産生を調節し,骨髄から末梢への動員,好中球減少時 のフィードバック機構など,好中球のホメオスターシス維持に多面的に関って いる。したがって,造血細胞における GCSF 受容体の発現制御および受容体か らのシグナル伝達が,好中球分化の理解において重要である。^[13]



第2項 G-CSF 受容体を介するシグナル伝達

好中球が、好中球前駆細胞から G-CSF 刺激により、分化する際には、細胞 増殖の停止と核の分葉化や、ミエロペルオキシダーゼ (MP0)の発現などが誘導 される事が知られている^[14]。

G-CSF が、G-CSF 受容体(Fig. 2-1-2)に結合すると、Jak キナーゼが自らを リン酸化し、活性化される。活性化された Jak によって G-CSF 受容体の細胞質 内の4つのチロシン残基がりン酸化され、下流へとシグナルが伝達される。1 番目と3番目のチロシン残基から STAT3 のリン酸化が誘導され、2量体を形成 し核へと移行する事で、細胞増殖の停止や核分葉化に関与している。また、Jak から直接 STAT5 のリン酸化が誘導され、2量体を形成し核へと移行する事で、 細胞の増殖や生存に関与しているとされている。一方、4番目のチロシン残基 にアダプタータンパク質である Shc が結合し、リン酸化されると、Grb2 がリ クルートされ、Shc-Grb2-Sos の複合体を介して、Ras-Raf-MEK-ERK の活性化が 誘導される事も知られている。これらの細胞内のチロシンキナーゼ、セリン・ トレオニンキナーゼの活性化により、リン酸化を受ける主要なタンパク質のひ とつが、Gab2 である。^[15] (Fig. 2-1-3)

Fig. 2-1-2 G-CSF 受容体の構造^[14]



Fig. 2-1-3 G-CSF 受容体を介するシグナル伝達^[15]

第四節 DOS/Gab ファミリ

DOS とは、Daughter Of Sevenless、Gab とは、Grb2-associated binder の 略である。DOS/Gab familyのメンバーとしては、現在、Drosophilaのホモロ グである DOS や C. elegans のホモログである Soc1 (Suppressor-Of Clear)など に加え、哺乳類においては、Gab1、Gab2、Gab3 の 3 種が存在する^[16]。様々な 系で、増殖因子やサイトカイン、抗原を含む様々な刺激によるシグナル伝達に おいて、関わっている事が明らかになってきており、それらををまとめてある Table. 1-3 を引用した。^[17]

Table. 1-3 様々なシグナル伝達における Gab タンパク質の関与^[17]

Receptor			Ligand Cell type	Gab prot	ein		
				Cell type	phosphotylated?		
					Gab1	Gab2	Gab3
RTK	EGF receptor	EGF		A431	yes	yes	?

	F1t3	F1t3L	BaF3	?	yes	yes
	Fms	M-CSF	Bac1.2F5, FDFms	?	yes	yes
	insulin receptor	insulin	A431, HepG2	yes	?	?
	Kit	SCF	MO7E, FDFms	yes	yes	?
	Met	HGF	MDCK, A549	yes	?	?
	PDGF receptor	PDGF	NIH3T3	yes	?	?
	TrkA	NGF	PC12	yes	?	?
Non-RTK	B cell receptor	anti-IgM or F(ab')2	Ramos, WEHI-231	yes	yes	?
	EPO receptor	EPO	HCD57, UT7	yes	yes	?
	G-CSF receptor	G-CSF	BAF-B03	?	yes	?
	GM-CSF receptor	GM-CSF	UT-7	?	yes	?
	gp130	IL-6	HepG2	yes	?	?
	IFN-a receptor	IFN-α	Нер3В	yes	?	?
	IFN- γ receptor	IFN-γ	Нер3В	yes	?	?
	IL-15 receptor	IL-15	T cell, NK3.3	?	yes	?
	IL-2 receptor	IL-2	Kit225, KT-3	?	yes	?
	IL-3 receptor	IL-3	TF-1, BaF3	yes	yes	yes
	Mpl	TPO	TF-1, UT-7, MK	yes	yes	?
	prolactin R	prolactin	HC11	?	yes	?
	T cell receptor	anti-CD3	Jurkat	?	yes	?

The references listed are representative, but not exclusive

<u>第1項 Gab タンパク質</u>

Gab ファミリータンパク質は三つ(Gab1-3)で、種々の受容体チロシンキナーゼ(RTKs)下流で細胞の成長、増殖と運動性を活性化する。



Gab ファミリータンパク質(Fig. 2-1-4)は、共通の構造モチーフを含んでお り、高度に保存されているN末端のPH(Pleckstrin Homology)ドメインや、中 央に存在する proline rich domain (PRD)と複数のリン酸化できるチロシン残 基などのいくつの高度的に保存している領域を含んている。プロリンリッチド メインはいくつの SH3 ドメイン含有タンパク質と結合できる PXXP モチーフを 含んでいる^[17]。Gab タンパク質はいくつの RTK の活性化によってリン酸化でき るチロシン残基を持っている^{[19] [20]}。多くのこれらのリン酸化できるチロシン はタンパク質チロシンホスファターゼ Shp2 と PI3K のサブユニット p85 を含 んでいる SH2 ドメイン含有タンパク質と結合できる。これらのタンパク質の結 合は Ras/MAPK と PI3K/Akt 経路を活性化または増強する。(Fig. 2-1-5)^[21]



Fig. 2-1-5 Gab2 タンパク質のシグナル伝達^[21]

<u>第2項 Gab2 と好中球の増殖と分化</u>

前駆細胞 GM-I₆₂では Gab2 family の中では主に Gab2 を発現し、わずかに Gab3 が存在し、また Gab1 は検出できなかった。IL-3 存在下では、核が球状で、未分化のまま増殖し続けるが、培地から IL-3 を除き、G-CSF を加えると、3日 ほど増殖を続けました後、増殖を止め、成熟好中球へ分化する。12日目のライト-ギムザ染色像では、この様に成熟好中球特有の核の分葉化が見られました。(Fig. 2-1-6)



Fig. 2-1-6 IL-3 を除き、G-CSF を加える後、12 日目のライト-ギムザ染色像。

第3項 Gab2 のシグナル伝達と Gab2 の RSK 介する負のフィードバック

Gab2 のチロシン残基がリン酸化すると、Shp2 の結合が促進され、Ras/MAPK 経路が活性化される。一方で、HEK293 細胞では、EGF により刺激されると RSK 介する Gab2 のセリン残基リン酸化は Shp2 の結合と Shp2 依存的なシグナル伝 達を抑制する^[22]。RSK 介する Gab2 リン酸化は Gab2 依存的な生物学機能を制御 する役割を果たしているかもしれない。(Fig. 2-1-7)



Growth, survival, proliferation, motility, differentiation

Fig. 2-1-7 Gab2 のシグナル伝達と Gab2 の RSK 介するネガテイブフィードバックのイメ ージ図^[22]

第五節 本研究の目的

好中球前駆細胞においては、Gab2とGab3の発現が見られ、G-CSF刺激依存 にチロシンリン酸化が誘導される事を我々は見い出した。本研究では、G-CSF 刺激依存の好中球の増殖と分化へのシグナル伝達におけるGab2の機能を解明 するために、Gab2とGab3の構造の違いを利用し、Gab2タンパク質のどの部位 が好中球の分化誘導に関与しているかを明らかにし、どの部位を介して活性化 するシグナルの全体を明らかにする目的で研究を行った。すなわち、野生型 Gab2やGab3、Gab2-3キメラタンパク質、また、変異型Gab3過剰発現株にお けるGabタンパク質のチロシンリン酸化やRas-MAPK経路の活性化への影響、 また、増殖曲線や核の分葉化への影響を検討する事で研究を行った。

第三章 方法と材料

<u>第一節 材料</u>

<大腸菌用培地>				
$5 \times \text{LB}$ media	500m1	$1 \times \text{LB}$ media	500m1	
Tryptone	25g	$5 \times \text{LB}$ media	100m1	
Yeast Extract	12.5g	milliQ	500m1 にフィルアップ	
NaC1	12.5g			
1N NaOH(約 1ml)でpH 7	7.5 に合わせ RO 水で			
500ml にフィルアップし	し、−20℃で保存			
			- H	
1.3% ager in LB	500m1	X-gal plate	1 枚	
ager	6.5g	100mMIPTG	100µ1	
1×LB media 50	00ml にフィルアップ	2%X-gal in DMF	40µ1	
Autoclave した後、熱	いうちによく混ぜる	10cmのLBAmp(100µg/ml)plateの表面に使		
		用直前に塗布する		
<competent cell="" td="" 用<=""><td>]試薬></td><td></td><td></td></competent>]試薬>			
TFB I		TFB II		
30mM]	KOAc	10mM	MOPS	
100mM]	$RbC1_2$	75mM	CaCl ₂	
10mM (CaC1 ₂	1 OmM	$RbC1_2$)	
50mM 1	MnC1 ₂	15%(v/v)	Glycerol	
15%(v/v) (Glycerol	1N KOH で pH6.5 に合	らわせ、milliQ で 50ml	
0.2M dilute acetic aci	dでpH7.5に合わせ、	にフィルアップ		
milliQ で 100ml にフィ	ルアップ			

<DNA 調製用試薬>

solution I		SolutionII		
50mM	glucose		0.2N	Na0H
25mM	Tris-HCl pH8.0		1%(w/v)	SDS
10mM	EDTA pH8.0	使う時作る		
Solution III (pH4.8)	100m1			
5M potassium acetate	29. 445g			
3M glacial acetic ac	id 11.5ml			
milliQ	28.5ml			

<細胞用培地>

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium "Nissui"② L-グルタミン・炭酸

水素ナトリウム不含

RPMI: RPMI 1640 Medium "Nissui"② 炭酸水素ナトリウム・L-グルタミン不 含

DMED また RPMI 粉末を新製 milli Q 水で溶かし、autoclave した後、必要に よって試薬を加える

DMEM (10%FBS)

RPMI 1640 (45U/m1 IL-3, 10%FBS)

0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate	0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate
0.06%(w/v)	L-Gulutamine	0.03%(w/v)	L-Gulutamine
$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine	$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine
10%(v/v)	FBS	0.05mM	2-mercaptoetanol
		$45 \mathrm{U/ml}$	IL-3
		10%(v/v)	FBS
DMEM (serum	free Tris pH7.4)	RPMI 1640 (w	/o IL-3,5%FBS)
0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate	0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate
0.06%(w/v)	L-Gulutamine	0.03%(w/v)	L-Gulutamine
$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine	$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine
50mM	Tris-HCl pH7.4	0.05mM	2-mercaptoetanol
		5%(v/v)	FBS
DMEM (serum	free)	RPMI 1640 (w	/o IL-3,10%FBS)
0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate	0.15%(w/v)	Sodium bicarbonate
0.06%(w/v)	L-Gulutamine	0.03%(w/v)	L-Gulutamine
$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine	$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine
		0.05mM	2-mercaptoetanol
		10%(v/v)	FBS
		RPMI 1640 (w	/o IL-3, serum free)
		0.15% (w/v)	Sodium bicarbonate
		0.03%(w/v)	L-Gulutamine
		$100 \mu g/ml$	Streptomycin/Kanamycine
		0.05mM	2-mercaptoetanol
<buffer></buffer>			
Stacking Gel	Stock	2×可溶化 but	ffer
3.99%(w/v)	Acrylamide/Bis-argland	100mM	Tris-HCl pH7.5
	(3%/0.8%(w/v))	300mM	NaC1
150mM	Tris-HC1 pH6.8	2mM	EDTA
0.1%(w/v)	SDS	100mM	NaF
438mM	Sucrose	20mM	NaPPi

2mM Na₃VO₄

$10 \times PBS$		0.1M NaPPi (Sodiu	um Diphosphate Decahydrate)
1.37M	NaC1	$Na_2P_2O_7 \cdot 10H_2O(=44$.6.06) 2.23g
26.8mM	KC1)	Adjust the volume	e to 50ml
81mM	Na_2HPO_4	Store at 4°C	
14.7mM	KH ₂ PO ₄		
4 imes sample bu	ffer		
250mM	Tris-HCl pH6.8		
8%(w/v)	SDS		
40%(w/v)	Glycerol		
0.05%(w/v)	Bromophenolblue		
20%(v/v)	β -ME(1m1/5m1)		
5 imesRunning B	uffer(for SDS-PAGE)	Transfer Buf	fer
$125 \mathrm{mM}$	Tris base	25mM	Trizmabase
0.955M	Glycine	190mM	Glycine
0.5%(w/v)	SDS	20%(v/v)	MeOH
		0.005%(w/v)	SDS
K-PBS (-)		K-PBS(+)	
30.8mM	NaC1	30.8mM	NaC1
120. 7mM	KC1	120.7mM	KC1
8.1mM	Na_2HPO_4	8.1mM	Na_2HPO_4
1.46mM	KH ₂ PO ₄	1.46mM	KH_2PO_4
		5mM	$MgCl_2$
1×可溶化 but	ffer(0.5%TritonX-100)	1×可溶化 but	ffer(0.5%CHAPS)
50mM	Tris-HCl pH7.5	50mM	Tris-HC1 pH7.5
150mM	NaC1	150mM	NaC1
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA
50mM	NaF	50mM	NaF
1 OmM	NaPPi	10mM	NaPPi
1mM	Na ₃ VO ₄	1 mM	Na ₃ VO ₄
$1 \mu g/ml$	Leupeptin	$1 \mu g/ml$	Leupeptin
$1\mu g/ml$	Pepstatin	$1\mu g/ml$	Pepstatin
0.5%(w/v)	TritonX-100	0.5%(w/v)	CHAPS
1 mM	PMSF	1 mM	PMSF

1×可溶化 but	ffer(1%TritonX-100)	1×可溶化 buffer				
50mM	Tris-HCl pH7.5			50mM	Tris-H	HC1 pH7.5)
150mM	NaC1			150mM	NaC1		
1mM	EDTA			1mM	EDTA		
50mM	NaF			50mM	NaF		
10mM	NaPPi			10 mM	NaPPi		
1mM	Na_3VO_4			1mM	Na_3VO_4		
$1 \mu g/ml$	Leupeptin			1µg/ml	Leuper	otin	
$1 \mu g/ml$	Pepstatin			1µg/ml	Pepsta	atin	
1%(w/v)	TritonX-100			1mM	PMSF		
1 mM	PMSF						
5% milk buff	er (blocking buffe	er)	1% mi	lk buff	er(抗体	、反応用)	
5%(w/v)	not fat dry milk		10	‰(w∕v)	not fa	at dry mi	lk
50mM	Tris-HCl pH7.5			50mM	Tris-H	HC1 pH7.5	5
150mM	NaC1			150mM	NaC1		
				0.05%	Trito	nX-100	
wash buffer	(Tween20+)		wash k	ouffer	(Tween2	20-)	
25mM	Tris-HCl pH7.5			25mM	Tris-H	HC1 pH7.5	-)
150mM	NaCl			150mM	NaC1		
0.05%(w/v)	Tween20						
			0 114 (31	1101		
IM GIYCINE	7 507		0. IM (JIYCINE [.]	-HCI, p	DHZ. 5, 15	
Glycine	7.507g		IM GIY	ycine			50m1
Adjust the v	olume to 100ml		IM HC.				28. Iml
			5M Na(F00 1 2	15m1
			m1111(d		500ml (こ	フィルアップ
0.3% Tween 2	0 in PBS		脱色液	₹(35% Me	eOH, 10%	6 CH ₃ COOH)	(CCB 染色用)
20%Tween 20		7.5ml	MeOH				350m1
$10 \times PBS$		50 ml	CH ₃ COC	θH			100m1
milliQ	500m1 にフィ	ィルアップ	milli	Ź		1L に	フィルアップ
<抗体>							
	抗体名	会社	名	希釈著	率 	ECL 二次抗体	免疫沈降
anti-Gab2	抗体名	会社:	名	希釈 ³ 1/250	率 	ECL 二次抗体 rabbit	免疫沈降 proteinA
anti-Gab2 anti-Gab3	抗体名	会社 ² 河野俊- 卒論、修	名 一郎 論 ^[23]	希釈 ² 1/250 1/250	率)0)0	ECL 二次抗体 rabbit rabbit	免疫沈降 proteinA proteinA

anti-Flag M2	Kodak	1/2500	mouse	-	
anti-phosphotyrosine(4G10)		1/2500	mouse	proteinA	
anti-phosphoSTAT3(Tyr705)	Cell Signaling	1/2500	rabbit	proteinA	
anti-STAT3(c20):sc-482	SANTA CRUZ	1/2500	rabbit	proteinA	
anti-phosphoAkt(Ser473)	Cell Signaling	1/2500	rabbit	_	
anti-Akt	宮脇亜希子卒論 ^[24]	1/2500	rabbit	-	
anti-SH-PTP2(N-16)	SANTA CRUZ	1/2500	rabbit	_	
anti-PI 3-Kinase-p85 α (Z-8)	SANTA CRUZ	1/2500	-	proteinA	
mouse: anti-Mouse IgG/HRP (Rab	bit) 🔗 Dako				
rabbit: anti-Rabbit IgG/HRP (G	oat) 🕢 Dako				
免疫沈降後の western blot は proteinA-HRP を用いた					
proteinA: Peroxidase-Labeled P	proteinA: Peroxidase-Labeled Protein A from S. aureus				

<primer></primer>	
primer name	塩基配列
SF1450	CAT TCT CAA GCC TCA GAC AG
Gab2-N-f	GCG GTA CCG ACA TGA GCG GCG GCG GC
Gab2-N-r	CTG TGA GGC TGC TCT TGG TG
Gab2-C-f	GCC AAG CCG ACA CAA TAC AG
Gab2-C-r	CCA AGG GTG CCA AGC TGT AAT CTA GAC G
Gab2-3-For960	TTC AAG ATG CCC AGT GGG GTA AAA GAA CTA
Gab2-3-Rev960	CTT TTA CCC CAC TGG GCA TCT TGA AGG TGT
Gab2-3-200-F	TCA GGG CAC CAG ATG TGA TAQ CTG GTC AAA
Gab2-3-200-Rev	TAT CAC ATC TGG TGC CCT GAG AGA AGC TGG
Gab3-Y515F-R	CAT TTG GAT GTA CTT TTC TTC
Gab3-1100-R	CCA CAT GGT CTA ACC CAG A
BOS-A2-F	GGA GAC AAG AAA TCC CTG TT
Gab3-Y395F-F	GAA GAC AGC TAT GTG CCC TGA
Gab3-Y416F-F	AGG ATG ACT TCA TTC CAA TGA G
Gab3-Y542R-F	TTC AGC TTG GAT TTT TTG GCC CTG GAC TTC
Gab3-Y542F-R	TCC AGG GCC AAA AAA TCC AAG CTG AAT TTC

Gab3-Y569F-R	TCC ACT TGA ACA AAG TCT ACT CTC TGC TCT
Gab3-Y569R-F	CAG AGA GTA GAC TTT GTT CAA GTG GAT GAA
Gab2-S211A-F	AAG GAG TGC CGC CTT CTC TCA GGG CAC CCG
Gab2-S211A-R	CCC TGA GAG AAG GCG GCA CTC CTT GCA TTT

<MAPK 抑制剤>

溶媒: DMSO		
Inhibitor	Target	Stock
PD98059	MEK	30mM
U0126	MEK	20mM

<Lyn 抑制剤>

溶媒: DMSO		
Inhibitor	Target	Stock
PP1	Src family kinase	10mM
PP2	Src family kinase	3mM
Piceatannol	Syk tyrosine kinase	25mM

第二節 方法

<コンピテントセルの作製>

- 1、DH5 a のコロニーの一つを 5ml の 1×LB にうえて、37℃で一晩振とう培養
- 2、TB 培地(TB 45m1+リン酸バッファー 5m1 混合したものを TB 培地と言う) の A600 を測定
- 3、1/50 体積の DH5 α を培地に加える
- 4、37℃で振とう培養しながら、A600=0.5~1.0になるまで培養する。氷上で 15minよく冷やす。冷やしておいた遠心管に移し、3000rpm,2℃,10minで 遠心し、上清を取り除く
- 5、Tfb I (氷上で冷やしておいたもの)を培養液の体積の 2/5 体積加え、懸濁 氷上に 5min おく
- 6、3000rpm, 2℃, 10min で遠心、上清を取り除く
- 7、TfbⅡ(冷やしておいたもの)を1/25体積加えて懸濁し、ほぐす
- 8、氷上に 15min おき、冷やしておいたマイクロチューブに 100µl ずつ入れる
- 9、液体窒素で凍らす。-80℃で保存

Taq polymerase 用反応液		LA Taq polymerase 用	反応液
$1 \times$	PCR buffer(シグマ)	$1 \times$	PCR buffer(シグマ)
0.01mM	dNTP mix	0.25mM	$MgC1_2$
0.5µM	primer 1	0.01mM	dNTP mix
0.5µM	primer 2	0.5µM	primer 1
2.5units	Taq	0.5µM	primer 2
適量	DNA	2.5units	LA Taq
dH20 で 100µ1 V	こフィルアップ	適量	DNA
		dH20 で 100µ1 6	こフィルアップ

<PCR 条件>

Taq			LA Taq		_
95°C	1 min		95°C	1 min	-
94°C	1 min		96°C	10 sec	-
42°C	2 min	imes 15 cycles	42°C	30 sec	imes 20 cycles
72°C	3 min		68°C	3 min	
4°C	∞		72°C	7 min	-
			4°C	∞	-

 $< {\tt Freeze Method} >$

1. gel から目的のバンドを切り出し、ラップの上で 1mm 角に小さく切り、1.5ml tube に入れる

2. フェノール 200µl を加え、液体窒素で凍らした後、室温 15k rpm で 15 min 遠心し、上層を new tube に移す

3. 下層に TE200µ1 を加え、室温 15k rpm で 3 min 遠心

4.3の上層を2の上層とまぜ、φOH 400µ1を加え、よく混合し、室温 15k rpm で5 min 遠心

5. 上層を new tube に移し、φOH, CHC13/IAA (200µ1/200µ1)を加え、よく混 合し、室温 15k rpmで5 min遠心

6. 上層を new tube に移し、CHC13/IAA 400µ1 を加え、よく混合し、室温 15k rpm で 5 min 遠心

7. 上層を new tube に移し、3M NaOAc を 1/10 の体積で加え、100% EtOH 1ml 加え、混合

8. —80℃, 5 min 置き、4℃ 15k rpm で10 min 遠心

9. 上清を除き、70% EtOH 500µl 加え、voltex

10. ppt を減圧乾燥し、適当量の TE で溶かす

< ϕ OH/CHC13 処理、EtOH 沈殿>

1. DNA に制限酵素を入れ、37℃ incubation。

2. 等体積の ϕ OH を加え、よく混合し、室温 15k rpm で 5 min 遠心

3. 上層を new tube に移し、等体積のφOH, CHC13/IAA (1:1)を加え、よく混 合し、室温 15k rpmで5 min 遠心

4. 上層を new tube に移し、等体積の CHC13/IAA 400µ1 を加え、よく混合し、 室温 15k rpm で 5 min 遠心

5. 上層を new tube に移し、3M NaOAc を 1/10 の体積で加え、100% EtOH を 70~75%になるように加え、混合

6. —80℃, 5 min 置き、4℃ 15k rpm で10 min 遠心

7. 上清を除き、70% EtOH 500µ1 加え、voltex

8. ppt を減圧乾燥し、適当量の TE で溶かす

<transformation>

1. competent cells を氷上で溶かし、DNA mixture を加え、軽く混ぜる

2. 氷上 20 min

3. 42°C 90 sec 4. 氷上 1~2 min 5. LB 1ml 加え、37℃の waterbath に 1hr 置き 6. 室温 8k rpm で 10min 7. 上清 800µl を捨て、よく混ぜ、150µl プレートに拡げる ※青白選択法では x-gal plate に拡げる <Miniprep> 1. 大腸菌 single colony を LB/ampicillin 100µg/ml 3ml で培養(2h以上) 2. 培養液を2回分け、4℃15k rpm で5 min 遠心し、1.5ml tube に回収 3. ppt に Solution I 100µl 加え、よく混合 4. Solution II 200µ1 加え、静かに混合し、氷上5 min 5. SolutionⅢ 150µ1 加え、混合し、氷上5 min 6. 4℃ 15k rpm で 5 min 遠心し、上清を別の tube に移す 7. φOH, CHC13/IAA (200µ1/200µ1)加え、よく混合 8. 室温 15k rpm で 5 min 9. 上層を new tube に移し、100% EtOH 1ml 加え、混合 10. —80℃, 5 min 置き、4℃ 15k rpm で 10 min 遠心し、DNA を沈殿させる 11. 上清を除き、70% EtOH 500µl 加え、voltex 12. 4℃ 15k rpm で10 min 遠心 13. ppt を減圧乾燥し、適当量の TE で溶かす <塩基配列の決定> PEG 沈 1.TB 3ml(あるいは LB 6ml)で培養した大腸菌から回収し 50µlTE で溶かした DNAmixture に RNaseA を 10µg/ml になるように加え、37℃, 0.N. 2. 4℃ 15k rpm で 1min 遠心 3. 上層を new tube に移し、等量の 1.5M NaC1/15%(w/v) PEG6000 を加え、mix 4. 氷上に 30 min 置く 5. 4℃ 15k rpm で 10min 遠心 6. ppt に 70% EtOH 1ml 加え、4℃ 15k rpm で 5min 遠心 7. ppt を減圧乾燥し、適当量の TE で溶かす <sequencing reaction> Ready Reaction Pre Mix(RPMix) 1u1] Big Dye Terminator V1.1 3.5µ1 Big Dye Sequence Buffer Cycle Sequencing Kit DNA mixture 0.2~0.4ug (アガロースゲル泳動のバンドの 残さから推定する) Primer 3.2 pmol dH₂O 20µ1 にフィルアップ

<sequence 条件>

96°C	1 min		
96°C	10 sec		
50°C	5 sec	$\times 30$	cycles
60°C	4 min		
4°C	∞		

<sequence 後処理>

- 1. PCR 反応液 15µl を Eppendorf tube にとる (パラフィルムで oil を除く)
- 2. H₂0 5µ1 を加えて全量 20µ1 にする

3.	以下を加え、	よく混ぜる

0.125M EDTA	2µ1
3M NaOAc (pH4.6)	2µ1
99% EtOH	53µ1

- 4. 室温 15~60 min 置く、4℃ 15k rpm で 20 min 遠心
- 5. ppt に 70% EtOH (r.t.) 70µl を加え、よく混ぜる
- 6. 4℃ 15k rpm で 10 min 遠心し、ppt を減圧乾燥

<sequence>

- 1. HiDi-Formamide 20µl を加えてよく溶かす
- 2. voltex, flush
- 3. 95°C、3 min
- 4. 急冷、flush
- 5. sequencer tube に移し cap をする
- 6. sequence (ABI $\texttt{PRISM}^{\mathbb{R}}$ 310/3130 Genetic Analyzer)

<COS-7 細胞への DEAE-dextran 法による遺伝子導入から細胞回収>

- 1. 実験前日 10ml シャーレに COS-7 細胞を播種し、実験当日約 70% コンフルエ
- ントになる用に細胞を用意する。
- 2. 6mlのDMEM-serum free Tris pH7.4で2回wash
- 3. 下記を混合した溶液を wash 後の細胞に注く

		終濃度
DMEM serumfree -Tris	5m1	
0.3mg/ml DEAE Dextran	50µ1	$30 \mu g/ml$
150µM Chloroqine	50µ1	$15 \mathrm{mM}$

Plasmid

- 4. 37°C 5% CO₂ ⊂ 4h incubate
- 5. 上清を除き、5mlの15%(w/v)glycerol in isotonic Trisを加える。
- 6. 混合した後、正確に 2min (3min にならないように)静かに室温で放置する。
- 7. 上清を除き、6mlのDMEM-serum freeで1回 wash
- 8. 10ml の DMEM 10%FBS を加え、incubate 37°C 5% CO₂ 0/N
- 9. 培地交換: 上清を除き、10mlのDMEM 10%FBS を加え、incubate 37℃ 5% CO₂ 24hr
- 10. シャーレを氷上に置き、上清を除き、5ml の ice cold PBS(-)/1mM EDTA

で1回wash

11. 上清を除き、5mlのice cold PBS(-)/1mM EDTA を加え、on ice 10min(細胞が浮いている)

ヘラで細胞を剥がし、blue cup tube へ移す。4℃ 1k rpm で 8min 遠心
 13. 上清を除き、5mlのice cold PBS(-)/1mM EDTA を加え、懸濁する。4℃ 1k rpm で 8min 遠心

14. 上清を除き、1mlのice cold PBS(-)/1mM EDTA を加え、懸濁し、1.5ml tube に移す。4℃ 5k rpm で 10min 遠心

15. 上清を除き、液体窒素で凍らし、-80℃で保存

< GM-I₆₂-1 細胞へのエレクトロポレーション法による遺伝子導入から安定発 現株の樹立>

1. プラスミドを制限酵素で処理

2. GM-I₆₂-1 細胞を 50ml blue cap tube に回収し、1k rpm 室温で 8min 遠心

3. 20mlのK-PBS(-)で3回 wash(最後の遠心する前に、細胞数をカウント)

4. 1.25×10⁷cel1/ml になるように、K-PBS(+)で懸濁

5. 1.25×10⁷cel1/ml の細胞液 0.4ml と DNA(線状 40µg プラスミド DNA+1µg 薬 剤耐性プラスミド)を溶かした K-PBS(+)0.4ml をキュベット(BIO-RAD Gene Pulser Cuvette[®] 0.4cm)内で mix

6. 氷上に 10min 置く

7. 350V、250µF の条件でエレクトロポレーション(Bio-Rad Gene Pulser II System Electroporation System)

8. 氷上に 10min 置く

9. ice cold RPMI 1640 (w/o IL-3, serum free)を4ml 加える

- 10. 溶液の温度をゆっくり上がるために、室温で 30min 置く
- 11. RPMI 1640 (45U/ml IL-3,10%FBS)21ml を加える
- 12. 250µl ずつ 96well に植える
- 13. 37℃ 5% CO₂ 24hr 以上培養

 14. 1µg/ml puromycin in RPMI 1640 (45U/ml IL-3, 10%FBS) を 250µl ずつ加 える(puromycin 終濃度 0. 5µg/ml または他の抗生物質を適切な濃度で加える)
 15. 毎 3~6 日に培地を交換し、cell line を樹立

<G-CSF 刺激>

1. GM-I₆₂-1 細胞を 50ml blue cap tube に回収し、室温、1k で 8min 遠心

2. 上清を除き、RPMI 1640 (w/o IL-3, 5%FBS) 20ml で 3 回 wash

3. 上清を除き、RPMI 1640 (w/o IL-3, 10%FBS)10ml を加え、細胞数をカウン

トし、1.5×10⁶cell/ml になるように、RPMI 1640 (w/o IL-3,10%FBS)を追加

4. シャーレに移し、37℃ 5% CO₂ 4~6hr incubation (Starvation)

- 5. ヘラで細胞を剥がし、2本の 50ml blue cap tube に分け移す(阻害剤添加 の場合には、回収する 30min 前に、inhibitor を 1/200 体積で添加)
- 6. Na₃VO₄を 0.2mM になるように加え、温度を回復するため、37℃の water bath に 5min 置く

7. 20,000U/ml G-CSF を 150U/ml になるように一方の tube に加え、37℃の water bath に必要な時間に置いた(時々手で攪拌)後、氷水で急速に冷やし、反応を

止め(反応を止めないと脱リン酸化反応が進行してしまう)、4℃ 1k rpm で 8min 遠心

8. 上清を除き、10m1の0.2mM Na₃VO₄ in PBS(-)を加え、懸濁する。4℃ 1k rpm で 8min 遠心

9. 上清を除き、1mlの0.2mM Na₃VO₄ in PBS(-)を加え、懸濁し、1.5ml tube に移す。4℃ 5k rpmで10min遠心

10. 上清を除き、細胞の沈殿を液体窒素で凍らし、-80℃で保存

<細胞の可溶化>

1. 1×可溶化 buffer を加える

COS-7 細胞:細胞の体積に応じて、1×可溶化 buffer(1%TritonX-100) で調製 GM-I₆₂-1 細胞:1×10⁵cell/1µl 1×可溶化 buffer(1%TritonX-100) で調製 免疫沈降:1×10⁵cell/1µl で、1×可溶化 buffer(0.5%CHAPS) で調製 G-CSF 刺激によるリン酸化:1×10⁵cell/1µl で、1×可溶化 buffer(0.5%CHAPS) で調製

少量の抗原をウエスタンブロットで検出する場合は、SDS-GAPE できるサンプ ルの体積に上限があるので、なるべく濃い条件で可溶化する

2. 最高の速度で vortex 5sec、on ice 2min ×4~6 回(合計 10min on ice 染色体が糸くずのように見えるまで vortex 行う)

3. 4℃ 15k rpm で 10min 遠心

4. 上清を別の 1.5 tube に移し、液体窒素で凍らし、-80℃で保存

<免疫沈降>

1. 細胞を 1×10⁵cell/1µl で、1×可溶化 buffer (0.5%CHAPS) で可溶化し、適量を取る

2. 1%TritonX-100 可溶化 buffer 500µl を加え、軽く混ぜる

3. 4℃ 15k rpm で 1min 遠心し、上清を別の tube に移す(ppt を取らないよう に)

4. 抗体を入れ、4℃ 1hr incubation

5. 5mg protein A-spharose×(sample 本数+1) を取る

6. 1ml PBS(-)を加え、氷上で10~15min 置き、時々vortex

7. 4℃ 8k rpm で 10sec 遠心し、上清を除く

8. 1%TritonX-100 可溶化 buffer 1ml を加え、4℃ 8k rpm で 10sec 遠心し、上 清を除く×4回

9. 100µl/sample×sample本数+50µl 1%TritonX-100 可溶化 buffer を加える 10. vortex しながら、protein A-spharose 懸濁液を 100µl ずつ可溶化 sample に加える

11. 4°C 0/N

12. 4℃ 8k rpm で 30sec 遠心し、上清を除き、500µl 1%TritonX-100 可溶化 buffer を加え、vortex ×4回

13. 4℃ 8k rpm で 30sec 遠心し、上清を除き、500µ1 可溶化 buffer (界面活性 剤を含まない)を加え、vortex

14. 4℃ 8k rpm で 30sec 遠心し、上清を除く

15. 4℃ 8k rpm で 30sec 遠心し、上清をきれいに除く

16. 2×sample buffer 20µlを加える					
17. 95℃以上 5min 置く					
18. 室温 15k rpm で 2min 遠心					
19. 毛細管現象を利用して、sample をす~	べて吸い、別の tube に移す				
20. SDS-PAGE 電気泳動					
	Amersham				
protein A-spharose: Protein A Sepharos	e^{TM} CL-4B · V . Biosciences				
<sds-page(0.1%sds,4 枚分)=""></sds-page(0.1%sds,4>					
1. ゲル板を EtOH で拭き、テープとクリッ	プで固定				
2. 下記のように Running Gel を調製					
milliQ	18.9ml				
2M Tris-HC1 pH8.8	7.5ml				
10%(w/v) SDS	0. 4m1				
Acrylamid/Bis-argland (30%/0.8%	w/v) 13.2ml				
	全量 40ml				
3. 下記のように Running Gel を 0.5ml で同	両側から注入し、底と側面を固める				
(10min 以上置く)					
Running Gel	5m1				
TEMED	16µ1				
10%Aps	140µl				
4. 残った Running Gel を 5min 以上脱気					
5. 入れた Running Gel が固まったら、下語	記のように Running Gel を調整し、				
ゴームの下約 1cm まで流し込む					
Running Gel	残り全量				
TEMED	16µ1				
10%Aps	140µ1				
6. H ₂ 0 で飽和した 2-ブタノールを静かに剥 待つ	表面に流し込み、ゲルが固まるまで				
7. 2-ブタノールを捨て、milliQで何回で	先い、Stacking Gel で共洗う				
8. Stacking Gel 10ml を 5min 以上脱気し、	下記のよう調整し、ゲル板に流し				
込み、コームを差し込む					
Stacking Gel	10m1				
TEMED	15µ1				
10%Aps	45µ1				
9. 液面を下がったら、足し、ゲールが固定	まるまで待つ				
10. milliQで濡れたティッシュで被って、	ラップで包み、4℃で保存				
<sds-page 電気泳動=""></sds-page>					
1. 必要量の cell lysate を取って、PBS(-)を加えて一定の体積にしたのち、					
4×sample buffer を全体積の 1/4 になるように加える					
2. 95℃以上 5min 置く					
3. 室温 15k rpmで1min遠心					

4. 電気泳動(100V、1 枚あたり約 25mA、電流一定)

<Transfer> 1. 電気泳動後 Gel を取り出す ナイロン タワシ(白) 2. 必要な部分を切り離す タワシ(黒),ろ紙 3. nylonemembrane (MILLPORE 疎水性 0.22µM GVHP)をイ ソプロパノールに 1min 浸し、特級 MeOH に 5min 浸す 4. ろ紙、Gel、nylonemembraneをtransfer bufferに 浸す 5. Transfer セットにセットし、transfer buffer を満 Gel Filter たす 6. 40V, over night. VolTage constant. <Western Blotting> 1. Transfer 終了後 nylonemembrane を取り出す 2. blocking buffer に 1hr 浸す 3. blocking buffe を除き、抗体用 buffer と1 次抗体を入れ、2hr 激しく振る 4. 10分間 wash buffer (Tween20+) で wash ×3回 5. 抗体用 buffer と 2 次抗体を入れ、2hr 激しく振る 6. 10分間 wash buffer (Tween20+) で wash ×3回 7. wash buffer(Tween20-)に 5min 以上置く 8. ECL < ECL >1. ①と②を混ぜた後、③と④を入れ、8m1 ECL 反応液を調製 22.5mM Luminol in DMSO (1)0.4m1 (2)90mM p-Coumaric acid in DMSO 17.4µ1 3 100mM Tris-HC1 pH8.8 7.6ml (4)3% H₂O₂ 24µ1 2. filter を ECL 反応液に 1min つけ、すぐ写真を撮る <Removing IgG form filter> 1. filterをwash buffer(Tween+)に5minつける 2. buffer に 1hr つける 0.1M Glycine-HCl pH2.5 10ml 又は十分量 150mM NaCl 14.4M β -ME $70\mu1(100\,\text{mM})$ 20% Tween 20 25µ1 (0.05%) 3. buffer に 5min つける 0.1M Glycine-HCl pH2.5 ▶ 10m1 又は十分量 150mM NaCl 4. 1M Tris-HCl pH8.0 に 10min つける(中和) 5. filterをwash buffer(Tween⁺)で10minつける×2回

<Staining the blot with amido black>

		amido	o black		
		0. 1	1%(w/v)	amido black 10-B	
		45	5%(v/v)	MeOH	
		10	0%(v/v)	CH ₃ COOH	
1.	0.3%Twee	en20 in PBS	でfilte	erで15min wash ×	3 回
2.	室温で、	amido black	にて 5min	っつける	
3.	35%MeOH	10%CH3COOH ~	で脱色		

<Staining the blot with India Ink>

	Ink solution	50 ml	
	TBS	50 m1	
	20%Tween20	500µ1	
	India Ink		
1.	wash buffer(Tween)で、filterで、5min wash ×2回		

2. Ink solution $\sub{15min}{18hr}$ \neg that

3. wash buffer(Tween)で脱色

4. 乾かさないように、scan

<G-CSF に刺激による増殖曲線>

1. GM-I₆₂-1 細胞を 50ml blue cap tube に回収し、室温、1k で 8min 遠心

2. 上清を除き、RPMI 1640 (5%FBS, w/o IL-3)20ml で3回 wash

3. 上清を除き、RPMI 1640 (10%FBS, w/o IL-3)10ml を加え、細胞数をカウン トし、2×10⁵cell/ml になるように、RPMI 1640 (w/o IL-3,10%FBS)を追加し、 IL-3 用は 2cm シャーレに 2ml、G-CSF 用は 6cm シャーレに 5ml 、factor free 用は 2cm シャーレに 2ml を入れる

4. IL-3 用に 4,500U/ml IL-3 を 45U/ml になるように加え、20,000U/ml G-CSF を 150U/ml になるように加える (リン酸化酵素抑制剤の影響を調べる場合、抑制剤を必要な濃度になるように加える)

5. 37℃ 5% CO₂ で培養(1×10⁶ cells/ml を超えないように、適宜的に希釈)
6. 各日の細胞数をカウントし、増殖曲線を作成(細胞数が 1×10⁵cells/ml~1×10⁶cells/ml)

<ライト-ギムザ 染色>

1. スライドガラスを TOMY の機器(浮遊細胞収集バケット SC-2)にセットし、 細胞を室温 500rpm で 10min 遠心し、乾燥させる(風乾)

2. ライト液をスライドガラス上に乾かさないようにのせ、5min つける

3. milliQ で静かによく洗い流す

4. milliQ で 10 倍希釈下ギムザ液をスライドガラス上にのせ、10min つける

5. milliQ で静かによく洗い流す

6. 乾燥させ、光学顕微鏡で観察する

第四章 結果

第1節 Gab3 タンパク質の発現が GM-I62-1 の分化への影響

Gab3 は Gab2 と同じく Gab ファミリーの一員で、Fig. 4-1-1 に示す様に Gab2 と似ている構造を持っていて、前駆細胞 GM-I₆₂に微量に発現している。Gab3 を過剰発現し、好中球の分化への影響を検討した。(Fig. 4-1-1)



Fig. 4-1-1 Gab2 と Gab3 タンパク質の構造^[17]

第1項 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立

ApaL I で消化した 40 μ g pBOS-Gab3-Flag と選択マーカーとして EcoR I で消化した 1 μ g puromycin 耐性遺伝子を用い、GM-I62-1 細胞ヘエレクトロポレーション法により導入した。その後、0.5 μ g/mlpuromycin で選択し、安定発現株の樹立を行った。1×10⁶ cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用いて Gab3 タンパク質の発現量を、ウエスタンブロットを行い、ECL により検討した。以後の実験は Gab3 発現量多い株の一つ GM-Gab3 1-A-3 を用いて実験を行うことを決めた。(Fig. 4-1-2)



Fig. 4-1-2 Gab3 タンパク質の発現量の確認

第2項 Gab3発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

RPMI10%FBS 培地中の細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるので、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。 IL-3が培地中の濃度が 45 u/ml で、G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中に IL-3 も G-CSF も加えない。細胞のサイトカイン依存性誘導を トリバンブルー染色後の細胞核で調べる事により解析した。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 は5日ほど増殖を 続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。一 方で、Gab3 発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続け、分化が阻害された。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。(Fig. 4-1-3) 以上の事から「増殖 停止」の指標から見た G-CSF 依存の好中球分化は Gab3 の過剰発現により阻害 される事がわかった。



Fig. 4-1-3 Gab3 タンパク質発現株における増殖曲線

第3項 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

成熟好中球へと分化が誘導されると細胞の核の形態が断片化し、花びら状 になる様に分かれている。これを分葉化と言う細胞の形態をライト-グムサ染 色により観察した。

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見 られた。一方で、Gab3 過剰発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなか った。(Fig. 4-1-4)



Fig. 4-1-4 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると、親細胞のGM-I62-1では2つ以上 に断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された 事がわかった。一方で、Gab3発現細胞GM-Gab3では、G-CSF存在下でも、ほと んどの細胞の核の分葉化が見られなかった。よって、Gab3の過剰発現により 好中球への分化が阻害された事がわかった。(Fig. 4-1-5)



Fig. 4-1-5 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

以上によると、増殖停止、核の形態変化の観点から Gab3 の過剰発現は G-CSF 依存の好中球への分化を阻害することが明らかになった。

第2節 Gab2-3 キメラタンパク質の過剰発現が GM の分化への影響

Gab3の好中球分化誘導の阻害効果をもたらすドメインを特定する目的で、 阻害効果を示さないGab2と阻害効果を示すGab3タンパク質とのキメラタンパ ク質の遺伝子を構築し、その過剰発現の効果を解析する。

第1項 Gab2-3 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築

<u>1、EF-1αのプロモーターを持ち、C 末に Flag タグを付加する動物発現プラ</u>

スミドの構築

EF-1αのプロモーターにより発現し、C 末に Flag タグを持つ動物発現プラ スミドを構築する。Fig. 4-2-1のようにプラスミド pEF-BOS-EX と pBOS-Gab3-Flag を Xba I と Sph I で処理し、agarose を用いて展開後、必要 な DNA 断片を切り出し、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、 2 つの DNA 断片を回収し、混合して ligation を行った。



Fig. 4-2-1 EF-1αのプロモーターを持つ動物発現プラスミドの構築方法

Ligation でできたプラスミドを大腸菌にコロニーングし、Amp 耐性菌株を 回収し、DNA を抽出する。DNA を酵素で処理し、0.7% agarose in TAE で電気 泳動して、正しい DNA 断片が結合している事を確認し、pBOS-C-Flag が得られ た。(Fig. 4-2-2)



Fig. 4-2-2 pBOS-C-Flag を Xba I (左)と Spe I、Sph I (右)で処理して、断片の長さから 決定する結果、1から8まですべてのプラスミドは目的プラスミドである。
2、Gab2-3-300 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築

Gab2-3-300は Gab2 の 295 番のプロリンと Gab3 の 294 番のセリンの位置で 連結しているキメラタンパク質である。

(1) Gab2-3-300 の Gab2-Gab3 連結部分の構築

Fig. 4-2-3 のように、pBOS-HA-Gab2 と pBOS-Gab3-Flag をテンプレートに 用い、PCR を行った。その際、Gab2-C-f と Gab2-3-Rev、Gab2-3-For と Gab3-Y515-R の組み合わせ、Taq polymerase を用いて PCR を行い、2 つの Gab2-Gab3 のバンドの増幅を行った。その後、agarose を用いて展開後、きり だしを行い、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2 つの DNA 断片を回収し、全量 $15 \mu 1 \text{ 中の } 1 \mu 1$ ずつを取って混合し、Gab2-c-f と Gab3-Y515-R を用いた PCR を行い、Gab2-3-300 連結部分の DNA 断片を増幅した。 この DNA 断片を sequence 用プラスミド pBS II KS (+) の EcoR I 、Sac I 部位にク ロニーングし、青白選択法で選択した菌株のプラスミドを回収し、EcoR I で 処理し、電気泳動し、断片の長さによって、プラスミドを確認した。pBS II KS (+) より 491bp 長いプラスミドを選択し、sequence 反応により塩基配列を確認し た。(Fig. 4-2-4) 正確な塩基配列を持つプラスミドを一つ選んで、Gab2-3-300 キメラタンパク質発現プラスミドの構築を行う。



Fig. 4-2-3 sequence 用 Gab2-3-300 の Gab2-Gab3 連結部分の構築方法



Fig. 4-2-4 sequence 用 pBS II KS(+)-Gab2-3-300 を EcoR I で処理して、断片の長さから PCR により増幅した Gab2-3-300 断片を持つプラスミドを選択し決定する結果、 矢印で示したプラスミドは目的プラスミドである(pBS II KS(+)より 491bp 長い)。

(2) Gab2-3-300 キメラタンパク質発現プラスミドの構築

Fig. 4-2-5のように、pBSIIKS(+)をEcoRIとXbaIで、pBSII KS(+)-Gab2-3-300をEcoRIとSacIで、pBOS-Gab3-FlagをSacIとXbaIで処 理して、必要なDNA断片を回収し、Ligationして、pBSII KS(+)-Gab2-3-300(m)-3(a)を得られた。

続いて、pBSIIKS(+)-Gab2-3-300(m)-3(a)をEcoRIとXbaIで、pBSIIKS(+)をKpnIとXbaIで、pBOS-HA-Gab2をKpnIとEcoRIで処理して、必要なDNA 断片を回収し、Ligationして、pBSIIKS(+)-Gab2-3-300を得られた。

菌株のプラスミドを回収し、Xba I で処理し、電気泳動し、断片の長さによって、プラスミドを確認する。確認したプラスミドを EcoR I と Kpn I で処理し、再確認する。(Fig. 4-2-6)



Fig. 4-2-5 pBSⅡKS(+)-Gab2-3-300の構築方法



Fig. 4-2-6 pBSIIKS(+)-Gab2-3-300をXbaIで処理して、断片の長さから決定した結果、 矢印で示したプラスミドは目標プラスミドである(pBSIIKS(+)より2037bp長い)。 目的プラスミドをKpnI(1098bp+6176bp)とEcoRI(7274bp)で処理して再確認す る。

最後、Fig. 4-2-7のように pBS II KS (+) -Gab2-3-300 は Kpn I で部分分解後、 Xba I でで処理する。pBOS-C-Flag は Kpn I と Xba I で処理する。必要な DNA 断 片を回収し、Ligation して、pBOS-Gab2-3-300-Flag を得られた。

Amp 耐性菌株のプラスミドを回収し、Xba I で処理し、電気泳動し、断片の 長さによって、プラスミドを確認する。確認したプラスミドを Kpn I で処理し、 再確認する。(Fig. 4-2-8)





Fig. 4-2-8 pBOS-Gab2-3-300-Flag を Xba I で処理して、断片の長さから決定する結果、
 矢印で示したプラスミドは目的プラスミドである(pBOS-C-Flag より 2037bp 長い)。目的プラスミドを Kpn I (1098bp+6209bp)で処理して再確認する。

3、Gab2-3-200キメラタンパク質の発現プラスミドの構築

Gab2-3-200は Gab2 の 216 番のトレオニンと Gab3 の 201 番のアルギニンの 位置で連結しているキメラタンパク質である。

(1) Gab2-3-200 の Gab2-Gab3 連結部分の構築

Fig. 4-2-9 のように、pBOS-HA-Gab2 と pBOS-HA-Gab3-Flag をテンプレート

に用い、PCRを行った。その際、Gab2-N-fとGab2-3-200-Rev、Gab2-3-200-F とGab3-1100-Rの組み合わせ、Taq polymeraseを用いてPCRを行い、2つの Gab2-Gab3のバンドの増幅を行った。その後、agaroseゲル電気泳動を用いて 展開後、きりだしを行い、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿 し、2つのDNA 断片を回収し、全体15 μ 1中の1 μ 1 ずつを取って混合し、 Gab2-N-fとGab3-1100-Rを用いたPCRを行い、Gab2-3-200連結部分のDNA 断 片を増幅した。このDNA 断片を sequence 用プラスミド pBS II KS (+) Pst I と Kpn I 部位にコロニーングし、青白選択法で選択した菌株のプラスミドを回収し、 Pst I で処理し、電気泳動し、断片の長さによって、プラスミドを確認する。 選んったプラスミドを sequence して塩基配列を確認する。(Fig. 4-2-10) 正 確な塩基配列を持つプラスミドを一つ選んで、Gab2-3-300キメラタンパク質 発現プラスミドの構築を行う。



Fig. 4-2-9 sequence 用 Gab2-3-200 の Gab2-Gab3 連結部分の構築方法



Fig. 4-2-10 sequence 用 pBS II KS (+)-Gab2-3-200 を Pst I で処理して、断片の長さから 目的の PCR 断片を含むクローンを選択した決定する結果、矢印で示したプラスミ ドは目的プラスミドである(pBS II KS (+) より 1199bp 長い)。

(2) Gab2-3-200 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築

Fig. 4-2-11 のように、pBOS-HA-Gab2 を Sac II と Bg1 II で、pBS II KS(+)-Gab2-3-200 を Sac II と Bg1 II で処理して、必要な DNA 断片を回収し、 Ligation して、pBSIKS(+)-Gab2-3-200(m)-2(a)を得られた。

続いて、pBOS-Gab2-3-Flag と pBS II KS (+) -Gab2-3-200 (m) -2 (a) を Kpn I で処 理して、必要な DNA 断片を回収し、Ligation して、pBOS-Gab2-3-200-Flag を 得られた (Fig. 4-2-11)。ここで、生成したプラスミドは Gab2-3-200-2 (a) 断 片の向きによって、二種類がある (Fig. 4-2-12)。

菌株のプラスミドを回収し、Bg1Ⅱで処理し、電気泳動し、断片の長さによって、プラスミドを確認する。確認したプラスミドをKpnIとXhoIで処理し、 再確認する。(Fig. 4-2-13)



Fig. 4-2-12 Kpn I で処理して、Ligation して、生成した二種類の pBOS-Gab2-3-200-Flag



Fig. 4-2-13 pBOS-Gab2-3-200-FlagをBg1Iで処理して、断片の長さから決定する(Fig. 4-2-12)結果、矢印で示したプラスミドは目的プラスミドである (1142 bp+6953 bp)。目的プラスミドをKpnI (1202 bp+6173 bp)とXhoI (1786 bp+5589 bp)で処理して再確認する。

第2項 抗 Gab2-3 抗体の精製

抗 Gab3 抗体は Gab3 タンパク質の His-240 から C 末端までの部分を抗原と して免疫し調製したため、認識部位が Gab3 タンパク質の 240 番のヒスチジン から C 末端までである。Gab2-3-300 タンパク質の Gab3 部分は 294 番のセリン から C 末端までである。同じ量の Gab3 と Gab2-3-300 タンパク質を抗 Gab3 抗 体を用いてウエスタンブロットを行った場合、Gab3 と結合する抗体は Gab2-3-300 と結合する抗体より多い。したがって、抗 Gab3 抗体で Gab3 と Gab2-3-300 タンパク質の発現量を比較できない。

ここで、Gab3とGab2-3-300タンパク質の発現量を比較するため、Gab2-3-300 タンパク質の Gab3 部分だけを認識する抗 Gab2-3 抗体を調製する目的で、 Gab3(294-596)の部分のタンパク質のアフィニティーカラムを作成する。



Fig. 4-2-1 抗 Gab3 抗体と抗 Gab2-3 抗体の認識部分

<u>1、試薬</u>

_TB 培地

培地				50m1
		ſ	tryptone	0. 6g
	\bigcirc	J	yest extract	1.2g
	45m1)	glycerol	0.2ml
		l	milliQ	全体積 45ml になるように加える
	2	ſ	KH_2PO_4	0.1155g(終濃度 0.17M)
	5m1	ſ	K_2HPO_4	0.672g(終濃度 0.72M)

①と②を別々で調製し、autoclave した後、60℃以下にひやした後混ぜる。

M9 培地		300m1				
$\int Na_2 HPO_4 \cdot 7H_2 O$		1.8g				
KH ₂ PO4		0.9g				
NaCl		0.15g				
$V_{\rm NH_4C1}$		0.3g				
		\downarrow				
autoclave	。して、事前に滅菌	した試薬を下	記のように加える			
_		\downarrow				
∫1M MgSO4	600µ1(終濃)	叓 2mM)				
L1M CaCl2	30µ1(終濃度	ŧ O. 1mM)				
10% trypton	3m1(終濃度	0.1%)	本実験の場合、M9 培			
10% glucose	6m1(終濃度	0.2%)	地にさらに左の試薬			
50mg/ml Amp	600µ1(終濃)	度 100μg/ml)	を入れた			
10%(w/v) tryptor	n 100ml	Buffer A	100m1			
trypton	10g	50mM Tris-HC	¹ J			
milliQ	全体積 100m1	150mM NaCl				
	になるように	0.4M EDTA 25	50µ1(終濃度 1mM) ≻ 100m1			
	加える					
		0.1M PMSF 1m	nl (終濃度 1mM) 丿			
autoc	elave					
	V 100		50.1			
Buffer A+Iriton	X-100		50m1			
50mm Iris-HCI			J			
150mm Naci	1951					
0.4M EDIA	125µ1		50ml			
0.1M PMSF 20% (w/w) Twiton	200μ1 V_100 1 25m1	(奴淟귵 0 50/…)	()			
20%(W/V) If 1000	20%(W/V) IFILON A=100 1.25m1(於張皮 0.5%W/V))					
1M HEPES-NaOH pH	17.5	50m1				
HEPES		11.92g				

milliQ	で溶かし、	NaOH `	でpH	を合わせ、	${\tt milliQ}$	を全体積	50 ml	になる	よう	に加
える										

0.5M borate-NaOH pH8.6	100ml						
boric-acid	3.08g						
warm milliQ で溶かし、室温まで冷めたら、NaOH で pH を合わせ、milliQ を全							
体積 100ml になるように加える							
0.2M triethanolamine-HCl	pH8.3 100ml						
triethanolamine	2.7ml						
milliQ で溶かし、HCl で pH	を合わせ、milliQ	を全体積 100ml になるように加					
える							
	100 1						
0.2M ethanolamine-HCl pH8	5.2 100m1						
ethanolamine	3ml						
milliQ で浴かし、HCI で pH	を合わせ、m1111Q	を全体積 100ml になるように加					
える							
wash huffor 20ml	HEPES-Buffor A	45m]					
50mM Tric-HCl	1M HEPES-NaOH						
150 mM NaCl $\geq 20 \text{ ml}$	5M NaCl	1 35ml(終濃度 20mm)					
$\begin{array}{ccc} 0 & 1 \\ 1 & 0$	0 4M EDTA	112 5ml(終濃度 100mm)					
(終濃度 1mM)	0.1M PMSF	450ul(終濃度 1mM)					
	20%(w/v)						
	Triton X-100	1.125ml(終濃度 0.5%(w/v))					
	milliQ	全体積 45ml になるように加					
		える					
Buffer A+ NaN ₃		5m1					
50mM Tris-HC1		J					
150mM NaCl							
0.4M EDTA 12.5µ1(終濃度 1mM) 5m1							
0.1M PMSF	50µ1(終濃度 1mM)						
10% (w/v) NaN ₃	%w/v) J						

<u>2、抗体用 GST-Gab2-3 プラスミドの構築</u>

Fig. 2のように、pGEX-4T-1をEcoRIとPstIで、pBOS-Gab2-3-300-Flag を先にEcoRIで処理した後XhoIで、pGEX-4T-2-Gab3-C'をXhoIとPstIで 処理して、必要なDNA断片を回収し、Ligationして、pGEX-4T-Gab2-3-300-C' を得た。

Amp 耐性菌株のプラスミドを回収し、EcoR I で処理し、電気泳動し、断片の

長さによって、プラスミドを確認する。確認したプラスミドを Xho I と Pst I で処理し、再確認する。(Fig. 3)



Fig. 4-2-3 pGEX-4T-Gab2-3-300-C'を EcoR I で処理して、断片の長さから決定する結果、
 矢印で示したプラスミドは目的プラスミドである(pGEX-4T-1 EcoR I Pst I より
 2149bp 長い)。目的プラスミドを Xho I と Pst I で処理して再確認する
 (1569bp+4566bp)。

<u>3、抗体用 GST-Gab2-3 タンパク質発現の確認</u>

(1)Competent Cell BL21(DE3)の調製

- 1、E. coli のコロニーの一つを 5ml の 1×LB にうえて、37℃で一晩振とう培養
- 2、TB 培地(TB 45ml+リン酸バッファー 5ml 混合したものを TB 培地と言う) の A600 を測定
- 3、E. coli 125 2.5ml を 50mlTB 培地に加える
- 4、37℃で振とう培養しながら、A600=0.5~1.0になるまで培養する。氷上で 15minよく冷やす。冷やしておいた遠心管に移し、3000rpm,2℃,10minで 遠心し、上清を取り除く
- 5、Tfb I (氷上で冷やしておいたもの)を 10ml 加え、懸濁氷上に 5min おく
- 6、3000rpm, 2℃, 10min で遠心、上清を取り除く
- 7、TfbII(冷やしておいたもの)を1ml加えて懸濁し、ほぐす
- 8、氷上に 15min おき、冷やしておいたマイクロチューブに 100µl ずつ入れる
- 9、液体窒素で凍らす。-80℃で保存

(2)抗体用 GST-Gab2-3 タンパク質発現の確認

1、Competent Cell BL21(DE3)をLB plateに広げ、培養する。 pGEX-4T-Gab2-3-300-C'を Competent Cell BL21(DE3)に transfermationし、Fig.4のよう に50µlを取り、100µg/ml Amp in LB plateの半分に広げ、10µlを 取り、plateの半分に染み込ませ る。



Fig. 4-2-4 BL21-pGEX-Gab2-3-300-C'の広 げ型

- 2、Single Colony として形成された BL21(DE3) BL21-pGEX-Gab2-3-300-C'を5ml LH
 - 3ml LB media にう

5ml LB media(100μg/ml Amp) える

- 3、37℃で一晩振とう培養
- 4、BL21(DE3) 0.5ml を取り、5ml LB media に入れ、BL21(DE3) pGEX-Gab2-3-300-C' 0.5ml を取り、5ml LB media(100µg/ml Amp)に入れ、 37℃で1hr 振とう培養
- 5、100mM IPTG 20µ1 を入れ(終濃度 0.4mM)、BL21-pGEX-Gab2-3-300-C'の方

には 50mg/ml Amp 10µ1(終濃度 100µg/ml)を追加し、37℃で 2hr 振盪培養 6、氷上で冷やし、4℃ 10k rpm で 10 min 遠心し、上清を捨てる

- 7、ppt に 2ml wash buffer を入れ、10mg/ml リゾチーム 20µl を入れる(終濃 度 0. 1mg/ml)。
- 8、25℃ 15 min おき、時々まぜる
- 9、 氷上で 10 min 冷やし
- 10、sonication で破菌されるまで 15s×5
- 11、4℃ 10k rpm で 10 min 遠心し、上清を別の tube に移す
- 12、ppt に 1ml wash buffer を入れ、かるく sonication し、懸濁
- 13、各 12µl を取り、4×sample buffer 4µl を加え、95℃以上 5min 置き、室 温 15k rpm で 1min 遠心
- 14、SDS-PAGE 電気泳動(100V、1 枚あたり約 25mA、電流一定)し、transfer し、 抗 Gab3 抗体でウエスタンブロットし、GST-Gab2-3-300-C'の発現を確認 (Fig. 5)
- 15、supとpptを-20℃で保存



Fig. 4-2-5 GST-Gab2-3-300-C'の発現。 BL21(DE3)に pGEX-4T-Gab2-3-300-C'を入れな い方(-)と入れた方(+)と比べる。

GST-Gab2-3-300-C'の計算上の分子量は 28kDa+43.5kDa=71.5kDa で、図の "←"の位置に相当する。抗 Gab3 抗体と反応するプラスミド由来のバンドの 売り最も大きいものは 63kDa 付近である。

これは GST-Gab2-3-300-C'タンパク質が大腸菌内で分解しているか、又は 正規の GST-Gab2-3-300-C'の SDS-PGAE 上での泳動位置が計算値よりの小さい 位置である可能性とが考えられる。

<u>4、抗 Gab2-3 抗体の精製</u>

(1)glutatine-sepharose-GST-Gab2-3-300-C'の作製

1、	BL21-pGEX-Gab2-3を取り、5ml LB media(終濃度 100µg/ml Amp)に入れ、					
0	37して一呪派とり培養 MO 校社 200ml に入れ、					
<i>と</i> 、 つ	M9 培地 300m1 に入れ、吸工度 A000=0.6 まで培養					
з,	100mM IPTC 200ul(20連度 0.1mM)) たみわ 20℃で 2.5hr にしら					
	$100 \text{Im} \text{IFIG} 500 \mu 1 (於假度 0.1 \text{Im}) (老八40、50 C C 2.5 \text{III } 孤と) 50 \text{mg/m1} (如果 由 0.1 \text{mg/m1}) [拉姜$					
1	30 mg/mi Amp $000 \mu i$ (彩張反 0.1 mg/mi) $\int 4 \pi$ 来上で冷やし 500ml 遠心管に移し 4° 10k rpm で 10 min 遠心し 上					
ч,						
5	10ml PRS(-)で縣濁し 100ml 遠心管に移し 4℃ 10k rpm で 10 min 遠心					
0,	し、上清を捨てる					
6、	10ml PBS(-)で懸濁し、4℃ 10k rpm で 10 min 遠心し、上清を捨てる					
7、	ppt を 5ml Buffer A で懸濁し、10mg/ml リゾチーム 50ul を入れる(終濃					
	度 0. 1mg/ml)					
8、	10ml PBS(-)で懸濁し、4℃ 10k rpmで10 min遠心し、上清を捨てる					
9、	4℃ 10k rpmで10 min遠心し、上清を別のtubeに移す					
10,	25℃ 15 min おき、時々まぜ、氷上で 10 min 冷やす					
11,	1M DTT 25µ1(終濃度 5mM)、10% sarkosyL 250µ1(終濃度 0.5%)を入れる					
12,	氷上で冷やしながら、sonication					
13,	4℃ 10k rpm で10 min 遠心し、上清を保存					
14,	pptにBuffer A 5mlを加え、sonication					
15,	4℃ 10k rpm で10 min 遠心し、上清を保存					
16、	上清に 20% Triton X-100 250µl を加える(終濃度 0.5%)					
17、	上清を 100µl 保存し <u>(sample 1)</u> 、ppt を Buffer A 1ml で懸濁し保存する					
	(sample 2)					
18、	残り上清に 1ml gutatine-sepharose を加える					
19、	4 C に一晩でゆっくり攪拌					
20、	4C 3k rpm で2 min 退心し、上宿を 100µ1 保存し <u>(sample 3)</u> 、残りを害					
01						
21,	nnt / 10ml Buffor AtTriton V-100 を加え、かえくmix)					
	4° 3k rpm で 2 min 造心」 上法を捨てる $\times 5 \square$					
22	40 5K Ipm C 2 min 速心で、工作を招てる \int nnt V 10ml Buffer A+Triton X-100 を加え 4℃で保存する					
23	gutatine-senharose-GST-Gab $2-3-300-C'$					
20,	guideline September 001 002 0 000 0 (2) 10.1 $\int 20mM$ HPEPS-NaOH pH7.5 を入れ、かるくmix し、4°C 3k					
	10m1 150mM NaCl rpm で 2 min 遠心し、上清を捨て					
	$\int 1 \text{ mM EDTA} \qquad \qquad$					
	C 0.5% Triton X-100					
0.4	10 1 00 M UPPPC N OIL UP $(2, 1, 1)$ $(3, 2)$					

24、10ml 20mM HPEPS-NaOH pH7.5 を入れ、かるく mix し、4℃ 3k rpm で 2 min 遠心し、上清をギリギリまで除く

- 25、10ml 0.2M borate-NaOH pH8.6 を入れ、かるく mix し、4℃ 3k rpm で 2 min 遠心し、上清を捨てる×3回 26、体積を 1ml になるように、0.2M borate-NaOH pH8.6 を入れる 27、よく混ぜ、20µ1のビーズ液を取り、-20℃で保存(sample 4) 28、残りを 4℃ 3k rpm で 2 min 遠心し、上清をギリギリまで除く 29, 15.5mg Dimethyl pimelimidate(DMP) in 2ml 0.2M triethamolamine pH8.3 を入れ、pH を確認(pH8 以上) 30、25℃ 30min~1hr におき、4℃ 3k rpm で 2 min 遠心 31、上清 100µl を取り、-20℃で保存し(sample 5)、残りを捨てる 32、pptに10ml 0.2M ethanolamine-HCl pH8.2を入れ、5minおく 33、4°C 3k rpm で 2 min 遠心し、上清を捨てる 34、ppt に 10ml 0.2M ethanolamine-HCl pH8.2 を入れ、室温 1hr 混ぜる 35、4℃ 3k rpm で 2 min 遠心し、上清を捨てる Journal Tris-HCl を入れ、かるくmixし、4℃ 3k
 150mM NaCl rpmで2min遠心し、上清を捨て
 1mM EDTA る×2回
 1mM PMSF 36、 10m1
- C IMM PMSF 37、Buffer A+ NaN₃ 2ml を入れ、懸濁し、-20℃で保存(sample 6)
- 38、各 12µl を取り、4×sample buffer 4µl を加え、95℃以上 5min 置き、室 温 15k rpm で 1min 遠心
- 39、SDS-PAGE 電気泳動(100V、1 枚あたり約 25mA、電流一定)し、transfer し、 抗 Gab3 抗体でウエスタンブロットし、filter を CBB 染色(Fig. 6)



Fig. 4-2-6 gutatine-sepharose-GST-Gab2-3-300-C'の作製(sample1~6 は操作文中に記載)

(2)抗 Gab2-3 抗体の精製

1、sample 6の上清を静かに除く

- 2、10mM Tris-HC1 pH 7.5 2ml で懸濁
- 3、カラムに 10mM Tris-HCl pH 7.5 5ml を入れておく
- 4、パスツールピペットで上から、懸濁した resin をカラムの液の中に均一に 静かに入れておく
- 5、1滴/10sのスピードで静かに下から液を出す
- 6、液がビーズと同じまで液を止める
- 7、上から静かに 2ml 100mM Glycin-HCl pH2.5 を加える (resin の表面が乱れ ないように注意する)
- 8、下からゆっくり液を出す。1滴/10s で液がなくならないように注意する
- 9、2ml 100mM Glycin-HCl pH7.5を加え、下から液を出す ×5回
- 10、5ml 10mM Tris-HCl pH8.8 を静かに加え、下から液を出す ×2回
- 11、最後の1滴をpH paper で pH を確認(pH8.8)
- (7~11 は非共有結合 GST-Gab3-300 を流し出す)
- 12、5ml 100mM triethanolamine pH11.5 を静かに加え、下から液を出す ×2回
- 13、5ml 10mM Tris-HCl pH7.5を静かに加え、下から液を出す ×2回
- 14、最後の1滴をpH paper で pH を確認(pH7.5)

15、

- 抗 Gab3 抗体 2ml 】を blue cap tube に入れ、
- 10mM Tris-HCl pH7.5 20ml ∫ 泡を立たないように混ぜる
- 16、4℃ 3.5k rpm で 10min 遠心し、上清を別の tube に回収
- 17、カラム中の液をビーズの表面まで除く
- 18、抗体液で三日間 incubation
- 19、 血清を 5~10ml ずつ加え、1 滴/10s でカラムを通し、下から出 る液を回収
- ○個を回収
 20、 回収した液を再びカラムにのせる(完全に抗体をカラムに接合 ×3回 させる)
- (15~20は抗体をカラムに吸着させる)
- 21、5ml 10mM Tris-HCl pH7.5を加え、下からゆっくり流し出す ×4回
- 22、 5ml 10mM Tris-HCl pH7.5 500mM NaCl を加え、下からゆっくり流し出す ×4回
- 23、100mM Glycine-HCl pH2.5 1ml ずつ加え、下から回収(#1~10)
- 24、すぐ各 tubu に 100µl 1M Tris-HCl pH8.0 を加え(終濃度 100mM)、中和
- 25、カラムに 5ml Tris-HCl pH8.8 で洗う ×2 回
- 26、最後の1滴をpH paper で pH を確認(pH8.8)
- 27、100mM triethanolamine pH11.5 1ml ずつ加え、下から回収(*1~10)
- 28、すぐ各 tubu に 100µl 1M Tris-HCl pH8.0 を加え(終濃度 100mM)、中和 (23~28 は IgG を溶出する)
- 29、カラムに 5ml Tris-HCl pH7.5 で洗う ×2 回
- 30、Buffer A+ NaN₃ 2ml を加え、4℃で保存
- 31、各 3. 5µ1 を取り、PBS (-) 4µ1 と 4×sample buffer2. 5µ1 を加え、95℃以上 5min 置き、室温 15k rpm で 1min 遠心
- 32、SDS-PAGE 電気泳動(100V、1 枚あたり約 25mA、電流一定)し、CBB 染色し、 抗 Gab2-3 抗体の量を確認(Fig. 7)

33、抗 Gab2-3 抗体は#1 を 500 倍希釈で使用する



Fig. 4-2-7 抗 Gab2-3 抗体の量の確認(#1~10:操作 23、*1~10:操作 27)

<u>5、抗Gab2-3抗体の確認</u>

Gab3-Flag、Gab2-3-300-Flag、Gab2-3-200-Flag のそれぞれの安定発現株の 細胞を可溶化し、細胞抽出液を抗Gab3 抗体と抗Gab2-3 抗体でウエスタンブロ ットを行った。抗Gab2-3 抗体でブロットする方は抗Gab3 抗体でブロットする 方よりバンドが薄いが、Gab2-3-200 とGab3 の方の変化がGab2-3-300より大 きい。抗Flag 抗体でブロットする方と比べた結果、抗Gab2-3 抗体でブロット する方はもっと一致する。抗体が精製された事を確認した。(Fig. 4-2-8)



抗 Gab3 抗体に比べ、Gab2-3-300 に対する反応性が相対的に上昇した。これは、Gab2-3-300 タンパク質の Gab3 部分に対する抗体が単離されたためと考えられる。しかし、抗 Flag 抗体との反応結果と少し異差が見られるので、再び反応性の検討が必要である。

第3項 Gab2-3キメラタンパク質の安定発現株の樹立

1、COS-7 でタンパク質の発現の確認

COS-7 細胞へ、pBOS-HA-Gab2、pBOS-Gab3-Flag、pBOS-Gab2-3-300-Flag、 pBOS-Gab2-3-200-Flag を各 5 µ g 相当トランスフェクションし、各抗体でウエ スタンブロットを行った。Gab2-3 キメラタンパク質(Fig. 4-2-14)が発現でき る事を確認した。



Fig. 4-2-14 Gab2-3-300 と Gab2-3-200 タンパク質の発現の確認

2、前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当の ApaL I で消化した pBOS-Gab3-Flag、Nsi I で消化した pBOS-Gab2-3-300-Flag、Nsi I で消化した pBOS-Gab2-3-200-Flag、Sph I で消 化した pBOS-HA-Gab2-PI3K(-)、Sph I で消化した pBOS-HA-Gab2-Stat3(-)をそ れぞれ、選択マーカーとして $1 \mu g$ 相当の EcoR I で消化した puromycin 耐性遺 伝子を用い、GM-I62-1 細胞へエレクトロポレーション法により導入した。そ の後、puromycin 耐性で選択し、安定発現株の樹立を行った。1×10⁶cells 相 当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用い て Gab2-3 キメラタンパク質の発現量を、ウエスタンブロットを行い、ECL に より検討した。Amido Black 染色で各レーン同量のタンパク質が泳動されてい る事が確認できた。(Fig. 4-2-15)



Fig. 4-2-15 Gab2-3-300 と Gab2-3-200 タンパク質の構造と発現量の確認

第4項 各発現株の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化

1、Gab タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

RPMI-10%FBS 培養下で各サイトカイン存在下又は非存在下の細胞の増殖の 様子をトリバンブルー染色による生細胞数を数えることで解析した。

細胞の濃度が 1×10⁶cel1/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 と Gab2-3-300 発現 細胞は3日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されて いる事がわかった。一方で、Gab3 と Gab2-3-200 発現細胞は G-CSF 存在下で増 殖を続け、分化が阻害されている事がわかった。factor free の場合はどの細 胞も数日で死滅した。(Fig. 4-2-16)



Fig. 4-2-16 Gab2-3 キメラタンパク質発現株における増殖曲線

<u>2、Gab2-3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化</u>

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

親細胞の GM-I62-1 と Gab2-3-300 発現細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。一方で、Gab3 と Gab2-3-200

発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかった。(Fig. 4-2-17)



Fig. 4-2-17 Gab2-3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のGM-I62-1及びGab2-3-300発現細胞では2つ以上に断片化した核を持つ細胞が40%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。一方で、Gab3又はGab2-3-200発現細胞はG-CSF存在下でも、ほとんどの細胞の核の分葉化が見られず、好中球へに分化誘導が阻害された事がわかった。(Fig. 4-2-18)



Fig. 4-2-18 Gab2-3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

第5項 各発現株における Gab タンパク質のリン酸化

Gab2 を主に発現している親細胞及び Gab2-3-300 発現細胞では G-CSF 依存に 好中球への分化が誘導されたが、Gab3 及び Gab2-3-200 発現細胞では、分化誘 導が阻害された。(Fig. 4-2-19)



Fig. 4-2-19 各種の Gab タンパク質の比較と分化誘導の関係

Gab2、Gab3 キメラタンパク質が G-CSF 刺激でチロシンリン酸されるかを調べた。Gab2 が G-CSF 刺激依存にチロシン残基がリン酸化されるので、GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab2-3-300 及び GM-Gab2-3-200 の 150u/ml G-CSF 刺激 5 分における内在性 Gab2 又は Gab タンパク質のチロシンリン酸化の様子を、抗リン酸化チロシン抗体(4G10)を用いて western blot で解析した。(Fig. 4-2-20)



又、これまでの研究から G-CSF による好中球への分化に G-CSF 刺激の Stat3 のチロシンリン酸化は必須である事がわかっているので、どの細胞での G-CSF 刺激での Stat3 のチロシンリン酸化にはほとんど影響が見られなかったから、 Gab2-3 キメラタンパク質発現により、リン酸化反応自体には影響がなかった 事が確認された。内在性 Gab2 のチロシンリン酸化は Gab2-3-200 発現細胞でも

Fig. 4-2-20 G-CSF 刺激によるチロシンリン酸化

検出されたが、Gab3 及び Gab2-3-300 発現細胞では低下が見られた。一方で、Gab3、Gab2-3-200 発現細胞では好中球への分化誘導が阻害されたので、内在性の Gab2 のリン酸化の有無と分化誘導との関連はない事がわかった。又、Gab3、Gab2-3-200 のチロシンリン酸化が強く検出されたので、外来性の Gab キメラタンパク質のチロシンリン酸化の度合と好中球分化の阻害とは関連があるかもしれない。

親細胞の GM-I62-1 では、未刺激に対して、G-CSF で 5 分間刺激すると、内 在性 Gab2 のチロシンリン酸化が見られた。

Gab3 と Gab2-3-200 細胞では、内在性 Gab2 のチロシンリン酸化も検出された、外来性の Gab3 又は Gab2-3-200 の強いリン酸化も検出された。Gab3 又は Gab2-3-200 のリン酸化はリン酸化した Gab2 と競合し、Gab2 の下流のシグナル 伝達を抑制して、好中球への分化誘導を阻害する可能性が考えられる。

一方で、Gab2-3-300 細胞では、内在性 Gab2 のチロシンリン酸化がほとんど 検出されなかったが、外来性の Gab2-3-200 の強いリン酸化も検出された。 Gab2-3-300 のリン酸化は Gab2 の代わりに、下流のシグナル伝達を活性化して、 好中球への分化を誘導する可能性が考えられる。

したがって、Gab2のアミノ酸 216-295 番の領域が G-CSF 依存の好中球分化 誘導に必要であるか、あるいは Gab3のアミノ酸 201-294 番の領域の過剰発現 が G-CSF 依存の好中球分化誘導を阻害することかが考えられた。(Fig. 4-2-19)

Gab2 のこの領域には3 つのチロシン残基が存在するのに対して、Gab3 のこの領域にはチロシン残基が存在しなかった。これらのチロシン残基のリン酸化に伴い結合するタンパク質が好中球への分化誘導に関与している可能性が考えられる。特に248 と 266 番のチロシン残基は CrkL や PLC y の結合部位の可能性がある。

また、Gab2 と Gab3 で Casein kinase Ⅱや Protein kinase C によりリン酸 化される可能性のある部位が存在するので、これらのリン酸化酵素の G-CSF 依存の好中球分化誘導への関与についても今後検討する必要がある。(Fig. 4-2-21)

			CrkL/PLC y	
Gab2	TRQKS	DTAVQKLAQSNGHCINGVGGC	QVHGF <mark>YSLP</mark> KPSSR	256
Gab3	TRCDSW	SNSNHSLAQTSFDDVFLDGLQF	PFISNNLVHPLHHGKVSQD	245
	Ck2	Ck2		
			Ck2 PKC	
Gab2	HNTEFKD	STYDLPRSLASHGHTKSS-L	TGSETDNEDVYTEKMP	s 296
Gah3	FPSIRPO/		F-SSI NPTVEVEEKOVSI P	294
0000	PKC			234
	Y	:Gab2にある3つのTyr残基	É.	
Cell	/PLC v			
		: CrkL/PLC y 結合部位(Yx	xP)	
6	<u>1</u> K2			
	<u>, , , , , , , , , , , , , , , , , , , </u>	: Casein kinase II (CK2)	リン酸化部位(S/T xx)	D/E)
			and presidential and an analysis and the state	
_ F	PĶC	: Protein kinase C (PKC))リン酸化部位(S/T x]	K/R)
		4.0.01 八小話道に明にナス	「街村のマン」前町町	
	F1g.	4-2-21 万化碳导に関与する	3 限戦のノミノ 酸配列	

第3節 Gab3 タンパク質の発現が LGM-Y4 の分化への影響

G-CSFが、G-CSF受容体に結合すると、G-CSF受容体の細胞質内の4つのチ ロシン残基がリン酸化され、下流へのシグナルが伝達される。4番目のチロシ ン残基にアダプタータンパク質であるShcが結合し、リン酸化されると、Grb2 がリクルートされ、Shc-Grb2-SOSの複合体を介して、Ras-Raf-MAPKK(MEK)-MAPK(ERK)の活性化が誘導される事も知られている。前駆細胞LGM-Y4は4番目 のチロシンがフェニルアラニンに入れ替わり、リン酸化できないG-CSF受容体 を発現している好中球前駆細胞である。(Fig. 4-3-1) この細胞でGab3を過剰 発現し、好中球の分化への影響を検討した。



Fig. 4-3-1 GM-I62-1 と LGM-1 Y4-1 の G-CSF 受容体の構造

第1項 前駆細胞 LGM-Y4 に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当のApaL I で消化した pBOS-Gab3-Flag と選択マーカーとして $1 \mu g$ 相当の EcoR I で消化した puromycin 耐性遺伝子を用い、LGM-Y4-1 細胞ヘエレ クトロポレーション法により導入した。その後、puromycin 耐性で選択し、安 定発現株 (LGM-Gab3)の樹立を行った。 1×10^6 cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用いて Gab3 タンパク質 (Fig. 4-3-2)の発現量を、ウエスタンブロットを行い、ECL により検討した。以後 の実験は LGM-Gab3 1-E-7 を用いて実験を行うことを決めた。



1、Gab3発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の LGM-Y4-1 と LGM-Y4-Gab3 発現細胞は3日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。Gab3は LGM-Y4 の G-CSF 依存の分化を阻害できないことがわかった。(Fig. 4-3-3)



2、Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の LGM-Y4 細胞 と Gab3 過剰発現した LGM-Y4-Gab3 は両方とも 10 日目から核の分葉化が見られ、 13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。(Fig. 4-3-4)



Fig. 4-3-4 GM-I62-1 及び LGM-Y4 の Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。 G-CSF存在下で13日間培養すると2つ以上に断片化した核を持つ細胞が40% 以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。(Fig. 4-3-5)



Fig. 4-3-5 GM-I62-1 及び LGM-Y4 の Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

以上によると、Gab3の過剰発現によりG-CSF依存の好中球の分化阻害には G-CSF 受容体の細胞質内の四番目のチロシン残基は必要であることが明らか になった。

あるいは、G-CSF 依存の Gab3 又は Gab2 のチロシンリン酸化には、G-CSF 受

容体の4番目のチロシン残基を介するシグナル伝達が必要であるので、 LGM-Y4-Gab3細胞では、Gab3のチロシンリン酸化が起こらない。よって、Gab3 の過剰発現が好中球への分化を阻害することには、Gab3のチロシンリン酸化 が必要であることが特定される。

第4節 Gab2 タンパク質の過剰発現が GM-I62-1 の分化への影響

Gab3 及び Gab2-3 キメラタンパク質を過剰に発現し、いろんな実験を行ったが、その実験結果はただ細胞に異常にタンパク質が過剰発現した結果と疑いがある。

Gab タンパク質の過剰発現により細胞が増殖し続け、細胞の癌化の原因の一つという報告がある。好中球前駆細胞 GM-I62-1 での Gab3 の過剰発現が増殖能の上昇による分化の阻害作用かどうかを確認するため、どの Gab タンパク質にでも起る可能性がある、すなわち、Gab3 の過剰発現によって、G-CSF 刺激による好中球への分化誘導が阻害されるのは、「過剰発現された Gab3 が Gab2 と拮抗して Gab2 の活性化を阻害するため」であり、「単に Gab2 又は Gab2 と類似している Gab3 の細胞内発現量が増加したため」ではないことを示す目的で、Gab3 ではなく、Gab2 の過剰発現による好中球の分化誘導への影響を検討した。

第1項 Gab2 タンパク質過剰発現 GM-I62-1 細胞の Gab2 発現量の確認

1×10⁶cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細 胞抽出液を用いて Gab2 タンパク質 (Fig. 4-4-1)の発現量を、ウエスタンブロ ットを行い、ECL により検討した。過剰発現した Gab2 は内在性 Gab2 の 2 倍以 上発現していることが確認できた。



Fig. 4-4-1 Gab2 タンパク質の発現量の確認

第2項 Gab2 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

G-CSF 依存の好中球分化誘導における増殖停止に対する Gab2 の過剰発現の 影響を検討した。

本実験に使われる細胞は GM-Gab2 1-B-1 である。

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、Gab2 過剰発現細胞は親細胞の GM-I62-1 細胞と同じく 5 日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。(Fig. 4-4-2)



Fig. 4-4-2 Gab2 タンパク質過剰発現株における増殖曲線

第3項 Gab2 タンパク質過剰発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、Gab2 発現細胞は親細胞の GM-I62-1 細胞と同じく 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。10 日目と 13 日目で大量の分葉化が見られた。(Fig. 4-4-3)



Fig. 4-4-3 Gab2 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のGM-I62-1では2つ以上に 断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事 がわかった。一方で、Gab2発現細胞も分葉化した核を持つ細胞が50%以上と なり、好中球への分化が誘導された事がわかった。(Fig. 4-4-4)



Fig. 4-4-4 Gab2 タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ Gab3 の過剰発現の場合と異なり、Gab2 を過剰発現させても、G-CSF 依存下 の好中球分化誘導を阻害しないことがわかった。

第5節 変異型 Gab2 および変異型 Gab3 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の

増殖曲線及び核の形態変化

赤血球前駆細胞の増殖に STAT3 が Gab2 の 195 版のチロシンに結合し、リン酸化(活性化)するという報告があったので^[27]、好中球前駆細胞の増殖と分化に、Gab2 の 195 番チロシン残基が関与しているかどうかを調べた。

第1項 変異型 Gab2 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形

態変化

1、Gab2-STAT3(-)タンパク質の発現プラスミドの構築

Gab2-STAT3(-)は Gab2 の 195 番のチロシンをフェニルアラニンに置換する 変異型 Gab2 タンパク質である。

(1) Gab2-STAT3(-)の変異部分の構築

Gab2 の 195 番のチロシンをコードする TAC コドンを、フェニルアラニンを コードする TCC コドンに置換するプライマーを設計する。

Fig. 4-5-1のように、195番のチロシンをフェニルアラニンに置換するに 当たって、pBOS-HA-Gab2をテンプレートに用い、PCRを行った。その際、SF1450 とGab2-Y-STAT3-F660-Rev、Gab2-Y-STAT3-F660-ForとGab2-N-Rの組み合わせ、 Taq polymeraseを用いて PCRを行い、2つのGab2-Gab3のDNA 断片の増幅を行 った。その後、agaroseゲル電気泳動を用いて展開後、きりだしを行い、フェ ノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2つのDNA 断片を回収し、 15 μ 1の1 μ 1ずつを取って混合し、SF1450とGab2-N-Rを用いた PCRを行い、 Gab2変異部分のDNA 断片を増幅した。このDNA 断片を sequence 用プラスミド pBS II KS(+) に Kpn I と EcoR I を用いてクロニーングし、青白選択法で選択し た菌株のプラスミドを回収し、EcoR I で処理し、電気泳動し、断片の長さによ って、プラスミドを確認する。選択したプラスミドの塩基配列を確認する。(Fig. 4-5-2) 正確な塩基配列を持つプラスミドを一つ選んで、Gab2-STAT3(-)タンパ ク質発現プラスミドの構築を行う。



Fig. 4-5-1 sequence 用 Gab2-Stat3(-)の変異部分の構築方法



Fig. 4-5-2 sequence 用 pBS II KS (+)-Gab2-Stat3(-)を EcoR I で処理して、断片の長さから決定する結果、矢印で示したプラスミドは目的の Gab2 断片を含んたプラスミドでと考えられる(pBS II KS(+)より 937bp 長い)。

(2) Gab2-STAT3(-)の発現プラスミドの構築

Fig. 4-5-3のように、一つの pBOS-HA-Gab2を Kpn I と Xba I で、もう一つの pBOS-HA-Gab2を EcoR I と Xba I で、pBS II KS (+)-Gab2-Stat3(-)を Kpn I と EcoR I で処理して、必要な DNA 断片を回収し、Ligation して、 pBOS-HA-Gab2-Stat3(-)を得た。

菌株のプラスミドを回収し、EcoRI、KpnIとXbaIで処理し、電気泳動し、 断片の長さによって、プラスミドを確認する。(Fig. 4-5-4)



Fig. 4-5-4 pBOS-Gab2-Stat3(-)を EcoR I (854 bp+6509bp),、Kpn I (7363 bp)と Xba I (7363 bp)で処理して、断片の長さから決定する結果、矢印で示したプラスミドは目的 プラスミドである。

操作中、変異が導入していない断片が産生するおそれがあるので、確認したプラスミドを、プライマーSF1450を用いて sequence し、変異部分の塩基配列が TAC から TCC に置換する事を確認する。

2、COS-7 でタンパク質の発現の確認

COS-7 細胞へ、pBOS-HA-Gab2-Stat3(-)を各 5 µg 相当トランスフェクション し、ウエスタンブロットを行った。Gab2-3 キメラタンパク質(Fig. 4-3-1)と 変異型 Gab2 タンパク質(Fig. 4-5-5)が発現できる事を確認した。



Fig. 4-5-5 Gab2-Stat3(-)タンパク質の発現確認

<u>3、変異型 Gab2 発現プラスミドを前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の</u> 樹立

(1) Gab2-PI3K(-)タンパク質

Gab2-PI3K(-)は Gab2 の 441 番、465 番、574 番のチロシンをフェニルアラ ニンに置換する変異型 Gab2 タンパク質である。(出口雅子卒業論文^[25])

これらのチロシン残基はリン酸化されるとPI3Kが結合すると考えられている。したがって、Gab2-PI3K(-)では、チロシンリン酸化反応が起きない。したがって、その下流のPI3K-Aktの活性化が起こらないと考えられる。

(2) 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当の Sph I で消化した pBOS-HA-Gab2-PI3K(-)、Sph I で消化した pBOS-HA-Gab2-Stat3(-)をそれぞれ、選択マーカーとして $1 \mu g$ 相当の EcoR I で消化した puromycin 耐性遺伝子を用い、GM-I62-1 細胞へエレクトロポレー ション法により導入した。その後、puromycin 耐性で選択し、安定発現株の樹 立を行った。1×10⁶cel1s 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より 調製した細胞抽出液を用いて変異型 Gab2 タンパク質 (Fig. 4-3-4)の発現量を、 ウエスタンブロットを行い、ECL により検討した。Amido Black 染色で各レー ン同量のタンパク質が泳動されている事が確認できた。通常の GM-I62-1 に対 して、Gab2-Stat3(-) タンパク質の発現量は内在性 Gab2 の 3 倍、Gab2-PI3K (-) タンパク質の発現量は内在性 Gab2 の 2 倍である (Fig. 4-5-6)。



Fig. 4-5-6 Gab2-Stat3(-)と Gab2-PI3K(-)タンパク質の発現量の確認

4、変異型 Gab2 発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖を続けた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、Gab2-Stat3(-)と Gab2-PI3K(-)発現細

胞は3日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球へと分化が誘導されている事がわかった。(Fig. 4-5-7)



Fig. 4-5-7 変異型 Gab2 タンパク質発現株における増殖曲線

なお、これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察 した。IL-3 存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事 がわかる。Gab2-Stat3(-)と Gab2-PI3K(-)発現細胞は 10 日目から核の分葉化 が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた(data not show)。

Gab2 の Stat3 結合部位 195 番のチロシンの変異型タンパク質の過剰発現で は分化誘導が阻害されなかった。G-CSF 刺激後、Stat3 は Gab2 と結合して活性 化されない事を示している。

また、核の分葉化を促進する Akt の活性化に必要な PI3K の p85 サブユニット結合部位の変異型 Gab2-PI3K(-)の過剰発現細胞でも G-CSF 刺激依存の増殖 停止に影響は見られなかった。Gab2 を介する PI3K-Akt の活性化の分化誘導へ の関与は少ないか又はこの細胞の Gab2-PI3K(-)の発現量がそれほど多くなか った(Fig. 4-5-6)ために影響が少なかった事も考えられる。

第2項 Gab3-PI3K(-)タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の

形態変化

次の Gab2 ではなく、Gab3 を介する PI3K/Akt の活性化に対する影響を調べた。Gab3 の PI3K との結合部位三つのチロシンをフェニルアラニンに入れ替わり PI3K と結合できない、すなわち Gab3-PI3K-Akt 経路の活性化が起こらない 変異型 Gab3 である Gab3-PI3K(-)を GM-I62-1 に過剰発現させ、好中球分化への影響を調べた。

1、Gab3-PI3K(-)タンパク質過剰発現 GM-I62-1 細胞の Gab2 発現量の確認

1×10⁶cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細 胞抽出液を用いて Gab3-PI3K (-) タンパク質 (Fig. 4-5-8) の発現量を、ウエス タンブロットを行い、ECL により検討した。過剰発現した Gab3 は内在性 Gab3 の5倍以上発現していることが確認できた。



Fig. 4-5-8 Gab3-PI3K(-)タンパク質の発現量の確認

2、Gab3-PI3K(-)タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

Gab3 を介する PI3K-Akt 経路の活性化の有無を調べた。本実験に使われる細胞は GM-Gab3-PI3K(-) clone 5 である。

細胞の濃度が 1×10⁶cel1/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 細胞は 5 日ほど増 殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。 一方で、Gab3 発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続け、分化が阻害されたが、 Gab3-PI3K(-)発現細胞は 10 日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球へ の分化が見られる。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。(Fig. 4-5-9)



Fig. 4-5-9 GM-Gab3-PI3K(-)タンパク質発現株における増殖曲線

3、Gab3-PI3K(-)タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見 られた。一方で、Gab3 発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかった が、Gab3-PI3K(-)発現細胞は10日目と13日目で大量の分葉化が見られた。 (Fig. 4-5-10)



Fig. 4-5-10 Gab3-PI3K(-)タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のGM-I62-1では2つ以上に 断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事 がわかった。一方で、Gab3発現細胞はG-CSF存在下でも、ほとんどの細胞の 核の分葉化が見られなかったが、Gab3-PI3K(-)発現細胞では、2つ以上に断片 化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわ かった。(Fig. 4-5-11)



Fig. 4-5-11 Gab3-PI3K(-)タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

<u>4、G-CSF 刺激後 GM-Gab3、GM-Gab3-PI3K(-)の Akt 及び MAPK リン酸化の経時</u> 変化の比較

GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3-PI3K(-)の細胞抽出液を抗 p-Akt 抗体、抗 Akt 抗体、抗 p-MAPK 抗体と抗 MAPK 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、 GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3-PI3K(-)の細胞内 Akt 及び MAPK のリン酸化状況 を検討した。

Fig. 4-5-12 によって、GM-I62-1 では、G-CSF で刺激した後、Akt と MAPK がリン酸化されたが、5min 後には脱リン酸化した。GM-Gab3 では、Akt も MAPK も長時間で強くリン酸化していた。一方で、GM-Gab3-PI3K(-)では、Akt がリ ン酸化され、5min 後に脱リン酸化したが、MAPK は長時間で強くリン酸化して いた。



Fig. 4-5-12 GM-Gab3、GM-Gab3-PI3K(-)の細胞内 Akt 及び MAPK のリン酸化状況

PI3K との結合部位の変異のよって、Gab3の好中球分化の阻害作用がなくなったことがわかった。Gab3の好中球分化の阻害は PI3K 経路にも関わっていることと考えられる。
第6節 変異型 Gab2-3-300 キメラタンパク質の発現が GM-I62-1 の分化への

影響

Zhang さんらの論文によると^[28]、Gab2 のチロシン残基がリン酸化すると、 Shp2 の結合が促進され、Ras/MAPK 経路が活性化される。Ras/MAPK の下流で活 性化されるキナーゼの一つ RSK は Gab2 の三つのセリン残基リン酸化、Shp2 の 結合と Shp2 依存的なシグナル伝達を抑制する。RSK 介する Gab2 リン酸化は Gab2 依存的な生物学機能を制御する役割を果たしているかもしれない。RSK がリン酸化する Gab2 の三つのセリンの一つである Gab2 と SHP2 の結合と SHP2 の下流の Ras/MAPK シグナル伝達を抑制する Ser211 は Gab2-3-200 と Gab2-3-300 の違い部分にあるので、二つのキメラタンパク質の分化への影響 の違いに関与している可能性があると考え、211 番のセリンをアラニンに置換 する変異型 Gab2-3-300 タンパク質である Gab2-3-300-S211A を過剰発現させ、 好中球分化への影響を調べた。(Fig. 4-6-1)



Fig. 4-6-1 各 Gab タンパク質の構造

第1項 変異型 Gab2-3-300 キメラタンパク質の発現プラスミドの構築

1、Gab2-3-300のS211A変異部分の構築

Gab2-3-300の211番のセリンをコードするCAGコドンを、アラニンをコードするCGCコドンに置換するプライマーを設計する。

Fig. 4-6-2 のように、pBOS-HA-Gab2 をテンプレートに用い、PCR を行った。 その際、SF-1450 と Gab2-S211A-R、Gab2-S211A-F と Gab2-N-R の組み合わせ、 Taq polymerase を用いて PCR を行い、2 つの Gab2-S211A のバンドの増幅を行 った。その後、agarose ゲル電気泳動を用いて展開後、切り出しを行い、フェ ノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2 つの DNA 断片を回収し、 全体 15 μ 1 中の 1 μ 1 ずつを取って混合し、SF-1450 と Gab2-N-R を用いた PCR を行い、Gab2-S211A 変異部分の DNA 断片を増幅した。この DNA 断片を sequence 用プラスミド pUC-18 の Pst I と Eco I 部位にコロニーングし、青白選択法で選 択した菌株のプラスミドを回収し、Pst I で処理し、電気泳動し、断片の長さ によって、プラスミドを確認する。選んったプラスミドを sequence して塩基 配列を確認する。(Fig. 4-6-3) 正確な塩基配列を持つプラスミドを一つ選ん で、Gab2-3-300 キメラタンパク質発現プラスミドの構築を行う。



Fig. 4-6-2 sequence 用 Gab2-S211A の変異部分の構築方法



sequenceしてDNA配列を確認する



Fig. 4-6-3 sequence 用 pUC-18-Gab2-S211A を Pst I 或いは EcoR I で処理して、バンドが 一本で長さが 3482bp の方は目的の PCR 断片である。赤い矢印が示しているのは Pst I と EcoR I で処理した pUC-18 である。

<u>2、Gab2-3-300-S211Aの発現プラスミドの構築</u>

Fig. 4-6-4のように、一つの pBOS-Gab2-3-300-Flag を Apal I と Bgl II で、 もう一つの pBOS-Gab2-3-300-Flag を EcoR I と Apal I で、pUC-18 を Bgl II と EcoR I で処理して、必要な DNA 断片を回収し、Ligation して、 pBOS-Gab2-3-300-S211A-Flag を得られた。

菌株のプラスミドを回収し、Apa I、Bg1 Ⅱと EcoR I で処理し、電気泳動し、 断片の長さによって、プラスミドを確認する。(Fig. 4-6-5)



Fig. 4-6-4 pBOS-Gab2-3-300-S211A-Flag の構築方法



Fig. 4-6-5 pBOS-Gab2-300-S211A を Apa I (7067bp)、Bg1 II (6092 bp+975 bp)と Xho I (6284 bp+783 bp)で処理して、断片の長さを確認する。

<u>第2項 COS-7 でタンパク質の発現の確認</u>

COS-7 細胞へ、pBOS-Gab2-3-300-S211A-Flag を各 5 µ g 相当トランスフェク ションし、ウエスタンブロットを行った。Gab2-3-300-S211A タンパク質(Fig. 4-6-6)が発現できる事を確認した。



Fig. 4-6-6 Gab2-3-300-S211A タンパク質の発現の確認

第3項 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当のNsi I で消化した pBOS-Gab2-3-300-S211A-Flag と選択マーカ ーとして 1 μ g 相当の EcoR I で消化した puromycin 耐性遺伝子を含んでいるプ ラスミドを用い、GM-I62-1 細胞へエレクトロポレーション法により導入した。 その後、puromycin 耐性で選択し、安定発現株の樹立を行った。1×10⁶cel1s 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用 いて Gab2-3-300-S211A タンパク質 (Fig. 4-6-7)の発現量を、ウエスタンブロ ットを行い、ECL により検討した。以後の実験は GM-Gab2-3-300-S211A 2-E-6 を用いて行うことを決めた。



Fig. 4-6-7 Gab2-3-300-S211A タンパク質の発現量の確認

第4項 Gab2-3-300-S211A タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び

核の形態変化

1、Gab2-3-300-S211A タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 と Gab2-3-300 発現 細胞は3日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されて いる事がわかった。一方で、Gab2-3-300-S211A 発現細胞は G-CSF 存在下で増 殖を続け、分化が阻害されている事がわかった。factor free の場合はどの細 胞も数日で死滅した。(Fig. 4-6-8)



Fig. 4-6-8 Gab2-3-300-S211A タンパク質発現株における増殖曲線

2、Gab2-3 キメラタンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライトーギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。

IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわかる。

親細胞の GM-I62-1 と Gab2-3-300 発現細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。Gab2-3-300-S211A は増殖が 止まりませんが、13 日目で大量の分葉化が見られた。(Fig. 4-6-9)



Fig. 4-6-9 Gab2-3-300-S211A タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のGM-I62-1とGab2-3-300 発現細胞では2つ以上に断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球 への分化が誘導された事がわかった。一方で、Gab2-3-300-S211A発現細胞発 現細胞では、分葉化した核を持つ細胞も60%以上となり、好中球への分化が 誘導された事がわかった。(Fig. 4-6-10)Gab2-3-300タンパク質については、 もっと詳しい研究が必要である。



Fig. 4-6-10 Gab2-3-300-S211A タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

第7節 Gab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞の再調査

ずっと培養し続けた Gab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞の Gab2-3-300 発 現量が少ないから、好中球分化への影響が出られなかった可能性があると考え、 Gab2-3-300 タンパク質の過剰発現の好中球分化への影響を再検討した。

第1項 Gab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞 stock を取り出し

以前作成した Gab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞 stock をおこし、安定した後、1×10⁶cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用いて Gab2-3-300 タンパク質 (Fig. 4-7-1)の発現量を、ウエスタンブロットを行い、ECL により検討した。その結果、ずっと使っているGab2-3-300 タンパク質過剰発現細胞の Gab2-3-300 発現量が下がっていたことが判明した。新しく出した stock の発現量はその 4 倍であることがわかった。



第2項 Gab2-3-300 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形

態変化の再調査

1、Gab2-3-300 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

細胞の濃度が 1×10⁶cel1/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、元の Gab2-3-300 発現細胞は3日ほど 増殖を続けた後、増殖が止まり、ライト-ギムザ染色し顕微鏡下で核の形態を 観察し、分葉化が見られ、好中球への分化が誘導されている事がわかった。一 方で、新しく取り出した Gab2-3-300 発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続ける が、分葉化が見られ、分化がある程度で阻害されている事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。(Fig. 4-7-2)



Fig. 4-7-2 Gab2-3-300 タンパク質発現株における増殖曲線

2、Gab2-3-300 タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

親細胞の GM-I62-1 と Gab2-3-300 発現細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。Gab2-3-300 は増殖が止まりませんが、13 日目で大量の分葉化が見られた。(Fig. 4-7-3)



Fig. 4-7-3 Gab2-3-300 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると元のGab2-3-300細胞は親細胞のGM-I62-1では2つ以上に断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。一方で、新しく起こしたGab2-3-300発現細胞では、分葉化核を持つ細胞が80%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。(Fig. 4-7-4)



Fig. 4-7-4 Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ Gab2-3-300の過剰発現によって、好中球前駆細胞は G-CSF 刺激で増殖が止 まらないことにもかかわらず、分葉化が促進した。

以前行った Gab3、Gab2-3-200、Gab2-3-300、Gab2-3-300-S211A に関する実 験結果をまとめた結果、Gab3 の 300 番アミノ酸から後ろの部分を持つタンパ ク質が好中球前駆細胞に過剰発現する場合、G-CSF で刺激後増殖が止まらなく なった。この部分からのシグナルが細胞の G-CSF で刺激後の増殖に関係ある可 能性があることが考えられる。一方で、Gab2 の 300 番アミノ酸より前の部分 を持つタンパク質が好中球前駆細胞に過剰発現する場合、G-CSF で刺激後増殖 に関係なく分葉化した。この部分からのシグナルが細胞の G-CSF で刺激後の分 葉化に関係ある可能性があることが考えられる。(Fig. 4-7-5)



Fig. 4-7-5 各過剰発現株における G-CSF 刺激後増殖と核の形態変化のまとめ

Gab2のチロシン残基がリン酸化すると、Shp2の結合が促進され、Ras/MAPK 経路が活性化される。一方で、Ras/MAPK 経路の下流で活性化される RSK 介す る Gab2のセリン残基リン酸化は Shp2の SHP2 への結合と Shp2 依存的な Ras/MAPK シグナル伝達を抑制するとの報告がある(Fig. 4-8-1)^[22]。Gab2の RSK にリン酸化される Ser の位置には、Gab3 では Ser がないと報告されている。 したがって、Ser 残基のリン酸化による negative feedback を受けないことが 示唆される。Gab3の相当する部位にはセリンがないので、Gab3 は Shp2 と結合 し続け、Ras/MAPK 経路が活性化し続けることは Gab3の過剰発現が好中球分化 を阻害する原因かもしれない。Gab3の過剰発現細胞が G-CSF 刺激後細胞内の MAPK 経路が持続的強い活性化も見られる可能性が高い(第10節を参考)。そ こで、Gab3の SHP2 との結合部位を変異させ、変異型 Gab3 を好中球前駆細胞 で過剰発現させ、好中球分化への影響を調べた。



Fig. 4-8-1 Gab2 のシグナル伝達と Gab2 の RSK 介する負のフィードバック^[22]

第1項 Gab3FF タンパク質の発現プラスミドの構築

Gab3FFはGab3の542番と569番のチロシンをフェニルアラニンに置換する 変異型Gab3タンパク質である。

1、Gab3FF の変異部分の構築

Gab3 の 542 番と 569 番のチロシンをコードする TAT コドンを、フェニルア ラニンをコードする TTT コドンに置換するプライマーを設計する。

Fig. 4-8-2 のように、542 番のチロシンをフェニルアラニンに置換するに 当たって、pBOS-Gab3-Flag をテンプレートに用い、PCR を行った。その際、 Gab3-Y416F-R と Gab2-Y542F-R、Gab2-Y542F-F と Bos-A2 の組み合わせ、Taq polymerase を用いて PCR を行い、2 つの Gab3 の DNA 断片の増幅を行った。そ の後、agarose ゲル電気泳動を用いて展開後、きりだしを行い、フェノール/ クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2 つの DNA 断片を回収し、15 μ 1 の 1 μ 1 ずつを取って混合し、Gab3-Y416F-R と Bos-A2 を用いた PCR を行い、Gab3 変異部分の DNA 断片を増幅した。569 番のチロシンをフェニルアラニンに置換 するに当たって、Gab3 変異部分の DNA 断片をテンプレートに用い、PCR を行っ た。その際、Gab3-Y416F-R と Gab2-Y569F-R、Gab2-Y569F-F と Bos-A2 の組み 合わせ、Taq polymerase を用いて PCR を行い、2 つの Gab3 の DNA 断片の増幅 を行った。その後、agarose ゲル電気泳動を用いて展開後、きりだしを行い、 フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2 つの DNA 断片を回収 し、15 μ 1 の 1 μ 1 ずつを取って混合し、Gab3-Y416F-R と Bos-A2 を用いた PCR を行い、Gab3FF 変異部分の DNA 断片を増幅した。

この DNA 断片を sequence 用プラスミド pBS II KS (+) に Pst I と Xba I を用い てクロニーングし、青白選択法で選択した菌株のプラスミドを回収し、Pst I 又は Xba I で処理し、電気泳動し、断片の長さによって、プラスミドを確認す る。選択したプラスミドの塩基配列を確認する。(Fig. 4-8-3) 正確な塩基配 列を持つプラスミドを一つ選んで、Gab3FF タンパク質発現プラスミドの構築 を行った。



Fig. 4-8-2 sequence 用 Gab3FF の変異部分の構築方法

Pst I 又はXba I で処理して確認する											
т (1239000000000000000000000000000000000000	Т239000000000000000000000000000000000000										
Pst I で処理	Xba I で処理										
Pst I で処理 sequence してDN	Xba I で処理 A配列を確認す <u>ろ</u>										
Pst I で処理 sequence してDN Gab3 AgcagaAgtectctttctttegacAAA Gab3FF AscagaAgtectcttttcttegacAAA	Xba I で処理 A配列を確認する BAATTCAGCTTGGATTATTTGGCCCTGGACTTC BAATTCAGCTTGGATTTTTGGCCCTGGACTTC										
Pst I で処理 sequence してDN Gab3 Agcagaagtectctttcttregacaaa Gab3FF Ascagaagtectctttcttregacaaa Gab3 AATTCAACATCACCAGCCCCTGTACA Gab3FF AATTCAACATCACCAGCCCCTGTACA	Xba I で処理 A配列を確認する заааттсадсттадаттаттадоссстадастт заааттсадосттадаттаттадоссстадастто заадааасттостостттоадаадаадсадаадаат заадаааасттосостттоадаадаадсадаадат										

Fig. 4-8-3 sequence 用 pBS II KS (+)-Gab3FF を Pst I 或いは EcoR I で処理して、バンド が一本で長さが 3482bp の方は目的の PCR 断片である。

2、Gab3FFの発現プラスミドの構築

Fig. 4-8-4 のように、一つの pBOS-Gab3-Flag を EcoR I と Xho I で、もう一 つの pBOS- Gab3-Flag を EcoR I と Xba I で、 pBS II KS (+)-Gab3FF を Xho I と Xba I で処理して、必要な DNA 断片を回収し、Ligation して、 pBOS-Gab3FF-Flag を得た。

菌株のプラスミドを回収し、Xba I、EcoR I と Xho I で処理し、電気泳動し、 断片の長さによって、プラスミドを確認する。(Fig. 4-8-5)



Fig. 4-8-4 pBOS-Gab3FFの構築方法



Fig. 4-8-5 pBOS-Gab3FFを Xba I (7058bp)、EcoR I (7058 bp)と Xho I (5479 bp+1579 bp) で処理して、断片の長さを確認する。

第2項 COS-7 でタンパク質の発現の確認

COS-7 細胞へ、pBOS-Gab3FF-Flag を各 5 µg 相当トランスフェクションし、 ウエスタンブロットを行った。Gab3FF タンパク質(Fig. 4-8-6)が発現できる 事を確認した。



Fig. 4-8-6 COS7 細胞で Gab3FF タンパク質の発現の確認

第3項 前駆細胞 GM-I62-1 に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当の ApaL I で消化した pBOS-Gab3FF-Flag と選択マーカーとして1 μg 相当の EcoR I で消化した puromycin 耐性遺伝子をを含んでいるプラスミド を用い、GM-I62-1 細胞へエレクトロポレーション法により導入した。その後、 puromycin 耐性で選択し、安定発現株 (GM-Gab3FF)の樹立を行った。 RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した 1×10⁶ cells 相当の細胞より調製した細胞 抽出液を用いて Gab3FF タンパク質 (Fig. 4-8-7)の発現量を、ウエスタンブロ ットを行い、ECL により検討した。以後の実験は GM-Gab3FF 1-E-8 を用いて行 うことを決めた。



Fig. 4-8-7 Gab3FF タンパク質の発現量の確認

<u>第4項</u> Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変 ...

<u>化</u>

1、Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

増殖曲線を調べるために、サイトカイン依存の細胞の増殖をトリパンブル 一染色で調べた。細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育 が悪くなるので、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中に IL-3 も G-CSF も加えない。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 細胞は5日ほど増 殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。 一方で、Gab3 過剰発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続け、分化が阻害された が、Gab3FF 発現細胞は3日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への 分化が誘導された事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅 した。(Fig. 4-8-8)



Fig. 4-8-8 Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現株における増殖曲線

2、Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の GM-I62-1 細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見 られた。一方で、Gab3 発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかった が、Gab3FF 発現細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大 量の分葉化が見られた。(Fig. 4-8-9)



Fig. 4-8-9 Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のGM-I62-1では2つ以上に 断片化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事 がわかった。一方で、Gab3発現細胞はG-CSF存在下でも、ほとんどの細胞の 核の分葉化が見られなかったが、Gab3FF発現細胞では、2つ以上に断片化した 核を持つ細胞が80%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。 (Fig. 4-8-10) Gab3の好中球分化への阻害作用はSHP2との結合部位の変異に よって消えたことがわかった。



Fig. 4-8-10 Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

したがって、Gab3 の過剰発現による好中球分化誘導に対する阻害作用は Gab3-SHP2 結合により誘起される Ras-MAPK シグナル伝達経路の活性化による ことが示唆された。

第1項 Flag タグを付加する Gab2 プラスミドの構築

Flag-tag をつけた Gab2 と内在性の Gab2 及び Flag-tag 付きの Gab3 の量比 を算出するために、Flag-tag 付きの Gab2 発現プラスミド、pBOS-Gab2 プラス ミドを構築する。Fig. 4-9-1 のように、pBOS-Flag をテンプレートに用い、PCR を行った。その際、SF-1450 と BOS-A2 の組み合わせ、Taq polymerase を用い て PCR を行い、Flag のバンドの増幅を行った。増幅された断片とプラスミド pBOS-HA-Gab2 を Sph I と Kpn I で処理し、agarose を用いて展開後、必要な DNA 断片を切り出し、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、2 つの DNA 断片を回収し、混合して ligation を行った。



Fig. 4-9-1 Flag タグを持つ pBOS-Flag-Gab2 プラスミドの構築方法

Ligation でできたプラスミドを大腸菌にコロニーングし、Amp 耐性菌株を 回収し、DNA を抽出する。DNA を酵素で処理し、0.7%agarose in TAE で電気泳 動して、正しい DNA 断片が結合している事を確認し、pET-Flag-Gab2 が得られ た。(Fig. 4-9-2)





Sph I で確認(7273bp)



Fig. 4-9-2 pBOS-Flag-Gab2 を Kpn I (左) と Sph I (右) で処理して、断片の長さから 決定する結果、1、2、4、6、7、13 のプラスミドは目的プラスミドである。

pBOS-Flag-Gab2 をテンプレートに用い、PCR を行った。その際、M13-reverse

と BOS-Flag-rev の組み合わせ、Taq polymerase を用いて PCR を行い、Flag のバンドの増幅を行った。agarose を用いて展開後、必要な DNA 断片を切り出 し、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿し、DNA 断片を回収し、 agarose 電気泳動で確認した。Flag が成功に入れたプラスミドのみ増幅される ので、バンドを見えるプラスミドが目的プラスミドである(Fig. 4-9-3)



Fig. 4-9-3 pBOS-Flag-Gab2を テンプレートし PCR を行い、増幅された断片から決定す る結果、1、2、4、6、7、13のプラスミドは目的プラスミドである。

第2項 COS-7 にプラスミドの導入

2 枚の 10cm のシャーレで COS-7 細胞へ、それぞれ pBOS-Flag-Gab2(7.5 μ g) に加え、発現させ、1×10⁷cel1s/100 μ 1 の可溶化液を入れ、可溶化し調節した 細胞抽出液を抗 Flag 抗体、抗 Gab3 抗体と抗 Gab2 抗体を用いてウエスタンブ ロットを行った。プラスミドを transfection した COS-7 細胞では、プラスミ ドにコードされたタンパク質が発現されている事を確認した。(Fig. 4-9-4)



Fig. 4-9-4 pBOS-Flag-Gab2 タンパク質の発現の確認

<u>第3項 GM-I62-1 細胞の内在性 Gab2 の量と GM-Gab3 細胞の外来性 Gab3-Flag</u>

の相対比

Flag-Gab2 を発現した COS7 細胞抽出液 2µ1、3µ1、4µ1、5µ1、6µ1、 8µ1 をそれぞれ電気泳動し、抗 Flag 抗体、抗 Gab3 抗体と抗 Gab2 抗体を用い てウエスタンブロットを行った (Fig. 4-9-5)。抗 Flag 抗体と抗 Gab2 抗体バン ドの濃さで検量線を作成した(Fig. 4-9-6)。検量線を使い、同じ量で電気泳動 した GM-I62-1、GM-Gab3-Flag、GM-Gab3FF-Flag 細胞抽出液のバンドの濃さか ら換算し、Gab3-Flag と Gab3FF-Flag タンパク質の発現量が野生型 GM-I62-1 の Gab3 及び各細胞内の内在性 Gab2 との比例がわかった。GM-Gab3 では、過剰 発現した Gab3-Flag は内在性 Gab2 とほぼ同量で、内在性 Gab3 の 10 倍で発現 している。GM-Gab3FF では、過剰発現した Gab3FF は内在性 Gab2 とほぼ同量で、 内在性 Gab3 の 15 倍で発現している(Fig. 4-9-7)。



 Fig. 4-9-5 COS-Flag-Gab2 細胞抽出液 2μ1、3μ1、4μ1、5μ1、6μ1、8μ1と同じ量の GM、GM-Gab3-Flag、GM-Gab3FF-Flag 細胞抽出液をそれぞれ電気泳動し、抗 Flag 抗体、抗 Gab3 抗体と抗 Gab2 抗体を用いて行ったウエスタンブロット。



Fig. 4-9-6 抗 Flag 抗体と抗 Gab2 抗体バンドの濃さで作成した検量線

	野生型Gab2	野生型Gab3	Gab3-Flag	Gab3FF-F1ag
GM-162-1	1.00	0.11		
GM-Gab3	1.11	0.10	1.07	
GM-Gab3FF	1.56	0.09		1.47
		((GM−I62−1の野生型	塱Gab2を1として)

Fig. 4-9-7 各細胞株での Gab2、Gab3、Gab3FF タンパク質の相対発現量

第10節 各発現株における細胞内他のシグナル伝達因子のリン酸化及び Gab

タンパク質とSHP2との結合

第1項 各発現株における MAPK のリン酸化

Gab2 が G-CSF 刺激依存にチロシン残基がリン酸化されるので、GM-I62-1、 GM-Gab3、GM-Gab3FF、GM-Gab2-3-200、GM-Gab2-3-300、GM-Gab2-3-300-S211A、 LGM-1 Y4-1 及び LGM-Y4-Gab3 の 150u/ml G-CSF 刺激 5 分及び三日間における MAPK リン酸化の様子を、抗リン酸化 MAPK 抗体を用いて western blot で解析 した。

その結果、親細胞の GM-I62-1 では、未刺激に対して、150U/ml G-CSF で 5 分間刺激すると、GM-Gab2-3-300 と LGM-1 Y4-1 以外の細胞の MAPK の強いリン 酸化が検出された。3日後、ほとんどの細胞の MAPK が脱リン酸化したが、 GM-Gab3 と GM-Gab2-3-300-S211A 細胞の MAPK 強いリン酸化がまだ検出された。 GM-Gab3 で好中球への分化が阻害されたのは G-CSF 存在下の培養で、MAPK の活 性が高いことに関与する可能性が考えられた。

一方で、刺激 5 分 LGM-1 Y4-1 の MAPK リン酸化にはほとんど見られなかったが、3 日後強いリン酸化がまだ検出された。(Fig. 4-10-1)



 Fig. 4-10-1 各細胞株における G-CSF で刺激 5 分及び三日間における MAPK リン酸化の様子

第2項 G-CSF 刺激後 GM-Gab3、GM-Gab3FF の Gab2、Gab3 のリン酸化と SHP2

の結合の経時変化の比較

GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞抽出液を抗 Gab2 抗体及び抗 Gab3 抗体を用いてそれぞれ Gab タンパク質の免疫沈降を行った。その後、抗 SHP2 抗体、抗リン酸化チロシン抗体(4G10)と抗 Gab 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞内 Gab タンパク質と SHP2 との結合状況を検討した。

Fig. 4-10-2 によって、GM-I62-1 では、SHP2 は Gab2 と結合したが、35min 後には離れた。Gab2 もリン酸化されたが、5min 後には脱リン酸化した。GM-Gab3 では、Gab3 は大量の SHP2 と長時間で結合することが検出させた。Gab3 も長時間で強くリン酸化していた。Gab3 と内在性 Gab2 が競合するため、内在性 Gab2 のチロシンリン酸化が低下していた。そのため、Gab2 のンリン酸化及び SHP2 の Gab2 への結合がともに低下していた。一方で、GM-Gab3FF では、Gab3FF と SHP2 と結合しなかったし、Gab3FF 自身もほとんどリン酸化されなかった。



Fig. 4-10-2 GM-Gab3、GM-Gab3FF の細胞内 Gab タンパク質と SHP2 との結合状況及びリン酸化 状況

第3項 主要な Gab タンパク質に結合する及び他の解析

GM-I62-1の細胞抽出液は抗 Gab2 抗体を、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞抽出 液は抗 Gab3 抗体を用いてそれぞれ Gab タンパク質の免疫沈降を行った。その 後、抗 p85 抗体、抗 SHP2 抗体、と抗 Gab 抗体を用いてウエスタンブロットを 行い、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞内 Gab2 又は Gab3 タンパク質と p85 及び SHP2 との結合状況を検討した。

1.2×10⁶cells 相当の GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FF の細胞抽出液は抗 SHP2 抗体、抗リン酸化 MAPK 抗体、抗 MAPK 抗体、抗リン酸化 STAT5 抗体、抗 STAT5 抗体、抗リン酸化 STAT3 (Try705) 抗体、抗リン酸化 STAT3 (Ser727) 抗体、抗 STAT3 抗体と抗 Gab 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、GM-I62-1、GM-Gab3、 GM-Gab3FF の細胞内 Gab タンパク質と p85 及び SHP2 との結合状況及び各シグ ナル伝達因子のリン酸化状況を検討した。

GM-I62-1 では、Gab2 と SHP2 は G-CSF に刺激された後大量の SHP2 と結合し

たが、35min 後には離れた。Gab2 と p85 との結合はほとんど見えなかった。MAPK もリン酸化された後 35min 後には脱リン酸化したことが見られた。 一方で、 GM-Gab3 では、Gab3 は大量の SHP2 も p85 もより長時間にわたって結合するこ とが検出された。 MAPK の長時間にわたり強くリン酸化も検出された。両細胞 の STAT3 と STAT5 のリン酸化は大きな違いが見られなかった。一方で、 GM-Gab3FF では、Gab3FF と p85 も SHP2 も結合しなかった。STAT3 がリン酸化 されたが、他の細胞株より弱く、Tyr705 が Ser727 よりリン酸化された。 STAT5 のリン酸化も他の細胞株よりかなり弱い。(Fig. 4-10-3)



Fig. 4-10-3 GM-I62-1, GM-Gab3、GM-Gab3FF の細胞内 Gab タンパク質と p85 及び SHP2 との結 合状況及びシグナル伝達因子のリン酸化状況

以上の結果から、親株 GM-I62-1 と比べて、Gab3 の過剰発現により、G-CSF 依存の SHP2 の Gab タンパク質への結合がより長く続き、それに伴い MAPK の活 性化もより長く続くことが明らかになった。

第11節 MAPK 抑制剤によって、Gab3 過剰発現細胞の分化阻害の回復

上皮細胞増殖因子で刺激した時、Gab2のチロシン残基がリン酸化されると、 Shp2のGab2への結合が促進され、Ras/MAPK経路が活性化される。一方で、MAPK の下流で活性化されるRSKを介するGab2のセリン残基リン酸化はShp2の結合 とShp2依存的なシグナル伝達を抑制する。(Fig. 4-11-1)Gab2とGab3のア ミノ酸配列を比較すると、Gab2のRSKにリン酸化されるSerの位置には、Gab3 ではSerがないと報告されている。Gab3の相当する部位にはセリンがないの で、Shp2と結合し続け、Ras/MAPK経路が活性化し続けることはGab3の過剰発 現が好中球分化を阻害する原因かもしれない。Gab3の過剰発現細胞がG-CSF 刺激後細胞内のMAPK経路が持続的強い活性化も見られた。そこで、 Ras-Raf-MEK-MAPK経路の抑制剤を用いてMAPK活性を低く抑えることで、Gab3 の過剰発現細胞での好中球分化阻害を回復できるかどうかを調べた。



Fig. 4-11-1 Gab2 のシグナル伝達と Gab2 の RSK 介する負のフィードバック

第1項 MAPK 抑制剤の効果について

MEK の阻害剤である PD98059 と U0126 の効果を調べた。PD98059 と U0126 は DMS0 で溶ける。DMS0 は培地中での濃度が 1%以上になると、細胞の増殖に影響 が出る。そこで、事前で試薬を必要濃度の 200 倍の DMS0 溶液を作り、G-CSF で刺激する 30min 前に、培地の 1/200 の体積 (DMS0 の終濃度が 0.5%) で各リン 酸化抑制剤を加える。

DMS0、PD98059 が G-CSF で刺激した 5 分後の MAPK リン酸化に影響が少なかった、U0126 は強く抑制した。(Fig. 4-11-2)



GM-Gab3

Fig. 4-11-2 G-CSF 誘導した各 MAPK 抑制剤存在下 GM-Gab3 細胞内の MAPK のリン酸化状況 と GM-Gab3 細胞増殖曲線。

培地に DMSO、PD98059 を加え、培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養する場合、GM-Gab3 は未分化のまま増殖が続けた。培地に 10 μ M U0126 を加える場合、増殖が野生型 GM-I62-1 のように、3 日ほど続けた後止まった。25 μ M U0126 存在下では、G-CSF 含有培地で細胞は増殖しなかった。以後の実験は 10 μ M U0126 で行うことを決定した。(Fig. 4-11-2)

第2項 10 µ M U0126 を加える場合 MAPK のリン酸化状況と GM-Gab3 の増殖と

<u>分化に対する効果</u>

1、10µM U0126 を加える場合 MAPK のリン酸化状況

U0126 は DMS0 で溶ける。DMS0 は培地中での濃度が 1%より高くなると、細胞 が死亡する。事前で、必要濃度の 200 倍の DMS0 溶液を作り、G-CSF で刺激す る 30min 前に、培地の 1/200 の体積で DMS0 又は U0126 の DMS0 溶液を加える (DMS0 の倍地中の終濃度を 0.5%にする)。

 100μ M U0126 は MAPK 完全に抑制した。 10μ M U0126 は MAPK 半分程度で抑制した。DMS0 は MAPK に影響がないこともわかった。Akt の 473 番のセリンの リン酸化と Gab3 のチロシンリン酸化はほとんど影響されなかった。U0126 は MAPK を特異的に抑制することがわかった。(Fig. 4-11-3)



Fig. 4-11-3 10 μ M U0126 存在下 GM-Gab3 細胞内の MAPK のリン酸化状況 (8×10⁵cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞より調製した細胞抽出液を用いてウエスタンブロットを行い、ECL により検討した)

2、10μM U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中 に IL-3 も G-CSF も加えない。DMSO と 10 μ M U0126 は誘導開始後 1 日目に培地 に加える。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、Gab3 発現細胞と DMSO を添加した培地 での培養では Gab3 発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続け、分化が阻害された が、 10μ M U0126 を添加した培養の Gab3 発現細胞は 8 日ほど増殖を続けた後、 増殖が止まり、好中球への分化が誘導されたと考えた。factor free の場合は どの細胞も数日で死滅した。(Fig. 4-11-4)



Fig. 4-11-4 10 μ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現株における増殖曲線 (DMSO と 10 μ M U0126 は誘導開始 1 日後に培地に加える)

3、10 µ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

G-CSF存在下、Gab3発現細胞とDMS0添加培地で培養した Gab3発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかった。一方で、10μM U0126添加培地で培養した Gab3発現細胞は10日目以後核の分葉化が見られた。(Fig. 4-11-5)



Fig. 4-11-5 10 µ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、核の分葉化の度合から好中球への 分化の程度を判定した。細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。

Gab3 発現細胞と DMS0 培養の Gab3 発現細胞は G-CSF 存在下でも、ほとんどの細胞の核の分葉化が見られなかった。一方で、10 µ M U0126 培養の Gab3 発現細胞では、2 つ以上に断片化した核を持つ細胞が 40%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。(Fig. 4-11-6)



Fig. 4-11-6 10 µ M U0126 存在下 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

Ras-MEK-MAPK 経路の抑制剤が Gab3 の過剰発現細胞の分化阻害を回復できることがわかった。

第1項 各種 32D 細胞の G-CSF 依存的な分化の検討

1、Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

32D 細胞は G-CSF 添加により細胞周期停止ならびにそれに引き続く成熟顆 粒球への分化が誘導される骨髄系前駆細胞株である。好中球の分化に関する研 究でよく使われている。

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるので、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中に IL-3 も G-CSF も加えない。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養した 32D 細胞は増殖し続けた。 何種類の血清で作った培地で実験を行ったが、好中球へ分化しないため(Date not show)、親細胞として使うことが不適用と判断した。32D-Gab3 と 32D-Gab3FF の G-CSF での培養実験を中止した(Fig. 4-12-1)



Fig. 4-12-1 Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現株における増殖曲線

2、Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライトーギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。

IL-3存在下では、32Dは球状の核を持ち、未分化の状態である事がわかる。 32D-Gab3は実験中止し細胞が廃棄されたため、IL-3存在下の核の分葉化を観察しなかった。

培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の 32D と 32D-Gab3 発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかった。(Fig. 4-12-2)



Fig. 4-12-2 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化

細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2つに断片化した核、3つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。 親細胞の 32D と 32D-Gab3 発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなか った。32D-Gab3FF は 8 日目で中止したため、核の分葉化は観察しなかった。 (Fig. 4-12-3) 培地から IL-3を除き、G-CSF を添加して培養した 32D 細胞は 増殖し続け、好中球へ分化しないため、親細胞として使うことが不適用と判断 した。



Fig. 4-12-3 Gab3 タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ

第2項 L-G細胞の G-CSF 依存的な分化の検討

1、L-G細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化

L-G細胞は IL-3 依存性マウス骨髄細胞株であり、G-CSF の刺激により増殖 停止し好中球への分化が誘導されることが報告された。

細胞の濃度が 1×10⁶cell/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。RPMI 10%FBS 中にサ イトカイン IL-3 が培地中の濃度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free が培地中に IL-3 も G-CSF も加えない。

L-G細胞は IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の L-G細胞は 8 日ほど増殖を続 けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。細胞をライト-ギムザ染色して、顕 微鏡下で核の形態を観察した。IL-3 存在下では、L-G細胞は球状の核を持ち、 未分化の状態である事がわかる。G-CSF 存在下、L-G細胞は 13 日目で大量の分 葉化が見られた。(Fig. 4-12-4)

Gab3及びGab3FFの過剰発現がG-CSF依存な好中球分化への影響を調べるための親細胞として使うことが可能である。



Fig. 4-12-4 野生型 L-G における増殖曲線と核の形態変化

2、前駆細胞 L-G に導入し安定発現株の樹立

 $40 \mu g$ 相当の ApaL I で消化して線状になった pBOS-Gab3 及び pBOS-Gab3FF-Flag 発現プラスミドと $1 \mu g$ 相当のEcoR I で消化した選択マーカ ーの puromycin 耐性遺伝子発現プラスミドを用い、L-G 細胞へエレクトロポレ ーション法により導入した。その後、puromycin 耐性で選択し、安定発現株の 樹立を行った。 1×10^6 cells 相当の RPMI (10%FBS, IL-3) 培地で培養した細胞よ り調製した細胞抽出液を用いて Gab3 及び Gab3FF タンパク質 (Fig. 4-12-5)の 発現量を、ウエスタンブロットを行い、ECL により検討した。発現量が一番高 いの LG-Gab3 2-E-6 と LG-Gab3FF 2-E-8 を用いて以降の実験を行った。



Fig. 4-12-5 Gab3 及び Gab3FF タンパク質の発現量の確認

3、Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線及び核の形態変化

(1) Gab3FF タンパク質発現細胞の G-CSF 依存の増殖曲線

Gab3FFはGab3の542番と569番のチロシンをフェニルアラニンに置換する 変異型Gab3タンパク質である。

細胞の濃度が 1×10⁶cel1/ml を大きく超えると、細胞の生育が悪くなるの で、この濃度を超えないように細胞を希釈して測定した。IL-3 が培地中の濃 度が 45 u/ml で、 G-CSF が培地中の濃度が 150u/ml で、factor free では培地 中に IL-3 も G-CSF も加えないで培養した。

どの細胞も IL-3 存在下では、未分化のまま増殖が続いた。培地から IL-3 を除き、G-CSF を添加して培養すると、親細胞の L-G 細胞は 8 日ほど増殖を続 けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導されている事がわかった。一方 で、Gab3 発現細胞は G-CSF 存在下で増殖を続け、分化が阻害されたが、Gab3FF 発現細胞は 6 日ほど増殖を続けた後、増殖が止まり、好中球への分化が誘導に 影響がない事がわかった。factor free の場合はどの細胞も数日で死滅した。 (Fig. 4-12-6)



Fig. 4-12-6 Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現株における増殖曲線

(2) Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化

これらの細胞をライト-ギムザ染色して、顕微鏡下で核の形態を観察した。 IL-3存在下では、どの細胞も球状の核を持ち、未分化の状態である事がわ かる。

親細胞の L-G 細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、13 日目で、さらに大量の分葉化が見られた。一方で、Gab3 発現細胞では、核の分葉化がほとんど見られなかったが、Gab3FF 発現細胞は 10 日目から核の分葉化が見られ、Gab3FF 発現細胞は 13 日目には細胞が大量死亡で観察できなかった。 MAPK 経路の活性化は細胞生存にも関わっていると言われている。Gab3FF の過剰発現量が多ければ多いほど、IL-3 で培養する場合細胞の増殖が遅いこと及び G-CSF で培養する場合細胞が死にやすいのは、細胞内の MAPK 経路の活性化が細胞の増殖 と生存と関与していることと一致している。(Fig. 4-12-7)



Fig. 4-12-7 Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化 細胞の核の形態においで、球状の核、桿状の核、2 つに断片化した核、3 つ 以上に断片化した核を持つ細胞の数を数え、好中球への分化の程度を判定した。 細胞の総数 200 個以上を数えた。

どの細胞でも、IL-3存在下ではほとんどの細胞が球状の核を持っていた。 一方、G-CSF存在下で13日間培養すると親細胞のL-Gでは2つ以上に断片 化した核を持つ細胞が60%以上となり、好中球への分化が誘導された事がわ かった。一方で、Gab3発現細胞はG-CSF存在下でも、ほとんどの細胞の核の 分葉化が見られなかったが、Gab3FF発現細胞では、分葉化した細胞が60%以 上となり、好中球への分化が誘導された事がわかった。(Fig. 4-12-8)



Fig. 4-12-8 Gab3 及び Gab3FF タンパク質発現株における核の形態変化のまとめ
 以上の結果から、Gab3 の過剰発現が好中球分化への阻害と Gab3 の SHP2 結
 合部位の変異によってその好中球への分化誘導の阻害から回復したことを
 GM-I₆₂-1 細胞だけではなく L-G 細胞においでも再現できた。

第13節 各発現株における細胞内 Lyn のリン酸化及び Gab タンパク質と Lyn

の結合

G-CSF 刺激依存の Gab2-SHP2 介する Src キナーゼ Lyn の活性が好中球の分化 に重要な役割があるとの報告があります。^[29] 以前の結論によると、Gab3 過剰 発現細胞では、Gab3 が SHP2 と結合し続けるなら、Lyn もリン酸化され続き、 好中球の分化を促進するはずだが、Gab3 過剰発現細胞の好中球への分化が阻 害された。この矛盾を解明するため、GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FF 細胞内 のLyn リン酸化の様子及びLyn と Gab タンパク質との結合を解析する必要があ ります。

第1項 Lyn 抑制剤を加える場合 Lyn のリン酸化状況

Lyn 抑制剤は DMSO で溶ける。DMSO は培地中での濃度が 1%より高くなると、 細胞が死亡する。事前で、必要濃度の 1000 倍の DMSO 溶液を作り、G-CSF で刺 激する 30min 前に、培地の 1/1000 の体積で DMSO 又は Lyn 抑制剤の DMSO 溶液 を加える (DMSO の倍地中の終濃度を 0.1%にする)。

Src キナーゼ抑制剤 PP1、PP2 は Lyn のリン酸化を強く抑制したが、Gab2 の リン酸化及び Gab2 と SHP2 との結合に影響がないことがわかった。(Fig. 4-13-1)

	total							IP:Gab2 antibody									
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PP1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
PP2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
Piceatanno	- 1	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
G-CSF	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
p-Lyn (抗p-Lyn抗体)		-	20	17	1	-			=								
Lyn (抗Lyn抗体)			-	-		-			i.								
рҮ (4G10)	-	-	11	-	-	-	1			10					13		Gab2
SHP2 (抗SHP2抗体)	-	-	-	-	~	-	-	-	•	-	•	•	•	-	•	-	
Gab2 (抗Gab2抗体)	-		-	łi.	-	ŝ	-				è						
β-actin (抗β-actin抗体)	-	~	-	-	-	-	-	-									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	



Fig. 4-13-1 Lyn 抑制剤存在下各細胞内の Lyn、Gab2、Gab3 のリン酸化状況及び Gab2 と SHP2 の結合状況

<u>合</u>

GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞抽出液を、抗Lyn 抗体を用いて免疫 沈降を行った。その後、抗 p-Lyn 抗体、抗 Lyn 抗体、と抗 Gab 抗体を用いてウ エスタンブロットを行い、GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FF 細胞内の Lyn リン 酸化の様子及び Lyn と Gab タンパク質との結合状況を検討した。

Fig. 4-13-2 によって、G-CSF で刺激した後、GM-I62-1 では、Lyn がすぐリ ン酸化され、10min後まだ強くリン酸化されていたが、GM-Gab3とGab3FF では、 Lyn のリン酸化がほとんど見えません。内在性 Gab2 が Lyn と結合したが、Gab3 は Lyn と結合しなかった。



IP:抗Lyn抗体

第2項 各発現株における Lyn のリン酸化及び Lyn と Gab タンパク質との結

Fig. 4-13-2 GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞内Lyn リン酸化状況及びGab タンパク質 とLyn との結合状況
Fig. 4-13-3 によって、G-CSF で刺激した後、GM-Gab3 では、Gab3 が強くリン酸化されたが、Lyn のリン酸化がほとんど見えません。Gab3 のリン酸化がLyn のリン酸化との関連性がないと思われます。



Total

Fig. 4-13-3 GM-I62-1、GM-Gab3、GM-Gab3FFの細胞内 Lyn リン酸化状況及びリン酸化状況

以上をまとめると、G-CSFで刺激した後、GM-I62-1では、Gab2がリン酸化 され、SHP2と結合して、その相互作用がLynをリン酸化し、好中球の分化誘 導が促進された。GM-Gab3では、Gab3が強くリン酸化され、SHP2と結合して いたが、その相互作用がLynをリン酸化しない、一方でGab2がリン酸化が抑 制され、Gab3がSHP2と長時間強く結合しているため、SHP2がGab2と結合で きないので、好中球の分化誘導が阻害された。GM-Gab3FFでは、GM-Gab3FFは SHP2と結合しないため、Gab2のリン酸化が低下しているが、SHP2と結合でき、 その相互作用がLynをリン酸化し、好中球の分化誘導が促進された。

第五章総結及び今後の展望

G-CSF 刺激による好中球分化誘導のシグナル伝達反応における Gab2 の働き を明らかにするために、Gab2 と構造が類似した Gab3 に注目し好中球前駆細胞 GM-I62-1 に Gab3 を過剰発現させる事により、Gab2 の作用を抑制した時の好中 球への分化誘導への影響を解析した。Gab3 の過剰発現細胞 GM-Gab3 を樹立し、 G-CSF 存在下での好中球への分化誘導への影響を解析したところ、GM-Gab3 細 胞は G-CSF を含む培地の中で増殖停止が見られず、成熟好中球特有の核の分葉 化も見られなかった。したがって、Gab3 過剰発現により G-CSF 依存の好中球 への分化誘導の阻害が見られた。

Gab2 を主に発現している親細胞は G-CSF 依存に好中球への分化が誘導され たが、Gab3及び Gab2-3-200発現細胞では、分化誘導が阻害された。Gab2-3-300 発現細胞では、分葉化したが、増殖が止まらなかったから、分化誘導がある程 度で阻害された。4番目のチロシンがフェニルアラニンに入れ替わり、リン酸 化できない G-CSF 受容体を発現している好中球前駆細胞である前駆細胞 LGM-Y4 では、Gab3の過剰発現はG-CSF 依存の好中球の分化を阻害できなかっ た。Gab3の過剰発現により G-CSF 依存の好中球の分化阻害には G-CSF 受容体 の細胞質内の四番目のチロシン残基は必要であることが明らかになった。受容 体の四番目のチロシンを介する Gab2 のチロシンリン酸化が誘導され、Gab3 の 過剰発現は Gab2 と競合し、Gab2 のチロシンリン酸化を抑制するので、通常の G-CSF 依存の好中球分化は Gab2 を介するシグナル伝達が必要で、Gab3 の過剰 発現はこれを抑制すると考えられる。Gab3 過剰発現細胞 GM-Gab3 では、G-CSF 刺激により Gab3 がチロシンリン酸化をうけ、一方で Gab2 のチロシンリン酸化 は抑制された。したがって、G-CSF 刺激によるシグナル伝達反応において過剰 発現したGab3がGab2のリン酸化を競合的に抑制している事が明らかになった。 一方で、Gab2を過剰発現している細胞はG-CSF 依存に好中球への分化が誘導 されたので、Gab2の過剰発現はG-CSF 依存に好中球への分化に影響がないこ とがわかった。Gab3 過剰発現細胞に過剰発現した Gab3 は Gab2 と競合し、G-CSF 受容体の細胞質内の四番目のチロシン残基と shc-Grb2 介して結合し、シグナ ルを伝達し、好中球への分化を阻害することと考えられる。

他の研究グループによる他の細胞を用いた研究により、EGF 刺激による Gab2 のチロシンリン酸化にともなう SHP2 の Gab2 への結合は、SHP2 の下流で働く Ras-MAPK-RSK 又は RSK 以外のリン酸化酵素による Gab2 の Ser (又は Thr)残基 のリン酸化により、ネガテイブフィードバックを受ける事が報告された。Gab2 と Gab3 のアミノ酸配列、特に 200 番以後のアミノ酸配列を比較すると、Gab3 には Gab2 で RSK によりリン酸化を受ける Ser 残基 (RxxPS/T) が存在しない事か ら、Gab3 のチロシンリン酸化はネガテイブフィードバックを受けない事が予 想された。これを確認するために、Gab2 を主に発現する親株 GM-I62-1 と Gab3 過剰発現により、Gab3 が主に働き、Gab2 のリン酸化が抑制される GM-Gab3 細 胞において、G-CSF 刺激による Gab2、Gab3 のチロシンリン酸化の経時変化、 チロシンリン酸化による Gab2、Gab3 への SHP2 の結合の経時変化、および Gab2 又は Gab3 への SHP2 の結合により活性化される Ras-MAPK 経路の MAPK のリン酸 化の経時変化を解析した。Gab2 を主に発現する親株の GM-I62-1 細胞では、 G-CSF 刺激による一時的な Gab2 のチロシンリン酸化、SHP2 の Gab2 への結合し、 その下流で働く MAPK の一時的なリン酸化(活性化)が見られ、20 分後にはこ れらの反応の低下が見られた。したがって Gab2 を介するシグナル伝達反応に ネガテイブフィードバック機構が働いている事が明らかになった。一方で Gab3 を過剰発現した GM-Gab3 細胞では、G-CSF 刺激依存に継続した Gab3 のチ ロシンリン酸化、継続した SHP2 の Gab3 への結合、継続した MAPK のリン酸化 が見られた。一方で、Gab2-STAT3(-)、Gab2-PI3K(-)および Gab3-PI3K(-)発現 細胞では、分化誘導が阻害されなかったため、MAPK 経路の異常な活性化だけ が分化誘導の阻害に関与していると考えられる。以上の結果から、Gab3 過剰 発現による GM-Gab3 細胞での G-CSF 依存の好中球への分化誘導の阻害は Gab3 タンパク質のチロシンリン酸化のネガテイブフィードバック機構の欠除によ る、継続した MAPK の活性化による事が示唆された。

この事を確かめるために Gab3 の SHP2 結合部位に変異を導入した Gab3FF 遺 伝子を構築し、GM-I62-1 細胞で過剰発現させ、Gab3 を介する SHP2-Ras-MAPK 経路の活性化が起こらない細胞株 GM-Gab3FF を樹立し、G-CSF 刺激による好中 球への分化における影響で調べた。GM-Gab3FF 細胞では、G-CSF 刺激による GM-Gab3FF (又は内在性の少量の Gab3 への) SHP2 の結合が見られなかった。 さらに、GM-Gab3FF 細胞では G-CSF 刺激による継続した MAPK のリン酸化も見 られず、低下した一時的なリン酸化が観察された。さらに GM-Gab3FF 細胞では、 野生型 Gab3 の過剰発現により見られた G-CSF 依存の好中球への分化誘導阻害 が見られず、親株 GM-I62-1 細胞と同様に G-CSF による好中球への分化誘導 された。したがって、Gab3 過剰発現による G-CSF 依存の好中球への分化誘導 の阻害は Gab2 によって見られた一過性の MAPK の活性化とは異なり Gab3 を介 するシグナルによる継続した MAPK の活性化による事が示唆された。

さらに、この事を示すために、好中球への分化誘導が阻害された GM-Gab3 細胞において阻害剤により MAPK を部分的に阻害する事で、再び G-CSF 依存の 好中球への分化能が回復するかを調べた。分化が阻害される Gab3 過剰発現細 胞 GM-Gab3 を、MAPK の上流の MEK の阻害剤 U0126 存在下で、G-CSF 含有培地で 培養したところ、分化時に見られる増殖の停止と核の分葉化が再び観察され、 MEK 阻害剤により MAPK を阻害することで GM-Gab3 の G-CSF 依存の好中球への 分化能が回復する事が示された。

以上の現象が好中球前駆細胞 GM-I62-1 細胞にだけの特有の事ではない事を 示すために、他の好中球前駆細胞 L-G においても Gab3 過剰発現細胞 LG-Gab3、 及び、Gab3 を通した MAPK の活性化が起こらない SHP2 結合部位変異型 Gab3 (Gab3FF) の過剰発現細胞 LG-Gab3FF を樹立し、G-CSF 依存の好中球への分 化誘導を調べた結果、GM-I62-1 細胞の時と同様に、野生型 Gab3 過剰発現細胞 LG-Gab3 では G-CSF 依存の好中球への分化誘導が阻害されたが、LG-Gab3FF 細 胞ではその阻害が見られず、成熟好中球への分化誘導が観察された。

以上の結果から、好中球前駆細胞中の Gab2 は G-CSF 刺激により一時的に SHP2-Ras-MAPK シグナル経路を活性化させるが、その後の MAPK の活性化を低 下される事が G-CSF 依存の好中球分化誘導に必要である事が明らかになった。 このネガテイブフィードバック機構を持たない Gab3 が過剰に存在すると、 G-CSF 依存に継続した MAPK の活性化がおこり、好中球への分化が阻害された。

今まで行った実験では、好中球へ分化するかどうかを判断する基準は、増

殖停止および核の分葉化だが、今後の研究では、遺伝子レベルの検査も必要で ある。一方で、MAPKの持続的な活性化している前駆細胞は単球へ分化しやす い傾向が見られることが報告されたので^[26]、好中球への分化が阻害された細 胞株は単球へ分化したかどうかことも検討すべきだと思っている。

第六章 参考文献

- 1. 大島泰郎. 生化学辞典. 東京化学同人, 第4版, ISBN-10: 4807906704, ISBN-13: 978-4807906703.
- 2. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis. 細胞の分子生物学. ニ ュートンプレス,第5版, ISBN: 978-4-315-51867-2
- 3. 杉本 恒明. 内科学. 朝倉書店, 第9版, ISBN-10: 4254322305, ISBN-13: 978-4254322309.
- 小川聡, 伊藤裕, 三嶋理晃, 三森経世, 山本和利, 塩沢昌英, 井廻道夫, 大田健, 小澤敬也, 後藤元, 祖父江元, 千葉勉, 花房俊昭, 伴信太郎, 藤田敏郎. 内科学書. 中山書店, 改訂第8版, ISBN-10: 4521737757, ISBN-13: 978-4521737751
- 5. 内山卓,浅野茂隆,池田康夫. 三輪 血液病学. 文光堂,第3版. ISBN-10: 4830614196, ISBN-13: 978-4830614194.
- 6. 日本検査血液学会.スタンダード検査血液学,医歯薬出版第3版,ISBN-10: 4263226712, ISBN-13: 978-4263226711
- 7. 江川真由美, 烏山一. 好塩基球研究のアップデート. 実験化学, 第 30 巻第 6 号, 2012 年, 905-911 頁.
- Barbara A. Nichols, Dorothy Ford Bainton, and Marilyn G. Farquhar. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. J Cell Biol. 1971 Aug 1; 50(2): 498-515.
- Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. Immunobiology, 5th edition. New York and London: Garland Science. ISBN-10: 0-8153-3642-X.
- 10. 宮島篤,北村俊雄,新井直子. サイトカインの分子生物学. 羊土社. ISBN-10: 4897063124, ISBN-13: 978-4897063126
- 11. パタゴニア. The copyright free images by FujiMan Production (Japan). 20101213
- 12. 平位秀世. 好中球分化異常と疾患. 臨床血液. 2013 年 54 巻 10 号. p. 1573-1584
- Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. Curr Opin Hematol. 2002 May;9(3):183-9.
- 14. Clifford Liongue, Craig Wright, Aaron P. Russell, Alister C. Warda. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: Stimulating granulopoiesis and much more. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41 (2009) 2372-2375
- 15. Athanasia D. Panopoulos, Stephanie S. Watowich. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. Cytokine 42 (2008) 277-288
- Wöhrle FU, Daly RJ, Brummer T. Function, regulation and pathological roles of the Gab/DOS docking proteins. Cell Commun Signal. 2009 Sep 8;7:22. doi: 10.1186/1478-811X-7-22.

- Yan Liu, Larry R. Rohrschneider. The gift of Gab. FEBS Letters 515 (2002) 1-7
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. Science. 1994 Nov 18;266(5188):1241-7.
- 19. Gabriella Sa ´rmay, Adrienn Angyal, A ´ kos Kerte ´sz, Ma ´te ´ Maus, Da ´vid Medgyesi. The multiple function of Grb2 associated binder (Gab)adaptor/scaffolding protein in immune cell signaling. Immunology Letters 104 (2006) 76-82
- 20. Haihua Gu and Benjamin G. Neel. The 'Gab' in signal transduction. TRENDS in Cell Biology Vol.13 No.3 March 2003
- 21. Sarah J. Adams, Iraz T. Aydin, Julide Tok Celebi. GAB2--a scaffolding protein in cancer. Mol Cancer Res. 2012 Oct;10(10):1265-70.
- 22. Xiaocui Zhang, a Genevieve Lavoie, a Loic Fort, a Edward L. Huttlin, b, c Joseph Tcherkezian, a Jacob A. Galan, a Haihua Gu, d Steven P. Gygi, b, c Sebastien Carreno, a, e Philippe P. Rouxa, e. Gab2 Phosphorylation by RSK Inhibits Shp2 Recruitment and Cell Motility. Mol Cell Biol. 2013 Apr; 33 (8):1657-70.
- 23. 河野俊一郎. G-CSF 依存のシグナル伝達におけるアダプタータンパク質 Gab の機能解析.未発表.
- 24. 宮脇亜希子. G-CSF 刺激依存のシグナル伝達における Akt タンパク質の機能解析. 未発表.
- 25. 出口雅子. 好中球分化誘導のシグナル伝達における Gab アダプタータンパ ク質の機能解析. 未発表.
- 26. Hu N, Qiu Y, Dong F. Role of Erk1/2 signaling in the regulation of neutrophil versus monocyte development in response to G-CSF and M-CSF. J Biol Chem. 2015 Oct 2;290(40):24561-73
- 27. Shuang Ni, Chunmei Zhao, Gen-Sheng Feng, Robert F. Paulson, Pamela H. Correll. A Novel Stat3 Binding Motif in Gab2 Mediates Transformation of Primary Hematopoietic Cells by the Stk/Ron Receptor Tyrosine Kinase in Response to Friend Virus Infection. Molecular and Cellular Biology Apr 2007, 27 (10) 3708-3715
- 28. Xiaocui Zhang 1, Genevieve Lavoie, Loic Fort, Edward L Huttlin, Joseph Tcherkezian, Jacob A Galan, Haihua Gu, Steven P Gygi, Sebastien Carreno, Philippe P Roux. Gab2 phosphorylation by RSK inhibits Shp2 recruitment and cell motility. Mol Cell Biol. 2013 Apr;33(8):1657-70.
- 29. Muneyoshi Futami, Quan-sheng Zhu, Zakary L. Whichard, Ling Xia, Yuehai Ke, Benjamin G. Neel, Gen-Sheng Feng, and Seth J. Corey. G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase. Blood. 2011 Jul 28; 118(4): 1077–1086.