



Title	血球細胞特異的に発現するM-DOCK蛋白の機能の解析
Author(s)	西原, 広史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第4655号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151337
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51582
Type	doctoral thesis
File Information	000000336527.pdf



①

血球細胞特異的に発現する

M-DOCK蛋白の機能の解析

Analysis of Hematopoietic Cell Specific Protein, M-DOCK

西原 広史

Hiroshi Nishihara

北海道大学・大学院医学研究科
脳科学専攻・分子細胞病理学

Laboratory of Molecular & Cellular Pathology,
Center of Neurological Science,
Hokkaido University Graduate School of Medicine

血球細胞特異的に発現する M-DOCK 蛋白の機能の解析

西原 広史

Analysis of Hematopoietic Cell Specific Protein, M-DOCK.

Hiroshi Nishihara

Laboratory of Molecular & Cellular Pathology, Center of Neurological Science,
Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

Abstract

Full length cDNA of M-DOCK was isolated at Kazusa DNA Institute and its sequence has been deposited as KIAA0209. The cDNA sequence of M-DOCK contained a 5490 bp open reading frame that encodes a 1830-aa protein with a calculated molecular mass of 212 kDa. The amino acid sequence of M-DOCK shows 62.3 % identity with DOCK180 when the carboxyl terminal variable regions were omitted. DOCK180, which was originally identified as a major protein bound to Crk oncogene product, is an archetype of a family of proteins including Ced-5 of *C. elegans* and Mbc of *D. melanogaster*. DOCK180 localizes at focal adhesions and regulates cell morphology through the activation of Rac. Expression of DOCK180 is ubiquitous except hematopoietic cells. Here, we report on the characterization of M-DOCK protein, which is closely related to DOCK180 and expressed only in the hematopoietic cells. We immunized rabbits with bacterially-expressed GST-M-DOCK protein, and obtained an anti-sera specific to M-DOCK. Tissue distribution of M-DOCK was examined by Northern blotting and Western blotting. M-DOCK was expressed abundantly in peripheral blood leukocytes. When cell lines were analyzed, M-DOCK expression was detected in cells derived from T-cells, B-cells, and monocytes, but never in the adherent cells. Most of the lymphocytes and macrophages in human organ expressed M-DOCK diffusely in the cytoplasm analyzed by immunohistochemistry using anti-M-DOCK antibody. We previously reported that membrane-targeted form of DOCK180 induced spreading of NIH 3T3 cells. By contrast, overexpression of M-DOCK rounded up flat NRK cells. This suggests that M-DOCK may regulate cell detachment of adherent cells. These results demonstrate that M-DOCK is a new member of DOCK180-family proteins and regulates cell shape in suspension cells.

緒言

DOCK180 は、アダプター分子 Crk の SH3 領域に結合する蛋白として同定され¹⁾、その機能は p130^{Cas}-Crk 複合体を介する focal adhesion からのシグナル伝達に関与することがわかっている²⁾。さらに、DOCK180 は Rac1 と結合し、活性化することで focal contact から細胞骨格へのシグナルを伝達していることが報告された³⁾。

DOCK180 の相同蛋白で既にその機能が解明されているものには、*D. melanogaster* の Mbc、*C. elegans* の Ced-5 があり、これらは DOCK180 を archetype として一つのファミリーを形成している⁴⁾。ショウジョウバエでは、Mbc の変異体において、細胞骨格の再構築を基盤とする myoblast fusion 及び上皮細胞の遊走が見られなくなる⁵⁾。さらに、Mbc は Rac を活性化することで細胞骨格の制御を担っている、という報告もされている⁶⁾。線虫では、Ced-5 の変異で、アポトーシスに陥った細胞の貪食が阻害され、また distal tip cell (DTC) の遊走が見られなくなることがわかっており⁴⁾、Ced-5 もまた細胞骨格の制御に関して重要な役割を担っている。

ヒトにおける DOCK180 の相同蛋白は、データベース検索にて少なくとも 3 つが確認された。骨髓芽球 (Myeloblast) 由来の KG-1 細胞からクローニングされた KIAA0209 (GenBank/EMBL/DDBJ, D86964)、脳から分離された KIAA0299 (AB002297)、そしてリンパ芽球から分離された GS034D21 である。すなわち、ヒトにおいては少なくとも 4 つの DOCK ファミリー蛋白の存在が認められる。しかしながら、これまで DOCK180 以外のものについてはその機能、性質について全く報告されていない。本研究ではこのうち、KIAA0209 について解析したので、その発現特異性及び機能について報告する。尚、以下 KIAA0209 は M-DOCK と呼称する。

材料と方法

1. Sequence analysis

cDNA の sequence は, Clustal W によって解析されたデータを用いた⁷⁾.

2. Plasmids

KIAA0209 の cDNA は, かずさ DNA 研究所、野村博士より御供与頂いた⁸⁾. これを本実験で使用するに際し, N 末に Flag tag を付けた全長の cDNA を pCXN2 発現ベクター⁹⁾に組み込んで用いた. CrkII, pCAGGS-CrkII, DOCK180, pCAGGS-DOCK180 の発現ベクターは, 松田らが作製したものを用いた^{10) 1)}. pCAGGS-EGFP は, pEGFP (Clontech) の enhanced green fluorescent protein の coding region を PCR にて増幅し, それを pCAGGS 発現ベクターに組み込んで作製した.

3. 抗体

M-DOCK の C 末となる 1644 番から 1830 番のアミノ酸に相当する部位を PCR で増幅し, pGEX4T (Pharmacia Biotech) に組み込んで, 大腸菌にて GST-tag recombinant protein を作製. これを glutathion sepharose にて精製後, ウサギに免疫して, 抗 M-DOCK ウサギ血清を作製した. またこの抗血清を, GST-M-DOCK affinity column にて精製して, 抗 M-DOCK ポリクローナル抗体として用いた. 抗 DOCK180 ポリクローナル抗体及び抗 Crk 3A8 モノクローナル抗体は, 松田らが作製したものを使用した^{1) 11)}. Flag tag に対する M5 抗体は Eastman Kodak 社から, また, 抗 Crk モノクローナル抗体は Transduction Lab 社からそれぞれ購入した.

4. 細胞

293T 細胞 (human embryonal kidney cell) 及び NRK (Normal rat kidney) 細胞は, 非働化した 10%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて培養を行った. ヒト T 細胞由来 Jurkat 細胞, ヒト B 細胞由来 Ramos 細胞, 及びヒト単球由来 THP-1 細胞は, それぞれ非働化した 10%ウシ胎児血清を添加した RPMI1640 にて培養を行った.

5. 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト剖検標本を用いて, 各組織の免疫染色

を行った。切片は、1% BSA で preincubate 後、精製した抗 M-DOCK ポリクローナル抗体で 37℃, 1 時間 incubate. 二次抗体には peroxidase 標識抗ウサギ抗体を用いて、DAB にて発色させた。

6. DNA トランスフェクション、免疫沈降と Western blot.

pCXN2-CrkII と pCXN2-Flag-DOCK180 ないし pCXN2-Flag-M-DOCK を、リン酸カルシウム法を用いて 293T 細胞にトランスフェクトし、48 時間後に溶解バッファー (10 mM Tris-hydrochloride, pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 50 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 5 ug/ml aprotinin, 1 mM PMSF) で細胞を溶解した。回収した細胞溶解液を 15,000 rpm にて 10 分遠心後、上清を各種ウサギ抗体と protein A-Sepharose を用いて免疫沈降を行った。ビーズに結合した蛋白は、SDS-PAGE にて分離し、抗 Flag M5 抗体及び抗 CrkII 抗体にて Western blotting を行った。二次抗体には peroxidase 標識抗ウサギ及び抗マウス抗体を用い、ECL chemiluminescence system (Amersham) にてバンドを検出した。

7. マイクロインジェクション法

Fibronectin でコートした glass dish に NRK 細胞を 80% confluent となるように撒いて、16 時間後にマイクロインジェクション装置 (Carl Zeiss, Germany) にて、圧 400 hPa, 0.1 秒のコンディションで pEGFP と共に各 cDNA 発現ベクターを核内に導入した。細胞はインジェクション後 5 時間から 30 分おきに、confocal laser microscopy (Carl Zeiss) で観察した。

8. THP-1 細胞の Phorbol ester 刺激

浮遊状態で培養した THP-1 細胞を、刺激 12 時間前に 6 well dish に 2.5×10^5 /well の濃度で撒き、TPA を最終濃度 10 ng/ml となるように注入して 24 時間後に細胞を回収した。Negative control には DMSO を用いた。浮遊状態のままの細胞は、遠心して沈殿させてから細胞を溶解し、dish に付着したものはそのまま溶解液を注入した。回収した細胞溶解液は総蛋白量定量後、SDS-PAGE にて分離し、抗 M-DOCK 抗体を用いた Western blotting にて内因性 M-DOCK 蛋白の発現を調べた。また、抗 M-DOCK 抗体と protein A-

Sepharose を用いた免疫沈降法にてビーズに結合した M-DOCK 蛋白も同時に検出した。尚、用いた TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate/Phorbol 12-myristate 13-acetate) は SIGMA 社から購入し、DMSO を溶媒として 100 ug/ml の保存溶液にして用いた。

2. M-DOCK のヒト組織における発現分布

M-DOCK mRNA の発現を Northern blotting にて解析した。Fig. 2 に示されるように、7.4 kb のバンドが末梢血白血球で最も強く認められ、骨髄、脾臓、腎臓で発現が見られる。また非常に発現は弱いが、小腸及び大腸でも M-DOCK mRNA の発現が確認された。一方 DOCK180 は、末梢血白血球以外の組織で普遍的に発現しており、M-DOCK の発現は DOCK180 に対して特異的である。また DOCK180 との相同性が低いヒト組織に比較して、M-DOCK 抗体を用いて、次亜腎の細胞株での M-DOCK 発現を Western blotting にて確認した (Fig. 3)。初代、M-DOCK の発現が認められる Jurkat 細胞、Ramos 細胞、TNP-1 細胞で認められたが、白血病細胞株 329T 細胞には認められなかった。逆に DOCK180 は全ての細胞株で発現が認められ、血球系では発現が非常に強く、次亜腎細胞株においても M-DOCK と DOCK180 の発現は特異的であることが示された。なお、Fig. 2 に示していないが、細胞株での Northern blotting でも発現が確認された。

結果

1. DOCK ファミリー蛋白の相同性の比較

M-DOCK の cDNA は全長 5,490 bp, 1,830 アミノ酸をコードし, 計算上 212 kDa の蛋白を発現する. アミノ酸配列で, C 末の可変領域を除くと archetype である DOCK180 に対して 62.3% と高い同一性を持つ. ファミリーを形成する他の相同蛋白との比較では, DOCK180, M-DOCK, Ced-5, Mbc はいずれも N 末に SH3 領域を持つ. しかし, 同じファミリーに属する KIAA0299, GS034D21, DocA には SH3 領域は見られず (Fig.1A), 相同性のある他の領域の意義に関しては更なる検討が必要である. Fig.1B に全長のアミノ酸配列がわかっている 6 種の蛋白の sequence を示した. 全ての蛋白に相同領域が見られる一方, 特に C 末領域ではほぼ相同性が失われている. 結果, DOCK180 において認められた Crk 結合部位は他の 3 種類のヒト DOCK family 蛋白では見られない. また, 系統樹では M-DOCK は最も DOCK180 に近い相同蛋白であることが示される (Fig.1C). そして, KIAA0299 と GS034D21 は別のサブファミリーを形成していることが予想される.

2. M-DOCK のヒト組織における発現分布

M-DOCK mRNA の発現を Northern blotting にて解析した. Fig.2 に見られるように, 7.4 kb のバンドが末梢血白血球で最も強く認められ, 続いて胸腺, 脾臓で発現が見られる. また非常に程度は弱い, 小腸及び大腸でも M-DOCK mRNA の発現が確認された. 一方 DOCK180 は, 末梢血白血球以外の組織で普遍的に発現しており, M-DOCK の発現は DOCK180 に対して相補的と言える. また, DOCK180 との相同性が低い C 末領域に対して作成した抗 M-DOCK 抗体を用いて, 数種類の細胞株での M-DOCK 蛋白の発現を Western blotting にて検索した (Fig.3). 結果, M-DOCK の発現は, 血球系である Jurkat 細胞, Ramos 細胞, THP-1 細胞で認められたが, 上皮系である 293T 細胞には認められなかった. 逆に DOCK180 蛋白の発現は 293T 細胞に認められ, 血球細胞では発現していない. 従って, これら細胞株においても M-DOCK と DOCK180 の発現は相補的であることが示された. なお, データは示していないが, 細胞株での Northern blotting でも同様の結果を得てい

る。

3. ヒト各臓器における抗 M-DOCK 抗体を用いた組織免疫染色

さらに詳細な組織特異性を確認するために、抗 M-DOCK ポリクローナル抗体を用いて、各種組織の免疫染色を施行した (Fig.4)。結果、心臓、肝臓、肺では、心筋細胞、肝細胞、肺胞上皮細胞及び各臓器の間質支持細胞には M-DOCK の発現は認められない。しかし、間質内のマクロファージ、肺胞マクロファージは M-DOCK 陽性であった。また扁桃の免疫染色でも、濾胞を構成するリンパ球は M-DOCK 強陽性であった (Fig.4)。

4. M-DOCK と Crk の結合

最近、DOCK180 が Crk-p130^{cas} 複合体を介して focal contact からのシグナル伝達に関与していることが報告された²⁾。Crk, p130^{cas} とともに普遍的な発現を示すことから^{10) 12) 13)}、M-DOCK は浮遊系の細胞において DOCK180 と同様の機能を持つことが予想された。そこで、M-DOCK と Crk との *in vivo* で結合の有無について実験を行った。CrkII と DOCK180 ないし M-DOCK を強制発現させた 293T 細胞の溶解液を、抗 Crk モノクローナル抗体にて免疫沈降した (Fig.5)。結果、DOCK180 はこれまでの報告通り CrkII と共沈したが、M-DOCK と CrkII との結合は認められなかった。Jurkat 細胞においても同様に、CrkII と M-DOCK の結合は認められなかった (data not shown)。

5. M-DOCK 強制発現による NRK 細胞の形態変化

M-DOCK のもつ生理機能を解析するために、通常 M-DOCK を発現していない NRK 細胞に、マイクロインジェクションによって M-DOCK を強制発現させて細胞に及ぼす影響を検討した。通常 NRK 細胞に cDNA を導入すると、50%以上の細胞で目的蛋白の発現が認められが、予備実験の段階で、導入後 24 時間の時点で極少数の細胞しか M-DOCK を発現していない、という結果を得た (data not shown)。M-DOCK の発現が、細胞を dish から解離させたことが想定されたため、cDNA インジェクション後の細胞の形態変化を経時的に観察した。M-DOCK 蛋白発現の標識として、GFP 発現ベクターを同時に導入した。インジェクション後 5 時間から観察を開始し、30 分おきに 22 時間まで行った。5 時間の時点では GFP を発色している細胞は認められな

ったが (Fig.6C), その16時間後の22時間の時点では多数のGFP発現細胞が認められ, しかもそれらは, 球形を呈していた (Fig.6D). なかには dish から離れた細胞も確認された. ちなみに, negative controlとしてGFP発現ベクターのみを導入した細胞および, DOCK180を導入した細胞ではそのような球形細胞の出現は認められなかった (Fig.6A, 6B). 従ってM-DOCKはNRK細胞において, 細胞を基質から剥離させる機能をもつことが示された.

ところで, 内因性M-DOCKを発現している単球由来のTHP-1細胞は, phorbol esterで刺激により分化し, 形態が変化してdishに接着することが知られている¹⁴⁾. NRK細胞でのM-DOCKの強制発現が細胞の形態変化を引き起こすことから, THP-1細胞における形態変化がM-DOCKの発現に及ぼす影響の有無について検討した (Fig.7). 結果, TPA刺激前後の細胞溶解液を用いたWestern blottingを行ったところ, M-DOCK蛋白の発現量に差は認められなかった. 尚, 抗リン酸化チロシン抗体を用いたWestern blottingで, 刺激後のM-DOCKのチロシンリン酸化は認められないことを確認した (data not shown).

考察

DOCK ファミリーを構成する蛋白は線虫からヒトまで種を越えて広く保存されている (Fig.1). またヒトにおいては, DOCK ファミリー蛋白は archetype となる DOCK180 以外にこれまで少なくとも 3 種類の存在が報告されており, このことは生物の進化の過程で, DOCK ファミリーのもつ機能が細分化されたことを示唆している. DOCK180 は, Crk の SH3 領域と結合し, また Rac を介して細胞骨格を制御することがわかっている^{1) 15)}. しかしその発現は付着系の細胞に限定され, 血球系で同様の機能をもつ蛋白はまだ報告されていない. ヒトの DOCK180 相同蛋白のうち, 我々は M-DOCK (KIAA0209) が骨髓芽球から分離され, また最も DOCK180 と相同性が高いことに注目し, 血球系において DOCK180 の機能を補完する蛋白であると想定し, 検討を始めた.

Northern blotting (Fig.2A) 及び, 抗 M-DOCK ポリクローナル抗体を用いた Western blotting (Fig.2B) の結果, 当初の予想通り DOCK180 と M-DOCK の発現は完全に相補的であった. すなわち, M-DOCK は血液中及び組織においても T 細胞, B 細胞, マクロファージといった浮遊系細胞にのみ発現が認められる一方, DOCK180 は付着系の細胞にのみその発現が認められた. ところで, 単球由来である THP-1 細胞は phorbol ester の刺激によってマクロファージに分化し, dish に接着する事が知られている¹⁴⁾. しかし, その際に DOCK180 の誘導や M-DOCK 発現量の変化は認められなかった (Fig.7). 従って, M-DOCK の発現は細胞の接着という現象で誘導されるのではなく, 細胞の種類によってすでに発現が決まっているものと考えられる.

DOCK180 は p130^{cas}-CrkII 複合体の下流因子として機能する事が既に証明されている⁸⁾. p130^{cas}, CrkII とともに付着系のみならず血球系においても普遍的な発現を示すことから, DOCK180 の発現していない浮遊系の細胞においては M-DOCK が CrkII と結合し, DOCK180 の機能を補完することが考えられた. しかし, 予想に反して 293T 細胞において強制発現させた M-DOCK は抗 Crk 抗体による免疫沈降で CrkII と共沈せず (Fig.4), M-DOCK は CrkII を介するシグナル伝達には関与しないことが証明された. さらにヒトにおけ

る他の2つの DOCK ファミリー蛋白である KIAA0299, GS034D21 についても sequence 上 Crk 結合領域を欠いており、それぞれ異なったシグナル伝達経路を持つことが予想される。その意味において、DOCK180 が線虫の Ced-5 の変異体で失われた2つの機能のうち、ひとつしか補完できなかった⁴⁾ということは大きな意義を持つ。つまり、Ced-5 の持つ2つの機能が、ヒトにおいては細胞の系に応じて2つの異なった DOCK ファミリー蛋白に分離された可能性がある。

最近、DOCK180 が Rac1 と結合し、また活性化する、というデータが得られている¹⁵⁾。そこで、M-DOCK についても Rac1 及び Rac2 との結合の有無を検討し、DOCK180 同様、293T 細胞において M-DOCK は Rac1, Rac2 とともに結合する、という結果を得た (data not shown)。従って、DOCK180 が細胞の形態を広げる機能をもつ¹⁾一方、M-DOCK を NRK 細胞に強制発現させると細胞が球形となって dish から離れた (Fig.6) という事実を考え合わせると、M-DOCK は Rac を介した別のシグナル伝達経路を担っている可能性があり、DOCK ファミリー蛋白の機能の分散と異なったシグナル伝達経路の存在を示唆するものである。Rac はほとんど全ての細胞において細胞の構築に重要な役割を果たしている¹⁶⁾一方で、貪食系の細胞では特異的な別の機能を持つ。Rac1 は p67-phox と結合して NADPH を介した superoxide の産生に参与する^{17) 18) 19)}。免疫不全症を起こす慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease) では、p67-phox の変異により Rac1 と結合できなくなることで貪食細胞の殺菌能が低下し、免疫不全の原因となることが判明している²⁰⁾。貪食系の細胞で Rac と M-DOCK がともに発現し、また結合するという事実は phagocytosis と何らかの関与を示唆しているのかもしれない。さらに、DOCK180 が補完出来なかった ced-5 の機能は apoptotic body の貪食であり、ヒトにおいて phagocytosis を担っているのが M-DOCK である可能性は低くない。今後、phagocytosis 及び NADPH による superoxide 産生に於ける M-DOCK の関与についての研究が興味深い対象と思われた。

結語

1. DOCK ファミリーの一員である M-DOCK は計算上、212kDa の分子量を

有する蛋白で、N 末には DOCK180 同様 SH3 構造を持つが、C 末には DOCK180 に見られる Crk 結合部位を欠き、Crk 蛋白との結合も見られない。

2. M-DOCK の発現は白血球、脾臓、胸腺に認められ、その他主要臓器には認められなかった。これは DOCK180 の分布と相補的であり、浮遊系の細胞においては M-DOCK が、付着系の細胞では DOCK180 が機能していると考えられる。

3. M-DOCK は NRK 細胞において強制発現させると、細胞の形態が球形となり、また細胞を基質から剥離させる機能をもつことが示された。

謝辞

本論文執筆にあたり、御指導、御校閲いただきました北海道大学医学部分子細胞病理学講座 長嶋和郎教授に深く謝意を表します。また、研究の機会と研究の場を提供していただきました、国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部の松田道行部長並びに、国立感染症研究所 感染病理部 倉田穀部長に心より御礼申し上げます。

文献

1. Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, and Matsuda M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the membrane. *Mol.Cell.Biol.* 16:1770-1776.
2. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kurata T, Sugimura H, and Matsuda M. (1998). Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130^{Cas} complex. *J.Biol.Chem.* 273:24479-24484.
3. Kiyokawa E, Mochizuki N, Kurata T, and Matsuda M. (1997). Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Crit.Rev.Oncog.* 8:329-342.
4. Wu YC and Horvitz HR. (1998). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180 [see comments]. *Nature* 392:501-504.
5. Erickson MS, Galletta BJ, and Abmayr SM. (1997). *Drosophila* myoblast city Encodes a Conserved Protein That Is Essential for Myoblast Fusion, Dorsal Closure, and Cytoskeletal Organization. *J.Cell Biol.* 138:589-603.
6. Nolan KM, Barrett K, Hu K-Q, Lu Y, and Settleman J. (1998). Myoblast city functions in a Rac-mediated signaling pathway during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* 12:3337-3342.
7. Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic.Acids.Res.* 22:4673-4680.
8. Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Ohira M, Kawarabayasi Y, Ohara O, Tanaka A, Kotani H, Miyajima N, and Nomura N. (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* 3:321-354.
9. Niwa H, Yamamura K, and Miyazaki J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-200.
10. Matsuda M, Tanaka S, Nagata S, Kojima A, Kurata T, and Shibuya M. (1992). Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Mol.Cell.Biol.* 12:3482-3489.
11. Matsuda M, Nagata S, Tanaka S, Nagashima K, and Kurata T. (1993). Structural requirement of the CRK SH2 region for the binding to phosphotyrosine-containing proteins: evidence from reactivity to monoclonal antibodies. *J.Biol.Chem.* 268:4441-4446.
12. Reichman CT, Mayer BJ, Keshau S, and Hanafusa H. (1992). The product of the cellular crk gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.* 3 :451-460.
13. Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y,

- and Hirai H. (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.* 13:3748-3756.
14. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, and Tada K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42:1530-1536.
 15. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, and Matsuda M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12:3331-3336.
 16. Mackay DJ and Hall A. (1998). Rho GTPases. *J.Biol.Chem.* 273:20685-20688.
 17. Abo, A., Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, and Segal AW. (1991). Activation of the NADPH Oxidase Involves the Small GTP- Binding Protein p21rac1. *Nature* 353:668-670.
 18. Faris SL, Rinckel LA, Huang J, Hong YR, and Kleinberg ME. (1998). Phagocyte NADPH oxidase p67-phox possesses a novel carboxylterminal binding site for the GTPases Rac2 and Cdc42. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 247:271-276.
 19. Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, and Hall A. (1994). Interaction of rac with p67 (phox) and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265 :531-533.
 20. Leusen JH, de KA, Hilarius PM, Ahlin A, Palmblad J, Smith CI, Diekmann D, Hall A, Verhoeven AJ, and Roos D. (1996). Disturbed interaction of p21-rac with mutated p67-phox causes chronic granulomatous disease. *J.Exp.Med.* 184:1243-1249.

Figure legend

- Fig.1 Comparison of the sequence of DOCK family proteins. A) Schematic structure of DOCK family proteins. N-terminal, and C-terminal closed box shows SH3 (Src Homology 3) region and hypervariable region, respectively. B) Alignment of the amino acid sequences of DOCK family proteins. Asterisk means identical aminoacids, and dots indicate same group of aminoacids. C) Phylogenic tree of DOCK family proteins. Number shows homology of each proteins.
- Fig.2 Northern blot analysis of M-DOCK expression. Nylon filters blotted with human mRNAs of various tissues (MTNTM I and II, CLONTECH) were hybridized with [32 P]dCTP-labeled probes of DOCK180 (bottom panel, arrow head) or M-DOCK (top panel, arrow head). lane 1, spleen; lane 2, thymus; lane 3, prostate; lane 4, testis; lane 5, ovary; lane 6, small intestine; lane 7, colon; lane 8, peripheral blood leukocyte; lane 9, heart; lane 10, brain; lane 11, placenta; lane 12, lung; lane 13, liver; lane 14, skeletal muscle; lane 15, kidney; lane 16, pancreas. The bars indicate 9.5, 7.5, 4.4, 2.4 kbp from the top.
- Fig.3 Western blot analysis of M-DOCK expression in cell lines. Total cell lysates of 293T (lane 1,5), JurkatT (lane 2,6), Ramos B (lane 3,7), and THP-1 (lane 4,8) cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblotting with antisera against DOCK180 or M-DOCK.
- Fig.4 Immunohistochemical analysis of M-DOCK in human organs. Formalin-fixed paraffin-embedded tissues of human organs were

used for the analysis. Endogenous peroxidase activity was blocked by preincubation with 1 % hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline, followed by pretreatment with microwave oven twice for 5 minutes. Specimens were incubated with anti-M-DOCK serum in PBS containing 1 % BSA, followed by the detection of the antibody by peroxidase-conjugated streptavidin-DAB readout system (DACO). Tissues and the magnifications are as follows: heart, lung, liver, and tonsil (x200 each). Arrow shows the positive staining.

Fig.5. Binding of DOCK proteins to CrkII. 293T cells were cotransfected with pCXN2-CrkII and pCXN2-Flag-DOCK180 or pCXN2-Flag-M-DOCK. Cells were lysed and immunoprecipitated with anti-Crk monoclonal antibody 3A8. Total cell lysates and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-Flag monoclonal antibody (Eastman Kodak) or anti-Crk monoclonal antibody (Transduction Lab). The arrow head indicates M-DOCK in lane 2, and DOCK180 in lane 3. Lanes 1,4; pCAGGS and pCXN2-CrkII; lane 2,5; pCXN2-Flag-M-DOCK and pCXN2-CrkII; lane 3,6; pCXN2-Flag-DOCK180 and pCXN2-CrkII.

Fig.6 Microinjection of M-DOCK cDNA into NRK cells. NRK cells were injected with pCAGGS-GFP and various expression plasmids with an automated injection system (Carl-Zeiss, Germany). From 5 hrs after injection, cells were photographed with an LSM410 confocal microscope (Carl-Zeiss) every 30 mins. The expression plasmids coinjected with pCAGGS-GFP and the incubation times until observation are as follows.

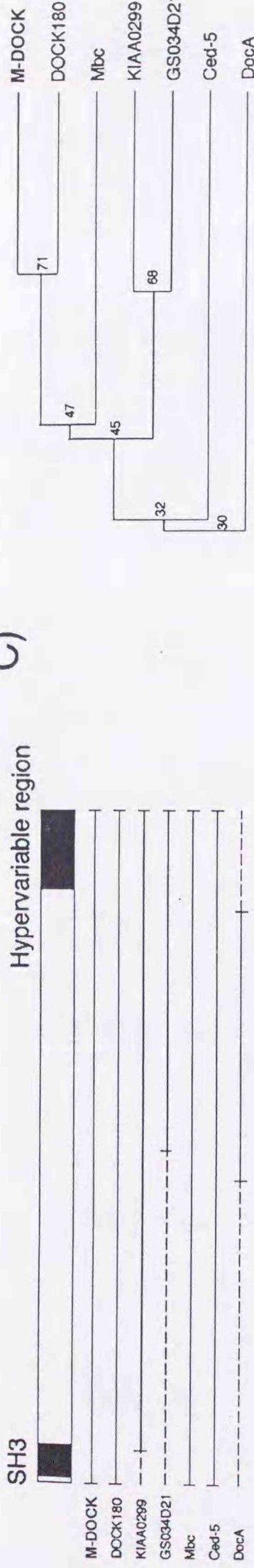
(A) vector, 22hrs; (B) pCXN2-Flag-DOCK180, 22hrs; (C) pCXN2-Flag-M-DOCK, 5hrs; (D) pCXN2-Flag-M-DOCK, 22hrs

Fig.7 M-DOCK expression level in THP-1 cells after treatment with TPA. THP-1 cells cultured in suspension (right upper panel) were treated with 10ng/ml TPA. After 24 hours, cells which adhered to dish (right lower panel) were lysed and immunoprecipitated with anti-M-DOCK antibody. DMSO was used for negative control (lane TPA(-)). Total cell lysates and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-M-DOCK antibody.

A)

Hypervariable region

C)



B)

M-DOCK	979	VLQKQ-----KVQSHNEIVSNLKKQKEDILLPVITKELKELLKQKDDMOHVLERYK-----CVLLSILELVSY-----QDAFTYHHIOEIRVOLLKRTVNRVIT-HGRDH-----ILISHFVACHTALINQMDOHVSFVIEF-QTSSELVDPLAKETTFIMFKDL	979
DOCK180	975	GLLTQ-----KLYCLIEIVHSDLEFQDCREILLPMNTDQKYHLRQRDLA-----CCOLLSHILEVLR-----KDVQRTORVHVLQKLTNRVITIS-HGRDH-----ELIGHFVACHTALINQMDOHVSFVIEF-QTSSELVDPLAKETTFIMFKDL	975
KIAA0299	864	TVHIGQSMVDVVKLQSLARTVDLSRFSSESRRILLPVVLLHHLRQKELL-----CSGILGSIFSIVKTS-----SLADVHEVEVMEVWESLDDVLLQTLTTHGRSHAOEAVRGQRCPQCTABITGBYSCLLSULLRQCDTHQHLDDNF-QSKDELKELFKKIFCVFRNL	864
mbc	14	RELTOB-----KNGAKDFEVTKLFTLPKCRALLPVFCCKHKLHLSKREIAE-----CINMHNILKLF-----SDVSGTHNDIRINILFRTVMAAHA-LDRDT-----GLVGRFKAIMLGILOMDAOHYFYVKDL-HSGELKHFVIEILLVFEEL	14
GS034D21	1000	NIVTRE-----RLNTAQIVBTRFSLISICRBL-IPCLQIALDITOIDNHATEKGFADRAACASITAAILRLERFADAKSGEGNAERLTSFILMYRPLVQAMIRVIRHDDKHT-----DDDARGHFTSVILALIDKMSQMFSEVEER-SSDIDKRDFLMEVQIRDL	1000
Mbc	982	VDEKRR-----SLSSITQSLISINISTHNEENQNNLAIKIYAFILGTARLGSVOR-----WENVNKSVTQLNKN-----FFINLYDSLQILFESRPFSDFTIT-V-POLKTLIRMTIRLEDVIFLYLBNVVPAAATATATSTLTNNNNNN	982
Ced-5	159	IG-----KNVYFGDMHNSVQNRVFLRAINKFAETNQKFLBTEPFLQNNVYHLAVAFITODLSQLEQFSHAKYKILNKYGMRLIGFSIRDMWYKLGQ-NKICFIPIKNGVPILEMTLIPHAELPKATIPITFDMLCEVORS-----GDFKPFENEIILKLD	159
DocA	1137	MK-----MSVFPFDMVYHRLTSTNLIITVQVLSALHKNFTB-TDPDFKVNYSFSLAVFIPNOLSLQLEIITSARKKILDKYGMVMAHELFSHWNQNGE-HKIHFIKNGIPGLGVTLVQPEVQANINIPFDMHMDQKORH-----RSGFQFENEIILKLD	1137
GS034D21	1021	IR-----PEMFPKDMVYHRLVANNVITVAVLSALHKNFTB-TDPDFKVNYSFSLAVFIPNOLSLQLEIITSARKKILDKYGMVMAHELFSHWNQNGE-HKIHFIKNGIPGLGVTLVQPEVQANINIPFDMHMDQKORH-----RSGFQFENEIILKLD	1021
mbc	1171	VSPHQKAVFPDMVYHRLVANNVITVAVLSALHKNFTB-TDPDFKVNYSFSLAVFIPNOLSLQLEIITSARKKILDKYGMVMAHELFSHWNQNGE-HKIHFIKNGIPGLGVTLVQPEVQANINIPFDMHMDQKORH-----RSGFQFENEIILKLD	1171
Ced-5	1177	LN-----RATFTSTKDMHILQNKVIRKSLRFTVSAVOTFFSN-DKPCVEMWRBTFVLTTSYLLKQLOFESVNPAAKAVIKTSCGSDVIRTEHARVFERVATYIKERSTFIPVLGIPVKLSISDTMDARVATKIFIPDMLESIIOTNG-----YTDLFYHTIDSLLEISTERLRNGG	1177
DocA	1140	NS-----ITITNNNNNNNNNNNDIGSSANTGCGNSLINSQSFETPTORSFVLTTSYLLKQLOFESVNPAAKAVIKTSCGSDVIRTEHARVFERVATYIKERSTFIPVLGIPVKLSISDTMDARVATKIFIPDMLESIIOTNG-----YTDLFYHTIDSLLEISTERLRNGG	1140
M-DOCK	1303	HEVEGGRGDEQYNOLLESIL-----MECAAHPTIAKTSVENFVNLVKGLLEKLLDYGVMT-----DESKDNRSCTVNLNLFYK-DNNREPMVIRVLYKLDLHDCDNYTEAATYLLHMLLKWSDQOC-ASVQVMTGQOHPOTHRQLKRTLYETIIGVDFDKGMEAEALSCKE	1303
DOCK180	1299	SHYSEKGGDESYRELFSLLTOLF-GPYPSLLEKVEQETWRTGTGTSVTVRLMERLLDYRDMKG-EETENKKIGCTVNLNLFYKSEINKPEMIRVIRKLDLHDCDNYTEAATYLLHMLLKWSDQOC-ASVQVMTGQOHPOTHRQLKRTLYETIIGVDFDKGMEAEALSCKE	1299
KIAA0299	1193	SLASEKGGDESYRELFSLLTOLF-GPYPSLLEKVEQETWRTGTGTSVTVRLMERLLDYRDMKG-EETENKKIGCTVNLNLFYKSEINKPEMIRVIRKLDLHDCDNYTEAATYLLHMLLKWSDQOC-ASVQVMTGQOHPOTHRQLKRTLYETIIGVDFDKGMEAEALSCKE	1193
GS034D21	1234	ILIGAGKGDATYKHLFTIM-----LERCAAHNTLVNVDGTAQVOMVTRMLMDLLEFRTIIO-----DESKDNRSCTVNLNLFYK-DNNREPMVIRVLYKLDLHDCDNYTEAATYLLHMLLKWSDQOC-ASVQVMTGQOHPOTHRQLKRTLYETIIGVDFDKGMEAEALSCKE	1234
mbc	1343	TNYDQHSATKGFKEHFROLS-----ITLQSGDEKELMANGRELLERIDRLLTALIEYHEVASKSLVCVSLASRVTOLMYIN-OYSHLELYKVIYKLYDLHTSYGNKIEAKTILLRHATLITDODALPOMLIRASLNRHREZLRQLKEDLMEAEAGNLFGKEDMEDALIVNQ	1343
Ced-5	1311	WPIVCRSVGDKLPFTLRSESTFFNVKCKSLVLNKSDDALKTSQPIHNDINHLYLISPFMDVK-----SGDEEIEPSSVSKLLIYQEHKRIAHIRVHATSRHTEMGNTIEAATYLLHMLLKWSDQOC-ASVQVMTGQOHPOTHRQLKRTLYETIIGVDFDKGMEAEALSCKE	1311
DocA	504	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	504
M-DOCK	1445	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	1445
DOCK180	1440	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	1440
KIAA0299	1334	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	1334
GS034D21	503	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	503
mbc	1486	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	1486
Ced-5	1455	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	1455
DocA	658	LAQYENEIPDYELLQNLQAKFYESIMKILRKPQ-YFVAVTYGQGPFLRKNVTVIRGKEYREREDFMQLATOPFNAEKMTTSAPGDVKNAPQGYIO-----CFTVQPVY-----DEHPFRKHKVPVDOINIFYKSNVQVRFHYS---	658
M-DOCK	1618	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	1618
DOCK180	1613	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	1613
KIAA0299	1509	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	1509
GS034D21	678	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	678
mbc	1660	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	1660
Ced-5	1632	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	1632
DocA	831	-RVRRTGVDPE--NEFASMIERTSVTAVKLPGLKMPFVVM-SOTTIFLENAETSTANEKILMHINQSDDTL-PINPLSMILINGVDPVAVMGGFAYEKAPTEEYVRDHPEDQDLTKLKOLIANQIPFLGAGIKIHEKRVSDNRPFPHDMNEECFKNLKHV-EKEYG-	831
M-DOCK	1751	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1751
DOCK180	1761	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1761
KIAA0299	1666	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1666
GS034D21	905	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	905
mbc	1837	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1837
Ced-5	1754	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1754
DocA	1830	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1830
M-DOCK	1865	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1865
DOCK180	1839	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1839
KIAA0299	843	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	843
GS034D21	1970	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1970
mbc	1781	-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	1781
Ced-5		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
DocA		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
M-DOCK		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
DOCK180		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
KIAA0299		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
GS034D21		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
mbc		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
Ced-5		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	
DocA		-VREMP-DFDDR--RVGR--FRSMRLSY-----R-QMSIISLASMNSDCTPCKPSE-----SFDELE--ASPKTRVQGEPIPSGDTLFEVLRKSKTRKRSVUFADKAAESDLK-----LSKHEFMSDTNLSHAAIPLKASVL-S-----OM	

Fig. 1

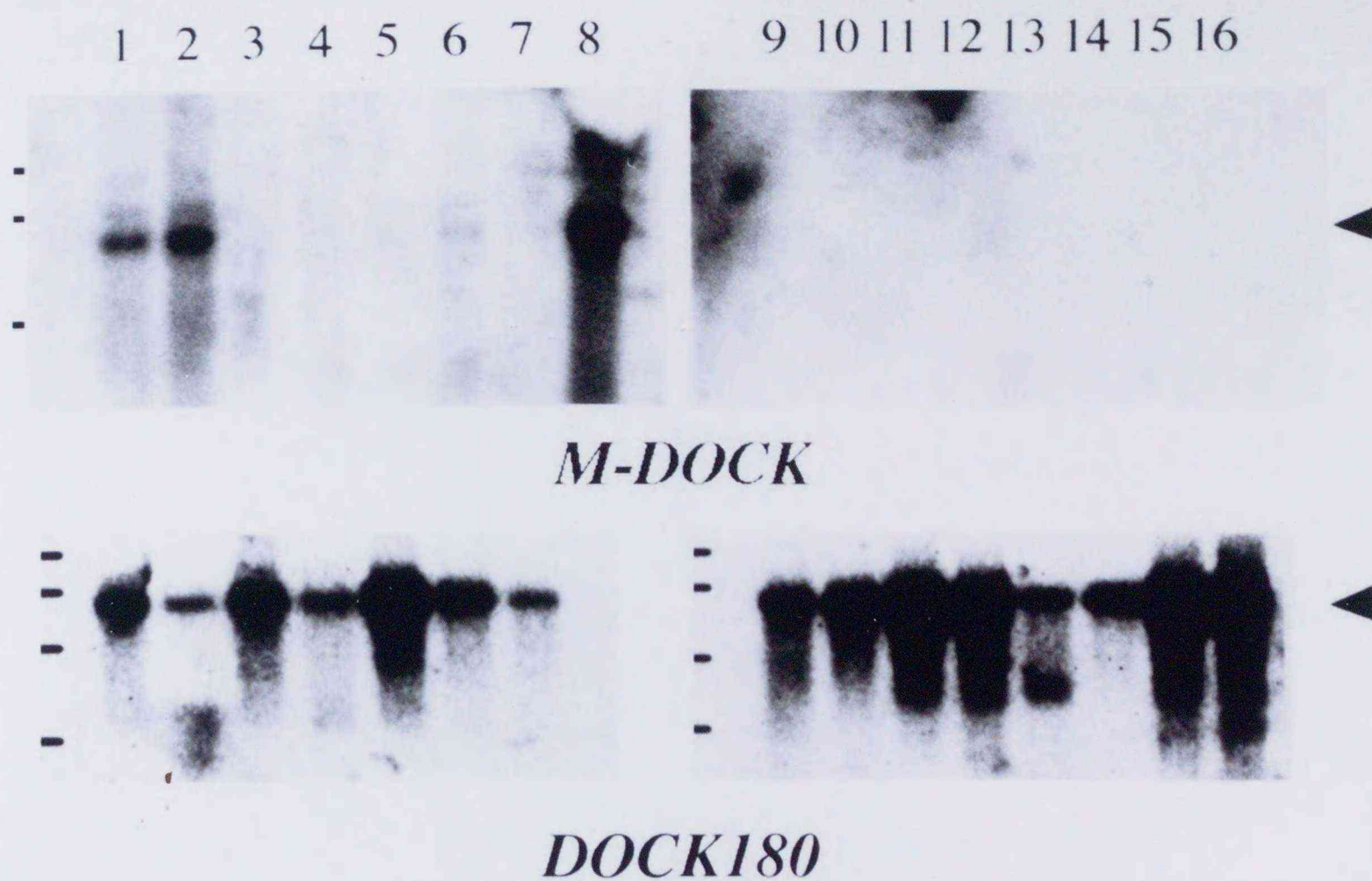


Fig.2

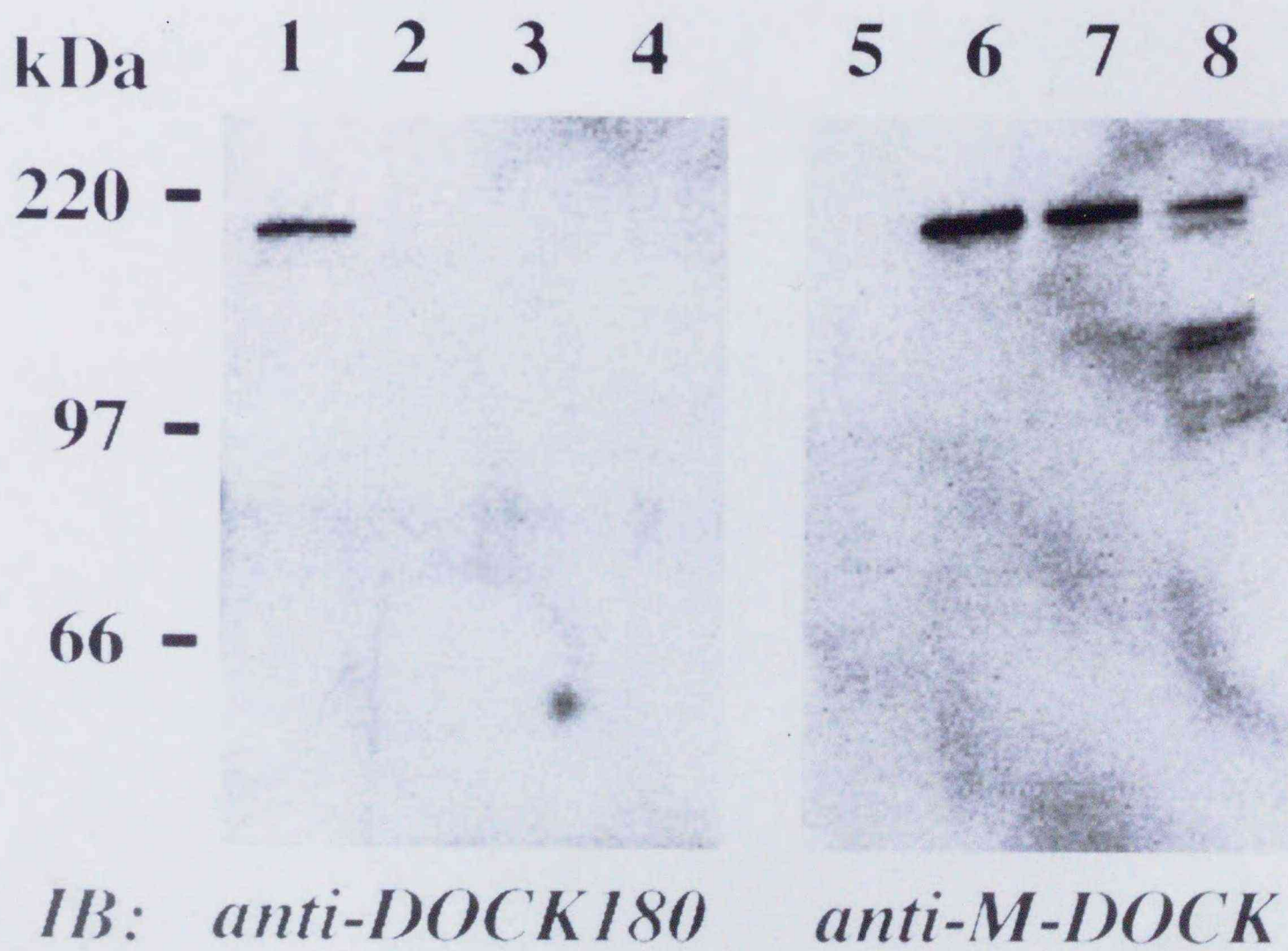
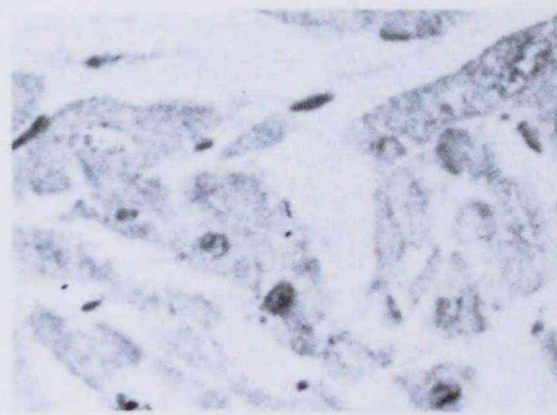


Fig.3



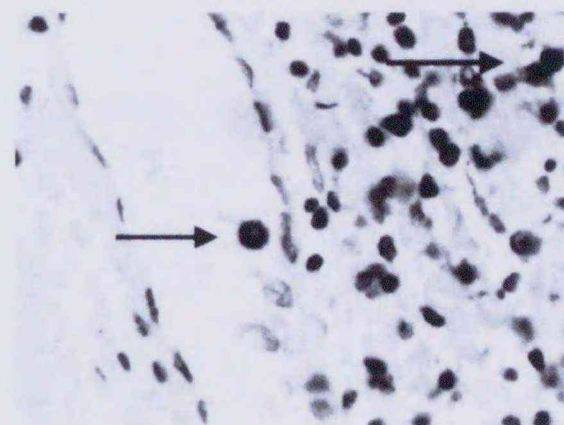
Heart



Liver



Lung



Tonsile

Fig.4

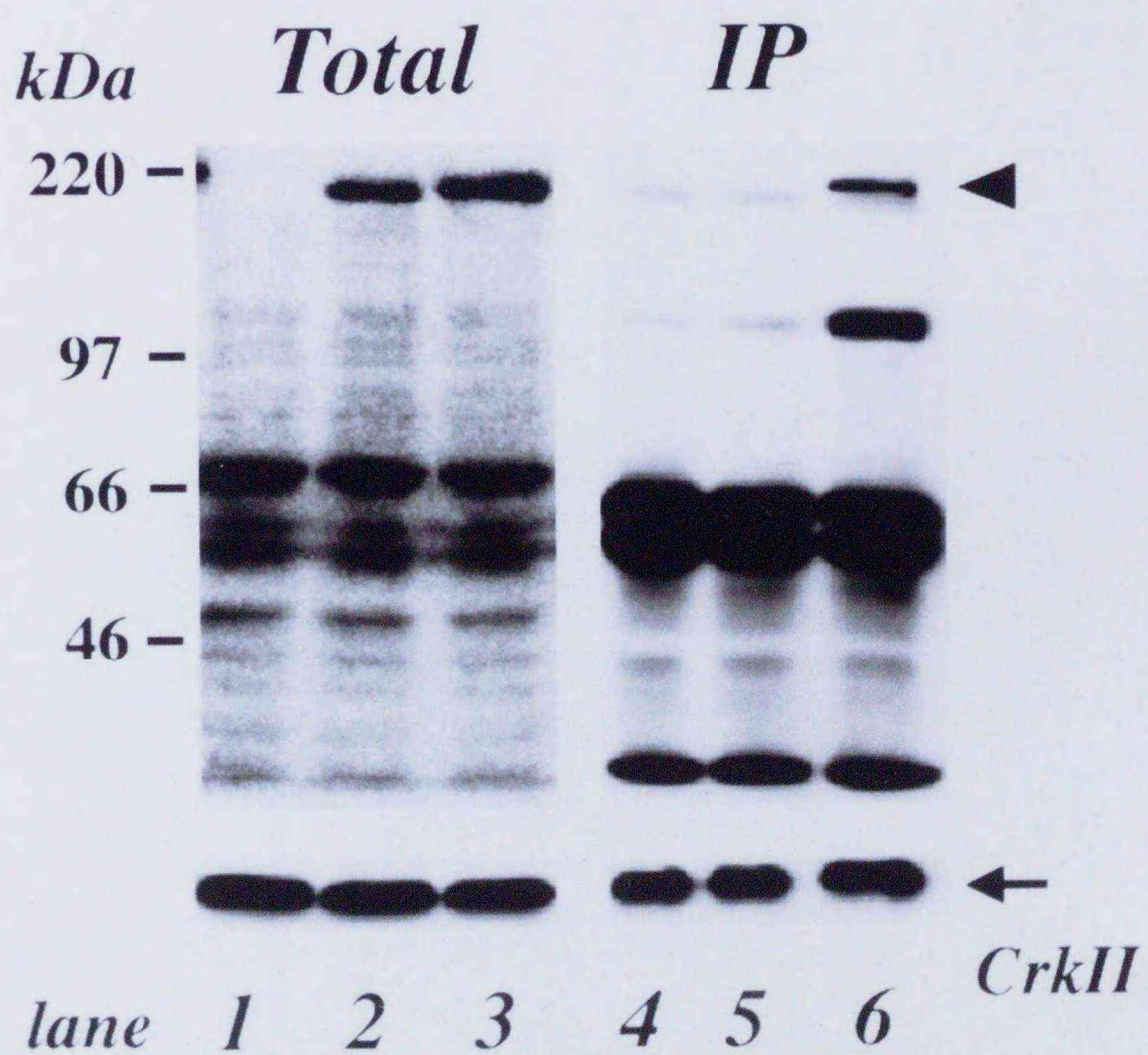


Fig.5

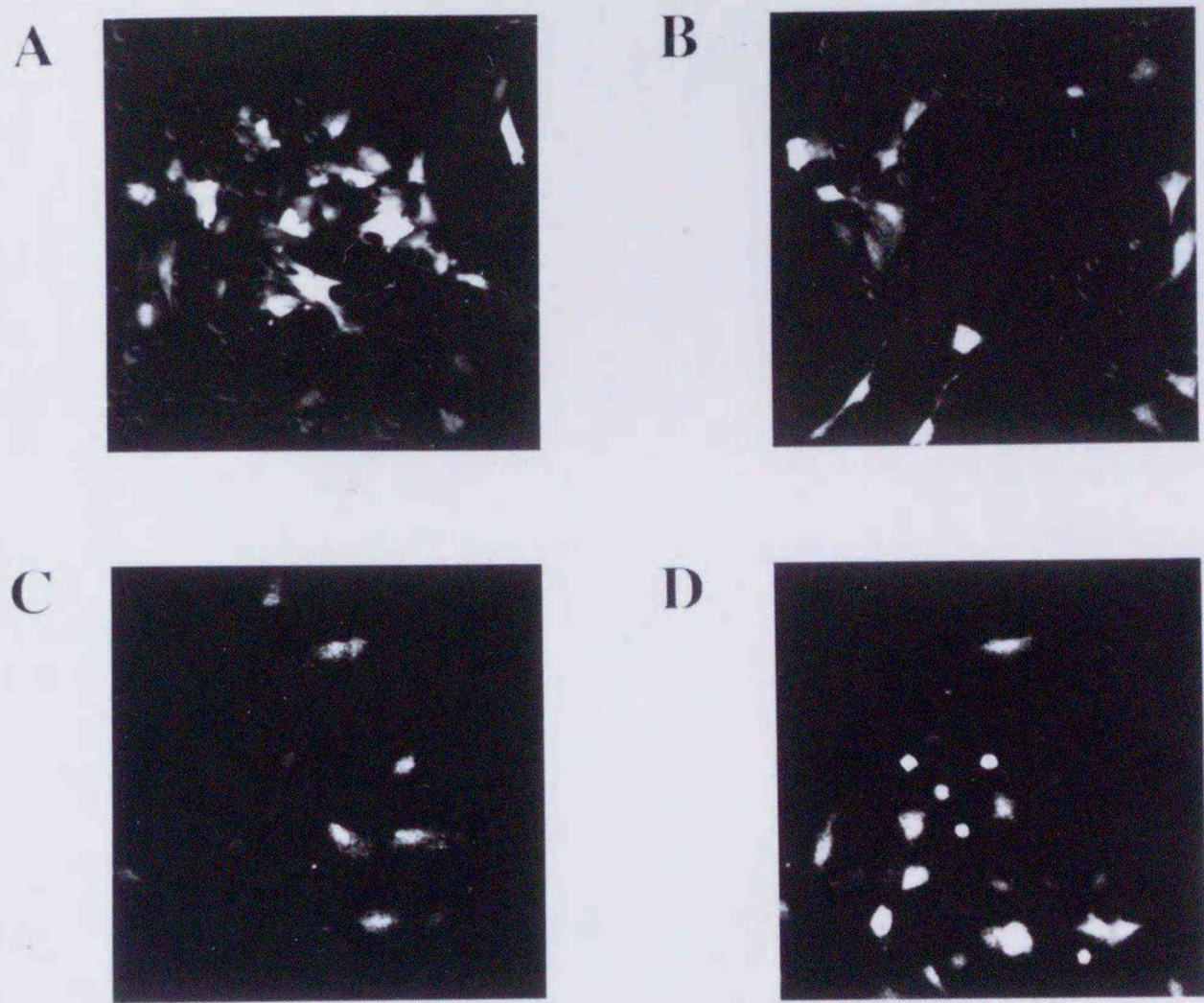


Fig.6

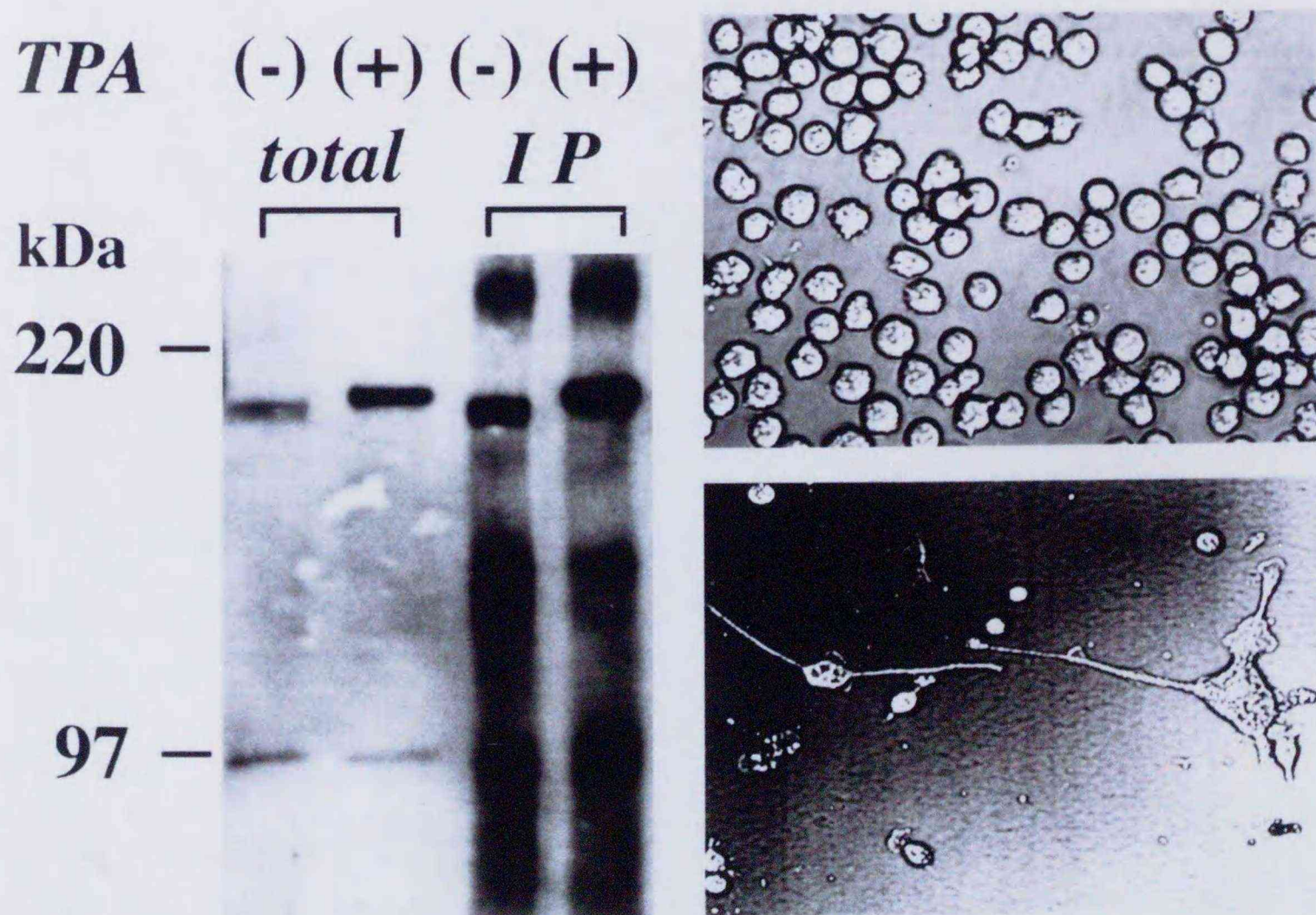
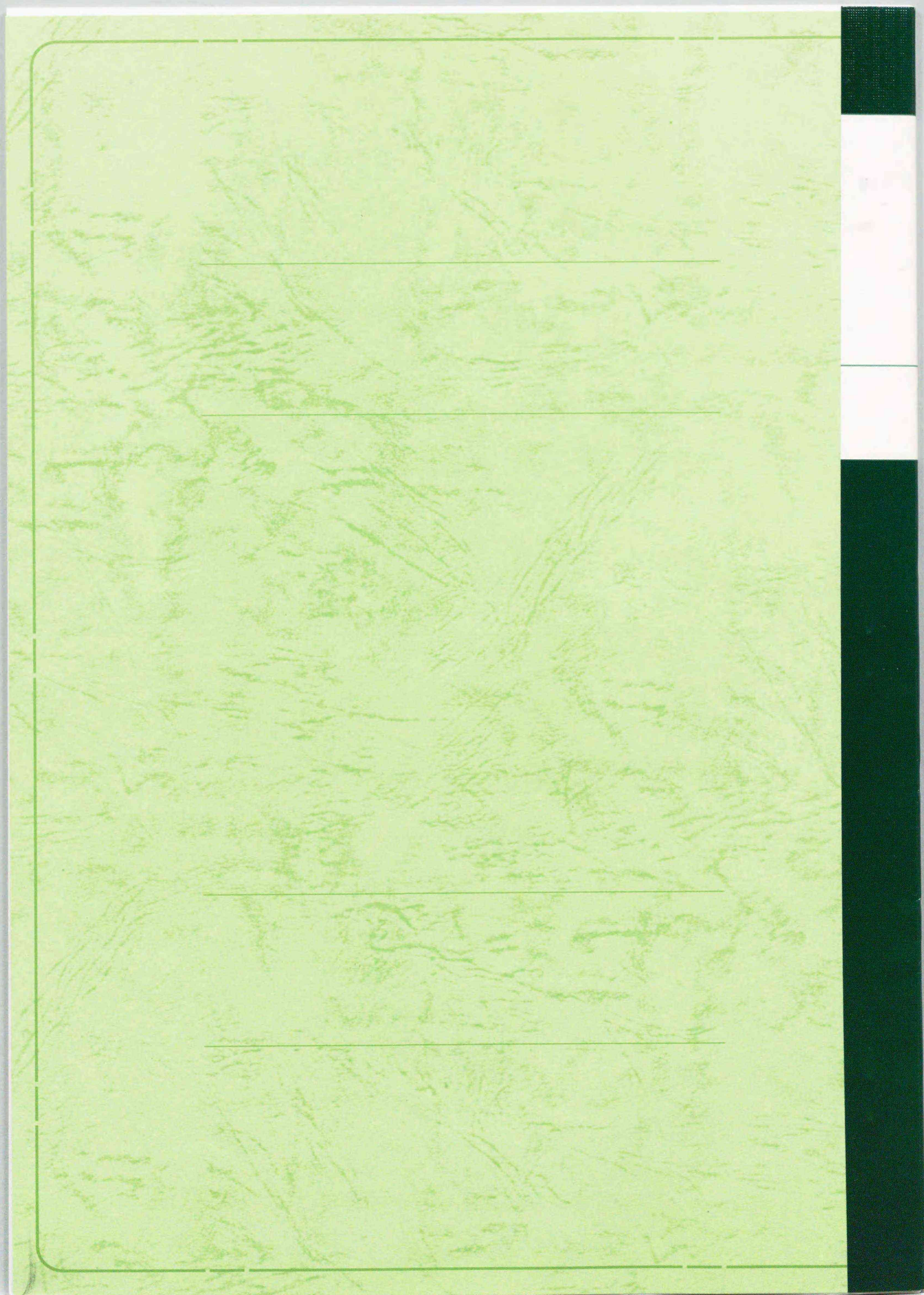
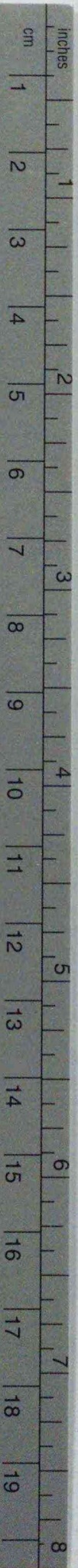


Fig.7

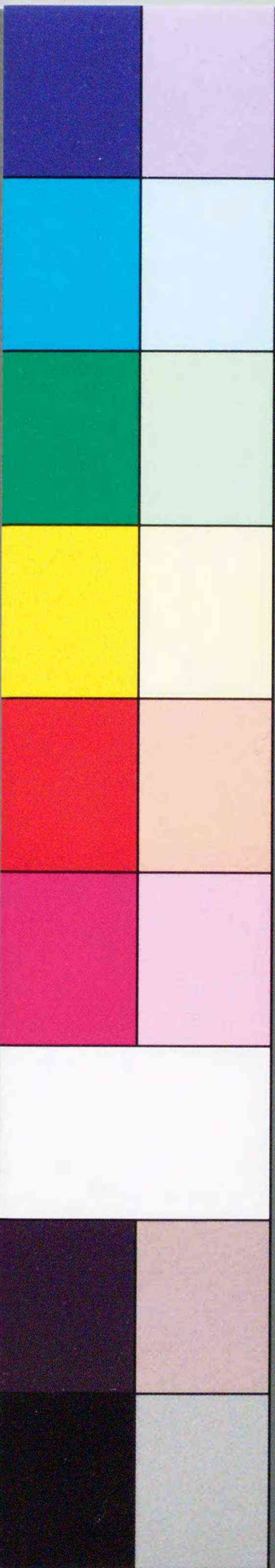




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

