



Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant

稲垣, 健二郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2439

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002439>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 8 0 】

氏 名・(本 籍) 稲垣 健二郎 (滋賀県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第 1 4 0 2 号

学位授与の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位授与の 日 付 平成 1 4 年 3 月 3 1 日

【学位論文題目】

Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant

(蛋白質チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 の細胞骨格、
接着及び運動における役割:優性阻害型変異体を用いた検討)

審 査 委 員

主査 教授 春日 雅人

教授 片岡 徹

教授 山村 博平

I. 緒言

SH2ドメインを有する細胞質型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素であるSHP-2は、様々な増殖因子や細胞接着により活性化し、Rasやmitogen-activated protein kinase (MAPK) を制御している。SHP-2は細胞骨格機能も調節することが示唆されているが詳細は不明である。本研究では、優性阻害型変異体を用いてSHP-2の生理機能につき検討した。

II. 方法

触媒部位に存在する第459位アミノ酸残基のcysteineをserineに置換することにより、酵素活性を喪失した変異型SHP-2をコードするcDNAを含むプラスミド発現ベクターを構築した (SHP-2 C/S)。これをChinese hamster ovary (CHO) 細胞およびRat-1細胞に恒常的に過剰発現することにより内因性SHP-2をdominant negativeに抑制する細胞株 (CHO SHP-2 C/S・Rat-1 SHP-2 C/S) を作成し、この変異型SHP-2の細胞骨格、接着および運動に与える影響を調べた。

III. 結果

1) 細胞骨格構成におけるSHP-2 C/Sの効果:

位相差顕微鏡による観察では、Rat-1細胞は進展した紡錘形の形態をとり高度の極性を有していたが、Rat-1 SHP-2 C/S細胞は平坦で極性が失われていた。CHO細胞でも同様の形態変化が見られた。ファロイジン染色による細胞の免疫蛍光分析ではアクチンストレスファイバーがRat-1 SHP-2 C/S細胞で増加しており、細胞辺縁の重合したアクチンを含むフィロポディア様構造も増生していた。リン酸化チロシンや細胞接着斑蛋白複合体の重要な構造物であるPaxillinに対するモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色分析では、これらの蛋白の総量はRat-1 SHP-2 C/S細胞で増加していた。これらの結果は、SHP-2の抑制によりアクチンストレスファイバーと細胞接着斑の形成が増加することを示唆する。

2) 細胞接着やSHPS-1のリン酸化に対するSHP-2 C/Sの効果:

通常培養下のRat-1、Rat-1 SHP-2 C/S細胞を低濃度のトリプシンを含むphosphate-buffered saline (Ca-Mg-PBS) で処理し、人為的に細胞と培養基との接着や細胞接着斑蛋白のチロシンリン酸化を減弱させた。Rat-1細胞は時間依存性に培養皿から剥がれ、20分では90%以上が剥がれたが、Rat-1 SHP-2 C/S細胞は30分後でも80%以上が接着していた。CHO細胞は30分後で90%以上が剥がれたが、CHO SHP-2 C/S細胞は60%以下であった。これらの結果より、SHP-2の抑制により細胞と培養基との接着性が増強することが示唆される。

次にイムノブロット分析において、処理前のSHP substrate-1 (SHPS-1) のチロシンリン酸化はRat-1 SHP-2 C/S・CHO SHP-2 C/S細胞でそれぞれの親株に比べ増強していた。この処理で親株のSHPS-1の脱リン酸化が見られたが、Rat-1 SHP-2 C/S・CHO SHP-2 C/S細胞ではあまり影響を受けなかった。このように、SHP-2の抑制によりその基質であるSHPS-1の過剰リン酸化が誘導された。一方、SHPS-1と異なり、Rat-1 SHP-2 C/S・CHO SHP-2 C/S細胞

のPaxillinのチロシンリン酸化は処理前でそれぞれの親株と明らかな差はなく、5分間のこの処理後では、親株と同様にPaxillinの脱リン酸化が見られた。これらの結果はPaxillinがSHP-2の直接の基質ではなく、またSHP-2の抑制による細胞接着の増強がPaxillinよりもSHPS-1のチロシンリン酸化量の増加に関与している可能性を示唆する。

3) インテグリン依存性細胞接着および伸展に対するSHP-2 C/Sの効果:

Rat-1 SHP-2 C/S・CHO SHP-2 C/S細胞及び親株を培養皿から脱着し、フィブロネクチン (FN) またはヒトロネクチン (VN) をコートした培養皿に再接着させた。FN・VNに接着したRat-1 SHP-2 C/S細胞の数は親株に比べそれぞれ173±14、123±8%と有意に増加していた。CHO SHP-2 C/S細胞においても接着細胞数はそれぞれ150±5、191±6%まで増加していた。これらの結果よりインテグリン依存性の早期細胞接着はSHP-2の抑制により増加することが示唆される。

培養皿から脱着した細胞を、FNで被覆した培養皿へまき直し接着・進展させたところ、5分後にはほとんどのRat-1細胞は球形のままであったが、Rat-1 SHP-2 C/S細胞の30%は既に進展し始めていた。更に15分後には80%以上のRat-1細胞は依然球形のままであったが、70%以上のRat-1 SHP-2 C/S細胞は伸展していた。このように、SHP-2の抑制によりFN上の細胞伸展が促進した。

4) Paxillinとp130Casの接着依存性チロシンリン酸化に対するSHP-2 C/Sの効果:

Rat-1細胞をFNをコートした培養皿へ接着させることにより、Paxillin・p130Casのチロシンリン酸化が増加した。Rat-1 SHP-2 C/S細胞では親株と比べこれらのチロシンリン酸化は高度であった。VNへの接着に関しても同様の結果が得られた。このようにSHP-2の抑制により、接着によって誘導されるPaxillin・p130Casのチロシンリン酸化の亢進が起こり得る。これらの結果より、SHP-2は細胞接着・伸展、およびPaxillin・p130Casのチロシンリン酸化を含むインテグリンシグナルに関連した早期の細胞応答を負に制御していることが示唆される。

5) インテグリン依存性細胞運動におけるSHP-2の役割:

Boyden Chamber法を用いて樹立した細胞の運動能を調べた。CHO細胞はFN上では走化したが、非特異的 (インテグリン非依存性) 細胞外基質であるポリ-L-リジン上ではほとんど動かなかった。CHO SHP-2 C/S細胞のFN上での運動性は親株の58±2%まで低下していた。更に、Rat-1 SHP-2 C/SのFN・VNにおける運動性は親株に比べそれぞれ57±1、73±0.5%であった。これらの結果より、SHP-2は細胞外基質蛋白とインテグリンの相互作用によって誘導される細胞運動に重要であることが示唆される。

IV. 考察

本研究において、不活性型SHP-2の過剰発現による内因性SHP-2の抑制により、2つの異なる細胞株において極性の低下を伴う細胞の形態の著明な変化が観察された。この変異体を発現する細胞では、アクチンストレスファイバーと細胞接着斑は共に増加し、培養皿へ

の接着性が亢進していた。これらより、SHP-2が細胞接着斑において基質の脱リン酸化を介して細胞接着斑の再構築を直接制御する可能性が示された。

細胞外基質への接着により細胞接着斑に局在する Paxillin・p130Cas・FAKのチロシンリン酸化が維持される。しかしながら、これらの蛋白のチロシンリン酸化量は、SHP-2 C/Sの過剰発現により増強しない。一方、SHPS-1のチロシンリン酸化は、SHP-2 C/Sで著明に増加しており、Ca-Mg-PBS処理にてSHP-2 C/S細胞では Paxillinは脱リン酸化されたが SHPS-1はされなかった。これらの結果より、SHPS-1はSHP-2の直接の基質であることが示唆されるが、Paxillin・p130Cas・FAKはSHP-2の直接の基質ではないように思われ、他の蛋白質チロシン脱リン酸化酵素が細胞脱着時の細胞接着斑におけるこれらの蛋白のチロシン脱リン酸化を制御すると考えられた。

SHP-2がインテグリンに関連した細胞接着シグナルを負に制御する分子機構はいくつか考えられる。細胞接着斑の形成や Paxillinのチロシンリン酸化は Rhoの活性に依存していることから、SHP-2は Rhoの活性化に関与する蛋白を脱リン酸化することにより Rhoの活性を抑制する可能性がある。また、SHP-2と類似の構造を持つ SHP-1を欠損するマクロファージのインテグリン依存性接着・伸展も増強しており、これは Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 活性の亢進によりもたらされる。このことから、SHP-2は PI3K活性を調節することによりインテグリンに関連した細胞接着を制御している可能性がある。もう一つの可能性は、SHP-2がインテグリン機能をより直接的に制御しているということである。Rasは、細胞接着斑の代謝を制御したりインテグリン機能を抑制すると考えられていること、更に FNによる Rasや MAPKの活性化が SHP-2 C/Sにより抑制されるという我々の以前の知見も合わせると、SHP-2 C/Sは細胞外基質に対する細胞接着の過程で Ras・MAPKの活性化を障害する一方、インテグリンに依存した細胞接着・伸展と Paxillin・p130Casのチロシンリン酸化を増強することが示唆される。

SHP-2 C/Sの細胞接着・伸展に対する刺激効果とは対照的に、インテグリン依存性の細胞運動は著明に阻害された。これは、SHP-2が細胞外基質における細胞の運動を正に制御していることを示唆する。細胞接着斑の形成・破壊を介する細胞接着の制御は、細胞運動に必須である。従って、SHP-2 C/Sの細胞運動抑制効果は細胞接着斑の過剰形成に伴う基質への接着の増強によると考えられる。このように、SHP-2は細胞接着斑の数や細胞接着の強度を制限することにより、細胞運動に対して促進的に働くと考えられる。また、Ras-MAPKは細胞外基質上での細胞運動に必要であることから、SHP-2 C/S細胞の細胞運動の低下は、MAPK活性化の阻害によりもたらされる可能性も否定できない。

V. 結論

SHP-2はアクチンストレスファイバーと細胞接着斑の形成を制御し、細胞形態の維持に寄与する。更に、SHP-2はインテグリン依存性の細胞接着・伸展・運動を調節すると考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1405号	氏名	稲垣 健二郎
論文題目	Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant 蛋白質チロシン脱リン酸化酵素SHP-2の 細胞骨格、接着および運動における役割： 優性阻害型変異体を用いた検討		
審査委員	主査	春日 雅人	
	副査	片岡 徹	
	副査	山本 丹平	
審査終了日	平成14年1月28日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

SH2ドメインを有する細胞質型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素であるSHP-2は、様々な増殖因子や細胞接着により活性化しRasやMAPKを制御している。
SHP-2は細胞骨格機能も調節することが示唆されているが詳細は不明であり、本研究ではSHP-2の細胞骨格に対する生理機能の探究を目的としている。
触媒部位に存在するアミノ酸残基のcysteineをserineに置換した不活性型SHP-2を恒常的に過剰発現することにより内因性SHP-2をdominant negativeに抑制する細胞株 (CHO SHP-2 C/S・Rat-1 SHP-2 C/S) を作成し、この優性阻害型SHP-2の細胞骨格、接着および運動に与える影響を調べところ、位相差顕微鏡による観察では、Rat-1細胞は進展した紡錘形の形態をとり高度の極性を有していたが、Rat-1 SHP-2 C/S細胞は扁平で極性が失われていた。CHO細胞でも同様の形態変化が見られた。ファロイジン染色による細胞の免疫蛍光分析ではアクチンストレスファイバーがRat-1 SHP-2 C/S細胞で増加しており、リン酸化チロシンやPaxillinに対する免疫蛍光染色分析でも、これらの蛋白の総量はRat-1 SHP-2 C/S細胞で増加していた。これらはSHP-2の抑制により細胞骨格の構成が変化し、アクチンストレスファイバーと細胞接着斑の形成が増加することを示唆する。
通常培養下のRat-1、Rat-1 SHP-2 C/S細胞を低濃度のトリプシンを含むPBSで処理し細胞と培養基との接着を減弱させたところ、Rat-1細胞は時間依存性に培養皿から剥離し、20分では90%以上が脱着したが、Rat-1 SHP-2 C/S細胞は30分後でも80%以上が接着していた。CHO細胞でも同様の傾向が見られた。これらより、SHP-2の抑制により細胞と培養基との接着性が増強することが示唆される。イムノブロット分析では、SHP-2の抑制によりその基質であるSHPS-1の過剰リン酸化が誘導されたが、Paxillinはこの処理によるSHP-2の抑制の影響は見られず、親株と同様に脱リン酸化された。これらはSHP-2の抑制による細胞接着の増強がPaxillinよりもSHPS-1のチロシンリン酸化量の増加に関与している可能性を示唆する。
Rat-1 SHP-2 C/S・CHO SHP-2 C/S細胞及び親株を培養皿から脱着し、フィブ

ロネクチン(FN)またはビトロネクチン(VN)で被覆した培養皿に再接着、伸展させたところ、接着した変異型細胞の数は親株に比べ有意に増加しており、細胞伸展も促進していた。これらはインテグリン依存性の早期細胞接着・伸展がSHP-2の抑制により増加することを示唆する。また、Rat-1 SHP-2 C/S細胞をFNやVNで被覆した培養皿へ接着させることにより誘導されるPaxillin・p130Casのチロシンリン酸化は、親株と比べ高度であった。これらよりSHP-2は細胞接着・伸展、およびPaxillin・p130Casのチロシンリン酸化を含むインテグリンシグナルに関連した早期の細胞応答を負に制御していることが示唆される。
Boyden Chamber法を用いて変異型細胞の運動能を調べたところ、CHO SHP-2 C/S細胞のFN上での運動性は親株の58±2%まで低下していた。Rat-1 SHP-2 C/SのFN・VNにおける運動性は親株に比べそれぞれ57±1、73±0.5%であった。これらより、SHP-2は細胞外基質蛋白とインテグリンの相互作用によって誘導される細胞運動に重要であることが示唆される。
本研究の要点をまとめると、1) SHP-2は細胞接着斑において基質の脱リン酸化を介して細胞接着斑の再構築を直接制御する可能性がある。2) SHP-2 C/Sは細胞外基質に対する細胞接着の過程で、インテグリンに依存した細胞接着・伸展とPaxillin・p130Casのチロシンリン酸化を増強することが示唆される。3) SHP-2は細胞接着斑の数や細胞接着の強度を制限することにより、細胞運動に対して促進的に働くと考えられる。の三点である。
本研究は、SHP-2の細胞骨格、接着および運動に与える影響を明らかにしたものであり、SHP-2の生理的機能において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認められる。よって、本研究者は博士(医学)の学位を取る資格があると認める。