



A Novel Membrane Glycoprotein, SHPS-1, That Binds the SH2-Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2 in Response to Mitogens and Cell Adhesion

藤岡, 洋介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2228

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002228>

※ 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。



氏名・（本籍） ふじ おか よう すけ
藤 岡 洋 介 （兵庫県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博ろ第1629号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の日付 平成10年3月20日

学位論文題目 A Novel Membrane Glycoprotein, SHPS-1, That Binds the SH2-Domain-Containing Protein Response to Mitogens and Cell Adhesion
(増殖因子及び接着刺激によってSH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼSHP-2に結合する新規膜糖蛋白質SHPS-1)

審査委員 主査 教授 春日 雅 人
教授 山村 博 平 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

I. 序 文

SHP-2は、2個のSRCホモロジー2（SH2）ドメインを有する非膜貫通型チロシンフォスファターゼであり、血小板由来増殖因子（PDGF）、上皮増殖因子（EGF）、インスリンといった種々の増殖因子による細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っていると考えられている。SHP-2はPDGF刺激やインスリン刺激によってリン酸化したPDGF受容体やIRS-1（insulin receptor substrate-1）と結合する。また、フォスファターゼ活性の欠如した変異型のSHP-2はこれらの増殖因子刺激によるRas-MAPキナーゼカスケードの活性化を阻害することから、SHP-2はRas-MAPキナーゼ系活性化に促進的に作用していることが示唆されている。しかしながら、SHP-2によるRas活性化機構については依然不明な点が多く、その解明にはSHP-2の基質蛋白質の同定が重要である。そこで、我々はSHP-2及びもう一つのSH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼであるSHP-1に結合するチロシンリン酸化された膜型糖蛋白、SHPS-1（SHP substrate-1）の精製およびそのcDNAクローニングを行い、その機能について解析を行った。

II. 法および結果

SR-3Y1細胞においてSHP-1と結合するチロシンリン酸化蛋白pp120

v-Srcによってトランスフォームしたラット線維芽細胞（SR-3Y1）にSHP-1を過剰発現させ、抗SHP-1抗体にて免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体によってウェスタンブロットを行うと、分子量約120kDaのチロシンリン酸化した蛋白、（pp120）の共沈を認めた。pp120はSH2ドメインを欠くSHP-1とは共沈せず、invitroにおいてもrecombinantのGST-SHP-1全長とは結合するが、SH2ドメインを欠くGST-SHP-1-ΔSH2とは結合しなかった。従ってpp120は、SH2ドメインを介してSHP-1と結合するものと考えられた。

pp120は膜分画に存在し、ConA、WGAなどのレクチンに結合し、Tunicamycin処理によってその分子量を約60kDaに減ずることから膜糖蛋白と考えられた。

また、pp120はin vitroにおいてGST-SHP-1-ΔSH2とは結合せず、pp120はSHP-2ともSH2ドメインを介して結合することが示唆された。

pp120のアフィニティー精製およびアミノ酸シーケンス分析

pp120がGST-SHP-1およびConAに結合することを利用し、SR-3YI細胞の膜分画からGST-SHP-1およびConAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってpp120を粗精製した。粗精製した蛋白をSDS-PAGEにて展開後、PVDF膜に転写し、最終精製標品とした。175cm²ディッシュ1000枚分のSR-3YI細胞より計約5μgのpp120が得られた。精製されたpp120をアミノ酸シーケンス分析に供したところ、9個の単一ペプチドシーケンスを得た。

データベースを検索したところ、pp120は新規蛋白と考えられた。pp120はSH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼ(SHP)の基質蛋白であると考えられたので、我々はこの蛋白をSHP substrate-1 (SHPS-1)と命名した。

SHPS-1 cDNAのクローニング

精製したSHP-1ペプチドシーケンスを基にオリゴプライマーを設定し、ラット脳のcDNAライブラリーをテンプレートとしてPCRを行い、168bpのDNAフラグメントを得た。このDNAフラグメントをプローブとしてラット3Y1細胞のZAPII cDNAライブラリーをスクリーニングし、全長のSHPS-1 cDNAを得た。得られたSHPS-1 cDNAは3728塩基より成り、509アミノ酸をコードする一つのopen reading frameを含んでいた。

アミノ酸シーケンスより推定されるSHPS-1は一つの膜貫通部位を持つ膜蛋白で、細胞外はN端から一つのVタイプおよび二つのC1タイプの免疫グロブリン(Ig)様ドメインより成り、15箇所のアスパラギン酸糖付加部位を有していると想定された。細胞内にはYXX(L/V/I)ら成り、SHP-2のSH2ドメインの結合部位と思われる4箇所のチロシン残基(Y408ADL, Y432ASIE, Y449ADL, Y473ASV)と幾つかのセリンスレオニンリン酸化部位を認めた。これらのチロシン残基周囲のシーケンスはIRS-1のSHP-2のSH2ドメイン結合部位周囲のシーケンスに類似していた。

我々は、ラットのSHPS-1 cDNAに加えてマウスおよびヒトのSHPS-1 cDNAをクローニングした。4箇所のSH2ドメイン結合部位のチロシン残基とそれに続く三つのアミノ酸は完全に保存されており、また細胞内ドメインは全体にわたってこの3種間で高率に保存されていた。

ノーザンブロットによる検討では、SHP-1は検討したすべての組織において認められ、脳、肺、脾に豊富であった。

インスリン受容体によるSHPS-1のチロシンリン酸化とインスリン刺激によるSHP-2-SHPS-1複合体の形成

これまでに我々は、ヒトインスリン受容体を強発現したCHO細胞(CHO-IR)においてインスリン刺激によってチロシンリン酸化され、同時にSHP-2と複合体を形成する分子量約115kDaの膜糖蛋白(pp115)について報告してきた。ラットSHPS-1の細胞内ドメインのGST融合蛋白を抗原として作成したポリクローナル抗体(αSHPS-1)、pp115を特異的に認識するモノクローナル抗体(4C6)、MYCtagを付加したSHPS-1の発現ベクター等を用いた実験からpp115はSHPS-1であると考えられた。

SHPS-1の細胞内部分のGST融合蛋白(GST-SHPS-1-cyto)は、インスリンで刺激されたCHO-IR細胞から粗精製された活性化インスリン受容体によってin vitroでチロシンリン酸化された。さらに、このインスリン受容体によってリン酸化されたGST-SHPS-1-cytoはSHPS-2のSH2ドメインのGST融合蛋白と結合した。

これらの結果より、SHP-2はチロシンリン酸化されたSHPS-1とSH2ドメインを介して直接結合す

るものと考えられた。

他の増殖因子および接着刺激によるSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合の促進

ヒトインスリン受容体を過剰発現させたRat-1細胞（Rat-1-IR）をインスリン、ウシ胎児血清（FCS）およびLPAで刺激すると、FCS、LPA刺激においてもインスリン刺激と同様にSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合が増加した。

さらに、CHO-IR細胞を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないPBSで処理するとSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合が減弱し、CHO-IR細胞をフィブロネクチンでコートしたディッシュ上に再接着させると、SHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合が明らかに亢進した。これより、接着刺激もSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合を促進するものと考えられた。

Ⅲ. 考 案

本研究では、SH2ドメインを有するチロシンフォスターゼに結合する膜糖蛋白SHPS-1の分子クローニングとその生化学的機能解析を行った。SHPS-1は細胞外に3個のIg様ドメインを持ち、細胞内には4箇所のSH2ドメインを有するチロシンフォスターゼに対する結合部位を有していた。

今回の検討でSHPS-1は我々が以前に報告したCHO-IR細胞においてインスリン刺激によってチロシンリン酸化され、SHP-2と結合する膜糖蛋白、pp115と同一のものと考えられた。SHPS-1のチロシンリン酸化部位周囲のシーケンスはIRS-1のSHPS-2結合部位のそれと酷似しており、SHP-2はIRS-1と同様の形式でSH2ドメインを介してSHPS-1に結合するものと考えられる。インスリン刺激によるpp115^{SHPS-1}のチロシンリン酸化は、フォスファターゼ活性を欠如した変異型SHP-2を過剰発現させたCHO-IR細胞において遷延する。また、*in vitro*においてrecombinantのSHP-2はリン酸化したSHPS-1を脱リン酸化する。これらの結果よりSHP-2はインスリン刺激によってSHPS-1と結合した後、SHPS-1のいくつかのリン酸化チロシンを脱リン酸化する可能性が考えられる。

LPAおよび接着刺激によるSHPS-1のリン酸化およびSHP-2との結合のメカニズムの詳細は不明であるが、SHP-2がLPAやインテグリンによるRasとMAPキナーゼの活性化を媒介していると考えられるので、リン酸化したSHPS-1とSHP-2の結合がこれらの過程でも重要な働きを担っている可能性が示唆される。

SHPS-1およびSHP-2の発現は共に脳において多く、SHPS-1は脳におけるSHP-2を介するシグナル伝達系で機能している可能性がある。また、マウスの発生早期においてもSHPS-1のmRNAはSHP-2と共に認められ、これより個体の発生過程においてもSHPS-1とSHP-2HA共役して機能しているのかもしれない。

SHPS-1の構造が明らかにされたが、SHPS-1がいかにしてSHP-2とRasの間を結びつけるのかは依然として明らかではない。SHPS-1は触媒ドメインを持たず、まづ備の実験ではGrb2, shc, GAPのいずれとも結合しないので、単にドッキング蛋白として機能し、各種刺激に対してSHP-2を細胞質から膜へ移動させているのかもしれない。SHP-2はSHPS-1と結合した後、それを脱リン酸化することによってSHPS-1から離れる。そして恐らくは、膜近傍のSOS様蛋白を脱リン酸化することによってそれを活性化させるのかもしれない。

Ⅳ. 結 語

SH2ドメインを有するチロシンフォスターゼに結合する膜糖蛋白SHPS-1の分子クローニングとその生化学的機能解析を行った。

SHPS-1は細胞外に3個のIg様ドメインを持ち、細胞内には4箇所のSH2ドメインを有するチロシンフォスターゼに対する結合部位を有していた。

SHPS-1は各種ミトゲンや接着刺激によってチロシンリン酸化され、SHP-2と結合することによってこれらの刺激によるRas-MAPキナーゼ系の活性化に寄与しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

2個のSRCホモロジー2 (SH2)ドメインを有する非膜貫通型チロシンフォスファターゼであるSHP-2は、PDGF, EGF, インスリンといった種々の増殖因子刺激によるRas-MAPキナーゼ系活性化に促進的に作用していることが示唆されている。しかしながら、SHP-2によるRas活性化機構については依然不明な点が多く、その解明にはSHP-2の基質蛋白質の同定が重要である。本研究において、我々はSHP-2及びもう一つのSH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼであるSHP-1に結合するリン酸化された膜型糖蛋白質SHPS-1 (SHPsubstrate-1) の精製およびそのcDNAクローニングに成功し、機能について解析を行った。

v-Srcによってトランスフォームしたラット線維芽細胞にSHP-1を過剰発現させ、抗SHP-1抗体にて免疫沈降し、ウェスタンブロットを行うと、分子量約120 kDaのチロシンリン酸化した蛋白 (pp120) の共沈を認めた。pp120は、SH2ドメインを介してSHP-1及びSHP-2と結合し、また膜糖蛋白質であると考えられた。SR-3YI細胞の膜分画からGST-SHP-1およびConAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってpp120を精製した。精製されたpp120をアミノ酸シーケンス分析に供し、得られたシーケンスをデータベースにて検索したところ、pp120は新規蛋白質と考えられた。pp120はSH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼ (SHP) の基質蛋白質であると考えられたので、我々はこの蛋白質をSHPsubstrate-1 (SHPS-1) と命名した。

SHPS-1のペプチドシーケンスを基にして得られたDNAフラグメントをプローブとしてラット3YI細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長のSHPS-1cDNAを得た。アミノ酸シーケンスより推定されるSHPS-1は一つの膜貫通部位を持つ膜蛋白質で、細胞外はN端から3個のイムノグロブリン (Ig) 様ドメインより成り、15箇所のアスパラギン糖付加部位を有していた。細胞内にはSHP-2のSH2ドメインの結合部位と思われる4箇所のチロシン残基を認めた。これらのチロシン残基周囲のシーケンスはIRS-1のSHP-2のSH2ドメイン結合部位周囲のシーケンスに類似していた。マウスおよびヒトのSHPS-1cDNAもクローニングしたところ、4箇所のSH2ドメイン結合部位のチロシン残基とそれに続く三つのアミノ酸は完全に保存されており、また細胞内ドメインは全体にわたって高率に保存されていた。ノーザンブロットによる検討では、SHPS-1は検討したすべての組織において認められ、脳、肺、脾に豊富であった。

これまでに我々は、ヒトインスリン受容体を強発現したCHO細胞においてインスリン刺激によってチロシンリン酸化され、同時にSHP-2と複合体を形成する分子量約115kDaの膜糖蛋白質 (pp115) について報告してきたが、本研究でpp150とSHPS-1は同一であることを明らかにした。

SHPS-1の細胞内部分のGST融合蛋白は、in vitroでインスリン受容体によってチロシンリン酸化され、さらにSHP-2のSH2ドメインのGST融合蛋白と結合した。これより、SHP-2はチロシンリン酸化されたSHPS-1とSH2ドメインを介して直接結合するものと考えられた。

ヒトインスリン受容体を強発現したRat-1細胞をインスリン、ウシ胎児血清 (FCS) およびLPAで刺激すると、FCS, LPA刺激においてもインスリン刺激と同様にSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-

2との結合が増加した。

さらに、CHO-IR細胞を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を欠くPBSで処理、あるいはCHO-IR細胞をフィブロネクチンでコートしたディッシュ上に再接着させると、SHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合が明らかに亢進したことから、接着刺激もSHPS-1のチロシンリン酸化とSHP-2との結合を促進するものと考えられた。

本研究は、SH2ドメインを有するチロシンフォスファターゼに結合する膜糖蛋白質SHPS-1の分子クローニングとその生化学的機能解析を行ったものであるが、はじめてこれらのフォスファターゼの標的蛋白質を同定し、その性質についても重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。