



# Integrin-mediated Tyrosine Phosphorylation of SHPS-1 and Its Association with SHP-2

津田, 政広

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-11-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2373

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002373>

※ 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）    | つ　だ　まさ　ひろ<br>津　田　政　広                                                                                                                                                                                       | （大阪府）      |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学）                                                                                                                                                                                                   |            |
| 学位記番号      | 博ろ第1713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11年11月10日                                                                                                                                                                                                |            |
| 学位論文題目     | Integrin-mediated Tyrosine Phosphorylation fo SHPS-1 and It's Association with SHP-2<br>ROLES OF Fak AND Src FAMILY KINASES*<br>（インテグリンによる SHPS-1 チロシンリン酸化および SHPS-1 と SHP-2 の結合：FAK および SRC ファミリーキナーゼの役割） |            |
| 審　査　委　員    | 主査 教授 春 日 雅 人<br>教授 片 岡 徹                                                                                                                                                                                  | 教授 中 村 俊 一 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### I. 緒言

インテグリンがフィブロネクチンやラミニンなどの細胞外基質（ECM）と結合することにより、細胞接着が起こり、細胞増殖を始めとする様々な生化学的反応が喚起される。これらの反応はインテグリンにより誘導されるさまざまな蛋白質のチロシンリン酸化によって起こり、Ras-MAP kinase シグナルの活性化にも関与している。インテグリンによる Ras-MAP kinase シグナル活性化に対するチロシンキナーゼの役割は明らかにされつつあるが、チロシンフォスファターゼについては全く知られていない。SHP-2 は細胞質型のチロシンフォスファターゼ（PTPase）で、様々な増殖因子刺激により活性化される Ras-MAP kinase シグナルの活性化に重要な役割を果たしている。SHPS-1 は SHP-2 に結合する蛋白質として新しく同定された約120kDa の膜糖蛋白質で、種々の増殖因子刺激によりチロシンリン酸化を受け、SHP-2 と結合する。また SHPS-1 は細胞接着によってもチロシンリン酸化を受け、SHP-2 と結合することが知られているが、その詳細は充分明らかではない。今回我々はインテグリンによる SHPS-1 のチロシンリン酸化のメカニズムを明らかにし、さらに SHPS-1 および SHP-2 がインテグリンによる Ras-MAP kinase 活性化に及ぼす影響について検討した。

### II. 方法

細胞接着：細胞は血清を含まない Medium で12時間スターブし、Ca<sup>2+</sup>と Mg<sup>2+</sup>を含まない PBS で37℃、15分 incubate し細胞をディッシュよりはがし、suspend した後フィブロネクチンでコートされたディッシュに再接着させた。

免疫複合体 Kinase Assay：SHPS-1 の細胞内ドメインを含む GST 結合蛋白（GST-SHPS-1-cyto）と免疫沈降された Kinase を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 存在下で24℃、30分反応させ、GST-SHPS-1-cyto のリン酸化レベルを autoradiography にて検討した。

MAP kinase Assay：MAP kinase の活性化は2種類の方法で検討した。一つは細胞ライセートを、204位チロシンリン酸化した活性化 MAP kinase に対する抗体で免疫染色し、その活性を評価した。また

別に細胞ライセートを抗 MAP kinase 抗体で免疫沈降し, myerin basic protein と [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP 存在下で20℃, 15分反応させ, その radioactivity を測定した。

### Ⅲ. 結果

1) インテグリンと ECM の結合による SHPS-1 のチロシンリン酸化と SHP-2 との結合: フィブロネクチンでコートされたディッシュに細胞を接着させ, 抗 SHPS-1 抗体で免疫沈降し, 抗リン酸化チロシン抗体, および抗 SHP-2 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。SHPS-1 のチロシンリン酸化および SHP-2 との結合は, 15分以内に起こり, 60-120分で最大となった。同様のことがラミニンをコートした場合にも見られた。またサイトカラシン D を加えると SHPS-1 のチロシンリン酸化は顕著に抑制された。

2) SHPS-1 のチロシンリン酸化における Src family kinase および Fak の役割: Csk の野生型 (Csk-WT) と222位のリジンをアルギニンに置換し酵素活性のない変異型 (Csk-K/R) を過剰発現している CHO-IR 細胞を, それぞれフィブロネクチンでコートされたディッシュに接着させ, 抗 SHPS-1 抗体で免疫沈降し, 抗リン酸化チロシン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。Csk-WT 細胞では SHPS-1 のチロシンリン酸化レベルは著しく低下し, Csk-K/R 細胞では SHPS-1 のチロシンリン酸化レベルは上昇した。次に, Src, Fyn, そして Fak 遺伝子を knock-out したマウスより得た細胞をフィブロネクチンでコートされたディッシュに接着させ, 抗 SHP-2 抗体で免疫沈降し, 抗リン酸化チロシン抗体で免疫染色した。SHPS-1 と考えられる約120kDa の蛋白質のリン酸化レベルが, 野生型細胞 (WT) に比べ, それぞれ Src を欠く細胞 (SRC-) と, Fyn を欠く細胞 (FYN-) で著明に低下していた。そして Fak を欠く細胞 (FAK-) ではその蛋白質は確認できなかった。さらに Src-, Fyn-そして Fak-細胞に, それぞれ rat SHPS-1 を一過性に発現させ抗 rat SHPS-1 抗体で免疫沈降し, 抗リン酸化チロシン抗体を用いてイムノブロッティングを行った。SHPS-1 のリン酸化レベルは, WT 細胞に比較し, Src-, Fyn-そして Fak-細胞では著しく低下していた。つぎに SHPS-1 細胞内ドメインを含む GST 結合蛋白 (GST-SHPS-1-cyto) を作成し, Rat-1 細胞より抗 Src 抗体で免疫沈降した Src Kinase と in vitro で反応させると, GST-SHPS-1-cyto はチロシンリン酸化された。これに対し COS-7 細胞に HA tag を付加した Fak を発現させ, 抗 HA 抗体で免疫沈降して得られた Fak では GST-SHPS-1-cyto はチロシンリン酸化されなかった。

3) 酵素活性のない SHP-2 あるいは野生型 SHPS-1 を過剰発現することがフィブロネクチン刺激による MAP kinase の活性化におよぼす影響: Rat-1 細胞に, 459位のシステインをセリンに置換し酵素活性のない変異型 SHP-2 を過剰発現させた細胞 (Rat-1-SHP-2-C/S 細胞), あるいは野生型 SHPS-1 を過剰発現させた細胞 (Rat-1-SHPS-1 細胞) を作成した。これらの細胞をそれぞれフィブロネクチンでコートされたディッシュに接着させ, MAP kinase の活性化を検討した。Rat-1 細胞では MAP kinase の活性化は15分以内に起こり, 30分で最大となった。これに対し, Rat-1-SHP-2-C/S 細胞では MAP kinase の活性化が著しく抑制されていた。また Rat-1-SHPS-1 細胞では MAP kinase 活性化の明らかな増強は見られなかった。またそれぞれの細胞において, フィブロネクチン刺激による Fak のリン酸化および Grb2 との結合に明らかな差は見られなかった。

### Ⅳ. 考案

本研究で我々はまず細胞接着により SHPS-1 のチロシンリン酸化されること, それにともない SHP-2 が結合することを明らかにした。このチロシンリン酸化はインテグリンの特異的な基質であ

るフィブロネクチンやラミニンでコートされたディッシュに接着させたときに見られ、非特異的な基質のポリ-L リジンでは見られなかったことから、インテグリンがECMと結合することによりSHPS-1のチロシンリン酸化およびSHP-2との結合がおこると考えられた。またアクチンの重合化阻害剤であるサイトカラシンDを加えるとSHPS-1のチロシンリン酸化が起こらなかったことから、この反応には正常な細胞骨格の構築が必要であることが示唆された。つぎにフィブロネクチンによる刺激によるSHPS-1のチロシンリン酸化のメカニズムについて検討した。Cskを過剰発現することで、フィブロネクチン刺激によるSHPS-1のチロシンリン酸化レベルは低下し、酵素活性のないCsk-K/Rを過剰発現することでSHPS-1のチロシンリン酸化レベルは上昇した。CskはSrc family kinaseのC末側のチロシン残基をリン酸化し、その活性を抑制することから、フィブロネクチン刺激によるSHPS-1のチロシンリン酸化にSrc family kinaseの深く関与している可能性が示された。さらにSrcあるいはFynを欠く細胞においてもSHPS-1のチロシンリン酸化レベルは低下し、Fakを欠く細胞ではSHPS-1のチロシンリン酸化が起こらなかったことから、Src, Fyn, あるいはFakが細胞接着によるSHPS-1のチロシンリン酸化に関与していることが示された。インテグリンがECMに結合すると、Fakの自己リン酸化が起こり、SH2ドメインを化介してSrcが結合し、SrcのKinase活性が上昇し、Fakの活性ドメインをチロシンリン酸化し、FakのKinase活性も上昇する。しかしin vitroではFakはSHPS-1の細胞内ドメインをチロシンリン酸化しなかった。このことからFakはSHPS-1のチロシンリン酸化には必要であるが、直接チロシンリン酸化していないことが判明した。一方Src Kinaseはin vitroでもSHPS-1をチロシンリン酸化することから、in vitroにおいてもSHPS-1をチロシンリン酸化していると考えられた。

また本研究においては、インテグリンにより活性化されるMAP kinaseシグナルに対するSHPS-1およびSHP-2の作用を検討した。酵素活性のないSHP-2を過剰発現すると、フィブロネクチン刺激によるMAP kinaseの活性化が著しく抑制された。このことからSHP-2は他の増殖刺激の場合と同様に、インテグリンによるMAP kinaseの活性化シグナルにも関与していることが示された。またこの際、フィブロネクチン刺激によるFakのリン酸化およびFakとGrb2との結合は抑制されていないことから、SHP-2はFak-Grb2とは独立した、未知のメカニズムを介してインテグリンによるMAP kinaseの活性化シグナルに関与していることが示唆された。

## V. 結論

インテグリンによるSHPS-1のチロシンリン酸化はSrc family kinaseによって起こり、その際Fakが必要不可欠である。インテグリンによるMAP kinaseの活性化シグナルにおいて、SHP-2が重要な役割を果たしている。

## 論文審査の結果の要旨

SHP-2は細胞質型のチロシンフォスファターゼで、様々な増殖因子刺激により活性化されるRas-MAPkinaseシグナルの活性化に重要な役割を果たしている。SHPS-1はSHP-2に結合する蛋白質として新しく同定された約120kDaの膜糖蛋白質で、種々の増殖因子や細胞接着刺激によりチロシンリン酸化を受け、SHP-2と結合する。一方インテグリンがフィブロネクチンやラミニンなどの細胞外基質(ECM)と結合することにより、細胞接着が起こり、細胞増殖をはじめとする様々な生化学反応が喚起される。これらの反応はインテグリンにより誘導されるさまざまな蛋白質のチロシンリン

酸化によって起こり、Ras-MAPkinase シグナルの活性化にも関与している。

本研究はまず細胞接着により SHPS-1 のチロシンリン酸化されること、それにともない SHP-2 が結合することを明らかにした。このチロシンリン酸化はインテグリンの特異的な基質であるフィブロネクチンやラミニンでコートされたディッシュに接着させたときに見られたことから、インテグリンが ECM と結合することにより SHPS-1 のチロシンリン酸化および SHP-2 との結合がおこると考えられた。つぎに SHPS-1 のチロシンリン酸化のメカニズムについて検討した。CHO-IR 細胞に Csk を過剰発現することで、フィブロネクチン刺激による SHPS-1 のチロシンリン酸化レベルは低下し、酵素活性のない Csk-K/R を過剰発現することで SHPS-1 のチロシンリン酸化レベルは上昇した。Csk は Src family kinase の C 末側のチロシン残基をリン酸化しその活性を抑制することから、フィブロネクチン刺激による SHPS-1 のチロシンリン酸化に Src family kinase の関与している可能性が示唆された。また Src あるいは Fyn を欠く細胞においても SHPS-1 のチロシンリン酸化レベルは低下しており、Fak を欠く細胞では SHPS-1 のチロシンリン酸化が起こらなかったことから、Src, Fyn, あるいは Fak が細胞接着による SHPS-1 のチロシンリン酸化に関与していることが示された。in vitro では Fak は SHPS-1 の細胞内ドメインをチロシンリン酸化しなかったことから、Fak は SHPS-1 のチロシンリン酸化には必要であるが、直接チロシンリン酸化していないことが判明し、一方 Src Kinase は in vitro でも SHPS-1 をチロシンリン酸化することから、in vitro においても SHPS-1 を直接チロシンリン酸化していると考えられた。次に、インテグリンにより活性化される MAPkinase シグナルに対する SHP-2 の作用を検討した。酵素活性のない SHP-2 を過剰発現すると、フィブロネクチン刺激による MAPkinase の活性化が著しく抑制された。このことから SHPS-1 のチロシンリン酸化とそれに結合する SHP-2 は、インテグリンによる MAPkinase の活性化シグナルにおいても何らかの関与をしていることが示唆された。

本研究はインテグリンによる情報伝達機構について研究したものであるが、従来は不明であったインテグリンによる Ras-MAPkinase 活性化における SHPS-1 ならびに SHP-2 の役割につ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。