



# Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and association of SHPS-1 with SHP-2, a SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase

越智, 深

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2752

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002752>

※ 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。



【 1 8 1 】

氏 名・(本 籍) 越智 深 (愛媛県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1912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16年3月22日

【 学位論文題目 】

Epidermal growth factor stimulates the tyrosine  
phosphorylation of SHPS-1 and association of  
SHPS-1 with SHP-2, a SH2 domain-containing  
protein tyrosine phosphatase

(上皮増殖因子による SHPS-1 のチロシンリン酸化と、  
SH2 ドメインを含むチロシンフォスファターゼ SHP-2  
との結合)

審 査 委 員

主 査 教 授 片岡 徹

教 授 南 康博

教 授 仲村 俊一

SHPS-1 (SHP substrate-1) は、細胞外領域に 3 個の免疫グロブリン様ドメインと細胞内領域に 4 個の Src ホモロジー-2 (SH2) ドメイン結合配列に相当するチロシンリン酸化モチーフを有する分子量 120 kDa の受容体型の糖化蛋白質である。SHPS-1 は、インスリンやリゾホスファチジン酸、あるいは細胞接着によりチロシンリン酸化され、引き続いてチロシンホスファターゼである SHP-2 が結合する。SHP-2 は 2 個の SH2 ドメインを含む、非受容体型のチロシンホスファターゼである。SHP-2 は、血小板由来増殖因子やインスリン、線維芽細胞増殖因子などの増殖因子やサイトカイン刺激による RAS や MAP キナーゼの活性化に重要な役割を果たしていることが示唆されている。SHP-2 はさらに上皮増殖因子 (epidermal growth factor、以下 EGF と略) による細胞増殖にも重要な役割を果たすことが示唆されている。また、以前から EGF 受容体を過剰発現した NIH3T3 細胞や HepG2 細胞において EGF 刺激により分子量 115kDa のチロシンリン酸化蛋白質が SHP-2 と複合体を形成することが指摘されていた。そこで本論文では EGF により SHPS-1 がチロシンリン酸化され、それに引き続いて SHPS-1 に SHP-2 が結合するか否かを明らかにしようと試みた。

ヒト EGF 受容体を過剰発現した chinese hamster ovary 細胞 (CHO-ER 細胞) を 30nM の EGF で 2 分間刺激した後、SHPS-1 に対するモノクローナル抗体である 4C6 で免疫沈降した。これを抗ホスホチロシン抗体あるいは抗 SHP-2 抗体を用いたウエス

タンブロットにて解析した結果、コントロールに比して EGF で刺激した細胞においては SHPS-1 のチロシンリン酸化の程度と SHPS-1 に結合する SHP-2 の量は著明に増加した (Fig. 1 A, lane 3, 4)。また SHPS-1 の免疫沈降物の中に EGF 受容体と思われる約 180kDa のチロシンリン酸化蛋白質を認めた (Fig. 1 A lane 4) が、この 180kDa の蛋白質は正常マウスの IgG をビーズに結合させたコントロールの免疫沈降物中にも認められたこと、また 4C6 で免疫沈降し、EGF 受容体に対するモノクローナル抗体でプロットしても SHPS-1 と共に EGF 受容体は免疫沈降されなかった (Fig. 1 A, lane 7, 8) ことより、SHPS-1 とチロシンリン酸化された EGF 受容体が共沈したのは非特異的と考えられた。CHO-ER 細胞を 30nM の EGF で刺激すると、1 分から 5 分の間に SHPS-1 のチロシンリン酸化の程度は増加し、15 分までに再び減少した (Fig. 1 B)。EGF 刺激による SHPS-1 のチロシンリン酸化が非常に短時間で観察されることより、おそらく EGF 受容体チロシンキナーゼが直接 SHPS-1 をチロシンリン酸化する可能性が考えられた。実際、部分的に精製した EGF 受容体は in vitro において、大腸菌で作製したりコンビナントの SHPS-1 の細胞内ドメインをチロシンリン酸化し得た。

次に我々は CHO-ER 細胞にラット SHPS-1 を過剰発現させた CHO-ER-SHPS-1 細胞を作製した。外来性に発現させた SHPS-1 の発現量を SHPS-1 に対するポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにて検討した (Fig. 2, lane 1)。CHO-ER-SHPS

-1 細胞に発現する SHPS-1 の量は、CHO-ER 細胞の SHPS-1 の量の約 20 倍あった。EGF で刺激した後、細胞ライセートを外来性に発現させたラット SHPS-1 のみを認識するモノクローナル抗体 2F34 で免疫沈降したところ、SHPS-1 のチロシンリン酸化の程度は、SHPS-1 を過剰発現させた CHO-ER-SHPS-1 細胞において、親株の CHO-ER 細胞のそれより著明に増加していた (Fig. 2, lane3-6)。これらの結果より、EGF 刺激により、SHPS-1 はチロシンリン酸化を受け、SHP-2 を SHPS-1 の細胞内部に結合させる可能性が示唆された。即ち、SHPS-1 は、EGF 刺激による SHP-2 の細胞質分画から細胞膜分画への移動に重要な役割を果たしており、SHP-2 は、チロシンリン酸化された SHPS-1 の細胞内部分に結合した後、これを脱チロシンリン酸化し解離して、さらに下流にシグナルを伝えるものと考えられる。

SHP-2 は、EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化に必須であり、EGF 刺激による細胞増殖のポジティブな調節因子として働くことが示唆されている。そこで我々は、SHPS-1 の過剰発現が EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化に及ぼす効果につき検討した。しかしながら、検討した EGF の濃度では、MAP キナーゼの活性化の程度は、CHO-ER-SHPS-1 細胞と CHO-ER 細胞において有意な差は観察されなかった (Fig. 3A)。加えて、SHPS-1 を過剰発現した場合でも、EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化のタイムコースは CHO-ER 細胞のそれに比べて有意な差はなかった (Fig. 3B

)。Kharitononkov らは最近ラット SHPS-1 のヒトホモログである SIRP  $\alpha$  1 を NIH3T3 細胞において過剰発現させると、EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化は阻害されると報告した。Kharitononkov らと我々との結果が相反するのには 2 つの可能性が考えられる。まず第 1 に、ラットとヒトの種の違いが異なる影響を与えた可能性がある。ただしラット SHPS-1 とヒト SHPS-1 (=SIRP  $\alpha$  1) のアミノ酸レベルでの総一致率と類似率はそれぞれ 65%と 91%と極めて近い相同関係にある。第 2 に、我々の SHPS-1 の発現量に比べて Kharitononkov らの検討での SIRP  $\alpha$  1 の発現量の程度が非常に高い点である。SIRP  $\alpha$  1 を発現することで細胞膜近傍に SHP-2 が多量に集まり、MAP キナーゼの活性化に関与する構成因子をダウンレギュレーションする可能性がある。また、インスリンシグナルにおける SHP-2 のポジティブな役割とは対照的に、CTL-4 に結合する SHP-2 は T 細胞受容体を介する Ras と MAP キナーゼの活性化を阻害すると考えられており、SHP-2 はある条件下ではネガティブな役割も果たすことが示唆される。酵素活性を喪失させた SHP-2 を発現させると、EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化と細胞増殖は阻害されることが示されており、SHP-2 は EGF 刺激による細胞増殖に関してはポジティブな役割を果たすと考えられる。従って、我々は、SHPS-1 と SHP-2 の複合体は、EGF 刺激後の Ras とそれに引き続いて起こる MAP キナーゼの活性化をポジティブに調節すると考えている。しかし、単に SHPS-1 を過剰発

現させるだけでは EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化には影響を与えなかった。

この結果は、EGF 刺激により内因性の SHPS-1 と SHP-2 の間で複合体が形成されるこ

とで、SHP-2 の細胞質から細胞膜近傍への移動に十分である可能性を示唆している。

或いは、全く別の可能性として EGF 刺激によりチロシンリン酸化され SHP-2 に結合す

る Gab-1 といった様な SHPS-1 以外のドッキング蛋白質が存在するかもしれない。実

際、我々は EGF で刺激した CHO-ER 細胞を抗 SHP-2 抗体で免疫沈降した際、Gab-1

とは異なる約~100 kDa のチロシンリン酸化蛋白質が SHP-2 と複合体を形成すること

を観察している (Ochi, Matozaki, and Kasuga 未発表)。この 100 kDa のチロシンリン

酸化蛋白質は、EGF 刺激により SHP-2 を結合させる新規の蛋白質である可能性があり、

予備的実験ではこの蛋白質は細胞質蛋白質であると考えられた。この蛋白質の精製とク

ローニングは、EGF のシグナル伝達経路における SHP-2 の生理的な役割を理解する上

でさらなる情報を与えるものであると考えられる。

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	乙 第 1914 号	氏 名	越智 深
論文題目	Epidermal growth factor stimulates the tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and association of SHPS-1 with SHP-2, a SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (上皮増殖因子によるSHPS-1のチロシンリン酸化と、SH2ドメインを含むチロシンフォスファターゼSHP-2との結合)		
審査委員	主 査 片岡 徹 副 査 南 康博 副 査 中村俊一		
審査終了日	平成 16 年 3 月 12 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

SHPS-1 (SHP substrate-1) は、細胞外領域に 3 個の免疫グロブリン様ドメインと細胞内領域に 4 個の Src ホモロジー-2 (SH2) ドメイン結合配列に相当するチロシンリン酸化モチーフを有する分子量 12 万の受容体型の糖化蛋白質である。SHPS-1 は、インスリンやリゾホスファチジン酸、あるいは細胞接着によりチロシンリン酸化され、引き続いてチロシンホスファターゼである SHP-2 が結合する。SHP-2 は 2 個の SH2 ドメインを含む、非受容体型のチロシンホスファターゼであり、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) による細胞増殖にも重要な役割を果たすことが示唆されている。また、以前から EGF 受容体を過剰発現した NIH3T3 細胞や HepG2 細胞において EGF 刺激により分子量 11.5 万のチロシンリン酸化蛋白質が SHP-2 と複合体を形成することが指摘されていた。そこで本研究者は、EGF による SHPS-1 のチロシンリン酸化と、それに引き続いて SHPS-1 に SHP-2 が結合するか否かを解析した。

ヒト EGF 受容体を過剰発現した chinese hamster ovary 細胞(CHO-ER 細胞)を EGF で刺激すると、SHPS-1 のチロシンリン酸化の程度と SHPS-1 に結合する SHP-2 の量は非刺激コントロールに比して著明に増加した。また、SHPS-1 のチロシンリン酸化が非常に短時間で観察されたので、EGF 受容体チロシンキナーゼが直接 SHPS-1 をチロシンリン酸化する可能性が考えられた。

次に CHO-ER 細胞にラット SHPS-1 を過剰発現させた CHO-ER-SHPS-1 細胞を作製した。EGF 刺激による SHPS-1 のチロシンリン酸化の程度は、CHO-ER-SHPS-1 細胞において、CHO-ER 細胞のそれより著明に増加していた。これらの結果より、EGF 刺激により SHPS-1 はチロシンリン酸化を受け、SHP-2 の SHPS-1 の細胞内部分への結合を引き起こす可能性が示唆された。即ち、SHPS-1 は、EGF 刺激による SHP-2 の細胞質分画から細胞膜分画への移動に重要な役割を果たしており、SHP-2 は、チロシンリン酸化された SHPS-1 の細胞内部分に結合した後、これを脱チロシンリン酸化することにより解離し、さらに下流にシグナルを伝えるものと考えられた。

SHP-2 は EGF 刺激による細胞増殖に関してはポジティブな役割を果たすと考えら

れている。従って SHPS-1 と SHP-2 の複合体は、EGF 刺激後の Ras とそれに引き続いて起こる MAP キナーゼの活性化をポジティブに調節すると考えられる。しかし SHPS-1 を過剰発現させるだけでは、EGF 刺激による MAP キナーゼの活性化には影響を与えなかった。この理由として、EGF 刺激によりチロシンリン酸化され SHP-2 に結合する Gab-1 の様な SHPS-1 以外のドッキング蛋白質が MAP キナーゼの活性化を仲介している可能性が考えられた。実際、本研究者は、EGF で刺激した CHO-ER 細胞を抗 SHP-2 抗体で免疫沈降した際、Gab-1 とは異なる約 100 kDa のチロシンリン酸化蛋白質が SHP-2 と複合体を形成することを観察している。この 100 kDa のチロシンリン酸化蛋白質の精製とクローニングは、EGF のシグナル伝達経路における SHP-2 の生理的な役割を理解する上でさらなる情報を与えるものであると考えられた。

本研究は、細胞接着因子である SHPS-1 について、その上皮増殖因子依存性のチロシンリン酸化とそれに伴うチロシンホスファターゼ SHP-2 との結合を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった上皮増殖因子受容体からの SHPS-1 を介するシグナル伝達機構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。