Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

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。

【１８１】

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ブロットしても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、大腸菌で作製したリコンビナントの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, lane1）。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の細胞内部分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刺激によるによる細胞増殖のポジテイ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）。Kharitonenkovらは最近ラットSHPS-1のヒトホモログであるSIRP α 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。Kharitonenkov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 α 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Kharitonenkovらの検討でのSIRP α 1の発現量の程度が非常に高い点である。SIRP α 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。