# 3BP2の新規会合分子SHP-1を介するマスト細胞活性化調節機構

研究代表者：千原　一泰（医学部、講師）
共同研究者：定　清直（医学部、教授）　竹内　健司（医学部、助教）

| 概　　要 | アダプター蛋白質3BP2はSykにより直接チロシンリン酸化を受け、抗原刺激によるマスト細胞の脱顆粒を促進的に調節する。最近我々は、pervanadate処理をしたマスト細胞の抽出液を用いてプロテオミクス解析を行い、3BP2の新たな会合蛋白質として非受容体型チロシンホスファターゼSHP-1(SH2 domain-containing phosphatase-1)を同定した。その会合様式を解析した結果、SHP-1が3BP2のSH2ドメインに会合し、その会合にSHP-1のTyr564のチロシンリン酸化が必要であることを明らかにした。さらに、SHP-1と3BP2の直接的な会合が抗原刺激したマスト細胞で認められた。野生型SHP-1をマスト細胞に過剰発現させると抗原刺激によるTNF-α産生の上昇が認められるが、3BP2とは会合出来ないTyr564をフェニルアラニンに置換したSHP-1変異体を発現する細胞では野生型ほどの上昇が認められなかった。それゆえ、抗原刺激により活性化したマスト細胞において、3BP2はSHP-1と会合することでTNF-αの産生を促進している可能性が新たに示唆された。 |
|---|---|
| 関連キーワード | マスト細胞、アダプター蛋白質、チロシンリン酸化、3BP2、SHP-1 |

## 研究の背景

アダプター蛋白質3BP2はc-AblのSH3ドメインに会合する分子として同定された。その発現はB細胞、T細胞などのリンパ球に加え、マスト細胞や破骨細胞などのミエロイド系細胞に認められる。これまで、3BP2の生理機能に関する解析はリンパ球を中心に行われてきた。B細胞において3BP2がSykと会合することを皮切りに、Vav1やPLCγ2と会合することが明らかにされた（Deckert *et al.*, *Immunity*, 1994; Foucault *et al.*, *Blood*, 2004)。我々は、3BP2がB細胞受容体の活性化に伴いSykによりチロシンリン酸化されることを見出し、Sykによるチロシンリン酸化がVav1やPLCγ2との複合体形成および転写因子NFATの活性化に必要であることを明らかにした（Shukla *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2009、図１）。一方、我々はミエロイド系細胞、特にマスト細胞における3BP2の生理機能についても解析を行っている。これまで、3BP2がマスト細胞に高レベルで発現しており、IgE受容体刺激に応じてSykによりチロシンリン酸化されることを世界に先駆けて明らかにした。さらに、3BP2のSH2ドメインをマスト細胞に過剰発現させると、IgE受容体刺激による脱顆粒反応が強く抑制されることを見出した（Sada *et al.*, *Blood*, 2002; Miah *et al.*, *Genes Cells*, 2004）。このようにマスト細胞における3BP2の機能解析は、我々が世界の先頭に立って推し進めている。なおごく最近、3BP2が破骨細胞の分化を促進する役割を有することが他のグループにより報告された（Guezguez *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2010)。

## 研究の目的

これまでに行った研究により、3BP2のSH2ドメインをマスト細胞に過剰発現させると、IgE受容体刺激による脱顆粒反応が強く抑制されることが明らかとなっている。この結果は、3BP2のSH2ドメインに会合する分子がIgE受容体シグナルに深く関与している可能性を示唆している。そこで、pervanadate処理をしたマスト細胞から、3BP2のSH2ドメインに会合する蛋白質をプロテオミクス解析により網羅的に探索した。その結果、チロシンリン酸化されたSHP-1が3BP2に会合することを新たに見出した。

本研究の目的はアダプター蛋白質3BP2によるSHP-1の活性制御機構を明らかにし、新たな視点からマスト細胞活性化の分子メカニズムを明らかにすることにある。

具体的には以下の点に焦点をあて解析を行った。

**１．マスト細胞活性化との関連性**

マスト細胞の活性化に3BP2とSHP-1の会合がどのように関連するのか、経時的にモニタリングする。

**２．会合の分子メカニズム**

SHP-1と3BP2の会合にはSHP-1のチロシンリン酸化が必須である。そこで具体的に、どのチロシン残基のリン酸化が必要なのか明らかにする。さらに、SHP-1と3BP2の会合が直接的なものなのか、Far-western法により解析する。

**３．マスト細胞活性化に及ぼす影響**

3BP2とSHP-1の会合がIgE受容体刺激による脱

顆粒反応や、炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響を細胞生物学的に解析する。

## 研究の成果

**１）マスト細胞活性化との関連性**

HA-myc タグを付した 3BP2 を安定に発現するマスト細胞株を樹立し、SHP-1 と 3BP2 の会合を抗 HA 抗体による免疫沈降により解析した。その結果、SHP-1 は抗原刺激に依存して 3BP2 と会合する事が明らかとなった。SHP-1 と 3BP2 の会合が抗原刺激後、経時的に変化することから、両者の会合にチロシンキナーゼとホスファターゼが関与している可能性が示唆された。

**２）会合の分子メカニズム**

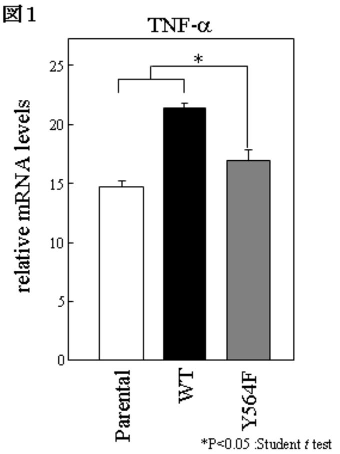
3BP2 の SH2 ドメインは、蛋白質に存在する YEN モチーフという配列に含まれるリン酸化チロシンを認識することが明らかとなっている。SHP-1 には YEN モチーフに相当するチロシン残基が一つ存在する(Tyr564)。そこで Tyr564 を含む SHP-1 の合成ペプチドを作成し、3BP2 との会合を検討したところ、3BP2 はリン酸化型 Tyr564 を含むペプチドにのみ、高いアフィニティーを示した。また、3BP2 は Tyr564 をフェニルアラニンに置換した SHP-1 変異体(Y564F)とは会合出来ないことを明らかにした。さらに Far-western 法を用いた解析から、3BP2 は介在蛋白質を必要とせず、直接リン酸化型 SHP-1 と会合することを明らかにした。以上の結果により、抗原刺激に応じて SHP-1 の Tyr564 がチロシンリン酸化されると、3BP2 が SH2 ドメインを介して SHP-1 と直接会合すると考えられた。

**３）マスト細胞活性化に及ぼす影響**

野生型 SHP-1 及び 3BP2 に会合できない Y564F 変異体を安定に発現するマスト細胞株を作製し、抗原刺激による脱顆粒反応および炎症性サイトカインである TNF-αの産生に及ぼす影響を解析した。その結果、野生型 SHP-1 や Y564F 変異体を過剰発現しても、抗原刺激による脱顆粒反応に影響は認められなかった。一方、野生型 SHP-1 の過剰発現により、TNF-αの産生が強く促進されたが、Y564F 変異体では SHP-1 の過剰発現の効果が著しく減少した（図１）。それゆえ、3BP2 は SHP-1 との会合を介して抗原刺激による TNF-α産生を促進する可能性が新たに考えられた。

今後の課題として、3BP2 との会合が SHP-1 のチロシンホスファターゼ活性に及ぼす影響や、SHP-1 の細胞内局在にどのような影響を与えるのか解析する必要があると考えている。

**図1**




## 特記事項・発表論文など

「特記事項」

＜学術論文＞

① Nakashima, K., Takeuchi, K., Chihara, K., Hotta, H. and Sada, K. Replication of Hepatitis C virus by AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms in Huh-7.5 cells. *in submission*

② Ogi, K., Nakashima, K., Chihara, K., Takeuchi, K., Horiguchi, T., Ueki, Y., Fujieda, S. and Sada, K. Enhancement of B cell receptor signaling by a point mutation of adaptor protein 3BP2 identified in a human inherited disease cherubism. *in submission*

③ Chihara, K., Nakashima, K., Takeuchi, K. and Sada, K. Adaptor protein 3BP2 interacts with SHP-1 and regulates the SHP-1-mediated TNF-α production in antigen-activated RBL-2H3 cells. *manuscript in preparation*

＜日本語総説＞

① 千原一泰、定清直　「関節リウマチ治療における Syk 阻害薬の可能性を探る」，分子リウマチ治療，3(4), 14-17, 2010

＜学会発表＞

① 中島謙治、竹内健司、千原一泰、堀田博、定清直　「エネルギーセンサーAMPK 活性化による C 型肝炎ウイルス複製の抑制」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月

② 扇和弘、中島謙治、シュクラ ウパサナ、千原一泰、藤枝重治、定清直　「アダプター蛋白質 3BP2 の点突然変異による B 細胞シグナル伝達への影響」第 83 回日本生化学学会・第 33 回日本分子生物学会年会合同学会、2010 年 12 月