

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590265

研究課題名（和文） 消化管粘膜上皮細胞に特異的なチロシンホスファターゼ SAP-1 の生理機能の解析

研究課題名（英文） Role of SAP-1, a gastrointestinal-specific protein tyrosine phosphatase

研究代表者

村田 陽二（MURATA YOJI）

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60400735

研究成果の概要（和文）：

研究代表者は腸粘膜上皮細胞の微絨毛に特異的に発現する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 の生理機能と病態的意義の解析を行った。その結果、炎症性腸炎モデルマウスである IL-10 遺伝子破壊マウスを用いた解析から、SAP-1 遺伝子の欠損が腸炎の増悪をもたらすことを見出した。また、SAP-1 によりチロシン脱リン酸化を受ける新規基質候補分子として膜蛋白質 p100 を同定した。さらに、SAP-1/p100 シグナル系が腸粘膜上皮細胞によるケモカイン産生を介して腸管免疫の制御に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

SAP-1 is a receptor-type tyrosine phosphatase that is specifically expressed at the microvillus of intestinal epithelial cells. In this study, the physiological and pathological roles of SAP-1 in the intestine were examined. I showed that the deficiency of *Sap1* contributes to enhance colitis in IL-10 knockout mice, a mouse model for inflammatory bowel disease. I found that p100, a membrane protein, is a novel substrate for SAP-1 in the intestinal epithelial cells. Furthermore, I also found that SAP-1/p100 signal might be involved in the regulation of intestinal immunity through the production of chemokines by intestinal epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：チロシンホスファターゼ、腸粘膜上皮細胞、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

蛋白質チロシンリン酸化シグナル伝達系は、細胞の増殖、分化、接着、運動などの細

胞機能制御に重要な役割を果している。このシグナル伝達系は蛋白質チロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼと脱リン酸化を担

うチロシンホスファターゼが基質蛋白質（シグナル伝達分子など）のリン酸化状態を厳密に制御することで成り立っている。一方、このリン酸化状態のバランスの破綻は、自己免疫疾患、がん、神経疾患などの発症に深く関与することが示唆されている。チロシンホスファターゼは、構造上、細胞質内に局在する細胞質型と細胞膜上に局在する受容体型に分類されており、ヒトではそのゲノムデータベースの解析から100種類以上ものチロシンホスファターゼが存在することが確認されている。しかしながら、個々のチロシンホスファターゼの生理機能およびその異常と疾患との関わりについては十分に明らかとはなっていない。

SAP-1は細胞外領域に複数のフィブロネクチンタイプIII様ドメインをもち、細胞領域内に1つのチロシンホスファターゼ（PTP）ドメインをもつ受容体型のチロシンホスファターゼであり、大腸や小腸の粘膜上皮細胞においてその微絨毛に特異的に発現し局在することをこれまでに研究代表者らは明らかにしていた。一方、このSAP-1の腸粘膜上皮細胞における生理機能の解析を行うため、SAP-1遺伝子破壊（KO）マウスの作製を行ったが、SAP-1 KOマウスは正常に発生し、成体マウスでは腸管の形成、小腸粘膜上皮細胞および、その微絨毛の形成や形態、細胞間接着に顕著な異常は認められなかった。しかし、腸疾患とSAP-1との関連性について検討する目的で、SAP-1 KOマウスを用い、炎症性腸炎のモデルマウスの作製を試みたところ、SAP-1の遺伝子欠損により、腸炎の重症度と発症率が高度になる可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、腸粘膜上皮細胞による腸管免疫制御の観点から、SAP-1の生理機能を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 腸炎モデルマウスの作製と評価

腸管における免疫制御の異常は、炎症性腸炎の発症につながる事が知られている。抑制性サイトカインであるIL-10の遺伝子破壊マウスは、炎症性腸炎を発症することから、一般的に、炎症性腸疾患のモデルマウスとして広く用いられている。そこで、SAP-1と腸管免疫制御の関連性を評価する目的で、IL-10 KOマウスとSAP-1 KOマウスとの交配を行い、野生型マウス、SAP-1 KOマウス、IL-10 KOマウス、SAP-1/IL-10二重遺伝子欠損(DKO)マウスについて、腸炎の発症度および重症度、また、腸管におけるサイトカイン・ケモカイン産生、腸粘膜上皮細胞構造や細胞間接着構造などについて検討した。腸炎の発症度および重症度は、Disease Activity Index (1. 便

の堅さ、2. 血便の有無、3. 脱肛の程度)および組織学的解析に基づき点数化することで評価した。

(2) チロシンリン酸化蛋白質の単離と同定

SAP-1 KOマウス由来腸粘膜上皮細胞の微絨毛膜画分を調整し、抗リン酸化チロシン抗体によるチロシンリン酸化蛋白質のアフィニティー精製および質量分析を行うことで、複数のチロシンリン酸化蛋白質の単離と同定を試みた。

(3) p100の機能解析

p100のSAP-1による脱リン酸化、p100のチロシンリン酸化部位、また、p100を介した細胞の機能制御につき、培養細胞およびSAP-1 KO、SAP-1/IL-10 DKOマウスを用い、生化学的、分子細胞生物学的手法にて解析した。

4. 研究成果

(1) IL-10/SAP-1 DKOの解析

野生型マウス、SAP-1 KOマウス、IL-10 KOマウス、SAP-1/IL-10 DKOマウスにおける腸炎の発症、および重症度について検討したところ、野生型マウス、SAP-1 KOマウスにおいては、腸炎の発症等は認められなかったが、IL-10 KOマウス単独に比べ、SAP-1/IL-10 DKOマウスにおいて、著明に腸炎の発症度および重症度が亢進することが明らかとなった。また、この結果と一致して、腸粘膜におけるIL-1、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生量が、野生型マウス、SAP-1 KOマウス、IL-10 KOマウスに比べSAP-1/IL-10 DKOマウスでは有意な増加が認められた。これらの結果から、腸粘膜上皮細胞のSAP-1が腸炎の病態形成に関与することが示唆された。さらに、抗生剤投与により、腸炎の発症率、重症度ともに低下することから、SAP-1/IL-10 DKOマウスにおける腸炎の病態形成やその維持には、腸内細菌叢が密接に関与することが示唆された。一方、腸炎の増悪化の原因として、SAP-1遺伝子欠損に伴う、上皮細胞の細胞増殖能や形態、細胞間接着の異常等が考えられるが、SAP-1 KOマウスにおいて、上皮細胞の増殖能、細胞形態、上皮細胞間の接着構造や透過性などに顕著な異常は認められなかった。

SAP-1がチロシンホスファターゼであることから、SAP-1の遺伝子欠損によるIL-10 KOマウスでの腸炎の増悪化には腸管粘膜上皮細胞での何らかの蛋白質のチロシンリン酸化の亢進が関与する可能性が高いと考えられた。そこで、抗リン酸化チロシン抗体による腸組織の免疫染色を試みたところ、野生型マウスに比べSAP-1 KOマウスでは、小腸および大腸においてSAP-1が本来存在する腸粘

膜上皮細胞のアピカル面（微絨毛部位）での蛋白質のチロシンリン酸化の亢進が認められた。この結果と一致して、腸組織より腸粘膜上皮細胞の微絨毛膜画分（MVM）の粗精製を行い、抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロットを試みたところ、100 kDa 付近に、野生型マウスに比べ SAP-1 KO マウス由来 MVM においてチロシンリン酸化が顕著に亢進する蛋白質の存在が認められた。これらの実験結果から、SAP-1 の遺伝子欠損により、腸粘膜上皮細胞の MVM における蛋白質チロシンリン酸化の亢進が、SAP-1/IL-10 DKO マウスで認められた腸炎の増悪化に寄与する可能性が高く、チロシンリン酸化蛋白質の一つとして p100 の関与が考えられた。

(2) リン酸化蛋白質の単離と同定

抗リン酸化チロシン抗体を用いたアフィニティー精製および質量分析を行い、100 kDa 付近のチロシンリン酸化蛋白質の単離同定を試みた。その結果、100 kDa 付近のチロシンリン酸化蛋白質として一回膜貫通型の膜蛋白質である p100 を単離同定することができた。

(3) p100 のチロシンリン酸化に関する解析

p100 に対する特異抗体を作製し、MVM における p100 のチロシンリン酸化の程度についてウェスタンブロットにて評価検討したところ、野生型マウスに比べ SAP-1 KO マウスでは、p100 のチロシンリン酸化の亢進が認められた。さらに、p100 が SAP-1 の基質候補分子であるについて検討した。*in vitro* におけるチロシンリン酸化 p100 の SAP-1 による脱リン酸化の有無について、精製した SAP-1 のホスファターゼドメイン蛋白質とチロシンリン酸化を受けた p100 とを用い解析した結果、p100 が直接 SAP-1 により脱リン酸化を受けることが明らかとなった。一方、腸組織における SAP-1 と p100 の免疫染色から、両者が腸粘膜上皮細胞のアピカル面に存在し、おそらくは微絨毛部位にて局在が一致すると考えられた。また、培養細胞での SAP-1 および p100 の過剰発現実験から、両者が複合体を形成することが確かめられた。これらの実験結果から、p100 が SAP-1 の基質分子であると強く示唆された。

アミノ酸配列から p100 は細胞内領域に 4 つのリン酸化を受ける可能性の高いチロシン残基が存在すると考えられた。そこで、細胞内領域の 4 つのチロシン残基をすべてまたは一部をフェニルアラニン残基に置換した変異体を作製し、培養細胞を用い、p100 変異体の過剰発現、および pervanadate によるチロシンホスファターゼ活性の阻害を行い、p100 のチロシンリン酸化部位の同定を試みた。その結果、カルボキシル末端側の 3 つの

チロシン残基がリン酸化を受ける可能性が高いと考えられた。また、チロシンキナーゼの阻害剤を用いた実験等から、このチロシンリン酸化には Src ファミリーチロシンキナーゼが関与すると考えられた。

(5) p100 の生理機能の解析

腸管上皮細胞は、ケモカインなどを分泌し免疫系細胞の機能を制御することで腸管免疫制御に関与することが知られている。そこで、腸管上皮細胞に発現する p100 がケモカイン産生などを通じて免疫系細胞の機能に関与するかについて検討を試みた。その結果、培養細胞を用いた解析から、p100 がケモカイン産生の誘導に関与するとともに、p100 の細胞内領域のチロシンリン酸化が p100 を介したケモカイン産生に重要であることが示唆された。また、興味深いことに、p100 を過剰発現した細胞では、p100 に対する特異抗体でコートされたビーズ（直径 2 μm）を取り込む活性（食食活性）を示し、この食食活性にも細胞内のチロシンリン酸化が関与することが示唆された。腸管上皮細胞の微絨毛は、常に食物抗原や常在菌と接している。従って上記の実験結果は、p100 が受容体型の膜蛋白質であることから、その細胞外領域を介して腸管内腔の食物抗原や常在菌を感知し、それらを上皮細胞内に取り込むことで、ケモカイン産生などを通じて腸管免疫を制御する可能性を示唆するものであるとも考えられた。また、SAP-1/IL-10 DKO マウスで認められた腸炎の増悪化に p100 のチロシンリン酸化状態の異常が関与する可能性を示すものであるとも考えられる。

p100 の SAP-1/IL-10 DKO マウスで認められた腸炎の増悪化への関与と p100 の生理機能をより詳細に解析する目的で、p100 のエクソン 1 およびエクソン 2 を neo カセットに置き換え、ヘテロに p100 遺伝子の一部を欠損した ES 細胞株を複数樹立した。さらに、樹立した 2 種類の ES 細胞株を用い、キメラマウスの作製を行い、最終的に異なる 2 種類の ES 細胞株から作製された p100 KO マウスを得ることができた。現在、SAP-1/IL-10/p100 三重遺伝子欠損マウスの作製を行い、腸炎の発症度、重症度につき解析を進めている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 13 件）

- (1) Kaneko T., Saito Y., Kotani T., Okazawa H., Iwamura H., Sato-Hashimoto M., Kanazawa Y., Takahashi S., Hironuma K., Kusakari S.,

- Kaneko Y., Murata Y., Ohnishi H., Nojima Y., Takagishi K., and Matozaki T.
Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity.
J. Immunol., 188, 5397-5407, 2012 査読あり
DOI: 10.4049/jimmunol.1103210.
- (2) Maruyama T., Kusakari S., Sato-Hashimoto M., Hayashi Y., Kotani T., Murata Y., Okazawa H., Oldenborg P.-A., Kishi S., Matozaki T., and Ohnishi H.
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain.
J. Neurochem., 121, 891-902, 2012 査読あり
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07748.x.
- (3) Ohnishi H., Murata Y., Okazawa H., and Matozaki T.
Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior.
Trends Neurosci., 34, 629-637, 2011 査読あり
DOI: 10.1016/j.tins.2011.09.005.
- (4) Sato-Hashimoto M., Saito Y., Ohnishi H., Iwamura H., Kanazawa Y., Kusakari S., Kotani T., Mori M., Murata Y., Okazawa H., Ware CF., Oldenbrg PA., Nojima Y., and Matozaki T.
Signal regulatory protein α regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen.
J. Immunol., 187, 291-297, 2011 査読あり
DOI: 10.4049/jimmunol.1100528.
- (5) Matozaki T., Murata Y., Mori M., Kotani T., Okazawa H., and Ohnishi H.
Expression, localization, and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals.
Cell. Signal., 22, 1811-1817, 2010 査読あり
DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.07.001.
- (6) Murata Y., Mori M., Kotani T., Supriatna Y., Okazawa H., Kusakari S., Saito Y., Ohnishi H., and Matozaki T.
Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn.
Genes Cells, 15, 513-524, 2010 査読あり
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01398.x.
- (7) Mori M., Murata Y., Kotani T., Kusakari S., Ohnishi H., Saito Y., Okazawa H., Ishizuka T., Mori M., and Matozaki T.
Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins.
J. Cell. Physiol., 224, 195-204, 2010 査読あり
DOI: 10.1002/jcp.22122.
- [学会発表] (計 29 件)
- (1) 村田 陽二
Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (2) Edwin Widyanto Daniwijaya
Tyrosine phosphorylation of CEACAM20 and its functional roles
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京

- (3) 小谷 武徳
Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiations and induces autoimmunity
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (4) 草苺 伸也
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain
第10回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2013年02月07日~2013年02月09日, 東京
- (5) 橋本 (佐藤) 美穂
脾臓T細胞の恒常性調節へのSIRP α の関与
第85回日本生化学会大会、2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
- (6) 草苺伸也
細胞質型チロシンホスファターゼShp2の成熟脳における機能解析
第85回日本生化学会大会、2012年12月14日~2012年12月16日, 福岡
- (7) Kemala Isnainiasih Mantilidewi
Roles of vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in endothelial cells
2nd Bandung Biomolecular Medicine Conference, 2012年10月05日~2012年10月06日, インドネシア・バンドン
- (8) 草苺伸也
成熟脳における Shp 2 の生理機能解析
第5回プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2012年1月19日, 大阪
- (9) 小谷武徳
腸微絨毛特異的な発現を示す受容体型チロシンホスファターゼSAP-1による腸管免疫制御
第5回プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2012年1月19日, 大阪
- (10) 金子哲也
Dendritic cell-specific depletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1

promotes Th1 differentiation and autoimmunity

第40回日本免疫学会学術集会, 2011年11月29日, 千葉

- (11) 森 宗昌
Shear stress regulates cellular localization of vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP).

発がんスパイラル第1回国際シンポジウム&第9回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス, 2011年2月3日, 東京

- (12) 村田 陽二
血管内皮細胞のシェアストレス刺激応答における VE-PTP の機能解析
BMB2010 第33回日本分子生物学会年会
第83回日本生化学会大会 合同年会, 2010年12月10日, 神戸

- (13) 小谷 武徳
腸微絨毛特異的な発現を示す受容体型チロシンキナーゼSAP-1とIL-10による炎症性腸疾患の制御
BMB2010 第33回日本分子生物学会年会
第83回日本生化学会大会 合同年会, 2010年12月10日, 神戸

〔図書〕(計1件)

- (1) 小林孝安, 他、羊土社、シグナル伝達キーワード“プロテインホスファターゼ”、2012、27

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signa/Home.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
村田 陽二 (MURATA YOJI)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60400735