

特集：プロテオミクス

プロテオミクスによる腎組織タンパク質解析 —糸球体上皮細胞スリット膜リン酸化シグナルの解析を例に—

張田 豊

はじめに

近年、腎臓における血漿の濾過障壁を構成する構造と分子メカニズムの解明が進んでおり、とりわけ、糸球体上皮細胞がタンパク尿および腎機能低下に大きな役割を果たすことがわかっている。なかでもこの細胞の構造、特に特徴的な足突起構造と、細胞間接着装置であるスリット膜について多くの検討が行われており、その疾患発症メカニズムとのかかわりに注目が集まっている。本稿ではタンパク質複合体や翻訳後修飾の機能解析の一例としてスリット膜リン酸化シグナルを例にとり、実際にプロテオミクス技術を用いて行った解析について概説する。

シグナル複合体としてのスリット膜

Nephrin, podocin などから形成される糸球体上皮細胞スリット膜は、単なる接着構造としてのみでなく、糸球体上皮細胞の形態、分化、生存などさまざまな機能を修飾するシグナル複合体として機能する^{1,2)}。とりわけ Src ファミリーキナーゼ(SFK)がそのなかで大きな役割を果たしていると考えられており、それは、SFK の Fyn および Yes のノックアウトマウスでは部分的ではあるものの足突起の癒合(effacement)が見られ、タンパク尿を生じること^{3,4)}、また、複数のスリット膜複合体のタンパク質(nephrin, neph1, TRPC6)が SFK の基質となるためである。最近では、スリット膜タンパク質の細胞内領域のリン酸化に伴い、さまざまなアダプタータンパク質、キナーゼが SH2 ドメインを介して結合し、その結果、セカンドメッセンジャーの変化や細

胞骨格の変化をきたす、すなわち、スリット膜複合体が T 細胞受容体やチロシンキナーゼ受容体と相同性を持つダイナミックなシグナル複合体を形成していることが明らかとなってきた。

ゲノム情報のみでは解析が不可能なタンパク質のリン酸化を含めた翻訳後修飾の検討に質量分析は威力を発揮する。われわれは、プロテオミクス技術を用いてスリット膜タンパク質である nephrin や neph1 のリン酸化部位の同定、およびリン酸化依存的な結合タンパク質および複合体の解析を行い、スリット膜の新たな機能を探っている。

1. Nephrin のチロシンリン酸化

Nephrin は腎発達期や糸球体の傷害時にその細胞内領域がチロシンリン酸化を受ける^{5,6)}。スリット膜複合体のリン酸化の機能解析として、まずわれわれは nephrin のチロシンリン酸化部位の同定を試みた。nephrin 細胞内領域タンパク質を GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)融合タンパクとして大腸菌で発現し、これを精製したものを *in vitro* で SFK の一つである Fyn によりリン酸化させる。このタンパク質を液相でトリプシン消化して生じたペプチドを MALDI-TOF 型質量分析計により解析した。リン酸化したタンパク由来のペプチドスペクトルをリン酸化させていないコントロールのスペクトルと比較することでリン酸化したペプチドを同定しうる(図 1)。原理としては、ペプチドのリン酸化により 80Da 質量が大きくなったピークを同定しうる場合、また、リン酸化することにより非リン酸化ペプチドのイオン化傾向が変化し、ピークが低下した場合、ペプチドのリン酸化として検出できる。これにより nephrin についてはすべての細胞内領域のチロシンが *in vitro* でリン酸化されうること、そのなかでも特に 3 つのチロシンがリン酸化を受けやすいことを見出した(図 2)。

次に、リン酸化 nephrin に特異的に結合するタンパク質の同定を試み、GST 融合 nephrin 細胞内領域タンパク質を

Analysis of phosphorylation signaling at the podocyte slit diaphragm using mass spectrometry

横浜市立大学医学研究科分子細胞生物学, 同 生命ナノシステム研究科生体超分子相関科学

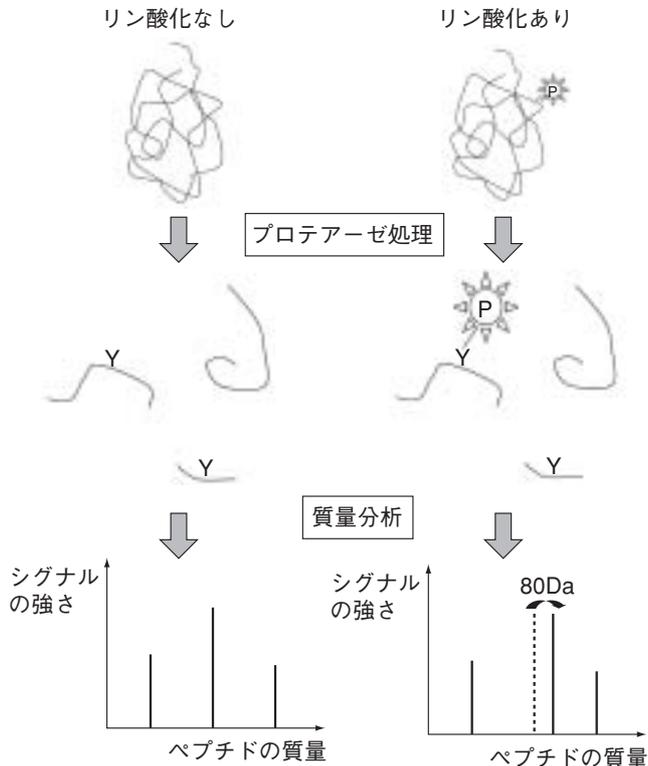


図 1 ペプチド質量分析を用いたリン酸化部位の同定

in vitro でリン酸化し、それに HEK293T 細胞の溶解液、あるいはラット単離糸球体溶解液を反応させ、結合したタンパク質を SDS-PAGE で展開し銀染色を行った。その結果、リン酸化した nephrin 細胞内領域にのみ結合する特異的なバンドを同定し得た(図 3a)。このバンドを切り出し peptide mass fingerprinting 法により解析し、結合タンパク質を同定した。質量分析および Western blot により phospholipase C(PLC)- γ , Nck, Crk ファミリータンパク質, p85(PI3-kinase)がリン酸化依存的に nephrin に結合することが明らかになった(図 3b)。Nck についてはその SH2 ドメインが nephrin の複数のリン酸化チロシン残基に結合すること、また、この結合を介して nephrin 直下のアクチンの重合が促進することから、nephtrin のリン酸化が糸球体上皮細胞の特徴的な足突起のアクチン細胞骨格系を制御している可能性が示唆されている^{5,7)}。Nck1/2 を特異的にこの細胞でノックアウトすることにより、正常の足突起構造を保てないことから Nck の役割が示唆される⁷⁾。nephtrin がリン酸化される腎の発達時⁵⁾、および糸球体上皮細胞傷害モデルの回復期には足突起の形成/再形成が行われると考えられるため、nephtrin のリン酸化が Nck を足突起にリクルートし、

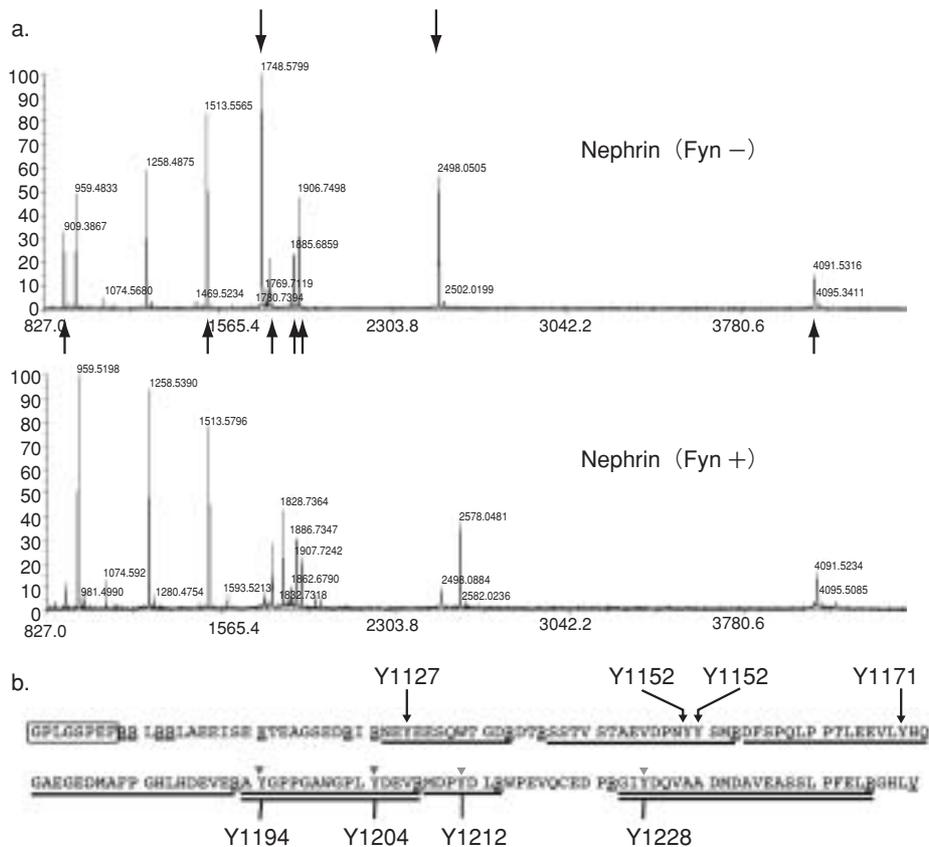


図 2 Nephtrin 細胞内領域のリン酸化によるペプチド質量の変化
b. a のスペクトルから強くリン酸化されるペプチド(二重下線)を同定した。(文献 6 から引用)

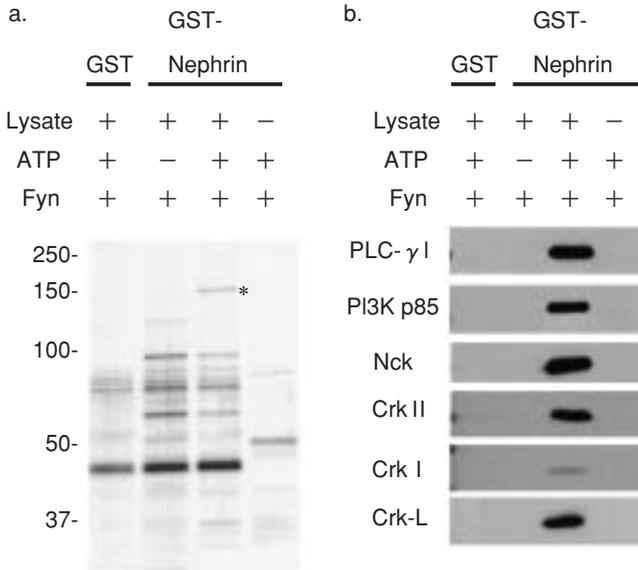


図 3 Nephrin 細胞内領域のリン酸化による結合タンパク質の変化

a のバンドを切り出し、リン酸化 nephrin 特異的な結合タンパク質として PLC- γ を同定した。b. 多くのシグナル分子がリン酸化 nephrin に結合する。(文献 6 から引用)

その下流でアクチン骨格系を制御することが必要なのではないかと議論されている。

PLC- γ もまた SH2 ドメインを介して nephrin の特定のチロシン(Tyr1204)に結合する。nephrin はその細胞外領域に対する抗体を用いてクラスタリングすることにより、SFK によりリン酸化を受けることが知られているが、われわれはこのクラスタリングによる nephrin のリン酸化が PLC- γ の膜移行をきたし、PLC- γ の活性化、それに引き続く IP₃ の産生を促し、細胞内のカルシウム濃度の上昇をきたすことを明らかにした(図 3, 4)⁶⁾。ラットの糸球体上皮細胞傷害モデルであるプロタミン硫酸還流モデルで、nephrin の Y1204 がリン酸化を受けていること、また、健康ラットで糸球体上皮細胞の細胞質に存在する PLC- γ が傷害により細胞膜に局在することから、nephrin のリン酸化とその下流での PLC- γ の活性化が *in vivo* でも起こることが推察され、スリット膜のリン酸化が Ca²⁺ シグナルを介してこの細胞の傷害の引き金になりうる可能性が示唆されている⁶⁾。

近年、この細胞の Ca²⁺ シグナルの変化が直接病態発症につながる事が報告されている。スリット膜に存在するカチオンチャネルである TRPC6 チャネルの活性型変異で糸球体上皮細胞の形態異常が起こり、ネフローゼの一種である巣状糸球体硬化症が惹起される⁸⁾。また、腎疾患の治療

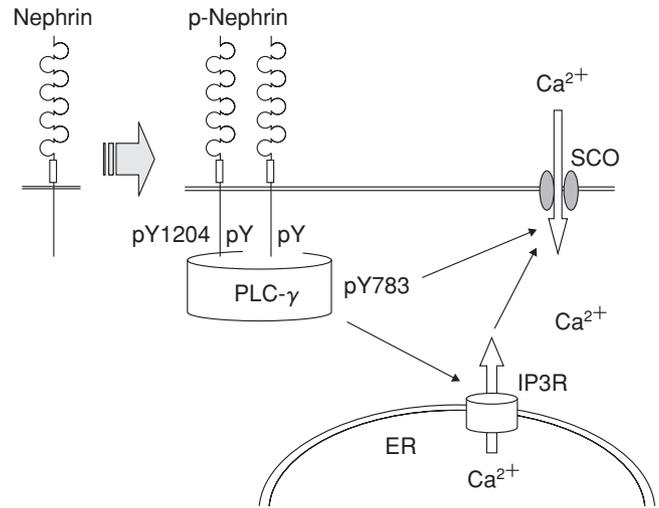


図 4 Nephrin 細胞内領域のリン酸化による細胞内 Ca²⁺ 濃度変化のメカニズム

薬で使用されるカルシニューリン阻害薬(カルシニューリンは細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を契機に活性化される)がこの細胞に直接働いて傷害を受けた上皮細胞の治癒に役立つことも明らかになっている⁹⁾。これらの結果から、nephrin のリン酸化がこの細胞の傷害時の Ca²⁺ 濃度上昇の端緒になっている可能性も示唆される。

2. Neph1 のチロシンリン酸化

Neph1 は nephrin と同様にスリット膜を構成する膜タンパク質で、nephrin や podocin など他のスリット膜タンパク質と結合する。われわれは、nephrin と同様にスリット膜を構成する膜タンパク質である neph1 も同様に、ポドサイト傷害モデルの糸球体でリン酸化していることを明らかにし、neph1 のチロシンリン酸化の機能解析を行った¹⁰⁾。培養糸球体上皮細胞にフォスファターゼ阻害薬である vanadate を反応させることにより neph1 がチロシンリン酸化されるが、これが SFK の阻害薬により抑制されることから、neph1 の主なキナーゼは nephrin と同様 SFK であることが判明した。そこで *in vitro* で neph1 の細胞内領域タンパク質を Fyn によりリン酸化させ、それに由来するペプチドを質量分析計で解析することにより、neph1 のリン酸化されるチロシン残基の同定を行った。複数の neph1 細胞内領域のチロシン残基が Fyn によりリン酸化を受け、特に隣り合った Y637, Y638 を含むペプチドが強くリン酸化を受けることが明らかになった。MALDI-TOF 型質量分析計による解析では、1 つのペプチド中に複数のチロシンがある場合、どのチロシンがリン酸化を受けたかを判定することは不可能である。そこで特定の質量を持つ分子を選び出し、

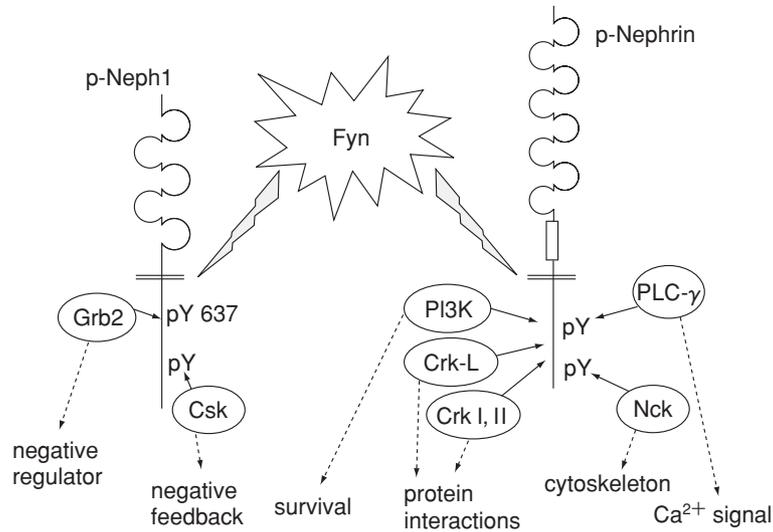


図 5 細胞内シグナルプラットフォームとしてのスリット膜複合体のダイナミクス

それをアルゴンガスと衝突させて断片化し、その断片の質量を解析する Q-TOF 型の質量分析計を用いた解析を行った。この解析により、neph1 細胞内領域の Y637 および Y638 両者がチロシンリン酸化を受けることが明らかになった。

リン酸化 neph1 の結合タンパクについて GST-neph1 細胞内領域を *in vitro* でリン酸化したものに糸球体溶解液を反応させ、結合したタンパク質を解析した。それによりリン酸化 neph1 にアダプタータンパク質 Grb2 やチロシンキナーゼ Csk が特異的に結合すること、特に Grb2 は neph1 の Y637, Y638 のリン酸化に依存して結合し、その結合により Fyn による ERK の活性化を抑制する、すなわち neph1 のリン酸化が細胞内のシグナル伝達を修飾することを明らかにした¹⁰⁾。neph1 のリン酸化についてはまた、Garg らが³⁾、nephrin のクロスリンクによるリン酸化により neph1 もリン酸化され、さらに neph1 と Grb2 との結合により nephrin の Nck を介したアクチンの重合を促進するなど、nephrin と neph1 は協調的なシグナル複合体を形成していることも報告している¹¹⁾。興味深いことに、これときわめて類似するシステムが vaccinia ウイルスが宿主に侵入する際に知られている¹²⁾。これは、ウイルスが A36R というタンパク質を宿主細胞膜に挿入し、A36R が Fyn によりリン酸化されることにより Nck と Grb2 をリクルートし、それらが協調的にアクチンを重合させる、というものである。スリット膜複合体も、特徴的な足突起の形成、維持に同様の複合体としてのシグナル伝達が必要である可能性が示唆される。

おわりに

プロテオミクスは強力なツールであり、ゲノミクスでは解析対象にならないタンパク質複合体や翻訳後修飾などの変化をとらえる際に威力を発揮する。プロテオミクス技術を用いて行ったタンパク質複合体やそのリン酸化シグナルの解析により、スリット膜のダイナミックな接着構造が糸球体上皮細胞内のさまざまなシグナル伝達を担っている可能性が示唆された(図 5)。タンパク尿の根本的な発症機序の解明と、特異的な治療法の開発を目標として、今後、糸球体上皮細胞の形態変化、あるいは生存にかかわるシグナル伝達系の研究にさらに焦点が当てられると思われる。

文 献

1. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006 ; 2 : 271-282.
2. Tryggvason K, Pikkarainen T, Patrakka J. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell* 2006 ; 125 : 221-224.
3. Yu CC, Yen TS, Lowell CA, DeFranco AL. Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol* 2001 ; 11 : 34-38.
4. Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK, Wiggins RC, Killen P, Holzman LB. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 20716-20723.
5. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin

- polymerization. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1346-1359.
6. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. Phosphorylation of nephrin triggers Ca^{2+} signaling by recruitment and activation of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 8951-8962.
 7. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, Huang H, Larose L, Li SS, Takano T, Quaggin SE, Pawson T. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 2006 ; 440 : 818-823.
 8. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005 ; 308 : 1801-1804.
 9. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008 ; 14 : 931-938.
 10. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Hattori S. Neph1, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine-phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 9177-9186.
 11. Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB. Neph1 cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol* 2007 ; 27 : 8698-8712.
 12. Scaplehorn N, Holmstrom A, Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Way M. Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* 2002 ; 12 : 740-745.