

■図3 ヒトHEXIM1の一次構造

ヒトHEXIM1は359アミノ酸(a.a.)からなる核タンパク質。塩基性アミノ酸リッチな領域(BR)は核移行に必須であるほか、7SK snRNA、グルココルチコイドレセプター(GR)、また、HEXIM1分子内の酸性アミノ酸リッチな領域と結合する。疎水性アミノ酸リッチな領域は、HEXIM1の二量体化および7SK snRNA存在下におけるcyclin T1との結合に重要。プロリンリッチな領域は、HEXIM1のCdk9抑制活性を負に調節する。

ウスの心筋において約1/3まで減少していた。さらに、培養心筋細胞を用いて、Cdk9の活性化、PGC-1 α の発現量の低下、PGC-1 α の下流遺伝子発現の低下との因果関係を検討した結果、Cdk9の活性化によってPGC-1 α の発現量低下が起こり、続いて、PGC-1 α の下流にあるミトコンドリアエネルギー産生酵素の発現低下を招くこと、反対にPGC-1 α の発現を外因性に補うことによってCdk9の活性化に伴う心筋細胞のアポトーシスに対する感受性の亢進が救済された。以上の結果から、Cdk9の活性化はストレス下における心筋収縮力の低下、アポトーシスに対する感受性の亢進を引き起こしているということが明らかになった(図2)。

IV Cdk9の活性化の分子メカニズム

Cdk9は他のcyclin依存性キナーゼとは異なり、細胞周期の進行と直接関係しないユニークなメカニズムによって、そのキナーゼ活性が可逆的に調節されている。細胞核内のCdk9-cyclin T1ヘテロダイマーは7SK snRNA (7SK small nuclear RNA) および核タンパク質HEXIM1 (hexamethylene bisacetamide (HMBA) -inducible protein 1/CLP-1/MAQ1/EDG1) と結合して7SK snRNPを形成することによって、そのキナーゼ活性を抑制される⁷⁾。7SK snRNAはRNAポリメラーゼIIIによって転写される約330ヌクレオチドからなる豊富な(細胞あたり 2×10^5 コピー)核内低分子RNAで、脊椎動物で高度に保存されている。

HEXIM1は当初、ヒト血管平滑筋細胞において増殖抑制・分化誘導剤HMBAによってmRNAレベルで発現誘導される遺伝子としてクローニングされた。ヒトHEXIM1は359アミノ酸からなり、おおまかに4つのアミノ酸領域に分けられる(図3)。中央付近の塩基性アミノ酸リッチな領域(basic region: BR)は核移行シグナルとして機能するほか、7SK snRNAの非存在下でC末端寄りの酸性アミノ酸リッチな領域と分子内相互作用する。また、BRはRNA結合モチーフの1つとして知られるアルギニンリッチモチーフを形成し、7SK snRNAと結合する。この結合はBRと酸

性アミノ酸リッチな領域との相互作用を阻害し、7SK snRNA依存的なHEXIM1の立体構造変化を引き起こし、cyclin T1との結合を誘導して7SK snRNPの形成に寄与する。C末端側の疎水性アミノ酸リッチな領域は、HEXIM1の二量体化および7SK snRNA存在下におけるcyclin T1との結合に重要である。N末端寄りのプロリンリッチな領域は、HEXIM1のCdk9抑制活性を負に調節する機能がある。HEXIM1のホモログHEXIM2はN末端側を除きHEXIM1と非常に相同性の高いアミノ酸配列を持っており、HEXIM1と同様なCdk9活性制御機構に関わる可能性が示唆されているが、多くの組織においてHEXIM1に比べて発現量が低く、その寄与は明らかでない。

7SK snRNPの解離・形成は可逆的で、不活性型Cdk9と活性型Cdk9の核内における量的なバランスの迅速な調節に重要な役割を果たしていると考えられている。最近、その制御機構として、hnRNP Qなどのpre-mRNAスプライシング因子が、7SK snRNAに結合することによってCdk9-cyclin T1とHEXIM1の結合を阻害し、転写伸長反応を促進するモデル⁸⁾、また細胞内のATPがHEXIM1のBRに結合することによって7SK snRNPの解離を促進し、利用可能なエネルギーの量に応じてCdk9活性を調節するモデルが提唱されている。一方、筆者らはHEXIM1のBRが、核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子、グルココルチコイドレセプター(glucocorticoid receptor: GR)に直接結合し、グルココルチコイド応答遺伝子プロモーターへのGRのリクルートメントおよびGRと転写共役因子との相互作用を抑制して、ホルモンシグナル依存的なmRNA発現を抑制することを示した⁹⁾。さらに、この特異的なmRNA発現抑制は、7SK snRNAに結合せずCdk9活性を抑制しないHEXIM1組換え変異体も引き起こすことから、Cdk9抑制とは独立した機構によることを示した。HEXIM1のGR結合、7SK snRNA結合はどちらもHEXIM1のBRに依存し、HEXIM1-GR複合体は核内で7SK snRNPと独立に存在することから、グルココルチコイドホルモン依存的なGRの核移行が、HEXIM1を介して7SK snRNPの解離を誘導しCdk9の活性バランスの制御に関わることも想定される。

HEXIM1の発現は幅広い組織・細胞において認められるが、その発現量は様々である。また、上述の血管平滑筋細胞以外でもHMBやUV照射などのストレス刺激によって発現誘導が認められるほか、組織の発生段階においてもその発現量が制御されている。例えば、マウス心臓の発生段階において、出生前は高発現しているが、出生とともにその発現量は減少する。HEXIM1ノックアウトマウスは、胎生16.5日ごろに心筋のZ帯が観察されなくなるなどの異常を来し、出生前に著名な左心室肥大を呈して致死となる¹⁰⁾。このことは、出生前の心臓においてHEXIM1がCdk9活性を抑制することにより、無計画なRNA/タンパク質量の増加の結果引き起こされる心肥大、さらには心不全への進行をくい止めていると解釈することが可能である。HEXIM1/2はCdk9と安定な複合体を形成してその活性を抑制する、現在のところ唯一のCdk9特異的インヒビタータンパク質であり、その活性制御機構の詳細な解明は、Cdk9を中心とする転写伸長制御機構の理解の進展に寄与するであろうと注目されている。

おわりに

Cdk9は、後天性免疫不全症候群(エイズ)の原因ウイルスであるHIV-1の転写・複製に必要な宿主因子としても知られている。ウイルス由来の因子を直接の標的とした治療法は、高頻度の突然変異による薬剤耐性株の出現が大きな問題となるが、Cdk9などの宿主由来の因子を標的とした治療法、すなわちflavopiridol, seliciclib, DRBといったCdk9特異的阻害剤を応用した創薬により、この問題を軽減できると考えられてきた。しかしながら、Cdk9は、RNAポリ

メラーゼIIを介する遺伝子発現にとって普遍的に必要な酵素であり、この活性をおしなべて抑制することは細胞の正常な機能の破綻を引き起こすことが予想される。実際、上記のCdk9阻害剤は、ヒト末梢血由来T細胞などにおいてHIV-1の増殖を抑制するが、同時に無視できない細胞毒性を併せ持つ。Cdk9を心不全治療の標的分子として考えた場合においても、この問題は程度の差はあれ、未解決のまま同様に存在する。したがって、病的状態下における過剰な活性化を選択的に抑制するような治療が理想的である。その意味でも、Cdk9の活性そのものを抑制するよりはむしろ活性化を引き起こす上流のシグナル伝達経路を標的とした治療が好ましいと考えられる。心肥大あるいは心不全を引き起こすストレスシグナルがどのようにして7SK RNAを介したHEXIM1/2によるCdk9の抑制を解除し、過剰なCdk9の活性化を引き起こすのか、今後の解析が待たれる。

PROFILE 佐野元昭

- 慶應義塾大学医学部 再生医学教室 講師
- E-mail: msano@sc.itc.keio.ac.jp
- 趣味: テニス、ジョギング、登山

1994年慶應義塾大学医学部卒業。内科、循環器内科の研修・専修医を経て、2000～2005年まで米国テキサス州ペーラー医科大学心臓血管病センターに留学。2007年から現職。2007年からJSTさきがけ(代謝と機能制御)兼任。

PROFILE 清水宣明

- 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 免疫病態分野
- E-mail: nshimizu@ims.u-tokyo.ac.jp
- 趣味: 柔道、トロンボーン演奏、旅行

2000年東京工業大学大学院生命理工学研究所修了。博士(工学)。バイオテクノロジー開発技術研究組合研究員。新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)養成技術者を経て、2002年より現所属。2005年より日本学術振興会特別研究員。

文献

- 1) Olson EN, et al: Genes Dev (2003) 17: 1937-1956
- 2) Orphanides G, et al: Cell (2002) 108: 439-451
- 3) Peterlin BM, et al: Mol Cell (2006) 23: 297-305
- 4) Abdellatif M, et al: Mol Cell Biol (1998) 18: 6729-6736
- 5) Sano M, et al: Nat Med (2002) 8: 1310-1317
- 6) Sano M, et al: EMBO J (2004) 23: 3559-3569
- 7) Zhou Q, et al: Microbiol Mol Biol Rev (2006) 70: 646-659
- 8) Barrandon C, et al: Mol Cell Biol (2007) 27: 6996-7006
- 9) Shimizu N, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102: 8555-8560
- 10) Huang F, et al: Mech Dev (2004) 121: 559-572

for beginners

「転写がわかる わかる実験医学シリーズ」半田 宏: 羊土社 (2002)



アルデヒドと老化*

佐野元昭¹

アルデヒドと聞くとアルコール代謝を連想される方が多い。お酒を摂取すると、肝臓でエタノール→アセトアルデヒド→酢酸と代謝されていく(図1)。お酒を飲むと気分が良くなるのはエタノールの作用、反対に顔が紅潮し動悸がして気分が悪くなるのはアセトアルデヒドの作用である。お酒がよく飲めるひとと飲めないひとがいるが、これはアセトアルデヒドの代謝能力の違いによる。アセトアルデヒドの代謝は主としてALDH2というアセトアルデヒド脱水素酵素が担っている。ALDH2をコードしている遺伝子には遺伝子多型が存在する。活性型のALDH2*1に対して点変異(E487K)が入っているALDH2*2は不活性型で、その遺伝子産物は活性型のALDH2*1に対して“優勢抑制型変異体”として働く。ALDH2という酵素は4量体で働くが、4つのうちひとつでもALDH2*2由来の蛋白が入ると酵素活性はなくなる。したがって、ALDH2*1/ALDH2*2のヘテロのひとはALDH2*1/ALDH2*1のホモのひとに比べるとALDH2の酵素活性としては1/2ではなくて1/16まで低下しており、アセトアルデヒドの血液中濃度がすぐに高くなってしまいうためにお酒が弱い(図2)。また、ALDH2*2/ALDH2*2のホモのひとはまったくお酒が飲めない。成人してお酒を飲んでみたら一口だけで顔面が紅潮し心臓がドキドキして全く受け付けなかったというひとは、ALDH2*2/ALDH2*2のホモである。日本人の4割のひとがALDH2*1/ALDH2*2のヘテ

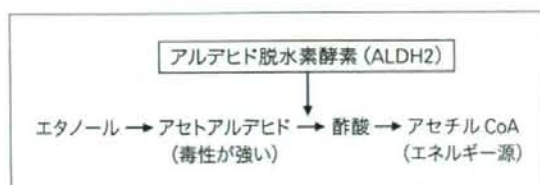


図1 アルコール代謝 ALDH2は飲酒時に生じるアセトアルデヒドの主要な代謝酵素である。

ロで、1割のひとがALDH2*2/ALDH2*2のホモである。つまり、10人に1人は、お酒が全く飲めないひとということになる。ALDH2の遺伝子多型は、遺伝子を調べなくても経験から自分で自覚できる。また、前腕にアルコールを浸したバンドエードを貼るという学生時代にやったあの簡単なパッチテストも実はALDH2活性をみている検査である。

アルデヒドは、お酒を飲まなくても体の中で自然に生じている。食品中に含有される脂質の酸化劣化(酸化的分解過程)は、においや嘔吐、ふるえ、下痢などの中毒症状の原因ともなるが、これは活性酸素(ラジカル:注1)によって脂質の過酸化反応が進行した結果生じたアルデヒドなどの二次酸化生成物によるものである。

これと同様な反応が生体内でも生じる。細胞膜

注1:原子核を取り巻く電子は2つずつペアで同じ軌道に存在している(共有電子対)が、同じ軌道にひとつしか電子を持たない不安定な状態の原子や分子のこと。安定上にある他の分子から電子を奪い安定化状態になろうとする。

* Aldehyde and Aging

¹ 慶應義塾大学医学部再生医学(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Motoaki Sano: Department of Regenerative Medicine and Advanced Cardiac Therapeutics, Keio University, School of Medicine

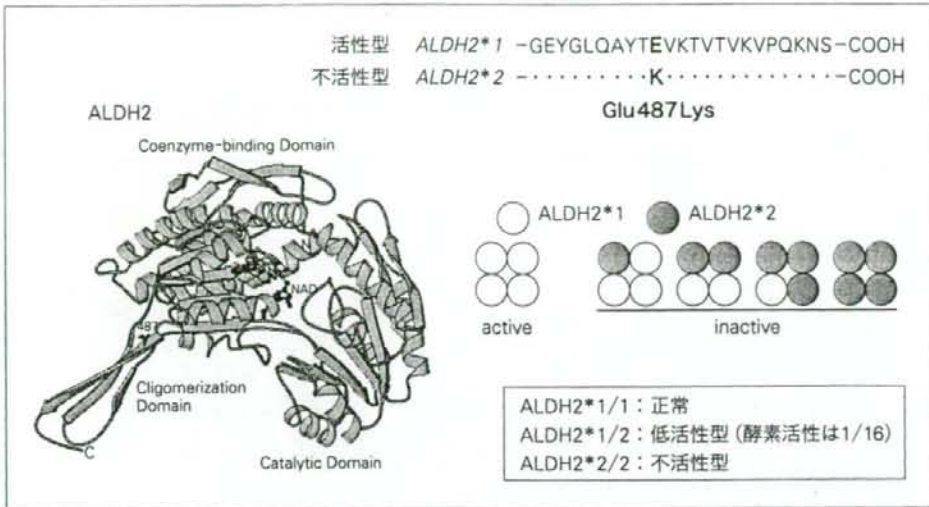


図2 ALDH2の遺伝子多型活性型のALDH2*1に対して点変異(E487K)が入っているALDH2*2は不活性型で、その遺伝子産物は活性型のALDH2*1に対して“優勢抑制型変異体”として働く。

脂質の多価不飽和脂肪酸が生体内で生じた活性酸素によって攻撃を受けると、ラジカル連鎖反応が起こって、一次酸化生成物として過酸化脂質(脂質ヒドロペルオキシド)が生じる。さらに過酸化脂質の分解反応によってアルデヒドなどの二次酸化生成物が生成されてくる(図3)。生体内脂質の過酸化反応は加齢とともに進行してくる。いわゆる加齢臭は、中年以降濃度が上昇する hexenal, octenal, nonenal といったアルデヒドに由来する不快な匂いである。これらアルデヒド族は、反応性が非常に高く、膜に損傷を与えるだけでなく、蛋白質との共有結合や核酸内部での分子間相互作用を介して細胞機能に有害な影響を及ぼす¹⁾。アルデヒドのなかでも最も毒性を示す 4-hydroxynonenal によって修飾された蛋白質は、酸化 LDL、動脈硬化層、虚血再灌流心、アルツハイマー病、腫瘍などのヒトの病態組織に蓄積されており、老化や酸化ストレスによる疾病発症の一因となっていると考えられる。

体内には、もちろん、この有害なアルデヒドを消去する防御機構が備わっている。そのひとつが ALDH ファミリーの酵素群である。ヒトでは実に 19 個の ALDH 遺伝子が存在している²⁾。アル

コール代謝に重要な ALDH2 はミトコンドリアに局在する。ミトコンドリアといえば、生体内における主要な活性酸素の発生源である。さらに、ALDH2 は魚類からその存在が確認されており、ニワトリ、ブタ、イヌ、ネコにももちろん存在している。しかも、アルコール代謝の場である肝臓だけでなく、心臓、血管、腎臓、脳、筋肉、脂肪など全身にくまなく発現が確認される。以上の事実から、ALDH2 はお酒を代謝するために存在している酵素ではなくて、抗酸化酵素のひとつとして、脂質過酸化反応の結果生じたアルデヒドを代謝するのが本来の機能で、たまたまヒトがお酒を飲んだときに ALDH2 を使って代謝しているだけだという結論に達する。

2003年1月の朝日新聞に「お酒を飲めないヒトは、飲めるヒトと比べるとアルツハイマー病に1.6倍なりやすい。」という内容の記事が掲載され反響を呼んだ。これは日本医科大学の太田成男教授のグループが発表した分子疫学調査の結果である。年齢、性別、居住地域を一致させた健康人とアルツハイマー病患者の ALDH2 の遺伝子多型を調べると、ALDH2*2 の遺伝子を持っている人がアルツハイマー病患者で有意に高かったと

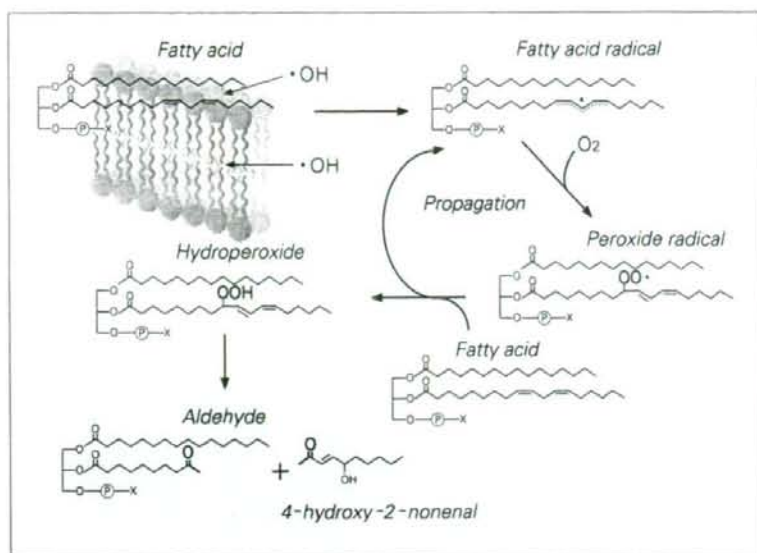


図3 生体内におけるアルデヒド生成のメカニズム

膜脂質の多価不飽和脂肪酸が活性酸素によって攻撃を受けると、ラジカル連鎖反応が起こり様々な酸化体が生じる。

いう報告である³⁾。同グループは、血液中の過酸化脂質の濃度も ALDH 2*2 の遺伝子を持っているヒトのほうが、持っていないヒトより有意に高いと報告している⁴⁾。ALDH 2 が抗酸化酵素としてミトコンドリアにおけるアルデヒドの除去に重要な役割を果たしているのなら、ALDH 2*2 の遺伝子を持っているヒトはお酒が弱いだけでなく、酸化ストレスによる障害を受けやすい体質である可能性が示唆される。確かに長寿である沖縄のヒトにはお酒が強いヒトが多い。酒は百薬の長というのは、実はお酒が体にいいということではなくて、お酒を飲めるヒトが健康であるということであるのかもしれない。しかし、実際には、酸化ストレスに対する抵抗性を規定している因子は多数存在し、また、お酒が飲めるヒトは飲めないヒトに比べると暴飲暴食に走る傾向があるかもしれないので、一概には「お酒の弱い=病気にかかりやすい」という図式は成り立たないのかもしれない。もし、生存にとって 100% ネガティブに働く遺伝子なら自然淘汰の歴史の中でなぜ ALDH 2*2 の遺伝子が残ってきたのか？(日本人の約半数に ALDH 2*2 の遺伝子は存在するが、ALDH 2*2 の遺伝子の存在は東北アジアに限られ、欧米の白人には全く認められない)。マラリア感染地区に存在する鎌状赤血球貧血症の遺伝子

変異のように自然淘汰されずに残ってきた理由が存在するのかもしれない。ALDH 2 は進化的にも生物学的にも興味の尽きない遺伝子である。

お酒が飲めないと老化しやすいかはさておき、循環器診療において患者さんがお酒を飲めるか飲めないかを確認しておくのは重要な問題かもしれない。狭心症の特効薬として使用されるニトログリセリンは一酸化窒素 NO を介して血管を拡張させて効果を発揮するが、これまで生体内でニトログリセリンから NO を産生する代謝経路は不明であった。最近、体内でニトログリセリンから NO を作るのに必要な酵素が同定された。それが、何と ALDH 2 であった⁵⁾。では、お酒が飲めないヒトのなかには狭心症の発作にニトログリセリンを使用しても無効である、ということが実際にはあるのだろうか。当然、この疑問に答えるべく、お隣の中国で臨床研究が行われた。その結果、確かに、お酒の弱い患者群にニトロ無効例が多かったという結果が報告された。

おわりに

活性酸素による障害は体内に生じる“さび”に例えられ、老化や加齢性疾患の病態生理において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、活性酸素の半減期は短く、その作用は産生さ

れた局所に限られる。一方、活性酸素による脂質の二次酸化生成物であるアルデヒドは半減期も長く、膜を通過して細胞内外に拡散し、その反応性の高さから細胞・組織傷害性に働き、活性酸素の移行分子と位置づけられる。われわれは、アルデヒドの代謝障害モデルマウスを作製し、アルデヒドの蓄積による疾病発症の分子メカニズムや、生体のアルデヒドに対する臓器特異的ストレス応答機構の解明を進めている。このような基礎研究を通じて、新規の抗加齢医療の治療標的をみつけるトランスレーショナルリサーチを今後も続けていく所存である。

文 献

- 1) Conklin D, Prough R, Bhatnagar A: Aldehyde metabolism in the cardiovascular system. *Mol Biosyst* 3: 136-150, 2007
- 2) Vasiliou V, Pappa A, Estey T: Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 36: 279-299, 2004
- 3) Kamino K, Nagasaka K, Imagawa M, et al: Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 192-196, 2000
- 4) Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, et al: Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J Hum Genet* 48: 404-409, 2003
- 5) Chen Z, Zhang J, Stamler JS: Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8306-8311, 2002

特集

慢性心不全を
解く・治す

識る

3-b

基礎研究のフロンティア

ミトコンドリア エネルギー代謝

▶ *mitochondrial energy metabolism in the heart*

佐野元昭 (慶應義塾大学医学部再生医学教室)

心臓が血液を送り出すポンプとして働き続けるためには、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生は不可欠である。さまざまな血行力学的、代謝的ストレスに対して、心筋が適切にエネルギー産生を行うことができなくなると、心筋収縮力が低下し、心不全に陥る。ミトコンドリアエネルギー代謝に関与する酵素群の発現レベルは、発生・成長過程、あるいはストレス下において動的に変化している。これらの遺伝子発現は、転写因子peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), estrogen receptor related receptor (ERR), nuclear respiratory factor (NRF) が担っており、さらにメタボリックストレスセンサーとして働く転写コアクチベーター (PPAR γ coactivator-1; PGC-1) が動的に制御している。

ミトコンドリア エネルギー代謝

心臓は、全身組織への血液循環を維持するためのポンプとして休みなく働き続けなければならない。また、末梢組織の酸素需要の増加に応じて、心拍出量を瞬時に増加させる高いエネルギー産生予備能力も兼ね備えていなければならない。したがって、心臓を構成する心筋細胞では、酸化的エネルギー(ATP)産生において中心的な役割

を担うミトコンドリアが数と質の両面においてほかの細胞とは比較にならないほど非常に高度に発達している(図1)。

心臓は、脂肪酸とグルコースを主な代謝燃料として利用している。脂肪酸は、ミトコンドリア内での脂肪酸 β 酸化経路によってアセチルCoAにまで分解される。この過程で還元された補酵素類(NADHやFADH $_2$)がつくられる。一方、グルコースは、細胞質に局在する解糖系(glycolysis)によって嫌氣的

にピルビン酸(pyruvate)まで変換された後、ミトコンドリア内でpyruvate dehydrogenase complexによってアセチルCoAに代謝される。アセチルCoAはTCA回路(クエン酸回路)に入り、さまざまな中間代謝産物に変換されるが、この過程でも還元された補酵素類(NADHやFADH₂)がつかられる。次に、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の酵素によってこれら還元された補酵素類から水素が引き抜かれて水素イオン(H⁺)と電子(e⁻)に分離される。プラスの電荷をもった水素イオンだけがマトリックスからミトコンドリアの外膜と内膜の間のスペース(膜間腔)に放出される。これによって、ミトコンドリアの内膜を挟んで外はプラス、中はマイナスという電位差がかかる。マイナスの電荷をもった電子は別の電子伝達系の酵素に次々とリレーされてゆき、最終的に酸素分子に受け渡されて水になる。一方、膜間腔に蓄積したプラス電荷をもつ水素はATP synthase酵素分子のゲートの部分を通して内側に流れ込み、このときにATP synthaseの頭部が回転することによってATPが合成される。この一連の過程を酸化リン酸化(oxidative phosphorylation)とよぶ。ATPはadenine nucleotide transporterの働きで、ミトコンドリアのマトリックスから細胞質に運搬され、興奮収縮連関(アクチンミオシンのスライディングや筋小胞体のCa ATPase活性)、細胞内イオン環境のホメオスタシスの維持(Na/K ATPase活性)に利用される(図2)。

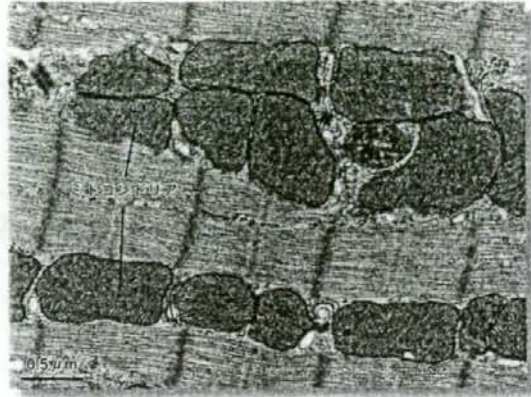


図1 心筋細胞の電顕写真：心筋細胞のミトコンドリアネットワーク
筋原線維の間に数石状に並んで存在するのがミトコンドリアである。数が多いだけでなく個々のミトコンドリアの内膜構造(cristae)が非常に密に発達しており心筋細胞が潜在的に高いエネルギー産生機能を保持していることが形態からも推測できる。

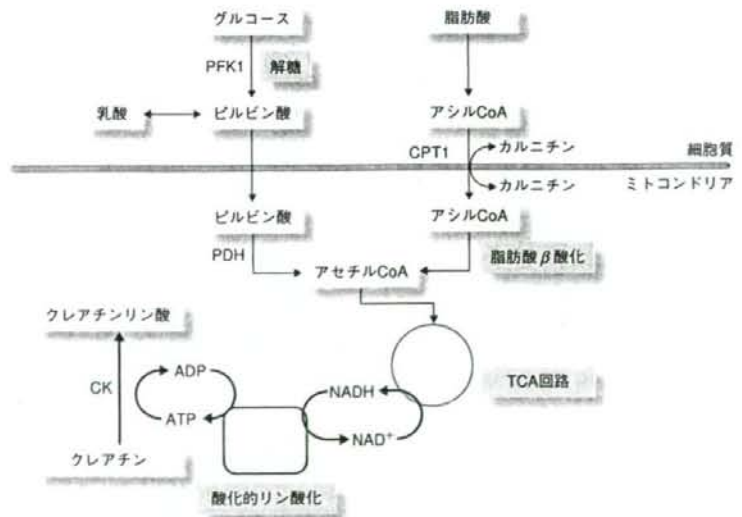


図2 心筋ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝

心筋細胞はグルコースと脂肪酸を代謝燃料にして最終的にはミトコンドリアでの酸化リン酸化によってATPを合成している。

成長に伴うミトコンドリア エネルギー代謝の活性化

生後、成長による血液供給量の増加に伴って、心臓は個々の心筋細胞容積の増大(肥大)によって臓器として大きくなっていくが、この生理的な肥大(physiological hypertrophy)に伴って、ミトコンドリアの数と個々のミトコンドリアのエネルギー産生能力が向上していく。代謝燃料としては、胎生期には主にグルコースを用いていたが、生後は脂肪酸を好んで使用するようになる。ミトコンドリアエネルギー代謝活性は、スポーツトレーニングによっても向上していく。

血行力学的なストレス下 におけるミトコンドリア エネルギー代謝の変化

高血圧や弁膜症によって心臓に圧負荷(pressure-overload)が加わると、病的な心肥大(pathological hypertrophy)を呈する。この解剖学的な変化に一致して非常に早期のうちから、生理的な心肥大のときは対照的な心筋エネルギー代謝のリプログラミング(reprogramming)が観察される。すなわち、ミトコンドリアにおける酸化のリン酸化が低下し、主としてグルコースを解糖系で燃焼させエネルギー合成を行うようになる(図3)。この圧負荷に対する代謝応答は、心筋酸素消費量を抑

えるという意味において、少なくとも一過性には好ましい適応現象とみなすことができる。しかし、負荷が解除されなければ、早晩、相対的エネルギーの産生不足から、収縮不全をきたす。事実、心筋におけるエネルギーリザーブの指標であるクレアチンリン酸/ATP比の低下の度合いが、心筋収縮力や心不全の重症度・予後ともよく相関していることは古くから知られている事実である。

ミトコンドリアエネルギー 代謝障害と心不全発症の 因果関係

ミトコンドリアエネルギー代謝障害

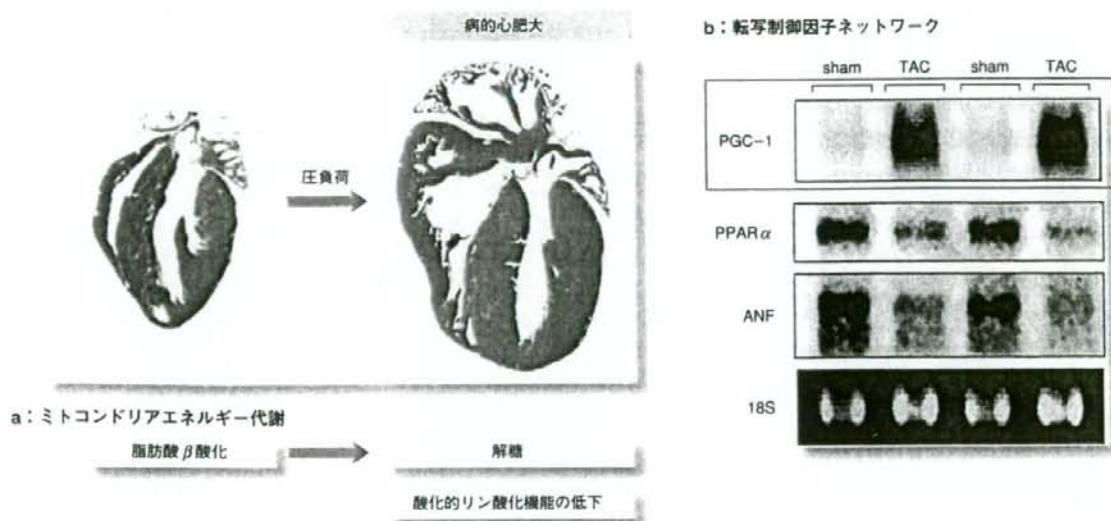


図3 血行力学的負荷に対する心筋ミトコンドリアエネルギー代謝応答

大人の心臓では脂肪酸を主な代謝燃料としているが、血行力学的負荷が加わると、胎児期のようにグルコースを主な代謝燃料として利用するようになる。脂肪酸β酸化、ミトコンドリア酸化のリン酸化酵素の発現が減少する。TAC: transaortic constriction(大動脈縮窄モデル)、ANF: atrial natriuretic factor。

と心不全発症の間に、直接の因果関係があることは、ミトコンドリアエネルギー代謝にかかわる酵素(脂肪酸 β 酸化酵素, adenine nucleotide transporter など)や次で述べるミトコンドリアの数や機能を遺伝子発現レベルで制御する転写制御因子を欠損させた遺伝子操作モデルマウスが、ミトコンドリアエネルギー代謝障害によって心筋症様の病態を呈することからも証明されている。

また、ヒトにおいてもミトコンドリアDNA変異によって病的な心肥大、拡張型心筋症、伝導障害を呈すること、あるいは、脂肪酸 β 酸化酵素欠損のある患者が、感染症を契機として飢餓や代謝需要の増加に対応できずに心不全を発症することも、ミトコンドリアエネルギー代謝障害と心不全発症の直接の因果関係を裏づけている。

ミトコンドリアエネルギー代謝の転写制御機構

ミトコンドリアエネルギー代謝は、遺伝子発現レベルで制御されている。生理的な心肥大は、ミトコンドリアエネルギー代謝酵素の発現量の増加を伴い、反対に病的な心肥大や心不全ではミトコンドリアエネルギー代謝酵素の発現量の低下を認める。もちろんエネルギー代謝のすべてがミトコンドリア内で完結できるわけではなくて、細胞膜のトランスポーター(transporter)、細胞質に局在する代謝経路、中間代謝

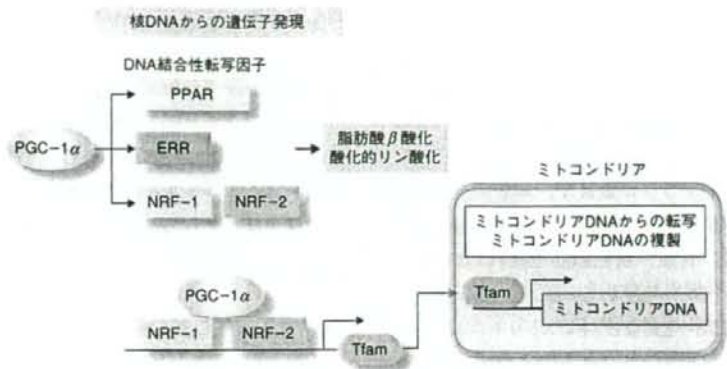


図4 エネルギー代謝を制御している転写ネットワーク

ミトコンドリアエネルギー代謝酵素の核、ミトコンドリアDNAからの遺伝子発現は、転写因子PPAR, ERR, NRF, さらにメタボリックストレスセンサーとして働く転写コアクチベーターPGC-1によって包括的かつ動的に制御されている。

産物のミトコンドリアへのトランスポート、ミトコンドリア内に局在する代謝経路、産生したATPの細胞質へのトランスポートなどのすべての過程が連鎖的に働いてはじめて効率よくエネルギー産生が行われる。また、ミトコンドリアに局在する代謝関連分子の遺伝子は、一部はミトコンドリアDNAに、残りのほとんどすべては核DNA上にコードされている。したがって、ミトコンドリアエネルギー代謝を効率よく調節するためには、核DNAとミトコンドリアDNA双方からの遺伝子発現を協調的に制御する必要もある。これらの遺伝子発現は、転写因子PPAR, ERR, NRFが担っており、さらにメタボリックストレスセンサーとして働く転写コアクチベーターPGC-1が動的に制御している¹⁾(図4)。

PGC-1

その中心的な役割を果たすPPAR γ coactivator (PGC)-1は、いわゆる転写コアクチベーターであり、それ自身はDNAに直接結合せず、転写因子(DNA上の特定の塩基配列を認識して結合することによって遺伝子発現を制御している分子)に結合し、転写因子による遺伝子発現を助けてやることによって間接的に遺伝子発現を誘導している。具体的には、PGC-1は分子scaffoldとして働き、クロマチン修飾活性をもった酵素群(ヒストンアセチル化酵素など)やmediator complex, 基本転写装置, RNA polymerase II, splicing factorなどをリクルートして標的遺伝子の発現を増加させている²⁾。

(1) PGC-1 α の特徴

PGC-1には、PGC-1 α , PGC-1 β ,

PGC-1-related coactivatorの3種類が存在し、相補のかつ一部異なった機能を保持している。ここでは、心臓において研究が最も進んでいるPGC-1 α に関して話をします。PGC-1 α は、ミトコンドリアが豊富で、エネルギー代謝が活発に行われている臓器(心臓、肝臓、腎臓、褐色脂肪組織)において高レベルで発現している。さらに、寒冷、飢餓、運動などミトコンドリアエネルギー代謝を活性化させるような刺激によってmRNAレベルで発現が誘導される。そもそもPGC-1 α は、寒冷時に褐色脂肪細胞のミトコンドリアにおいてuncoupling protein-1を誘導して熱産生を引き起こす因子としてクローニングされたが、心筋細胞においてPGC-1 α を過剰発現させても、熱産生は起きず、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化の活性化に伴うATP産生亢進を引き起こす。

(2) PGC-1 α ノックアウトマウスによる検討

PGC-1 α をノックアウトしても(PGC-1 $\alpha^{-/-}$ マウス)心筋細胞のミトコンドリアの数や形態に変化を認めない。しかし、PGC-1 $\alpha^{-/-}$ マウス的心臓ではミトコンドリア脂肪酸 β 酸化や酸化リン酸化にかかわる酵素群の発現は低下しており、運動負荷時やカテコラミン負荷時における心拍数の増加が野生型のマウスと比べて低下していた。さらに、PGC-1 $\alpha^{-/-}$ マウスはトレッドミル運動負荷検査における運動耐容能が低下しており、圧負荷刺激に

対して適応できずに心不全に陥った。以上の結果から、PGC-1 α は心臓においてエネルギー産生能力が高い成熟したミトコンドリアネットワークの形成と維持に関与しており、血行力学的負荷に対してエネルギー産生を高めて心機能を維持するのに必要な因子であることがうかがわれる³⁵⁾。

(3) PGC-1 α による転写因子の調節
心臓においてPGC-1 α が結合する標的転写因子としては、PPAR(PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ)、ERR(ERR α , ERR β , ERR γ)、NRF(NRF-1, NRF-2)があげられる。PGC-1 α は、転写因子PPAR、ERR、NRFの機能をさらに上位から動的に調節することによって、核DNAとミトコンドリアDNAからのミトコンドリアエネルギー代謝酵素の発現を包括的に制御し、心機能の維持に関与している。

PPAR

PPAR $\alpha^{-/-}$ マウス心臓では、脂肪酸 β 酸化が低下し、反対にPPAR α の心筋過剰発現マウス(α MHC-PPAR α マウス)では、脂肪酸の取り込み、 β 酸化が亢進し、グルコースの利用比率が低下し、脂肪の蓄積から心筋症様の病態を呈した。PPAR β/δ も心筋において高発現しているが、PPAR β/δ の心筋過剰発現マウス(α MHC-PPAR β/δ マウス)では、 α MHC-PPAR α マウスとは対照的に、glucose

transporter 4の発現亢進と一致してグルコースの利用比率が亢進して、心筋への脂肪の蓄積は起こらずに、心機能も正常に保たれていた。それだけではなく、グルコースの利用比率が亢進を反映してか、 α MHC-PPAR β/δ マウスでは心筋虚血再灌流障害に対して抵抗性を示した。つまり、PPAR α とPPAR β/δ は心筋においてまったく異なった代謝経路を制御している事実が明らかになった⁶⁾。PPAR γ の心筋における発現量は少ないが、PPAR γ の心筋過剰発現マウス(α MHC-PPAR γ マウス)では、 α MHC-PPAR α マウスと同様に脂肪酸の取り込みの増加、脂肪蓄積から心筋症様の病態を呈する⁷⁾。

ERR

ERR α は、過剰発現によって脂肪酸 β 酸化、酸化リン酸化に関与する酵素群が誘導される。ERR α による脂肪酸 β 酸化の一部は、ERR α によるPPAR α の発現誘導を介している。ERR $\alpha^{-/-}$ マウスは、PGC-1 $\alpha^{-/-}$ マウス同様に、圧負荷刺激に対してエネルギー産生の面で適応できずに心不全に陥る⁸⁾。ERR $\gamma^{-/-}$ マウスは、生後にグルコースから脂肪酸への代謝燃料の利用比率の変化が起こらずに、生後1週間以内に死亡する。ERR $\beta^{-/-}$ マウスは、胎盤機能不全による胎生致死のため、心臓における役割はまだ解析できていない。

NRF

NRF-1は酸化リン酸化に関与する酵素群の発現を制御しているだけでなく、ミトコンドリアDNAの複製・ミトコンドリアDNAからの転写を制御しているmitochondrial transcription factor A(Tfam)の発現を介して、ミトコンドリアの数の制御も行っている。NRF-1^{-/-}やTfam^{-/-}マウスは、ミトコンドリアDNAの欠損、ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性低下を認め、胎生期3.5~6.5日、8.5~11.5日にそれぞれ胎生致死となる。

PGC-1の機能異常と心不全

PGC-1 α の発現は、生理的な心肥

大の過程では上昇し、病的な心肥大の形では減少する。病的な心肥大におけるPGC-1 α の発現低下は、比較的早期から観察されること、さらに、PGC-1 α ^{-/-}マウスの心臓が、負荷時にのみあっただけのエネルギー産生増加を達成できず、相対的エネルギー不足から心不全に陥ったことなどから、PGC-1 α の発現低下や機能異常が心不全発症の分子基盤として重要な位置を占めていることがわかれる。

今後の展望

ミトコンドリアエネルギー代謝の側面から慢性心不全の治療を考えると、病的ストレス下で低下しているPGC-1 α の機能を補うような手法が治療的

なると考えられる。しかし、PGC-1 α を無制限に過剰発現させると、ミトコンドリア過増殖によって筋原線維の秩序だった構築が乱れて拡張型心筋症様の病態を呈してしまうことから、PGC-1 α の生理的な機能制御を標的にした治療法がより臨床的にも応用可能なものになると考えられる。しかし、心筋におけるPGC-1 α の機能制御に関する研究は、いまだ発展途上であり、mRNAレベルでの発現制御、蛋白レベルでの翻訳後修飾や蛋白-蛋白会合による機能制御⁹⁾、さらにそれらを調節する上流のシグナル伝達経路の全貌を解明していく必要がある。特に、病的な肥大刺激によってPGC-1 α の発現・機能が低下する分子基盤はほとんど解明されておらず¹⁰⁾、今後の研究が待たれる。

文献

- 1) Finck BN, Kelly DP: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation* 115(19): 2540-2548, 2007.
- 2) Sano M, Izumi Y, Helenius K, et al: Ménage-à-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPARgamma coactivator 1. *Cell Metab* 5(2): 129-142, 2007.
- 3) LinksLeone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al: PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3(4): e101. Epub 2005.
- 4) Arany Z, He H, Lin J, et al: Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1(4): 259-271, 2005.
- 5) Arany Z, Novikov M, Chin S, et al: Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(26): 10086-10091, 2006.
- 6) Burkart EM, Sambandam N, Han X, et al: Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* 117(12): 3930-3939, 2007.
- 7) Son NH, Park TS, Yamashita H, et al: Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest* 117: 2791-2801, 2007.
- 8) Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, et al: The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab* 6(1): 25-37, 2007.
- 9) Sano M, Tokudome S, Shimizu N, et al: Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* 282(35): 25970-25980, 2007.
- 10) Sano M, Wang SC, Shirai M, et al: Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J* 23(17): 3559-3569, 2004.

Phosphorylation of Nephritin Triggers Ca^{2+} Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1*

Received for publication, September 4, 2008, and in revised form, January 26, 2009. Published, JBC Papers in Press, January 29, 2009, DOI 10.1074/jbc.M806851.200

Yutaka Harita^{†§}, Hidetake Kurihara[†], Hidetaka Kosako[‡], Tohru Tezuka^{||}, Takashi Sekine[§], Takashi Igarashi[§], Ikuroh Ohsawa^{**}, Shigeo Ohta^{**}, and Seisuke Hattori^{‡,††}

From the [†]Division of Cellular Proteomics (BML) and ^{||}Department of Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan, the [§]Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan, the [‡]Department of Anatomy, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan, the ^{**}Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, Japan, and the ^{††}Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

A specialized intercellular junction between podocytes, known as the slit diaphragm (SD), forms the essential structural framework for glomerular filtration in the kidney. In addition, mounting evidence demonstrates that the SD also plays a crucial role as a signaling platform in physiological and pathological states. Nephritin, the major component of the SD, is tyrosine-phosphorylated by a Src family tyrosine kinase, Fyn, in developing or injured podocytes, recruiting Nck to Nephritin via its Src homology 2 domain to regulate dynamic actin remodeling. Dysregulated Ca^{2+} homeostasis has also been implicated in podocyte damage, but the mechanism of how podocytes respond to injury is largely unknown. Here we have identified phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) as a novel phospho-Nephritin-binding protein. When HEK293T cells expressing a chimeric protein consisting of CD8 and Nephritin cytoplasmic domain (CD) were treated with anti-CD8 and anti-mouse antibodies, clustering of Nephritin and phosphorylation of Nephritin-CD were induced. Upon this clustering, PLC- γ 1 was bound to phosphorylated Nephritin Tyr-1204, which induced translocation of PLC- γ 1 from cytoplasm to the CD8/Nephritin cluster on the plasma membrane. The recruitment of PLC- γ 1 to Nephritin activated PLC- γ 1, as detected by phosphorylation of PLC- γ 1 Tyr-783 and increase in inositol 1,4,5-trisphosphate level. We also found that Nephritin Tyr-1204 phosphorylation triggers the Ca^{2+} response in a PLC- γ 1-dependent fashion. Furthermore, PLC- γ 1 is significantly phosphorylated in injured podocytes *in vivo*. Given the profound effect of PLC- γ in diverse cellular functions, regulation of the Ca^{2+} signaling by Nephritin may be important in modulating the glomerular filtration barrier function.

The glomerular capillary wall of the kidney functions as a highly selective filtration barrier that retains albumin and other

plasma proteins in the circulation (1). A defect in glomerular ultrafiltration results in several forms of congenital or acquired kidney diseases, which is typically manifested by a massive loss of protein in the urine (proteinuria), which is key symptom of nephrotic syndrome (2). The glomerular capillary wall consists of three structural layers: a layer of a fenestrated endothelial cells, the glomerular basement membrane, and the visceral epithelial cells, also called podocytes. Podocytes form primary processes that further extend numerous elaborate foot processes. Foot processes from neighboring podocytes interdigitate with each other and surround the entire surface of capillary loops. These foot processes are bridged by a unique cell adhesion structure, the slit diaphragm (SD).²

Over the last decade, mutations in genes encoding the SD proteins have been identified in several forms of congenital nephrotic syndrome (2). The first of these molecules to be identified was Nephritin (3). Nephritin is a membrane-spanning glycoprotein encoded by the *NPHS1* gene and is a member of the immunoglobulin superfamily. Nephritin is specifically expressed in glomerular podocytes, and mutations in *NPHS1* cause heavy proteinuria before birth and result in early death (congenital nephrotic syndrome of the Finnish type) (4). Several other molecules, including Nephrin (5), podocin (6), FAT1 (7), and CD2-associated protein (8) have been identified as components of SD, and genetic disruption of these molecules in human diseases or in genetically manipulated mice results in similar phenotypic conditions: a flattening (effacement) of foot processes, loss of SD, and proteinuria. The identification of these SD components has shed light on the pathogenesis of proteinuria and emphasized the critical role of SD in maintaining the function of the glomerular filtration barrier.

In addition to its role as a structural framework of the filtration barrier, SD has been implicated in podocyte intracellular signaling (9). Nephritin interacts with phosphatidylinositol 3-kinase p85, which leads to increased Akt activity and a reduction in cell death induced by apoptotic stimuli (10). SD components are also modulated by tyrosine phosphorylation. The cytoplas-

* This work was supported in part by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) 20790719 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (2008). This work was developed and coordinated under the framework of the program for the International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] To whom correspondence should be addressed: Division of Cellular Proteomics (BML), Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. Fax: 81-3-6409-2073; E-mail: hattori@ims.u-tokyo.ac.jp.

² The abbreviations used are: SD, slit diaphragm; PLC, phospholipase C; CD, cytoplasmic domain; SH2, Src homology 2; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; PS, protamine sulfate; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; PBS, phosphate-buffered saline; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight.

Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ

mic domain (CD) of Nephrin is transiently tyrosine-phosphorylated by a Src family tyrosine kinase, Fyn, in developing or injured podocytes (11, 12). The Src homology 2 domain of Nck binds to several phosphorylated tyrosines of Nephrin, and this interaction regulates actin polymerization (12, 13), indicating a dynamic regulatory role of Nephrin in the podocyte cytoskeleton. The critical role of tyrosine phosphorylation in filtration barrier function is also suggested by proteinuria and the effacement of foot processes in *fyn*-deficient mice (11, 14).

New insights have recently emerged concerning the functional importance of Ca^{2+} signaling in the pathophysiology of podocyte. Mutant forms of canonical TRPC6 (transient receptor potential cation channel 6) have been shown to cause congenital proteinuria (15). TRPC6 is a Ca^{2+} -permeable cation channel activated following stimulation of membrane receptors linked to PLC. TRPC6 is highly expressed in podocytes and closely localized to the SD. Some mutants found in patients are gain-of-function mutations, leading to speculation that the exaggerated Ca^{2+} signaling disrupts glomerular cell function (15, 16). But to date, the mechanism by which Ca^{2+} signaling is associated with glomerular pathogenesis is largely unknown.

In the present study, we identified PLC- γ 1 as a novel phospho-Nephrin-binding protein. Specific phosphorylation of Nephrin by a clustering strategy revealed that phosphorylation of Nephrin is directly involved in Ca^{2+} homeostasis via the recruitment and activation of PLC- γ 1. Moreover, in a rat podocyte injury model, which is characterized by enhanced Nephrin phosphorylation, PLC- γ 1 is phosphorylated and recruited to the plasma membrane. These results strongly suggest that the SD structure is directly linked to Ca^{2+} signaling by PLC- γ 1 and demonstrate a novel role of SD as an orchestrator of a versatile signaling pathway, including Ca^{2+} homeostasis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents—Mouse monoclonal anti-FLAG antibody (M2; Sigma), rabbit polyclonal anti-PLC- γ 1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-p-PLC- γ 1 antibody (Tyr(P)-783) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (4G10; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY), and mouse monoclonal anti-His antibody (Qiagen, Hilden, Germany) were obtained commercially. A rabbit polyclonal anti-Nephrin antibody was raised against a COOH-terminal peptide of 17 amino acids CAVEASSLPFELRGHLV (the first cysteine is not part of the Nephrin sequence) coupled to keyhole limpet hemocyanin. The antiserum was affinity-purified using the immunogen coupled to a SulfoLink column (Pierce). A rabbit polyclonal phosphospecific antibody (anti-Tyr(P)-1204) was raised against a high pressure liquid chromatography-purified synthetic oligopeptide CAWGPLYDEVRMD. The antiserum was affinity-purified by the immunogen described above and absorbed with nonphosphorylated peptide, CAWGPLYDEVRMD. Western blotting was carried out with these antibodies diluted at 1:2000. Thapsigargin, U73122, and NAADP receptor modulator (catalog number 481919) were obtained from Calbiochem. NAADP receptor modulator is a weak NAADPR ligand ($IC_{50} = 90 \mu M$ in competition binding against 0.2 nM NAADP) that specifically inhibits NAADP-

mediated (but not cADPR-, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)-, or acetylcholine-evoked) Ca^{2+} response in sea urchin egg homogenate and in murine pancreatic acinar cells (17). 8-bromo-cyclic adenosine diphosphate ribose was from Sigma.

Cell Culture and Transfection—HEK293T cells were purchased from the ATCC (Manassas, VA). These cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum. NIH3T3 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% calf serum. Transfections were performed using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

Eukaryotic Expression Constructs—The following plasmids were prepared. For full-length Nephrin and full-length Nephrin-FLAG, a cDNA fragment coding for full-length rat Nephrin was amplified by PCR using primers (5'-attgcccgcgccatggcgctaaagagagctactg-3' and 5'-gcccgtcactcacaccagatgcccctcagctc-3', 5'-attgcccgcgccatggcgctaaagagagctactg-3' and 5'-gcccgtcactcacaccagatgcccctcagctc-3') and was cloned into a pCMV-Tag4A vector (Stratagene, Cedar Creek, TX). A Nephrin phenylalanine substitution mutant, Y1204F, was prepared using standard PCR methods. Mammalian expression plasmid encoding Fyn (18), FLAG-tagged PLC- γ 1, and GFP-tagged PLC- γ 1 (gift from P. G. Suh, POSTECH, Pohang, Korea) (19), and CD8 (gift from S. Yamasaki, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology) (20) were as previously described. Restriction digestion and DNA sequencing were performed to validate all constructs.

Bacterial Fusion Protein Expression—A rat Nephrin cDNA fragment encoding the 151-amino acid cytoplasmic region (Nephrin-CD; amino acids 1102–1252) flanked with EcoRI (5') and XhoI (3') restriction sites was subcloned into pGEX-6P-1 (GE Healthcare). Bacterial pellets were resuspended and sonicated in a solution containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 $\mu g/ml$ antipain, and 10 $\mu g/ml$ leupeptin; insoluble material was removed by centrifugation. GST-tagged fusion protein was purified on a glutathione-Sepharose column, followed by removal of GST with PreScission protease according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). To express the His-tagged NH₂-terminal SH2 domain of PLC- γ 1 SH2, a PLC- γ 1 cDNA fragment encoding the 108-amino acid residues (amino acids 550–657) flanked with EcoRI (5') and NotI (3') restriction sites was cloned into the pET28a (+) vector (Novagen, Madison, WI). To express the His-tagged COOH-terminal SH2 domain of PLC- γ 1, a PLC- γ 1 cDNA fragment encoding the 90 amino acid residues (amino acids 667–756) flanked with EcoRI (5') and NotI (3') restriction sites was cloned into the pET28a (+) vector. His-tagged fusion protein was purified by a nickel-Sepharose column according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare).

In Vitro Phosphorylation and Peptide Mass Analysis—Phosphorylation of recombinant Nephrin-CD (residues 1102–1252) was performed by incubation of 6.0 μg of Nephrin-CD with 30 ng of recombinant active Fyn (Upstate Biotechnology) in 10 μl of kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, and 1 mM sodium orthovanadate) for 60 min at 30 °C. Phosphorylated Nephrin-CD was digested with trypsin (Promega, Madison, WI). Acetonitrile was added to a final concen-

Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ

tration of 90%, and the sample was desalted/concentrated using ZipTip HPL (Millipore, Bedford, MA). Peptides were eluted with 1 μ l of matrix solution (0.1% acetic acid and 50% acetonitrile saturated with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and applied onto a sample plate (Applied Biosystems, Foster City, CA). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was performed using Voyager-DE PRO (Applied Biosystems).

Pull-down Assay—GST or GST-Nephrin-CD immobilized on glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare) was incubated with Fyn in a kinase buffer for 60 min at 30 °C. HEK293T cell lysates were incubated at 4 °C overnight with phosphorylated GST-Nephrin-CD or GST immobilized on beads. Beads were washed extensively with wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40). Nephrin and bound proteins were detached from the beads by digestion with PreScission protease and analyzed by Western blotting or silver staining.

Determination of Proteins of Interest Using Mass Spectrometry—The pull-down sample prepared as above in large scale was subjected to SDS-PAGE and transferred to ProBlott membranes (Applied Biosystems) and stained with Coomassie Brilliant Blue. Proteins of interest were excised, treated with a reduction buffer (0.5 M Tris, pH 8.5, 8 M guanidine hydrochloride, 0.3% EDTA, 5% acetonitrile), and digested with 1 pmol of lysylendopeptidase (Wako) in 6 μ l of digestion buffer (18 mM Tris, pH 8.9, 70% acetonitrile) for 90 min at 37 °C. Peptides were purified and subjected to peptide mass fingerprinting, as described above. Peptide ions specific for each sample were then used to interrogate human protein sequences in the NCBI database using the MASCOT algorithms.

Immunoprecipitation—Cells were lysed with immunoprecipitation buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 100 units/ml aprotinin, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, and 1 mM orthovanadate) for 15 min on ice. Lysates were clarified by centrifugation and incubated with beads conjugated with M2 anti-FLAG antibody for 1 h at 4 °C. Beads were washed twice with immunoprecipitation buffer, and bound proteins were eluted with 100 mM glycine-HCl (pH 2.6).

Immunohistochemistry—Immunofluorescence studies were performed as previously described (21). Briefly, rat kidneys were perfused with 2% paraformaldehyde fixative buffered with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). These samples were immersed in the same fixative for about 30 min. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the tissue was immersed successively in PBS solution containing 10, 15, and 20% sucrose. After the tissue was embedded in OCT Compound and frozen, cryosections (thickness 5–10 μ m) were cut using a Jung Frigocut 2800E (Leica) and then mounted on silane-coated glass slides. The cryosections were rinsed with PBS and blocked in blocking solution (0.1% bovine serum albumin in PBS). The sections were incubated with the primary antibodies and visualized with fluorescein isothiocyanate or rhodamine-isothiocyanate-conjugated second antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Fluorescent specimens were viewed

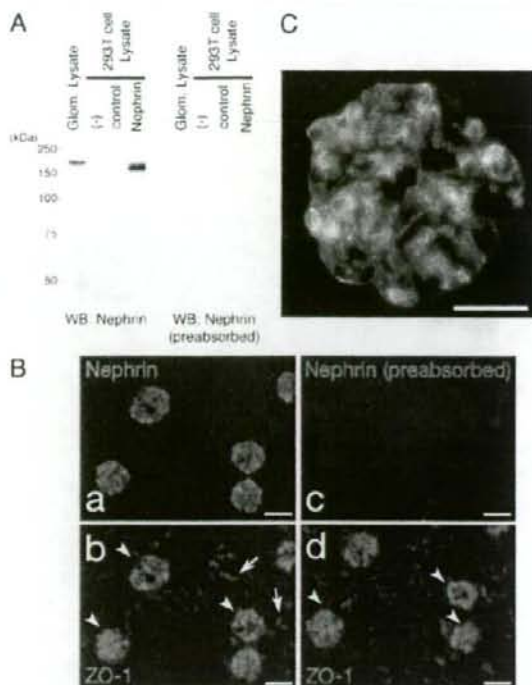


FIGURE 1. Detection of Nephrin with the anti-Nephrin antibody. *A*, lysates from isolated rat glomeruli, untransfected HEK293T cells, and HEK293T cells transiently transfected with plasmid encoding Nephrin or a control vector were separated on SDS-PAGE (10%), transferred to nitrocellulose membrane, and immunoblotted with anti-Nephrin (left) or anti-Nephrin preabsorbed with the peptide used for immunization (right). *B*, adult rat cryosections were analyzed by indirect immunofluorescence microscopy (magnification, $\times 100$) after incubating sections simultaneously with anti-zonula occludens (ZO-1) and rabbit Nephrin antibody (*a* and *b*) or anti-Nephrin antibody preabsorbed with the peptide used for immunization (*c* and *d*) to confirm Nephrin staining in glomeruli (arrowheads) but not in the tubular cells (arrows). Scale bars, 100 μ m. *C*, nephrin staining shows a typical podocyte pattern along the glomerular capillary loops. Magnification, $\times 400$; scale bars, 50 μ m.

with a confocal laser-scanning microscope LSM510 (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

Immunoelectron Microscopy—Kidneys were isolated from anesthetized adult rats, which were fixed by perfusion of 0.5% (w/v) glutaraldehyde in PBS. Tissues were cut in small pieces and fixed in the same fixative for 1 h on ice, washed with PBS, and dehydrated with a graded series of ethanol. Cubes of renal cortex (2 mm) were embedded in LR white resin (London Resin Company Ltd., London, UK) and polymerized with LR white accelerator and stored at -20 °C. Ultrathin sections were mounted on 300-mesh nickel grids and treated with 3% H_2O_2 for 10 min. After blocking with 1% (w/v) bovine serum albumin in PBS for 30 min, grids were incubated overnight at 4 °C with the affinity-purified rabbit anti-PLC- $\gamma 1$ antibody, washed with PBS, and incubated with 10-nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (GE Healthcare) at a dilution of 1:20 for 1 h at room temperature. Grids were washed with distilled water and stained with uranyl acetate for 20 min. After air drying at room temperature, the sections were photographed on a Hitachi 7100 electron microscope at $\times 10,000$ magnification.

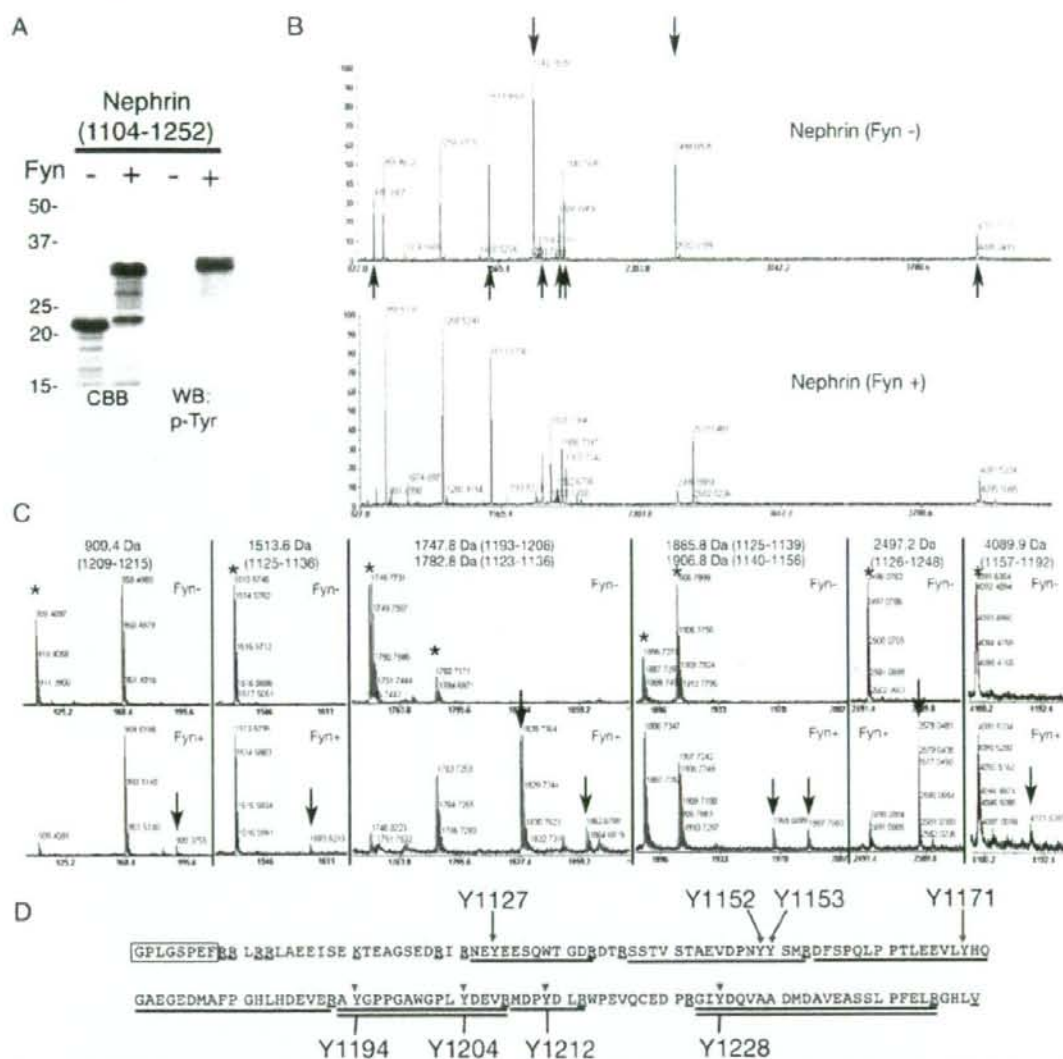
Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ 

FIGURE 2. Tyrosine phosphorylation of Nephrin by *Fyn* in vitro. *A*, Nephrin-CD (amino acids 1104–1252) was incubated with or without *Fyn* in vitro, and the samples were immunoblotted with anti-phosphotyrosine (*p-Tyr*) antibody. *CBB*, Coomassie Brilliant Blue staining; *WB*, Western blot. *B*, Identification of tyrosine residues of Nephrin phosphorylated by *Fyn*. The same samples as in *A* were digested with trypsin, and the peptides were analyzed by a MALDI-TOF mass spectrometer. A marked decrease of peak intensity was observed for two peptides (indicated by *downward arrows*; 1747.8 Da (corresponding to amino acids 1193–1208) and 2497.2 Da (residues 1226–1248)), and a moderate decrease was observed for other peptides (909.4 Da (residues 1209–1215), 1513.6 Da (residues 1125–1136), 1782.8 Da (residues 1123–1136), 1885.8 Da (residues 1125–1139), 1906.8 Da (residues 1140–1156), and 4089.9 Da (residues 1157–1192); *upward arrows*). Representative data are shown from one of three independent experiments. *C*, Detailed data of the peptide mass spectra of nonphosphorylated (*top*) and phosphorylated (*bottom*) Nephrin-CD in Fig. 2*B* are shown. *D*, tyrosine phosphorylation sites in the rat Nephrin-CD. The amino acid sequence of Nephrin-CD with amino-terminal linker sequence (the first eight amino acids, marked as a box). Peptides corresponding to 1747.8 and 2497.2 Da are *double underlined*. Peptides corresponding to 909.4 Da (residues 1209–1215), 1513.6 Da (residues 1125–1136), 1906.8 Da (residues 1140–1156), and 4089.9 Da (residues 1157–1192) are *underlined*. Candidate phosphorylation sites are indicated by *arrows* with amino acid numbers. Lysine and arginine residues are marked with *single underlines*.

CD8 Chimera Clustering—NIH 3T3 cells were transfected with CD8 chimeric constructs bearing Nephrin-CD at the COOH-terminal end. At 24 h after transfection, Dulbecco's modified Eagle's medium was removed and replaced with fresh medium containing 1 μ g/ml CD8 antibody (clone RPA-T8, BD

Biosciences). Cells were maintained at 37 °C for 10 min. At this point, cells were washed with PBS and replaced with medium containing 1 μ g/ml goat anti-mouse IgG (Pierce), and incubation was continued for 15 min for the recruitment experiment. Cells were washed three times with PBS and fixed with 3.7%

formaldehyde for 10 min at room temperature. Fixed cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min. After washing with PBS, the cells were incubated with primary antibodies in PBS containing 1% bovine serum albumin for 1 h, followed by incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000 dilution; Invitrogen) for 1 h. Coverslips were mounted on glass slides using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen Corp.). Samples were observed on an inverted microscope (model IX71; Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a PlanApo $\times 60$, 1.4 numerical aperture oil immersion objective. Images were obtained with a cooled charge-coupled device camera (ORCA-ER; Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) controlled by Aqua-Lite software (Hamamatsu Photonics) and were processed using Adobe Photoshop CS3.

Inositol 1,4,5-Trisphosphate Generation Assay—HEK293T cells (2.4×10^6) were transfected with CD8/Nephrin-CD and PLC- $\gamma 1$ vectors. These cells were stimulated with the primary antibody for 10 min at 37 °C and the secondary antibody for the indicated times at 37 °C. Determination of IP $_3$ production was performed using the Biotrak IP $_3$ assay system (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. Ratios compared with the control (secondary antibody: 0 min) are shown as the mean of three independent experiments. Error bars represent the S.D.

Determination of $[Ca^{2+}]_i$ Changes with the Ratiometric Pericam—The intracellular Ca^{2+} change was measured using a fluorescent Ca^{2+} indicator, ratiometric pericam (22). HEK293T cells expressing the ratiometric pericam were analyzed by video imaging using a multidimensional imaging workstation (AS MDW, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with dual alternative excitations at 410 and 490 nm and detection with a fluorescent emission filter, 520–600 nm. The 490 nm/410 nm excitation ratio, which increases as a function of intracellular Ca^{2+} , was captured at 5-s intervals.

Animals—All the experiments using model animal were carried out according to the guidelines set by the Animal Center of the Institute of Medical Science at the University of Tokyo. Perfusion of rat kidneys with protamine sulfate (PS) was carried out essentially as previously described (21). Six-week-old male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc. (Atsugi, Japan). The rats were anesthetized with pentobarbital. Kidneys were perfused through the aorta at 5 ml/min with Hanks' balanced salt solution for 20 min followed by PS solution (500 μ g/ml in Hanks' balanced salt solution) for 20 min. The cryostat sections for immunohistological study and glomerular lysates were prepared as previously described (23).

RESULTS

Characterization of Anti-Nephrin Antibody—We prepared a rabbit polyclonal antibody against the rat Nephrin carboxyl-terminal 17 amino acid residues. To assess the specificity of the antibody, the full-length rat Nephrin cDNA was cloned and transiently expressed in human embryonic kidney HEK293T cells. A portion of the cell lysates was subjected to immunoblotting with this antibody. As shown in Fig. 1A, the anti-Nephrin antibody recognized a protein with an apparent molecular mass of ~ 180 kDa in the Nephrin-transfected cells but not in the

Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ

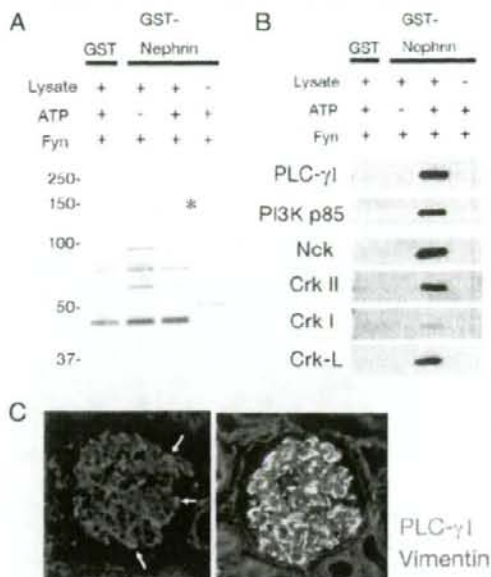


FIGURE 3. Identification of PLC- $\gamma 1$ as a phospho-Nephrin-binding protein. A, recombinant GST-Nephrin-CD was bound to glutathione-Sepharose beads and incubated with recombinant Fyn with or without ATP. After washing, the beads were incubated with lysates from HEK293T cells, and bound proteins were analyzed by silver staining. These experiments were repeated four times, and representative data are shown. B, multiple proteins specifically bind to phosphorylated Nephrin. Protein samples in A were analyzed by immunoblotting for the indicated antibodies. C, expression of PLC- $\gamma 1$ in podocytes. Indirect immunofluorescence microscopy was performed to detect PLC- $\gamma 1$ in adult rat kidney cryosections (left). Colocalization with vimentin suggests that PLC- $\gamma 1$ is highly expressed in podocyte in renal glomeruli (right). Magnification was $\times 400$.

empty vector transfectants. Rat glomeruli were isolated using a sieving protocol (21), and their extracts were analyzed similarly. A protein with a slightly slower mobility than overexpressed Nephrin in HEK293T cells, probably due to a difference in post-translational modification, was clearly visible. We immunostained kidney sections isolated from normal rats with this antibody, which resulted in a specific staining in renal glomeruli (Fig. 1B). Nephrin staining shows a typical podocyte pattern along glomerular capillary loops (Fig. 1C).

Identification of Tyrosine Residues of Nephrin Phosphorylated by Fyn—Recent studies have revealed that the SD protein complex conducts phosphorylation-mediated signals to integrate the junctional structure and cytoskeletal dynamics in podocytes. Nephrin is tyrosine-phosphorylated by Fyn in developing glomeruli and injured podocytes, recruiting Nck to the SD to regulate actin filament polymerization (12, 13). To extend our knowledge of the mechanism regulated by Nephrin phosphorylation, we first determined the tyrosine residues phosphorylated by Fyn. To identify these sites, we performed *in vitro* phosphorylation of Nephrin by recombinant active Fyn and confirmed that Nephrin-CD (cytoplasmic domain, amino acids 1104–1252) was tyrosine-phosphorylated by Fyn *in vitro* (Fig. 2A). The significant mobility shift indicates multiple phosphorylation and conformational changes of Nephrin-CD.

Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ

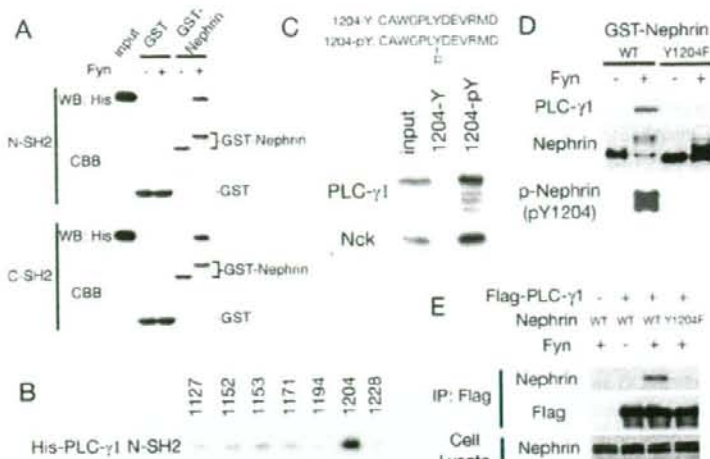


FIGURE 4. PLC- γ 1 directly binds to phosphorylated Nephrin Tyr(P)-1204. A, recombinant GST or GST-Nephrin-CD was bound to glutathione-Sepharose beads and incubated with or without Fyn. After washing, the beads were incubated with recombinant His-tagged N- or C-SH2 domain of PLC- γ 1, and bound proteins were immunoblotted with anti-His antibody. CBB, Coomassie Brilliant Blue staining. WB, Western blot. B, phosphorylated Nephrin peptides were immobilized to SulfoLink coupling gel to pull down His-PLC- γ 1-N-SH2. PLC- γ 1-N-SH2 specifically bound to phospho-Tyr-1204. C, phosphorylated or nonphosphorylated Nephrin Tyr-1204 peptides were immobilized to coupling gel and incubated with HEK293T cell lysates. The bound proteins were immunoblotted with anti-PLC- γ 1 and anti-Nck. D, GST-Nephrin-CD wild type or Y1204F were phosphorylated by Fyn and immobilized to glutathione-Sepharose. The beads were incubated with HEK293T lysates, and bound proteins were analyzed by Western blotting for PLC- γ 1. E, HEK293T cells were transfected with indicated vectors, and anti-FLAG immunoprecipitates (IP) and cell lysates were analyzed by Western blotting for FLAG and Nephrin.

These samples (phosphorylated and nonphosphorylated Nephrin-CD) were digested with trypsin, and their peptide mass fingerprints were compared. Fig. 2B shows the peptide mass spectra of nonphosphorylated (*top*) and phosphorylated (*bottom*) Nephrin-CD. When a peptide is phosphorylated, its peptide mass should increase by 80 Da. By this criterion, we could identify phosphorylated peptides by comparing these two spectra. In the Fyn-phosphorylated samples, significant decreases in peak intensity were observed for peptides of 1747.8 Da (corresponding to amino acids 1193–1208) and 2497.2 Da (amino acids 1226–1248) (indicated by *downward arrows* in Fig. 2B), and concomitantly phosphorylated forms of these peptides were identified. Similarly, partial phosphorylation of peptides of 909.4 Da (amino acids 1209–1215), 1513.6 Da (amino acids 1125–1136), 1782.8 Da (amino acids 1123–1136), 1885.8 Da (amino acids 1125–1139), 1906.8 Da (amino acids 1140–1156), and 4089.9 Da (amino acids 1157–1192) (Fig. 2, B (indicated by *upward arrows*) and C) were also observed. These results suggested that all of the eight tyrosine residues in rat Nephrin-CD can at least be partially phosphorylated *in vitro*, and of those, Tyr-1194, Tyr-1204, and Tyr-1228 are the major sites for the tyrosine phosphorylation.

Identification of SH2 Domain-containing Proteins That Associate with Phosphorylated Nephrin—To characterize the diverse function of Nephrin tyrosine phosphorylation, we investigated phospho-Nephrin-binding proteins by pull-down strategy. GST or GST-Nephrin-CD was immobilized on glutathione-Sepharose beads and phosphorylated by Fyn *in vitro*. These samples were used to pull down binding proteins from

HEK293T cells. Proteins trapped on the beads were analyzed by silver staining. As shown in Fig. 3A, a 150-kDa protein specifically bound to phosphorylated Nephrin (marked by an *asterisk*). This band was excised and subjected to peptide mass fingerprinting, as described under "Experimental Procedures." Using the MASCOT (available on the World Wide Web) data base search algorithms, this protein was identified as human PLC- γ 1 (probability 9.8E-009, score 113, coverage 14%). Proteins trapped on the beads were also analyzed by immunoblotting using antibodies against several SH2 domain-containing proteins. Of these, Crk family proteins (Crkl, CrkII, and Crk-I), Nck, and phosphatidylinositol 3-kinase p85 also specifically bound to Nephrin in a phosphorylation-dependent manner (Fig. 3B). Rat glomerular cryosections were immunostained with antibody to PLC- γ 1 (Fig. 3C, *left*). Although not restricted to podocytes, PLC- γ 1 is highly expressed in

podocytes, which are indicated by expression of the podocyte marker vimentin (Fig. 3C, *right*).

PLC- γ 1 Directly Binds to Phosphorylated Tyr-1204 of Nephrin—Next, the interaction between Nephrin and PLC- γ 1 was investigated. PLC- γ 1 has two SH2 domains (N-SH2 and C-SH2). GST or GST-Nephrin-CD immobilized on glutathione beads phosphorylated by Fyn *in vitro* was incubated with either of the His-tagged SH2 domains of PLC- γ 1, and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-His antibody. As shown in Fig. 4A, both SH2 domains directly bound to phosphorylated Nephrin. To identify the critical tyrosine residue for the interaction, pull-down analysis using phosphorylated Nephrin peptides was performed. Tyr-1212 was omitted, because this tyrosine is not conserved in human Nephrin. As shown in Fig. 4B, the PLC- γ 1 N-SH2 domain specifically bound to phosphorylated Tyr-1204 peptide. The PLC- γ 1 C-SH2 domain did not show specific binding to these peptides (data not shown). C-SH2 may be involved in intramolecular binding to Tyr-783, as described (24). Phosphorylation specificity was also examined by pull-down analysis using nonphosphorylated and phosphorylated Nephrin peptide around Tyr-1204. When the peptide-immobilized beads were incubated with HEK293T lysates, Nck and PLC- γ 1 specifically bound to phosphorylated Tyr-1204 (Fig. 4C). Site specificity was also confirmed by pull-down analysis using GST-Nephrin Y1204F (Fig. 4D). We also confirmed this interaction in transiently transfected HEK293T cells. PLC- γ 1 was specifically coimmunoprecipitated with Fyn-phosphorylated wild type Nephrin but not with nonphosphorylated Nephrin or with the phosphoryl-

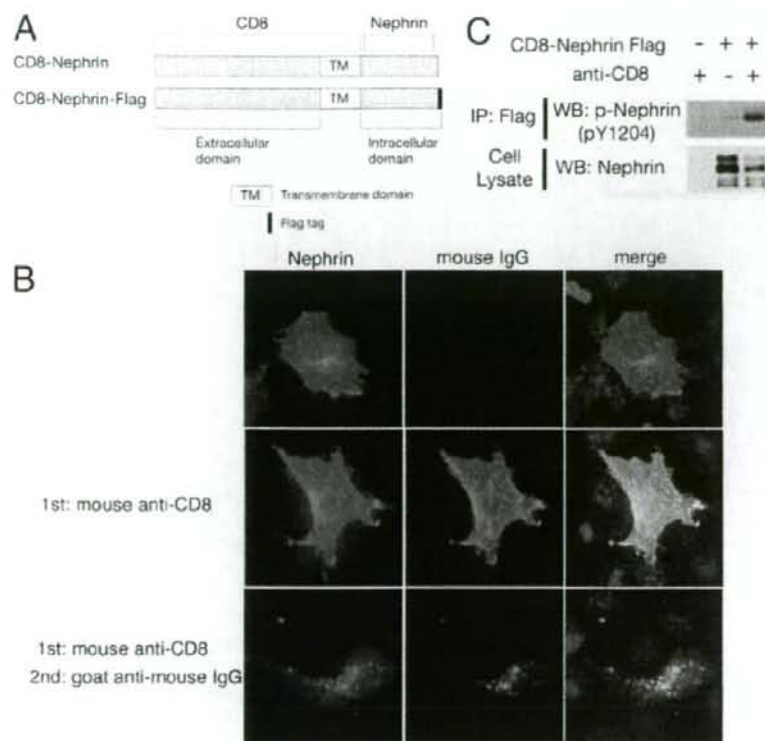


FIGURE 5. Clustering of Nephrin-CD. *A*, schematic representation of CD8 fusion proteins. *B*, clustering of the CD8/Nephrin-CD by cross-linking. HEK293T cells expressing CD8/Nephrin-CD were treated with mouse anti-CD8 (*middle panels*) or with anti-CD8 plus goat anti-mouse IgG (*lower panels*) and then fixed. Cells were stained with anti-Nephrin antibody (*green*), anti-mouse IgG antibody (*red*), and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (*blue*). Representative data are shown. Magnification was $\times 100$. *C*, HEK293T cells expressing CD8/Nephrin-CD-FLAG were treated with clustering antibodies (*left and right lanes*; primary + secondary antibody; *middle lane*; secondary antibody only), and then the cell lysates and FLAG immunoprecipitates (IP) were immunoblotted for Nephlin and phospho-Nephrin (Tyr(P)-1204). *WB*, Western blot.

ated Y1204F mutant (Fig. 4E). These results indicate that PLC- γ directly binds to phosphorylated Tyr-1204 of Nephrin.

Nephrin Clustering Induces Its Phosphorylation and Recruits PLC- γ to Nephrin-CD—The phosphorylated tyrosine residues in receptors for growth factors, immunoglobulins, and cytokines provide a set of specific docking platforms to recruit various effector proteins, including PLC- γ . The recruitment of PLC- γ to tyrosine-phosphorylated growth factor receptors activates PLC- γ and mobilizes the internal Ca^{2+} stores and further affects multiple downstream protein kinase pathways that control or modulate diverse cellular functions. It is already known that upon clustering of Nephrin-CD, the Src family protein kinase rapidly catalyzes the phosphorylation of Nephrin. Phosphorylated Nephrin recruits Nck to the plasma membrane, which results in concomitant recruitment of components of the actin polymerization complex and induction of localized actin polymerization (12, 13). We sought to test the hypothesis that in a similar fashion, PLC- γ may be recruited to Nephrin-CD at the plasma membrane. To this end, a modified strategy developed by Verma *et al.* (12) and Jones *et al.* (13) was used. A fusion protein construct was created in which the CD8

extracellular domain and the transmembrane domain (amino acids 1–206) were coupled to Nephrin-CD (CD8/Nephrin-CD) (Fig. 5A). This fusion protein was expressed in cultured cells by transient transfection. After 24 h, a mouse anti-CD8 antibody and a secondary anti-mouse IgG antibody were added to the culture media. This procedure induced visible aggregation or clustering of the CD8 fusion protein on the plasma membrane (Figs. 5B and 6) and induced tyrosine phosphorylation on Tyr-1204 of CD8/Nephrin-CD (Fig. 5C). To test whether Nephrin clustering induces PLC- γ 1 relocalization, NIH 3T3 cells were cotransfected with plasmids encoding CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1-GFP and were examined by immunofluorescence. Upon clustering, a significant portion of PLC- γ 1-GFP forms a dotlike structure, which colocalized with Nephrin-CD at the plasma membrane, as stained by anti-CD8 (Fig. 6). Approximately 60–70% of CD8-Nephrin clusters contain PLC- γ 1. We did not detect any PLC- γ 1 clusters where anti-CD8 antibody was not present. These results clearly indicate that Nephrin clustering recruits PLC- γ 1 to Nephrin-CD.

Clustering of Nephrin Activates PLC- γ 1 and Induces Ca^{2+} Response—

Recruitment of PLC- γ to growth factor receptors results in its tyrosine phosphorylation, and this phosphorylation is necessary for its activation. Although PLC- γ 1 is rapidly phosphorylated at Tyr-771 and Tyr-783 in response to epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor kinases, Tyr-783 is known to be crucial for the activation of PLC- γ 1 through its intramolecular interaction with C-SH2 (24). Therefore, we examined whether PLC- γ 1 is phosphorylated and activated in response to Nephrin phosphorylation using phosphospecific antibody for PLC- γ 1 Tyr(P)-783. When HEK293T cells expressing FLAG-tagged CD8/Nephrin-CD and FLAG-tagged PLC- γ 1 were treated with the primary and secondary antibodies, clustering-induced tyrosine phosphorylation of Nephrin on Tyr-1204 occurred within 1 min of the addition of clustering antibodies, and Tyr(P)-1204 was quickly dephosphorylated after 4–5 min (Fig. 7A). On the other hand, phosphorylation of PLC- γ 1 Tyr-783 was observed 2 min after antibody treatment and persisted for more than 45 min (Fig. 7, A and B). The phosphorylation of PLC- γ 1 Tyr-783 was absolutely dependent on Nephrin Tyr-1204 phosphorylation, because Y1204F mutant did not induce this phosphorylation at all (Fig. 7C).

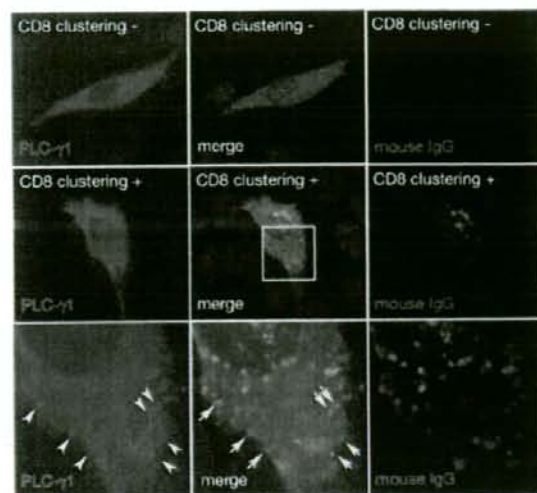
Nephrin Triggers Ca^{2+} Signaling through PLC- γ 

FIGURE 6. PLC- γ 1 is recruited to the CD8/Nephrin-CD cluster. NIH3T3 cells expressing CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1-GFP (green) were treated with mouse anti-CD8 antibody and goat anti-mouse IgG antibody (middle and lower panels) or were treated with the secondary antibody only (upper panels) and then fixed and stained for mouse IgG (red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). Higher magnification images corresponding to a square in a middle panel are shown in the lower panels. PLC- γ 1 forms clusters upon CD8 clustering and the clusters were colocalized with CD8/Nephrin-CD clusters. Magnification was $\times 400$.

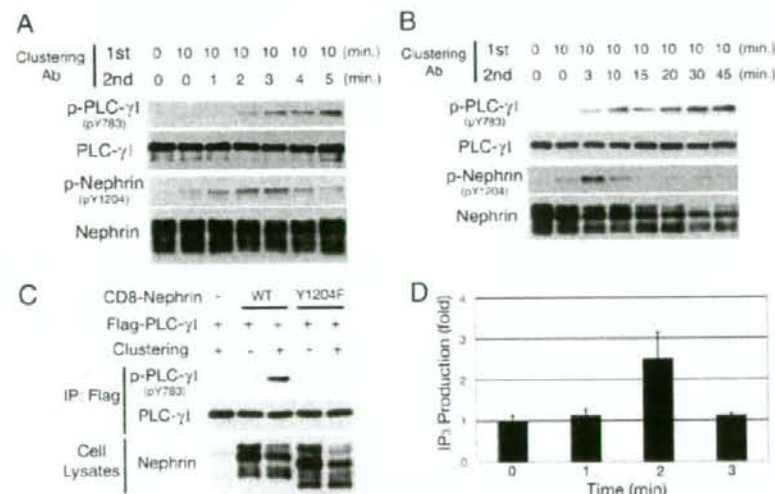


FIGURE 7. Nephrin clustering activates PLC- γ 1. *A* and *B*, HEK293T cells expressing FLAG-tagged PLC- γ 1 and CD8/Nephrin-CD were treated with or without mouse anti-CD8 antibody for 10 min and then with goat anti-mouse IgG antibody for the indicated periods of time. Anti-FLAG immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with the antibodies indicated. Nephrin is phosphorylated in 1 min after CD8/Nephrin-CD clustering and dephosphorylated after 4–5 min, whereas phosphorylation of PLC- γ 1 is observed after 2 min and continues for over 45 min. *C*, phosphorylation of PLC- γ 1 is abrogated by substitution of Tyr-1204 to Phe, indicating the critical role of this tyrosine in the activation of PLC- γ 1. Incubation time for the secondary antibody was 15 min. *IP*, immunoprecipitation; *WT*, wild type. *D*, IP_3 production. IP_3 levels in these cells were measured using a competitive binding assay with radiolabeled IP_3 -binding proteins. Three independent competitive radioreceptor assays for IP_3 levels in the cells as in *A* were performed, and the mean values are shown with S.D.

The activation of PLC- γ induced by stimulation of surface membrane receptors triggers hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into IP_3 and diacylglycerol and elicits Ca^{2+} signals. Therefore, we measured IP_3 levels in cells treated with clustering antibodies. As shown in Fig. 7*D*, clustering of Nephrin-CD resulted in generation of IP_3 within 2 min, which is well correlated with the activation of PLC- γ 1.

We next examined whether this clustering-induced activation of PLC- γ 1 is involved in Ca^{2+} signaling. HEK293T cells were cotransfected with CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1. Real time changes in the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were monitored in individual cells, using the Ca^{2+} -selective sensor pericam (22). The fluorescence ratio at 490 nm excitation to that of 410 nm excitation reflects $[Ca^{2+}]_i$ at a constant pH (22). Clustering of Nephrin-CD triggered a rapid rise in pericam excitation ratio 490 nm/410 nm (Fig. 8*A*), indicating a clustering-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise. Both CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1 were necessary for this clustering-induced $[Ca^{2+}]_i$ change, because the omission of either component abolished the Ca^{2+} response (Fig. 8, *B* and *C*). No increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed when HEK293T cells cotransfected with CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1 were treated with either the first or second antibody alone (Fig. 8, *D* and *E*), demonstrating the specificity of the clustering response. Because no change in $[Ca^{2+}]_i$ was observed when cells expressing CD8/Nephrin-CD Y1204F mutant, which does not bind to PLC- γ 1, were treated with clustering antibodies (Fig. 8*F*), the recruitment of PLC- γ 1 to Nephrin Tyr-1204 is crucial for the Ca^{2+} signal. To examine whether

the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in response to Nephrin clustering originated primarily from internal Ca^{2+} store release or external Ca^{2+} influx, HEK293T cells transfected with CD8/Nephrin-CD and PLC- γ 1 were stimulated with clustering antibodies in the absence of extracellular Ca^{2+} (Fig. 8*G*). The initial transient rise in $[Ca^{2+}]_i$ of clustering-stimulated cells was still observed under these conditions, suggesting that at least some of the Ca^{2+} response originates from internal stores. When the cells were pretreated with thapsigargin (a SERCA pump inhibitor) to deplete internal Ca^{2+} stores (Fig. 8*H*), there was no Ca^{2+} response in cells treated with clustering antibodies. Furthermore, a PLC inhibitor, U73122, partially inhibited the sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$, suggesting the involvement of PLC- γ 1 activity in the Ca^{2+} response (Fig. 8*I*). Recently, other Ca^{2+} -mobilizing messengers, such as cADP-ribose and NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate), have been shown to be involved in