

## 9630 脳および腎臓の新しい塩素イオンポンプ

助成研究者：稲垣 千代子(関西医科大学 医学部)  
共同研究者：服部 尚樹(関西医科大学 医学部)  
東田 敏明(関西医科大学 医学部)  
曾 訓庭(関西医科大学 医学部)

研究目的：神経細胞の細胞内塩素イオン濃度を受動分布のレベルよりも低く保つことは、中枢神経の抑制性制御に必須の要件であるが、この勾配形成の機構は不明であった。我々は、この機構の候補として中枢神経に初めて塩素イオン汲み出し機構(塩素イオンポンプ-ATPase)を見出し(J. Biol. Chem. 1989)、その機能と分子実体を解析している。塩素イオンポンプ-ATPase 活性は、中枢神経の他に末梢組織中では腎に認められる。最近、脳の塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)の単離に成功し、これに対する抗体を作製した。本研究は、脳と腎臓における塩素イオンポンプの局在を免疫組織学的に明らかにし、塩素イオンポンプの活性サブユニットを同定することを目的とする。

結果と考察：(1) 抗塩素イオンポンプ抗体の作製：ラット脳の細胞膜分画から調整した塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)をウサギに免疫した結果、塩素イオンポンプ蛋白の51kDaサブユニットを認識し、Cl<sup>-</sup>-ATPase活性およびATP依存性<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>輸送活性(塩素イオンポンプ活性)を阻害する抗体を得た。51kDaペプチドが塩素イオンポンプの活性に関与するペプチドであることが示唆された。(2) 免疫組織化学：上記抗体を用いた免疫組織化学により、塩素イオンポンプ蛋白はラット大脳皮質錐体細胞や小脳プルキンエ細胞の細胞膜の他、腎の皮質および髄質集合管間在細胞の基底膜側に局在することが明らかになった。塩素イオンポンプは細胞内塩素イオン濃度の低い神経細胞や腎尿細管の最終部位で能動的塩素イオン輸送を司ることが示唆された。(3) 塩素イオンポンプ活性サブユニット：塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動により、51kDaペプチドの他、3種のペプチドバンドが確認された。その中の一つは既知の蛋白アミノ酸配列と相同性のないN末端アミノ酸配列をもつことが明らかになった。

塩素イオンポンプは、51kDaの活性サブユニット候補蛋白を含む新しい蛋白複合体であり、脳神経細胞の他に腎集合管間在細胞に存在することが明らかになった。



## 9630 脳および腎臓の新しい塩素イオンポンプ

助成研究者：稲垣 千代子 (関西医科大学 医学部)  
 共同研究者：服部 尚樹 (関西医科大学 医学部)  
 東田 敏明 (関西医科大学 医学部)  
 曾 訓庭 (関西医科大学 医学部)

研究目的

神経細胞の細胞内塩素イオン濃度を受動分布のレベルよりも低く保つことは、中枢神経のGABAおよびグリシン受容体の内蔵する塩素イオンチャネルを介した抑制性制御機構に必須の要件であるが、この勾配形成の機構は不明であった。我々は、この機構の候補として中枢神経に初めて塩素イオン汲み出し機構 (塩素イオンポンプ-ATPase) を見出し<sup>1)</sup>、その機能と分子実体を解析している<sup>2)</sup>。塩素イオンポンプ-ATPase の阻害剤であるエタクリン酸のマウス脳室内投与は痙攣を誘発し<sup>3)</sup>、塩素イオンポンプの中枢神経抑制性制御機構における生理的意義の大きいことが明らかになった。塩素イオンポンプ-ATPase活性は、中枢神経の他に末梢組織中では腎に認められる<sup>4)</sup>。最近、脳の塩素イオンポンプ蛋白 (520 kDa) の単離に成功し、これに対する抗体を作製した。

本研究は、脳と腎臓における塩素イオンポンプの局在を免疫組織化学的に明らかにし、塩素イオンポンプの活性サブユニットを同定することを目的とする。

研究方法

塩素イオンポンプ蛋白の単離：ラット脳のEDTA処理細胞膜分画を非イオン性界面活性剤MEGA-10により可溶化し、CM-セファローズカラム非吸着分画をMono-Q装着高速液体クロマトグラフィーにて分画し、活性分画をポリアクリルアミドゲル電気泳動により展開した。ゲル上の520 kDa 蛋白バンドを切断採取して蛋白を溶出し、濃縮して塩素イオン蛋白標品とした。

抗塩素イオンポンプ抗体の作製：上記の塩素イオンポンプ蛋白をウサギに免疫し、得られた抗血清から硫酸分画法によりIgG分画を調製し、抗塩素イオンポンプ抗体として用いた。

ATPase活性の測定：ATPase活性は、10-20  $\mu$ g 酵素蛋白を 200  $\mu$ l の反応液 [100 mM Tris-Mes, 6 mM  $MgCl_2$ , 6 mM ATP-Tris, 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA,  $\pm$ 1 mM ウアバイン、 $\pm$ 0.3 mM エタクリン酸)、pH 7.4] 中で37 $^{\circ}$ C、10-20 分反応させ、遊離した無機リン酸を比色定量して算出した。1mM ウアバイン感受性活性を $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性、ウアバ

イン存在下の0.3 mMエタクリン酸感受性活性をCl<sup>-</sup>-ATPase活性、またウアバインおよびエタクリン酸存在下の残存活性をアニオン非感受性活性とした<sup>5)</sup>。

塩素イオンポンプ活性の測定：脳EDTA処理細胞膜分画(膜顆粒)を200μlの反応液[50 mM Tris-Mes, 3 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1 mM picrotoxin, 1 mM ウアバイン, 6 mM [<sup>36</sup>Cl]Cl-Tri (0.1μCi), +3 mM ATP-Tris, pH 7.4]中で37°C、4分間反応させた後、グラスフィルター上に膜顆粒を採取して、ATP添加による<sup>36</sup>Cl取り込み活性を塩素イオンポンプ活性とした。

免疫組織化学：エーテル麻醉下ラットの還流固定および後固定後に、脳および腎の20μ切片を作製し、1000倍希釈一次抗体を用いてABC法またはFITC標識二次抗体による蛍光法により観察した。抗水チャネル抗体は、東京医科歯科大学内科・佐々木成先生より提供された。

## 研究結果

(1) 抗塩素イオンポンプ抗体の性質：ラット脳由来塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)に対するウサギ抗血清(IgG)は、塩素イオンポンプ蛋白のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動展開後の51 kDaサブユニットを認識し、Cl<sup>-</sup>-ATPase活性およびATP依存性<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>輸送活性(塩素イオンポンプ活性)を阻害した。

このことから、51kDaペプチドが塩素イオンポンプの活性に関与するペプチドであることが示唆された。

(2) 免疫組織化学による塩素イオンポンプの局在：上記抗体を用いた免疫組織化学により、塩素イオンポンプ様免疫活性は、ラット大脳皮質錐体細胞、小脳プルキンエ細胞、脊髄前角運動神経細胞の細胞膜の他、腎の皮質および髄質集合管上皮細胞の基底膜側に局在することが明らかになった(図1、2)。腎髄質集合管上皮細胞のうち主細胞の管腔側に存在することが知られている水チャネル(アクアポリン)の免疫染色を同時に行ったところ、水チャネル様免疫活性を示さない細胞にのみ塩素イオンポンプ様免疫活性が認められたので、腎の塩素イオンポンプは集合管間細胞の基底膜側に局在することが明らかになった。

これらの所見から、塩素イオンポンプは細胞内塩素イオン濃度の低い神経細胞や腎尿管の最終部位で能動的塩素イオン輸送を司ることが示唆された。

(3) 塩素イオンポンプのサブユニット：塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分子量(kDa)51、55、60、64のペプチドバンドが確認された。51および55 kDaペプチドは、既知の蛋白アミノ酸配列と相同性のないN末端アミノ酸配列をもつことが明らかになった。また、抗塩素イオンポンプ抗体は脳・脊髄および腎

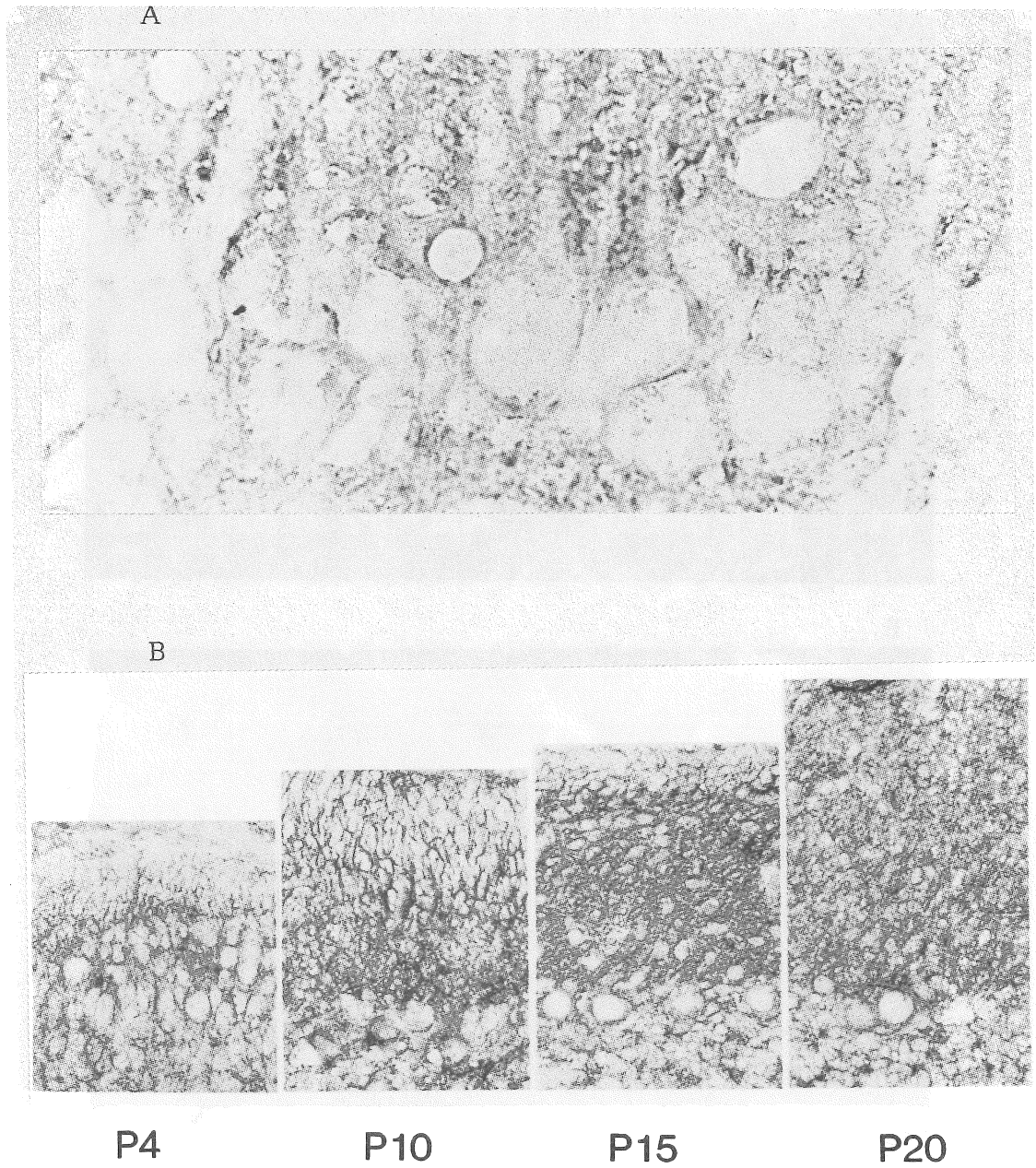


Fig. 1 Cl<sup>-</sup> pump immunoreactivity in the rat brain.

A: Hippocampus CA1 pyramidal cells.

B: Cerebellar Purkinje cells at different postnatal stages (4-20 days).

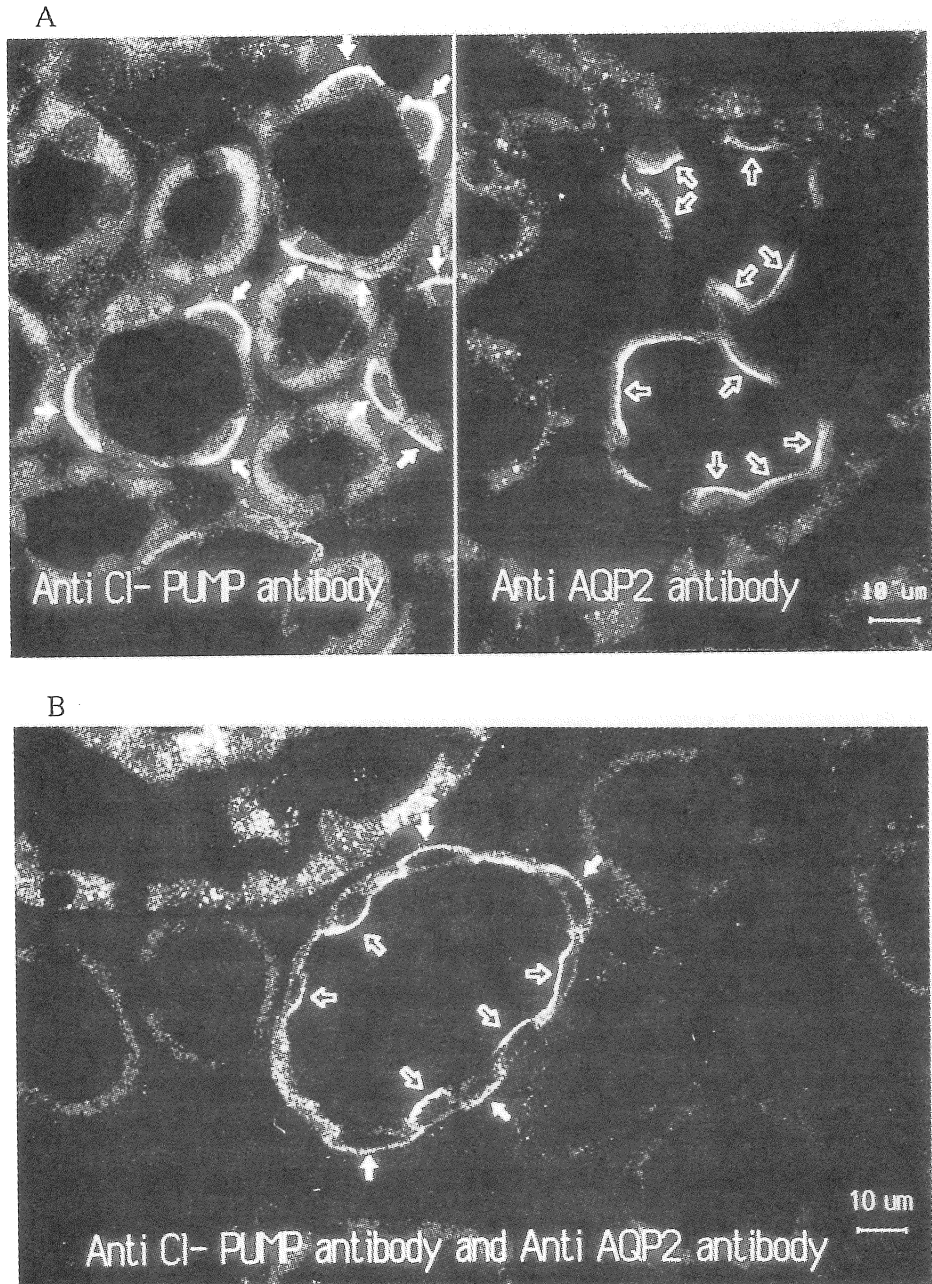


Fig. 2 Cl<sup>-</sup> pump immunoreactivity in the rat kidney.

A: Collecting ducts in reference to aquaporin immunoreactivity.

B: Double staining of collecting ducts (Cl<sup>-</sup> pump and aquaporin at basal and apical membranes, respectively).

の膜分画に含まれる51kDa ペプチドを認識し、両組織のCl<sup>-</sup>-ATPase活性および塩素イオンポンプ活性を部分的に抑制したが、心臓、肺、胃粘膜、小腸、肝、副腎、脾臓および膀胱などのCl<sup>-</sup>-ATPase活性の低い組織<sup>3)</sup>では、抗塩素イオンポンプ抗体反応性51kDa ペプチドは確認されなかった。

これらの所見から、塩素イオンポンプ蛋白は51 kDaの活性(基質結合または触媒)サブユニット候補蛋白を含む新しい蛋白複合体であると推定される。

## 考察

アニオンである塩素イオンを能動的に輸送する機構には、これまで生理学的興味を示されなかった。しかしながら、成熟動物の中樞神経では GABA<sub>A</sub>受容体・塩素イオンチャネルの活性化が過分極応答を示すこと、また幼若動物では中樞神経細胞内の塩素イオン濃度が高く<sup>2)</sup>、GABA<sub>A</sub>受容体・塩素イオンチャネルの活性化は興奮を惹起すること、などから、細胞内外の塩素イオン濃度勾配の形成が中樞神経抑制性神経伝達に極めて重要であることが明らかになった。この勾配を形成する能動輸送系としての、塩素イオンポンプの意義は大きい。

塩素イオンポンプの存在は、哺乳類以外では、腔腸動物(Aplysia)の腸細胞<sup>6)</sup>および藻類(カサノリ)<sup>7)</sup>において報告され、それぞれ細胞外または細胞内への能動的塩素イオン輸送を担っていると考えられる。分子構造は、前者では100 kDaペプチド、後者では54 kDaと50 kDaのサブユニットからなる蛋白複合体であると推定されている。本研究で報告している哺乳類の塩素イオンポンプは、細胞の塩素イオン汲み出し機構として作動する点では前者と類似の機能を持つが、構造は異なり、また後者とはサブユニット構造を持つ点で共通性が認められるが、塩素イオンの輸送方向は逆方向である。

今回作製された塩素イオンポンプ蛋白(520 kDa)に対する抗体は、脳および腎の膜分画または塩素イオンポンプ蛋白(520 kDa)のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後の51 kDaペプチドのみを認識し、Cl<sup>-</sup>-ATPaseおよび塩素イオンポンプ活性を脳および腎において抑制し、またCl<sup>-</sup>-ATPase活性の少ない組織では免疫反応性が低かったことから、抗塩素イオンポンプ抗体としての性質を持つと考えられる。また、これらの所見から51 kDaペプチドが塩素イオンポンプの活性に関わる構成蛋白であること推定される。

中樞神経において塩素イオンポンプ様免疫活性が明らかに認められた神経細胞は、いずれもGABA<sub>A</sub>受容体刺激またはグリシン受容体刺激により過分極性膜電位変化を示す細胞であり、塩素イオン平衡電位が静止膜電位よりも低く、細胞内塩素イオン濃度は能動的に低く維持されていることが推定される神経細胞である。この実験結果は、塩素イオンポンプがこれらの神経細胞において塩素イオンの能動的汲み出し機構として作動しているとの推論<sup>2, 8)</sup>を支持するものである。

腎における塩素イオンポンプ様免疫活性は、集合管の間在細胞基底膜側にのみ認められ

た。これまでに知られている集合管の主細胞水チャネルと間質高浸透圧による尿濃縮機能に加えて、間在細胞が尿生成の最終段階で電解質の中でも特に塩素イオンの能動輸送によって体液電解質を調節する可能性が示唆される。エタクリン酸は、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  共輸送を阻害するループ利尿薬として分類されるが、他のループ利尿薬とは化学構造が異なり、塩素イオンポンプを阻害する<sup>1)</sup>。エタクリン酸は、他のループ利尿薬に比べてその利尿効果に種差が大きく、耳毒性出現頻度も高い。この種差や耳毒性と塩素イオンポンプ活性との関連も検討を要する。

#### 今後の課題

- (1) 塩素イオンポンプの分子構造を、各サブユニットのcDNAクローニングによる全アミノ酸配列の解析により明らかにし、哺乳類塩素イオンポンプの構造的特徴を示す。
- (2) 塩素イオンポンプの発達・老化・病態における意義を、特に中枢神経組織において解析する。

#### 文献

- 1) Shiroya, T., R. Fukunaga, K. Akashi, N. Shimada, Y. Takagi, T. Nishino, M. Hara and C. Inagaki: J. Biol. Chem. 264, 17416 (1989)
- 2) Inagaki, C., M. Hara and X.-T. Zeng: J. Exp. Zool. 275, 262 (1996)
- 3) Inoue, M., H. Uriu, H. Otani, M. Hara, K. Omori and C. Inagaki: Eur. J. Pharmacol. 166, 101 (1989)
- 4) Kunugi, Y., Y. Hiraoka, Y. Hashimoto, T. Taniguchi and C. Inagaki: Jpn. J. Pharmacol. 57, 167 (1991)
- 5) Inagaki, C., T. Tanaka, M. Hara and J. Ishiko: Biochem. Pharmacol. 34, 1705 (1985)
- 6) Gerencser, G. A. and K. R. Purushotham: J. Bioenerg. Biomemb. 28, 459 (1996)
- 7) Moritani, C., T. Ohhashi, H. Kadowaki, M. Tagaya, T. Fukui, F. Lottspeich, D. Oesterhelt and K. Ikeda: Arch. Biochem. Biophys. 339, 115 (1997)
- 8) Inagaki, C., M. Hara and M. Inoue: Adv. Comp. Environ. Physiol. 19, 59 (1994)



A chloride ion pump ( $\text{Cl}^-$  pump) in brain and kidney

Chiyoiko Inagaki, Naoki Hattori, Toshiaki Higashida and Xun-Ting Zeng

Department of Pharmacology, Kansai Medical University

The chloride ion concentration in neurons of the central nervous system such as spinal motoneurons and hippocampal pyramidal cells is lower than that predicted from passive distribution. This enables inhibitory hyperpolarizing responses to occur when transmitter operated chloride channels are facilitated. As a candidate for an active chloride transporting system that produces such an inwardly directed chloride gradients, we found an ATP-dependent chloride extrusion system,  $\text{Cl}^-$  pump, in the brain (J. Biol. Chem. 1989). Later, the activity was also found in the kidney. Recently, we isolated 520 kDa protein with  $\text{Cl}^-$  pump activity. In this study, we analyzed subunit structure and localization of  $\text{Cl}^-$  pump using anti- $\text{Cl}^-$  pump antibody.

(1)  $\text{Cl}^-$  pump protein (520 kDa) was isolated from plasma membrane fractions of rat brain, and administered subcutaneously to rabbits for immunization. Anti- $\text{Cl}^-$  pump antibody reacted with 51 kDa subunit of  $\text{Cl}^-$  pump and inhibited both  $\text{Cl}^-$ -ATPase and ATP-dependent  $^{36}\text{Cl}^-$  transport ( $\text{Cl}^-$  pump) activities. (2)  $\text{Cl}^-$  pump-like immunoreactivity was observed in the plasma membranes of brain neurons such as cerebral cortical pyramidal cells and cerebellar Purkinje cells, and those of basal plasma membranes of intercalated cells of renal collecting ducts. (3) Electrophoresis (SDS-PAGE) of  $\text{Cl}^-$  pump protein yielded at least 3 peptide bands including immunoreactive one (51 kDa) and that with an N-terminal amino acid sequence that has not been reported previously.

It is suggested that  $\text{Cl}^-$  pump has multisubunit structure with a possible active subunit of 51 kDa peptide, and is localized in plasma membranes of brain neurons and intercalated cells of renal collecting ducts.