

9735 新しい塩素イオンポンプの分子構造

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)

北川 香織 (関西医科大学 医学部)

東田 敏明 (関西医科大学 医学部)

研究目的：我々が脳に見出した塩素イオンポンプは、推定分子量520kDaの新しい塩素イオン能動輸送系である。中枢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。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。これまでの研究で、塩素イオンポンプは中枢神経と腎臓にのみ存在し、少なくとも4種のサブユニットから構成されることが明らかになった。本年度は、新たにサブタイプ特異的抗塩素イオンポンプ抗体を作製して、各サブタイプの機能を同定し、各サブユニット蛋白一次構造を明らかにすることを目的とする。

結果と考察：(1) 塩素イオンポンプのサブユニット：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)は、少なくとも4種のペプチド(64, 60, 55, 51 kDa)を含み、この内51kDaペプチドに対する抗体はCl⁻-ATPase活性およびATP依存性³⁶Cl⁻輸送活性(塩素イオンポンプ活性)を阻害した。更に、55kDaペプチドのN-末端アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサーにより得、その18残基に対応する合成ペプチドをウサギに免疫し、新たに55kDaペプチドを単一バンドとして認識する抗体および55kDaペプチドのほか51kDaペプチドを弱く認識する抗体を得た。両抗体の内後者はCl⁻-ATPase活性を阻害し、51kDaペプチドが塩素イオンポンプのCl⁻-ATPase活性サブユニットであることが示唆された。(2) 55kDaサブユニット遺伝子の塩基配列：55kDaサブユニットの部分アミノ酸から推定される塩基配列に対応するアンチセンスプライマーを合成し、一方向性に挿入されたラット脳cDNAライブラリーを鋳型に5'プロモーター領域を増幅して、大腸菌を用いたサブクローニングの後、55kDaペプチドN-末端アミノ酸配列を含む、5'上流領域173bpのDNA塩基配列を得た。この配列に対して高い相同性を示す既知のDNAは検索上見当たらなかった。

塩素イオンポンプは、51kDaペプチドをCl⁻-ATPase活性サブユニットとし、少なくとも4種のサブユニットから成る新しい蛋白複合体であると推定される。

9735 新しい塩素イオンポンプの分子構造

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)
 北川 香織 (関西医科大学 医学部)
 東田 敏明 (関西医科大学 医学部)

研究目的：我々が脳に見出した塩素イオンポンプは、推定分子量520kDaの新しい塩素イオン能動輸送系である。中枢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。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。これまでの研究で、塩素イオンポンプは中枢神経と腎臓にのみ存在し、少なくとも4種のサブユニットから構成されることが明らかになった。本年度は、新たにサブタイプ特異的抗塩素イオンポンプ抗体を作製して、各サブタイプの機能を同定し、各サブユニット蛋白一次構造を明らかにすることを目的とする。

研究方法

塩素イオンポンプ蛋白およびサブユニットの単離：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(PAGE)により展開した。ゲル上の520kDa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。520kDa蛋白をSDS-PAGE展開し、PVDF膜に転写してCBC染色後のペプチドバンドを切り出し、アミノ酸シーケンサーにてN-末端アミノ酸配列を分析した。

抗塩素イオンポンプサブユニット抗体の作製：塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)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、SDS-PAGE展開後の塩素イオンポンプ51kDaペプチドにのみ反応する抗体を得、抗51kDaサブユニット抗体として用いた。また、55kDaペプチドのN-末端18アミノ酸残基に相当する合成ペプチドをウサギに免疫し、硫酸分画法によりIgG分画を調整した。この方法で55kDaペプチドに反応する二種の抗体(A、B)を得、抗55kDaサブユニット抗体とした。

ATPase活性の測定：ATPase活性は、10-20 μ g 酵素蛋白を200 μ 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°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⁻-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⁵⁾。

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200 μlの反応液[50 mM Tris-Mes, 3 mM Mg(CH₃COO)₂, 1 mM EDTA, 0.1 mM picrotoxin, 1 mM ウアバイン、6 mM [³⁶Cl]Cl-Tri (0.1 μCi), ±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³⁶Cl取り込み活性を塩素イオンポンプ活性とした。

サブユニットcDNAの5'プロモーター領域の塩基配列分析：サブユニットの部分アミノ酸配列から推定される塩基配列に対応するプライマーを合成し、ラット脳cDNAライブラリーを鋳型に5'プロモーター領域を増幅する。増幅産物をベクターに組み込み、大腸菌を用いてサブクローニングし、その塩基配列をシーケンサーにより分析する。

研究結果と考察

(1) 塩素イオンポンプ蛋白のサブユニット：ラット脳から調整した塩素イオンポンプ蛋白(520kDa)のSDS-PAGE展開により、4種のペプチド(64, 60, 55, 51 kDa)が確認された(図1 a)。520kDa塩素イオンポンプ蛋白を抗原として作製した抗体は、51kDa ペプチドのみを認識した(図1 b, 抗 51kDaサブユニット抗体)。SDS-PAGE展開後にPVDF膜上に転写したこれら4種のペプチドの内、N-末端アミノ酸配列のシーケンサーによる分析は55kDaペプチドにおいてのみ可能であり、他のペプチドについてはN-末端ブロック状態にあると思われる。55kDa ペプチドのN-末端18アミノ酸残基に対応する合成ペプチドをウサギに免疫して二種の抗体を得た。抗体Aは、55kDa ペプチドのみを認識し、抗体Bは55kDa ペプチドの他に51kDa ペプチドを弱く認識した。抗 51kDaサブユニット抗体、抗体Aおよび抗体Bの内、抗 51kDaサブユニット抗体および抗体BのみがCl⁻-ATPase活性を抑制した(表1)。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) 55kDa サブユニット遺伝子の塩基配列：55kDa サブユニットの部分アミノ酸配列(11-16残基、8-12残基)から推定される塩基配列に対応するアンチセンスプライマーを合成し、一方向性に挿入されたラット脳cDNAライブラリーを鋳型に5'プロモーター領域を増幅した。増幅された大腸菌を用いたサブクローニングの後、55kDa ペプチドN-末端アミノ酸配列を含む、5'上流領域173bpのDNA塩基配列を得た。相同性の検索により、この配列に対して50%以上の高い相同性を示す既知のDNAは見当たらなかった。

塩素イオンポンプは、51kDa ペプチドをCl⁻-ATPase活性サブユニットとし、少なくとも4種のサブユニットから成る新しい蛋白複合体であると推定される。

今後の課題

(1) 塩素イオンポンプ各サブユニットのcDNAクローニングによる全アミノ酸配列の解析を可能にするため、N-末端脱ブロック操作および蛋白分解酵素によるペプチド消化断片の

作製を試行しており、これを成功させる。(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。

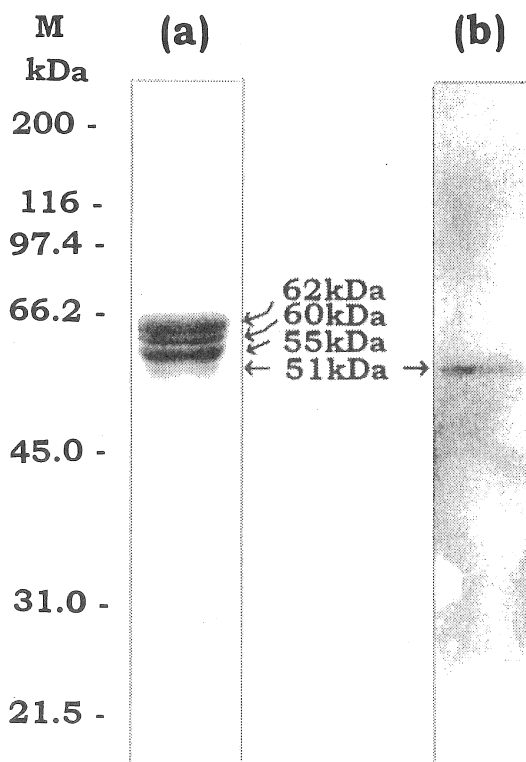


Fig. 1. Western blot analysis of Cl^- pump protein in the rat brain. Cl^- pump protein (520 kDa , $20 \mu\text{g}/\text{lane}$) was subjected to Western blot analysis (SDS-PAGE). (a) Coomassie brilliant blue staining. (b) Immunostaining using anti- 51 kDa subunit antibody and chemiluminescence detection.

Table 1. Effects of antibodies on Cl^- -ATPase and $^{36}\text{Cl}^-$ transport activities.

	Cl^- -ATPase ($\mu\text{moles Pi}/\text{mg protein}/\text{hr}$)	Na^+, K^+ -ATPase	Mg^{2+} -ATPase	$^{36}\text{Cl}^-$ transport ($\text{nmoles Cl}^-/4 \text{ min}$)
Non-immune	2.4 ± 0.5	12.4 ± 4.1	4.1 ± 1.5	1.6 ± 0.6
Anti- 55kDa	$1.1 \pm 0.2^*$	13.4 ± 4.8	4.3 ± 1.7	$0.8 \pm 0.5^*$
Non-immune	5.7 ± 0.7	25.6 ± 3.6	10.8 ± 1.6	ND
Antibody A	5.4 ± 0.4	26.4 ± 3.7	11.8 ± 1.2	ND
Antibody B	$4.9 \pm 0.5^*$	28.8 ± 3.4	12.4 ± 1.1	ND

Molecular structure of a new chloride ion pump

Chiyoko Inagaki, Naoki Hattori, Kaori Kitagawa and Toshiaki Higashida
Department of Pharmacology, Kansai Medical University

An ATP-dependent chloride extrusion system, a Cl^- pump, was found in the rat brain as a candidate for an active chloride transporting system that produces an inwardly directed chloride gradients to enable inhibitory hyperpolarizing responses to occur when transmitter operated chloride channels are facilitated. In this study, we isolated 520 kDa protein with a Cl^- pump activity, and analyzed its subunit structure.

(1) A 520 kDa protein with Cl^- -ATPase/pump activity was isolated from plasma membrane fractions of the rat brain. The protein consisted of at least 4 kinds of peptides with molecular mass of 64, 60, 55 and 51 kDa, and an antibody raised against the latter peptide inhibited both Cl^- -ATPase and $^{36}\text{Cl}^-$ transport activities. A 55 kDa subunit of the Cl^- pump protein also was separated and analyzed for N-terminal amino acid sequence. Using a synthetic peptide corresponding to 18 amino acid residues in the sequence, antibodies were raised against 55 kDa subunit. An antibody obtained reacted with the 55 kDa subunit, and another one reacted with 55 kDa subunit and slightly with 51 kDa subunit. The latter antibody slightly inhibited Cl^- -ATPase activity. (2) Using antisense primers for N-terminal amino acid sequences of 55 kDa subunit and the rat brain cDNA library, cDNA with a sequence for the N-terminal amino acids and 173 bp of 5' upstream region was cloned. On the homology search, no reported sequences were found to show homology over 50% with the cloned cDNA fragment for 55 kDa subunit.

It is suggested that Cl^- pump has multisubunit structure with 51 kDa subunit having Cl^- -ATPase activity.