

発表番号 64

## 脳クロライドポンプの分子機構とその異常

研究代表者 稲垣千代子 (関西医科大学・医学部)

共同研究者 服部 尚樹、大谷ひとみ、北川 香織、  
中山 靖久 (関西医科大学・医学部)

## (1) クロライドポンプ 51kDa 触媒蛋白の構造解析

ラット脳より可溶化・精製した 520kDa および 580kDa の ATP 依存性クロライド輸送活性をもつ蛋白複合体について、微量無機リン定量による Cl<sup>-</sup>-ATPase 活性確認の後、SDS-PAGE 法により 51, 55, 60, 62 kDa サブユニット蛋白を単離した。51 kDa 蛋白のエドマン分解解析では N 末端アミノ酸配列の解読が出来なかった。reactive red による ATP 結合蛋白精製および二次元電気泳動 (SDS, pH 4-10) による精製を新たに加え、51kDa 蛋白を分離し、得られた 51 kDa 蛋白の TOF/MS 解析を行なった所、既知の蛋白との一致は認められなかった。

クロライドポンプ 51 kDa 蛋白は未報告の新規蛋白である可能性があるが、おそらく蛋白の N 末端ブロックのためアミノ酸配列の解読が困難である。現在、共存蛋白免疫沈降などによるクロライドポンプ蛋白の高率回収法を用い、51 kDa 触媒サブユニットのペプチド断片についてアミノ酸配列を解読し、cDNA クローニングを成功させるべく実験を進めている。

(2) アミロイド β 蛋白誘発クロライドポンプ活性低下が惹起する神経細胞傷害の分子機構  
ークロライドイオン感受性蛋白リン酸化/脱リン酸化の検出ー

## i) アミロイド β 蛋白によるグルタミン酸興奮毒性のクロライドイオン依存性：

培養液の Cl<sup>-</sup>を isethionate 置換して、低 Cl<sup>-</sup>培養液を調整した。病態濃度(1-10 nM)のアミロイド β 蛋白(Aβ1-42、Aβ25-35)48 時間処理で通常認められる神経細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の上昇は低 Cl<sup>-</sup>培養液では認められなかった。またアミロイド β 蛋白によるグルタミン酸毒性の増強 (WST ミトコンドリア還元活性および乳酸脱水素酵素漏出を指標とした神経細胞死) も、低 Cl<sup>-</sup>培養液では認められなかった。これらの結果から、アミロイド β 蛋白によるグルタミン酸毒性の増強には神経細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の上昇が関わっているものと推定される。

## ii) 細胞内クロライドイオン濃度の上昇に伴うグルタミン酸興奮毒性増強の機構：

グルタミン酸興奮毒性には細胞内蛋白リン酸化の変動が見られる。神経細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の上昇を低 Cl<sup>-</sup>培養液によって阻止した場合の蛋白リン酸化の変動をチロシン・リン酸化およびセリン・リン酸化から解析した。低 Cl<sup>-</sup>培養液では通常の場合に比べ、110 kDa, 76 kDa, 60 kDa の 3 種の蛋白のチロシン・リン酸化が低下し、セリン・リン酸化に有意な変化は認められなかった。クロライドイオン依存性チロシン・リン酸化を示す蛋白の同定を TOF/Mass 解析および特異的抗体を用いて進めた結果 Src を含む蛋白群である可能性が高くなった。これらの蛋白のチロシン・リン酸化は病態濃度のアミロイド β 蛋白による細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の上昇を介してグルタミン酸興奮毒性シグナルの増強に関わっているものと考えられる。



1

助成番号 0428

## 脳クロライドポンプの分子機構とその異常

稲垣千代子 (関西医科大学・医学部)  
服部 尚樹 (関西医科大学・医学部)  
大谷ひとみ (関西医科大学・医学部)  
北川 香織 (関西医科大学・医学部)

## 研究目的

脳のクロライドポンプは我々が分子同定を進めている中枢神経細胞膜の ATP およびホスファチジルイノシトール要求性能動的外向きクロライドイオン輸送系であり、既にそのサブユニット(CIP55)の cDNA クローニングを終え(Biochem Biophys Res Commun 2001)、51 kDa 触媒蛋白の同定に取り組んでいる。一方、アルツハイマー病は高齢化社会の社会的問題となっており、その早期診断、予防および治療法の一刻も早い開発が待たれている。我々は本疾患の病原蛋白(アミロイドβ蛋白)がクロライドポンプ活性阻害を介して神経細胞傷害を起すことを見出した(J Neurochem 2001)。これらの研究背景から、クロライドポンプの全分子構造およびその機能異常がもたらす細胞傷害の機構を明らかにして、中枢神経におけるクロライドイオンホメオスタシスの生理・病態生理学的重要性と病態回復手段の基礎を明らかにすることが緊急の課題であると考え。本研究の目的は、(1) クロライドポンプ 51 kDa 触媒蛋白の構造を明らかにし、(2) アミロイドβ蛋白誘発クロライドポンプ活性低下が惹起する神経細胞傷害の分子機構を解明することである。

## 研究方法

## (1)クロライドポンプ 51 kDa 触媒蛋白の構造解析

ラット脳細胞膜分画の MEGA-10 可溶化蛋白から ATP-affinity chromatography, native PAGE および 2 次元電気泳動によるリン酸化中間体形成 51 kDa 蛋白スポットを採取し、新しく採用する質量分析法による断片化蛋白一次構造情報を得、cDNA クローニングを行なう。cDNA クローニングの方法には、上記情報に基づく合成ペプチドに対する抗体を用いた発現クローニング法、および 5'-, 3'-RACE によるクローニング法を用いる。

## (2)アミロイドβ蛋白誘発クロライドポンプ活性低下が惹起する神経細胞傷害の分子機構

- クロライドイオン感受性蛋白リン酸化 / 脱リン酸化の検出 -

これまでの我々の研究により、培養ラット脳海馬神経細胞に病態濃度(1-10 nM)のアミロイドβ蛋白(Aβ1-42、Aβ25-35)を作用させるとクロライドポンプ活性の低下に伴い神

神経細胞内クロライドイオン濃度が正常値 (6-10 mM) から 30 mM 程度に上昇し、グルタミン酸興奮毒性が増強されることが明らかになっている。

) アミロイド  $\beta$  蛋白によるグルタミン酸興奮毒性の増強が神経細胞内クロライドイオン濃度の上昇に起因するか否かを、培養液の  $\text{Cl}^-/\text{isethionate}$  置換により検討する。

) 細胞内クロライドイオン濃度の上昇に伴うグルタミン酸興奮毒性増強の機構を細胞内リン酸化蛋白量の変動から解析し、クロライドイオン依存性蛋白リン酸化および脱リン酸化反応を明らかにする。

## 研究結果と考察

### (1) クロライドポンプ 51 kDa 触媒蛋白の構造解析

ラット脳より可溶化・精製した 520 kDa および 580 kDa の ATP 依存性クロライド輸送活性をもつ蛋白複合体について、微量無機リン定量による  $\text{Cl}^-$ -ATPase 活性確認の後、SDS-PAGE 法により 51, 55, 60, 62 kDa サブユニット蛋白を単離した。51 kDa 蛋白のエドマン分解解析では N 末端アミノ酸配列の解読が出来なかった。reactive red による ATP 結合蛋白精製および二次元電気泳動 (SDS, pH 4-10) による精製を新たに加え、51 kDa 蛋白を分離し、得られた 51 kDa 蛋白の TOF/Mass 解析を行なった所、既知の蛋白との一致は認められなかった。

クロライドポンプ 51 kDa 蛋白は未報告の新規蛋白である可能性があるが、おそらく蛋白の N 末端ブロックのためアミノ酸配列の解読が困難である。現在、共存蛋白免疫沈降などによるクロライドポンプ蛋白の高率回収法を用い、51 kDa 触媒サブユニットのペプチド断片についてアミノ酸配列を解読し、その結果をもとに cDNA クローニングを成功させるべく実験を進めている。

### (2) アミロイド $\beta$ 蛋白誘発クロライドポンプ活性低下が惹起する神経細胞傷害の分子機構

- クロライドイオン感受性蛋白リン酸化 / 脱リン酸化の検出 -

) アミロイド  $\beta$  蛋白によるグルタミン酸興奮毒性のクロライドイオン依存性:

培養液の  $\text{Cl}^-$  を isethionate 置換して、低  $\text{Cl}^-$  培養液を調整した。病態濃度 (1-10 nM) のアミロイド  $\beta$  蛋白 ( $\text{A}\beta_{1-42}$ ,  $\text{A}\beta_{25-35}$ ) 48 時間処理で通常認められる神経細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度の上昇は低  $\text{Cl}^-$  培養液では認められなかった。またアミロイド  $\beta$  蛋白によるグルタミン酸毒性の増強 (WST ミトコンドリア還元活性および乳酸脱水素酵素漏出を指標とした神経細胞死) も、低  $\text{Cl}^-$  培養液では認められなかった。これらの結果から、アミロイド  $\beta$  蛋白によるグルタミン酸毒性の増強には神経細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度の上昇が関わっているものと推定される。

) 細胞内クロライドイオン濃度の上昇に伴うグルタミン酸興奮毒性増強の機構:

グルタミン酸興奮毒性には細胞内蛋白リン酸化の変動が見られる。神経細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度の上昇を低  $\text{Cl}^-$  培養液によって阻止した場合の蛋白リン酸化の変動をチロシン・リン酸化およびセリン・リン酸化から解析した。低  $\text{Cl}^-$  培養液では通常の場合に比べ、110 kDa, 76 kDa,

60 kDa の3種の蛋白のチロシン・リン酸化が低下し、セリン・リン酸化に有意な変化は認められなかった。クロライドイオン依存性チロシン・リン酸化を示す蛋白の同定を TOF/MS 解析および特異的抗体を用いて進めた結果 Src を含む蛋白群である可能性が高くなった。

これらの結果から、神経細胞内の少なくとも3種の蛋白のチロシン・リン酸化は病態濃度のアミロイドβ蛋白 ( $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{25-35}$ ) による細胞内  $Cl^-$  濃度の上昇を介してグルタミン酸興奮毒性シグナルの増強に関わっているものと考えられる。

## Cl<sup>-</sup> pump and its pathophysiological changes in the brain

C. Inagaki, N. Hattori, H. Otani, K. Kitagawa and Nakayama H.

Department of Pharmacology, Kansai Medical University, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan

### Summary

As a candidate for outwardly directed active Cl<sup>-</sup> transporters, we previously reported ATP-dependent and phosphatidylinositol-4-monophosphate (PI4P)-stimulated Cl<sup>-</sup> pump/ATPase (J Biol Chem 264,17416,1989, Brain Res 641, 164 ,1994), and isolated 520 kDa protein complex with the Cl<sup>-</sup> pump activity (Neurosci Lett 258, 85 (1998)). The cDNA of 55 kDa subunit was cloned (Biochem Biophys Res Commun 289,363, 2001). In this study, we examined the structure of Cl<sup>-</sup> pump/ATPase as well as its involvement in pathophysiology of Alzheimer's disease.

#### (1) Cl<sup>-</sup> pump/ATPase 51 kDa subunit

SDS-PAGE of 520 kDa Cl<sup>-</sup> pump/ATPase protein complex yielded 51, 55, 60 and 62 kDa proteins. A catalytic subunit 51 kDa protein was isolated using reactive red column, SDS-PAGE and 2nd dimension electrophoresis. In Edman degradation, the N-terminal amino acid appeared to be blocked. Mass spectrometry (TOF/MS) yielded no matching with any known protein data base. Further analysis of the 51 kDa protein is now underway with a possibility that this protein is one not yet reported previously.

#### (2) Molecular mechanisms of neuronal cell death related to amyloid $\beta$ (A $\beta$ )-induced inhibition of Cl<sup>-</sup> pump/ATPase activity

i) A $\beta$ (25-35)-induced enhancement of glutamate neurotoxicity is dependent on Cl<sup>-</sup>.

Replacement of Cl<sup>-</sup> in culture medium with isethionate abolished A $\beta$ -induced increase in neuronal [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> resulted from inhibition of Cl<sup>-</sup> pump/ATPase activity. Under such conditions, A $\beta$ -induced enhancement of glutamate toxicity was also blocked as assayed by mitochondrial WST-reducing activity and LDH release, suggesting that the enhancement of the toxicity is Cl<sup>-</sup>-dependent.

ii) Molecular mechanisms of Cl<sup>-</sup>-dependent enhancement of glutamate toxicity:

A $\beta$ -induced enhancement of glutamate toxicity was associated with increased tyrosine phosphorylation of 110 kDa, 76 kDa and 60 kDa proteins. Tyrosine phosphorylation of these proteins was attenuated in the culture using low Cl<sup>-</sup> medium. Protein analyses using TOF/MS spectrometry and specific antibodies suggest that the Cl<sup>-</sup>-dependently phosphorylated proteins are Src-related ones.