

## アルミニウムイオンのカルシニューリン活性に対する影響

秋山 珠璃<sup>1)</sup>, 片山 豪<sup>2)</sup>, 田中 進<sup>3)</sup><sup>1)</sup>東都大学管理栄養学部管理栄養学科\*, <sup>2)</sup>高崎健康福祉大学人間発達学部子ども教育学科\*\*,  
<sup>3)</sup>高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科\*\*\*)

(受付 2020年8月31日, 受理 2020年10月8日)

## Effect of aluminum ions on calcineurin phosphatase activity

Shuri AKIYAMA<sup>1)</sup>, Takeshi KATAYAMA<sup>2)</sup>, Susumu TANAKA<sup>3)</sup><sup>1)</sup>Faculty of Nutritional Sciences, Tohto University<sup>2)</sup>Faculty of Human Development, Takasaki University of Health and Welfare<sup>3)</sup>Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare

## Summary

Aluminum (Al) is the third-most abundant metal and is widely distributed in our environment. It is stable as a trivalent ion and is not an essential trace element for humans. Aluminum compounds are industrially used as pharmaceuticals, food additives, cosmetics, and other household products. For pharmaceutical applications, aluminum salts are used as adjuvants to prepare vaccines and sucralfate, a complex of aluminum hydroxide and sulfated sucrose with an antiulcer property. However, Al is reported to be associated with the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease.

Calcineurin (CN), a target enzyme for immunosuppressive drugs such as tacrolimus (FK506) and cyclosporine A, is a calcium ion (Ca<sup>2+</sup>)/calmodulin (CaM)-dependent protein serine/threonine phosphatase. We previously confirmed that trivalent lanthanum (La [III]), trivalent scandium (Sc [III]), trivalent yttrium (Y [III]), and trivalent chromium (Cr [III]) can inhibit the phosphatase activity of recombinant human CN (rhCN) from *Escherichia coli*. Kinetic analysis revealed that the inhibition was a mixed-type inhibition for La (III) and a non-competitive inhibition for Cr (III). In the present study, we examined the effect of rhCN on phosphatase activity using trivalent aluminum (Al [III]). We observed that the Al (III) inhibition of rhCN activity was a mixed-type inhibition using a double-reciprocal Lineweaver-Burk plot.

アルミニウム (Al) は、酸素、ケイ素に次いで3番目に地殻中の元素の存在度が高く、広く自然界に存在している<sup>1)</sup>。Alは三価のイオンで安定しており、ヒトに対して必須性は認められないが、工業的、医薬品としての利用価値が高く、食品添加物、化粧品、その他の家庭用品としても使用されており、その用途は広い<sup>2)</sup>。医薬品としてのAlはアルミニウム塩がワクチンのアジュバンドとして、ショ糖硫酸エステルアルミニウム塩 (スクラルファート) は胃炎・消化性潰瘍治療剤として使用されている<sup>3,4)</sup>。一方でAlはアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患や乳癌の発症に関連があると報告されており<sup>5-7)</sup>、Alの毒性作用や生物学的な影響について多くの研究が行われ

ている<sup>8)</sup>。

一方、免疫抑制剤の標的酵素であるカルシニューリン (CN) は、カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) /カルモジュリン (CaM) 依存性のタンパク質脱リン酸化酵素であり、細胞性免疫に関わる酵素として知られている<sup>9)</sup>。またCNは別名PP2Bとも言われ、セリン / トレオニンホスファターゼ活性をもっている。大腸菌由来のリコンビナントヒトCN (rhCN) を使用した我々の先行研究では、希土類元素である三価のランタンイオン (La<sup>3+</sup>)、スカンジウムイオン (Sc<sup>3+</sup>)、イットリウムイオン (Y<sup>3+</sup>) および遷移元素である三価のクロムイオン (Cr<sup>3+</sup>) が rhCN 活性を阻害することを報告してきた<sup>10,11)</sup>。従って、三価の元素はCN活性を

\*所在地: 埼玉県深谷市上紫町西4-2-7 (〒366-0052)

\*\*所在地: 群馬県高崎市中大類町58-2 (〒370-0033)

\*\*\*所在地: 群馬県高崎市中大類町37-1 (〒370-0033)

阻害し、細胞性免疫系に影響を与える可能性があると考えられる。本研究は同じ三価のアルミニウムイオン ( $\text{Al}^{3+}$ ) に着目し、 $\text{Al}^{3+}$  の細胞性免疫に与える影響を酵素レベルで明らかにするために、ヒト酵素である rhCN のホスファターゼ活性に対する影響について検討を行った。また  $\text{Al}^{3+}$  は、食品添加物として使用されている 3-ヒドロキシ-2-メチル-4-ピロン (マルトール: mal) とアルミニウム-マルトール錯体 ( $\text{Al}(\text{mal})_3$ ) を形成する。 $\text{Al}(\text{mal})_3$  はその細胞膜透過性から、神経細胞のモデル細胞株である PC12 細胞や NT2 細胞に対する Al の影響解析の検討に用いられている<sup>12,13)</sup>。従って、 $\text{Al}(\text{mal})_3$  についても同様に rhCN 活性に対する影響を検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

塩化アルミニウム・6水和物 ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、mal、塩化ランタン ( $\text{LaCl}_3$ )、塩化スカンジウム ( $\text{ScCl}_3$ )、塩化イットリウム ( $\text{YCl}_3$ )、塩化クロム ( $\text{CrCl}_3$ )、水酸化ナトリウム ( $\text{NaOH}$ )、アセトンは富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。rhCN 測定のためのホスファターゼアッセイキットは Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) から購入した。

### 2. $\text{Al}(\text{mal})_3$ の調製

$\text{Al}(\text{mal})_3$  の調製は、Finnegan 等の方法に従って行った<sup>14)</sup>。15.5 g の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と 9.9 g の mal を穏やかに加熱しながら 160 mL の蒸留水に溶解し、 $\text{NaOH}$  溶液で pH 8.3 に調製した。室温で冷却後、生成した結晶をアセトンで3回洗い、デシケーター中で一晩乾燥させ、 $\text{Al}(\text{mal})_3$  を得た。

### 3. rhCN 活性の測定

CN 活性はホスファターゼアッセイキットのプロトコールに従って、前報の通り測定を行った<sup>10,11)</sup>。酵素反応溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM DTT, 0.025% NP-40) に、それぞれ 8 U/ $\mu\text{L}$  の rhCN<sup>15)</sup> と 0.25  $\mu\text{M}$  CaM を添加したものを標準酵素反応液とした。これに任意の濃度の、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 、mal、 $\text{LaCl}_3$ 、 $\text{ScCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{CrCl}_3$  をそれぞれ加え、基質として 150  $\mu\text{M}$  の R II リン酸化ペプチド (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-*pSer*-Val-Ala-Ala-Glu) を添加し、30°C、60 分間、酵素反応を行った。60 分後、この溶液の 2 倍量のマラカイトグリーンを添加し、酵素反応の結果、生成したリン酸を波長 620 nm の吸光度 ( $A_{620}$ ) を測定することにより、CN の酵素活性を求めた。なお、酵素活性は  $A_{620}$  とリン酸濃度との検量線を使用することにより求めた。

## 4. キネティクス解析

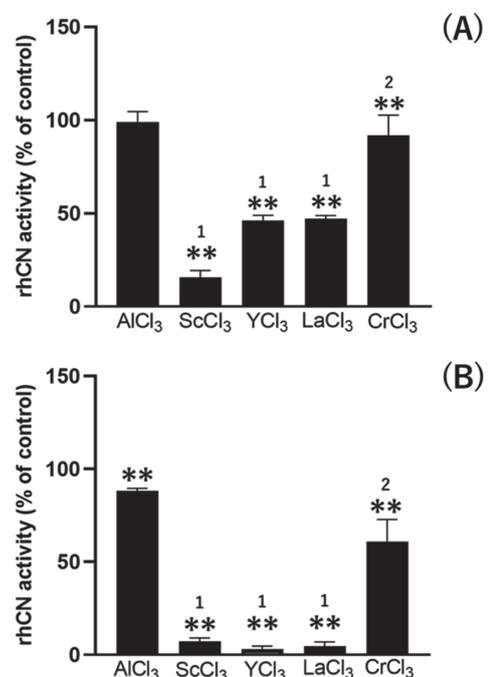
rhCN のホスファターゼ活性に対する  $\text{AlCl}_3$  の阻害形式を明らかとするために行った逆数プロット解析は、標準酵素反応液に終濃度で  $\text{AlCl}_3$  なし (0  $\mu\text{M}$ ) あるいは 50  $\mu\text{M}$  をそれぞれ添加して一定濃度で固定し、さらに、基質である R II リン酸化ペプチドを任意の濃度でそれぞれ添加して 30°C、60 分間反応させた。それぞれの反応速度と基質濃度の逆数をプロットし阻害形式を求めた。

## 5. 統計解析

得られた結果は平均値  $\pm$  標準偏差で表し、Dunnett's test で各試料と対照の有意差を判定し、有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )、95% 信頼区間 (95% CI) は、GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego) を用いて非線形回帰による分析で求めた。

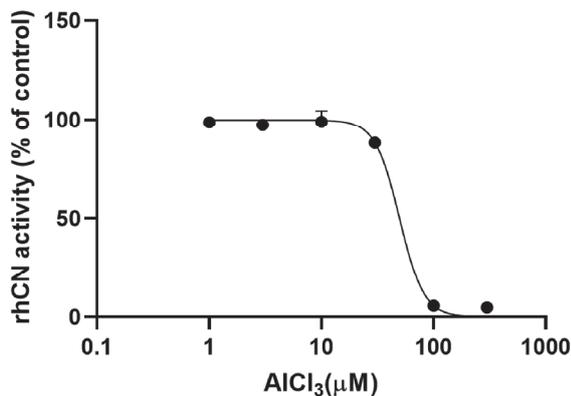
## 結果

Fig. 1(A), (B) に示すように、それぞれ 10  $\mu\text{M}$ 、30  $\mu\text{M}$  の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を用いて  $\text{Al}^{3+}$  の rhCN 活性に対する影響を検討したところ、10  $\mu\text{M}$  の  $\text{Al}^{3+}$  では CN 活性の阻害を認めず、30  $\mu\text{M}$  の  $\text{Al}^{3+}$  で  $\text{Sc}^{3+}$ 、 $\text{Y}^{3+}$ 、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$  と同様にコントロールと比較して有意に rhCN のホスファターゼ活性の阻害を認めた。 $\text{Al}^{3+}$  の rhCN に対する 50% 阻害濃度

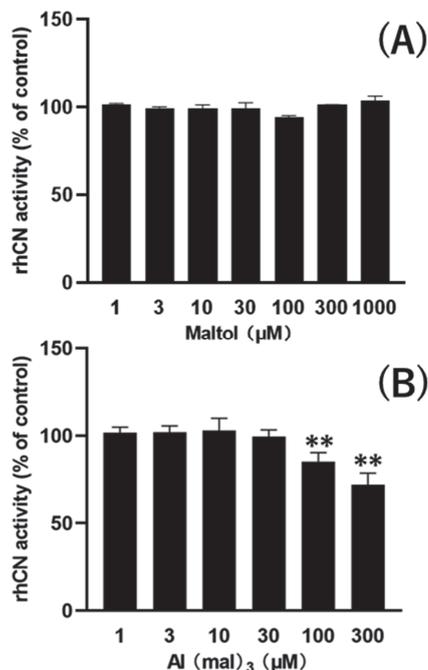


**Fig. 1** Effects of aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), scandium chloride ( $\text{ScCl}_3$ ), yttrium chloride ( $\text{YCl}_3$ ), lanthanum chloride ( $\text{LaCl}_3$ ), and chromium chloride ( $\text{CrCl}_3$ ) at 10  $\mu\text{M}$  (A) and 30  $\mu\text{M}$  (B) on the activity of recombinant human calcineurin (rhCN) from *Escherichia coli*. Data 1 is cited from reference 10 and data 2 is cited from reference 11. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*\* $p < 0.01$  vs. control.

( $IC_{50}$ ) は  $49.8 \mu\text{M}$  (95% 信頼区間 (95% CI)  $44.3\text{--}54.9 \mu\text{M}$ ) であり、先行研究で得られた  $\text{La}^{3+}$  の  $3.3 \mu\text{M}$  (95% CI  $2.8\text{--}3.9 \mu\text{M}$ ),  $\text{Sc}^{3+}$  の  $9.4 \mu\text{M}$  (95% CI  $9.0\text{--}9.8 \mu\text{M}$ ),  $\text{Y}^{3+}$  の  $9.5 \mu\text{M}$  (95% CI  $8.9\text{--}10.1 \mu\text{M}$ )  $\text{Cr}^{3+}$  の  $34.6 \mu\text{M}$  (95% CI  $30.8\text{--}39.4 \mu\text{M}$ ) と比較して高い値を示した (Fig. 2)<sup>10,11</sup>). 次に mal および  $\text{Al}(\text{mal})_3$  の rhCN 活性に対する影響を検討した結果、 $1000 \mu\text{M}$  の mal は rhCN 活性には影響を与えず (Fig. 3A),  $\text{Al}(\text{mal})_3$  は  $100 \mu\text{M}$  で有意に rhCN のホスファターゼ活性を阻害し、 $IC_{50}$  は、 $734 \mu\text{M}$  であった (Fig. 3B)。以上より、アルミニウム単独のほうが、rhCN 活性への阻害効果が大きかった。 $\text{Al}^{3+}$  の CN に対する阻害様式を明らかとするために  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を使用してキネ



**Fig. 2** Inhibition of the phosphatase activity of recombinant human calcineurin (rhCN) by  $\text{AlCl}_3$ .  $IC_{50}$  values were calculated using GraphPad Prism8. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

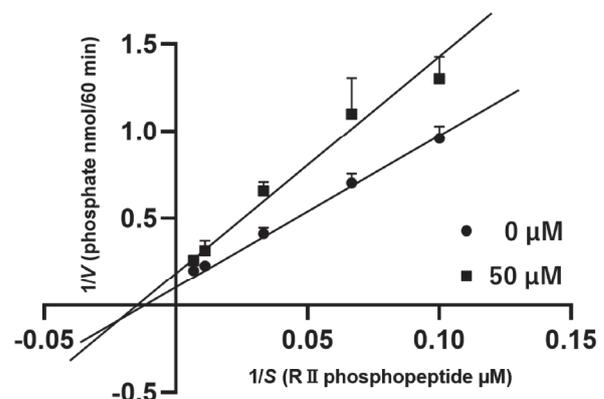


**Fig. 3** Effects of maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) and aluminum maltol complex ( $\text{Al}(\text{mal})_3$ ) on the phosphatase activity of recombinant human calcineurin (rhCN). CN activity was significantly reduced at  $100 \mu\text{M}$  of  $\text{Al}(\text{mal})_3$  compared with the control. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. \*\* $p < 0.01$  vs. control.

ティクス解析を行った。 $\text{AlCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ ), あるいは  $50 \mu\text{M}$  でそれぞれ一定の濃度に固定し、基質として使用した R II リン酸化ペプチドの濃度を変えて rhCN 活性を測定した。Fig. 4 に示すように基質濃度と反応速度について二重逆数プロットを作成し、 $\text{Al}^{3+}$  の rhCN に対する阻害形式を求めたところ、 $\text{AlCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ ) と  $50 \mu\text{M}$  存在下のそれぞれの直線はグラフの第 3 象限で交差し、この結果、 $\text{Al}^{3+}$  は混合阻害により rhCN 活性を阻害することが示された。また、 $\text{AlCl}_3$  なし ( $0 \mu\text{M}$ ) のときの最大反応速度 ( $V_{\text{max}}$ ) は  $7.14 \text{ nmol}/60 \text{ min}$ , ミカエリス定数 ( $K_M$ ) は  $55.6 \mu\text{M}$  であり、 $50 \mu\text{M}$  の  $\text{AlCl}_3$  存在下では  $V_{\text{max}}$  は  $4.17 \text{ nmol}/60 \text{ min}$ ,  $K_M$  は  $41.7 \mu\text{M}$  であった。

## 考察

CN はセリン/トレオニンホスファターゼ活性を持つタンパク質脱リン化酵素の一つで、下等から高等に至る真核生物の様々な細胞機能において重要な役割を果たしている。特にヒトでは心肥大の制御、興奮性神経細胞死などに CN が関与している報告がある<sup>16,17</sup>). また免疫系において CN は、T 細胞のインターロイキン-2 (IL-2) mRNA の発現を制御する転写調節因子の一つである Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1) を脱リン酸化することで IL-2 mRNA の発現を上昇させ、細胞性免疫を高める<sup>18</sup>). さらに、臓器移植の際に免疫抑制剤として臨床で使用されているシクロスポリンやタクロリムス (FK506) はそれぞれシクロフィリンや FK506 結合タンパク質 (FKBP) といったイムノフィリンという結合タンパク質を介して間接的に CN を阻害することから、CN は免疫抑制剤の標的酵素であることが知られている<sup>19</sup>). CN の構造は、触媒サブユニット A (CNA) と制御サブユニット B (CNB) からなり、CNA には、CaM 結合ドメイン、CNB 結合ドメイン、C 末端自己活性阻害ドメインなどが存在し、鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) と亜鉛イオン



**Fig. 4** Double-reciprocal Lineweaver-Burk plot.  $1/V$  (phosphate,  $\text{nmol}/60 \text{ min}$ ) increased linearly with increased  $1/S$  (R II phosphopeptide) and was the highest at  $50 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  and the lowest at  $0 \mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

(Zn<sup>2+</sup>) の2個の金属イオンを活性中心に内在しており、CNBは、4つのEFハンドモチーフにそれぞれ1つずつのCa<sup>2+</sup>を結合している特徴を持つ<sup>20,21)</sup>。従って、細胞内のCNは、Ca<sup>2+</sup>やCaMおよびその他の因子によって活性が調節されていると思われるが、*in vitro*では、ニッケルイオン(Ni<sup>2+</sup>)やマンガンイオン(Mn<sup>2+</sup>)のような二価重金属で活性化(刺激)されることが明らかとなっている<sup>22)</sup>。

近年、我々は*in vitro*において希土類元素である三価のLa<sup>3+</sup>、Sc<sup>3+</sup>、Y<sup>3+</sup>および遷移元素である三価のCr<sup>3+</sup>が大腸菌由来のrhCNのホスファターゼ活性を阻害することを明らかとし、またキネティクス解析によりこれらの元素の阻害様式は、La<sup>3+</sup>は混合阻害、Cr<sup>3+</sup>は非競合阻害であることを報告してきた<sup>10,11)</sup>。Alは3番目に地殻中の元素の存在度が高く、La<sup>3+</sup>、Sc<sup>3+</sup>、Y<sup>3+</sup>、Cr<sup>3+</sup>と同じ三価のイオンとして安定していることから、本研究ではAl<sup>3+</sup>に着目し、AlCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oとmalとの錯体であるAl(mal)<sub>3</sub>を使用してrhCNのホスファターゼ活性に対する影響について検討を行った。その結果、AlCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oにおいても、Sc<sup>3+</sup>、Y<sup>3+</sup>、La<sup>3+</sup>、Cr<sup>3+</sup>と同様にコントロールと比較して有意にrhCNのホスファターゼ活性の阻害を認めた(Fig. 1)。しかし、Al<sup>3+</sup>のrhCNに対する50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)は49.8 μMであり、先行研究で得られたLa<sup>3+</sup>の3.3 μM、Sc<sup>3+</sup>の9.4 μM、Y<sup>3+</sup>の9.5 μM、Cr<sup>3+</sup>の34.6 μMと比較して高い値を示した(Fig. 2)。これらの結果から、三価のカチオンはrhCN活性に影響を与える可能性があると思われるが、同じ三価のカチオンであってもCNへの結合性や結合部位は異なると考えられた。また1000 μMのmalはrhCN活性には影響を与えず、Al(mal)<sub>3</sub>は100 μMで有意にrhCNのホスファターゼ活性の阻害を認めた。Al(mal)<sub>3</sub>のIC<sub>50</sub>は734 μMであり(Fig. 3)、その阻害効果はAl(mal)<sub>3</sub>よりもAl<sup>3+</sup>単独の方が大きいことが明らかとなった。AlCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oを使用したキネティクス解析からは、Al<sup>3+</sup>はLa<sup>3+</sup>と同じ混合阻害でrhCNを阻害し、Cr<sup>3+</sup>の非競合阻害とは異なることが示された。今後、CNAやCNBについてそれぞれのタンパク質の一部のリコンビナント体を作成してAl<sup>3+</sup>、La<sup>3+</sup>、Cr<sup>3+</sup>との結合実験を行い、結合部位の同定や結合性の検討などの詳細な実験を行う必要があると思われる。また今後は、Al<sup>3+</sup>とAl(mal)<sub>3</sub>が細胞性免疫に与える影響について、ヒトT細胞用株Jurkat細胞が産生するIL-2を指標に細胞レベルで検討を行っていきたいと考える。

## 参考文献

- 1) 海老原 充 (1998) クラーク数 — 消えゆく数値? (どうやってそれを求めたの1). 化学と教育 46(7): 428-431.
- 2) Niu Q (2018) Overview of the relationship between aluminum exposure and health of human being. Adv Exp Med Biol 1091: 1-31.
- 3) Oleszycka E, Lavelle EC (2014) Immunomodulatory

properties of the vaccine adjuvant alum. Curr Opin Immunol 28: 1-5.

- 4) Sulochana SP, Syed M, Chandrasekar DV, Mullangi R, Srinivas NR (2016) Clinical drug-drug pharmacokinetic interaction potential of sucralfate with other drugs: Review and Perspectives. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 41: 469-503.
- 5) Maya S, Prakash T, Madhu KD, Goli D (2016) Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. Biomed Pharmacother 83: 746-754.
- 6) Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. Front Cell Neurosci 9: 124.
- 7) Darbre PD (2016) Aluminium and the human breast. Morphologie 100: 65-74.
- 8) Klotz K, Weistenhöfer W, Neff F, Hartwig A, van Thriel C, Drexler H. (2017) The health effects of aluminum exposure. Dtsch Arztebl Int. 114: 653-659.
- 9) Shi Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: Mechanism through structure. Cell 139: 468-484.
- 10) 秋山琉璃, 田中佑季, 田中 進 (2018) 希土類元素のカルシニューリン活性に対する影響. 微量栄養素研究 35: 78-82.
- 11) 秋山琉璃, 田中佑季, 田中 進 (2019) クロムのカルシニューリン活性に対する影響. 微量栄養素研究 36: 35-38.
- 12) Saberzadeh J, Arabsolghar R, Takhshid MA (2016) Alpha synuclein protein is involved in aluminum-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. Brain Res. 1635: 153-160.
- 13) Griffioen KJS, Ghribi O, Fox N, Savory J, DeWitt DA (2004) Aluminum maltolate-induced toxicity in NT2 cells occurs through apoptosis and includes cytochrome c release. Neurotoxicology 25: 859-867.
- 14) Finnegan MM, Rettig SJ, Orvig C (1986) A neutral water-soluble aluminum complex of neurological interest. J Am Chem Soc 108: 5033-5035.
- 15) Harder KW, Owen P, Wong LK, Aebersold R, Clark-Lewis I, Jirik FR (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. Biochem J 298: 395-401.
- 16) Molkentin JD. (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. Cardiovasc Res 63: 467-475.
- 17) Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF,

- Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H. (2004) Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem* 279: 4929-4940.
- 18) Crabtree GR. (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through  $\text{Ca}^{2+}$ , calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614.
- 19) Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- 20) Yu L, Golbeck J, Yao J, Rusnak F. (1997) Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of calcineurin: implications for a mechanistic role. *Biochemistry* 36: 10727-10734.
- 21) Stemmer PM, Klee CB. (1994) Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33: 6859-6866.
- 22) Pallen CJ, Wang JH (1986) Stoichiometry and dynamic interaction of metal ion activators with calcineurin phosphatase. *J Biol Chem* 261: 16115-16120.