

助成番号 9925

アンモニアによる中枢神経細胞内クロライドイオン濃度上昇の分子機構

助成研究者：稲垣 千代子(関西医科大学 医学部 薬理学)

共同研究者：服部 尚樹(関西医科大学 医学部 薬理学)

大谷 ひとみ(関西医科大学 医学部 薬理学)

- 1、研究目的：中枢神経細胞内外のクロライドイオン勾配は、GABA_A受容体を介する抑制性制御系に必須の要件である。肝性脳症や先天性高アンモニア(ornithine trans-carbamylase欠損症など)における錯乱、痙攣、意識障害などの症状はアンモニアを原因物質とする抑制性制御系の機能不全によると考えられるが、その機構は不明であった。我々は、これらの症状がベンゾジアゼピン誘導体のGABA_A受容体促進作用では改善されないことから、アンモニアが中枢神経の細胞内クロライドイオン濃度を上昇させる可能性を考え、培養海馬神経細胞を用いてこれを証明した。本研究では、アンモニアによる海馬神経細胞内クロライドイオン濃度上昇の機構について、特に細胞内の主要情報伝達物質であるプロテインキナーゼCの関与に注目して検討を行った。
- 2、研究結果と考察：(1)アンモニアによる[Cl⁻]_i上昇効果：ラット脳、海馬神経細胞を脳症惹起濃度(2mM)の塩化アンモニウムに暴露すると、定常状態では約8mMであった[Cl⁻]_iは24時間後から有意な上昇を示し、48時間後にはほぼ3倍に増加した。この反応はCl⁻/HCO₃⁻交換系阻害薬であるSITSやDIDSにより著明に抑制されたことから、この交換体の機能亢進の関与が示唆された。
- (2)アンモニアによるアニオン交換体の発現誘導：2日間のアンモニア処置後の海馬神経細胞において、競合的RT-PCR実験および抗ペプチド抗体を用いたイムノブロット実験から、アニオン交換体のmRNAおよび蛋白質発現量の増加が認められた。こうした反応はアンモニア誘発[Cl⁻]_i上昇と同様にPKC阻害薬により抑制されたことから、[Cl⁻]_i上昇がPKCの活性化を介したアニオン交換系の遺伝子発現/蛋白質新規合成に伴うものであることが示唆された。
- (3)アンモニアによるPKC活性化と細胞内Ca²⁺上昇作用：海馬神経細胞での主要サブタイプであるα、βII型PKCの活性化がアンモニア暴露5分後から認められた。さらにCa²⁺蛍光指示薬であるfura-2AM負荷細胞において、無刺激状態で約58nMの[Ca²⁺]_iは2mMのアンモニア暴露直後から約1.5倍から2倍に上昇した。
- 3、結論：アンモニア暴露により[Ca²⁺]_i上昇依存型PKCサブタイプ(α、βII型)が活性化され、この反応がアニオン交換(Cl⁻/HCO₃⁻)系の遺伝子発現/蛋白質新規合成の誘導を介した活性の亢進を惹起し、その結果、細胞内クロライド濃度を上昇させるものと考えられた。

助成番号 9925

アンモニアによる中枢神経細胞内クロライドイオン濃度上昇の分子機構

助成研究者：稲垣 千代子(関西医科大学 医学部 薬理学)

共同研究者：服部 尚樹(関西医科大学 医学部 薬理学)

大谷 ひとみ(関西医科大学 医学部 薬理学)

1、研究目的：中枢神経細胞内外のクロライドイオン勾配は、GABA_A受容体を介する抑制性制御系に必須の要件である。肝性脳症や先天性高アンモニア (ornithine trans-carbamylase 欠損症など) における錯乱、痙攣、意識障害などの症状はアンモニアを原因物質とする抑制性制御系の機能不全によると考えられるが、その機構は不明であった。我々は、これらの症状がベンゾジアゼピン誘導体の GABA_A受容体促進作用では改善されないことから、アンモニアが中枢神経の細胞内クロライドイオン濃度を上昇させる可能性を考え、培養海馬神経細胞を用いてこれを証明した。

本研究では、アンモニアによる海馬神経細胞内クロライドイオン濃度上昇の機構について、特に細胞内の主要情報伝達物質であるプロテインキナーゼCの関与に注目して検討を行った。

2、研究方法：

2.1, 培養海馬神経細胞内クロライドイオン濃度([Cl]⁻)_iの測定

胎生18日ラット脳の海馬神経細胞を培養し、シトシンアラビノシドでグリア細胞を除去し、培養10-14日にクロライドイオン感受性蛍光色素(MQAE)を負荷して360nmの励起光照射により得られた530nmの蛍光量から、錐体細胞様神経細胞の[Cl]⁻_iを計測した。さらに、グラミシジン穿孔パッチクランプ法によりGABA_A受容体刺激時の膜電位変化を測定した。

2.2, クロライドイオン輸送系の遺伝子および蛋白質発現の解析

アニオン交換体mRNA発現量については、培養神経細胞から全RNAを調製し、脳型type3アニオン交換体(anion exchanger: AE3)の遺伝子配列から特定したプライマーを用いて競合的RT-PCRを行い測定した。またAE3蛋白質発現については、まず脳型AE3のアミノ酸配列から設計、合成したペプチドを抗原として抗体を作成し、培養神経細胞から調製した細胞膜画分について、抗ペプチド抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫反応性の強度を指標として発現蛋白

質量の変化を検討した。

2.3, プロテインキナーゼC (PKC) の活性化

PKCの活性化は細胞質から細胞膜への移行を特徴とする。現在見いだされているPKCサブタイプのうち脳に発現が高い α 、 β 、 γ 、 ε 型について、培養神経細胞から調製した細胞膜と細胞質画分を用いてイムノブロットを行い、各画分での免疫反応性の強度の変化からPKC活性化の時間的推移を追跡した。

2.4, 培養海馬神経細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の測定

カルシウムイオン感受性蛍光色素(fura-2AM)を負荷した海馬神経細胞をアンモニアで刺激し、340nmと380nmの励起光照射により得られた蛍光量の比から $[Ca^{2+}]_i$ の経時変化を顕微画像測光装置にて測定した。

3、研究結果と考察:

3.1, アンモニアによる $[Cl^-]_i$ 上昇効果

ラット脳、海馬神経細胞を脳症惹起濃度(2mM)の塩化アンモニウムに暴露すると、定常状態では約8mMであった $[Cl^-]_i$ は24時間後から有意な上昇を示し(Fig1)、48時間後には22mMとほぼ3倍に増加した。こうした反応は塩化ナトリウムや塩化カリウムでは惹起されなかった。またグラミシジン穿孔パッチクランプ法で、GABA_A受容体刺激による過分極性応答が2mMアンモニア暴露下では消失することを認めた。アンモニア誘発 $[Cl^-]_i$ 上昇反応はクロライドイオン輸送系(Cl^-/HCO_3^- 交換系、 $Na^+/K^+/Cl^-$ 共輸送系、 Cl^- ポンプ)阻害薬のうち Cl^-/HCO_3^- 交換系阻害薬であるSITSやDIDSにより著明に抑制されたことからこの交換体の機能亢進の関与が示唆された。

3.2, アンモニアによるアニオン交換系の発現誘導

2日間のアンモニア処置後の海馬神経細胞において、全RNAを用いた競合的RT-PCR実験からアニオン交換体mRNA発現量が約2倍に上昇し、また抗ペプチド抗体を用いたイムノブロット実験から、この交換体蛋白質発現量も増加することが判明した。こうした反応は各種蛋白リン酸化酵素阻害薬のうち、PKC阻害薬であるH-7やカルホスチンCにより抑制された。またアンモニア誘発 $[Cl^-]_i$ 上昇も同様にこれらのPKC阻害薬により抑制された(Fig 1)ことから、 $[Cl^-]_i$ 上昇作用がPKCの活性化を介したアニオン交換系の遺伝子発現/蛋白質新規合成に伴うものであることが示唆された。さらに、PKC活性化薬であるホルボールエステルがアンモニアと類似反応を惹起したことは、この可能性を支持するものである。

3.3, アンモニアによるPKC活性化作用

PKCファミリーは現在約10種のサブタイプが見い出され、その活性化がCa²⁺要求性か否かで大きく2群に大別される。PKCは通常、非刺激時には細胞質に存在するが、刺激に伴い細胞質から細胞膜へと移行する特徴的な活性化パターンをもつ。そこでまず非刺激状態での海馬神経細胞の細胞質標品を用いて各分子種の特異的抗体に対するイムノプロットを行ない、Ca²⁺依存型であるα、βII型の強い免疫活性からこの2種が海馬神経細胞での主要サブタイプであることを確認した。次にこの2種PKCについてアンモニアによる活性化の有無を検討した。2 mMアンモニア暴露5、10、30分、1時間、3時間後の細胞質、細胞膜標品についてのイムノプロット解析を行なった結果、暴露5分後からα、βII型の両PKCサブタイプの免疫反応性が細胞質で減少し細胞膜で増加し、PKCの細胞内移行を認めた（Fig 2）。こうした活性化は塩化アンモニウムの対照となる塩化ナトリウム添加では観察されず、アンモニアの特異的反応であることを確認した。

3.4, アンモニアによる細胞内Ca²⁺上昇効果

上述のPKC活性化に関連して、アンモニアによる[Ca²⁺]_iの上昇の有無についてCa²⁺蛍光指示薬であるfura-2AMの蛍光変化から検討した。その結果、無刺激状態で約58nMの[Ca²⁺]_iは2mMのアンモニア暴露直後から約1.5倍から2倍に上昇した。

以上の研究成果から、アンモニア暴露により[Ca²⁺]_i上昇依存型PKCサブタイプ（α、βII型）が活性化され、この反応がアニオン交換（Cl⁻/HCO₃⁻）系の遺伝子発現/蛋白新規合成の誘導を介した活性の亢進を惹起し、その結果、細胞内クロライド濃度を上昇させるものと考えられた。

4、今後の課題

複数のサブタイプが関与する細胞応答の解明には、生細胞内での各PKCサブタイプの活性化と細胞内イオン濃度変化のリアルタイム解析を行なう必要があり、さらにPKCによるアニオン交換体の機能亢進を証明するため、この交換体のリン酸化反応を示すことが今後の課題として挙げられる。

Effects of ammonia on $[Cl^-]_i$ in hippocampal neuronal cells

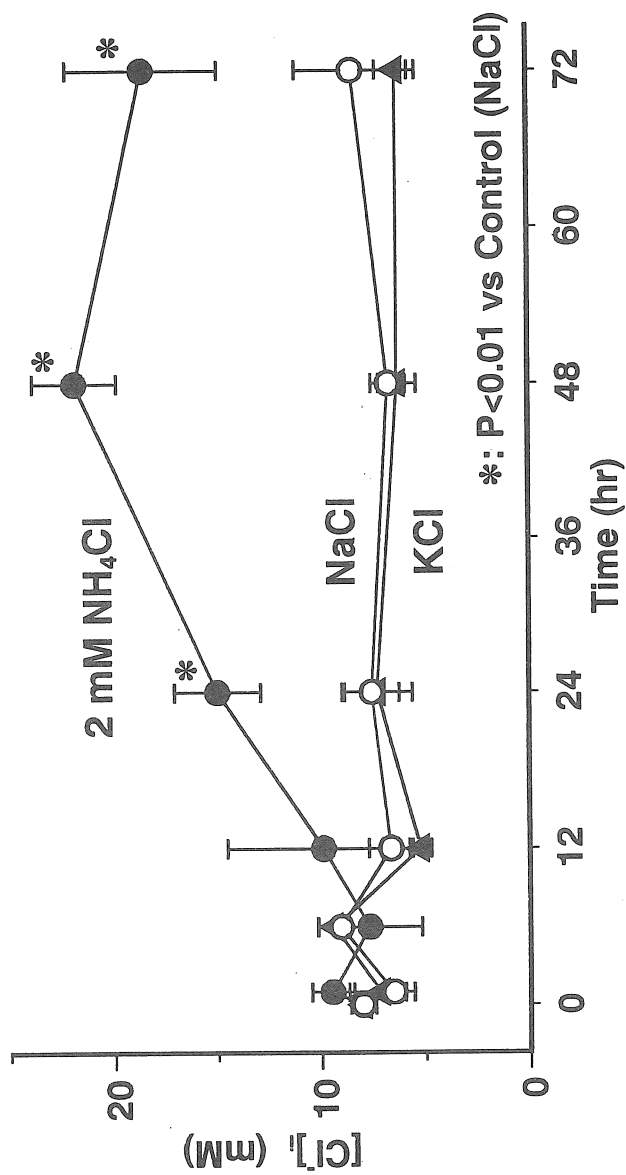


Fig. 1. Time course of the effects of ammonia on chloride concentration in hippocampal neurons. Cultured hippocampal neurons were incubated in the media with 2 mM NH_4Cl , NaCl or KCl, and the $[Cl^-]_i$ of pyramidal cell-like neurons were measured fluorometrically.

Effects of protein kinase inhibitors on ammonia-induced changes in $[Cl^-]_i$

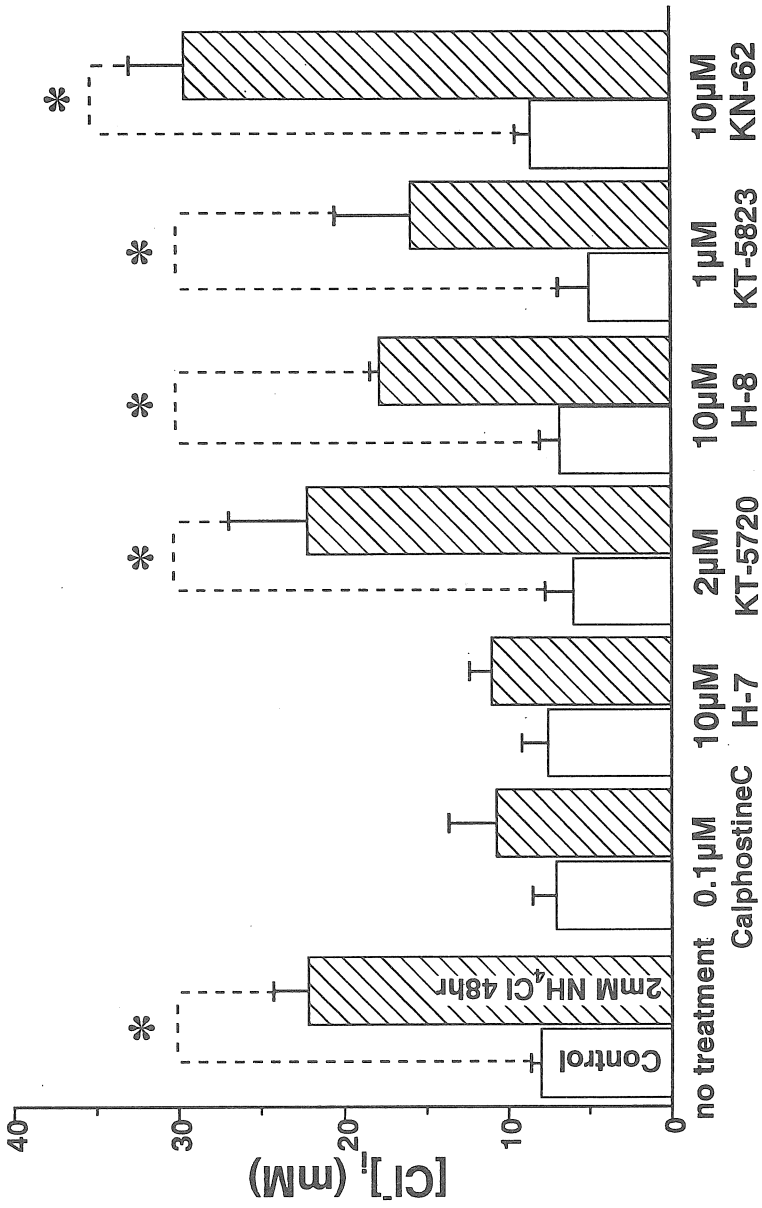
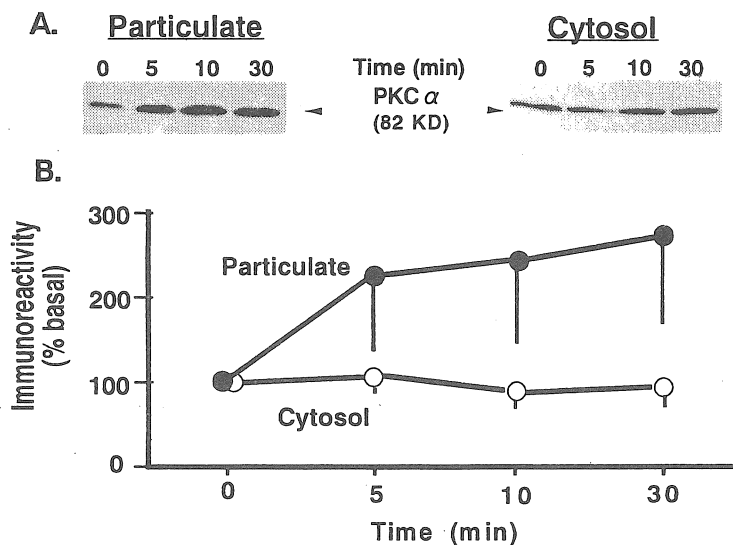


Fig.2. Effects of protein kinase inhibitors on ammonia-induced increase in $[Cl^-]_i$ in neurons. Cultured hippocampal neurons were incubated with or without the addition of 2 mM NH_4Cl for 48 hours, and tested for the $[Cl^-]_i$ in pyramidal cell-like neurons. *: $p < 0.05$, NH_4Cl vs control PKC inhibitors; calphostin C, H-7, A-kinase inhibitor; KT-5720, G-kinase inhibitor; KT-5823, H-8, CaMKII inhibitor; KN-62

Ammonia-induced translocation of PKC α



Ammonia-induced translocation of PKC β II

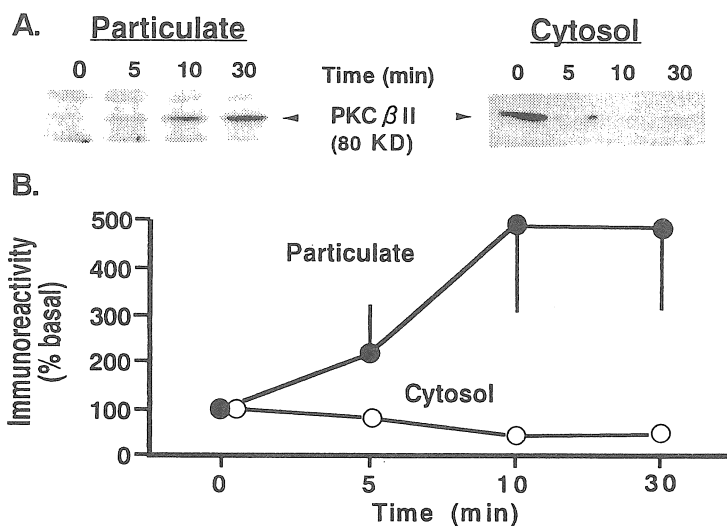


Fig.3. Western blot analyses of PKC α and β II activation in cultured hippocampal neurons. The hippocampal neurons were exposed to 2 mM ammonia for the indicated periods. In B, results are based on densitometric scanning of immunoblot data. Changes in the immunoreactivity are expressed as a % of that obtained before the exposure to ammonia.

Molecular mechanisms for ammonia-induced increase in chloride concentration in cultured hippocampal neurons

Chiyoko Inagaki, Naoki Hattori and Hitomi Otani

Department of Pharmacology, Kansai Medical University

Hyperammonemia is one of the most important factors in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. In this study, we found that long term (24-48 hrs) exposure of MQAE-loaded hippocampal neurons to 2mM ammonia induced an elevation of the intracellular Cl^- level ($[\text{Cl}^-]_i$) which was inhibited by anion ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) exchange inhibitors, SITS and DIDS. Ammonia also increased this exchanger's mRNA and protein level. Since these effects of ammonia were inhibited by the protein kinase C (PKC) inhibitors H-7 and calphostin C, we herein examined whether ammonia induces PKC activation or not, by Western blot analysis using PKC subtype-specific antibodies, in cultured rat fetal hippocampal neurons. Treatment with 2mM NH_4Cl for 5-30min time-dependently increased the immunoreactivities of both α - and β II- PKCs in the particulate fractions with decreases in the cytosol fractions, indicating the translocations of α - and β II- PKCs from cytosol to the membranes. Furthermore, stimulation by 2mM NH_4Cl resulted in a 1.5- to 2-fold elevation of intracellular Ca^{2+} levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in fura-2 AM-loaded neuronal cells in a time course parallel with PKC activations.

From these results, ammonia treatment appears to activate Ca^{2+} dependent α - and β II- PKCs in hippocampal neurons, which probably induces $[\text{Cl}^-]_i$ elevation through enhanced expression of the anion exchanger.