

# 脳内アンモニア代謝に関わる新規分子の研究

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生化学分野

照沼 美穂

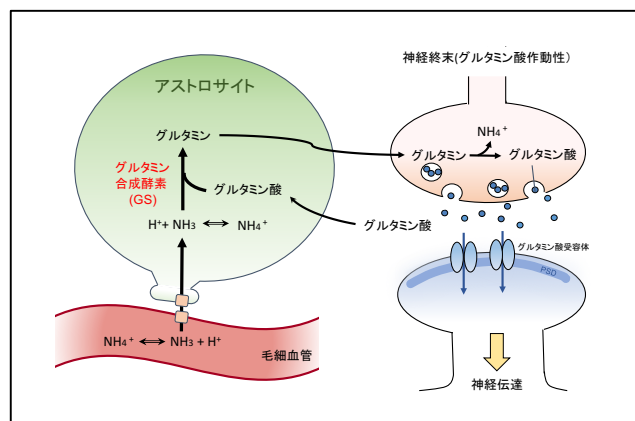
## 1. 研究目的と背景

肝性脳症は肝硬変などの重篤な肝疾患に起因して起こる精神・神経疾患で、深刻な意識障害や運動障害をきたす。その発生機序はまだ十分に解明されていないが、肝臓や筋肉のアンモニア解毒機能低下により生じる高アンモニア血症が大きく関わる。高アンモニア血症になると、血液脳関門のアンモニア透過性が増加し、脳の恒常性維持に重要な働きをするアストロサイトの機能を障害する。これにより脳内の神経伝達物質のバランスが乱れ、神経機能障害を誘発する。

脳細胞の大多数を占めるアストロサイトは、脳で唯一グルタミン合成酵素を発現し、アンモニアを処理することができる細胞である。アストロサイトはアンモニアと興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸からグルタミンを産生して細胞外に放出する（図1）。放出されたグルタミンは神経細胞に取り込まれ、グルタミン酸や抑制性神経伝達物質である GABA に変換されて神経細胞間の情報伝達を担う。このようにして脳内ではアストロサイトがアンモニアとグルタミン酸の代謝を行っている。

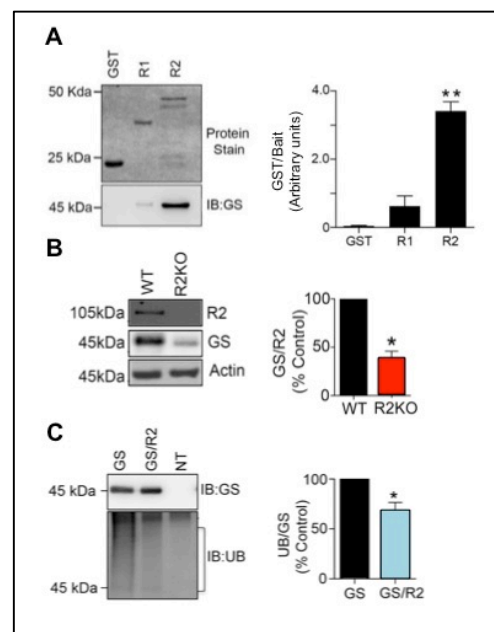
図1：脳内のアンモニアの取り込みと代謝の経路

生理的な状態では、1-2%の血中アンモニアが  $\text{NH}_3$  の形で存在しており、脳内に入り込む。アストロサイトでは、アンモニアはグルタミン合成酵素によってグルタミンに代謝される。その際、神経細胞から放出され、アストロサイトに取り込まれたグルタミン酸を使用する。グルタミンはアストロサイトから放出され、神経細胞に取り込まれる。神経細胞内でグルタミンはグルタミン酸（グルタミン酸作動性ニューロン）、さらには GABA（GABA 作動性ニューロン）に変換され、神経伝達物質として使用される。（Eid & Lee, *Nat Med*, 2013 など引用）



申請者は最近、遅延型の抑制性神経伝達を司る GABA<sub>B</sub> 受容体がアストロサイトにも高度に発現し、グルタミン合成酵素と結合してこの酵素の発現を安定化させていることを発見した（Huyghe, Nakamura, Terunuma et al., *J Biol Chem*, 2014）（図2）。アストロサイトの GABA<sub>B</sub> 受容体は、グルタミン合成酵素と結合する事が確認された、ただひとつの分子である。さらに、アストロサイトの GABA<sub>B</sub> 受容体は、アストロサイト活性の指標となる細胞内のカルシウム上昇に関わることも明らかにした（Terunuma et al., *Neuropharmacology*, 2015）。そこで本研究は、アストロサイトの GABA<sub>B</sub> 受容体に注目し、脳内アンモニア代謝の分子機構の一端を明らかにすることを目指す。

図2：アストロサイトの GABA<sub>B</sub> 受容体はグルタミン合成酵素 (GS) の発現を調節する (A) GABA<sub>B</sub> 受容体の R2 サブユニットは GS と結合する。 (B) GABA<sub>B</sub> 受容体の R2 サブユニットが無いと GS の発現が減少する。データは R2 サブユニットのノックアウトマウス (KO) を用いたもの。 (C) R2 サブユニットが無いと GS はユビキチン化 (UB) されて最終的には分解される。データは COS 細胞に GS と R2 サブユニットを過剰発現させ、GS の抗体で免疫沈降して検討した。（全て Huyghe, Nakamura, Terunuma et al., *J Biol Chem*, 2014 より）



## 2. 方法

高アンモニア血症の患者やモデル動物では、脳内アンモニアを排除するためと思われるグルタミン合成酵素の活性上昇や (Suarez et al., *Neurochem Int*, 2002)、細胞内浸透圧上昇によるアストロサイトの膨張などが確認されている (Martines, *Acta Neuropathol*, 1968; Swain et al., *Am J Physiol*, 1991)。本研究は、申請者がこれまでに明らかにしたアストロサイトの GABA<sub>B</sub> 受容体の機能に注目し、アストロサイトの抑制性シグナリングが、脳のアンモニア代謝機構や、肝性脳症に見られるアストロサイトの形態や機能の変化にどう関わるかを検討する。本計画では、

詳細な分子機構を検討するためにはマウスの脳より調整した培養アストロサイトを (Terunuma et al., *Neuropharmacology*, 2015)、病態生理学的な検討をするためには、既に確立されている高アンモニア血症モデルマウスを用いて研究を行う (Rangroo Thrane et al., *Nat Med*, 2014; Liang et al., *Neurochem Res*, 2014)。尚、これらのモデルマウスは脳機能に障害は見られるが、肝機能は正常である。

### (1) 培養アストロサイトを用いた研究：

**実験1.アンモニア刺激によるGABA<sub>B</sub>受容体やグルタミン合成酵素、アストロサイトの活性指標となるGFAPの発現の変化を調べる。**肝性脳症では脳内のアンモニア濃度が3-5 mMにまで上昇していると言われている。ここではNH<sub>4</sub>Clを用いて24-72時間刺激して、経時的な発現の変化を調べる。

**実験2.アンモニア刺激時のGABA<sub>B</sub>受容体とグルタミン合成酵素の結合状態や酵素活性を調べる。**実験1と同じ条件下で二つの分子の結合や酵素活性を検討する。

**実験3.アストロサイトのGABA<sub>B</sub>受容体の発現を変化させた時のグルタミン合成酵素の発現や活性を検討する。**アンモニア刺激と同時にGABA<sub>B</sub>受容体の活性を薬剤で変化させて検討する。変化が見られた場合にはshRNAや過剰発現系を用いてGABA<sub>B</sub>受容体の発現量を変化させ、さらに検討する。

**実験4. GABA<sub>B</sub>受容体の発現変化によってアストロサイトの形態に変化が見られるかを調べる。**実験3の適正な条件下でアストロサイトの形態と活性を検討する。

### (2) 高アンモニア血症モデルマウスを用いた研究：

**実験1.様々な脳の部位におけるGABA<sub>B</sub>受容体やグルタミン合成酵素、GFAPの発現の変化を調べる。**大脳皮質、海馬、小脳など、肝性脳症の症状の発現に重要とされる部位を中心に調べる。

**実験2. GABA<sub>B</sub>受容体の活性を変化させる薬剤を投与した時のアストロサイトの形態などを調べる。**GABA<sub>B</sub>受容体の作用薬を投与してアストロサイトの形態などに変化があるかを検討する。

## 3. 結果

### (1) 培養アストロサイトを用いた研究：

**実験1.アンモニア刺激によるGABA<sub>B</sub>受容体やグルタミン合成酵素、アストロサイトの活性指標となるGFAPの発現の変化を調べる。**

初代培養アストロサイトに0-10mMの濃度のNH<sub>4</sub>Clを添加し72時間培養したところ、GSの発現がNH<sub>4</sub>Clの濃度依存的に減少した。この発現減少は時間依存的に見られることも確認した。この時のGFAPの発現を検討したところ、著名な変化は見られなかった。このためアンモニアはアストロサイトの活性化を起こさずにGSの発現を減少させていると考えられた。

**実験2.アンモニア刺激時のGABA<sub>B</sub>受容体とグルタミン合成酵素の結合状態や酵素活性を調べる。**

NH<sub>4</sub>Clの添加によりGSの発現が減少することからGSの分解を阻止しようと、神経細胞ではGABA<sub>B</sub>受容体の分解を阻止するプロテアソーム阻害剤MG132を添加したところ、GABA<sub>B</sub>受容体の発現量は劇的に上昇したが、GSは回復されなかった。このことは、アンモニアによるGS発現の減少がGABA<sub>B</sub>受容体非依存的に、さらにはプロテアソーム非依存的に起こることを示唆している。そのため、無刺激時にはGSと結合してその発現を安定化しているGABA<sub>B</sub>受容体が、アンモニア刺激によってその安定化機能が抑制されていることが考えられた。

加えてリソソーム分解系についても同様に検討したが、GSは回復されなかった。現在どのタンパク質分解経路でGSの分解が起こっているのかを調べている。

**実験3.アストロサイトのGABA<sub>B</sub>受容体の発現を変化させた時のグルタミン合成酵素の発現や活性を検討する。**

NH<sub>4</sub>Clの添加15分前にGABA<sub>B</sub>受容体のアゴニストであるバクロフェンを添加したところ、GSの発現回復は見られなかった。このことは、GABA<sub>B</sub>受容体の下流シグナルの活性化ではGSの分解を阻止できないことを意味している。今後はバクロフェンの添加時間を変えて再度検討する予定である。

**実験4. GABA<sub>B</sub>受容体の発現変化によってアストロサイトの形態に変化が見られるかを調べる。**

NH<sub>4</sub>Clの添加後にGSの局在を検討したところ、核の周囲により強く発現が認められた。小胞体との共局

在は認められなかったため、現在他の細胞内小器官のマーカーを用いて検討している。この局在がGSの分解系と関連していると考えられることから、エンドソームなどの局在について調べる予定である。尚、アストロサイトの形態そのものには大きな変化は認められなかった。

## (2) 高アンモニア血症モデルマウスを用いた研究：

**実験1：様々な脳の部位におけるGABA<sub>B</sub>受容体やグルタミン合成酵素、GFAPの発現の変化を調べる。**

まず高アンモニア血症モデルマウスが本当に肝障害を起こし、血中のアンモニア濃度が上昇しているかを検討した。その結果、申請者が作成したモデルでは、肝細胞障害がみられ、正常マウスよりも約2倍血中アンモニア濃度が上昇していることがわかった。このマウスの大脳、小脳、海馬、視床、視床下部におけるGSとGFAPの発現量をWestern Blotting法にて検討したところ、大脳皮質、視床においてGSの発現減少が、そして小脳と視床下部でGFAPの発現上昇が認められた。GABA<sub>B</sub>受容体の発現量はサンプル数が十分ではないためまだ確定していない。

さらに免疫組織染色法にてGSの局在を検討したところ、高アンモニア血症マウスではGSが核の周囲により強く発現していた。現在細胞内小器官のどこに局在しているのかを検討している。

**実験2. GABA<sub>B</sub>受容体の活性を変化させる薬剤を投与した時のアストロサイトの形態などを調べる。**

GABA<sub>B</sub>受容体の活性化がGSの発現を回復するかを検討したところ、現在のところ回復傾向が見られている。今後サンプル数を増やして検討していく予定である。

## 4. まとめ

本研究は、生理的な条件下ではGSの発現を安定化させているGABA<sub>B</sub>受容体に注目し、GSが行うアストロサイトのアンモニア代謝においても重要な役割を果たしているのではないかと考え、その機能を解明しようと開始した。これまでの結果、培養細胞ではアンモニアによるGSの分解がGABA<sub>B</sub>受容体の活性化で阻止できていないが、高アンモニアモデルマウスでは回復傾向が見られている。そのため、神経細胞におけるGABA<sub>B</sub>受容体の活性化がアストロサイトのGSの発現に関与している可能性が考えられる。今後は神経細胞とアストロサイトとの関係も考慮しながら研究を進めていく予定である。

## 5. 発表論文

本研究は論文にまとめる段階にはまだないが、研究成果は以下のシンポジウムにて発表した。

(1) Miho Terunuma: Roles of inhibitory neurotransmitter receptors in brain homeostasis, International Collaborative Symposium, Schools of Dentistry in Taiwanese Universities, November 18-19, Taipei, Taiwan

(2) 照沼美穂: グルタミン合成酵素による脳内アンモニア代謝に関わる新規分子, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 12月6-9日, 神戸