

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06881

研究課題名(和文) ノックアウトラットによる2種類のGABA合成酵素アイソフォームの機能的役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of functional roles of two GABA synthetic enzyme isoforms using knockout rats

研究代表者

柳川 右千夫 (Yanagawa, Yuchio)

群馬大学・大学院医学系研究科・客員教授

研究者番号：90202366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質のGABAは、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD; GAD65とGAD67の2型存在)により合成される。GAD65とGAD67は、Gad2とGad1の異なる遺伝子にコードされる。様々な遺伝子型のGadノックアウト(KO)ラットを作製・解析した。例えば、Gad1/Gad2ダブルKOラット(DKOラット)前脳のGABA含量が著しく低値であり、GABAが2種類のGAD分子により合成されることを明らかにした。また、胎生期のDKOラット大脳皮質では、神経前駆細胞数の減少を観察した。従って、これらのKOラットは、脳におけるGAD分子やGABAの役割を解明する有用なツールとなることが予測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GABAは代表的な神経伝達物質であり、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD; GAD65とGAD67の2型存在)により合成される。GADやGABAは、多くの精神神経疾患に関与している。例えば、GAD67をコードするGAD1遺伝子の機能喪失変異と統合失調症、発達性およびてんかん性脳症との関連が報告されている。我々の作製したGadノックアウトラットでは、様々な表現型が見出された。これらのGadノックアウトラットは、脳におけるGADの役割の解明だけでなくヒト精神神経疾患の病態の解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：GABA is a major neurotransmitter in the mammalian central nervous system. It is synthesized from glutamate by glutamate decarboxylase (GAD). Two isoforms of GAD, GAD65 and GAD67 are separately encoded by the Gad2 and Gad1 genes, respectively. We generated Gad1/Gad2 mutant rats of various genotypes and characterized their phenotypes. For example, the extremely low GABA content in Gad1/Gad2 double knockout (DKO) rat forebrains at embryonic day 20 indicated that almost all GABA is synthesized by GADs. In addition, the number of neural progenitor cells was low in the DKO rat cerebral cortex at the embryonic stage, suggesting that GABA is critical for neural development. These KO rats will be a useful tool for clarifying the role of GADs and GABA in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：GABA グルタミン酸脱炭酸酵素 GAD65 GAD67 ノックアウトラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GABA は代表的な神経伝達物質であり、神経の電位活動の制御に加えて、覚醒、睡眠、概日リズムや学習、運動、感覚情報処理など脳機能を構築する上で中心的役割を果たしている。GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD ; GAD65 と GAD67 の 2 型存在) によって合成される。GAD65 と GAD67 は、それぞれ *Gad2* と *Gad1* の異なる遺伝子にコードされる。動物種により GAD65 と GAD67 の脳内発現比率が異なり、アダルト大脳皮質においてヒトとラットは GAD65 が GAD67 より多く、マウスでは GAD65 と GAD67 とが同程度である。

GAD や GABA は様々な精神神経疾患に関与している。複数の研究室での統合失調症死後脳の解析から、大脳皮質や海馬で GAD67 単独の発現低下、GAD65 と GAD67 双方の発現低下が報告された。*GAD1* 遺伝子の家族研究から、1塩基多型 (SNP) と若年発症型統合失調症との関連、SNP と注意欠陥多動性障害との関連が報告された。さらに、*GAD1* 遺伝子の機能喪失変異を両アレルにもつヒトでは、統合失調症だけでなく、発達性およびてんかん性脳症 (Developmental and epileptic encephalopathy) を発症することが最近報告された。一方、抗 GAD 抗体関連脳症では血中に抗 GAD65 抗体が検出され、てんかん、小脳失調、認知症を示す。しかし、GAD の遺伝子変異や発現低下が疾患の発症や病態にどのように寄与しているかは多くは未解決である。

2. 研究の目的

Gad2 ノックアウトマウス (*Gad2*^{-/-}マウス) では、4 週齢までは死亡例がなく、成熟とともに自発性痙攣発作が観察され、6 月齢で 25% が死亡する。*Gad1* ノックアウトマウス (*Gad1*^{-/-}マウス) では、口蓋裂や臍帯ヘルニアを呈し、全例出生日に死亡するため、生後発達や行動の解析が困難であった。それから、GAD65 と GAD67 の脳内発現比率は動物種で異なり、ヒトはラットに類似し、マウスと異なる。そこで、ヒトを含む GAD 分子の理解にはノックアウトラットの情報が有用と判断し、*Gad* 遺伝子のノックアウトラットの作製と解析に着手した。*Gad2*^{-/-}ラットでは 3 週齢の痙攣発作と高死亡率、*Gad1*^{-/-}ラットでは出生日以降の生存や低体重などを発見し、ノックアウトマウスと異なる表現型を見出した。本研究では、*Gad* 遺伝子ノックアウトラットの表現型についてさらに解析し、脳機能および神経発生における GAD65 分子と GAD67 分子、および GABA の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

TALEN 及び CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法で *Gad2*^{+/-}ラットと *Gad1*^{+/-}ラットをそれぞれ作製した。*Gad2*^{+/-}ラット同士あるいは *Gad1*^{+/-}ラット同士を交配し、*Gad2*^{-/-}ラットあるいは *Gad1*^{-/-}ラットをそれぞれ作製した。これらのラットを用いて、生化学解析、組織学的解析、行動解析を行った。また、*Gad2*^{+/-}ラットと *Gad1*^{+/-}ラットを交配し、*Gad1*^{+/-};*Gad2*^{+/-}ラット (ダブルヘテロ接合体) を得、さらに、*Gad1*^{+/-};*Gad2*^{+/-}ラット同士を交配することで、様々な遺伝子型の *Gad* ノックアウトラットを産出し、脳や網膜の GABA 含量を測定した。神経発生の研究には、*Gad1*^{-/-};*Gad2*^{-/-}ラット (*Gad1*/*Gad2* ダブルノックアウトラット ; DKO ラット) と *Gad1*^{+/+};*Gad2*^{+/+}ラット (野生型ラット) を比較解析した。

4. 研究成果

(1) (*Gad2* ノックアウトラットの解析) *Gad2* ノックアウトラット脳において GAD65 タンパ

ク質が欠損しているかどうかを確認するために、3種類の抗 GAD65 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。いずれの抗体においても野生型ラット (*Gad2*^{+/+}ラット) 脳では 65kD に相当するバンドが検出されたが、*Gad2* ノックアウトラットホモ接合体 (*Gad2*^{-/-}ラット) 脳では検出されなかった。*Gad2*^{-/-}ラットは、3週齢のてんかん痙攣発作を特徴とする。てんかんのモデル動物では海馬の形態学的変化を伴うことがある。ニッスル染色で海馬全体の形態、抗 ZnT3 抗体染色による海馬苔状線維の異常発芽の有無について光学顕微鏡レベルで検討したが、*Gad2*^{-/-}ラットと野生型ラットでは違いが観察されなかった。次に、GAD65 発現低下による行動への影響を明らかにする目的で、GAD65 ノックアウトラットヘテロ接合体 (*Gad2*^{+/-}ラット) と野生型ラットについて行動解析を行った。*Gad2*^{-/-}ラットでは生後 4 週齢までに約 80% が死亡するので、ヘテロ接合体を用いた。高架式十字迷路テストでは、*Gad2*^{+/-}ラットの方が野生型ラットよりクローズドアームでの長い滞在時間が観察され、不安様行動の亢進が示唆された。また、オープンフィールドテストでは、*Gad2*^{+/-}ラットの方が野生型ラットより長い総移動距離が観察され、自発運動量の亢進が示唆された。一方、Y 字型迷路テストおよび新奇物質探索テストでは、*Gad2*^{+/-}ラットと野生型ラットとで違いが検出されず、認知機能障害は観察されなかった。以上より、GAD65 分子は不安などの情動行動に関与することが示唆された。

(2) (*Gad1* ノックアウトラットの解析) 空間作業記憶における GAD67 の役割を明らかにするために、*Gad1* ノックアウトラットホモ接合体 (*Gad1*^{-/-}ラット) と野生ラット (*Gad1*^{+/+}ラット) を用いて Y 字型迷路試験を行なった。野生型ラットに比べ *Gad1*^{-/-}ラットで、自発性交替行動率が低下しており、GAD67 と記憶障害の関連が示唆された。次に、GAD67 欠損による恐怖反応への影響を明らかにする目的で、*Gad1*^{-/-}ラットと野生ラットを用いて文脈恐怖条件付けを行い、形成された恐怖記憶の消去学習を試みた。その結果、*Gad1*^{-/-}ラットでは全く消去が起きないことが明らかとなり、GAD67 分子が PTSD の病態に関与している可能性が示された。

(3) (*Gad* ノックアウトラットの GABA 含量) 発達期における GAD65 と GAD67 の各分子の役割 (特に GABA 合成への貢献度) を明らかにするために、様々な遺伝子型の *Gad* ノックアウトラットを作製し、表現型について比較解析した。最初に、胎生期 20 日 (E20) の *Gad1*^{-/-}; *Gad2*^{-/-}ラット (DKO ラット) 脳について、抗 GAD65/67 抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果、GAD65 及び GAD67 に相当するバンドが検出されず、両分子が欠損していることを確認した。次に、E20 のノックアウトラット前脳および網膜の GABA 含量を HPLC で測定し、ゲノタイプ間で比較検討した。前脳の GABA 含量では、野生型ラットを 100% とすると、*Gad1*^{-/-}ラットで 18%、*Gad2*^{-/-}ラットで 71%、*Gad1*^{-/-}; *Gad2*^{-/-}ラットで 0.3% であった。網膜の GABA 含量では、野生型ラットを 100% とすると、*Gad1*^{-/-}ラットで 38%、*Gad2*^{-/-}ラットで 56%、*Gad1*^{-/-}; *Gad2*^{-/-}ラットで 2% であった。以上の結果は、E20 の前脳及び網膜において、(1) GABA が 2 種類の GAD 分子により合成されること、(2) GABA 合成に関して GAD67 が GAD65 よりもドミナントであることを示唆した。

(4) (神経発生における GAD の役割) 胎生期大脳皮質の神経発生における GABA の役割を明らかにするために *Gad1*^{-/-}; *Gad2*^{-/-}ラット (DKO ラット) と野生型ラットとを比較解析した。Pax6 と Tbr2 はそれぞれ頂端側神経前駆細胞と基底側神経前駆細胞のマーカーである。それぞれの発現について胎生期 18 日 (E18) 大脳皮質を用いた免疫染色実験で検討した結果、Pax6 陽性細胞数、Tbr2 陽性細胞数がいずれも DKO ラットの方が少なかった。DKO ラットで神経前駆細胞数が減少するメカニズムを明らかにするために、細胞増殖能とアポトーシスについて検討した。リン酸化ヒストン H3 (PH3) と切断カスパーゼ 3 (CC3) はそれぞれ増殖細胞とア

ポトースのマーカーであり、それぞれの抗体を用いた免疫染色実験で比較検討した。E14, E16, E18 大脳皮質の脳室面での PH3 陽性細胞数を計測した結果、E16, E18 で DKO ラットの方が少なかった。一方、E14, E16, E18 大脳皮質の CC3 陽性細胞数はいずれの胎生期でも DKO ラットと野生型ラットで差がなかった。以上の結果より、DKO ラット大脳皮質では神経前駆細胞数が減っており、その原因が細胞増殖能の減少によることが推測された。

以上の研究成果より、*Gad* ノックアウトラットが脳機能や神経発生における GAD 分子の役割を解明するためのモデル動物になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Jiang W, Kakizaki T, Fujihara K, Miyata S, Zhang Y, Suto T, Kato D, Saito S, Shibasaki K, Ishizaki Y, Isoda K, Yokoo H, Obinata H, Hirano T, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Impact of GAD65 and/or GAD67 deficiency on perinatal development in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e22123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101389R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤原和之、柿崎利和、Weiru Jiang、宮田茂雄、柳川右千夫	4. 巻 53
2. 論文標題 ノックアウトラットによる2種類のGABA合成酵素アイソフォームの機能的役割の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 443-447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakizaki T, Ohshiro T, Itakura M, Konno K, Watanabe M, Mushiake H, Yanagawa Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Rats deficient in the GAD65 isoform exhibit epilepsy and premature lethality.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e21224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001935R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujihara K, Yamada K, Ichitani Y, Kakizaki T, Jiang W, Miyata S, Phd1; Suto T, Kato D, Saito S, Watanabe M, Kajita Y, Ohshiro T, Mushiake H, MD, Miyasaka Y, Mashimo T, Yasuda H, Yanagawa Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-engineered Gad1 elimination in rats leads to complex behavioral changes: Implications for schizophrenia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-01108-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara K, Sato T, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic Deletion of Glutamate Decarboxylase 67-kDa Isoform Alters Conditioned Fear Behavior in Rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 340-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyata S, Kakizaki T, Fujihara K, Obinata H, Hirano T, Nakai J, Tanaka M, Itohara S, Watanabe M, Tanaka KF, Abe M, Sakimura K, Yanagawa Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Global knockdown of glutamate decarboxylase 67 elicits emotional abnormality in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00713-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara K, Sato T, Higeta K, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral consequences of a combination of Gad1 haplodeficiency and adolescent exposure to NMDA receptor antagonist in Long-Evans rat.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 646088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.646088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono D, Honma KI, Yanagawa Y, Yamanaka A, Honma S	4. 巻 2
2. 論文標題 GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0483-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyata S, Kumagaya R, Kakizaki T, Fujihara K, Wakamatsu K, Yanagawa Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Loss of glutamate decarboxylase 67 in somatostatin-expressing neurons leads to anxiety-like behavior and alteration in the Akt/GSK3beta signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Behav Neurosci.	6. 最初と最後の頁 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2019.00131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuta S, Iguchi Y, Kakizaki T, Kobayashi K, Yanagawa Y, Takada M, Osanai M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Store-Operated Calcium Channels Are Involved in Spontaneous Slow Calcium Oscillations in Striatal Neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci.	6. 最初と最後の頁 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00547.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Kim J, Yanagawa Y, Suzuki N, Saito H, Takayama C.	4. 巻 426
2. 論文標題 Hyper-formation of GABA and glycine co-releasing terminals in the mouse cerebellar nuclei after deprivation of GABAergic inputs from Purkinje cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 88-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.11.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Fujihara K, Kakizaki T, Yanagawa Y.
2. 発表標題 Neonatal NMDA receptor blockade and glutamate decarboxylase 67-kDa isoform haplodeficiency synergistically cause behavioral alterations
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kakizaki T, Fujihara K, Yanagawa Y.
2. 発表標題 Behavioral analysis of GAD65 knockout rats
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jiang W, Kakizaki T, Miyoshi G, Yanagawa Y.
2. 発表標題 The effect of GABA deficiency on embryonic neocortical development
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jiang W, Kakizaki T, Miyoshi G, Kurachi M, Ishizaki Y, Yanagawa Y.
2. 発表標題 The effect of GABA on embryonic neocortical development
3. 学会等名 第68回北関東医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川右千夫
2. 発表標題 GABA合成酵素の遺伝子機能探索：マウスとラットのノックアウト動物を利用した比較研究
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム2021年度成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川右千夫
2. 発表標題 GABAニューロン研究のための遺伝子改変ラット
3. 学会等名 第15回 ラットリソース・リサーチ研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原和之、佐藤匠、宮坂佳樹、真下知士、柳川右千夫
2. 発表標題 GABA合成酵素GAD67ハプロ不全と新生仔期NMDA型グルタミン酸受容体遮断の組み合わせにより生じる行動学的表現型
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Weiru Jiang, Toshikazu Kakizaki, Goichi Miyoshi, Yuchio Yanagawa
2. 発表標題 The role of GABA in embryonic cortical development.
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Weiru Jiang、柿崎利和、藤原和之、宮田茂雄、張月、須藤貴史、加藤大樹、齋藤繁、柴崎真志、石崎泰樹、宮坂佳樹、真下知士、柳川右千夫
2. 発表標題 GAD65/67二重変異ラットの表現型解析
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿崎利和、Weiru Jiang、須藤貴史、齋藤繁、板倉誠、渡辺雅彦、柳川右千夫
2. 発表標題 GAD65欠損ラットは脳内GABA含量の減少とてんかん重積状態を示す
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Weiru Jiang, Toshikazu Kakizaki, Kazuyuki Fujihara, Shigeo Miyata, Yue Zhang, Takashi Suto, Daiki Kato, Shigeru Saito, Koji Shibasaki, Yasuki Ishizaki, Yoshiki Miyasaka, Tomoji Mashimo, Yuchio Yanagawa
2. 発表標題 Roles of rat glutamate decarboxylase isoforms in the perinatal period
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------