

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290002

研究課題名(和文) グルタミン酸脱炭酸酵素の遺伝子欠損マウスを用いたGABA神経伝達機構の研究

研究課題名(英文) Study of GABAergic transmission mechanism using glutamate decarboxylase knockout mice

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・教授

研究者番号：90202366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性神経伝達物質の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。GAD67ノックアウトマウスは出生日致死であり、それ以降の解析ができない。そこで、時期特異的GAD67ノックアウトマウスを作製した。それから、GAD67ノックアウトラットを作製した結果、3週齢以降も生存していることが判明した。これらの遺伝子改変動物は脳機能におけるGAD67およびGABAの役割を明らかにするための有用なツールとなることが予測される。

研究成果の概要(英文)：GABA is a major inhibitory neurotransmitter, and it is synthesized from glutamate by glutamate decarboxylase (GAD). There are two isoforms of GAD, GAD65 and GAD67. GAD67 knockout mice died at postnatal day 0 (P0), and thus they cannot be characterized after P0. We generated time-dependent GAD67 knockout mice. In addition, we generated GAD67 knockout rats, which were found alive after 3 weeks of age. These genetically engineered rodents will be a useful tool for clarifying the role of GAD67 and GABA in brain function.

研究分野：神経科学

キーワード：GABA GAD65 GAD67 ノックアウトマウス テトラサイクリン発現システム

## 1. 研究開始当初の背景

GABA は、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の機能を構築する上で中心的役割を果たしている。GABA は、てんかん病、統合失調症、不安症、自閉症スペクトラム障害などの精神神経疾患やハンチントン舞蹈病、全身硬直症候群の運動疾患との関連が知られている。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 GABA ニューロンで合成される。GAD65 と GAD67 は、分子量、補酵素との親和性、細胞内局在などで違いがあり、異なる遺伝子にコードされている。複数の研究室での統合失調症患者死後脳の解析から、大脳皮質や海馬で GAD67 単独の発現低下、GAD65 と GAD67 の双方の発現低下が報告されている。また、GAD67 遺伝子の家族研究から、1 塩基多型と若年発症の統合失調症及び灰白質容積の減少との関連が報告された。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が未解決である。

研究代表者等は、中枢神経系における GAD65、GAD67 の役割を明らかにする目的で、それぞれの遺伝子について完全型ノックアウトマウスを作製して解析を行ってきた。GAD65 完全型ノックアウトマウス(GAD65<sup>-/-</sup>マウス)では、不安レベルの増加、攻撃性の低下、自発性痙攣発作、痛覚感受性の亢進などが観察された。一方、GAD67 完全型ノックアウトマウス(GAD67<sup>-/-</sup>マウス)では口蓋裂や臍帯ヘルニアを呈し、出生日に死亡するため、それ以降の GAD67 の役割が不明であった。

## 2. 研究の目的

脳機能における GAD65 分子と GAD67 分

子の役割、GABA ニューロンの役割、および GABA 神経伝達機構について明らかにすることを目的とした。特に出生日以降の GAD67 分子の役割を明らかにするために、テトラサイクリントランスアクチベーター・システムを利用した時期特異的 GAD67 ノックアウトマウス(GAD67 誘導型ノックアウトマウス)を作製し、表現型の解析を目指した。既に我々が作製した遺伝子改変動物を用いて、神経発生や脳機能における GABA ニューロンの役割や GABA 神経伝達機構について明らかにする。脳における GAD65 と GAD67 の発現について理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

テトラサイクリン発現システム利用した GAD67 時期特異的ノックアウトマウス作製には、(1) GAD67 遺伝子にテトラサイクリントランスアクチベーター(tTA2)遺伝子をノックインした遺伝子改変マウス(GAD67-tTA ノックインマウス)、(2) GAD67 遺伝子に tTA2 が結合するテトラサイクリン応答因子を含むプロモーター(tet プロモーター)をノックインしたマウス(GAD67-tet ノックインマウス)が必要である。GAD67-tTA ノックインマウスは、既に作製した。GAD67 遺伝子座に STOP シグナルとテトラサイクリン応答配列を含む tet プロモーターをノックインしたマウス(GAD67-tet ノックインマウス)について ES 細胞を用いた遺伝子標的法により作製を行った。

GAD65<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウス(コントロール)において、ロータロッドテストを行い、運動失調の有無について検討した。また、発達段階の脳における GAD65 と GAD67 の発現についてマウスとラットで違いがあるかどうかを GAD65 と GAD67 の両者に反応する抗体(抗 GAD65/67 抗体)を用いたウエスタンブロット法で検討した。

#### 4. 研究成果

ES 細胞を用いた遺伝子標的法で GAD67-tet ノックインマウスのキメラマウスを得た。キメラマウスから体外受精でヘテロ接合体の GAD67-tet ノックインマウスを得て繁殖させた。GAD67-tet ノックインマウスを既に作製した GAD67-tTA ノックインマウスと交配し、ダブルノックインマウスを得た。このダブルノックインマウスにドキシサイクリン (Dox) を含む餌、あるいは含まない餌で飼育した場合の大脳皮質と小脳における GAD67 発現量についてウエスタンブロット法で比較検討した。Dox を含む餌で 4 週間飼育した場合、いずれの脳領域でも GAD67 発現量が減少した。次に、Dox を含まない餌に戻して 4 週間飼育すると GAD67 発現量が回復した。以上の結果は、ダブルノックインマウスが時期特異的 GAD67 ノックアウトマウスであることを示唆する。今後は、時期特異的 GAD67 ノックアウトマウスについて行動解析を行い、統合失調症様の表現型を示すかどうかなどについて検討する。さらに、時期特異的 GAD67 ノックアウトマウスに特有な表現型が観察された場合、Dox を含まない餌で GAD67 発現量を回復させ、観察された表現型がレスキューされるかどうかを検討する。

運動失調と GAD65 分子との関連を明らかにする目的で、GAD65<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウス (いずれも 5 月齢) を用いて運動機能について比較検討した。まず GAD65<sup>-/-</sup>マウスでは後肢クラスピングが観察されなかった。次にロータロッドテストを行ったが、両者の間に有意差がなかった。以上の結果から、GAD65<sup>-/-</sup>マウスでは明白な運動機能の障害は認められなかった。

2 週齢、4 週齢、8 週齢のマウスとラットの脳皮質と小脳の各サンプルについて、ウエスタンブロット法で GAD65 と GAD67 の発現レベルを検討した。マウスとラットのそれ

ぞれ対応するサンプルにおいて GAD 全体のタンパク量に対する GAD65 タンパク質が占める割合は、ラットの方がマウスよりも高かった。これらの結果は、ラットとマウスにおいて GAD65 と GAD67 の役割が異なる可能性を示唆している。そこで、GAD67 ノックアウトラットを作製・解析し、GAD67 ノックアウトマウスと表現型に違いがあるかどうか検討した。CRISPR-Cas9 法のゲノム編集技術を用いて、GAD67 完全型ノックアウトラットヘテロ接合体 (GAD67<sup>+/-</sup>ラット) を作製した。GAD67<sup>-/-</sup>ラットを得るために、GAD67<sup>+/-</sup>ラットを繁殖し交配させた。PCR 法を用いてゲノタイピングした結果、3 週齢で生存している GAD67<sup>-/-</sup>ラットを同定した。抗 GAD65/67 抗体を用いた GAD67<sup>-/-</sup>ラット全脳のウエスタンブロットでは GAD67 分子が検出されず、ノックアウト動物であることを確認した。以上の結果は、GAD67<sup>-/-</sup>ラットは出生日以降も生存しており、出生日に全例致死の GAD67<sup>-/-</sup>マウスとは重症度が異なることを示している。さらに、GAD67<sup>-/-</sup>ラットは出生日以降の GAD67 の役割を理解する上で有用なモデル動物になることが期待される。それから、TALEN 法のゲノム編集技術で作製した GAD65<sup>-/-</sup>ラットについても解析のための繁殖を行った。GAD65<sup>-/-</sup>マウスと同様に後肢クラスピングが観察されなかった。

植物性エストロゲンが不足した食餌では GAD67 分子の発現が低下すること、GAD67<sup>-/-</sup>マウス胎仔では舌下神経核運動ニューロンの樹状突起の長さや分岐の数が増加するなど、国際共同研究に貢献した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

1: Kaneko R, Takatsuru Y, Morita A, Amano I, Hajjima A, Imayoshi I, Tamamaki N, Koibuchi N, Watanabe M, Yanagawa Y. Inhibitory neuron-specific

- Cre-dependent red fluorescent labeling using VGAT BAC-based transgenic mouse lines with identified transgene integration sites. *J Comp Neurol.* 査読有、526, 373-396, 2018.  
doi: 10.1002/cne.24343.
- 2: Saito Y, Sugimura T, Yanagawa Y. Comparisons of neuronal and excitatory network properties between the rat brainstem nuclei that participate in vertical and horizontal gaze holding. *eNeuro* 査読有、4(5). e0180-17, 2017.  
doi: 10.1523/ENEURO.0180-17.2017.
- 3: Kakizaki T, Sakagami H, Sakimura K, Yanagawa Y. A glycine transporter 2-Cre knock-in mouse line for glycinergic neuron-specific gene manipulation. *IBRO Rep.* 査読有、3, 9-16, 2017.  
doi: 10.1016/j.ibror.2017.07.002
- 4: Uchida T, Lossin C, Ihara Y, Deshimaru M, Yanagawa Y, Koyama S, Hirose S. Abnormal  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission in a *Kcnq2* model of early-onset epilepsy. *Epilepsia* 査読有、58, 1430-1439, 2017.  
doi: 10.1111/epi.13807.
- 5: Saito Y, Yanagawa Y. Distinct response properties of rat prepositus hypoglossi nucleus neurons classified on the basis of firing patterns. *Neurosci Res.* 査読有、121, 18-28, 2017.  
doi: 10.1016/j.neures.2017.03.003.
- 6: Hirono M, Nagao S, Yanagawa Y, Konishi S. Monoaminergic modulation of GABAergic transmission onto cerebellar globular cells. *Neuropharmacology.* 査読有、118:79-89, 2017.  
doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.011.
- 7: Fogarty MJ, Kanjhan R, Yanagawa Y, Noakes PG, Bellingham MC. Alterations in hypoglossal motor neurons due to GAD67 and VGAT deficiency in mice. *Exp Neurol.* 査読有、289:117-127, 2017.  
doi: 10.1016/j.expneurol.2016.12.004.
- 8: Sunagawa M, Shimizu-Okabe C, Kim J, Kobayashi S, Kosaka Y, Yanagawa Y, Matsushita M, Okabe A, Takayama C. Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord. *Neuroscience.* 査読有、343:459-471, 2017.  
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.12.032.
- 9: Nakamura Y, Yanagawa Y, Morrison SF, Nakamura K. Medullary Reticular Neurons Mediate Neuropeptide Y-Induced Metabolic Inhibition and Mastication. *Cell Metab.* 査読有、25:322-334, 2017.  
doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.002.
- 10: Egashira Y, Takase M, Watanabe S, Ishida J, Fukamizu A, Kaneko R, Yanagawa Y, Takamori S. Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc Natl Acad Sci USA.* 査読有、113:10702-10707, 2016.  
doi: 10.1073/pnas.1604527113.
- 11: Zhang Y, Yanagawa Y, Saito Y. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in medial vestibular and prepositus hypoglossi nuclei neurons showing distinct neurotransmitter phenotypes. *J Neurophysiol.* 査読有、115:2649-2657, 2016.  
doi: 10.1152/jn.00852.2015.
- 12: Tomioka R, Sakimura K, Yanagawa Y. Corticofugal GABAergic projection neurons in the mouse frontal cortex. *Front Neuroanat.* 査読有、9, 133, 2015.  
doi: 10.3389/fnana.2015.00133.
- 13: Minocha S, Valloton D, Yspilanti AR,

Fiumelli H, Allen EA, Yanagawa Y, Marin O, Chédotal A, Hornung JP, Lebrand C. Nkx2.1-derived astrocytes and neurons are indispensable for the anterior commissure formation: a role for Slit2. *Nat Commun.* 査読有、6, 6887, 2015.  
doi: 10.1038/ncomms7887.

14: Fujihara K, Miwa H, Kakizaki T, Kaneko R, Mikuni M, Tanahira C, Tamamaki N, Yanagawa Y. Glutamate decarboxylase 67 deficiency in a subset of GABAergic neurons induces schizophrenia-related phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 査読有、40, 2475-2486, 2015.  
doi: 10.1038/npp.2015.117.

15: Nassar M, Simonnet J, Lofredi R, Cohen I, Savary E, Yanagawa Y, Miles R, Fricker D. Diversity and overlap of Parvalbumin and Somatostatin expressing interneurons in mouse presubiculum. *Front Neural Circuits.* 査読有、9, 20, 2015.  
doi: 10.3389/fncir.2015.00020.

16: Sandhu KV, Yanagawa Y, Stork O. Transcriptional regulation of glutamic acid decarboxylase in the male mouse amygdala by dietary phytoestrogens. *J Neuroendocrinol.* 査読有、27, 285-292, 2015.  
doi: 10.1111/jne.12262.

17: Kuki T, Fujihara K, Miwa H, Tamamaki N, Yanagawa Y, Mushiake H. Contribution of parvalbumin and somatostatin-expressing GABAergic neurons to slow oscillations and the balance in beta-gamma oscillations across cortical layers. *Front Neural Circuits* 査読有、9, 6, 2015.  
doi: 10.3389/fncir.2015.00006.

18: John D, Shelukhina I, Yanagawa Y,

Deuchars J, Henderson Z. Functional alpha7 nicotinic receptors are expressed on immature granule cells of the postnatal dentate gyrus. *Brain Res.* 査読有、1601:15-30, 2015.  
doi: 10.1016/j.brainres.2014.19: Kakizaki T, Oriuchi N, Yanagawa Y. GAD65/GAD67 double knockout mice exhibit intermediate severity in both cleft palate and omphalocele compared with GAD67 knockout and VGAT knockout mice *Neuroscience* 査読有、288, 86-93, 2015.  
doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.

〔学会発表〕(計 13 件)

1: Fujihara K, Kakizaki T, Miyata S, Watanabe M, Ohshiro T, Mushiake H, Miyasaka Y, Mashimo T, Yanagawa Y. Generation and characterization of glutamate decarboxylase knockout rats. 第 95 回日本生理学会大会、2018 年

2: Kakizaki T, Watanabe M, Yanagawa Y. Premature lethality in glutamate decarboxylase 65-deficient rats. 第 40 回日本神経科学大会、2017 年

3: 柳川右千夫、柿崎利和、渡辺 雅彦. TALEN を用いたゲノム編集で作製したグルタミン酸脱炭酸酵素 65 ノックアウトラットの解析。日本ゲノム編集学会第 2 回大会、2017 年

4: Wang T, Shinha AS, Yanagawa Y, Hata K, Fukuda A. Maternal stress causes loss of parvalbumin neurons and alterations of extracellular glycans in the mPFC of GAD67-GFP knock-in mouse. 第 94 回日本生理学会大会、2017 年

5: Nakamura Y, Yanagawa Y, Morrison SF, Nakamura K. Hypothalamic neuropeptide Y inhibits brown adipose tissue thermogenesis via activation of medullary reticular GABAergic neurons. 第 94 回日本

生理学会大会、2017年

6: Yanagawa Y, Kakizaki T, Watanabe M.

Lethal phenotype and seizures in glutamate decarboxylase 65 knockout rats.

第94回日本生理学会大会、2017年

7: Kakizaki T, Watanabe M, Yanagawa Y.

Phenotypic comparison between glutamate decarboxylase 65-deficient mice and rats.

第39回日本神経科学大会、2016年

8: Yanagawa Y. A genetic mouse model of

GABAergic dysfunction in schizophrenia.

第39回日本神経科学大会、2016年

9: Kakizaki T, Watanabe M, Yanagawa Y.

Comparison between glutamate decarboxylase 65 knockout mice and rats.

10<sup>th</sup> FENS meeting, 2016

10: Kakizawa K, Watanabe M, Yanagawa Y,

Oki Y, Fukuda A. A novel role of GABA in the release of CRH in the

hypothalamo-pituitary pathway. 第38回日本神経科学大会、2015年

11: Kaneko R, Takatsuru Y, Yanagawa Y.

Cre-dependent tdTomato reporter mouse lines to visualize inhibitory neuron

第38回日本神経科学大会、2015年

12: Yanagawa Y.: Glutamate decarboxylase

deficiency displays schizophrenia-like phenotypes: a study using knockout mice.

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・

第92回日本生理学会大会合同大会、2015年

13: 柳川右千夫、GABAニューロンを標的とした遺伝子改変マウスの開発

第18回活性アミンに関するワークショップ、2014年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/neurosci/neurosci-development/106.html>

6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号：90202366

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

柿崎 利和 (KAKIZAKI TOSHIKAZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50375531

三輪 秀樹 (MIWA HIDEKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80468488