

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460314

研究課題名(和文) 周生期及び成長期におけるGABA抑制から探る脳の性差とホルモンの制御機構の解明

研究課題名(英文) Sex differences in the GABAergic system

研究代表者

山田 順子 (Yamada, Junko)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：30334965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の性差を探るためGABAに焦点を当て、行動解析、シナプス解析、および関連タンパクの発現解析を行った。野生型の雌雄差行動解析では、新規環境下における活動量は雄雌とも時間経過とともに活動量は減少する傾向がみられたが、雄と比較してOVXマウスは活動量の減少が緩やかで、雄より活動量は高かった。PRIP-1 KOでは雌は野生型とKOで差はみられなかったが、雄はOVXマウスが雌に近く時間経過に伴う活動量低下が少なかった。

GABAネットワークの違いを調べるため、扁桃体のGABAシナプス周囲の受容体サブユニット発現解析をシナプス部、周囲、前シナプス部に分けてウエスタンブロッティング法を行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on GABAergic system to investigate the sex differences of the brain, using the behavior analysis, electrophysiology analysis and expression analysis of the GABAA receptor. The ovariectomized (OVX) wild type (WT) mice were more active than male mice in the open field test with a time course. The male PRIP-1 KO mice were more active than WT mice as the female mice.

To investigate the function of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors, we utilized a subcellular fractionation approach coupled with detergent extraction to prepare synaptic and extrasynaptic GABAA receptors from amygdala. The Pre-Post-Extra-synaptic membrane were prepared using a modified version of a previously method (Goebel-Goody et al, 2009, Garcia et al, 2014). This modified method makes us possible to extract protein from small amount of tissue (about 15-20 µg of protein of pre-synaptic membrane from 20 mg tissue).

研究分野：神経生理学

キーワード：GABA 脳の性差 トニック抑制

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳の性差: これまで脳の雌雄差研究は様々な方法で行われているがその一方、多くの生理・薬理学実験が性周期によるホルモン変動の少ない雄を用いて行われてきた。不安障害である月経前症候群をみても心の状態(脳の活動)に性ホルモン変動の影響が関係していることは容易に想像でき、雌雄差、ホルモン変動を考慮した研究は必須である。特に**脳内で主要な抑制性伝達物質 GABA は発達に伴い作用が逆転する**ことが近年示されているが、GABA はベンゾジアゼピンをはじめとする多くの薬物のターゲットとして用いられており、GABA_A 受容体を介する作用の雌雄差研究は今後のトピックとなりうる。

(2) 発達期の特殊な抑制メカニズム: 脳における主要な抑制性神経伝達物質 GABA は、成熟期では GABA_A 受容体を介して Cl⁻ 流入により神経細胞の膜電位を過分極させ神経伝達を抑制する。ところが、発達初期や神経障害時には Cl⁻ 流出により膜電位を脱分極させて興奮性に作用し、細胞内 Ca²⁺ を増加させ神経細胞への分化、移動、シナプス形成・強化に関与する。

(3) 新しい概念のシナプス伝達: 申請者は新しいタイプの GABA 伝達“トニック抑制”にも着目し大脳皮質におけるトニック GABA 抑制の層による違いを証明した他、分子生物学的解析を合わせてそのメカニズムを証明した。

2. 研究の目的

前述のとおり脳内の主要な抑制性伝達物質である GABA は、発達初期や神経障害時には神経細胞への分化、移動、シナプス形成・強化に関与する。一方、発達後の GABA 伝達は通常のシナプス伝達の他に持続的に微量の抑制を生じるトニック伝達も生じており細胞の活性を長時間ゆるやかにコントロールできるものとして注目されている。これら GABA の作用は発達期および二次性徴発現後、性ホルモンにより大きく影響を受ける。そこで本研究課題では情動の中核である扁桃体および前頭前野皮質を用い、1) 周生期における GABA 作用逆転機構と性差の分子機構の解明、2) 二次性徴発現後の GABA 作用とステロイドホルモンの修飾機構の解明を目的とし2つの神経ネットワークの構築期に焦点をあて発達期の GABA 応答と性差についてシナプスレベル、分子レベル合わせて検討する。

3. 研究の方法

雄マウスおよび雌マウスの性周期(発情期・非発情期)によるトニック抑制の変動を不安に関与していると考えられている扁桃体で比較検討する。雌マウスに関しては、卵巣切除を行ったものを用いた。野生型マウスでの雌雄差および GABA_A 受容体機能に変異が見られる PRIP-1 KO マウスでの雌雄差を解析した。

(1) 生理学的手法: パッチクランプ法によるトニック・フェージックカレントの測定
(2) 薬理学的手法: パッチクランプ法によるトニック電流に対する GABA 受容体サブユニット特異的アゴニスト、アンタゴニスト効果の検討

(3) 行動解析: 高架式十字迷路、オープンフィールドテストによる不安様行動解析

(4) 分子生物学的手法: GABA 受容体サブユニットタンパク発現を細胞質、シナプス終末、シナプス後部、シナプス周囲に分離してウエスタンブロッティング法による解析を行った。

4. 研究成果

野生型マウスの雌雄差行動解析

脳の性差を調べるため、野生型マウス(C57BL/6J)の行動解析を行った。8~10週齢の雄マウスと8週齢で卵巣切除(OVX)を行った雌マウスを比較した。

高架式十字迷路: オープンアームへのエントリー、滞在時間とも差はみられなかった。新奇環境下における活動量: 雄雌とも時間経過とともに活動量は減少する傾向がみられたが、雄と比較して OVX マウスは活動量の減少が緩やかで、雄より活動量は高かった。

PRIP-1 KO マウスの雌雄差行動解析

これまでの研究で GABA_A 受容体の膜への移動に関係するタンパク PRIP1 に変異をもつ PRIP-1KO マウス(KO マウス)は野生型と比べてシナプスレベルで GABA 応答に違いがみられること、野生型と KO での行動の違いも示してきた。今回このマウスを用いて雌雄差を調べる目的で行動解析を行った。

高架式十字迷路: KO マウスでは OVX マウスが雄と比べてオープンアームへのエントリーの減少と滞在時間の増加がみられた。つまり、OVX マウスはアーム間の移動はあまりせず、オープンアームにいる時間が長いということが言える。

新奇環境下における活動量: これまでの研究で KO マウスは雄では野生型とくらべ時間経過に伴う活動量の低下が少ないことがわかっていたが、KO マウスの OVX マウスも同様の傾向がみられ、雌に関しては野生型、KO マウスでの違いはみられなかった。つまり、雄の KO マウスは OVX マウスの野生型、KO に近いという事が言える。

シナプス周囲の受容体サブユニット発現解析のための方法の探索

これまでの研究で GABA_A 受容体サブユニット選択的アゴニスト、アンタゴニストにより、野生型と KO で GABA トニック電流に差がみられることを明らかにしたが、扁桃体組織を用いたウエスタンブロッティング法では差は見られなかった。この理由は、通常の GABA 受容体を介するシナプス電流(フェージック電流)を引き起こすシナプス直下の GABA 受容体サブユニットとトニック電流を引き起こすシナプス周囲の GABA 受容体サブユニット

トの構成が異なっている可能性があるため、これを解析するには細胞膜をシナプス直下とシナプス周囲、プレシナプスに分ける必要がある。今回、トライトン X を用いた方法でシナプス分画に分けてウエスタンブロッティングを行う方法 (S.M.Goebel-Goady et al, Neuroscience 2009) を参考に条件を変えて新しい方法を検討した。

GABA 受容体サブユニット 1、4、5、2/3、2、の発現を解析したシナプス直下でないエクストラシナプス部 (Extra) で 4、5、2、サブユニットの発現を検知することができた。当初、前シナプスと後シナプスに分ける際 1% Triton-X100 を用いており、この条件では前シナプス部と後シナプス部の分離が不十分であった。そこで Triton-X100 を 0.5% に下げたところ、Pre 側ではほとんど受容体が検出されなくなり分離ができるようになった (図 1)。

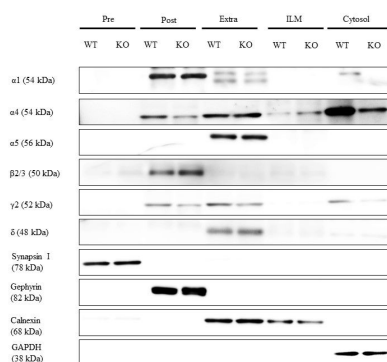


図 1 野生型 (WT)、PRIP-1 KO 扁桃体ニューロンの膜分画における GABA_A 受容体サブユニットタンパク発現

この結果から、まだ野生型と KO の顕著な発現の違いは見られないが、サンプル数を増やし現在継続して解析を行っている。また、周生期における雌雄差の行動解析も継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Migita K, Ozaki T, Shimoyama S, Yamada J., Nikaido Y, Furukawa T, Shiba Y, Egan TM, Ueno S. HSP90 Regulation of P2X7 Receptor Function Requires an Intact Cytoplasmic C-Terminus. *Mol Pharmacol.* 2016 Aug;90(2):116-126. doi: 10.1124/mol.115.102988. Epub 2016 Jun 14. (査読あり)
2. Nikaido Y, Yamada J., Migita K., Shiba Y., Furukawa T., Nakashima T., Ueno S. cis-3-Hexenol and trans-2-hexenal mixture

prevents development of PTSD-like phenotype in rats. *Behav Brain Res.* 2016 Jan 15;297:251-258. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.023. Epub 2015 Oct 22. (査読あり)

3. Shiba Y., Mori F, Yamada J., Migita K., Nikaido Y., Wakabayashi K., Kaneko S., Okada M., Hirose S., Ueno S. Spontaneous epileptic seizures in transgenic rats harboring a human ADNFLE missense mutation in the β 2-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neurosci. Res.* 2015 Nov;100:46-54. doi: 10.1016/j.neures.2015.06.003. Epub 2015 Jun 16. (査読あり)
4. Furukawa T, Yamada J., Akita T., Matsushima Y., Yanagawa Y., Fukuda A. Roles of taurine-mediated tonic GABA_A receptor activation in the radial migration of neurons in the fetal mouse cerebral cortex. *Frontiers in Cellular Neurosci.* 2014 doi: 10.3389/fncel.2014.00088. eCollection 2014. (査読あり)
5. Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J., Migita K., Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The Kick-In System: A Novel Rapid Knock-In Strategy *Plos One.* 2014 Feb 19;9(2):e88549. doi: 10.1371/journal.pone.0088549. eCollection 2014 (査読あり)

[学会発表](計 16 件)

1. Junko Yamada, Takakiyo Tsujiguchi, Masaru Yamaguchi, Toshiya Nakamura, Yasushi Mariya. 日本神経科学会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) Effects of irradiation in mouse excitatory synaptic transmission. (2016.7.20)
2. Yamada J., Zhu G, Okada M., Hirose S., Shiba Y., Migita K., Ueno S., Kaneko S. 5th International Symposium Interaction of nervous and immune systems in health and disease. (Saint Petersburg Russia) The prophylactic effect of early treatment with furosemide on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. (2015.6.25)
3. 上野伸哉 山田順子 日本てんかん学会シンポジウム 京王プラザホテル (東京都 新宿区) A novel prophylactic strategy for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) (2014.10.02)
4. Yamada J., Zhu G, Okada M., Hirose S., Shiba Y., Migita K., Ueno S., Kaneko S. Neuro2014 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) The prophylactic effect of early treatment with furosemide. (2014.9.12)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 順子 (YAMADA Junko)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：30334965

(2) 研究分担者

富山 誠彦 (TOMIYAMA Masahiko)
弘前大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：40311542

(3) 連携研究者

右田 啓介 (MIGITA Keisuke)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：10352262

