

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20590229

研究課題名(和文) 大脳皮質および大脳辺縁系における GABA 作動性トニックシグナルと不安のメカニズム

研究課題名(英文) Anxiety is involved in tonic GABAergic inhibition in cerebral cortex and limbic system.

研究代表者

山田 順子 (YAMADA JUNKO)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30334965

研究成果の概要(和文)：

不安のメカニズムを解明するためマウスを用い実験を行った。GABA 受容体の細胞膜への移動に関与している PRIP-1 ノックアウトマウス(KO)は GABA 作動性抑制伝達に異常をきたしている可能性がある。KO は野生型に比べ不安様行動が多いことがわかった。次に不安に関する扁桃体でホールセルパッチクランプ法による解析を行い、KO の扁桃体ニューロンではトニック GABA 抑制の減少を生じている事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

PRIP1, a novel IP3 binding protein, functioned as a transporter protein of GABA_A receptor to plasma membrane. Then PRIP1-KO mice should be changed the GABAergic inhibitory system. KO mice showed decreasing motor activity by an open-field test. Using brain slices and whole-cell patch-clamp recordings, there are no significant difference both amplitude and frequency of mEPSCs and mIPSCs between WT and KO mice. Tonic GABAergic inhibition exist in principal neurons of the basolateral amygdala in WT mice but PRIP-1 KO mice have imperfection of this inhibitory system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：GABA、抑制性シナプス伝達、不安、ニューロン、トニックシグナル、扁桃体

1. 研究開始当初の背景

(1) GABA、グルタミン酸などの神経伝達物質は、通常細胞の興奮と共に神経終末から放出され、シナプス後膜の受容体に作用しシナプス電位を引き起こすことが一般的に知られている。ところが近年、小脳や海馬のニューロンにおいて、シナプスから漏れだして神経

細胞周囲に微量に存在する GABA が、シナプス直下でない場所に存在する受容体に作用して“持続的なシナプス電流”すなわち“トニック電流”を引き起こしている事が見出され、これらが細胞の興奮性を調節していることがわかってきた(図1)。しかし、それらの意義や調節のメカニズムはよくわかって

いない。

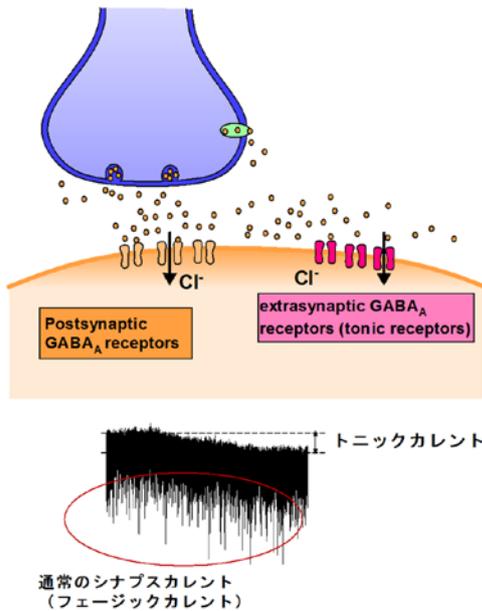


図1 GABA シナプスにおけるフェージックおよびトニックカレントのモデル図

シナプス直下(postsynaptic)にある受容体を介するフェージックカレントと、シナプス外(extrasynaptic)に存在する受容体を介しベースラインを変えるトニックカレントが存在する。

(2) 中枢神経系において、主要な抑制性伝達物質である GABA は GABA_A 受容体を介して Cl⁻ イオンを細胞の活動を抑制させる。申請者らは記憶・学内に流入し細胞の膜電位を過分極させ細胞習などと結びつくグルタミン酸受容体を介するシナプス伝達の研究が多い中、早くから、扁桃体における GABA_B 受容体を介する抑制調節、小脳における抑制調節、発達期の脳皮質細胞の GABA 応答性の変化、麻酔薬による脳皮質ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体の細胞膜への導入の発見など、抑制性伝達における新しい発見を行ってきた。

(3) 申請者らは前述の“トニック”な GABA 作動性の抑制性伝達が、ラット脳皮質錐体細胞にも存在し、麻酔薬 midazolam によりこのトニック抑制が引き起こされることを示した。さらに、脳皮質 2/3 層と 5 層で異なった薬理作用を持つことを見出し、この違いは GABA_A 受容体の $\alpha 5$ サブユニットによるものである事を single-cell RT-PCR 法とパッチクランプ法を用いて、遺伝子レベルと生理的応答をあわせて証明した (Yamada et al. Cerebral cortex 2007)。この発見は、これまで考えられていた、小脳の $\alpha 6$ 受容体、海馬の δ 受容体を介するトニックカレントと異なる新しいタイプのトニックカレントである。

このように脳内の部位により、まだ知られ

ていないさまざまなトニックカレントが存在していると考えられ、脳皮質での新しい発見に引き続き不安に関係していると考えられる扁桃体を含む脳辺縁系においてもトニックシグナル研究を行う本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

中枢神経系における最も主要な抑制性神経伝達物質 GABA は麻酔薬、抗不安薬、抗けいれん薬など様々な薬物の作用機序にかかわっている。細胞レベルで見ると、従来考えられていた神経細胞間のシナプス伝達 (フェージック) と異なる新たな方式のシナプス伝達 (トニック) も神経活動レベルに重要な役割を行っていることがわかってきた。この伝達方式が注目されている理由は、トニック伝達のみを薬物でモデュレートできれば“主要な伝達 (最低限必要な伝達) を遮断する事なく脳機能の活性を変えることができる”という点にある。具体的に言えば、麻酔薬、鎮痛薬、睡眠薬などへの応用へ直接結びつく非常に重要なものとなる。

本研究では GABA 作動性抑制性伝達に焦点をあて脳皮質及び脳辺縁系における“特殊な抑制性伝達”の役割や意義と不安との関係を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 不安様行動解析

IP3 結合タンパクとして、クローニングされた PRIP タンパクは GABA-A 受容体の膜へのトランスポーター蛋白としての機能も報告されている。すなわち GABA_A 受容体のクラスタリングなどに関係すると考えられ、GABA 作動性トニック抑制にも異常をきたしている可能性がある。そこで、このノックアウトマウス (PRIP1-KO) と野生型マウスを用いオープンフィールドテストによる不安様行動解析を行う。

(2) PRIP-1 ノックアウトマウスのニューロンのフェージック抑制、トニック抑制の検討
脳皮質および海馬のニューロンにおけるトニック抑制を検討する。脳スライス標本を作成し、スライスパッチクランプ法により GABA 作動性カレント (mIPSCs) を記録する。mIPSC の大きさ、頻度を比較する。さらに、GABA_A 受容体サブユニットの阻害薬により抑制されるトニックカレントを測定し、野生型マウスのニューロンと比較する。次にトニックカレントを生じるサブユニットを薬理的に同定する。

(3) PRIP1-ノックアウトマウスを用いた海馬、扁桃体トニックカレントの解析

前述 (2) と同様の方法で海馬 CA1 ニューロンおよび扁桃体ニューロンのトニック抑制を測定する。

(4) 分子生物学的解析: Single-cell RT-PCR 法及び western blot 法を用いて大脳皮質ニューロン、海馬 CA1 ニューロン、扁桃体ニューロンの GABA 受容体サブユニット遺伝子発現を野生型、PRIP-1 ノックアウトマウスで比較する。

4. 研究成果

(1) 不安行動と GABA 抑制の関係
PRIP1 ノックアウトマウスと野生型の行動解析をオープンフィールドテストを用いて行った。ノックアウトマウスは野生型に比べ新環境下における探索行動が有意に減少し不安様行動の増加が見られた。このことから、扁桃体における GABA 抑制の変化により行動変化が起きている可能性が示唆される (図 2)。

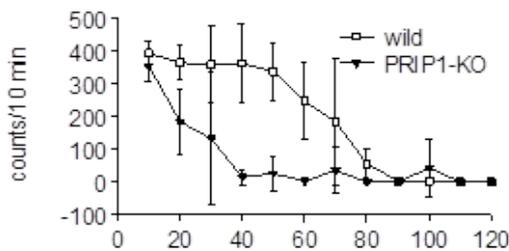


図 2 : オープンフィールドテストによる野生型、KO マウスの行動量測定: KO マウスは実験開始後行動量の低下がみられ、不安感が多いことがわかる。

次に、不安に関連する扁桃体ニューロンのトニック抑制を調べるため、スライスパッチクランプ法により主要細胞より GABA 作動性シナプス伝達の記録を行った。野生型、PRIP1-KO でフェージックシナプス伝達に差は見られなかったが、GABA_A 受容体アンタゴニスト bicuculline 投与によるトニック電流の抑制は PRIP1-KO で優位に減少していた (図 3)、このことから、PRIP1-KO 扁桃体ニューロンでは GABA 作動性トニック電流の減少が生じており、不安との関連が示唆される。

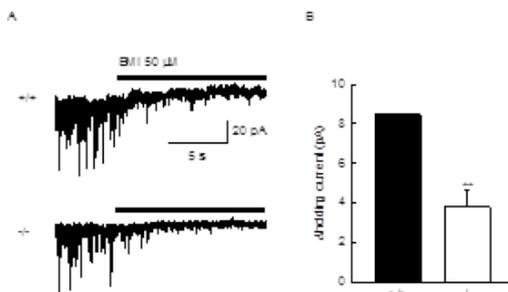


図 3: GABA_A 受容体アンタゴニスト BMI により抑制されるトニックカレント: KO は野生型に比べ優位に減少している。

(2) 海馬におけるトニックカレントと異常脳波

PRIP-1KO マウスの脳波を測定したところ異常脳波が観察された (図 4)

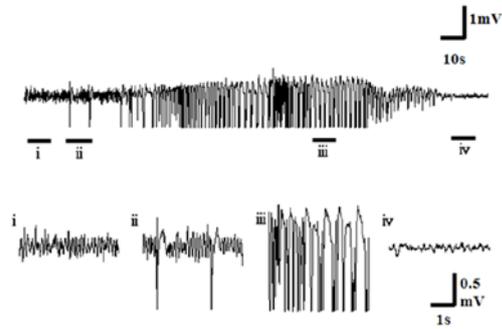


図 4 : PRIP-1 KO マウスで観察される異常脳波

次に異常脳波発生に関連すると考えられる海馬 CA1 ニューロンの抑制性シナプス伝達を解析した。通常のシナプス伝達は野生型、PRIP-1KO で差は見られなかったが、抗痙攣薬 Diazepam 投与により生じる GABA 作動性トニック電流の増強、bicuculline 投与により生じるトニック電流の抑制共に PRIP1-KO マウスは野生型と比べ優位に減少していた (図 5)。この結果から、PRIP1-KO マウスは GABA_A 受容体の (特にトニックカレントを引き起こすサブユニット構成の受容体) 機能が低下しており、これにより脳波異常や刺激に対する応答性の更新が見られている可能性が示唆される。

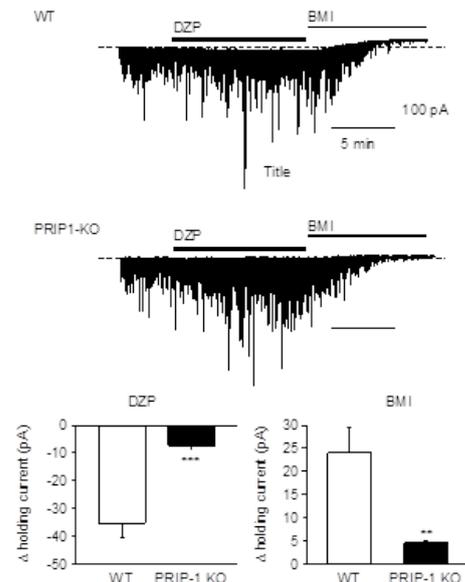


図 5 : WT および KO マウス CA1 ニューロンのトニックカレント: DZP による増強、BMI によるトニックカレントの抑制とも KO は優位に低下している。

(3) PRIP1-KO 扁桃体ニューロンの GABA_A 受容体のサブユニット構成

PRIP-1KO におけるトニックカレントの減少を引き起こしている GABA_A 受容体のサブユニットを調べるため、GABA_A 受容体サブユニット特異性のあるアゴニストを投与しトニックカレントを解析した (図 6) $\alpha 1$ サブユニットに選択制の高い zolpidem は KO では優位にトニックカレントが減少していた。一方 β サブユニット特異性が高い etomidate に対しては KO の方が増強効果が優位に増加していた。

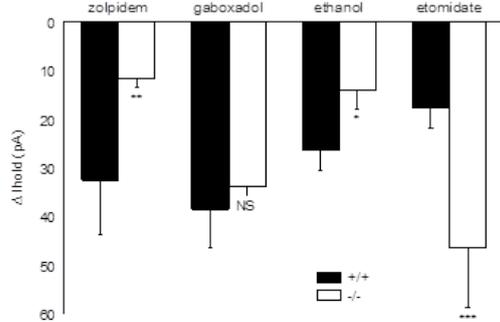


図 6: GABA_A 受容体を介するトニックカレントの薬理的検討

Western blot 法により野生型、KO マウスの扁桃体細胞の mRNA 発現を比較したが、有意な差は見られなかった (図 7)。単一細胞で記録するホールセルパッチクランプ法では薬理的有意差が見られているため、single-cell RT PCR 法による単一細胞での発現を調べる必要がある。

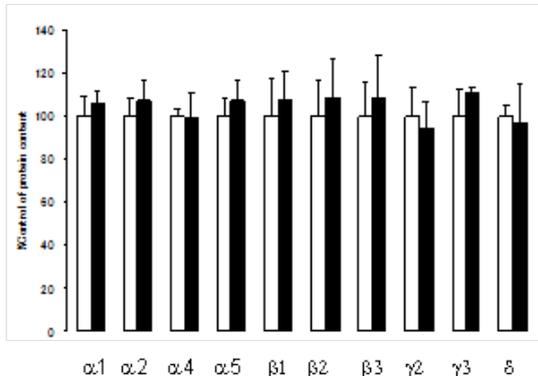


図 7: 細胞膜に発現する GABA_A 受容体サブユニットタンパク

(4) 人工的性周期コントロールマウス作成 雌マウスの性周期を人工的にコントロールするため、卵巣切除マウスを作製した。膣スメアのギムザ染色により観察される性周期は、卵巣切除マウスでは消失していた。術後 2 週間程度置いたマウスにプロゲステロンを投与した。これらのマウスを用いた行動実験を行い現在解析を継続している。さらに、プロゲステロンとエストロゲンを同時投与したマウスも作成した。

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 6 件)

① Zhu G., Yoshida S., Migita K., Yamada J., Ueno S. (7 名中 4 番目) (2011) Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in PRIP-1 KO mice is associated with an epilepsy phenotype. *J Pharmacol Exp Ther.* 340 (3):520-8 (査読有) doi: 10.1124/jpet.111.182386

② Migita K., Tomiyama M., Yamada J., Fukuzawa M., Kanematsu T., Hirata M., Ueno S. (2011) Phenotypes of pain behavior in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 knockout mice. *Molecular pain* 7:79 (査読有) doi:10.1186/1744-8069-7-79

③ Yamada J., Inoue K., Furukawa T., Fukuda A. (2010) A low-concentration tributyltin deteriorates inhibitory synaptogenesis and induces neuronal death in immature but not mature neurons. *Toxicol. Lett.* 198 (2):282-288. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.011>

④ Khirug S., Yamada J. (contributed equally with K. S.), Afzalov R., Voipio J., Khiroug L., Kaila K. (2008) GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J. Neurosci.* 28 (18):4635-39. (査読有) doi: 10.1523/JNEUROSCI.0908-08.2008

[学会発表] (計 23 件)

① Junko Yamada Alteration of tonic GABAergic inhibition of BLA neurons in PRIP1-KO mice. *Hirosaki International Forum 2010 Hirosaki*

② Junko Yamada Pharmacological properties of tonic GABAergic inhibition in the amygdala neurons of PRIP1-KO mice. *Neuroscience 2009*, 2009.10.19. Chicago.

③ Junko Yamada PRIP-1 is involved in GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in basolateral amygdala. *Neuroscience 2008*, 2008.11.16. Washington DC.

[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・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30334965
(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
上野 伸哉 (UENO SHINYA)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00312158