



Title	Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha2 subunit mRNA in the rat brain
Author(s)	佐藤, 康二
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38442
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	佐 藤 康 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 4 8 3 号
学位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 12 月 16 日
学位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha2 subunit mRNA in the rat brain (ラット中枢神経系におけるグリシン受容体α2サブユニット mRNA 発現細胞の分布)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 塩谷弥兵衛 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

グリシンは、中枢神経系において主要な抑制系伝達物質としてよく知られている。その受け皿であるグリシン受容体についても、近年、分子生物学的解析が進んでおり、現在まで、 $\alpha 1$. $\alpha 2$. $\alpha 3$. β サブユニットの塩基配列が明かとなっている。これまでノーザンプロット解析等により、 $\alpha 1$ サブユニット mRNA は成熟動物に強く豊富に発現すること、 $\alpha 2$ サブユニット mRNA は幼若期に特異的に発現すること、 $\alpha 3$ サブユニット mRNA は成熟期にごく弱く発現すること、 β サブユニット mRNA は幼若期より強く発現し成熟期においても豊富な発現がみられることなどが知られている。本研究では、 $\alpha 2$ サブユニット mRNA 含有細胞の分布と $\alpha 1$. β サブユニット mRNA の分布を比較検討することにより、同一ニューロン内で、 $\alpha 2$ サブユニットより $\alpha 1$ サブユニットへのスイッチングが生じている可能性の有無について検討した。

〔方法ならびに成績〕

1. オリゴ cDNA プローブの作成

グリシン受容体 $\alpha 2$ サブユニット mRNA の膜貫通部位3と4の間の塩基配列に相補的な2種のオリゴ cDNA プローブ (48mer) を作成した。また $\alpha 1$. β サブユニット mRNA については同様の部位においてそれぞれ1種のオリゴ cDNA プローブ (48mer) を作成した。プローブの特異性に関しては computer-assisted homology search (Gen Bank) により確認した。

2. 切片の作成

成熟ラットおよび生後7日の wistar 系雄性ラットを麻酔下にて断頭し、直ちに脳を取り出し、ドライアイスにて凍結する。クライオスタッフにて切片を作成し、それをスライドグラスに張り付ける。

3. In situ hybridization 法

切片を室温に戻した後、4% パラホルムにて15分間固定し、4 xSSC バッファーにて洗浄、さらにエタノール系列にて脱水する。プローブを、 α -³⁵SdATP にてラベリングし、ハイブリバッファーに加え切片にかける。湿箱内で

42度にて一晩反応させる。その後、 $1\times$ SSCバッファーにて洗浄し、エタノール系列にて脱水後、暗室内にて乳剤を塗布し、暗箱内で3-4週間オートラジオグラフィーを行う。現像後、対比染色を行い、暗視野及び明視野顕微鏡にて観察を行う。

4. 観察結果

〔成熟動物〕成熟ラットにおいては、 α 2サブユニット mRNA 発現はほとんど見られなかった。それに対し α 1, β サブユニット mRNA は豊富に発現していた。しかし両者の発現パターンは明らかに異なっていた。すなわち、 α 1サブユニット mRNA の発現はおもに下位脳に限局するのに対し、 β サブユニット mRNA は脳全体に豊富に発現していた。

〔幼若動物〕生後7日のラットにおいては、グリシン受容体 α 2サブユニット mRNA の豊富な発現が中枢神経全体に幅広く観察された。三叉神経運動核や、舌下神経核等、成熟ラットにおいて α 1サブユニット mRNA の強い発現の見られる諸核にも α 2サブユニット mRNA の豊富な発現が見られ、これら諸核のニューロンにおいては α 2サブユニットから α 1サブユニットへのスイッチングが行われていることが強く示唆された。しかし、 α 1サブユニット mRNA の発現してこない多くの領域にも α 2サブユニット mRNA の強い発現が見られ、これらの領域では、 α 2サブユニットから未知の成熟型 α サブユニットへのスイッチングが考えられた。また、 α 2サブユニット mRNA の発現は見られないが、 α 1サブユニット mRNA の発現してくる領域もあり、これらの領域では、未知の幼若型 α サブユニットの存在する可能性が考えられた。

〔総括〕

1. ラット中枢神経系におけるグリシン受容体 α 2サブユニット mRNA の発現を *in situ hybridization* 法にて検討し、 α 1, β サブユニット mRNA の分布と比較検討した。
2. α 2サブユニット mRNA は、幼若ラットの中枢神経系において幅広く豊富に発現しており、 α 2サブユニットから α 1サブユニットへのスイッチングが起きている可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット中枢神経系におけるグリシン受容体各サブユニット遺伝子の発現を、*in situ hybridization* 法を用い、発生学的視点も含めて詳細に検討を行ったものである。その結果、 α 1サブユニット mRNA は下位脳に限局する発現を示すが、 β サブユニット mRNA や幼若型の α 2サブユニット mRNA は、中枢神経系全体に広く発現していることを明かとした。このことは、従来下位脳に限局すると考えられてきたグリシン作動系が、発生初期より脳全体で重要な役割を果たしていること、また、成熟期の上位脳においてもグリシン作動系が幅広く働いていることを強く示唆するものである。本研究が中枢神経系における神経伝達機構の解明に大きく寄与したことは疑いのないところであり、学位論文に値するものと認める。