



Title	GABAA receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain.
Author(s)	荒木, 敏之
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38934">https://hdl.handle.net/11094/38934</a>
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、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	荒木敏之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第11239号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	GABA <sub>A</sub> receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. (GABA <sub>A</sub> 受容体各種サブユニットメッセンジャーRNAのラット脳大脳皮質の発達過程における発現の多様性)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌  (副査) 教授 塩谷弥兵衛 教授 三木 直正

## 論文内容の要旨

## 【目的】

中枢神経系における主要な伝達物質であるGABAはその受容体としてGABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>の2つのサブタイプが知られている。GABA<sub>A</sub>受容体に関しては、 $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-4,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ , p1という多様なサブユニットの存在が知られているが、その多様性の意義についてはいまだ明らかではない。我々は中枢神経系におけるGABA<sub>A</sub>受容体各種サブユニットの遺伝子発現の、成熟ラットにおける分布と個体発生における発現の変化をin situハイブリダイゼーション法を用いて細胞レベルにて詳細に検討した。さらに、これらのサブユニットの中でもベンゾジアゼピン等の作用発現上重要とされる $\gamma$ サブユニットに対する抗体を作成し、蛋白レベルでの発現部位をあわせて検討した。

## 【方法】

## 1) in situハイブリダイゼーション組織化学法

GABA<sub>A</sub>受容体の各種サブユニットのうち、 $\alpha$ 1,3,4,  $\beta$ 1,2,3,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2のサブユニットについて、既に明らかになっているcDNA配列の中の想定される膜貫通領域の3番目と4番目の間の、各サブユニット間のホモロジーの最も低い部位に相補的な48塩基のオリゴヌクレオチドプローブをそれぞれ合成した。これらを放射性標識し、150gの成熟ラットの前額断組織切片上にてmRNA分布を検索した。また、個体発生に伴うmRNA発現の変化に関しては、胎生13, 15, 17, 19日のラットを用い、主として大脳皮質において検討した。

## 2) 免疫組織化学法

GABA<sub>A</sub>受容体 $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2サブユニットの、膜貫通領域の3番目と4番目の間の20アミノ酸残基と同じ一次構造を持つペプチドをそれぞれ合成し、BSAにコンジュゲート後家兎に免疫し、抗血清を得た。血清は、抗原ペプチドを用いたアフィニティーカラムによって精製した。ウェスタンプロット法でラット脳の膜分画中より受容体蛋白を同定することにより抗体の特異性の確認を行った後、ラット中枢神経固定標本中での受容体サブユニット蛋白の存在部位を免疫組織化学法により検索した。

## 【結果】

1) ラット中枢神経系におけるGABA<sub>A</sub>受容体各種サブユニットの分布、ならびに個体発生における発現の変化はサブユニット特異的であった。成熟ラットにおける分布を神経核ごとに見ると、ほとんど全てのサブユニットを発現している部位、サブユニットのうち特定のいくつか、もしくは一つのみを発現している部位が存在していた。また、 $\gamma$ 2

サブユニットはその分布がGABAの合成酵素であるGADの分布と類似していた。胎生期においてはサブユニットごとに発現する細胞層が異なり、 $\alpha$ 4,  $\beta$ 1サブユニットのみが大脳皮質の未分化な層に発現を認めた。また、発現を最初に認める時期もサブユニットごとに異なり、 $\beta$ 3,  $\gamma$ 2サブユニットは他のサブユニットの発現の検出できない胎生13日においてすでに発現を認めた。

2) アフィニティー精製した抗GABA<sub>A</sub>受容体 $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2サブユニット抗血清によるウェスタンブロッティングをおこなったところ、それぞれ分子量66kD, 43kDの、単一のバンドを形成する蛋白を検出した。この抗血清を用いて免疫組織化学法によりラット中枢神経系における両蛋白の局在を検索したところ、 $\gamma$ 1サブユニット蛋白は、in situハイブリダイゼーション法により $\gamma$ 1サブユニットmRNAが存在すると考えられた部位に比較して非常に広範な分布を認め、 $\gamma$ 2サブユニットの存在部位と一致する箇所も多く認められた。

### 【結論】

- 1) GABA<sub>A</sub>受容体のそれぞれのサブユニットは発生過程を通して、また成熟動物でもサブユニットごとに独自の発現調節を受けていることが示唆された。
- 2)  $\gamma$ 2サブユニットはGABA性伝達におけるオートレセプターを構成する成分である可能性が示唆された。
- 3) GABA<sub>A</sub>受容体mRNAは、発生段階におけるGABA性神経伝達が起こる以前から認められ、また未分化な細胞層に主として認められるサブユニットも存在することから、発生の初期においてはこれらのサブユニットは栄養因子としてのGABAの作用を伝達する可能性があるものと考えられた。
- 4) ラット脳組織膜分画中で検出されたGABA<sub>A</sub>受容体 $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2サブユニット蛋白の分子量は細胞外領域における糖鎖による修飾などを考慮すると過去の報告に矛盾しない値であった。in situハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法との間には検出感度の相違、蛋白とmRNAの細胞内局在の相違などがあり、両者の結果は必ずしも一致しなかった。

### 論文審査の結果の要旨

近来進歩が著しいGABA<sub>A</sub>受容体の研究において問題となっている、分子種の多様性の意義は、GABA<sub>A</sub>受容体のみならず神経活性物質関連の広い分野で問題となっている極めて重要な課題である。本研究はこの問題に対し、神経機能と不可分の関係にある形態という側面から考察を加え、受容体の多様性の意義に関して重要な新知見を与えており、学位に値するものと考える。