



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	https://hdl.handle.net/11094/38934
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	あら き とし ゆき 荒 木 敏 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 3 9 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 _A receptor subunit messenger RNA _s show differential expression during cortical development in the rat brain. (GABA _A 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_A, GABA_B の 2 つのサブタイプが知られている。GABA_A 受容体に関しては、 $\alpha 1-6$, $\beta 1-4$, $\gamma 1-3$, δ , $\rho 1$ 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_A 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 γ 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_A 受容体の各種サブユニットのうち、 $\alpha 1, 3, 4$, $\beta 1, 2, 3$, $\gamma 1, 2$ 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_A 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。ウェスタンブ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_A 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_A 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_A 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_A 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_A 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

近來進歩が著しい GABA_A 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_A 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する。