

Title	PRIP-1/2ノックアウトマウス大脳皮質バレル野錐体細胞におけるGABA(A)電流の特性
Author(s)	小川, 丈夫
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49259">https://hdl.handle.net/11094/49259</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名 お 小 川 丈 夫

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 9 1 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 0 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

歯学研究科統合機能口腔科学専攻

学 位 論 文 名 PRIP-1/2 ノックアウトマウス大脳皮質バレル野錐体細胞における GABA  
(A) 電流の特性論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 矢 谷 博 文(副査)  
教 授 姜 英 男 准 教 授 舘 村 卓 講 師 本 間 志 保

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 【研究目的】

新規イノシトール 1,4,5-三リン酸結合性蛋白である phospholipase C- $\delta$  1 related catalytically inactive protein-1/2 (PRIP-1/2) は、GABA (A) 受容体分子トラフィックの調節に関与しており、PRIP-1/2 遺伝子をダブルノックアウトしたマウス (DKO マウス) では、膜に発現する GABA (A) 受容体分子のサブユニット構成が野生型マウスと異なっており、また、膜上の受容体分子の総数は、野生型マウスに比して約 30%多いことが知られている。

そこで本研究では、上記の DKO および野生型マウスから、大脳皮質第一次体性感覚野であるバレル野を含む脳スライス標本を作成し、皮質第 II/III 層に存在する錐体細胞からホールセル電位固定下で GABA (A) 受容体電流を記録し、PRIP-1/2 分子の有無が GABA (A) 受容体のチャネル機能においてどのような役割を果たすかについて調べた。

## 【材料と方法】

実験には生後 14~21 日齢の DKO および野生型マウスを用いた。ジエチルエーテル麻酔下にて断頭し、大脳皮質バレル野を含む脳ブロックを摘出して、マイクロスライサーにてバレル野を含む厚さ 300  $\mu$  m の冠状断脳スライス標本を作成した。赤外線微分干渉顕微鏡下にてバレル野 II/III 層の錐体細胞を同定し、同細胞に対してホールセルパッチクランプ形成して、電圧固定下 (0 mV) で膜電流を記録した。電極内液の組成 (mM) は、120 Cs-gluconate、10 HEPES、10 CsCl、11 EGTA または 10 BAPTA、2 MgCl<sub>2</sub>、2 ATP-Na<sub>2</sub>、0.4 GTP-Na<sub>3</sub> とし、KOH で pH を 7.3 に調整したものを使用した。細胞外灌流液には以下の組成 (mM) のものを用いた: 126 NaCl、3 KCl、2 MgSO<sub>4</sub>、1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、26 NaHCO<sub>3</sub>、1 CaCl<sub>2</sub>、10 D-glucose。

初めに、バレル野 II/III 層の錐体細胞における GABA (A) 抑制性シナプスの特性を比較するため、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) 及び近傍の微小電流刺激により誘発される抑制性シナプス後電流 (eIPSC) の記録を行なった。次に、細胞体に存在する GABA (A) 受容体の特性を検討するために、GABA (200  $\mu$  M) のパフ投与 (持続時間 2 秒) に対する応答を記録した。このようにして得られる GABA (A) 受容体電流は通常脱感作を示す。そこで、3~30 秒の時間間隔で GABA の二連パフ投与を行ない、脱感作からの回復過程を調べた。さらに、GABA 取込阻害薬 nipecotnic acid (1 mM) によって GABA (A) 受容体の持続的な脱感作を引き起こした状態で、GABA パフ投与に対

する応答を記録した。GABA (A) 受容体電流の脱感作は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に伴って進行することが報告されているので、細胞内液中の  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤として、EGTA より反応速度が大きい BAPTA を用い、脱感作を起こりにくくした。その上で、細胞外灌流液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1 mM から 2.5 mM に変化させた場合の GABA パフに対する GABA (A) 受容体電流の脱感作を調べ、野生型マウスと DKO マウスとの間に GABA (A) 受容体電流の脱感作機構における  $\text{Ca}^{2+}$  感受性に差異があるか解析した。

#### 【結果】

mIPSC の発生頻度、振幅および立ち上がり時間のいずれにおいても、DKO マウスと野生型マウスの間に有意差は認められなかった ( $p > 0.1$ )。しかしながら、mIPSC の 1/2 持続時間 (half-duration) は、DKO マウスの方が、野生型マウスに比べて有意に小さい値を示した ( $p < 0.05$ )。それにも関わらず、eIPSC では、その逆の大小関係が認められ、その持続時間は DKO マウスの方が、野生型マウスに比べて有意に大きい値を示した ( $p < 0.01$ )。

次に、GABA のパフ投与に対する実験では、DKO マウスの方が、野生型マウスに比べてより強い脱感作を示し、パフ投与中にみられる応答のピークの振幅に対するパフオフセット時の振幅の比は、DKO マウスの方が、野生型マウスに比べて有意に小さかった ( $p < 0.01$ )。DKO マウスでは、パフオフセット直後にハンブ状のテール電流を示す例が多く認められたが、このテール電流の反転電位は  $\text{Cl}^-$  イオンの平衡電位 ( $-54 \text{ mV}$  付近) に等しく、GABA (A) 電流であることが示された。

DKO マウスにおける二連パフ投与の実験では、投与間隔の減少に伴い、第二パフに対する応答そのものは脱感作のため小さくなったが、テール電流は逆に大きくなった。また、GABA 取込阻害薬 nipecotic acid を投与すると、基線電流が DKO マウスおよび野生型マウスでそれぞれ外向きにシフトした。これは、nipecotic acid によって再取込が阻害され、非脱感作成分の持続的活性化により生じていると考えられるので、GABA が受容体周辺に残留している可能性を強く示唆している。従って、同時に、持続的脱感作の存在も示唆することになる。こうした条件下では、DKO マウスにおけるテール電流はより顕著になった。さらに、DKO マウスにおいて、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を 10 mM BAPTA を用いて強くキレートした場合、GABA (A) 電流の脱感作は顕著ではなく、テール電流も観察されなかった。しかしながら、細胞外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1 mM から 2.5 mM に上昇させて、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性に GABA (A) 電流の脱感作を引き起こすと、テール電流が出現し、その増大が認められた。このように、DKO マウスでは、脱感作の進行に伴って、テール電流が顕著になり、脱感作とテール電流の生成機構が関連している可能性が強く示唆された。

#### 【考察ならびに結論】

以上の所見から、PRIP-1/2 DKO マウスでは野生型マウスに比べて GABA (A) 受容体の脱感作が強く、その反作用的なテール電流が DKO マウスにおいてのみ認められた。脱感作の進行に伴ってテール電流も増大したことから、脱感作した GABA (A) 受容体チャネルの一部が、開状態に回帰し得ることが示唆された。また、こうした GABA (A) 受容体の脱感作および再活性化は、何らかの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇機構が働いた結果生じた可能性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

PRIP-1/2 分子は、GABA (A) 受容体の膜発現調節に関わることが知られているが、チャネル機能にどのように関与するか不明である。本研究は、PRIP-1/2 遺伝子をダブルノックアウトしたマウス (DKO マウス) を用いて、大脳皮質第一次体性感覚野のうち、ヒゲの情報処理を行うバレル野の皮質第 II/III 層に存在する錐体細胞から GABA (A) 受容体電流を記録し、PRIP-1/2 分子の機能を調べたものである。

その結果、PRIP-1/2 分子の欠損により GABA (A) 受容体の脱感作が強化されること、また、それに伴い、脱感作した GABA (A) 受容体チャネルが細胞内カルシウム依存性に再活性化されることを初めて明らかにした。本研究は、GABA (A) 受容体チャネルの開閉機構を明らかにする上できわめて重要であり、博士 (歯学) の学位取得に値するものと認める。