



Title	PRIP-1/2ノックアウトマウス三叉神経中脳路核一次感覚ニューロンにおけるGABAA電流の特性
Author(s)	岩田, 淳
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49801">https://hdl.handle.net/11094/49801</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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【9】

氏名	岩田 淳 <sup>いわた じゅん</sup>
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学位記番号	第 22831 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 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三叉神経中脳路核一次感覚ニューロンにおける GABA <sub>A</sub> 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 教授 丹羽 均 講師 加藤 隆史

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

GABA<sub>A</sub> 受容体チャネル分子の膜発現の調節に関与していることが知られている新規イノシトール 1,4,5-三リン酸結合性蛋白 phospholipase C- $\delta$ 1 related catalytically inactive protein-1/2 (PRIP-1/2) の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<sub>A</sub> 受容体チャネル分子のサブユニット構成や分子の総数が野生型マウスと異なっており、海馬錐体細胞では、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 (Mizokami et al. 2007)。

通常、一次感覚ニューロンの細胞体に発現する GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルは、シナプス入力を受けないシナプス外受容体である。しかしながら、脳幹に存在する三叉神経中脳路核 (MTN) 一次感覚ニューロンでは、シナプス入力を受けるシナプス GABA<sub>A</sub> 受容体とそれを受けないシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体が混在している。シナプス外受容体は、シナプス受容体に比べて、膜への固定が弱いとされており、容易に細胞内に取り込まれると考えられている。

そこで本研究では、上記の DKO および野生型マウスを用いて、PRIP-1/2 分子の有無

が、三叉神経中脳路核(MTN)一次感覚ニューロンにおける GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの機能や、シナプス外とシナプスでの発現パターンにどのような影響を与えるかについて、電気生理学的手法を用いて調べた。

#### 【材料および方法】

実験には生後 7~14 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醉下にて断頭し、脳幹ブロックを摘出して、マイクロスライサーにて MTN を含む厚さ 250  $\mu\text{m}$  の冠状断脳幹スライス標本を作成した。赤外線微分干渉顕微鏡下にて MTN ニューロンを同定し、同ニューロンの細胞体においてホールセル電位固定記録を行なった。パッチ電極内液の組成 (mM) は、123 K-gluconate, 18 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Na<sub>2</sub>, 0.3 GTP-Na<sub>3</sub>, 10 HEPES, 0.1 EGTA とし、KOH で pH を 7.4 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： 124 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 D-glucose, 26 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>。

初めに、(1) 記録するニューロンの細胞体から 20~25  $\mu\text{m}$  離れた位置に GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬ムシモールの溶液 (200  $\mu\text{M}$ ) を充填したピペットの先端を置き、気圧式微量注出装置を用いてムシモールをパフ投与 (2 秒間) した際の膜電流応答を保持電位 -70~±0 mV の範囲で記録した。次に、(2) 作動薬への長時間曝露による GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの down-regulation について解析するため、ムシモール灌流投与 (50  $\mu\text{M}$ , 5 分間) の前後における、パフ応答、基線電流および漏洩コンダクタンスの変化を保持電位 -70 mV で観察した。

#### 【結果】

(1) ムシモールのパフ投与によって生じる膜電流の反転電位は Cl<sup>-</sup> の平衡電位に一致した。2 秒間のパフ投与中にみられた脱感作は、DKO マウスの方が野生型に比べ顕著に弱かった。一方、脱活性化の指標であるパフ終端後テール電流の減衰時定数 ( $\tau_{\text{decay}}$ ) は、DKO マウスの方が野生型に比べ有意に小さかった。(2) ムシモール灌流中には、基線電流の内向きシフト、漏洩コンダクタンスの増加と共に、パフ応答のほぼ完全な消失が認められた。その後、灌流したムシモールを 15~20 分間洗浄することにより、基線電流および漏洩コンダクタンスはほぼムシモール灌流前のレベルにまで回復し、パフ応答の反転電位も有意に変化しなかった。しかし、パフ応答の振幅の回復率は、DKO および野生型マウスにおいて、それぞれ約 50% および 30% 程度に止まり、DKO マウスの方が野生型に比べ有意に大きかった。

#### 【考察ならびに結論】

実験結果から、DKO マウスの MTN ニューロンに発現している GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルは、野生型マウスのそれに比べて、脱感作が弱く、脱活性化が速かった。また、作動薬への曝露による down-regulation からの回復の程度が大きいことが明らかとなった。

GABA<sub>A</sub> 受容体の内、 $\alpha 1$ -3 サブユニットを含むものはシナプス部の膜に、 $\alpha 4$ -6 を含む

ものはシナプス外の膜に挿入される傾向があるとされており (Luscher & Keller 2004)、シナプス部の受容体チャネルは、シナプス外のものよりも強固に固定されているとの報告がある (Farrant & Nusser 2005)。両者はチャネル電流のキネティクスに差があることが報告されており (Lagrange et al., 2007)、 $\alpha 1$  を含むシナプス GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルは脱感作が弱く脱活性化が早いのに対し、 $\alpha 4$  を含むシナプス外受容体チャネルはその逆のキネティクスを示す。従って、DKO マウスの MTN ニューロンでは野生型マウスに比べてシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの発現が少ない可能性が高い。また、この可能性は、DKO マウスの MTN ニューロンでは、作動薬曝露による down-regulation からのパフ応答の回復率が大きいことによっても支持される。即ち、down-regulation からの回復率が大きいのは、膜への固定が弱いため、内在化を引き起こし易いシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの発現が、DKO マウスでは、より少なくなっているからであると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究では、PRIP-1/2 分子の有無が三叉神経中脳路核(MTN)一次感覚ニューロンにおける GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの機能や発現パターンにどのような影響を与えるかを明らかにするため、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) および野生型マウスを用いて、電気生理学的手法により検討を行った。

その結果、DKO マウスの MTN ニューロンに発現している GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルは、野生型マウスのそれに比べて、脱感作が弱く、脱活性化が速いこと、また、作動薬への曝露による脱感作様抑圧からの回復の程度が大きいことが示された。

こうした所見は、膜への固定が弱く内在化を引き起こしやすいシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの発現が、DKO マウスの MTN ニューロンでは減少している可能性を示しており、咀嚼運動に重要な役割を果たす MTN ニューロンにおける GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルの発現機構の一端を明らかにしたと考えられる。

よって、本研究は博士 (歯学) の学位取得に値するものと認める。