



Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat olfactory bulb

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 淙 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/281

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 5 1 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	王 淙		
論文題目	Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat olfactory bulb (生直後のラット嗅球における KCC2 発現の差異は投射ニューロンと介在ニューロン間の GABA 応答性の差異を説明する)		

博士(医学) 王 淙

論文題目

Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat olfactory bulb

(生直後のラット嗅球におけるKCC2発現の差異は投射ニューロンと介在ニューロン間のGABA応答性の差異を説明する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

嗅球は生直後においては解剖学的に未成熟であり、神経発生およびシナプス形成は生後に行われることが知られている。また、興味深いことに、この時期の嗅球では重大な生理的変化が起こることが知られている。例えば、生後一週間は、外側嗅索への電気刺激時の顆粒細胞を介した僧帽細胞への抑制は活発であるが、生後2週間後に急激に下がることが報告されている。しかし、この現象の原因はまだ明らかではない。一方、神経細胞のGABAに対する応答性は細胞内のCl⁻濃度と関係がある。細胞内のCl⁻濃度はCl⁻ co-transporter KCC1、KCC2、NKCC1の働きによって調節されている。KCC1、KCC2は細胞中から細胞外へCl⁻を汲み出し、逆に、NKCC1は細胞外から細胞内にCl⁻を取り込むことが報告されている。幼若期の神経細胞ではKCC1、NKCC1は発現しているが、KCC2は発現していないために細胞内のCl⁻濃度が高く、GABAが作用するとCl⁻が流出し、脱分極反応が起こり興奮性に働く。一方、成熟期ではKCC2の発現が増大する結果、細胞内のCl⁻濃度が低下し、GABAが作用するとCl⁻が流入し過分極反応が起こり、抑制性に働く。本研究では、生後嗅球における上述の生理的変化とGABA応答性の変化の関係を調べることを目的とし、嗅球発達に伴う、KCC1、KCC2、NKCC1 mRNA発現の変化、GABA作用の変化を検討し、さらにこれらのメカニズムについて考察を行った。

〔材料ならびに方法〕

1. 生後1、3、7、14、49日齢の雄のWistar ratから脳を取り出し、cryostatで切片を作製した。KCC1、KCC2、NKCC1に特異的な合成oligonucleotide probeを用いて常法により*in situ* hybridizationを行った。
2. Gramicidin穿孔patch-clamp法を用いて、GABA応答を記録した。
3. Ca²⁺感受性蛍光色素のFura-2を用いたCa²⁺イメージングを行い、GABA投与時の細胞内Ca²⁺濃度の解析を行った。

〔結果〕

1. 生後1日齢ではKCC2は僧帽細胞に強く発現していた。顆粒細胞では、生後7日齢になって初めてKCC2の発現が認められた。KCC2の発現は生後14日齢で成熟ラットと同じレベルになった。このことは顆粒細胞のGABAに対する応答がこの時期に変化することを示唆していた。
2. GABAによって誘発される膜電位の変化を測定した結果、生後1日齢と6日齢では顆粒細胞はGABAの投与によって脱分極した。しかし、生後16日齢では顆粒細胞はGABAによって抑制された。生直後からKCC2の発現している僧帽細胞においては、全ての時期でGABAは抑制性に働いていた。
3. 顆粒細胞のGABAに対する応答性をFura-2 systemで調べた結果、生後1日齢と6日齢の顆粒細胞ではGABAを投与すると細胞内のCa²⁺が増加し、GABAが脱分極性に働いていた。ところが、生後14日齢

ではGABAに対する応答は観察されず、GABAは過分極性に働いていた。

〔考察〕

1. 生直後の僧帽細胞ではKCC2の発現が豊富なために細胞内のCl⁻濃度が低下し、GABAに対して抑制性の応答性を示した。一方、顆粒細胞ではKCC2の発現が少ないために細胞内のCl⁻濃度が高く、GABAに対して興奮性の応答を示した。このために介在ニューロンとしての顆粒細胞は投射ニューロンとしての僧帽細胞を抑制すると考えられた。この結果、この時期での僧帽細胞の自発的な活動レートは低いものと考えられた。
2. 嗅球では僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間に重要なシナプスがある。この回路では僧帽細胞は顆粒細胞にグルタミン酸を放出して、顆粒細胞は僧帽細胞にGABAを放出する。すなわち、顆粒細胞は抑制性の樹状突起を介して僧帽細胞の活動をコントロールする。一方、顆粒細胞はGABA_A受容体を持ち、GABA作働性の投射を介して制御されることが知られている。幼若期において顆粒細胞はGABAに対して興奮性を示すため、僧帽細胞への抑制が強まるものと考えられた。
3. 多くの哺乳類では生直後には目と耳は機能していない。したがって、嗅覚は最初に環境からの情報を受ける機能を担うと考えられ、生直後に十分に機能していると思われる。しかし、生直後において僧帽細胞の発生はほぼ完成しているものの、顆粒細胞数はまだ少ない。従って、生直後の嗅球で各々の顆粒細胞は僧帽細胞を強く抑制することが必要であると考えられる。したがって、生直後にGABAに対して顆粒細胞が興奮性に応答することは、生直後の嗅球の正常な機能の維持のために不可欠であると考えられた。

〔結論〕

GABAによって引き起こされる顆粒細胞の一過性の興奮性は、生直後に僧帽細胞への抑制が亢進している原因であると考えられた。また、このような投射ニューロンと介在ニューロンにおけるGABA応答性の差異が生直後のラット嗅球において重要な役割を担うと考えられた。

論文審査の結果の要旨

生直後の嗅球は小脳や海馬と共に未成熟であり、神経発生およびシナプス形成は生後に行われることが知られている。発達初期の嗅球における神経活動の記録から、生後一週間は顆粒細胞を介した僧帽細胞への活発な抑制が認められるが、この抑制は生後2週間後には急激に低下することが報告されている。しかし、こうした幼い時期の著しい生理的变化の神経基盤はまだ明らかにされていない。一方、顆粒細胞の神経伝達物質はGABAであり、それに対する神経細胞の応答は細胞内Cl⁻濃度により左右されること、さらにCl⁻濃度は細胞内から外へCl⁻を汲み出すCl⁻ co-transporter KCC1とKCC2、および細胞外から内にCl⁻を取り込むNKCC1の働きによって調節されることが知られている。また、申請者らのグループによる最近の研究により、幼若期の神経細胞では、細胞内にCl⁻を取り込むKCC2が発現していないために、GABAが作用すると、濃度が高い細胞内から外にCl⁻が流出し、脱分極反応が起こること、一方KCC2の発現が増大する成熟期では、細胞内のCl⁻濃度が低下し、GABAが作用するとCl⁻が流入し過分極反応が起こることが明らかにされている。そこで、申請者らは、上に述べた生理的現象とGABA応答性の関係を調べる目的で、嗅球発達に伴う、KCC1、KCC2、NKCC1 mRNA発現とGABA作用の両変化を生直後から成熟期に至

るまで経時的に観察した。

対象の選定と方法は以下の通りである。

生後 1、3、7、14、49 日齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。エーテル麻酔下で脳を取り出しクリオスタットで厚さ $20\mu\text{m}$ の凍結切片を作成した。ハイブリダイゼーションには KCC1、KCC2、NKCC1 に特異的な合成オリゴヌクレオチドを用いた。また、GABA 応答の記録には Gramicidin 穿孔 patch-clamp 法、GABA 投与時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には Ca^{2+} 感受性蛍光色素の Fura-2 による Ca^{2+} イメージングを用いた。

おもな結果は以下の通りである。

- (1) 僧帽細胞と顆粒細胞の KCC1 と NKCC1 の mRNA は、生後 1 日齢において、成体と同レベルの高い発現を示した。
- (2) 一方、KCC2 の mRNA は生後 1 日齢では僧帽細胞に強く発現していた。生後 7 日齢になって顆粒細胞にも初めて発現した。KCC2 mRNA の発現は生後 14 日齢で成体と同じレベルになった。したがって、GABA に対する顆粒細胞の応答はこの時期に変化することが示唆された。
- (3) GABA によって誘発される顆粒細胞の膜電位は、生後 1 日齢と 6 日齢では脱分極の応答を示した。しかし、生後 16 日齢では過分極を示した。一方、KCC2 が生直後から発現する僧帽細胞においては、全ての日齢で、GABA に対する過分極応答が観察された。
- (4) GABA に対する顆粒細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、生後 1 日齢と 6 日齢では増加し、GABA は興奮性に働いていた。ところが、生後 14 日齢では増加は観察されず、GABA は抑制性に働いていた。

以上のように、生直後の僧帽細胞では豊富に存在する KCC2 により細胞内の Cl^- 濃度が低下し、GABA による抑制性応答が観察され、一方顆粒細胞では KCC2 の発現が少ないために細胞内の Cl^- 濃度が高く、GABA に対する興奮性応答が認められた。このことから、申請者は生直後に僧帽細胞への抑制が亢進する生理的現象は GABA によって引き起こされる顆粒細胞の一過性の興奮が原因となっていると結論している。

審査委員会では、投射ニューロンと介在ニューロンにおける GABA 応答性の差がラット嗅球の発達において重要である可能性を示した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞内 Cl^- 濃度が高いと GABA が興奮性に働くのはどうしてか
- 2) 幼弱ニューロンと成熟ニューロンの静止膜電位は違うか
- 3) KCC2 を発現しないバソプレッシンニューロンの役割は何か
- 4) KCC2 を発現しないグリア細胞での GABA の作用は
- 5) 顆粒細胞を介する僧帽細胞への抑制が 2 週間前後で急速に低下する生理的意義は何か
- 6) KCC1、KCC2、NKCC1 の発現に雌雄差はあるか
- 7) KCC1、KCC2、NKCC1 欠損動物の神経活動はどうなるか
- 8) KCC1、KCC2、NKCC1 が細胞内 Cl^- 濃度を調節するメカニズムについて
- 9) Fura-2 による蛍光反応の大きさはどのようにして求めたか
- 10) 顆粒細胞間のシナプス接続はどのようなものか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	中	原	大	一	郎	
	副査	梅	村	和	夫		副査
							山
							本
							清
							二