



Endogenous taurine facilitates the excitatory neurotransmission in the neocortical marginalzone of neonatal rats

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: 千, 太哲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/286

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 6 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	千 太 哲		
論文題目	Endogenous taurine facilitates the excitatory neurotransmission in the neocortical marginalzone of neonatal rats (内因性タウリンが新生ラット大脳新皮質辺縁帯の興奮性シナプス伝達を促進する)		

博士(医学) 千 太 哲

論文題目

Endogenous taurine facilitates the excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats
(内因性タウリンが新生ラット大脳新皮質辺縁帯の興奮性シナプス伝達を促進する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

発達期の大脳皮質辺縁帯には、発達初期からカハール・レチウス細胞などのニューロンが存在しており、細胞移動や大脳皮質の層構造構築に重要な役割を担っていることが知られている。さらに発達期において辺縁帯に存在するニューロンに対しては、本来抑制性の神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) が興奮性神経伝達物質として機能していることが報告されている。また、カハール・レチウス細胞には抑制性の神経伝達物質であるグリシンの受容体も存在することが近年報告されているが、この発達期の辺縁帯に発現しているグリシン受容体の生理学的機能や内因性アゴニストについては良く分かっていない。さらに、辺縁帯の興奮性神経伝達に対するグルタミン酸受容体の関与についても不明な部分を多く残している。本研究では辺縁帯を含む脳スライス (tangential slice) 標本作製し、辺縁帯に存在するニューロンの興奮伝播や、細胞外に存在する神経伝達物質を指標として、発達期の辺縁帯における興奮性シナプス伝達機構を特にグリシン受容体とそのアゴニストに着目して検討した。

〔材料ならびに方法〕

1. 生後 0 ~ 3 日齢のラット脳を用いて、辺縁帯を含む tangential slice 標本作製した後、膜電位感受性色素 (JPW1114 100 μ M) を用いて染色して、辺縁帯の膜電位変化を可視化した。膜電位変化を超高速高感度カメラ (ニューロ CCD システム) により記録し、電気刺激により誘発される興奮性神経活動伝播の検討を行った。
2. 半透膜プローブを用いる Microdialysis 法により、辺縁帯の細胞外に存在するアミノ酸を 20 分毎に回収し、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) 法を用いて刺激により放出される神経伝達物質や神経修飾物質を同定し、定量した。

〔結果〕

1. 膜電位測定法により誘発性興奮伝播が観察できることを確認した後、 Na^+ チャネルブロッカーである tetrodotoxin (TTX 1 μ M) を灌流した。その結果、電気刺激により惹起される脱分極反応は完全に遮断された。また、無 Ca^{2+} の溶液を灌流すると電気刺激により惹起された脱分極反応は、シナプス前性成分のみが残った。
2. グルタミン酸受容体阻害剤である D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5 50 μ M) と 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX 10 μ M) は、電気刺激により惹起される膜電位変化に影響を及ぼさなかった。
3. GABA_A 受容体阻害剤 bicuculline (50 μ M) や picrotoxin (50 μ M)、グリシン受容体阻害剤である strychnine (50 μ M) の存在下では、惹起された興奮伝播は減弱した。

4. Cl^- を細胞内に取り込む Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体の阻害剤bumetanide ($20\mu\text{M}$)の存在下では、惹起された興奮伝播は減弱した。
5. 電気刺激により細胞外に遊離されるアミノ酸を回収してHPLCにて定量した結果、GABAとタウリンが電気刺激により増加した。一方、グルタミン酸やグリシンなどの神経伝達物質には変化が認められなかった。
6. 細胞外に存在するタウリンは、タウリントランスポーターにより細胞内に Na^+ イオンと同時に取り込まれ脱分極反応をおこす可能性があるが、タウリントランスポーターの抑制剤guanidinoethanesulfonic acid (GES $1\mu\text{M}$)は、電気刺激により惹起される興奮伝播に影響を与えなかった。

〔考察〕

辺縁帯スライスにおいて電気刺激により惹起された興奮伝播は、ナトリウムチャネルを介し、カルシウムの流入による伝達物質の放出に依存していた。従って電気刺激により惹起される脱分極反応はシナプスを介したものであることが確認された。各種阻害剤を用いた投与実験より、辺縁帯における興奮伝播では、グルタミン酸作動性神経細胞ではなくGABA作動性神経細胞が関与していることが確認された。さらに、GABAによる脱分極反応には、 Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体が関与していることが示唆された。 Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体は、 Cl^- を細胞内に取り込む働きを持っており、その働きにより細胞内 Cl^- が比較的高濃度に維持されているため、 Cl^- の平衡電位が静止膜電位よりも脱分極側で維持され、 GABA_A 受容体やグリシン受容体を介する脱分極反応が起こったと考えられる。

辺縁帯の興奮伝播に関与するアミノ酸をHPLC法により解析した結果、電気刺激により細胞外のGABAとタウリンが増加した。興奮伝播はタウリントランスポーターの影響を受けず、strychnineにより抑制されたことから、細胞外に放出されたタウリンは、グリシン受容体の内因性アゴニストとして辺縁帯の興奮伝播を増強して情報伝達に関与していることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

発達期の大脳皮質辺縁帯には、発達初期からカハール・レチウス細胞などのニューロンが存在しており、細胞移動や大脳皮質の層構造構築に重要な役割を担っていることが知られている。さらに発達期において辺縁帯に存在するニューロンに対しては、本来抑制性の神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA)が興奮性神経伝達物質として機能していることが報告されている。また、カハール・レチウス細胞には抑制性の神経伝達物質であるグリシンの受容体も存在することが近年報告されているが、この発達期の辺縁帯に発現しているグリシン受容体の生理学的機能や内因性アゴニストについては良く分かっていない。さらに、辺縁帯の興奮性神経伝達に対するグルタミン酸受容体の関与についても不明な部分を多く残している。本研究において申請者は、辺縁帯を含む脳スライス(tangential slice)標本を作製し、辺縁帯に存在するニューロンの興奮伝播や、細胞外に存在する神経伝達物質を指標として、発達期の辺縁帯における興奮性シナプス伝達機構を特にグリシン受容体とそのアゴニストに着目して研究を行った。

生後0～3日齢のラット脳を用いて、辺縁帯を含むtangential slice標本を作製した後、膜電位感受性色素(JPW1114、 $100\mu\text{M}$)を用いて染色して、辺縁帯の膜電位変化を可視化した。膜電位変化を超高速度カメラ(ニューロCCDシステム)により記録し、電気刺激により誘発される興奮性神経活動伝播の検討を行った。更に、半透膜プローブを用いるMicrodialysis法により、辺縁帯の細胞外に存在するアミノ酸を20

分毎に回収し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いて刺激により放出される神経伝達物質や神経修飾物質を同定し、定量した。

膜電位測定法により誘発性興奮伝播が観察できることを確認した後、 Na^+ チャネルブロッカーである tetrodotoxin ($1\mu\text{M}$) を灌流した。その結果、電気刺激により惹起される脱分極反応は完全に遮断された。また、無 Ca^{2+} の溶液を灌流すると電気刺激により惹起された脱分極反応は、シナプス前性成分のみが残った。グルタミン酸受容体阻害剤である D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid ($50\mu\text{M}$) と 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2, 3-dion ($10\mu\text{M}$) は、電気刺激により惹起される膜電位変化に影響を及ぼさなかった。GABA_A 受容体阻害剤 bicuculline ($50\mu\text{M}$) や picrotoxin ($50\mu\text{M}$)、グリシン受容体阻害剤である strychnine ($50\mu\text{M}$) の存在下では、惹起された興奮伝播は減弱した。 Cl^- を細胞内に取り込む Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体の阻害剤 bumetanide ($20\mu\text{M}$) の存在下では、惹起された興奮伝播は減弱した。

電気刺激により細胞外に遊離されるアミノ酸を回収して HPLC にて定量した結果、GABA とタウリンが電気刺激により増加した。一方、グルタミン酸やグリシンなどの神経伝達物質には変化が認められなかった。細胞外に存在するタウリンは、タウリントランスポーターにより細胞内に Na^+ と同時に取り込まれ脱分極反応をおこす可能性があるが、タウリントランスポーターの抑制剤 guanidinoethanesulfonic acid ($1\mu\text{M}$) は、電気刺激により惹起される興奮伝播に影響を与えなかった。

辺縁帯スライスにおいて電気刺激により惹起された興奮伝播は、ナトリウムチャネルを介し、カルシウムの流入による伝達物質の放出に依存していた。従って電気刺激により惹起される脱分極反応はシナプスを介したものであることが確認された。各種阻害剤を用いた投与実験より、辺縁帯における興奮伝播では、グルタミン酸作動性神経細胞ではなく GABA 作動性神経細胞が関与していることが確認された。さらに、GABA による脱分極反応には、 Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体が関与していることが示唆された。 Na^+ 、 K^+ -2 Cl^- 共輸送体は、 Cl^- を細胞内に取り込む働きを持っており、その働きにより細胞内 Cl^- が比較的高濃度に維持されているため、 Cl^- の平衡電位が静止膜電位よりも脱分極側で維持され、GABA_A 受容体やグリシン受容体を介する脱分極反応が起こったと考えられる。辺縁帯の興奮伝播に関与するアミノ酸を HPLC 法により解析した結果、電気刺激により細胞外の GABA とタウリンが増加した。興奮伝播はタウリントランスポーターの影響を受けず、strychnine により抑制されたことから、細胞外に放出されたタウリンは、グリシン受容体の内因性アゴニストとして辺縁帯の興奮伝播を増強して情報伝達に関与していることが考えられた。

審査委員会では、内因性タウリンが新生ラット大脳新皮質辺縁帯の興奮性シナプス伝達を促進することを世界で始めて明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) Cajal-Retzius細胞について
- 2) tangential sliceについて
- 3) 膜電位感受性色素の浸透性について
- 4) HPLCにおける検出方法について
- 5) タウリンの放出メカニズムについて
- 6) 発達にともなう同現象の変化について
- 7) Cajal-Retzius networkの生理学的意義について

これらの質問の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員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	佐藤康二		
	副査	梅村和夫	副査	山本清二