



## Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by Xenopus oocytes expressing GABA transporter(GAT1)

大澤, 一郎

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1252

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001252>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	おお さわ いち ろう 大澤 一郎	(大阪府)
博士の専攻 分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第881号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成6年3月31日	
学位論文題目	Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by <i>Xenopus</i> oocytes expressing GABA transporter(GAT1) (GABAトランスポーター(GAT1)発現卵母細胞及びシナプトゾームによるGABA取り込みに及ぼすホルボールエ斯特ルの阻害効果)	
審査委員	主査 教授 田中千賀子 教授 春日雅人 教授 西塚泰美	

### 論文内容の要旨

#### 目的

神経系における主要な抑制性神経伝達物質であるGABA(γ-アミノ酪酸)では、細胞外に分解酵素が存在しないため、GABAの再取り込みがGABAシナプス伝達を終結させる第一歩であり、シナプス伝達の効率を調節するという重要な役割を果たしていると考えられる。近年、最初にGABAトランスポーターの一次構造が決定され、これを契機としてノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンなどの複数のトランスポーターのcDNAがクローニングされた。これらのトランスポーターはすべてNa<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>依存性であり、その一次構造から細胞膜を12回貫通する構造を持つと考えられた。またプロテインキナーゼC(PKC)による複数のリン酸化部位が存在し、リン酸化によってトランスポーターの機能が調節を受けている可能性が高いと思われた。

今回、我々は、シナプトゾーム及びGABAトランスポーターを発現させた卵母細胞を用いて、PKCの活性化剤であるホルボールエステルによるGABA取り込みに及ぼすPKCの影響について検討した。

#### 方法

##### (1) シナプトゾームを用いた [<sup>3</sup>H]GABA取り込み実験

雄のウイスター系ラット(約200g)の大脳皮質から、ショ糖密度勾配法によりシナプトゾームを調整した。緩衝液に浮遊させたシナプトゾーム(約0.225mg)に種々の薬物を加え、25°Cの恒温槽中で15分間処置後、種々の濃度(0.2-200μM)の [<sup>3</sup>H]GABAを加え、さらに15分間処置した。試料に0°Cの緩衝液を3ml加え、Whatman GF/Fフィルターディスクに吸着させ、洗浄後、取り込まれた [<sup>3</sup>H]GABA量を測定した。

##### (2) 卵母細胞を用いた [<sup>3</sup>H]GABA取り込み実験

GABAトランスポーター(GAT1)の一番目の膜貫通部位の核酸配列(161-205番目の核酸に相当)を基にして合成したオリゴヌクレオチドをプローブとし、ラット全脳のcDNAライブラ

リーより GAT1 の cDNA を得た。これを Bluescript vector に組み込み mRNA を in vitro で合成した。

アフリカツメガエルより卵母細胞を採取し、10 ng の合成 mRNA をマイロインジェクターで注入した。注入後 2 ~ 4 日後に取り込み実験を行なった。卵母細胞は、種々の薬物を同時に含む ND96 液 (96 mM NaCl、2 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM HEPES、pH 7.5) 中で、25°C、15 分間処置後、種々の濃度 (0.2 ~ 200 μM) の [<sup>3</sup>H]GABA を含む ND96 液中で、25°C、60 分間処置した。反応終了後、各々の卵母細胞内の [<sup>3</sup>H]GABA 量を測定した。

## 結 果

### (1) シナプトゾームによる [<sup>3</sup>H]GABA 取り込みに及ぼす TPA の効果

- (a) 非選択性の GABA 取り込みの阻害剤であるニペコチン酸は、取り込みをほぼ抑制した。ホルボールエステル (TPA, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) は [<sup>3</sup>H]GABA 取り込みを濃度依存的に抑制し、100 nM で最大抑制率 38.1% を示した。この抑制効果は 100 nM のスタウロスボリンで完全に消失した。スタウロスボリン単独では有意な変化は見られなかった。不活性型のホルボールエステルである 4- $\alpha$ -PDD 投与では有意な抑制効果は見られなかった。
- (b) Eadie-Hofstee プロット解析の結果、コントロール群においては、K<sub>m</sub> = 6.76 μM を持つ高親和性の成分が認められた。V<sub>max</sub> は 0.32 nM/min/mg であった。TPA 処置群では、K<sub>m</sub> = 18.5 μM と親和性の低下が認められたが、V<sub>max</sub> に有意な変化は見られなかった。
- (c)  $\beta$ -アラニン存在下では、コントロール群における K<sub>m</sub> 値は 8.62 μM であり TPA 処置により 15.0 μM と親和性は低下した。V<sub>max</sub> は減少傾向を示したが、有意差は見られなかった。

### (2) 卵母細胞による [<sup>3</sup>H]GABA 取り込みに及ぼす TPA の効果

- (a) GAT1 を発現させた卵母細胞による GABA の取り込みは 100 nM TPA 及びジアシルグリセロールのアナログである 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (50 μg/ml) により各々 37.4%、34.2% 抑制された。これらの抑制は 100 nM のスタウロスボリン投与で消失した。スタウロスボリン単独、あるいは 4- $\alpha$ -PDD 投与では有意な変化は見られなかった。
- (b) Eadie-Hofstee プロット解析の結果、コントロール群においては、K<sub>m</sub> = 8.08 μM であったが、TPA 処置により 13.0 μM と親和性の低下を認めた。V<sub>max</sub> に有意な変化は見られなかった。
- (c) Na と H の交換阻害剤、アミロライド存在下でも TPA による抑制効果はほとんど影響を受けなかった。

## 考 察

現在 GABA トランスポーターとしては 4 種類がクローニングされている。その内、GAT1 及び GAT4 が神経細胞に存在すると一般的に考えられているが、今回、シナプトゾームで見られたホルボールエステルによる取り込み制御は、以下のような理由により主として GAT1 を介したものであることが示唆された。第一に、ニペコチン酸投与にて取り込みがほぼ消失したことにより、ニペコチン酸非感受性の GAT2、GAT3 はほとんど含まれていないこと、第二に、コントロール群の K<sub>m</sub> 値 6.76 μM が TPA 処置により 18.5 μM となったのに対し、 $\beta$ -アラニン投与下、つまり  $\beta$ -アラニン感受性の GAT4 活性がほぼ抑制された状態での K<sub>m</sub> 値 8.62 μM が TPA 処置により 15.0 μM となり、ほぼ類似の変化を示し、これらのことよりシナプトゾームにおける GABA 取り込みは主と

してGAT1に由来するものではないかと考えられた。

このことをさらに確認するためにGAT1のクローンを卵母細胞に発現させKm値を求めたところ、 $8.08 \mu M$ となり、 $\beta$ -アラニン投与下でのGAT1に相当すると思われるKm値に近い値が得られた。これをTPA処置したところKm値は $13.0 \mu M$ となり、シナプトゾームで得られた結果に近い親和性の変化が得られた。

シナプトゾーム及びGAT1を発現させた卵母細胞へのGABAの取り込みは、TPAあるいはOAGによって抑制されたが、不活性型の $4\alpha$ -PDD投与では有意な抑制効果は見られず、これらの抑制効果がPKCの阻害剤であるスタウロスボリン投与で消失した事から、取り込み抑制はPKC活性化によるものと考えられた。さらに、Eadie-Hofsteeプロット解析によりこの抑制効果は、シナプトゾーム及び卵母細胞いずれにおいても親和性の低下に基づくものであることが明らかとなった。即ち、抑制効果はトランスポーターのPKCによるリン酸化によりGABA結合部位に何らかの変化が起こり、GABAに対する親和性が低下した事によるものと考えられる。

今回の実験結果から、PKCがGABAの取り込み活性を調節し、その結果としたGABA神経伝達効率を変化させることにより、中枢機能制御に関与している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

GABA（ $\gamma$ -アミノ酪酸）は神経系における主要な抑制性神経伝達物質であり、神経終末あるいはグリア細胞によるシナプス間隙からのGABAの再取り込みが、GABAシナプス伝達の効率を調節する重要な役割を果たしていると考えられている。近年、GABAトランスポーター（GAT1）の一次構造が決定された。GAT1はNa, Cl依存性であり、その一次構造から細胞膜を12回貫通する構造を持つと考えられ、またプロテインキナーゼC（PKC）による複数のリン酸化部位が存在することより、リン酸化によってトランスポーターの機能が調節を受けている可能性が高いと思われた。

今回、申請者は、ラット大脳皮質より調整したシナプトゾーム及びGABAトランスポーター（GAT1）を発現させた卵母細胞を用いてGABA取り込みの特性及びホルボールエステルによるPKC活性化のGABA取り込みに及ぼす影響について検討した。

ホルボールエステル（TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate）はシナプトゾームによる $[^3H]GABA$ 取り込みを最大38.1%抑制し、この抑制効果はスタウロスボリンで完全に消失した。不活性型のホルボールエステル、 $4\alpha$ -PDD投与では有意な抑制効果は見られなかった。Eadie-Hofsteeプロット解析の結果、コントロール群においてはTPA処置により親和性の低下を認めた。また、ニペコチン酸処置にて取り込みはほぼ消失し、 $\beta$ -アラニン存在下では取り込みはわずかに抑制され、そのKm値 $8.62 \mu M$ は最初に報告されたGAT1のKm値とよく一致した。 $\beta$ -アラニン存在下では、TPA処置により $\beta$ -アラニン非存在下同様、Km値は増加し親和性は低下した。また、両群ともVmaxに有意な変化は見られなかった。

これらの結果より、シナプトゾームにおけるGABAの取り込みは、主としてニペコチン酸感受性、 $\beta$ -アラニン非感受性のGAT1を介したものではないかと考えられた。このことを確認するためGAT1のクローンを卵母細胞に発現させ取り込み実験を行なったところ、シナプトゾーム同様、ニペコチン酸感受性、 $\beta$ -アラニン非感受性のGABA取り込みが認められた。TPAあるいはジアシルグリセロールのアナログであるOAGにより取り込みは各々37.4%、34.2%抑制されたが、その

抑制効果はスタウロスボリンで完全に消失した。K<sub>m</sub> 値はT P A処置にて増加し親和性の低下を示したが、V<sub>max</sub> に有意な変化は見られなかった。

以上の結果により、シナプトゾーム及びG A T 1を発現させた卵母細胞へのG A B Aの取り込み抑制はP K Cの活性化に基づくものと考えられ、トランスポーターのリン酸化により、G A B Aに対する親和性が低下するために取り込みが抑制されるという可能性が示唆された。

以上本研究は、G A B Aの取り込み機構について研究したものであり、P K CがG A B Aの再取り込み活性を調節し、その結果としてG A B A神経伝達効率を変化させ中枢機能制御に関与している可能性を示唆したことは重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。