



Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT1, GAT2, GAT3) and their application to immunocytochemistry

池垣, なつ

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1458

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001458>

※ 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)	いけ がき 池 垣 な つ (愛知県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第990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8年3月31日
学位論文題目	Production of specific antibodies against GABA transporter subtypes (GAT 1, GAT 2, GAT 3) and their application to immunocytochemistry (GABAトランスポーターサブタイプ (GAT 1, GAT 2, GAT 3) に対する特異的抗体の作製およびその免疫組織化学的研究への応用)
審査委員	主査 教授 齋 藤 尚 亮 教授 吉 川 潮 教授 山 村 博 平

論文内容の要旨

はじめに

GABAは抑制性神経伝達物質であるが、シナプス間隙にはその分解酵素が存在しないため神経伝達を終了させるためには、GABAをシナプス間隙より除去する必要がある。GABAトランスポーター(以下GAT)は、GABAを能動的に神経終末あるいはグリア細胞に取り込むことにより神経伝達を終了させるという重要な役割を有する膜蛋白質である。

GATの取り込み機構は、 Na^+ 、 Cl^- 依存性であり薬理学的に β -alanine感受性の取り込みと非感受性の2種類の取り込みに分類されてきた。近年、分子クローニングにより、互いに高い相同性を有するが薬理学的に異なる特性を示す複数のGATサブタイプの存在が判明した。しかし各サブタイプが生理学的にどのような役割を果たしているかは明らかにされていない。そこで我々は既知のサブタイプのうちGAT 1, GAT 2, GAT 3の分布および局在について検討するために、それぞれに対する特異抗体を作製した。次にそれら抗体を用いてイムノブロットおよび免疫組織化学による解析を行い、各サブタイプの生体内における機能について検討した。

方法

1) 抗体の作製

各GATサブタイプのC末端側の15個アミノ酸からなるオリゴペプチドを合成し、keyhole limpet hemocyaninと結合させたものを抗原として用いた。次にこの抗原を雌性日本家兎に投与してそれぞれの抗原に対して反応する抗血清を得た。

2) 抗体の精製

牛血清アルブミンと結合させた各オリゴペプチドを、CNBr-activated Sepharose CL-4B (Pharmacia, NJ, USA) に固定化し、これを抗原カラムとして用いた。各抗血清はこの抗原カラムを使用して精製し、抗体の力価はイムノブロットによって決定した。

3) イムノブロット

体重200 g 前後のWistar系雄性ラットの各臓器および各脳部位に氷冷bufferA (0.32M sucrose, 4 mM Tris-Cl, pH7.4, 1 mM EDTA and 0.25mM DTT) を加えてホモゲナイズし1000xg, 15 分間遠沈した後, 上澄をサンプルとして用いた。また上澄の一部を用いて蛋白定量を行った。同じ蛋白量のサンプルを10%SDS-PAGEを用いて電気泳動後, イムノブロットで解析を行った。

4) 免疫組織化学

ラット脳をパラホルムアルデヒドおよびピクリン酸を含む固定液で灌流固定した後, cryostatにて20 μ mの前額断切片を作製した。標本は, GAT 1, GAT 2, GAT 3, の各タイプの抗体を用い, PAP法にて組織染色を行った。

結果

1) イムノブロット

GAT 2 のバンドは, 細く単一で, 分子量は, 84.6kDaであった。一方GAT 1 およびGAT 3 では分子量がそれぞれ67kDa, 71kDaの幅広いバンドを認めた。各バンドは, 吸収試験にて検出されなくなることより抗体の特異性が確認された。GAT 2 は脳, 心臓, 脾臓, 副腎, 腎臓, 肺, 肝臓の各臓器に広く分布していたが, GAT 1, GAT 3 は, 脳に限局して認められた。またGAT 1 は海馬を中心に脳皮質, 線条体, 小脳などに多く, 脳幹には少ない傾向がみられたのに対し, GAT 3 は, 嗅球, 視床, 視床下部, 延髄などに限局しており, 両者の局在には相補的な傾向が認められた。GAT 2 は脳内においても広く均一に分布していた。

2) 免疫組織化学

GAT 2 は脳実質には少なくクモ膜および上皮細胞に強い免疫反応を示した。一方GAT 1, GAT 3 は脳灰白質に分布し, 共に神経細胞体には殆ど認められず, ニューロピルに主に存在し, 神経細胞を取り囲むような構造物として認められた。

考察

イムノブロットにて検出されたラットの各GATサブタイプの分子量は, 糖鎖付加を考慮にいれると先に発表された文献によるものとほぼ一致していることが確認された。またGAT 1 およびGAT 3 のバンドは幅広の特徴的な形態を呈していた。これは, GAT 1 をin vitroにてCHO細胞に発現させ, 電気泳動した際にみられるバンドの形態と類似していることより抗体の交差反応によるものではないと考えられた。このことよりGAT 2 はGAT 1, GAT 3 とは異なった分子学的特性を有する可能性が示唆された。また脳特異的なGAT 1 およびGAT 3 の分布, あるいは各臓器に広く存在するGAT 2 の分布はNorthern blottingによって明らかにされた各サブタイプのmRNAの分布とほぼ一致した。この結果よりGAT 2 はGAT 1, GAT 3 とは異なり, 神経以外の機能にも関与している可能性が考えられた。GAT 2 の脳内の分布はGAT 1, GAT 3 と比較して量的に少なく, さらにその局在はクモ膜および上皮細胞にほぼ限局しているという事実も先の考えを裏づけるものと思われる。またGAT 2 はアミノ酸配列においてbetain transporterと68%と高い相同性を示す。betain transporterが腎臓髄質での浸透圧調整に関与する事実とGAT 2 の脳内の局在からGAT 2 が脳脊髄液と脳実質の間の浸透圧調節の関与している可能性が示唆された。

GAT 1 とGAT 3 の脳内分布が相補的な傾向にあることは特記すべき結果と思われる。すなわち脳内GABA神経の存在部位によって異なったGABAの除去機構が働いている可能性が考えられる。一般にGABAの再取り込み機構は, β -alanineに対する感受性の違いによって神経細胞性とグリア細胞

性のものと分類されることが知られている。GAT1は β -alanine非感受性であることよりシナプス前神経終末に存在すると考えられる。さらに大脳皮質において錐体細胞の周囲を取り囲む形でGAT1陽性の点状構造物がみられるが、この所見は同部におけるGADの免疫反応陽性所見と類似している。このことからGAT1はGABA神経終末に存在する可能性が強く示唆された。一方GAT3の免疫組織化学的局在はGAT3のmRNAの分布とよく一致している。すなわちGAT3の免疫反応はGAT3のmRNAが豊富にみられる深部小脳核において著明である。主に深部小脳核へ投射するプルキンエ細胞には、GAT3のmRNAが認められないことよりGAT3はプルキンエ細胞の神経終末には存在しないと考えられる。さらに深部小脳核における神経細胞の多くはglutamatergicおよびaspartatergicのものであり、GABAnergicのものはまれであることよりGAT3はGABAnergic以外の神経細胞突起あるいはグリア細胞に存在する可能性が考えられた。さらに詳細な検討のために電子顕微鏡を用いた解析が必要であると思われる。

結語

GABAトランスポーターサブタイプであるGAT1, GAT2, GAT3についてそれぞれに特異的な抗体を作製した。それら抗体を用いてイムノブロットおよび免疫組織化学による解析を行い、その分布と局在について検討を加えた。その結果、各サブタイプのGABAトランスポーターが独自の局在部位を有し、異なる機能を分担している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経伝達物質を介する細胞間情報伝達は、シナプス間隙に遊離された神経伝達物質が除去されることにより終了する。その除去のプロセスには主に2つの方法、すなわち能動的な取り込みによる除去、および分解酵素による神経伝達物質の分解による除去が考えられる。GABAは抑制性神経伝達物質であるが、シナプス間隙にはGABA分解酵素（GABAトランスアミナーゼ）が存在しないため、細胞間情報伝達の終了には、GABA取り込み機構が最も重要なプロセスであると考えられ、GABA取り込み機構は重要な神経作用薬のターゲットとなる可能性がある。GABAトランスポーターはGABA取り込み機構を担う膜蛋白であり、分子クローニングにより3ないし4種類のサブタイプの存在が報告されている。一方、GABA取り込み機構には、薬理学的特性の違いからみて、神経終末への取り込みと、グリア細胞への取り込みの2つの経路が存在するという報告がある。しかし各サブタイプが生理的に異なった機能を果たしているのか、もし果たしているとすればどのような機能なのか、という点については現在のところ解明されていない。

本研究者はGABAトランスポーターサブタイプであるGAT1, GAT2, GAT3について各々に特異的な抗体を作成し、臓器分布、および脳内の局在を検討することによりこれらサブタイプの生体内における機能について検討した。その結果、GAT1, GAT3は脳内に限局して発現しており、両者の脳内における分布領域には相補的な傾向が認められることなどから神経機能に關与するサブタイプと考えられた。一方、GAT2は各臓器に広く分布し、脳内における局在も広く均一で、神経機能には關与しないサブタイプである可能性が示唆された。

各GATサブタイプのC末端側の15個アミノ酸からなるオリゴペプチドを合成し、日本家兎に免疫することにより抗血清を得た。抗血清は抗原カラムを用いてaffinity精製し、イムノブロット法で各抗体の特異性を確認した。検出されたバンドはいずれも単一でGAT1が67kDa, GAT2が84.6kDa,

GAT 3が71kDaであり、これらは一次構造から推測される分子量と矛盾しないものであった。GAT 2は脳、心臓、脾臓、副腎、腎臓、肺、肝臓の各臓器に広く分布し、脳内においても広く均一に分布していたが、GAT 1,GAT 3は、脳に局限して認められた。またGAT 1は海馬を中心に大脳皮質、線条体などに多く、脳幹には少ない傾向がみられたのに対し、GAT 3は嗅球、視床、視床下部、延髄などに局限して認められた。免疫組織化学により、GAT 2は脳実質には少なく、クモ膜および上皮細胞に強い免疫反応を示すことが明らかとなった。一方、GAT 1,GAT 3はともに脳灰白質に局在し、神経細胞体には殆ど認められず、ニューロピルに主に存在し、神経細胞を取り囲むような構造物として認められることが判明した。

以上のように本研究者はGABAトランスポーターサブタイプであるGAT 1,GAT 2,GAT 3についてそれぞれに特異的な抗体を作製し、イムノプロット法および免疫組織化学的手法を用いて各サブタイプの臓器分布および脳内局在を明らかにすることによりそれらの生理的機能について検討を加えた。その結果、GAT 1,GAT 3は脳に局限して存在し、脳内分布が相補的な関係にあることより、脳内GABA神経において存在部位によって異なったGABAの除去機構が優位に働いている可能性が示唆された。これに対し、GAT 2は各臓器に広く分布していること、脳実質内には存在しないことなどの点から、神経以外の機能に関与している可能性が示唆された。

本研究はGABAトランスポーターサブタイプであるGAT 1,GAT 2,GAT 3の臓器分布、および脳内局在を解析し検討を加えたものであるが、各サブタイプの生理機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

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。