



## Immunocytochemical localization of three subtypes of GABA transporter in rat retina

本田, 茂

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1467

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001467>

※ 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) ほん だ しげる 本田 茂 (京都府)

博士の専攻 分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第998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 Immunocytochemical localization of three subtypes of GABA transporter in rat retina

(ラット網膜における三種のGABAトランスポーターサブタイプの免疫組織化学的局在)

審査委員 主査 教授 山本 節

教授 岡田安弘 教授 齋藤尚亮

### 論文内容の要旨

#### (緒言)

GABAは中枢神経の重要な神経伝達物質の一つであるが、その伝達の終了過程にはナトリウムイオン、塩素イオン依存性のGABA取り込み機構が関与していることが知られている。GABAシナプス伝達は、シナプス間隙のGABAがGABAトランスポーターによって神経終末あるいは隣接するグリア細胞に取り込まれることによって終了する。現在、GABAトランスポーターには少なくとも三つのサブタイプが存在することが報告され、これらは薬理学的にも異なる性質を持つことが示されている。

網膜においてもGABAやその合成酵素のGADは免疫組織学的にアマクリン細胞の神経終末及び細胞体に存在することが証明されている。またアマクリン細胞、ミューラー細胞や培養網膜色素上皮細胞による<sup>3</sup>H-GABAの取り込みも報告されている。その他一連の研究によってもGABAが網膜において最も重要な神経伝達物質の一つであることが証明されているが、網膜におけるGABA神経伝達の終了過程に関する報告は少なく、各GABAトランスポーターサブタイプがどの細胞に分布しているかを明らかにすることは網膜におけるGABA神経伝達機構の解明に必要であると思われる。

我々は、免疫組織化学染色によって各GABAトランスポーターサブタイプの網膜内分布を検討した。

#### (方法)

##### 1, 抗体の作成

GAT 1, GAT 2, GAT 3 のC末端の15アミノ酸からなるオリゴペプチドをkeyhole limpet hemocyaninに結合させたものを抗原としてウサギに免疫を行ない、特異的ポリクローナル抗体を作成した。各抗体はアフィニティクロマトグラフィーにて精製した。

##### 2, ウエスタンプロット解析

ラット眼球を赤道部で半割し、それぞれをホモゲナイズ後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

を行ない、PVDFフィルターに転写後、各GAT抗体と反応させた。

### 3. 免疫組織化学染色

ラット網膜を灌流固定した後、 $20\text{ }\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、各GAT抗体を用いて免疫染色を行なった。プレパラートの観察には蛍光顕微鏡に加え、共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

#### (結果・考察)

ウエスタンブロット解析では、眼内にはGAT 1, GAT 2, GAT 3全てのサブタイプが存在し、その分子量は脳内のものとほぼ同じであった。これにより、網膜においてもこれらの抗体は各サブタイプを特異的に認識することが確認された。また、GAT 1, GAT 3は眼球後部にのみ、つまり主に網膜に存在するが、GAT 2は他のサブタイプと異なり、眼球前部にも存在することが明かとなった。

蛍光顕微鏡による網膜の観察では、GAT 1の免疫反応は内網状層に強く認められ、また内顆粒層近位部には細胞を取り囲むような免疫反応を認めた。内網状層のGAT 1免疫反応は更に3から4の層状構造を示した。これに対し、GAT 2の免疫反応は網膜色素上皮層に最も強く認められ、また神経線維層にも認められた。更に内網状層には垂直に延びる淡い線状の蛍光が見られた。GAT 3の免疫反応は内境界膜と外境界膜で区切られた網膜全般に渡って認められたが、内網状層の近位部、外網状層に比較的強い免疫反応を認め、内顆粒層の遠位部では細胞を取り囲むような免疫反応が見られた。外顆粒層のGAT 3免疫反応は垂直に延びる線状蛍光として認められた。

毛様体ではGAT 2のみが上皮細胞における免疫反応を示し、GAT 1, GAT 3の免疫反応は認めなかった。毛様体色素上皮細胞は網膜色素上皮細胞と同様、神経組織ではなく水やイオンの輸送に関係していると考えられている。つまり眼内ではGAT 2が神経伝達以外の働きに関与していることが考えられた。

さらに詳細な局在を調べるために共焦点レーザー顕微鏡による観察を行なった結果、内顆粒層のGAT 1免疫反応は近位部に存在する細胞の周囲を囲む点状の蛍光を示すことが示された。同様に内網状層のGAT 1免疫反応も細かい点状蛍光の集まりであることが明らかになった。蛍光顕微鏡で内網状層に認められたGAT 1免疫反応が示した層構造が、GABA作動性アマクリン細胞の突起が形成する層構造に形態的に非常に相似していることからGAT 1はGABA作動性アマクリン細胞の突起に存在しているものと考えられた。また、脳神経細胞においてGAT 1が神経終末に存在していることから、内顆粒層に見られた点状蛍光は囲まれた細胞にシナプスを形成しているGABA作動性アマクリン細胞突起の終末であると考えられた。アマクリン細胞にはmuscimolの取り込みなど神経性のGABA取り込みが認められており、これはGAT 1の薬理学的性質に一致する。

神経線維層に認められたGAT 2の免疫反応は共焦点レーザー顕微鏡ではいくつもの線維束に分かれている事が示された。これより、GAT 2は神経節細胞の軸索に存在すると考えられた。神経節細胞には免疫組織化学染色によってGABAの免疫反応が証明されているが、現在のところGABA産生細胞である直接的な証拠はないため、この細胞に存在するGABAはGAT 2によって取り込まれたものである可能性も考えられる。

また、内網状層に認められた垂直の淡い線状蛍光は水平方向にいくつもの枝を有しており、その形態はミューラー細胞の構造の一部に一致すると考えられた。ミューラー細胞は網膜に存在する主なグリア細胞であり、その細胞体は内顆粒層に位置する。そこから網膜の外側、内側に向かって垂直に大きな突起を延ばしておりその末端は内、外境界膜を形成している。また、内網状層、外網状層ではそれぞれ突起から水平に延びる枝を有している。内網状層のGAT 2免疫反応はこのミューラー細胞の

突起と枝に分布しているものと考えられた。

GAT 3 の免疫反応は蛍光顕微鏡によっても外顆粒層から神経線維層まで連続する傾向を示したが、共焦点レーザー顕微鏡を用いて連続写真を作成することにより、内網状層から外顆粒層まで明らかに連続したGAT 3 の免疫反応が証明された。この分布はミューラー細胞の形態と非常に良く一致していた。ミューラー細胞へのGABA取り込みは $\beta$ -alanineで抑制されることが知られており、これはGAT 3 の性質と良く一致している。

以上よりラット網膜においてGABAトランスポーターサブタイプは異なる細胞に分布しており、神経伝達機構に関与していると共にGAT 2 に関しては神経伝達以外の働きにも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

### [審査の要旨]

GABAは中枢神経の重要な神経伝達物質の一つであるが、その伝達の終了過程にはGABA取り込み機構（トランスポーター）が関与していることが知られている。現在、GABAトランスポーターには少なくとも三つのサブタイプが存在することが報告され、これらは薬理学的にも異なる性質を持つことが示されている。

網膜においても一連の研究によってGABAが最も重要な神経伝達物質の一つであることが証明されているが、網膜におけるGABA神経伝達の終了過程に関する報告は少なく、各GABAトランスポーターサブタイプがどの細胞に分布しているかを明らかにすることは網膜におけるGABA神経伝達機構の解明に必要であると思われる。本研究者は、免疫組織化学染色によって各GABAトランスポーターサブタイプの網膜内分布を検討し、各々の細胞別局在を明らかにした。

### [方法]

1. 抗体の作成：GAT 1, GAT 2, GAT 3 のC末端の15アミノ酸からなるオリゴペプチドを抗原として特異的ポリクローナル抗体を作成した。
2. ウエスタンプロット解析：ラット眼球をホモゲナイズ後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、各GAT抗体と反応させた。

3. 免疫組織化学染色：ラット眼を灌流固定した後、 $20\text{ }\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、各GAT抗体を用いて免疫染色を行なった。プレパラートの観察には蛍光顕微鏡に加え、共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

### [結果]

ウエスタンプロット解析では、眼内にはGAT 1, GAT 2, GAT 3 全てのサブタイプが存在し、それぞれの抗体は各サブタイプを特異的に認識することが確認された。蛍光顕微鏡による網膜の観察では、GAT 1 の免疫反応は内網状層に強く認められ、3から4の層構造を示した。また内顆粒層近位部には細胞体を取り囲むような免疫反応を認めたが、これは共焦点レーザー顕微鏡によって点状蛍光のあつまりであることが分かった。内網状層でGAT 1 免疫反応が示した層構造が、GABA作動性アマクリン細胞の突起が形成する層構造に形態的に非常に相似していることからGAT 1 はGABA作動性アマクリン細胞の突起に存在しているものと考えられた。GAT 2 の免疫反応は網膜色素上皮層に最も強く認められ、また神経線維層にも認められた。これは共焦点レーザー顕微鏡ではいくつもの線維束に分かれている事が示され、GAT 2 は神経節細胞の軸索にも存在すると考えられた。更に内網

状層には垂直に延びる淡い線状の蛍光が見られたが、共焦点レーザー顕微鏡によってこの蛍光は水平方向にいくつもの枝を有していることが明らかとなり、その形態はミューラー細胞の構造の一部に一致することから内網状層のGAT 2免疫反応はこのミューラー細胞の突起と枝に分布しているものと考えられた。また、GAT 2免疫反応は毛様体上皮細胞にも認められた。GAT 3の免疫反応は内境界膜と外境界膜で区切られた網膜全般に渡って認められたが、内網状層の近位部、外網状層に比較的強い免疫反応を認めた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて連続写真を作成することにより、内網状層から外顆粒層まで明らかに連続したGAT 3の免疫反応が証明された。この分布はミューラー細胞の形態と非常に良く一致していた。以上よりラット網膜内においてGABAトランスポーターサブタイプは異なる細胞に分布しており、神経伝達機構に関与していると共にGAT 2に関しては神経伝達以外の働きにも関与している可能性が示唆された。

#### [結論]

GABAは網膜における最も重要な神経伝達物質の一つとして様々な視覚動態に深く関わっていると考えられている。しかしながら、網膜におけるGABA神経伝達の終了過程に関しては未だ不明の点が多い。本研究は各種GABAトランスポーターサブタイプに対する特異的抗体を用いて網膜における各々の局在を初めて明らかにしたものであり、今後網膜におけるGABA伝達終了過程の解明およびGABA伝達の異常によって起こる様々な病態の解明に役立つ重要な知見を得たものとして価値ある研究と認める。よって、本研究者は博士（医学）として学位を得る資格があると認める。