



GABA-Activated Conductance in Cultured Rat Inferior Colliculus Neurons

細見, 英信

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1642

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001642>

※ 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）	ほそ 見 英 信 （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1097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9年3月31日
学位論文題目	GABA-Activated Conductance in Cultured Rat Inferior Colliculus Neurons （ラット培養脳下丘神経細胞におけるGABA応答）
審査委員	主査 教授 天津 睦郎 教授 岡田 安弘 教授 岡村 均

論文内容の要旨

緒言

脳下丘は聴覚伝導路の主要な中継核で、聴覚入力調節、認知、相互作用に深く関わっている。下丘神経細胞は音の強さ、周波数、左右差、持続時間に特異的に反応する。下丘は興奮性入力、抑制性入力をともに受けており、特に下丘中心核への抑制性入力投射の存在することが報告されている。下丘には γ -アミノ酪酸（GABA）が比較的高濃度に存在し、GABA性神経終末、GABA_A受容体の存在することが報告されており、GABAは下丘における抑制性機構において重要な役割を果たすと考えられている。下丘神経細胞の詳細な電気生理学的解析に関する報告はされていないが、本研究において我々はラット中脳下丘中心核より神経細胞の初代培養を確立し、ホールセルパッチクランプ法および蛍光色素fura-2を用いた細胞内Ca²⁺濃度測定法を用いて下丘培養神経細胞におけるGABA受容体の特性を調べた。

方法

新生児ラット中脳下丘より中心核を取り出し、0.25%トリプシン、0.01mg/ml DNaseにて、37℃で10分間処理後、組織を機械的に分離し、ダルベッコ変法イーグル培地で培養した。培養後1-2週間の神経細胞を実験に用いた。

パッチクランプ法を用いて、全細胞膜電流を記録した。一部の実験では、ナイスタチン穿孔パッチ法を行った。圧負荷によりピペット先端からGABAを培養神経細胞に投与した。パッチクランプ用アンプはEPC-9（ドイツHEKA社）を用い、データの記録、分析にはPulse/PulseFitシステム（HEKA社）とマッキントッシュコンピュータを用いた。

蛍光色素fura-2を負荷して、細胞内Ca²⁺濃度を記録した。下丘神経細胞にfura-2-AM体を取り込ませ、回析格子分光器CAM230（浜松ホトニクス）を用いて、340nm、380nmの励起光による蛍光信号を記録した。

結果

GABAにより活性化される電流

100 μ M GABAを投与すると、保持電位-65mVにおいて一過性内向き電流が惹起された。保持電位-65mVにおけるコンダクタンス-濃度曲線が得られた。EC₅₀は49 μ Mと考えられた。1 mM濃度のGABAで最大コンダクタンスが得られた。

培養下丘神経細胞GABA受容体サブタイプ

GABA_A受容体アンタゴニストであるbicuculline (20 μ M) 存在下では、GABA投与により電流は惹起されなかった。また、bicucullineが存在しなければ、GABA_A受容体アゴニストであるmuscimol (100 μ M) 投与により、GABA投与時と同様の一過性内向き電流が記録された。保持電位-65mVにおいて、GABA, muscimol 投与によるコンダクタンスが得られ、それぞれ1000 $\pm$ 118, 1648 $\pm$ 173 (SE) S/Fであった。次に、下丘神経細胞にナスタチン穿孔パッチ法を行い、保持電位-65mVから1秒毎に+15mV、1秒間の脱分極刺激を加えた。保持電流、脱分極刺激によるK⁺コンダクタンスともにGABA_B受容体アゴニストであるbaclofen (100 μ M) 投与により影響を受けなかった。

GABAによる活性化電流のイオン機構

異なった保持電位 (-80mVから+80mV) でのGABA活性化電流をプロットし、GABA活性化電流の電流密度と電圧の関係を求めた。細胞外液と内液のCl⁻濃度が等しい場合には逆転電位は-4.4mVで、これはCl⁻の平衡電位 (-0.8mV) に近似していた。

細胞内液中のCl⁻の75%を膜不透過性陰イオンであるgluconateで置換した場合、GABAによる活性化電流の逆転電位は-33.8mVであり、この条件でのCl⁻の平衡電位-36.4mVとほぼ近似していた。以上のことから、培養下丘神経細胞におけるGABAによる活性化電流はCl⁻イオン特異的であり、これはGABA_A受容体チャネルを介することが示唆される。

細胞内Ca²⁺濃度に対するGABAの効果

中枢神経細胞において、GABA受容体の活性化によって細胞内Ca²⁺濃度が上昇することが報告されている。この現象は細胞外からのCa²⁺流入、細胞内ストアからの放出、あるいはその両者によって引き起こされる可能性が示されている。培養下丘神経細胞においてGABA受容体が細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き起こすかどうかを調べるため、fura-2を用いた細胞内Ca²⁺濃度測定を行った。細胞外液のCa²⁺存在下 (2.4mM) において、1.0mM GABA投与により細胞内Ca²⁺濃度は上昇しなかった。一方、150mM KCl投与による脱分極により、細胞内Ca²⁺濃度は上昇した。細胞外にCa²⁺が存在しない場合、1.0mM GABA, 150mM KClいずれを投与しても細胞内Ca²⁺濃度の上昇は認めなかった。

考察

ラット培養下丘神経細胞において、GABA投与により膜電流が活性化された。GABA_A受容体アンタゴニストbicuculline存在下ではGABAによる膜電流は活性化されなかった。またGABA_A受容体アゴニストmuscimolは同様の膜電流を引き起こした。GABA活性化電流は内液と外液のCl⁻濃度が等しい時には0 mV付近で逆転し、さらに内液のCl⁻をgluconateで置換すると、理論的に導かれたCl⁻の平衡電位付近へ移動した。これらの結果からGABAは主としてGABA_A受容体チャネルを介して膜コンダクタンスを活性化したことが示された。最近bicucullineにもbaclofenにも感受性のないGABA_C受容体が視蓋、網膜の神経細胞にて報告されているが、培養下丘神経細胞においてはbicucullineがGABAにより惹起される電流を完全に阻害しており、GABA_C受容体の関与は存在しないと考

えられる。

GABA_B受容体の活性化により、K⁺コンダクタンスが上昇する、あるいは電位依存性Ca²⁺コンダクタンスが抑制されることが知られているが、ラット培養下丘神経細胞においては、baclofenを投与してもK⁺、Ca²⁺コンダクタンスには影響を与えなかったことから、GABAはGABA_B受容体を通じては有意に膜コンダクタンスに影響を与えないことが示唆された。これまでに、免疫組織化学的研究により、今回培養のために神経細胞を採取した1日齢ラット下丘においてはGABA_B受容体の存在は報告されている。従って、この実験での神経細胞培養条件においてGABA_B受容体のみ発現が減った可能性があり、GABA_B受容体の発現にはGABA_A受容体の発現とは異なる何らかの発現因子が存在する可能性も考えられる。

ラット培養下丘神経細胞において、細胞外に高濃度K⁺溶液(150mM)を投与すると、細胞外Ca²⁺存在時にのみ細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。これは脱分極により電位依存性Ca²⁺チャネルが活性化され、Ca²⁺透過性が増したことを示唆している。一方、GABA投与によっては細胞外のCa²⁺の有無にかかわらず細胞内Ca²⁺濃度は上昇しなかった。従ってGABAは培養下丘神経細胞を過分極させるか、あるいは脱分極しても電位依存性Ca²⁺チャネルを活性化する程には脱分極しなかったこと、また細胞内ストアからのCa²⁺放出は起こさなかったことが示唆された。新生児下垂体細胞、胎生脊髄神経細胞、乳腺細胞ではGABA_A受容体の活性化により細胞内Ca²⁺濃度が上昇したという報告があり、また新生児海馬神経細胞、下垂体神経終末、海馬錐体細胞樹状突起では、GABAがGABA_A受容体を介して脱分極を起こしたという報告もある。GABAがGABA_A受容体チャネルを通じて単一神経細胞を脱分極させるか過分極させるかは、細胞膜内外のCl⁻の濃度勾配に依存している。脳下丘においてはGABAの抑制性効果が報告されており、GABAが電位依存性Ca²⁺コンダクタンスを活性化しない程度に細胞を脱分極させる可能性も否定はできないが、培養下丘神経細胞ではGABAは脱分極よりむしろ過分極させる可能性が示唆される。

下丘は聴覚性痙攣発作に関わりの深い部位である。下丘におけるGABA作動性システムが聴覚性痙攣発作の誘発開始に関係しているという報告がある。GABAを下丘に微量注入すると聴覚性痙攣発作が抑制された。bicucullineで正常ラット下丘のGABA_A受容体の活性化を阻害すると、聴覚性痙攣発作感受性が出現した。また、遺伝的に聴覚性痙攣発作感受性のラットにおいては、GABAを介する抑制が減少していることが報告されている。下丘において、GABAによる抑制機構が聴覚性痙攣発作感受性を調節していると思われる。

今回の結果は、GABAがラット下丘中心核培養細胞においてGABA_A受容体を介して膜を過分極させていることを示しており、聴覚の伝導路の中での重要な調節機構にGABAが関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

緒言

脳下丘は聴覚伝導路の主要な中継核で、聴覚入力調節、認知、相互作用に深く関わっている。下丘神経細胞は音の強さ、周波数、左右差、持続時間に特異的に反応する。下丘は興奮性入力、抑制性入力をともに受けており、特に下丘中心核への抑制性入力投射の存在することが報告されている。下丘にはγ-アミノ酪酸(GABA)が比較的高濃度に存在し、GABA性神経終末、GABA_A受容体の存在することが報告されており、GABAは下丘における抑制性機構において重要な役割を果たすと考

えられている。下丘神経細胞の詳細な電気生理学的解析に関する報告はされていないが、本研究において我々はラット中脳下丘中心核より神経細胞の初代培養を確立し、ホールセルパッチクランプ法および蛍光色素fura-2を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法を用いて下丘培養神経細胞におけるGABA受容体の特性を調べた。

方法

新生児ラット中脳下丘より中心核を取り出し、0.25%トリプシン、0.01mg/ml DNaseにて、37°Cで10分間処理後、組織を機械的に分離し、ダルベッコ変法イーグル培地で培養した。培養後1-2週間の神経細胞を実験に用いた。

パッチクランプ法を用いて、全細胞膜電流を記録した。一部の実験では、ナイスタチン穿孔パッチ法を行った。圧負荷によりピペット先端からGABAを培養神経細胞に投与した。パッチクランプ用アンプはEPC-9（ドイツHEKA社）を用い、データの記録、分析にはPulse/PulseFitシステム（HEKA社）とマッキントッシュコンピュータを用いた。

蛍光色素fura-2を負荷して、細胞内 Ca^{2+} 濃度を記録した。下丘神経細胞にfura-2-AM体を取り込ませ、回析格子分光器CAM230（浜松ホトニクス）を用いて、340nm、380nmの励起光による蛍光信号を記録した。

結果

GABAにより活性化される電流

100 μM GABAを投与すると、保持電位-65mVにおいて一過性内向き電流が惹起された。保持電位-65mVにおけるコンダクタンス-濃度曲線が得られた。 EC_{50} は49 μM と考えられた。1 mM濃度のGABAで最大コンダクタンスが得られた。

培養下丘神経細胞GABA受容体サブタイプ

GABA_A受容体アンタゴニストであるbicuculline (20 μM) 存在下では、GABA投与により電流は惹起されなかった。また、bicucullineが存在しなければ、GABA_A受容体アゴニストであるmuscimol (100 μM) 投与により、GABA投与時と同様の一過性内向き電流が記録された。保持電位-65mVにおいて、GABA、muscimol投与によるコンダクタンスが得られ、それぞれ 1000 ± 118 , 1648 ± 173 (SE) S/Fであった。次に、下丘神経細胞にナイスタチン穿孔パッチ法を行い、保持電位-65mVから1秒毎に+15mV、1秒間の脱分極刺激を加えた。保持電流、脱分極刺激による K^{+} コンダクタンスともにGABA_B受容体アゴニストであるbaclofen (100 μM) 投与により影響を受けなかった。

GABAによる活性化電流のイオン機構

異なった保持電位 (-80mVから+80mV) でのGABA活性化電流をプロットし、GABA活性化電流の電流密度と電圧の関係を求めた。細胞外液と内液の Cl^{-} 濃度が等しい場合には逆転電位は-4.4mVで、これは Cl^{-} の平衡電位 (-0.8mV) に近似していた。

細胞内液中の Cl^{-} の75%を膜不透過性陰イオンであるgluconateで置換した場合、GABAによる活性化電流の逆転電位は-33.8mVであり、この条件での Cl^{-} の平衡電位-36.4mVとほぼ近似していた。以上のことから、培養下丘神経細胞におけるGABAによる活性化電流は Cl^{-} イオン特異的であり、これはGABA_A受容体チャンネルを介することが示唆される。

細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するGABAの効果

中枢神経細胞において、GABA受容体の活性化によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されている。この現象は細胞外からの Ca^{2+} 流入、細胞内ストアからの放出、あるいはその両者によって引き起こされる可能性が示されている。培養下丘神経細胞においてGABA受容体が細胞内 Ca^{2+} 濃

度上昇を引き起こすかどうかを調べるため、fura-2を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行った。細胞外液の Ca^{2+} 存在下(2.4mM)において、1.0mM GABA投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇しなかった。一方、150mM KCl投与による脱分極により、細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。細胞外に Ca^{2+} が存在しない場合、1.0mM GABA、150mM KClいずれを投与しても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認めなかった。

考察

ラット培養下丘神経細胞において、GABA投与により膜電流が活性化された。GABA_A受容体アンタゴニストbicuculline存在下ではGABAによる膜電流は活性化されなかった。またGABA_A受容体アゴニストmuscimolは同様の膜電流を引き起こした。GABA活性化電流は内液と外液の Cl^- 濃度が等しい時には0 mV付近で逆転し、さらに内液の Cl^- をgluconateで置換すると、理論的に導かれた Cl^- の平衡電位付近へ移動した。これらの結果からGABAは主としてGABA_A受容体チャンネルを介して膜コンダクタンスを活性化したことが示された。最近bicucullineにもbaclofenにも感受性のないGABA_C受容体が視蓋、網膜の神経細胞にて報告されているが、培養下丘神経細胞においてはbicucullineがGABAにより惹起される電流を完全に阻害しており、GABA_C受容体の関与は存在しないと考えられる。

GABA_B受容体の活性化により、 K^+ コンダクタンスが上昇する、あるいは電位依存性 Ca^{2+} コンダクタンスが抑制されることが知られているが、ラット培養下丘神経細胞においては、baclofenを投与しても K^+ 、 Ca^{2+} コンダクタンスには影響を与えなかったことから、GABAはGABA_B受容体を通じては有意に膜コンダクタンスに影響を与えないことが示唆された。これまでに、免疫組織化学的研究により、今回培養のために神経細胞を採取した1日齢ラット下丘においてはGABA_B受容体の存在は報告されている。従って、この実験での神経細胞培養条件においてGABA_B受容体のみ発現が減った可能性があり、GABA_B受容体の発現にはGABA_A受容体の発現とは異なる何らかの発現因子が存在する可能性も考えられる。

ラット培養下丘神経細胞において、細胞外に高濃度 K^+ 溶液(150mM)を投与すると、細胞外 Ca^{2+} 存在時にのみ細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。これは脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化され、 Ca^{2+} 透過性が増したことを示唆している。一方、GABA投与によっては細胞外の Ca^{2+} の有無にかかわらず細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇しなかった。従ってGABAは培養下丘神経細胞を過分極させるか、あるいは脱分極しても電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを活性化する程には脱分極しなかったこと、また細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出は起こさなかったことが示唆された。新生児下垂体細胞、胎生脊髄神経細胞、乳腺細胞ではGABA_A受容体の活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したという報告があり、また新生児海馬神経細胞、下垂体神経終末、海馬錐体細胞樹状突起では、GABAがGABA_A受容体を介して脱分極を起こしたという報告もある。GABAがGABA_A受容体チャンネルを通じて単一神経細胞を脱分極させるか過分極させるかは、細胞膜内外の Cl^- の濃度勾配に依存している。脳下丘においてはGABAの抑制性効果が報告されており、GABAが電位依存性 Ca^{2+} コンダクタンスを活性化しない程度に細胞を脱分極させる可能性も否定はできないが、培養下丘神経細胞ではGABAは脱分極よりむしろ過分極させる可能性が示唆される。

下丘は聴覚性痙攣発作に関わりの深い部位である。下丘におけるGABA作動性システムが聴覚性痙攣発作の誘発開始に関係しているという報告がある。GABAを下丘に微量注入すると聴覚性痙攣発作が抑制された。bicucullineで正常ラット下丘のGABA_A受容体の活性化を阻害すると、聴覚性痙攣発作感受性が出現した。また、遺伝的に聴覚性痙攣発作感受性のラットにおいては、GABAを介

する抑制が減少していることが報告されている。下丘において、GABAによる抑制機構が聴覚性痙攣発作感受性を調節していると思われる。

今回の結果は、GABAがラット下丘中心核培養細胞においてGABA_A受容体を介して膜を過分極させていることを示しており、聴覚の伝導路の中での重要な調節機構にGABAが関与していることが明らかとなった。

以上本研究は、聴覚伝導路の主要な中継核である脳下丘につき、ラット下丘中心核より神経細胞の初代培養を確立したのち、ホールセルパッチクランプ法および蛍光色素fura-2を用いた細胞内Ca²⁺濃度測定法を用いて下丘培養神経細胞におけるGABA受容体の特性を調べたものであるが、従来ほとんど行われなかった聴覚伝導路の中での調節機構におけるGABAの役割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。