

氏 名	原山 信也
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Analysis of G-protein-activated inward rectifying K⁺ (GIRK) channel currents upon GABA_B receptor activation in rat supraoptic neurons (ラット視床下部神経における、GABA_B 受容体活性化による G タンパク活性化内向き整流性カリウム (GIRK) チャンネル電流の解析)</p> <p>論文要旨</p> <p>【目的】 GABA_B 受容体は中枢神経系に広く分布し、シナプス伝達調節に重要な役割を果たしている。GABA_B 受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体であり、細胞内情報伝達機構としては Gi/o を介して、アデニル酸シクラーゼ抑制、電位依存性カルシウムチャンネル抑制、G 蛋白活性化内向き整流性カリウム (GIRK) チャンネル活性化の 3 種が存在することが知られている。これまでに、ラット視床下部視索上核 (SON) ニューロンにおいて、GABA_B 受容体の選択的アゴニストであるバクロフェンが電位依存性カルシウム (VDC) チャンネルを抑制することを見いだした (Harayama <i>et al</i>, Journal of Physiology, 1998)。しかしラット SON ニューロンにおいては、未だ GIRK チャンネル電流活性化に関する報告はない。そこで今回、SON ニューロンにおいて GIRK チャンネルが機能的に存在しているかを検討するため、パッチクランプ法を用い GABA_B 受容体活性化における GIRK チャンネル電流の測定を電気生理学的に行った。</p> <p>【方法】 ラット SON ニューロンを急性単離し、パッチクランプ法を用いて、ボルテージクランプモードでのバクロフェンにより活性化される電流の測定を行った。また、SON 領域における GIRK チャンネル及び GABA_B 受容体の mRNA の RT-PCR を行った。さらに、パッチクランプ法のカレントクランプモードを用い、シナプス後膜の GABA_B 受容体活性化が SON ニューロン興奮に与える影響について検討した。</p> <p>【結果】 パッチクランプ法のボルテージクランプモードでの測定では、50 mM の細胞外高カリウム環境において、バクロフェンは内向き電流を惹起した。このバクロフェンにより惹起された電流は内向き整流性を示し、GABA_B 受容体の選択的アンタゴニストである CGP55845A によりブロックされた。また、内向き整流性カリウムチャンネルブロッカーであるバリウム、及び選択的 GIRK チャンネルブロッカーであるテルチアピンによりブロックされたことから、バクロフェンは GABA_B 受容体活性化を介して GIRK チャンネルを活性化していると考えられた。この GIRK チャンネル電流は、N-エチルマレイミドの前処置により消失し、またピペット内に GTPγS を混入することで持続することから、Gi/o を介した反応であると考えられた。ラット SON 領域の RT-PCR では、GIRK1-4 の GIRK4 種全ての、また GABA_BR1、GABA_BR2 両方の mRNA を検出した。しかしながら、バクロフェンによる GIRK チャンネル活性化の EC₅₀ は 110 μM と、VDC チャンネル抑制の EC₅₀ より約 100 倍高かった。さらに、パッチクランプ法のカレントクランプモードでは、バクロフェンは膜電位や興奮頻度に明らかな影響を与えなかった。</p> <p>【考察】 以上の結果から、ラット SON ニューロンにおいて GIRK チャンネルが存在し、GABA_B 受容体活性化により Gi/o を介し GIRK チャンネルを活性化する細胞内機構が存在しているにも関わらず、高濃度の GABA_B 受容体アゴニストを要することから、生体内における SON ニューロンの機能制御には、GIRK チャンネルの生理学的関与は低いものと考えられた。GABA_B 受容体活性化により、VDC チャンネルは著明に抑制されるにも関わらず、GIRK チャンネルは活性化されにくいというラット SON ニューロンの特徴は、Gi/o 共役型受容体を豊富に持つ他の中枢神経とは性質が異なっている。細胞外の浸透圧変化によりバソプレッシン及びオキシトシンの神経分泌制御機構を持つ SON ニューロンでは、GIRK チャンネルによる遅延過分極電流が流れにくいことが、生体内で浸透圧感知に有利に作用している可能性も考えられた。</p> <p>【結論】 ラット SON ニューロンに GIRK チャンネルが存在し、GABA_B 受容体活性化により GIRK チャンネルは活性化するが、VDC チャンネル抑制と比して著明にその効率は低く、ラット SON ニューロンに特有のものと考えられた。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	原山 信也				
論文審査委員	主査 所属	生体情報 系	生理情報 部門	藤木 通弘	(印)
	副査 所属	生態適応 系	機能調節 部門	井上 真澄	(印)
		生態適応 系	機能調節 部門	柳原 延章	(印)
		系	部門		(印)
		系	部門		(印)

論文題目

Analysis of G-protein-activated inward rectifying K⁺ (GIRK) channel currents upon GABA_B receptor activation in rat supraoptic neurons.

(ラット視床下部神経における、GABA_B受容体活性化による G 蛋白質活性化内向き整流性カリウム(GIRK)チャンネル電流の解析)

学位論文審査結果要旨

【背景】抑制性神経伝達物質である GABA の受容体のうち GABA_B受容体は G 蛋白質共役型受容体で、細胞内情報伝達機構として Gi/o を介し、アデニル酸シクラーゼの抑制、電位依存性カルシウム (VDC) チャンネルの抑制、G 蛋白質活性化内向き整流性カリウム(GIRK)チャンネル活性化の 3 つの働きを通じて細胞機能を調節していると考えられている。Gi/o のうち βγサブユニットを介する VDC チャンネルの抑制と GIRK チャンネルの活性化は、多くの神経細胞において両方とも存在していることが報告されている。申請者らの以前の報告で、視床下部の視索上核 (SON) ニューロンでも GABA_B受容体が存在し、VDC チャンネルを βγサブユニット介して抑制することが示されたが、GIRK チャンネルの存在および GABA_B受容体を介した活性化は SON ニューロンではこれまで明らかではなかった。本研究はラット SON ニューロンにおいて GIRK チャンネルが機能的に存在しているのか、パッチクランプ法 (Whole cell 記録) を用いて電気生理学的検討を行ったものである。

【方法】Wistar ラットを用い、以下の 3 つの実験を行った。1) 急性単離した SON ニューロンを用い、電圧固定法によって GABA_B受容体選択的アゴニストであるバクロフェン投与により活性化される電流変化を観察する際に、細胞外を 50mM の高カリウム環境下とすることで GIRK チャンネルを介する電流を主として観察できるよう工夫し、GIRK チャンネルの性質を調べる実験。2) SON 領域の GIRK チャンネル及び GABA_B受容体の mRNA の RT-PCR による検出。3) 急性単離した SON ニューロンを用い、電流固定法によって SON ニューロンの膜電位とその興奮性に、GABA_B受容体刺激が与える影響についての検討。

【結果と考察】1) バクロフェンによって惹起された内向き整流性電流は GABA_B受容体の選択的拮抗薬 (CGP55845A) および GIRK チャンネルのブロッカーによって消失した。さらに Gi/o を阻害する N-エチルマレイミドの前処置により消失し、GTPγS のピペット内への投与で持続した。2) SON 領域の RT-PCR で、GIRK1、GIRK2、GIRK3、GIRK4 と 4 種すべての GIRK チャンネル mRNA を、また GABA_BR1、GABA_BR2 両方の GABA_B受容体 mRNA を検出した。3) GABA_B受容体刺激は GABA_A受容体刺激と比べると、ラット SON ニューロンの膜電位や興奮性への影響は非常に少なかった。以上の結果から、ラット SON ニューロンにも GABA_B受容体が存在し、Gi/o (βγ) を介する VDC チャンネルの抑制だけでなく、GIRK チャンネルの活性化経路が存在することが明らかとなった。ただし、この経路が膜電位変化に及ぼす効率が著明に低いという SON ニューロンに特異な性質については今後もさらなる検討が必要である。

【審査結果】本研究は SON ニューロンにおける GIRK チャンネルの存在および GABA_B受容体を介した活性化を明らかにした点において新規性があり、さらにこの知見は SON ニューロンの生理学的役割のさらなる研究においてもたいへん重要であると考えられ、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 27 年 1 月 30 日