

氏 名 季 鳳 雲

学位（専攻分野） 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第416号

学位授与の日付 平成11年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Respective roles of isoforms of glutamic acid  
decarboxylase in GABA synthesis and neuronal  
function

論文審査委員 主 査 教 授 井本 敬二  
教 授 伊佐 正  
教 授 小幡 邦彦  
教 授 林 基治（京都大学）

## 論文内容の要旨

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is a principal inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. GABA is almost exclusively synthesized through  $\alpha$ -decarboxylation of L-glutamic acid by GAD, which is expressed in GABAergic neurons. Mammalian GAD has two isoforms, GAD65 and GAD67, which are named after their molecular masses of 65 and 67 kDa, and encoded by two independent genes respectively. Several different properties of these isoforms have been demonstrated but their distinct roles in GABA synthesis have not been clarified.

To disclose different functions of GAD65 and GAD67, GABA contents and GAD expressions together with histology and animal behavior were analyzed in mice carrying null mutations for either GAD65 or GAD67 and the both. GAD65 mutant mice were studied over 4 months after birth. The tissues were subjected to organotypic culture from GAD67-deficient mice which did not survive after birth.

GABA contents were significantly increased after 2 months of wild type mice in the amygdala, cerebral cortex, and hypothalamus. On the other hand, GABA contents were unchanged over 4 months in GAD65-deficient mice. GAD65-deficient mice also showed several behavioral abnormalities, i. e., increase in sensitivity to convulsants, anxiety, and freezing to fear and decrease in intermale aggression.

GABA contents of hippocampus and cerebellum in GAD67 null mutant mice were less than 5% of those in the wild-type mice on the first day after birth. After 14 days in culture, GAD65 protein and GABA contents were markedly increased in GAD67 null mutant hippocampus and cerebellum. The proteins of GAD65 and GAD67 and GABA contents were extensively increased during the culture in GAD67+/+ and GAD67+/- mice. The observation that expressions of GAD65 was not different between the genotypes indicates that upregulation of the GAD65 expression did not occur in the absence of GAD67. Histological studies showed that GABA-containing fiber networks well developed during culture.

In order to study GAD-independent GABA synthesis and neuronal development in extreme GABA deficiency, mice lacking both isoforms of GAD were generated. GABA was almost undetectable in GAD65/GAD67-deficient mice but these mice did not show any discernible disorders of histogenesis.

These results indicate that the two isoforms of GAD have distinct roles in GABA synthesis: GABA is mainly generated by GAD67 during prenatal development. While GAD65 is not required in the young mice, it is crucial for the adult. Although trophic functions of GABA have been suggested, our results indicate that deficits in GABA have no influence on neurogenesis in GAD mutant mice.

## 論文の審査結果の要旨

$\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)は、中枢神経系の主な抑制性神経伝達物質であるが、最近の研究では、GABA は神経形成において栄養因子として、神経細胞の分化・増殖、神経突起の伸展、シナプスの形成においても重要な役割を果たしていることが、*in vitro* の実験で示されている。GABA は、主にグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)によりグルタミン酸が脱炭酸化されて生成されるが、GAD には分子量が 65 kDa と 67 kDa の 2 つのアイソフォーム GAD65 と GAD67 が存在している。これらは別々の遺伝子にコードされているが、GABA 作動性ニューロンには両方が発現している。しかしそれぞれが GABA 合成にどのように関与しているかは不明であった。申請者はこの問題点を明らかにするために、それぞれの遺伝子欠損マウスの脳内 GABA 量及び GAD 活性を分析するとともに、その行動変化や神経発生をも観察した。また、両方の交配により GAD 完全欠損マウスを作製し、同様の解析を行った。

GAD65 欠損マウスでは、生後 2 ヶ月から扁桃体、視床下部および大脳皮質の GABA 量が野生型より半減し、また恐怖反応・攻撃反応テストにおいて情動変化を示す所見が認められた。

一方、GAD67 欠損マウスは口蓋裂により生存できないため、生後の変化を脳切片培養法を用いて解析した。GAD67 欠損マウスでは、生後 1 日目の脳内 GABA 量は野生型の 5%しかないが、その後急激に増加し、1 週間後では野生型のおよそ半分に達した。また、GAD65 の発現も同様に増加する。培養下での GABA 作動性ネットワークも、野生型の場合と同様に形成された。

両方の遺伝子欠損マウスの脳内 GABA 量は極わずかに存在したが、出生時の脳の形成には異常が認められなかった。また、GAD ダブルノックアウトマウスでは脳内 GABA は微量であり、GAD 以外の合成系は殆ど機能していないといえる。

本研究は、GAD ノックアウトマウスの詳細な機能解析であり、出生前の脳内 GABA は大部分が GAD67 によって合成され、出生後は GAD65 の活動が高まって脳内 GABA が増加すること、すなわち 2 つの GAD アイソフォームが神経発生上あるいは生後の脳機能において異なる機能的意義を有していることを明らかにしたものである。また、GABA 合成の障害により脳の発生異常は生じないことから、GABA が神経発生において栄養因子として作用するという説に対して疑問を投げかけたものである。よって申請者の論文は、神経系における GABA の役割に関する新たな知見を加えるものであり、学位論文として十分ふさわしい内容であるものと審査委員会で一致して判定した。

さらに、学問的背景や関連分野や研究動向についての口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も満足すべきものであった。本論文は英語で書かれており、また申請者を筆頭著者とする 2 報の英文論文が既に印刷中であることから、英語力も十分なものであると判定した。以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判断した。