

氏 名 稲田 浩之

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1392 号

学位授与の日付 平成 22 年 9 月 30 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Activation of GABA_A receptor accelerates
multidirectional migration of GABAergic interneurons
in cortical marginal zone of immature living mice

論文審査委員 主 査 教授 川口 泰雄
教授 鍋倉 淳一
教授 池中 一裕
教授 村上 富士夫 (大阪大学)

論文内容の要旨

Cortical GABAergic interneurons originate from ganglionic eminences and tangentially migrate into the cortical plate at early developmental stage. To observe the migration of GABAergic interneurons *in vivo*, the author has designed specialized experimental preparations for *in vivo* time-lapse imaging of immature mouse cortex with two-photon laser-scanning microscopy. Major improvements were the establishments of 1) stereotaxic four-direction restraint bars for immature mouse to alleviate heartbeat and breathing and 2) circulation system with warm water around imaging area to prevent the brain damage induced by a decrease of cortical temperature and disturbing local blood flow around imaging area.

In the cortical area of VGAT-Venus transgenic mice in which fluorescent protein, Venus, is expressed in cortical GABAergic interneurons. The author observed multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons within the marginal zone. Blockade of GABA_AR and chelating intracellular Ca²⁺ reduced migration rate *in vivo*. Blockade of NKCC1 also reduced migration rate. In slice preparation obtained from immature cortex, the author confirmed that 1) the blockade of GABA_A receptor or N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) reduced the frequency of intracellular Ca²⁺ transient, 2) a high intracellular Cl⁻ concentration ([Cl⁻]_i) was maintained by the activity of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter, NKCC1.

The author also observed differences in 1) the moving distance/hour and frequency of saltatory movement of cortical GABAergic interneurons *in vivo*, 2) GABA content within the cortex (VGAT-Venus mice > GAD67-GFP mice), between VGAT-Venus and GAD67-GFP mice, suggesting that extracellular GABA concentration could affect the motility of multidirectional tangential migration. Indeed, the local application of diazepam to GAD67-GFP mice increased migration rate substantially.

These findings suggest that the activation of GABA_AR by ambient GABA depolarizes GABAergic interneurons and its intracellular Ca²⁺ transient property, leading the acceleration of their motility *in vivo*.

大脳新皮質のGABA作動性細胞は基底核原基で作られた後、新皮質へ移動してくる。皮質への移動後に、GABA作動性細胞の局所空間配置がどのように決まるかは、新皮質の機能発現に重要である。GABA作動性細胞の皮質内での動きは、これまでは主に大脳皮質切片標本を使って調べられており、インビボでの解析は殆どされていない。本研究では、幼若動物のGABA作動性細胞移動を生体内で観察する手法を確立した後、その移動方向・速度を定量的に解析し、伝達物質であるGABA自体が細胞移動へ関与するかどうかを検討した。

まず、GABA作動性神経細胞の移動を生体内で観察するために幼若期マウス（生後0-3日齢）の頭部固定法を開発した。主な改良点としては、1）心拍と呼吸による揺れを軽減するために4方向から頭部を抑える拘束装置の開発、2）血流の停止および細胞への障害を防ぐために観察領域の温度を一定に保つ事を目的とした温水灌流装置の開発である。

次に、大脳皮質のほぼ全てのGABA作動性神経細胞で特異的に蛍光タンパク質が発現するVGAT-Venusトランスジェニックマウスを用い、2光子顕微鏡下でタイムラプス観察を行いGABA作動性神経細胞の移動速度と方向を定量的に解析した結果、辺縁帯において多方向性の移動が確認された。移動制御メカニズムを検討するために薬理学的手法を用いてGABA_A受容体を阻害すると移動速度は有意に減少した。

移動時期のVenus陽性細胞にグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いてGABAの平衡電位を調べた所、GABAは脱分極性に作用することが明らかとなった。そこでCl⁻トランスポーターであるNKCC1の阻害剤bumetanideを投与しGABAの脱分極性作用を阻害したところ移動速度は有意に減少した。

細胞移動速度とCa²⁺ transientの頻度は正の相関をもつことが明らかにされている。生後0-3日齢の皮質スライス標本にFluo4-AMをロードしGABA作動性神経細胞の自発的なCa²⁺ transientを測定した。GABA_A受容体の阻害剤を細胞外液に投与するとCa²⁺ transientの頻度は有意に減少した。

GABA作動性神経細胞を蛍光標識するGAD67-GFPノックインマウスは発達初期において大脳皮質GABA含有量が野生型に比べて低いことが知られている。生後0日齢における大脳皮質GABA含有量を測定したところ、野生型とVGAT-Venusでは有意差は認められなかったものの、GAD67-GFPは両系統に比べて有意に低いことが明らかになった。GAD67-GFPを用いて多方向性移動のin vivo イメージングを行い定量的に解析した結果、VGAT-Venusに比べて移動速度が有意に小さいことが明らかになった。さらにGAD67-GFPに対してGABA_A受容体の感受性を増大させるdiazepamを投与すると移動速度は有意に増加した。

これらの結果から、GABA_A受容体の活性化は膜の脱分極と細胞内Ca²⁺濃度変動を誘導することでGABA作動性神経細胞の多方向性移動を促進していると考えられる。

幼若動物で新皮質ニューロンの生体内動態を捉えるという高度な技術を開発し、それによってGABA作動性細胞移動パターンの定量的解析を行った上で、GABAやその受容

体活性化が移動速度に深く関与することを明らかにした。これらは新皮質 GABA 作動性ニューロンやその回路形成の理解に大きく貢献するものであり、審査委員全員が学位論文として十分ふさわしいものであると判断した。