

血圧調節機序におけるGABAの役割の解明 (遺伝子改変マウスを用いた解析)

助成研究者:柳川右千夫(岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経化学部門)

γ -アミノ酪酸 (GABA) は主要な抑制性神経伝達物質であり、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD; GAD65 と GAD67 の2型存在) によって合成される。GABA が血圧をコントロールする上で重要な役割を果たしている可能性について、以下の動物実験が報告されている。野生型ラットの視床下部尾側領域に GABA 受容体アンタゴニストの注入が血圧を上昇させ、GABA 受容体アゴニストの注入が血圧を下降させること。自然発症高血圧ラットでは、GABA 合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素の発現レベルと酵素活性とが野生型ラットに比較して低下していること。一方、我々はマウス GAD65 遺伝子と GAD67 遺伝子の構造を決定し、トランスジェニックマウスを用いて GAD 遺伝子プロモーター機能を明らかにした。本研究では、GAD65 ノックアウトマウスを用いて血圧調節機序における GABA の役割について検討を行った。

相同組み換えを利用した遺伝子標的法で GAD65 遺伝子を破壊したマウス (GAD65 ノックアウトマウス) を作成した。Western blot 法で解析した結果、GAD65 ノックアウトマウスの脳では GAD65 蛋白が検出されないことを確認した。PCR 法を用いたゲノタイピングで野生型マウスと GAD65 ノックアウトマウスの2グループに分け、それぞれについて収縮期血圧と心拍数、自発運動量について測定し、比較検討した。GAD65 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して自発運動量の増加が観察された。一方、収縮期血圧と心拍数については、GAD65 ノックアウトマウスと野生型マウスとでは有意差が認められなかった。上記の結果より、血圧調節機序には GAD65 単独だけではなく GAD65 と GAD67 の両方が関与している可能性が考えられた。GAD67 ノックアウトマウスは、口蓋裂により出生日に死亡するので、GAD67 遺伝子を時期特異的あるいは脳の領域特異的に破壊するコンディショナル GAD67 マウスの作成が血圧調節機序における GABA の役割を明らかにするのに有用であると考察した。

12

助成番号 0148

血圧調節機序におけるGABAの役割の解明 (遺伝子改変マウスを用いた解析)

助成研究者: 柳川右千夫(岡崎国立共同研究機構生理学研究所神経化学部門)

1. 研究目的

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、神経系における主要な抑制性神経伝達物質として神経の電位活動の制御に加えて、覚醒、睡眠、概日リズムや学習、運動、感覚情報処理など脳の機能を構築する上で中心的役割を果たしている。また、GABA はてんかん病やアルコール精神病をはじめとする精神神経疾患、不安や抑うつなどの精神症状との関連が報告されている。GABA が血圧をコントロールする上で重要な役割を果たしている可能性が、以下の動物実験から推測されている。野生型ラットの視床下部尾側領域にGABA受容体アンタゴニストの注入が血圧を上昇させ、GABA受容体アゴニストの注入が血圧を下降させる。自然発症高血圧ラットでは、GABA合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素の発現レベルと酵素活性とが野生型ラットに比較して低下している(1、2)。

一方、GABAはグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD; GAD65とGAD67の2型存在)によって合成される。我々は、マウスGAD65遺伝子とGAD67遺伝子の構造を決定し、トランスジェニックマウスを用いてGAD遺伝子プロモーター機能を明らかにした(3、4、5)。本研究では、GAD65ノックアウトマウスを用いて血圧調節機序におけるGABAの役割について検討を行った。

2. 研究方法

GAD65ノックアウトマウスの作製と解析

相同組み換えを利用した遺伝子標的法でGAD65遺伝子を破壊したマウス胚性幹細胞をマウス胚に導入することによりキメラマウスを作製した(6)。次に、キメラマウスと野生型マウスとを交配することにより、GAD65ヘテロ接合体マウスを得た。さらに、GAD65ヘテロ接合体マウス同士を交配することにより、GAD65ノックアウトマウスを作成した(図1)。

11月齢から15月齢のGAD65ノックアウトマウス(-/-)と野生型マウス(+/-)の収縮期血圧と心拍数をtail cuff法で測定した。また、自発運動量はcircular open fieldにマウスを入れ、移動距離をビデオ・イメージ解析システムで測定した。

3. 研究成果

3.1 GAD65 ノックアウトマウスの作製

GAD65 ヘテロ接合体マウス同士を交配することにより生まれた仔の尻尾からゲノム DNA を精製し、PCR 解析を用いて、仔のゲノタイプを決定した(図2A)。PCR 解析で決定された仔のゲノタイプは、Southern 法によっても確認され、GAD65 遺伝子が破壊されていることが示唆された。また、それぞれのゲノタイプをもつ仔の脳について抗 GAD65 抗体を用いた Western 法を行った(図2B)。GAD65 ノックアウトマウスでは、GAD65 蛋白が検出されなかった。また、GAD65 ヘテロ接合体マウスの GAD65 蛋白量は野生型マウスの GAD65 蛋白量より少なかった。従って、蛋白レベルにおいても GAD65 ノックアウトマウスであることが示唆された。

3.2 GAD65 ノックアウトマウスの解析

GAD65 ノックアウトマウス(-/-)は、野生型マウス(+/+)に比較して一定時間での移動距離は 1.8 倍増加しており($P < 0.01$)、自発運動量の増加が認められた(図3A)。また、GAD65 ノックアウトマウス(-/-)では、自発痙攣発作が認められた。

収縮期血圧を測定したところ、GAD65 ノックアウトマウス(-/-)では野生型マウス(+/+)に比較して上昇傾向は認めるが、有意差は認められなかった(105 ± 4 vs 98 ± 3 mmHg, $n=6$, $P > 0.05$) (図3B)。心拍数を測定した結果、GAD65 ノックアウトマウス(-/-)では対照マウス(+/+)に比較して上昇傾向は認めるが、有意差は認められなかった(635 ± 19 vs 569 ± 39 beats/min, $n=6$, $P > 0.05$) (図3C)。

4. 考察

血圧調節機序における GABA の役割を明らかにする目的で、GAD65 ノックアウトマウスを作製して、収縮期血圧と脈拍について検討した。収縮期血圧と脈拍については、GAD65 ノックアウトマウスと野生型マウスとでは有意差が認められなかった。GAD65 ノックアウトマウスでは自発運動量の増加や自発痙攣発作が観察されることから、自発運動量や痙攣発作には GAD65 が関与していることが明らかにされた。

GABA 合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素には GAD65 だけでなく GAD67 が存在する。従って、血圧調節機序には、GAD65 単独だけではなく GAD65 と GAD67 の両方が関与している可能性が考えられる。しかしながら、GAD67 ノックアウトマウスは、口蓋裂により出生日に死亡するので(7)、GAD67 遺伝子を時期特異的あるいは脳の領域特異的に破壊するコンディショナル GAD67 マウスの作製が血圧調節機序における GABA の役割を明らかにするのに有用であると推論された。

5. 今後の課題

収縮期血圧と脈拍について GAD65 ノックアウトマウスと野生型マウスとでは有意差が認められなかったが、GAD65 ノックアウトマウスの方が上昇傾向にあった。また、GAD65 ノック

アウトマウスでは、妊娠中あるいは育仔中の死亡が散見された。従って、妊娠中や高塩食餌投与した時の血圧変動について、GAD65 ノックアウトマウスと野生型マウスとで比較する。また、コンディショナル GAD67 マウスの作成については、現在、進行中である。

6. 文献

1. Horn EM, Shonis CA, Holzwarth MA, Waldrop TG.: Decrease in glutamic acid decarboxylase level in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*16, 625-33 (1998)
2. Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG.: Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Res Bull.* 53, 77-85 (2000)
3. Yanagawa Y, Kobayashi T, Kamei T, Ishii K, Nishijima M, Takaku A, Tamura S.: Structure and alternative promoters of the mouse glutamic acid decarboxylase 67 gene. *Biochem J.* 326, 573-8 (1997)
4. Yanagawa Y, Kobayashi T, Ishii K, Sakagami H, Kondo H, Tashiro F, Miyazaki J, Tamura S.: Regulation of GABAergic cell-specific gene transcription. (eds., Uyemura, K., Kawamura, T. & Yazaki, T.) *Neural Development*, pp. 435-439, Springer-Verlag Tokyo (1999)
5. akinae K, Kobayashi T, Kobayashi T, Shinkawa H, Sakagami H, Kondo H, Tashiro F, Miyazaki J, Obata K, Tamura S, Yanagawa Y. : Structure of the mouse glutamate decarboxylase 65 gene and its promoter: preferential expression of its promoter in the GABAergic neurons of transgenic mice. *J. Neurochem.*75, 1429-37 (2000)
6. Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F, Miyazaki J.: Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res.* 8, 215-21 (1999)
7. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K.: Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 6496-9 (1997)

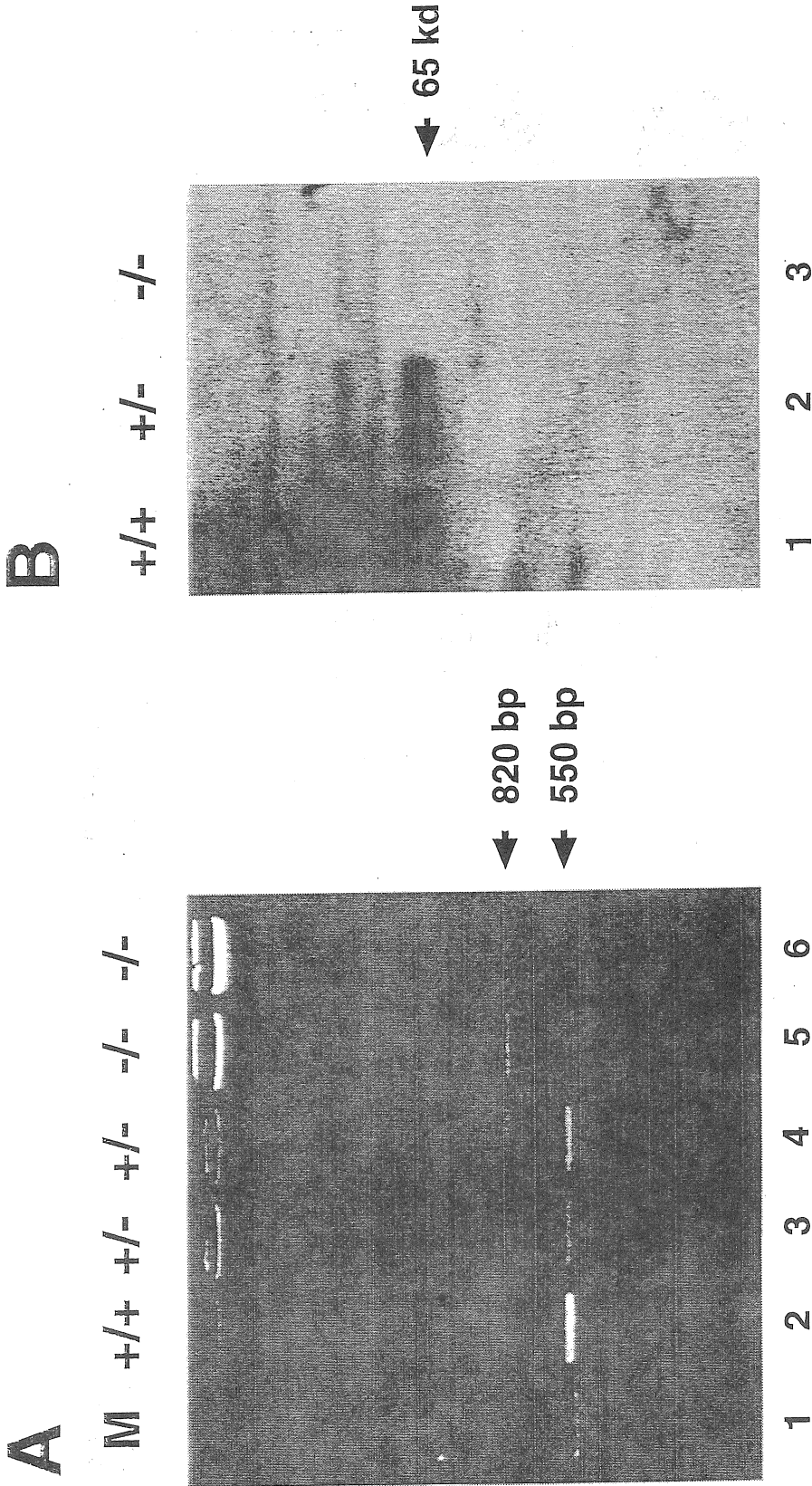


Figure 2. (A) Genotype analysis of mouse tail genomic DNA by PCR. Lane 1, DNA size marker, pGEM/HinfI (M); 2, wild type offspring (+/+); 3 and 4, heterozygous offspring (+/-); 5 and 6, homozygous null offspring (-/-). PCR amplification of the wild-type allele produces a 550-bp DNA fragment, whereas amplification of the disrupted GAD65 gene allele produces a 820 bp. (B) Western blot analysis of mouse brain homogenates using anti-GAD65 antibody. Lane 1, wild type offspring (+/+); 2, heterozygous offspring (+/-); 3, homozygous null offspring (-/-).

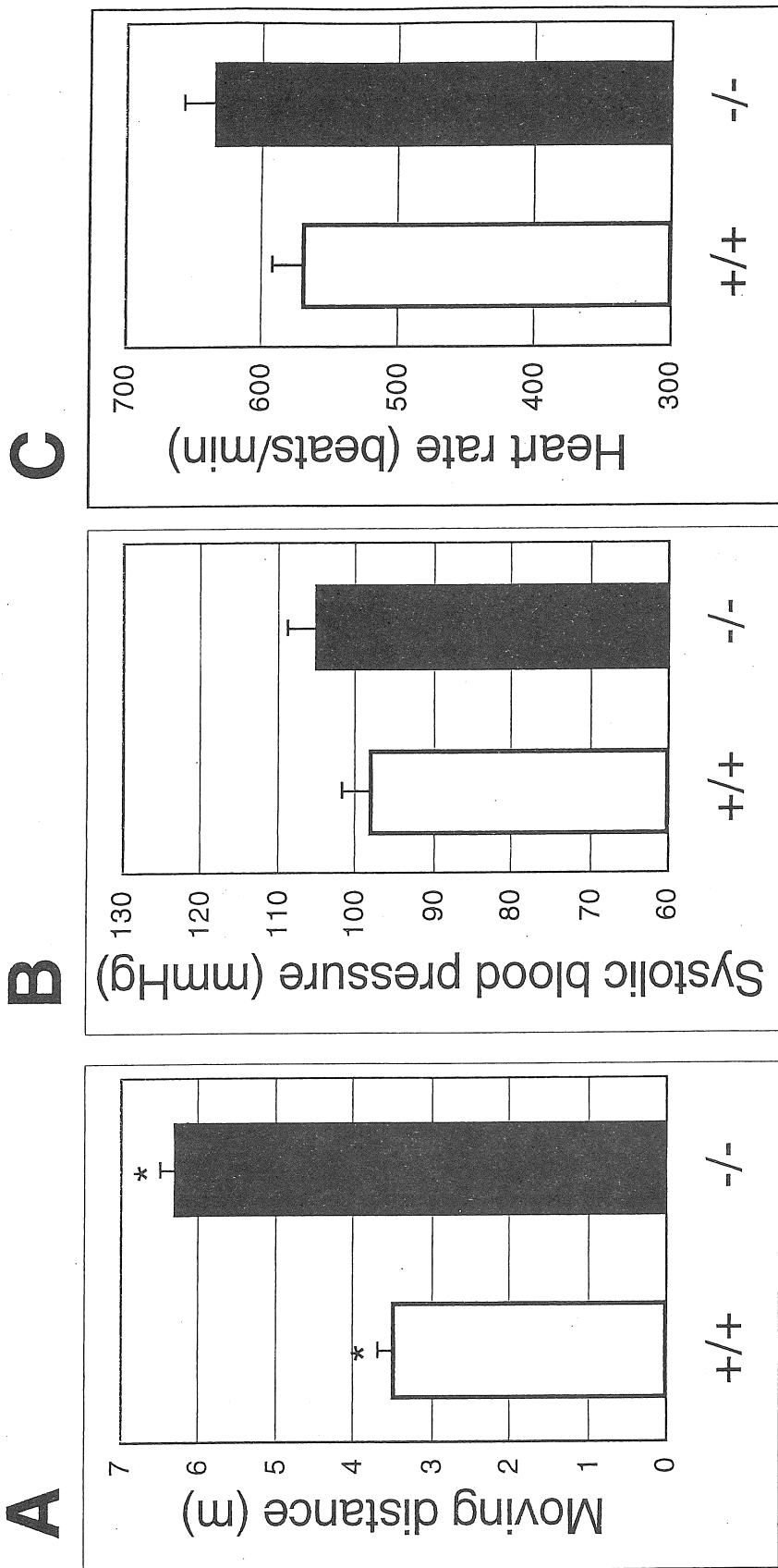


Figure 3. Locomotor activity (A), systolic blood pressure (B), and heart rate (C) in wild-type mice (+/+) and GAD65 knockout mice (-/-). Data are presented as means \pm S.E.M. *P < 0.01.

The elucidation of the roles of GABA in the control of blood pressure:
analysis using genetically engineered mice

Yuchio Yanagawa

Laboratory of Neurochemistry, National Institute for Physiological Sciences

Summary

γ -Aminobutyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABA is produced by glutamate decarboxylase (GAD), which has two isoforms (GAD65 and GAD67) encoded by separate genes. We have determined the structure of mouse GAD65 and GAD67 genes and analyzed their promoters using transgenic mice. Several studies have suggested that a GABA deficit in the caudal hypothalamus of the spontaneously hypersensitive rat contributes to elevated levels of arterial pressure. To further elucidate the role of GABA in the control of blood pressure, we have generated mice in which GAD65 was targeted by homologous recombination. GAD65 proteins were not detected in the brain of homozygous GAD65 mutants by Western blot analysis.

Systolic blood pressure and heart rate measurements in conscious mice by using tail cuff method showed an average systolic pressure of 98 ± 3 mmHg ($n = 6$) and 105 ± 4 mmHg ($n = 6$) in wild-type and GAD65 knockout mice, respectively ($P > 0.05$). Heart rates averaged 569 ± 39 beats/min ($n = 6$) and 635 ± 19 beats/min ($n = 6$) in wild-type and GAD65 knockout mice, respectively ($P > 0.05$). On the other hand, locomotor activity in GAD65 knockout mice was significantly increased relative to that in wild-type mice. These results suggest that both GAD65 and GAD67 proteins, but not only GAD65, might be involved in the control of blood pressure. Conditional GAD67 knockout mice will be useful for elucidating the functional role of GABA in the control of blood pressure.