

キンドリング形成過程におけるグルタミン酸トランスポーター機能調節因子 (GTRAP3-18) の機能解明とGABA合成能に関する研究

The functional role of glutamate transporter associated protein (GTRAP3-18) in the epileptogenesis

植田 勇人¹⁾, 土井 拓¹⁾, 中島 暉²⁾,
徳丸 潤³⁾, 鶴 紀子⁴⁾, 石田 康¹⁾

要旨: グルタミン酸-GABAシナプス伝達は再取り込みによって調整されるため, 各トランスポーター機能はてんかん性病態における興奮-抑制系間の均衡に影響すると考えられる。グルタミン酸トランスポーター機能調整因子 (GTRAP3-18) は, グルタミン酸とEAAC-1の結合性を制御する蛋白であり, さらにEAAC-1経山でGABAニューロン内に取り込まれるグルタミン酸からのGABA再合成を修飾していることから, GTRAP3-18の役割解明はてんかん研究において支持されてきた興奮系-抑制系間不均衡仮説の解釈を深めていくうえで, 重要なテーマである。PTZキンドリング完成後には, GTRAP3-18発現低下の長期持続が特徴的であったため, アンチセンス法を用いてGTRAP3-18ノックダウン操作を行い, てんかん原性獲得・けいれん変化およびグルタミン酸・GABA動態を観察した。その結果GTRAP3-18ノックダウン群ではけいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成とともに, 海馬グルタミン酸・GABA濃度の基礎値上昇が観察された。GABA基礎値上昇は, GTRAP3-18発現低下によってEAAC-1経山のグルタミン酸再取り込みが昂進し, GABA合成能が促進された帰結であると考察した。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2006;17:33-40

Key Words : epilepsy, glutamate, GABA, glutamate transporter associated protein 3-18, western blot

¹⁾ 宮崎大学医学部精神医学講座, ²⁾ 宮崎大学医学部医学科機能制御学講座物質科学分野,

³⁾ 医療法人 真愛会高宮病院, ⁴⁾ 宮崎大学医学部心理学,

^{1, 2, 4)} 〒889-1692 宮崎県清武町大字木原5200番地, ³⁾ 〒880-0841宮崎市吉村町大町甲1931番地

The functional role of glutamate transporter associated protein (GTRAP3-18) in the epileptogenesis Yuto Ueda¹⁾, Taku Doi¹⁾, Akira Nakajima²⁾, Jun Tokumaru³⁾, Noriko Tsuru⁴⁾, Yasushi Ishida¹⁾

¹⁾ Department of Psychiatry, Miyazaki Medical College, University of Miyazaki

²⁾ Department of Chemistry, Miyazaki Medical College, University of Miyazaki

³⁾ Takamiya Hospital

⁴⁾ Department of Psychology, Miyazaki Medical College, University of

^{1, 2, 4)} 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki 889-1692, JAPAN, Miyazaki

³⁾ 1931 Ohmachi, Yoshimura-cho, Miyazaki, 880-0841

緒 言

グルタミン酸作動性興奮系シナプス伝達とγ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性抑制系シナプス伝達間の不均衡仮説はてんかんの機序解明を進める上で重要な作業仮説となっている^{1,4)}。GABAはグルタミン酸を前駆物質として再合成されるため、抑制系を担うGABA合成能そのものが、グルタミン酸トランスポーター機能によって修飾を受けている⁵⁾。Rothstein JDらが行ったEAAC-1ノックダウン実験でけいれん誘発現象が確認され、そのけいれん誘発の原因としてEAAC-1経由のGABA再合成低下が提唱されてきた^{5) 6)}。彼らの研究はグルタミン酸-GABA系間の強力な機能的linkageを示すものとして注目に値する。GABA合成能を左右する膜蛋白であるEAAC-1は、グルタミン酸トランスポーター機能調整因子 (Glutamate transporter associated protein; GTRAP3-18) により抑制的に制御されている⁷⁾。GTRAP3-18はグルタミン酸とEAAC-1の結合性を制御する蛋白であり、てんかん研究において支持されてきた興奮系-抑制系間の不均衡を解釈していくうえでも、重要な蛋白である。現時点でもてんかん焦点および周囲組織の生化学的病理としてGABA抑制系を凌駕するグルタミン酸の機能昂進で形成される均衡崩壊説が強く支持されている。本研究では、キンドリング形成におけるGTRAP3-18・グルタミン酸・GABA関連蛋白の発現変化や、GTRAP3-18ノックダウンにおけるキンドリング形成の観察から、キンドリング形成の背景にある興奮系-抑制系間の不均衡説を再検討した。

方 法

本実験は宮崎大学動物実験委員会 (承認番号1998-158-8) の認可を得て行った。

1. PTZキンドリングとPTZ誘発全身けいれん
実験動物には7週令のSD系雄性ラットを用いて、実験目的を遂げるために、PTZキンドリングとPTZ誘発全身けいれんの二種類のモデルを用意した。

1-1. PTZキンドリング; PTZ (40 mg/kg, 16 mg/ml) を隔日、腹腔内投与し, Becker, A.⁸⁾ による分類でstage5が連続2回出現した時点でキンドリング完成とした。また同時にPTZ投与時におけるけいれん出現潜時, けいれん持続時間を計測した。

1-2. PTZ誘発全身けいれん; GTRAP3-18ノックダウンによって海馬グルタミン酸とGABA濃度にどのような変化が生じているかを観察するため, PTZ投与量50mg/ml腹腔内投与を用いて, 全身けいれんを誘発した。

2. キンドリング完成後におけるグルタミン酸-GABAシナプス関連蛋白の発現変化
キンドリング完成後24時間, 4週間後に各ラットから海馬を摘出し膜蛋白をSDS-PAGE上に展開しwestern blotを行った⁹⁾。対照群には週令数をマッチングさせたsham操作ラットを用意した。海馬におけるけいれん準備性獲得に関する解析対象蛋白としては, GLAST, GLT-1, EAAC-1のグルタミン酸トランスポーター, GABAトランスポーターGAT-1,-3およびglutamate decarboxylase (GAD65&67), Glu-R1, -R2, NMDA-R1, -R23のグルタミン酸受容体, GTRAP3-18の発現解析を行った。

3. GTRAP3-18ノックダウン操作

3-1. PTZキンドリング; 脳室注入用の26Gガイドカニューレ先端を左側側脳室上部に慢性留置し, 27G注入カニューレを用いて脳室内投与を行った。GTRAP3-18のノックダウンに用いたオリゴ設定は, Lin, CLらの報告に準じた⁷⁾。GTRAP3-18に対するanti-sense (5'-GAG CGG GGC AAG GGT TCA-3') を脳室内に隔日投与, 平行してPTZキンドリングを行った。対照群にはGTRAP3-18 sense (5'-GTG AAC CTT GCC CGC TC-3') の脳室内投与群を設定した。オリゴ濃度は人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid; aCSF) で $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.8mM) に調整し, $1.5 \mu\text{l}$ を $1 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で脳室内投与を行った。投与時期は, 48時間毎でGTRAP3-18 sense, anti-senseをisoflurane麻酔下にて脳室内投与を行った。投与総回数はPTZキンドリング刺激開

始前に4回、キンドリング刺激と平行して3回、合計7回行った。後半3回は、PTZ投与3時間前に脳室内投与を行った。

3-2. PTZ全身性けいれん；海馬腹側部灌流目的のマイクロダイアリーシス用ガイドカニューレの慢性留置を追加したのち、3-1の方法に準じたGTRAP3-18ノックダウンを行った。投与総回数は計7回とした。計7回のオリゴ投与終了後、4mmのI型プローブを急性留置したのちaCSFを2時間灌流した。その

後、PTZ全身性けいれんを誘発しけいれん段階、潜時、持続時間を計測した。その後、15分毎にマイクロダイアリーシス試料を回収し、OPA誘導体化後、HPLC-ECDでグルタミン酸及びGABAのけいれん前後における濃度を測定した¹⁰⁾。

結果

1. PTZキンドリング

40mg/kgPTZのキンドリング操作では、図1に示す過程でキンドリングが進行し、4週間のキンドリング刺激休止期間を設けても、全てのラットでstage 5の再出現が確認された (Fig.1)。次に、無刺激群、キンドリング完成24時間、4週間後が経過したラット海馬を摘出し、western blotを行った (Fig.2)。

2. PTZキンドリング完成後のグルタミン酸-GABAシナプス関連蛋白の発現変化

キンドリング完成24時間後の急性期、GLAST, GLT-1, EAAC1, GAT-1, GluR-1, NMDA-R1はともに発現上昇を示し、その一方でGTRAP3-18は発現低下を示した。GAT-3とGluR-2は対照群と同等の発現を示した。完成24時間後発現上昇を示したGLAST, GLT-1, EAAC1, GAT-1, NMDA-R1は4週

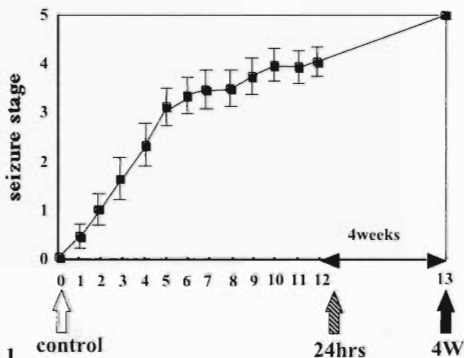


Fig.1 Kindling development and the sustained seizure prone state at 4 weeks after the last PTZ administration. Data represent mean \pm S.E..

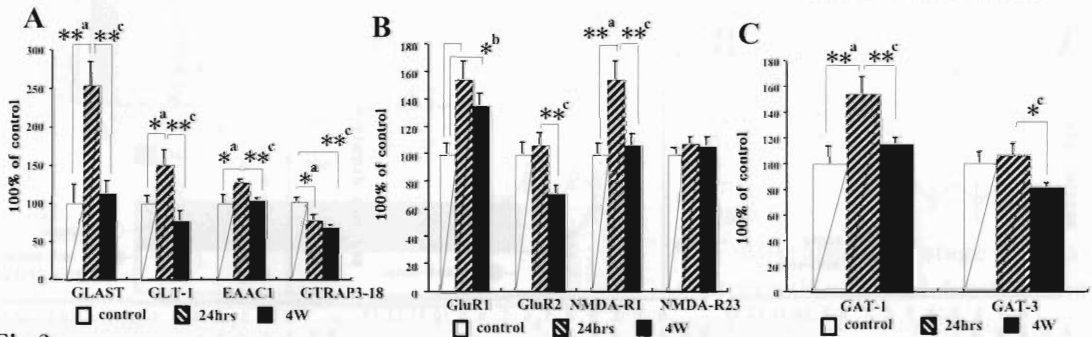


Fig.2

Time-dependent changes in expressions of glutamate transporters (Fig.2A), glutamate receptor (Fig.2B) and GABA transporters (Fig.2C) in the hippocampus of rats with intracerebroventricular injection of sense and anti-sense oligonucleotides respectively. Statistical analysis was performed by one-way (GROUP effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparisons.

Data represent mean \pm S.E..

**aP<0.01, *aP<0.05, values of control vs. values at 24 hrs; **bP<0.01, *bP<0.05, values of control vs. values at 4weeks; **cP<0.01, *cP<0.05, values at 24 hrs vs. values at 4weeks.

間後には対照群と同等レベルに回復したが、Glu-R1との上昇とGTRAP3-18の低下は4W間以上持続した。急性期には対照群と同レベルであったGAT-3、Glu-R2は4W間後には減少していた (Fig.2)。

3. GTRAPノックダウン操作に伴うPTZ誘発全身けいれん・キンドリング変化

3-1. GTRAPノックダウンにおけるキンドリング発展

GTRAPノックダウン群で発作潜時はPTZ刺激初期から短縮しており、長い発作持続時間を呈し、キンドリング形成は著しく早期に確立した (Fig.3)。

3-2. GTRAPノックダウン後の海馬におけるグルタミン酸関連蛋白の発現変動

Lin, CLらのノックダウン操作では、25 μ M GTRAP3-18 anti-senseで処理したHEK293細胞のEAAC-1発現には影響なく、GTRAP3-18発現量が約50%減少し、その結果EAAC-1経由グルタミン酸再取り込みは約2.5倍上昇し、またラット脳室投与をmini-osmotic pumpで7日間行った場合、GTRAP3-18発現量は大脳皮質で約50%減少させるなどの結果が指摘されている⁷⁾。本研究でも、EAAC-1発現には影響せずGTRAP3-18発現を約40%減少さ

せるなど、蛋白発現に及ぶ影響に関して共通結果をみた。その他、GLT-1は有意に減少していたが、GLAST、GAD65&67発現には影響しなかった。このことから、GTRAP3-18 anti-senseにより、EAAC-1経由のグルタミン酸再取り込みは上昇し、その結果GAD非依存性にGABA再合成が促進されている可能性が示唆された (Fig.4)。

3-3. GTRAP3-18ノックダウンにおけるPTZ誘発性全身けいれん

PTZ全身けいれんはともに観察されたが、GTRAP3-18 anti-sense投与群で早期にけいれんが出現し持続時間も長く、sense群と比較しそれぞれ有意差を認めた (Fig.5)。

3-4. GTRAP3-18ノックダウンにおけるPTZ誘発性全身けいれん前後のグルタミン酸とGABAの変動

anti-sense群とsense群におけるグルタミン酸並びにGABA基礎値を比較すると、anti-sense群でグルタミン酸・GABA細胞外濃度は有意に高値を示した。グルタミン酸動態はsense群でも、全ラットで全身けいれんが観察され、その直後からグルタミン酸は刺激前に比べ緩やかな上昇を認めた。一方、anti-sense群でのグルタミン酸上昇は、全身けい

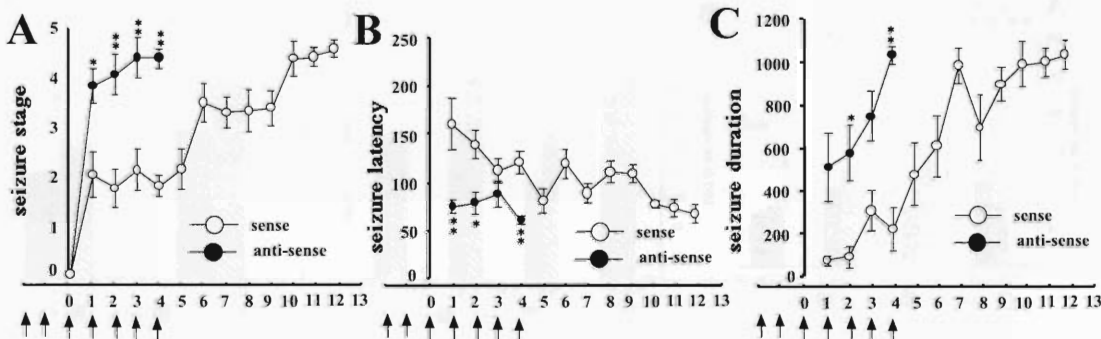


Fig.3

Schema of the kindling development in rats with intracerebroventricular injection of sense and anti-sense oligonucleotides respectively. Fig.3A represented seizure stage development; Fig.3B, latency; Fig.3C, duration. Statistical analysis was performed by two-way (GROUP-STIMULATION NUMBER effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparisons.

Data represent mean \pm SE.

**P<0.01, *P<0.05 compared with corresponding value of sense-injected group

れん終焉後から一過性の巨大上昇が観察された。GABA動態ではanti-sense群・sense群ともに緩やかな上昇をみた (Fig.6)。

考 察

PTZキンドリング完成後のけいれん準備性長期維持には、グルタミン酸作動性神経を主体とするてんかん性回路の強化とその同期発射システムが必要である。グルタミン酸代謝昂進を示唆するNMDA型グルタミン酸受容体やグルタミン酸トランスポーターの発現昂進などが、海馬を中心とした神経細胞死と再生・再構築を同時に促進し、てんかん性回路形成の基本的な分子基盤を形成すると考察した。一方GABA抑制系に関しては、キンドリングモデルやてんかん患者死後脳を用いた研究で、GABA神経の脱落が極めて少ないことを示唆する報告から^{11, 12, 13)}、てんかん原性獲

得後のGABA抑制系は比較的温存されると考えられている。またPTZキンドリングに伴うマイクロダイアリーシスによるアミノ酸研究でも、本研究同様にグルタミン酸・GABAともに上昇する傾向が報告されている¹⁴⁾。本研究結果であるキンドリング慢性期のGTRAP3-18発現低下はEAAC1経由のGABA合成亢進を通じ、発作形成に向けて強化されたグルタミン酸神経系ネットワークの同期発射を促す分子機構であると推測した。GTRAP3-18アンチセンス実験によるキンドリング形成の促進はEAAC1の機能上昇によりGABA合成が促された結果、同期発射しやすいシナプス環境がキンドリング形成に促進的に関与したと考察した。キンドリング慢性期のGlu-R1発現上昇やCa⁺⁺流入を抑制制御するGlu-R2の発現低下なども、キンドリング完成後のグルタミン酸作動性神経回路の易刺激

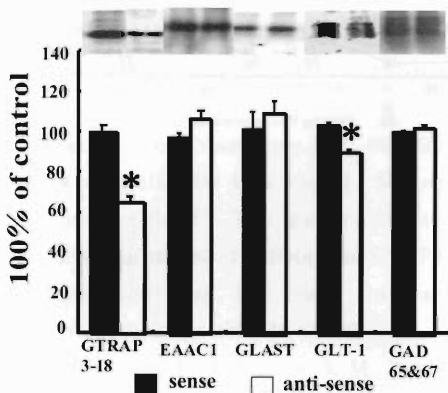


Fig.4

Alterations in the glutamate transporters and GAD65&67 in the hippocampus of rats injected with sense and anti-sense. Inserted figures indicate representative western blots of each protein expression, respectively.

Data represent mean \pm S.E.

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney *U*-test. * $P < 0.05$ vs. values of sense-injected group

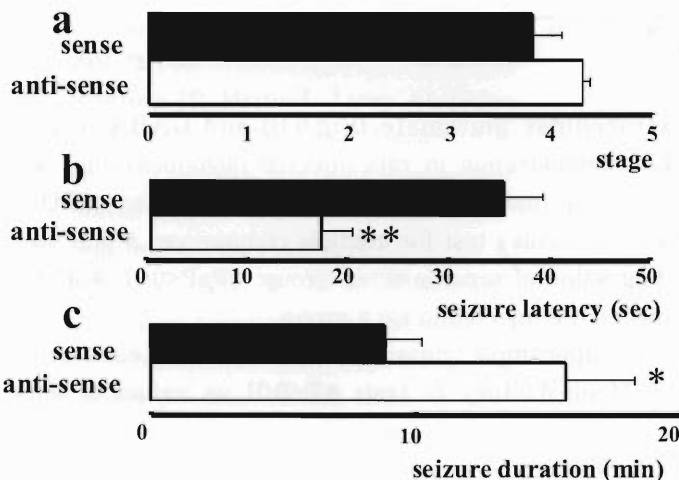


Fig.5

Alterations in stage (Fig.5a), latency (Fig.5b) and duration (Fig. 5c) of convulsion induced by 50mg/kg PTZ systemic administration. Data represent mean \pm S.E..

Statistical analysis was performed by Mann-Whitney *U*-test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. values of sense-injected group.

性や興奮状態に係わる背景分子機構と考えられた。鉄塩外傷性てんかんモデルやカイニン酸てんかんモデルの慢性期でグルタミン酸トランスポーター低下が見いだされ（従来の研究成果）、キンドリングでは観察されないことから、グルタミン酸トランスポーターの低下に伴うグルタミン酸の細胞興奮毒性の亢進やGTRAP3-18・GABAトランスポーター発現低下などの膜蛋白発現変化が、自発性けいれんに結びつくと推測された。

まとめ

PTZキンドリング完成後にはGTRAP3-18発現低下が長期間にわたり持続し、GTRAP3-18ノックダウン操作でも、けいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成を見たことから、GTRAP3-18の低下はpro-convulsantとして作用するものと考えられた。ノックダウン群では、海馬グルタミン酸・GABA濃度の基礎値上昇がマイクロダイアリースによって観察された。これらの結

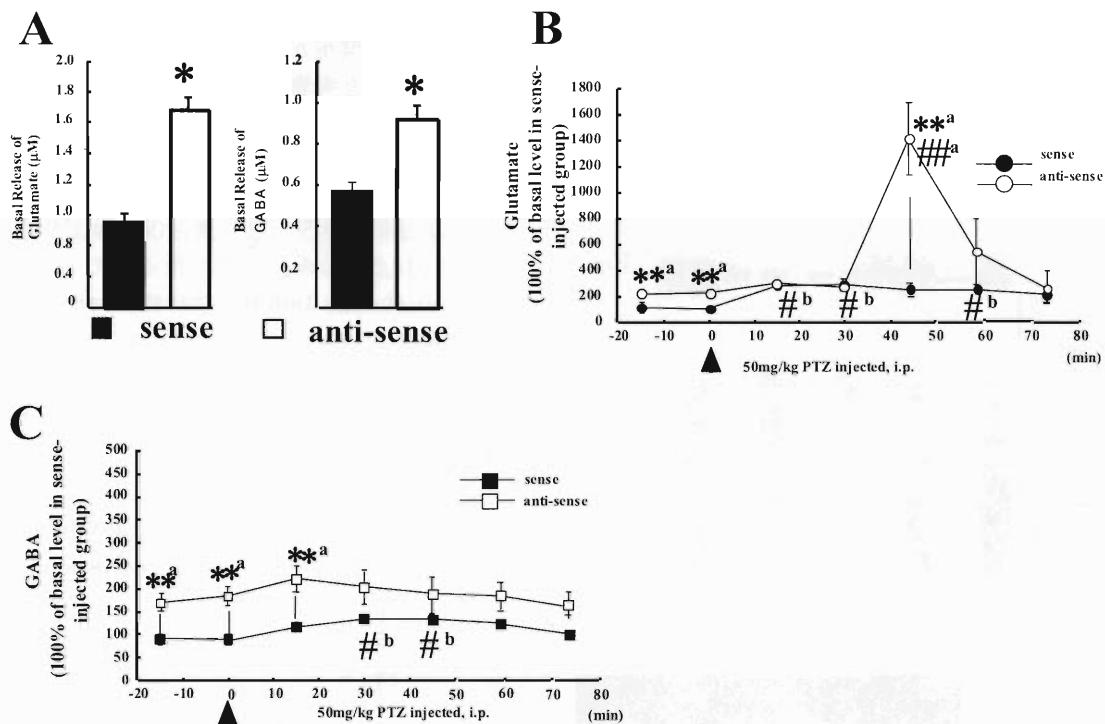


Fig.6

Time-dependent changes in extracellular glutamate (Fig.6.B) and GABA (Fig.6.C) concentration following systemic PTZ administration in rats injected oligonucleotides with sense and anti-sense respectively. Statistical analysis was performed by two-way (GROUP-TIME effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparison. **aP<0.01, *aP<0.05 compared with corresponding value of sense-injected group; ##aP<0.01, #bP<0.05 compared with corresponding value at pre-PTZ injected in each group.

Fig. 6A show the basal release of hippocampal glutamate and GABA in each group. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney *U*-test. *P<0.01 vs. values of sense-injected group.

Data represent mean \pm S.E. in each figure.

果は、EAAC-1経由のグルタミン酸再取り込みが昂進され、GABA合成能が促進された帰結である。てんかんモデルである“キンドリング”完成とそのけいれん準備状態維持並びに、てんかんにおける発作間歇期の存在と自発けいれんの突発性出現を同時に説明するには、グルタミン酸神経の機能昂進に加えて、その同期発射を保証し発作停止を可能にするGABA抑制系昂進を内包する均衡崩壊が不可欠であると考察した。

文 献

- 1) Ingram EM, Tessler S, Bowery NG, Emson PC. Glial glutamate transporter mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Strasbourg. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; **75**, 96-104.
- 2) Dutuit M, Touret M, Szymocha R, Nehlig A, Belin MF, Didier-Bazes M. Decreased expression of glutamate transporters in genetic absence epilepsy rats before seizure occurrence. *J Neurochem* 2002; **80**, 1029-38.
- 3) Kondziella D, Hammer J, Sletvold O, Sonnewald U. The pentylenetetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: glial-neuronal metabolic interactions. *Neurochem Int* 2003; **43**, 629-37.
- 4) Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004; **73**, 1-60.
- 5) Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994; **13**, 713-25.
- 6) Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, et al. A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci* 2002; **22**, 6372-9.
- 7) Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, et al. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001; **410**, 84-8.
- 8) Becker A, Grecksch G, Thiemann W, Holtt V. Pentylenetetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; **66**, 425-8.
- 9) Ueda Y, Willmore LJ. Sequential changes in glutamate transporter protein levels during Fe(3+)-induced epileptogenesis. *Epilepsy Res* 2000; **39**, 201-9.
- 10) Ueda Y, Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* 1995; **20**, 213-9.
- 11) Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 1989; **9**, 2562-74 ISSN: 0270-6474.
- 12) Freichel C, Ebert U, Potschka H, Loscher W. Amygdala-kindling does not induce a persistent loss of GABA neurons in the substantia nigra pars reticulata of rats. *Brain Res* 2004; **1025**, 203-9.
- 13) Liu X, Leung LS. Partial hippocampal kindling increases GABAB receptor-mediated postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells. *Epilepsy Res* 2003; **57**, 33-47.
- 14) Rocha L, Briones M, Ackermann RF, Anton B, Maidment NT, Evans CJ, et al. Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res* 1996; **26**, 105-13.

Summary

The functional role of glutamate transporter associated protein (GTRAP3-18) in the epileptogenesis induced by PTZ-kindling

Yuto Ueda, Taku Doi, Akira Nakajima, Jun Tokumaru, Noriko Tsuru, Yasushi Ishida

As well known the knockdown EAAC-1 by anti-sense induces epileptic convulsion in rats. EAAC-1 is important protein to connect glutamate re-uptake with GABA synthesis. It is important study to elucidate the role of glutamate transporter associated protein 3-18 (GTRAP3-18), because GTRAP3-18 inhibitory regulates the glutamate re-uptake through EAAC-1 into GABAergic neurons. In this study, suppression of GTRAP3-18 protein expression was long-lasting after PTZ kindling, and GTRAP3-18 knockdown by anti-sense method decreases seizure threshold and accelerates the kindling phenomena. Hippocampal glutamate and GABA basal release in GTRAP3-18 knockdown group higher rather than those of sense-injected group suggested knockdown of GTRAP3-18 promotes GABA synthesis. Sustainance of high seizure susceptibility in the PTZ kindled state and the existence of inter-paroxysmal period could be explained by synchronization of glutamatergic neuron caused by the enhanced GABAergic system.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2006;17:33-40