

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	榎殿 佳子
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Ionic basis for membrane potential resonance in neurons of the inferior olive (神経細胞膜の resonance 特性に関わるイオンチャネルの解明)			
論文審査担当者			
主査	酒井 規雄	印	
審査委員	浅野 知一郎		
審査委員	田中 茂		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>脳内のある種の神経細胞はサイン波状の周期的膜電位オシレーションを示す。このオシレーションは神経細胞間の活動同期や、信号のコード化などに重要な働きをしていると考えられている。オシレーションの発生メカニズムとして、細胞膜が持つ resonance 特性の関与が考察されている。Resonance 特性とは、ある特定の周波数（数ヘルツ）の入力信号を増幅して、大きな電圧変化として出力するという細胞膜が持つ電気特性のことである。この性質を持つ神経細胞では、細胞膜の電位が resonance 特性の周波数で振動しやすくなり、コンピューターのクロックのようなリズムを刻むようになる。Resonance 特性は、神経細胞膜が自然に持っている抵抗と容量（コンデンサー）の特性に加えて、インダクタンス（コイル）成分の役割をするイオンチャネルが加わることで発現するとされる。しかし、関与するイオンチャネルと resonance 発現におけるその機能的意義については多くが不明なままであった。</p> <p>本研究では、resonance 特性に関わるイオンチャネルの同定を目的として、延髄下オリブ核（Inferior olive, IO）ニューロンを解析対象として実験を行った。マウス延髄から急性冠状断スライスを作成し、顕微鏡下で IO ニューロンからホールセルパッチクランプ法を用いて電流、電圧記録を行った。Resonance 特性の評価のために、振幅は一定だが周波数が徐々に高くなる（0～40Hz, 40s）サイン波状電流（Chirp 電流）を加え、出力される電圧変化を計測した。Resonance 特性を持つ細胞では、ある特定の周波数の電流に対する電圧が大きくなる特徴が現れる。このため、入力電流の振幅は平坦であるのに対し、出力電圧は全体的に山状の変化を示すようになる。イオンチャネルの種類を同定するため、Cav3.1 T 型電位依存性 Ca²⁺チャネル（Cav3.1）、hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1（HCN1）の遺伝子欠損（KO）マウスも実験に使用した。</p>			

野生型マウスの IO ニューロンでは、入力電流の周波数が 3-5Hz の時に出力電圧が最大となるような山形の電圧変化を示し、resonance 特性をもつことが確認された。この野生型 IO ニューロンの resonance 特性は、Ca²⁺-free の細胞外液で灌流することにより減弱したため、Ca²⁺を透過するイオンチャネルの関与が想定された。イオンチャネルの同定の為、下オリブ核に強い発現が見られる Cav3.1 KO マウスを用いて同様の解析を行った所、Ca²⁺-free 外液の実験と同様な resonance 特性の減弱が見られた。この結果から、Cav3.1 が resonance 特性を増強する役割を持つことが示唆された。

Cav3.1 KO IO ニューロンでは、resonance 特性は大幅に減弱したが、完全に消失はしなかった。この結果は Cav3.1 以外のイオンチャネルの関与を示唆する。他の候補として HCN チャネルの関与を解析する為、HCN チャネルの阻害剤である ZD7288 (20 μ M) を投与した処、Cav3.1 KO で残存している resonance 特性は完全消失した。ZD7288 の投与を野生型マウスにおいても行った所、Cav3.1KO マウスでは減弱のみで消失はしなかった resonance 特性が完全消失した。この結果は、Cav3.1 よりも HCN のほうが resonance 発現に関して必須であることを示唆する。Resonance 特性は、HCN1 KO マウスにおいても同様に消失していた。上記の結果から、resonance 特性の発現には HCN1 が必須であることが明らかとなった。

最後に、IO ニューロン上の Cav3.1 チャネルと HCN1 チャネルの分布について形態学的解析を行った。凍結切断レプリカ標識法を用いて電子顕微鏡で観察した処、神経樹状突起の形質膜上でお互い集塊を形成し、両者は共存していないがごく近接して存在していることが判明した。以上の結果から、両チャネルは IO ニューロンの樹状突起上で電氣的に相互作用しうる距離に存在していることが分かった。

本研究により、細胞膜 resonance 特性の発現には、Cav3.1 と HCN1 のイオンチャネルが関与することが明らかとなった。特に、HCN1 は resonance 特性発現に必須であり、周波数依存的な特性が主体となるのに対し、Cav3.1 は HCN1 依存的な resonance を大幅に増強する役割を持っていることが判明した。本研究は、不明な点が多い神経細胞が刻むリズムの機能的意義の解明に大きく貢献すると思われる。よって審査委員会委員全体は、本論文が槇殿佳子に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。