

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	松岡 利典
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論 文 題 目 Molecular mechanisms for the resonance property in the inferior olivary neurons (下オリーブ核ニューロンの resonance 特性に関わる分子メカニズムの解明)			
論文審査担当者			
主 査 教授	相澤 秀紀	印	
審査委員 教授	川上 秀史		
審査委員 教授	丸山 博文		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>延髄に存在する下オリーブ核(inferior olive; IO)のニューロンでは、サイン波状の周期的閾値下膜電位オシレーション (subthreshold membrane potential oscillation; STO) が起こることが知られているが、その発生メカニズムについては多くが不明なままである。申請者が所属する研究室では STO 発生の基盤となると考えられている細胞膜の電気的特性として、resonance 特性と呼ばれる、ある特定の周期の電流入力を増幅された膜電位変化として出力する性質に着目し、STO 出現のメカニズムの一端を明らかにすることを目的として研究を行っている。これまでの先行研究から、IO ニューロンにおける resonance 特性の発現には Hyper polarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1 (HCN1 channel)が resonance 特性に必須であることが明らかになっている (Matsumoto-Makidono et al., 2016)。また同時に、IO の resonance 特性は E-4031 を加えることで減衰することも判明していた。E-4031 は Kv11 型電位依存性 K⁺チャネルの阻害剤であるため、Kv11 の resonance 特性への関与が予想されたが、分子実態や機能的意義については不明であった。</p> <p>本研究では、Kv11 の resonance 特性発現への関与をさらに深く解析するため、HEK293 細胞にリポフェクション法を用いてそれぞれの遺伝子を発現させ、resonance 特性と STO の発現への影響を解析した。3 種類ある Kv11 のサブタイプのうち、IO において記録された Kv11 電流が Kv11.3 と類似の特性を示したことから、本研究では Kv11.3 (Kenh7) に着目した。また、IO での resonance 特性への関与が判明していた HCN1 についても同様に発現実験を行った。レポーター遺伝子の蛍光を指標に発現している細胞を同定し、whole-cell patch clamp 法を用いて膜電位もしくは膜電流の計測を行った。resonance 特性を解析するため、周波数が時間に対して線形に早くなる振幅一定のサイン波状の電流 (chirp 電流) を注入し、得られた膜電位変化から細胞膜のインピーダンスの周波数依存性を計算した。通常の細胞のインピーダンスは周波数増加に対して徐々に小さくなるが、resonance 特性が見られる細胞では、3-10Hz の部分をピークに山状の変化を示す。この山状の変化の出現を指標として resonance 特性を評価した。</p> <p>外来遺伝子を発現していない HEK293 細胞では resonance 特性を示す細胞は見られなかったが、Kv11.3 単独発現では約半数の細胞 (57%、20/35) において、浅い膜電位で resonance 特性が見られた。Resonance の強度を表す指標と、同じ細胞で記録された Kv11.3 の電流値との間に相関関係はでなかったものの、コンダクタンスが増加するにつれて resonance 特性を持つ細胞の割合が多くなる傾向が</p>			

あった。また Kv11.3 単独発現の resonance 特性を示す細胞の内、約半数の細胞（47%、7/15）で STO が観察された。一方、HCN1 を単独発現した HEK293 細胞では resonance 特性と STO は見られなかった。細胞膜における HCN1 の発現量が不十分であるために resonance 特性と STO が見られない可能性を検証するため、HCN1 の細胞膜への発現を促進する Tetratricopeptide Repeat-Containing Rab8b-Interacting Protein (TRIP8b) を HCN1 と共発現させた。その結果 HCN1 電流は増強したが、resonance 特性と STO は依然として観察されなかった。

今回の解析により、Kv11.3 を HEK293 細胞に発現させると resonance 特性を発現できることが分かった。また、Kv11.3 を発現した約半数の細胞で自律的な膜電位オシレーションが見られた。これらの結果は、Kv11.3 が resonance 特性と STO の発現に必須な因子であることを示している。一方で、以前の IO ニューロンの解析から関与が想定されていた HCN1 を発現させた HEK293 細胞では、resonance 特性と STO は見られなかった。但し、HCN1 依存的な resonance 特性と STO には他の補助サブユニットなどが必要である可能性も考えられるため、この点については今後さらに解析を進めていく必要があると考えられた。

以上の結果から、本論文は培養細胞による外来性タンパク質発現系を用いて resonance 特性の発現に関わる遺伝子の解析を行った初めての研究であり、学術的価値が高い。これまで分子メカニズムの詳しい解明が進んでいない STO や resonance 特性の機序の解明に大きく貢献することが期待される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	松岡 利典
学位授与の条件	学位規則第4条第①2項該当		
論文題目 Molecular mechanisms for the resonance property in the inferior olivary neurons (下オリーブ核ニューロンの resonance 特性に関わる分子メカニズムの解明)			
最終試験担当者			
主 査 教授	相澤 秀紀	印	
審査委員 教授	川上 秀史		
審査委員 教授	丸山 博文		
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判定 合格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月10日の第2回研究科発表会（MD-PhD コース）及び平成31年1月29日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> HCN1 ノックアウトマウスの機能的異常 HCN1 と Kcnh7 の共発現が細胞機能に与える影響 レポーター遺伝子の発現強度とイオンチャネルの発現量との関連 HEK293 細胞を外来遺伝子発現系として使用した理由 Resonance 特性と閾値下膜電位オシレーションの下オリーブ核における機能的意義 Kv11.3 mRNA の分布パターンについて <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			