

氏 名 児玉 貴史

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1010 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 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 Physiological and morphological studies on cerebellar
synapses of $Ca_v2.1$ mutant mice rocker

論文審査委員 主 査 教授 伊佐 正
教授 井本 敬二
教授 重本 隆一
教授 平野 丈夫（京都大学）

論文内容の要旨

The *rocker* mice are hereditary ataxic mutants, which carry a point mutation in the gene encoding the Ca_v2.1 (P/Q-type) Ca²⁺ channel α_1 subunit. They show the mildest phenotypes among the reported Ca_v2.1 mutant mice, allowing us to evaluate primary symptoms caused by the Ca_v2.1 dysfunction. Although the basic properties of the *rocker* mutant channel have been reported, their influence on physiological functions remains unclear. Here, we studied the impacts of the *rocker* mutant Ca²⁺ channel on synaptic transmission especially in cerebellar Purkinje cells, where Ca_v2.1 Ca²⁺ channel mediates a major activity-dependent Ca²⁺ influx. Despite of the small changes in channel function, synaptic transmission in the parallel fiber (PF)-Purkinje cell (PC) synapses was severely impaired, whereas the climbing fiber inputs onto PCs appeared to function normally. We further explored the origin of the transmission impairment in the PF-PC synapses in *rocker* mice. Presynaptic functions of the PF-PC synapses, however, were unexpectedly normal in terms of paired-pulse facilitation, sensitivity to extracellular Ca²⁺ concentration, and glutamate concentration in synaptic clefts. Electron microscopic analyses including freeze-fracture replica labeling revealed that both the number and density of postsynaptic AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptors substantially decreased without gross structural changes of the PF-PC synapses. We also observed an abnormal arborization of PC dendrites in young adult *rocker* mice (1 month of age). These lines of evidence suggest that the *rocker* mutation exerts its influence especially on postsynaptic structures and functions in the PF-PC synapses.

論文の審査結果の要旨

電位依存性カルシウムチャネルは膜電位依存的に細胞内へのカルシウム流入をもたらし、多様な生理応答のトリガーとしての重要な機能を担っている。また、電位依存性カルシウムチャネルの機能異常は様々な人の疾患の原因であることも知られており、チャネル機能異常が疾患発症に至るメカニズムの解明が強く望まれている。これまでに電位依存性カルシウムチャネルの1種である $Ca_v2.1$ に変異をもつ自然発症変異マウスが複数系統報告されており、有望な疾患のモデル動物として期待されている。申請者は $Ca_v2.1$ 変異マウスの1系統である *rocker* マウスを対象に小脳皮質シナプスの機能解析を行った。*rocker* マウスは $Ca_v2.1$ に1アミノ酸置換変異を持ち、運動失調や動眼運動異常等の神経疾患を呈するが、その程度は他の $Ca_v2.1$ 変異マウスと比較して最も軽いことが知られている。また、*rocker* 変異の $Ca_v2.1$ チャネル機能への影響も大変軽度であることが知られており、*rocker* マウスの解析を通じて $Ca_v2.1$ 機能不全の引き起こす基本的な病態とその発症メカニズムを検討することが出来ると期待された。申請者はスライスパッチクランプ法を用いて小脳皮質プルキンエ細胞上の2種類の興奮性シナプス(平行線維-プルキンエ細胞シナプス、登上線維-プルキンエ細胞シナプス)について *rocker* 変異の影響を検討したところ、両シナプスにおいて有意な変化が認められ特に平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおいては著しい EPSC の減少が明らかになり、神経疾患の一因となっていることが示唆された。一方登上線維-プルキンエ細胞シナプスの変化は、complex spike の波形に有意な影響を与えない程度のものであり、生理条件下での登上線維入力はいずれのマウスにおいても正常に機能していることが示唆された。平行線維-プルキンエ細胞シナプスの機能異常の原因をさらに追究したところ、電気生理学的検討から平行線維終末からの伝達物質放出は正常であることが示され、また SDS-FRL 法による免疫電顕解析からシナプス後部の AMPA 受容体の数が顕著に減少していることが明らかになった。また、ビオチン化デキストランアミン標識によるプルキンエ細胞樹状突起形態の詳細な解析の結果、*rocker* マウスにおいて樹状突起伸展パターンが有意に変化していることが示された。これらの一連の結果より、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの機能がプルキンエ細胞上の $Ca_v2.1$ に特に強く依存していることが示され、またプルキンエ細胞樹状突起の形態が細胞内カルシウムレベル依存的に調節・維持されている可能性が示唆された。本研究により明らかにされたシナプス機能異常とその発症メカニズムは、軽度な $Ca_v2.1$ 機能異常によりもたらされたことから考えて、 $Ca_v2.1$ 機能異常のもたらす一般的な病態の1つであると考えられる。

本研究は $Ca_v2.1$ チャネルの機能異常が引き起こす病態を、電気生理学的実験手法と免疫電子顕微鏡による解析を組み合わせることで明らかにした優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資する重要な研究である。従って論文は学位論文として十分な内容を有していると審査委員会において全会一致で判定された。