

氏 名 柴 田 理 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第436号

学位授与の日付 平成11年9月30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4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Molecular Basis and Developmental Role of Voltage-gated
Potassium Currents in Cerebellar Granule Cells

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 井本 敬二
教 授 池中 一裕
教 授 川口 泰雄
教 授 岡田 泰伸
教 授 倉橋 隆（大阪大学）

During neuronal differentiation and maturation, electrical excitability is required for proper gene expression and formation of synapses. Expression of ion channels is important for this process, especially, voltage-gated K⁺ channels play as the key determinants of membrane excitability. Although a large number of K⁺ channel genes have been cloned, little is known about the molecular mechanisms that regulate membrane excitability in differentiating neurons. In this study, he focused on the expression of voltage-gated K⁺ channel genes in mouse cerebellar granule cells during developing. He also identified molecules underlying the generation of the K⁺ current component and clarified its effect on the membrane excitability.

To understand developmental regulation of specific channel genes, he examined the expression of voltage-gated K⁺ channel genes by in situ hybridization and immunohistochemistry in brain sections and cultured cells. Among the subunits of K⁺ channel genes found in adult cerebellum, Kv3.1 and Kv4.2 mRNA was detected in developing granule cells. Particularly, Kv4.2, which gives rise to A-type current when expressed in *Xenopus* oocyte, was detected in premigratory zone (PMZ) in vivo, indicating that postmitotic granule cells begin to express Kv4.2 before migration. This result corresponds to the increase in the A-type current in developing granule cells as reported by Wakazono et al. (1997).

It is possible that the increase in A-type current affects the membrane excitability. Therefore, he measured developmental changes of action potential in cultured granule cells using whole-cell patch clamp method. In addition to A-type current, he found that Na⁺ currents also increased during development. Accompanying the increase in both currents, action potential waveform changed from a non-spiking type to a repetitive firing type.

Finally, in order to elucidate whether Kv4.2 is responsible for the A-type currents, and in order to assess the effect of Kv4.2 on action potential waveform, he transfected cDNA encoding a dominant-negative mutant Kv4.2 (Kv4.2dn) and a wild-type Kv4.2 into cultured cells by a lipofection method. Expression of Kv4.2dn resulted in elimination of A-type current in the granule cells. This result demonstrates that members of Kv4 subfamily are responsible for the A-type current in developing granule cells. Moreover, the elimination of A-type current resulted in shortening of latency to first spike generation. In contrast to Kv4.2dn, expression of wild-type Kv4.2 gave rise to delay of the latency. This indicates that appearance of A-type current is critically required to suppress the excitability of granule cells during maturation.

論文の審査結果の要旨

神経細胞による活動電位発生は神経情報伝達に必要なだけでなく、シナプス形成以前から発生し、発達・成熟に伴う遺伝子発現やシナプス形成にも影響を及ぼすことが知られている。ナトリウムチャンネルの発現は興奮性を獲得するための中心的な働きをしていることは当然であるが、カリウムチャンネルも膜興奮性の獲得に重要な役割を果たしていることが分かってきた。しかしながらカリウムチャンネルにはいろいろなサブファミリーが存在することが知られており、神経細胞の発達過程においてどのタイプのカリウムチャンネル分子が興奮性の獲得に関与しているかは不明であった。

申請者は、まず *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて発達途上の小脳顆粒細胞に、いずれのタイプのカリウムチャンネルが発現しているかを検討した。その結果、Kv3.1 と Kv4.2 が主に発現していることが示された。Kv3.1 は初期より発現しているのに対して、顆粒細胞が一過性 A タイプカリウム電流を示し活動電位を発するようになる時期に Kv4.2 が出現してくることが示された。この時期にはナトリウム電流も増大してくる。

さらに申請者は、Kv4.2 の発現と A タイプの電流との関係を明らかにするために、小脳顆粒細胞の培養を用いて、正常の Kv4.2 の過剰発現とドミナント・ネガティブな Kv4.2 の発現が、A タイプ電流や活動電位発生に及ぼす影響を電気生理学的に検討した。その結果 Kv4.2 は A タイプ電流を担っていること、その A タイプ電流の存在により脱分極電流の注入から活動電位発生までの時間を長くすることが実験的に示された。

カリウムチャンネルには多くのサブファミリーが存在するが、選択的な薬剤は少ないため、いずれのタイプのカリウムチャンネルが発達途上でどのような役割を担っているかはほとんど未知であった。本論文は分子生物学を基礎に形態学と電気生理学を巧みに組み合わせ、神経細胞の興奮性獲得のメカニズムを分子レベルから解明することを試みたものであり高く評価される。本論文の一部はすでに論文として国際誌に掲載されており、さらに電気生理学的な解析を中心とした解析は近く投稿される予定である。

申請者の論文は発達段階の神経細胞において、ある特定の遺伝子由来のカリウム電流がどのように膜興奮性を変化させるか、またその電流の特異的な操作方法を示したものである。これらの知見は今後の神経発生・発達の研究方法にも大きな影響を与えるものであり、学位論文として十分ふさわしい内容であるものと審査委員会で一致して判定した。

学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容および周辺の知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置付け、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するに十分なレベルにあると判断された。

また、本論文は平易な英語で書かれており、また一部は英語論文として発表されていることから、申請者の語学能力は十分であると判断された。以上、総合的に判断し学位を取得するに足る水準に達しているものと判断した。