

氏 名 柴 崎 貢 志

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第560号

学位授与の日付 平成13年9月28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 Mossy Fiber Contacts Trigger the Localization of Kv4.2
to Dendrites and Synapses in Developing Cerebellar
Granule Neurons

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	井本 敬二
	教授	重本 隆一
	教授	河西 春郎
	教授	池中 一裕
	教授	岡村 康司（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター）

Neurons express a variety of ion channel genes to exert their diverse activity. Each gene product localizes in a specific subcellular compartment. This targeted localization of ion channels is indispensable for the channels to function properly. In this study, he focused on Kv4.2 voltage-gated K^+ channel and investigated how the localization of this channel is regulated in cerebellar granule neurons. The Kv4.2 channel in vivo is found in glomeruli, where the dendrites of the granule cells and mossy fibers form synapses. However, immunocytochemical staining of the cultured granule cells showed that the localization of Kv4.2 was restricted to the cell body. He hypothesized that this is due to lack of proper triggering signal, possibly provided by the excitatory synaptic input from mossy fibers. Thus he developed a co-culture with pontine gray nucleus, an origin of mossy fibers and asked whether the Kv4.2 channels resume their normal localization. In the new co-culture system, mossy fibers formed large synapsin-I positive clusters found on the mossy fiber, which were associated with PSD-95 on granule cell dendrites. The synapse-like structures were formed between mossy fibers and granule cell dendrites. Kv4.2 was co-localized with this structure. Therefore, contacts with mossy fibers induced targeting of the Kv4.2 channels from soma to dendrites and synapses in the granule cells. Treatment of the culture with presynaptic exocytosis inhibitors, tetrodotoxin, ω -conotoxin, or botulinum A toxin, disrupted the clustering of Kv4.2 at the synapse-like structure. Interestingly, mossy fiber contacts induced synaptic targeting of both Kv4.2 and NR1 that is a NMDA receptor subunit. The synaptic localization of Kv4.2 was regulated by the activation of NMDA- and/or AMPA-receptors, while activity blockage increased synaptic targeting of the NR1 subunit. These results indicate that the synaptic targeting of the two channels/receptors is regulated in a reciprocal manner by the activity. This differential regulation ensures effective changes in synaptic excitability and should be involved in synaptic maturation as well as in synaptic plasticity.

本研究は、電位依存性カリウムチャネル Kv4.2 の局在化メカニズムを検討したものである。

神経細胞には様々な機能分子が発現し脳の機能を担っている。これらの分子は細胞体・軸索・樹状突起などに限局的に存在して機能することが多く、分子の局在化メカニズムを明らかにすることは脳機能の解明に不可欠である。電位依存性カリウムチャネルは、神経細胞の興奮性調節に中心的役割を果たしているが、シナプス部位への局在化メカニズムに関しての研究はほとんど行われていない。

Kv4.2 カリウムチャネルは、小脳顆粒細胞の発達過程で発現がはじまり、活動電位の発生を制御する分子である。生体内において、Kv4.2 は未成熟な顆粒細胞の細胞体に集積しているが、成熟した顆粒細胞では樹状突起、シナプス部位への局在が観察される。一方、小脳微小組織片培養系(CMC)では、生体内の場合と同様に顆粒細胞の成熟に伴って Kv4.2 の発現が観察されるが、Kv4.2 は細胞体に集積しシナプス部位への局在化は見られない。

申請者は、CMC 培養系で Kv4.2 のシナプス局在化が起こらない原因として、シナプス形成の欠如を考え、その可能性を検証するために、小脳顆粒細胞への主な入力である苔状線維を出す橋核の組織片との共培養系を開発した。この共培養系では、苔状線維と顆粒細胞の間にシナプスが形成され、Kv4.2 は樹状突起、シナプス部位へと移行した。薬剤を用いてグルタミン酸放出を抑制する、あるいはグルタミン酸受容体をブロックすることにより、Kv4.2 のシナプス部位への局在化は有意に抑制された。さらに CMC の単独培養系で、グルタミン酸あるいはグルタミン酸受容体アゴニストである NMDA または AMPA を添加することにより、Kv4.2 の樹状突起への移行が観察された。これらの結果より、苔状線維から放出されるグルタミン酸が Kv4.2 のシナプス部位への集積を引き起こす主要な分子であることが示唆された。

生体内においても、培養細胞系と同様のメカニズムで Kv4.2 の局在化が起こるかを検討するために、橋核に蛍光色素 DiI を注入し、苔状線維の小脳内顆粒層への伸展時期とシナプス形成、および Kv4.2 の局在化の関係を調べた。その結果、Kv4.2 のシナプス部位への移行はシナプス後構造の成熟化の後に起こることが確認され、培養系で得られた結果が生体にも適応できることが示された。

申請者は、NMDA 受容体の局在化に関しても検討を行った。NMDA 受容体は、CMC 単独培養では細胞体に蓄積するのに対して、橋核との共培養ではシナプス部位に Kv4.2 と共局在しており、NMDA 受容体の局在化も神経活動依存的に制御されていることを見いだした。さらにシナプス活動が増加すると Kv4.2 がシナプス部位で増加し、シナプス活動が低下すると NMDA 受容体がシナプス部位で増加するという、逆の局在化メカニズムを持つことを見出した。

本論文は小脳と橋核の共培養系を巧みに用い、脳の重要な機能分子である Kv4.2 および NMDA 受容体の局在化機構を解析したものであり、単に発生過程における局在の変化ではなく、神経活動にともなう局在化の変化を見出した点において高く評価される。よって申請者の論文は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、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。