

氏 名 井 上 華

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第699号

学位授与の日付 平成15年3月24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 Volume-sensitive chloride channel in cerebral

neurons: its properties and roles

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 伊 佐 正

教授 岡 田 泰 伸

教授 重 本 隆 一

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）

論文内容の要旨

Because persistent swelling causes cell damage and often results in cell death, volume regulation is an important physiological function in both neuronal and non-neuronal cells. Brain cell swelling has been observed not only in various pathological conditions such as seizure, ischemia and excitotoxicity, but also during physiological synaptic transmissions. Volume-sensitive anion channels have been reported to play an important role in the regulatory volume decrease (RVD) after anisotonic swelling in many cell types. Thus, it is important to examine whether brain cells functionally express volume-sensitive anion channel.

In this study, she first studied whether or not cerebral neurons possess volume-sensitive anion channels. Using the whole-cell patch-clamp technique, she recorded Cl^- currents activated by exposure to hypotonic solution (90% osmolality) in cortical neurons in primary culture derived from mouse embryonic cerebra. This Cl^- current exhibited outward rectification, time-dependent inactivation at strong depolarizing potentials ($>+120$ mV), low-field anion permeability sequence of $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{gluconate}^-$, and sensitivity to Cl^- channel blockers, such as 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB, 80 μM), 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS, 400 μM), and phloretin (100 μM), but not to tamoxifen (10 μM) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 nM). Single-channel recordings revealed that the unitary chord conductance of this channel was 21 pS at +100 mV.

To investigate the involvement of this Cl^- channel in neuronal RVD, she performed time-lapse recordings of the neuronal images using two-photon microscopy under sustained hypotonic conditions. A hypotonic challenge (65%) induced rapid neuronal swelling followed by RVD, and this volume regulation was strongly inhibited by NPPB (100 μM). Moreover, a K^+ channel blocker, quinine (500 μM), also inhibited the RVD, suggesting that activation of both K^+ and Cl^- channel is necessary for the RVD process after hypotonic swelling in neurons.

Excitotoxicity is known to induce neuronal cell swelling both *in vivo* and *in vitro*. Under the patch-clamp whole-cell configuration, she demonstrated that volume-sensitive Cl^- channels were activated after exposure to an excitatory amino acid (30 μM N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) or 1 μM α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) *plus* 2.5 μM cyclothiazide). This activation was found to be associated not only with somatic swelling but also with varicosity formation.

This study provides the first demonstration which clarifies that cortical neurons possess the volume-sensitive anion channel. Electrophysiological and pharmacological properties of this channel are similar to those of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel reported in many other cell types. As in other cell types, it was demonstrated that in cortical neurons the volume-sensitive anion channel is involved in volume regulation after hypotonic swelling. Furthermore, the present study showed that hyperexcitation can also activate volume-sensitive anion channels in cortical neurons.

論文の審査結果の要旨

申請者の研究は培養された大脳皮質ニューロンにおける容積感受性Cl⁻チャネルの存在とその浸透圧性細胞膨張後の調節性容積減少 (regulatory volume decrease; RVD) に対する寄与を実験的に証明したものである。

容積感受性Cl⁻チャネルは、浸透圧性細胞膨張後の調節性容積減少 (regulatory volume decrease: RVD) において重要な役割を果たしているということが、多くの細胞で報告されている。持続的な細胞膨張は細胞を傷害し、時として死に至らしめることもあることから、容積調節は神経細胞を含め、すべての動物細胞で生理的に重要な機能である。神経細胞の膨張は、虚血や過興奮時などの病態下のみならず、生理的な神経伝達の際にも観察されており、神経細胞の容積調節は興味深い topic である。

本研究では、大脳皮質神経細胞に容積感受性Cl⁻電流の存在を初めて確認し、その電気生理学的性質をpatch clamp法により明らかにした。大脳皮質神経細胞において低浸透圧刺激により活性化されるCl⁻電流は、これまでに他の細胞で報告されている容積感受性Cl⁻チャネルに類似する性質を示し、外向き整流性、強い脱分極電位で時間依存性の不活性化を示し、low-field anion permeabilityで、Cl⁻チャネルブロッカーのNPPB、DIDS、phloretinによってブロックされ、intermediate single-channel conductanceであった。また、このCl⁻チャネルは、他の細胞と同様にRVDに関与していることが示唆された。

神経細胞の膨張は主に病態下で観察されていることから、次に過興奮によって膨張した場合にも、この容積感受性Cl⁻チャネルが活性化されるかどうかを検討した。過興奮性の刺激としてNMDA、あるいはAMPAに10分間曝露すると、varicosity formation (dendriteの局所的な膨張) を伴って、Cl⁻チャネルが活性化されることが明らかになり、そのcurrent profileからこの電流は容積感受性Cl⁻電流であることが強く示唆された。過興奮時にこのチャネルが活性化されることの生理的意義は未だ明らかではないが、興奮性細胞毒性 (excitotoxicity) に関与することが示唆されている。

以上、本研究は、大脳皮質ニューロンにおける容積感受性Cl⁻チャネルに関する最初の系統的な記述であり、高度な電気生理学的手法と2光子レーザー顕微鏡による形態観察を駆使したハイレベルの研究である。このことから関連分野に今後大変大きなインパクトを与えることが予想される重要な研究である。これらのことから申請者の論文は学位論文として十分にふさわしい内容であるものと審査委員会の委員全員一致で判定した。

学問的背景や実験手法の詳細、さらに今後の展望について口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も満足すべきものであった。本論文は明瞭な英語でかかれており、申請者の英語力も十分なものであると判定した。以上、総合的に判断し、学位取得に足る水準に十分に達しているものと判断した。