

氏 名 納 富 拓 也

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第728号

学位授与の日付 平成15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 Immunohistochemical Localization of  
I<sub>h</sub>Channel Subunits,HCN1-4,in the Rat  
Brain

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	川口 泰雄
	教授	重本 隆一
	教授	伊佐 正
	副参事研	高田 昌彦 (東京都神経科学総合研究所)
	究員	

Hyperpolarization-activated cation currents, termed  $I_h$ , were discovered in the heart and brain. These currents contribute to various physiological properties and functions, including neuronal pacemaker activity, the setting of resting potential and dendritic integration. The Hyperpolarization-activated and Cyclic-Nucleotide-gated nonselective cation channels (HCNs: HCN1-4), which generate  $I_h$ , have been cloned recently. To understand the functional diversity of  $I_h$  in the brain, precise immunohistochemical localization of all four HCNs is needed. Here we present the distribution and subcellular localization of immunoreactivity for HCNs in the rat brain using newly raised guinea pig polyclonal antibodies against fusion proteins containing rat HCN sequences. Immunoblot analyses of the rat brain with these antibodies showed single bands, which disappeared after adsorption of the antibodies with the respective antigens, suggesting specificity of these antibodies to each HCN subunit.

Then, we performed immunohistochemical investigation of HCNs in the rat brain. Immunoreactivity for all HCN subunits was detected with various intensities in neuropil throughout the brain. For HCN3 and HCN4 but not for HCN1 and HCN2, immunoreactive neuronal cell bodies and processes were clearly visible in light microscopic level in many brain regions. HCN1: Intense HCN1-like immunoreactivity (LI) was observed in the main olfactory bulb, cerebral cortex, stratum lacunosum moleculare (LM) of the hippocampal CA areas, superior colliculus, inferior olive, area postrema, hypoglossal nucleus and molecular layer of the cerebellum. HCN2: HCN2-LI was widely distributed throughout the brain being most intense in the cerebral cortex, thalamus, inferior colliculus, brain stem and granular layer of the cerebellum. The immunoreactivities for HCN1 and HCN2 were overlapped in layer I of the neocortex and the LM of the CA areas. In electron microscopic level, immunogold particles for HCN1 and HCN2 were found dense along the plasma membrane of distal dendrites of pyramidal cells in the neocortex and CA1 area. The HCN2-immunopositive small glia-like cells were observed throughout the brain including the white matter. HCN3: HCN3-LI was mainly distributed in the main and accessory olfactory bulbs, piriform cortex, preoptic area, habenular nuclei, hypothalamus, interpeduncular nuclei and inferior olivary complex. In the flocculus of the cerebellum, intense HCN3-LI was observed in the cholinergic terminal and axon. HCN4: The distribution pattern of intense HCN4-LI was restricted to the thalamic nuclei and some other regions such as the external plexiform layer of the main olfactory bulb, nucleus of the lateral olfactory tract, fasciculus retroflexus, lateral lemniscus, ventral cochlear nucleus, superior olivary complex, ventral cochlear nucleus, and area postrema.

We found that all four HCN-LIs were localized to presynaptic elements as well as to postsynaptic elements. In presynaptic elements, immunoreactivity for HCNs was often found in preterminal and axonal parts rather than in axon terminals. For example, in cerebellar basket cells, most of immunogold particles for HCN1 were found in the ponceau of the

basket cell, but only rarely localized to their terminals with symmetrical synapses. We also found immunoreactivity for HCNs in plasma membrane of myelinated axons in various regions including the fasciculus retroflexus and hippocampus.

Next, to identify HCN2-immunopositive small cells, we tried double immunostaining using the guinea pig anti-HCN2 antibody and mouse or rabbit antibodies for various markers including NeuN for matured neurons, GFAP for astrocytes, NG2 for oligoprogenitors, Iba1 for microglia-macrophages, and GST-p for oligodendrocytes. We found that all of the HCN2-positive cells were labeled only for GST-p throughout the brain except the amygdaloid areas and cingulate, perirhinal, and lateral entorhinal cortices, where we found only single labeled cells for GST-p. In addition, some of the double-immunopositive cells were particularly close to neuronal cell bodies and processes in the hippocampal pyramidal cell layer and cerebellar granule cell layer. In electron microscopic level, the HCN2-immunopositive cells had some clumps of heterochromatin along nuclear membrane and those clumps were eccentrically located in the soma, having similar properties to those of previously described perineuronal oligodendrocytes. These results suggest that HCN2-immunopositive small cells belong to a subpopulation of oligodendrocytes, including perineuronal oligodendrocytes.

In conclusion four HCNs have distinct distribution patterns in neuropil and neuronal cell bodies throughout the brain consistent with the reported patterns of distribution of mRNAs for HCNs. Our results indicate that HCNs are localized not only in somato-dendritic compartments, but also in axonal compartments of neurons. The HCN1 and HCN2 are co-localized in the distal dendrite of pyramidal cells in the hippocampus and neocortex and had similar distribution patterns in electron microscopic level, suggesting that these subunits could form the heteromeric channels. Interestingly, HCN2 is extensively expressed in a subpopulation of oligodendrocytes including perineuronal oligodendrocyte. These results support previous electrophysiological findings and further suggest diversified roles of  $I_h$  channels in the brain, which are not yet fully identified.

## 論文の審査結果の要旨

*I<sub>h</sub>* は、過分極によって活性化され、cAMP による調節を受け、1 価陽イオンに非選択的透過性を持つチャネル電流である。*I<sub>h</sub>* は、心臓や脳の様々な領域で発現しており、静止膜電位を決めたり、細胞内電位の周期的変動を引き起こしたりする過程に関与している。樹状突起においてシナプス電位や活動電位を統合して細胞体へ伝える特性にも影響すると考えられている。この電流を担うチャネル分子には、HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide-gated nonselective cation channel)と呼ばれる4つのサブユニット(HCN1-4)が存在することが最近明らかにされた。サブユニットごとに、活性化の時間経過と cAMP に対する感受性が異なるので、それぞれがどのような神経細胞に発現し、細胞内のどの領域に局在しているのかを明らかにすることは、*I<sub>h</sub>* を生じる神経細胞の機能や、HCN サブタイプの役割を理解する上で重要である。本研究では、HCN サブユニットすべてについて、特異的な抗体を作成し、中枢神経系全体での分布を免疫組織化学的手法で調べ、電子顕微鏡を用いて細胞内局在を検討した。その結果、中枢神経系の各領野の発現の違いや、細胞内分布の詳細が明らかとなり、それらの観察から HCN 発現パターンの特徴をいくつか見つけることができた。

- (1)HCN1 は皮質領域を中心として大脳皮質、小脳、海馬、上丘に、HCN3 と HCN 4 は主に皮質下領域の視床下部と視床にそれぞれ強い免疫反応が認められた。一方、HCN2 は脳領域全体に広く分布していた。
- (2)HCN1 と HCN 2 は海馬と大脳皮質錐体細胞の頂上樹状突起において遠位部ほど強い発現を示し、電子顕微鏡的には樹状突起の細胞膜に沿って同様の散在性局在パターンを示していた。
- (3)全ての HCN のサブタイプがそれぞれ特有の神経線維束に発現していた。電子顕微鏡的には、軸索終末前部の無髄線維や有髄線維の細胞膜上に多く陽性像が観察されたほか、軸索終末においてはシナプスから離れた細胞膜上に多くみとめられた。
- (4)HCN3 はアセチルコリン作働性神経細胞に発現しており、細胞体・樹状突起と軸索終末部の両方に局在していた。
- (5)小型の HCN2 陽性細胞は perineuronal oligodendrocyte を含む稀突起膠細胞であり、脳領域全域に広く分布していた。

*I<sub>h</sub>* を発生させる分子実体である HCN すべてのサブユニットの分布・細胞内局在を中枢神経系で系統的に調べた研究はこれまでになかった。本研究は、電気生理実験から得られた結果に対応する HCN サブユニットの発現を明らかにするのみでなく、現在までに *I<sub>h</sub>* の発現が予想されていなかった細胞や細胞内局在の詳細を明らかにしたものである。この仕事は、今後の脳における *I<sub>h</sub>* の役割の解明に大変貢献すると考えられる。以上、本論文は形態学的に質の高い新規の記載を含んでおり、学位論文として十分ふさわしいものであると審査委員会は判断した。

学位論文の内容説明の後、研究の背景、観察結果の解釈、生理的機能との対応などについて質疑応答がなされが、申請者は的確に説明した。申請者は自分自身の研究内容だけでなく、神経解剖学・生理学に関する知識も十分もっていると判断された。学位論文は明快な英語で書かれており、その一部については英文論文が既に発表されていることから、英語で論文を発表する能力も十分あるものと判断された。以上の結果から、申請者は学位を取得する水準に達しているものと審査委員会は判定した。