

氏 名	やま だ しん いち ろう 山 田 伸 一 郎
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2733 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Small conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels are the target of spike-induced Ca^{2+} release in a feedback regulation of pyramidal cell excitability. (錐体細胞の興奮性フィードバック制御のスパイク依存性カルシウム遊離は SK チャンネルを標的にしている)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 森 治 紀 教 授 中 西 重 忠 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

1,4,5-イノシトール三リン酸受容体 (IP3R) のリガンドとして1,4,5-イノシトール三リン酸 (IP3) とカルシウム (Ca^{2+}) とがあり、それらが協調して作用することが知られている。実際にカルシウムイメージング法を用いた実験で、IP3 存在下では細胞外からの Ca^{2+} 流入により IP3R を介して細胞内ストアから大量の Ca^{2+} が細胞内に放出されることが観察されていた (IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release)。この現象が膜興奮性抑制作用と関連していることは端緒的に報告されていたが、そのチャンネル機構の詳細は不明だった。

申請者はパッチクランプ法を用い、ラット視覚野 2/3 層錐体細胞にて電気生理学的実験を行った。電位固定下で短時間の脱分極パルスを与えると、脱分極パルスに引き続いて外向きの電流が観測される。これは電位依存性カルシウムチャンネル (VDCC) を介して流入した Ca^{2+} によって開く SK チャンネルを通る電流であった。ムスカリン受容体アゴニストのカルバコールなどで細胞内 IP3 を上昇させると、この外向き電流に加えて遅い外向き電流が流れるのが観察された。SK チャンネルのアンタゴニストのアパミンは、この 2 つの外向き電流を共に阻害した。また電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害剤の Ni^{2+} もこの 2 つの外向き電流を共に阻害した。また IP3 のブロッカーであるヘパリンは遅い外向き電流だけを阻害した。

ついで、高速のカルシウムイメージングによって、細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時記録した。脱分極パルスによって細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する。これは VDCC を介して流入した Ca^{2+} である。カルバコール投与下では脱分極パルス後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に引き続いて、大きく遅い Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。ヘパリン投与により遅い Ca^{2+} 濃度上昇は阻害された。アパミンを投与しても、この二相性の Ca^{2+} 濃度上昇は観測された。

これらの結果より、脱分極パルスに引き続いて流れる早い外向き電流においては VDCC から流入した Ca^{2+} が、遅い外向き電流においては IP3R から放出された Ca^{2+} が、それぞれ SK チャンネルを活性化して電流を生じさせていることが分かった。こうして IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release は SK チャンネルを開き膜興奮性を抑制しており、IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release の膜興奮性抑制作用は SK チャンネル開口を介するものであることが判明した。

さらに電流固定下の実験ではスパイク後過分極 (mAHP) がカルバコールにより大きくなった。また 500ms の通電記録では、spike frequency adaptation がカルバコールにより強められた。実際にスパイクによって VDCC から流入する Ca^{2+} が IP3 存在下では IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release を起こし、SK チャンネルを開いてスパイク発射を低下させていることが分かった。

このように、代謝的に産生される IP3 と、電気的活動によって細胞内に流入する Ca^{2+} とが協調して IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release を起こし、さらに SK チャンネルを介して神経細胞の膜興奮性を制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

1,4,5-イノシトール三リン酸受容体 (IP3R) のリガンドとして1,4,5-イノシトール三リン酸 (IP3) とカルシウム (Ca^{2+}) とがあり、それらが協調して作用する。IP3存在下では細胞外からの Ca^{2+} 流入によりIP3Rを介して細胞内ストアから大量の Ca^{2+} が細胞内に放出されることが報告されていた (IP3-assisted Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR))。しかしこの現象の働きは多くが未解明で、膜興奮性抑制作用と関連していることは端的に報告されていたが、その詳細は不明だった。

申請者は、ラット視覚野2/3層錐体細胞にて電気生理学的実験を行い、カルバコールによるムスカリン受容体刺激で脱分極パルス後の外向き電流が大きくなることを見いだした。そしてこの現象が、VDCCから流入する Ca^{2+} がIP3R存在下でIP3-assisted CICRを起こすことにより、SKチャネルを通る遅い電流を生じるためであることを確認した。さらに高速のカルシウムイメージングを行い、実際にカルバコール投与下で脱分極パルス後にIP3-assisted CICRが生じていることを観察した。また電流固定下の実験では、カルバコールによりスパイク後過分極が大きくなり、spike frequency adaptationも強められた。スパイクによって流入する Ca^{2+} が、IP3存在下ではIP3-assisted CICRを引き起こし、SKチャネルを開いてスパイク発射を低下させていることが分かった。このように、代謝的に産生されるIP3と、電気的活動によって細胞内に流入する Ca^{2+} とが協調して神経細胞の膜興奮性を制御していると考えられる。

以上の研究は、細胞内外のカルシウムによる神経細胞の興奮性制御機構の解明に貢献し、神経の情報伝達機構の解明に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年2月17日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。