

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	中 島 則 行
論文題目	Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice （HCNチャネルは、嗅細胞の自発発火頻度を制御し、嗅球への軸索投射に影響を与える）		
(論文内容の要旨)			
神経細胞の自発発火活動が、軸索投射・シナプス形成に影響を与えることが知られている。軸索投射の解剖学的構築がよく分かっている嗅覚神経系を用いて、自発発火活動の形成機構、またその制御による軸索投射への影響を、生化学、組織学、電気生理学、遺伝子工学を用いて検討した。 マウス嗅上皮のスライス標本を用いて、嗅覚受容神経細胞（嗅細胞）から大口径ガラス電極によるマルチユニット記録を行った。その結果、HCNチャネルが定常状態で活性化しており、膜を脱分極することで嗅細胞の自発発火をブーストすることを発見した。一方、嗅繊毛に局在して匂い応答に関わるCNGチャネルは、自発発火活動形成には関与が乏しいことを確認した。ホールセル電位固定法を用いた実験により、嗅細胞に発現するHCNチャネルは細胞内cAMPおよびPIP2の存在下に、静止膜電位付近でも十分に活性化されうることを確認した。また基底cAMPプールは、β2アドレナリン受容体の自発的な活性化と下流のアデニレートシクラーゼの活性化により維持されていることを見いだした。リアルタイムPCRおよび免疫組織化学により、HCN2およびHCN4サブユニットが嗅細胞の細胞体付近に強く発現していることを見いだした。そこで、cAMP感受性の最も高いHCN4サブユニットをTet-offシステムにより過剰発現するノックインマウスを用いて、HCNチャネル活性と、自発発火頻度および嗅球の形態形成の関連を調べた。このノックインマウスでは、嗅細胞の自発発火頻度が上昇すること、さらに嗅神経細胞の投射先である嗅球糸球体の数が減少し、嗅球が縮小することを見いだした。このTet-offノックインマウスにテトラサイクリン誘導体を投与してHCN4発現をノックダウンすると、自発発火活動が減少し、糸球体の数も回復することを確認した。 以上により、HCNチャネルの基底状態での活性化が、嗅細胞の自発活動の発火頻度を制御すること、その結果として嗅球での嗅神経細胞のネットワーク形成が制御されることが強く示唆された。またCNGチャネルとHCNチャネルを、嗅繊毛とそれ以外の部分にそれぞれ局在することで嗅細胞は区画化され、cAMPが匂い応答と自発発火活動という異なる生理機能に利用されていることが示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 神経の自発発火活動は、神経系に広く観察されており、個体の発達期だけでなく成体においても神経回路の形成・可塑性に影響を与える重要な現象である。嗅覚受容神経細胞（ORN）は、発現する匂い受容体の種類依存的に決められた嗅球内の位置に軸索投射して、二次神経と糸球体と呼ばれる構造をつくる。このネットワーク（嗅覚マップ）は、匂い受容体遺伝子の種類と関わっていること、ORN自発発火活動や細胞内cAMP濃度が重要であることは示唆されていたが、自発発火活動がどのように発生するのか、そしてどのように嗅覚マップに影響するのかは、不明であった。 申請者は、ORNから細胞外記録と全細胞記録を行い、cAMP依存的に開口するHCNチャネルがORNを脱分極することで自発発火活動を制御することを明らかにした。さらに組織学・分子生物学的手法を用いてORNにHCN₂および4サブユニットが多く発現することを明らかにした。そしてHCN₄チャネルを過剰発現するノックインマウスを用いて、自発発火活動がHCNチャネル活性と関連すること、さらに自発発火活動の頻度が上昇すると特に嗅球背側部の糸球体構造数が減少することを明らかにした。 以上の研究は、神経自発発火活動の内因的な制御機構を明らかにし、さらに活動依存的な回路形成機構の理解に貢献するもので、生理学の発展に寄与するところが多い。 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25年2月18日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			