

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 尾方 克久

本研究は神経細胞の興奮性細胞としての機能に重要な役割を担っている電位依存性ナトリウムチャンネルに着目し、分子種ごとの発現分布の特異性および多様性を解析することで、神経細胞の個性を規定する機構の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 分子生物学的手法を用いた電位依存性ナトリウムチャンネルの系統的探索により、新規のマウス電位依存性ナトリウムチャンネル α サブユニット遺伝子 *NaT/Scn11a* を同定した。この分子は予想されるアミノ酸配列からテトロドトキシン抵抗性と考えられ、その染色体座の周辺には他のテトロドトキシン抵抗性分子種 *Scn5a* および *Scn10a* が位置しており、これらの分子種の近縁性が示唆された。末梢感覚神経節（脊髄後根神経節、三叉神経節）と精巣に強い発現を認めたほか、脊髄、卵巣、胎盤、子宮、小腸にも分布した。末梢感覚神経節の中では、小径神経細胞に限局して発現し、この分子の痛覚伝導への関与が示唆された。
2. 電位依存性ナトリウムチャンネルの α サブユニット10種および β サブユニット3種について、ヒトおよびラット神経系のさまざまな部位における発現分布を、RT-PCR法を用いて系統的かつ網羅的に解析した。神経系に広く分布する分子種と、分布が局在する分子種があることが示された。同じ分子種でもヒトとラットの発現分布が必ずしも一致しなかった。
3. ヒト単一神経細胞を材料とした微量RT-PCR法を用いて、電位依存性ナトリウムチャンネル各分子種の発現分布を解析した。まず解析の素材となる単一神経細胞を、レーザーマイクロダイセクターを用いて回収し、RT-PCRに供した。微量PCRにおいては、鋳型核酸濃度が特定の低濃度の場合、PCR産物の検出にばらつきが生じることが予備実

験で示された。単一神経細胞を材料とした RT-PCR では、10 個の細胞を集めて RT-PCR を行なった場合と、1 個ずつの細胞で RT-PCR を行なった場合で、結果に齟齬がなく、再現性のある結果であることが示された。周囲の細胞成分の回収したサンプルへの混入や、メッセンジャーRNA の細胞内局在といった問題点はあるものの、解析した神経細胞に関してはおもに発現する分子種とほぼ発現のない分子種が明らかとなった。細胞ごとに結果にばらつきのある分子種は、細胞ごとの発現の差を反映する可能性と、発現が少量であることを反映する可能性が挙げられた。

以上、本論文は電位依存性ナトリウムチャンネルの神経系における発現分布の特異性および多様性を明らかにし、また新規分子の同定に成功した。神経系で重要な役割を果たす電位依存性ナトリウムチャンネルの分布を系統的かつ網羅的に解析した研究はこれまでになく、本研究における解析に用いた手法は疾患の病態解明や分子の機能解明への応用が期待され、学位の授与に値するものと考えられる。