

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650203

研究課題名（和文） 中脳黒質の抑制性軸索終末の構造・機能解析

研究課題名（英文） Structure-function analyses of inhibitory terminals in midbrain nucleus substantia nigra

## 研究代表者

山田 勝也 (YAMADA KATSUYA)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40241666

## 研究成果の概要（和文）：

イオンや低分子の通路の一種である細胞間のギャップ結合(GJ)が、成熟脳の神経軸索終末間に存在するか否かは不明である。そこで中脳黒質神経細胞の細胞体や樹状突起に終止する GABA 作動性軸索終末からのパッチクランプにより、GJ の存在を機能的に検証するための基礎技術を開発した。軸索終末をリアルタイムレーザー共焦点顕微鏡を用いて鮮明な 3 次元ライブ画像として可視化し、隣接する軸索終末を保存した *in vitro* 標本を樹立、目標達成へ向けた重要な技術課題をクリアした。

## 研究成果の概要（英文）：

It is a matter of debate whether the gap junction (GJ), a pathway for ions and small molecules between adjacent cells, exists between axon terminals in the adult brain. To approach the final goal demonstrating such GJs by patch clamping from adjacent axon terminals, the present study was designed as the first step. Three dimensional live images of a pair of adjacent GABAergic axon terminals, situated on a neuron side-by-side, were successfully obtained using a real time laser confocal microscopy. Some critical techniques were established in the present study towards the goal.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン、シナプス、神経回路

## 1. 研究開始当初の背景

ギャップ結合(GJ)は、隣り合う細胞間で電気および低分子の通路となり、全身のさまざま細胞同士の間に見られる重要な情報交換ルートである。成熟脳神経系においても、アストロサイト細胞間には広範に見られることは周知の通りである。

一方、脳の神経細胞間の GJ は、海馬や扁桃体など一部の神経核で樹状突起間や無髄の軸索束中に例が報告されている。しかし軸索終末間の GJ は未だ証明されておらず、もしその存在が明らかになれば脳における神

経情報処理機構の理解にとっても大きな転回点となる可能性がある。申請者らは、大脳基底核の出力を担当する中脳黒質網様部において、抑制性と考えられる軸索終末間に GJ 様構造を電子顕微鏡で観察したが、確かに GJ であるのか、決着していない。

また以前申請者らは、黒質網様部神経細胞に興奮性アミノ酸および GABA の両者の神経伝達を阻害しても停止しない非常に遅いオシレーション現象のみられることを脳スライス実験で報告し (Yuan, Yamada et al., *Neurosci. Lett.* 2004)、GJ の関与が想定される。さらに、黒質脳様部に隣接する緻密部

のドーパミン細胞が脱落するパーキンソン病を、黒質からの神経発火リズム異常として理解しようとする考え方が近年強まっている。こうした背景から、もし黒質神経細胞軸索終末同士の間には GJ が存在すれば、その機能的役割の解明は、大脳基底核の正常機能の理解に貢献するのみならず、パーキンソン病などの病態理解や基底核以外の脳の理解にも役立つものと期待される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、機能面からの GJ 検証に取り組む。黒質網様部神経細胞の大半は GABA 作動性の抑制性ニューロンであり、これらのニューロンへの主要入力線条体からの抑制性軸索ならびに黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの半回性抑制性側枝である。本研究では、これらの抑制性軸索終末からパッチクランプ記録を行うことを最終目標とし、実現に必要な基盤技術の開発を行なう。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究実施計画の概要

黒質細胞を機械単離し、軸索終末が結合した状態の細胞を得て、FM1-43 色素を取り込ませることで軸索終末を可視化する。二つ以上の本終末が隣接する部位で、複数の終末から同時にパッチクランプ記録を行ない、種々の手法で GJ を活性化した上、薬理的阻害により GJ の存在を検証することを究極の目標とし、必要な基盤技術を開発する。

### (2) 技術目標と方法

最初の大きな技術的目標は、黒質ニューロンを機械単離し、樹状突起もしくは細胞体と軸索終末とを識別して可視化することである。黒質網様部の主要ニューロンは GABA 作動性で、隣接する黒質緻密部の主要ニューロンはドーパミン作動性である。また黒質網様部には隣接する黒質緻密部に存在するドーパミンニューロンの樹状突起が隔々まで伸びており、その樹状突起表面には GABA 性軸索終末がシナプス結合している。

ドーパミンニューロンであるか、GABA ニューロンであるかは、これまでの研究により自発発火するスパイク幅や発火頻度から識別可能であるが、樹状突起と軸索、あるいは終末と終末とを明瞭に可視化、識別する安定な単離、観察方法を確立できなければ効率が悪く、複数の軸索終末からの同時記録はおぼつかないために重要なポイントである。

樹状突起・細胞体側から電氣的記録を行い、軸索終末と樹状突起とを電氣的に区別する

ため、さらには複数の軸索終末からの同時記録に必要な第二のマニピュレーターを導入する。以上により Venus 陽性 GABA 性軸索終末からの記録との同時記録に向けた技術課題を明らかにする。得られた研究成果は適切な形で発表を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 技術課題

軸索終末が保存されている *in vitro* 標本をどのようにして安定に得るかが最初の技術課題となった。申請者らは、酵素処理により黒質網様部や緻密部からコンスタントに神経細胞を急性単離してパッチクランプを行なった上、single cell リアルタイム RT-PCR により mRNA を同定する技術的方法を樹立しており (Yamada, 薬理学会シンポジウム 2011 など)、この方法は成熟動物にも応用可能である。しかしこれら通常の酵素処理による急性単離法では、軸索終末が外れた状態の神経細胞しか得られないため、機械単離法 (Akaike N. & Moorhouse AJ. Trends Pharmacol Sci. 24: 44-7, 2003) の使用を検討し、東北大学歯学部の高田寿彦助教のご協力を得て、同法を導入した。

### (2) 機械式単離法による軸索終末の保存

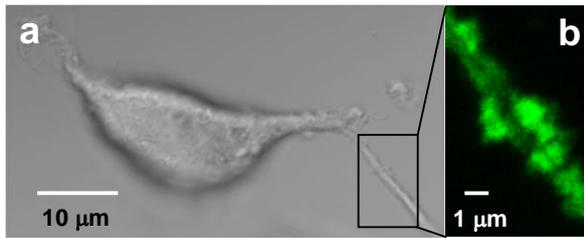
詳細は上記に譲り、本稿では簡単に記す。定法によりウレタン (1.4mg/kg) にて深麻酔したマウスを断頭後、脳を取り出し、トリミングの後、マイクロスライサーで厚さ 500 ミクロンの脳スライスを作成、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> を通気した Krebs-Ringer 液 (pH7.35) 中で回復させた (Yamada et al., Science 292: 1543-6, 2001)。機械単離には、ガラス微小電極の先端を様々なサイズに丸めたものを用い、ガルバノに接続して左右に振動できるようにした。位置は 3 次元機械式マニピュレーターで調節した。ガルバノの振幅は、カスタムメイドのアンプを用いてコントロールし、本アンプへの入力信号を Master8 (AMPI 社、Israel) で様々な振動数のパルスを生成して制御することにより振動数可変とした。

実体顕微鏡下、振幅、振動数、組織上での接触距離の制御、またガラス先端をマニピュレーターで動かす方法や速度を適切に調節することにより、最適条件を決定した。観察には急性単離細胞の電気生理実験用 HEPES buffer (pH7.35) を用いた。

### (3) FM1-43 色素による軸索終末の可視化

当初実施計画にあるように、先行研究で使用された FM1-43 (Life Technologies Inc) による方法をまず試した (図 1)。

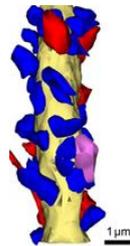
**図 1 中脳黒質から急性単離した神経細胞から伸びる樹状突起上に終止する軸索終末**



a, 幼若マウス中脳黒質網様部から機械単離した神経細胞の微分干渉(DIC)画像。黒四角部分は同神経細胞から伸びる樹状突起。b, 本神経細胞に FM1-43 色素を適用した上、a の黒四角の樹状突起部分に終止する軸索終末を 488nm レーザー光で蛍光可視化した共焦点顕微鏡画像。蛍光検出波長はプリズムとスリットにて 500nm 以上を long pass で観察した。

図 1b では、軸索終末の大きさ、形状が様々である。参考までに大脳皮質の抑制性神経細胞の樹状突起にシナプス結合する GABA 性軸索終末と非 GABA 性軸索終末の、電顕に基づく再構成画像を図 2 に著者の生理学研究所窪田芳之先生のご承諾を得て下記に転載する。

**図 2**



(Kubota Y. et al, Front Neural Circuits 3: (4) 1-10, 2009) GABA 性 (薄色) と非 GABA 性 (濃色) の軸索終末が示されている。

窪田先生の示されたシナプスと、FM1-43 でライブ染色した黒質神経細胞の樹状突起上のシナプス様構造は大きさ形ともによく類似している。しかし図 1b を見ると、うっすらと樹状突起の輪郭が見えるが、染色開始からパッチクランプ開始までの時間や観察時間が長くなるなどの条件で樹状突起や細胞体付近が強く染まり、軸索終末との明瞭な識別が難しくなった。すなわち 1) 蛍光像の経時的変化、2) 樹状突起も染まる点、3) パッチに至るまでの作業の煩雑さなどの問題点が判明した。本研究の対象となる黒質神経細胞への主要入力である抑制性終末はその大きさが極めて小さく、パッチに手間取る上に、黒質神経細胞は非常にデリケートなため、別法の導入が必要と判断した。

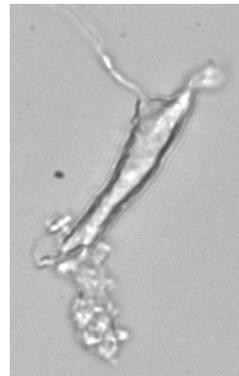
**(4) 遺伝子改変マウスを用いた抑制性軸索終末の可視化**

FM1-43 に代わり GABA 合成酵素 GAD による可視化も考えられたが、岩手大学の山本欣郎教授と共同で実施してきた免疫電顕などによる観察から、小脳や大脳皮質の抑制性ニューロンとは異なり、黒質に入力する軸索終末は GAD では十分に可視化されなかった。また同終末は Vesicular GABA transporter (vGAT) を豊富に発現した。そこで vGAT-Venus マウスを群馬大学の柳川右千夫教授より御供与を受けて導入した。Genotyping 等の課題を解決し、最終的に VGAT-Venus が高発現するクローズドコロニーの形成・維持に成功した。

もう一つのポイントは、幼若期の脳神経細胞間には GJ が広く存在するが、発達に伴い GJ は失われていくものと考えられている点である。本研究が検証を目指す仮説は、こうした生後間もない時期に存在する GJ の証明ではなく、成熟した黒質網様部で GJ が重要な機能を果たしているかどうかである。

ところが黒質網様部神経細胞の急性単離は、生後 3 週を越えると急速に成功確率が低下する。これは網様部が成熟し、神経軸索の髄鞘化が発達する時期に一致する。幼若動物ではうまくいく機械式単離法も (図 1 および図 3 参照)、発達段階の進んだマウスに適用すると、組織ダメージが大きく、神経細胞と軸索の保存状態が悪い様子が見られた。

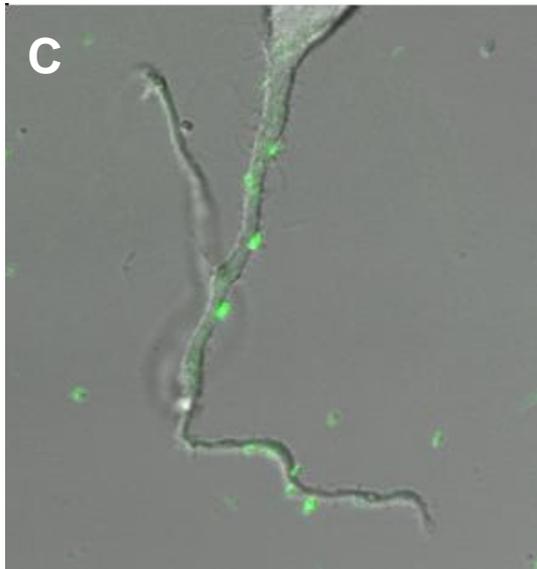
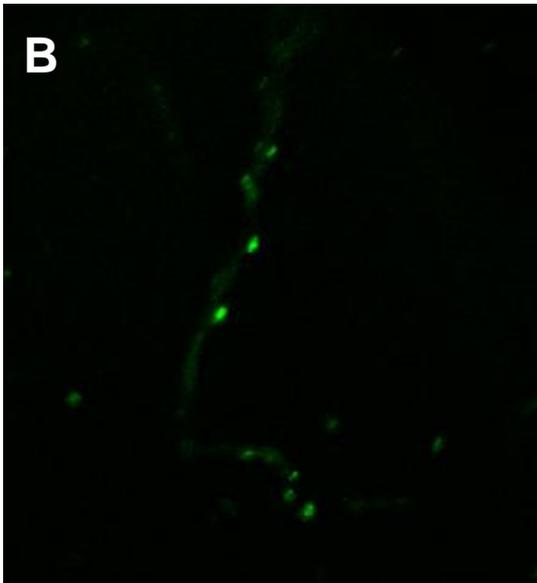
**図 3 機械式単離した幼若期黒質神経細胞**



(細胞体表面は軸索終末で覆われて不整となっており、樹状突起もよく維持されている)

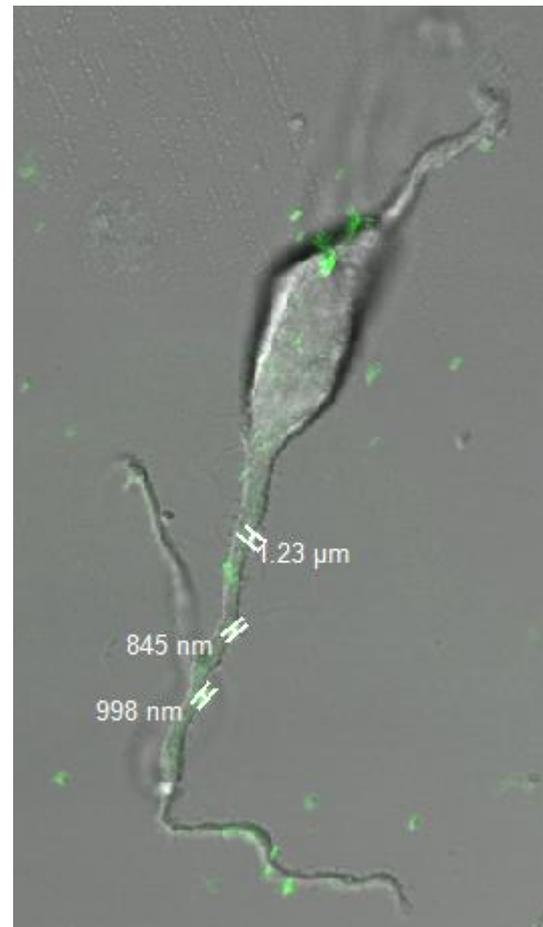
恐らく、軸索束間の神経細胞への機械ストレスが原因と判断された。そこで、機械式単離に酵素処理を組み合わせた細胞単離法を新規に考案した。詳細は別途論文に記載するが、最終的に、軸索終末が結合した状態の生きた黒質神経細胞を安定に得て、樹状突起などに終止する Venus 陽性 GABA 性軸索終末を鮮明な 3 次元ライブ画像として可視化することに成功した (図 4A-C)。

**図 4 黒質網様部神経細胞上に蛍光可視化された抑制性軸索終末の共焦点顕微鏡画像**



A, 急性単離黒質網様部神経細胞の DIC 画像。B, 同細胞に終止する VGAT 陽性抑制性軸索終末を Venus で可視化した蛍光共焦点顕微鏡断層像。特定の Z 平面に焦点面を合わせているため、他の平面上に存在する終末はこの断面では観察できない。C, 蛍光と DIC 画像の重ね合わせ。スケールは図 5 に掲載した。

**図 5 黒質網様部神経細胞上に終止する VGAT 陽性抑制性軸索終末の大きさ**



本研究により、最終的な目標達成に向けた重要な最初の技術課題であるところの「抑制性軸索終末を保存した状態で黒質神経細胞を安定に単離した上、同終末をレーザー顕微鏡上で高精度画像として可視化」することに成功した。

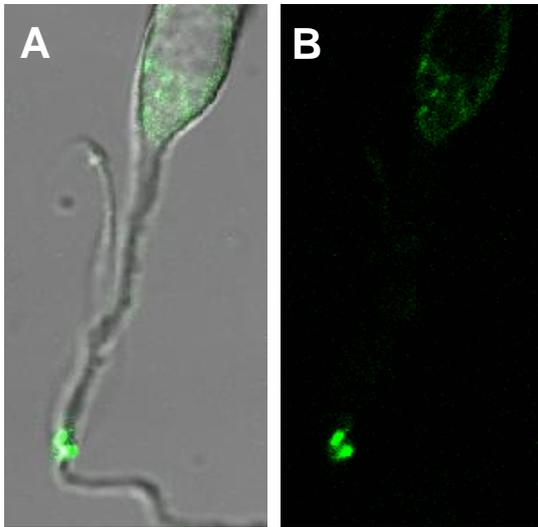
#### (5) 互いに隣接する軸索終末の可視化

本法は酵素処理の程度と機械式単離とのバランスが重要で、シナプスの保存の程度はそのバランスに左右される。そうした方法で互いに隣接する軸索終末が観察し得るかは本法の有効性を評価する際の重大なポイントである。

詳細は別途報告に委ねるが、結論から言えば、下記の代表例に示すように、隣接シナプ

スを観察することは可能と期待される。

**図 6 黒質網様部神経細胞上に終止する二つの互いに隣接する VGAT 陽性抑制性軸索終末の共焦点顕微鏡画像**



A, DIC 画像と蛍光画像の重ね合わせ。B, 蛍光共焦点顕微鏡画像。画面左下に隣接して光る二つの点はいずれも VGAT 陽性抑制性軸索終末。ここでは一定の Z 軸断面のみを示しているが、連続的な Z section を行なうことで両終末の位置関係がわかる。

#### (6) 今後の技術的課題

抑制性軸索終末は大きさが 0.6-1  $\mu\text{m}$  内外と極めて小さく、パッチクランプ記録に成功した報告はない。今後、樹状突起と軸索終末との明瞭な識別、二つ以上の軸索終末が隣接して結合したシナプス構造が保存された神経細胞の安定な単離法の樹立、ドリフトや振動の制御など数々の克服すべき技術課題がある。

VGAT-Venus マウスを用いて可視化した軸索終末からパッチしようとする際の大きな課題の一つは、終末付近にある多数の軸索が電極のアプローチや良好なシール形成を妨げる点である。もう一つの電極を準備し、buffer 液の流れを生成して軸索を一方向に流すようにし、上流側からアプローチする方法など様々な工夫など様々な方法が試せるが、実際にはなかなか難しい。特にパッチ電極先端に毛細管現象によって軸索吸引がおきないように圧力計を接続して調整する陽圧の制御が電極先端が細くなると難しさを増す。極小ターミナルの状態の維持も重要である。また細胞が生きているため樹状突起は時間経過に伴い大きな生理的動きをみせることが判明しており、本質的難題である。

現有する Kleindiek 社 マニピュレーターは電極先端部のドリフト量は、先端部で実測

すると平均 0.5  $\mu\text{m}/\text{hour}$  程度の速度であるが、エアコンの入れ切りなどの温度変化に大きく影響を受け、短時間で動くことがある。

また現有するライカ SP5 リアルタイムレーザー共焦点顕微鏡に備えられているレゾナントモードの 8000Hz 高速スキャンは非常に優れたシステムであるが、高速動作時にステージに伝わる振動モーメントが大きく、マニピュレーターで増幅されて電極先端に伝わるためにパッチクランプ状態が悪化する。

さらに二本の電極による異なる方向のドリフトをどのように制御できるか、1 ミクロンよりはるかに小さな先端径を有するパッチ電極をどのように作成し、かつ観察できるか、吸引圧でシナプスがはずれない条件の探索、GJ 閉鎖薬などの薬液の穏やかなかん流法の実現などが解決すべき課題である。

#### (7) 結語

本研究では、軸索終末間 GJ の存在の有無を、中脳黒質の軸索終末にパッチクランプ法を適用することで検証するための基盤技術の開発を行なった。

GJ は膜電位、pH、 $\text{Ca}^{2+}$  等様々な要素により開閉制御され、最近では蛍光標識グルコース (Yamada 他, *Nat Protoc*2007) を用いてグルコースの通過が示されたが、(Giaume 他, *Nat Rev Neurosci*2010)、リン酸化グルコースは通過せず、分子選択の仕組みも注目される。

今回高解像度ライブ画像として鮮明に可視化することに成功した抑制性軸索終末は想定どおり小さく、ここから安定にダブルパッチを成功させて GJ の存在を証明し、更に機能的役割を示すまでの道りは険しい。しかし次のハンマーの一振り当てを当てる場所は見えており、やりがいのある仕事である。本萌芽的研究の成果を生かしてチャレンジしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yamamoto, T., Tanaka, S., Suga, S., Watanabe, S., Nagatomo, K., Sasaki, A., Nishiuchi, Y., Teshima, T., and Yamada, K. "Syntheses of 2-NBDG analogues for monitoring stereoselective uptake of D-glucose" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 巻, 4088-4096, 2011, 査読有。  
DOI:10.1016/j.bmcl.2011.04.148

[学会発表] (計 6 件)

①佐々木綾子、長友克広、山田勝也、グリア

細胞における D-グルコースの立体選択的および非立体選択的取り込みのモニタリング、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 30 日、長野松本文化会館（長野県）

②長友克広、菅世智子、山田勝也、リアルタイム RT-PCR 法による黒質模様部アストロサイトのドーパミン受容体遺伝子発現解析、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 29 日、長野松本文化会館（長野県）

③山田勝也、中脳黒質細胞のドーパミン受容体サブタイプ発現と機能、第 85 回日本薬理学会（シンポジウム講演、セッションオガナイザー）、2012 年 3 月 16 日、京都国際会館（京都府）

④山田勝也、長友克広、菅世智子、山本敏弘、西内祐二、豊島正、佐々木綾子、新規蛍光 L-グルコース誘導体と 2-NBDG の組み合わせによるニューロンとアストロサイトのグルコース取り込み解析、第 34 回日本神経科学大会 Neuroscience2011、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

⑤長友克広、菅世智子、山田勝也、リアルタイム RT-PCR を用いた黒質網様部単一細胞のドーパミン受容体遺伝子発現解析、第 34 回日本神経科学大会 Neuroscience2011、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

⑥佐々木綾子、長友克広、山田勝也、グリア細胞における D-グルコースの立体選択的および非立体選択的取り込みの定量化、第 34 回日本神経科学大会 Neuroscience2011、2011 年 9 月 14-17 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

〔図書〕（計 2 件）

①山田勝也「糖のトランスポーター」トランスポートゾームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ-、2011、171pp-178pp、金井好克他編、(株)京都廣川書店、総ページ数、490 ページ

②山田勝也「グルコーストランスポーター」生化学事典 田中啓二他編 (株)朝倉書店 (in press)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：蛍光標識されたグルコース誘導体を用いたがん細胞を検出するための方法及び該誘導体を含むがん細胞のイメージング剤

発明者：山田勝也、尾上浩隆、豊島正、山本敏弘

権利者：国立大学法人弘前大学、独立行政法人理化学研究所、株式会社ペプチド研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2012/58439

出願年月日：24 年 3 月 29 日

国内外の別：国外

○取得状況（計 1 件）

名称：心拍・呼吸センサおよびそれを用いた生体監視装置

発明者：佐藤紳一、山田勝也、稲垣暢也、石田明

権利者：株式会社ユニークメディカル

種類：特許

番号：特許第 4899117 号

取得年月日：24 年 1 月 13 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~physiol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 勝也 (YAMADA KATSUYA)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40241666

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

長友 克広 (NAGATOMO KATSUHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30542568

山本 欣郎 (YAMAMOTO YOSHIO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：10252123

菅 世智子 (SUGA SECHIKO)

弘前医療福祉大学・保健学部・教授

研究者番号：80003408