

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890007

研究課題名（和文） 中脳黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの代謝依存的自発発火制御機構の解明

研究課題名（英文） Glucose- and temperature- dependent regulation of spontaneous firing in SNr GABAergic neurons

研究代表者

長友 克広 (NAGATOMO KATSUHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・奨励研究員

研究者番号：30542568

研究成果の概要（和文）：中脳黒質網様部 GABA ニューロンは、高頻度に自発発火をしている細胞の1つであるが、その持続的な自発発火を支える制御機構は明らかではない。本研究では、「代謝」という観点から、急性単離ニューロンを用いて、細胞外グルコース濃度および温度を変化させた時、自発発火頻度がどのように変動するのか解析した。以前報告した脳スライスの結果と異なる結果などが得られ、ニューロンの自発発火はニューロン周辺環境の何らかの因子によって調節されていると示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has not been identified that regulatory mechanisms of persistent high frequency spontaneous firing in SNr GABAergic neuron. Glucose- and temperature-dependent regulation of spontaneous firing in acutely dissociated SNr GABAergic neuron was investigated. Glucose- and temperature- dependent regulation of spontaneous firing in acutely dissociated GABAergic neuron was distinct from the results of the extracellular recording in acute brain slices (Yuan, H. et al, Neurosci Lett 2004). These results suggest that the spontaneous firing in SNr GABAergic neuron could be regulated by the environment around a neuron in brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：神経生理

科研費の分科・細目：医歯薬学・生理学一般

キーワード：自発発火、グルコース、温度

1. 研究開始当初の背景

黒質網様部 GABA 作動性ニューロンは運動制御に関わる大脳基底核の情報処理シグナルを上丘、視床、脳幹に送る最終出力の役割を担っており、通常は、高頻度で発火して投射先を持続的に抑制している (Hikosaka, O. et al, Physiol Rev 2000)。私達の研究グループの研究で、黒質網様部がグルコースや酸

素を鋭敏に検知することが分かってきており (Yamada, K. et al, Science 2001; Yuan, H. et al, Neurosci Lett 2004)、また他の研究グループからも同様の報告がある (Velisek, L. et al, J Neurosci 2008)。

周知の通り、グルコースは脳の最も重要なエネルギー源であり、グルコースの極端な低下は脳に致命的なダメージを与える。グルコ

一感受性ニューロンは、視床下部外側野、扁桃皮質内側核、視床下部背内側核などに存在することが知られている (Oomura, Y. et al, Nature 1974)。

神経細胞のエネルギー代謝が発火に影響していると示唆される私達の実験結果を以下にまとめた。マウス脳スライスを用いた黒質網様部からの単一細胞記録と急性単離した黒質網様部 GABA 作動性ニューロンのパッチクランプ法による実験結果である。

1	脳スライス(単一細胞記録), 33°C, 10 mM Glucose, 25.2±1.8 Hz, n=60, 基本条件
2	脳スライス(単一細胞記録), 33°C, 4 mM Glucose に低下, 32.0±1.1 Hz ~ 48.0±2.8Hz, n=33, 49.5±6.3% 上昇
3	脳スライス(単一細胞記録), 33°C, 1~3 mM Glucose に低下, 35.1±1.9 Hz ~ 62.9±6.7 Hz, n=6, 83.4±25.9% 上昇, 約 15 分後に発火停止
4	急性単離(パッチクランプ), 24°C, 10 mM Glucose, 10.8±1.1 Hz, n=38, 22°C以下では発火しない

他の研究グループは視床下部の Pro-opiomelanocortin (POMC) ニューロンについて、細胞外グルコース濃度が 10 mM から 5 mM に低下すると、自発発火頻度が 6 Hz から 3 Hz に低下するという報告をしている (急性単離、温度記載なし) (Ibrahim, N. et al, Endocrinology 2003)。また ATP 感受性を欠損した ATP 感受性 K⁺チャネル (Kir6.2; K_{ATP}) をノックインしたマウスの脳スライスを用いた電気生理学的な研究により、この POMC ニューロンでのグルコース応答は Kir6.2 チャネルによることが示されている (Parton, LE. et al, Nature 2007)。

一方、私達の研究グループは、彼らの報告以前に、黒質網様部 GABA 作動性ニューロンに発現している Kir6.2 チャネルの関与を疑い、Kir6.2 チャネルをノックアウトしたマウスの脳スライスを用いた単一細胞記録を行っており、野生型マウスと同様の結果が得られる為、黒質網様部 GABA 作動性ニューロンでのグルコース応答に Kir6.2 チャネルは関係ないという報告をしている (Yuan, H. et al, Neurosci Lett 2004)。

では、高頻度に発火する中脳黒質網様部 GABA 作動性ニューロンにおいて、代謝に影響を与えるグルコースや温度の変化に伴って自発発火頻度が変わるのは何故なのか、その分子基盤を解明するというのが本研究の目標である。

2. 研究の目的

(1) 細胞外グルコース濃度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

脳スライスを用いた単一細胞記録では、細胞外グルコース濃度が 10 mM から 20 mM に増加しても、発火頻度は 33.3±1.4 Hz (10 mM) から 33.0±1.3 Hz (20 mM, n=14) とほとんど変動しないが、細胞外グルコース濃度の低下に伴い自発発火頻度は上昇し、必要なグルコース濃度の閾値を超えて減少してしまうと自発発火は停止してしまう。細胞外グルコース濃度の変化で、黒質網様部急性単離 GABA 作動性ニューロンの自発発火頻度がどのように変化するか詳細に解析する。

(2) 温度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

細胞外記録用のチェンバーは厳密な温度管理 (32±1°C) がなされているが、今までの私達の研究室の黒質網様部急性単離ニューロンの実験は、温度管理されていないパッチクランプ装置を用いて室温下で実験を行っていた。本装置での黒質網様部 GABA 作動性ニューロンの自発発火は 10.8±1.1 Hz (n=38, 24°C, マウス♂15-20 日齢) である。このため、温度が自発発火に非常に重要な因子であると考えられるため、温度変化に対して自発発火頻度がどのように変動するのか解析を行う。

3. 研究の方法

13~20 日齢マウスを使用し、中脳黒質網様部を含む脳スライス (400~600µm 厚) を作成した後、Pronase 処理を行い、黒質網様部をパンチアウトし、顕微鏡下にてニューロンの単離を行う。

電気生理実験では、記録用外液として Na-HEPES バッファー (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.35) を基本組成として適宜調整を行う。電極内液は K-HEPES バッファー (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2) を使い、グラミシジン穿孔パッチクランプ法を行う場合、グラミシジン (0.1mg/mL) を添加する。

中脳黒質網様部の GABA 作動性ニューロンとドパミン作動性ニューロンを同定する為に HCN 電流の有無を確認を行う (次頁図 1)。

解析は Clampfit および自作解析 Perl スクリプトを用いて行う。

(1) 細胞外グルコース濃度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

脳はグルコースを唯一のエネルギー源として血中から取り込む。ニューロンはグルコースではなく、アストロサイトが分泌する乳酸をエネルギー源としているという乳酸シヤトル説が主流となっていたが、最近では抑

制性ニューロンがグルコースを直接シナプス伝達に利用するという報告もある (Hyder, F. et al, J Cereb Bloodflow Metab 2006)。そこで、アストロサイトの影響を無視する為に、急性単離した黒質網様部 GABA 作動性ニューロンを用い、自発発火頻度が細胞外グルコース濃度の変化でどのように変動するのか、グラミシジン穿孔パッチクランプ法によるホールセル記録により、室温条件(24°C)で、詳細に解析する。

(2) 温度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

現在のパッチクランプ実験セットに温度コントローラ (Bipolar Temperature Controller CL-100, warner) を導入することにより、厳密な温度管理下での記録を行う。まず脳スライスを用いた単一細胞記録と同様に $32 \pm 1^\circ\text{C}$ にし、 $25.2 \pm 1.8 \text{ Hz}$ ($n=60$ at 10 mM) の高頻度発火が観察できるか検討する。細胞外記録では 37°C では代謝が亢進し、経時的に脳スライスの状態が著しく悪くなり、安定した記録が行えない。そこで温度を体温付近 37°C にして、本来の *in vivo* に近い条件における急性単離ニューロンの発火頻度を検討する。また温度を下げていった時の発火頻度の変化を検討する。経験的に室温 22°C 以下において、自発発火は観察できなくなるが、溶液の厳密な温度管理を行い、事実上の下限を特定する。

4. 研究成果

(1) 細胞外グルコース濃度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

急性単離した黒質網様部 GABA 作動性ニューロンを、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により HCN 電流の有無でドパミン作動性ニューロンと区別し(図 1)、室温条件で細胞外グルコース濃度を低下させた時の自発発火頻度の変化を検討した。細胞外グルコース濃度を 10 mM から $8, 6, 5, 4 \text{ mM}$ に低下させると 21 例中全例で膜電位が有意に上昇した。しかし自発発火頻度の変化は上昇するもの(14/21 例)、変化しないもの(3/21 例)、低下するもの(4/21 例)があった。今回の結果は、以前、私達の研究グループが報告した脳スライスを用いた単一細胞記録の結果(一定温度条件下、 33°C で細胞外グルコース濃度を 10 mM から 4 mM に低下させると発火頻度が上昇する)とは異なるものとなった。この結果から、低グルコースにさらされた GABA 作動性ニューロンの自発発火は、脳スライスでは周辺環境にある何らかの因子により維持されて頻度が上昇するが、急性単離した状態ではその因子がないために上昇・無変化・低下の 3 種類のパターンを示したと考えられた。

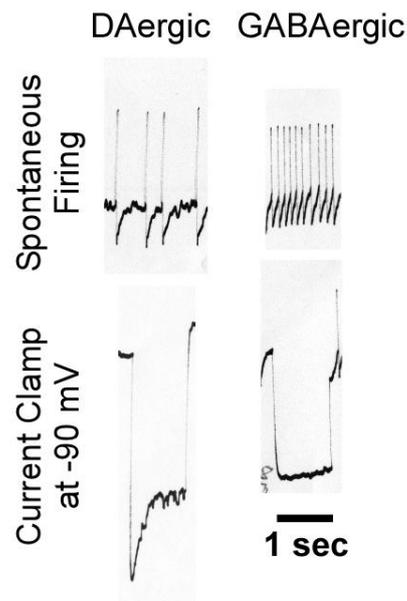


図 1. 黒質網様部から急性単離したドパミン (DA) 作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンのパッチクランプ法による自発発火の記録および HCN 電流の確認

(2) 温度変化に対する急性単離ニューロンの自発発火頻度の変動

急性単離した黒質網様部 GABA 作動性ニューロンを、通常ホールセルパッチクランプ法やグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用い、HCN 電流の有無でドパミン作動性ニューロンと区別し、細胞外グルコース濃度を一定値 (10 mM) に固定し、灌流細胞外液の温度を種々に変化させた時の自発発火頻度の変化を検討した。 28°C 付近の平均発火頻度が 10.5 Hz のニューロンでは、徐々に温度を上昇させていくと、 34°C 付近の平均発火頻度は 18.2 Hz になった。しかしおよそ 1 分後には平均膜電位が -43.6 mV と浅くなり自発発火が観察できなくなった。自発発火が停止した状態から、温度を低下させると、徐々に膜電位が深くなり自発発火が復帰した (1.15 Hz)。別のニューロンにおいても、温度上昇に伴い、 32°C 以上では 1 分以内に、徐々に膜電位が浅くなり、自発発火が観察されなくなった。逆に温度を 31°C 付近から低下させる実験では、およそ 26°C を境に自発発火が観察されなくなった(次頁図 2 に別の例を挙げる)。また現在の単離方法で取り出した細胞は、水温 $27.5 \pm 1^\circ\text{C}$ (室温 $28 \pm 1^\circ\text{C}$) の一定温度環境下において、GABA 作動性ニューロンの静止膜電位は $-55.3 \pm 4.1 \text{ mV}$ ($25.1 \pm 17.3 \text{ Hz}$, $n=14$) となっており、高頻度自発発火が観察できるが、ドパミン作動性ニューロンの静止膜電位は $-73.5 \pm 3.5 \text{ mV}$ ($n=13$) となっており発火せず、脱分極させないと自発発火は観察できなかった(脱分極時のドパミン作動性ニューロン

の発火頻度は 1.29 ± 0.39 Hz)。急性単離したニューロンでは 34°C 以上で自発発火が持続しないことから、生体内では細胞内に流入するナトリウムイオンなどが、アストロサイトなどの周辺細胞により調節されていると示唆された。

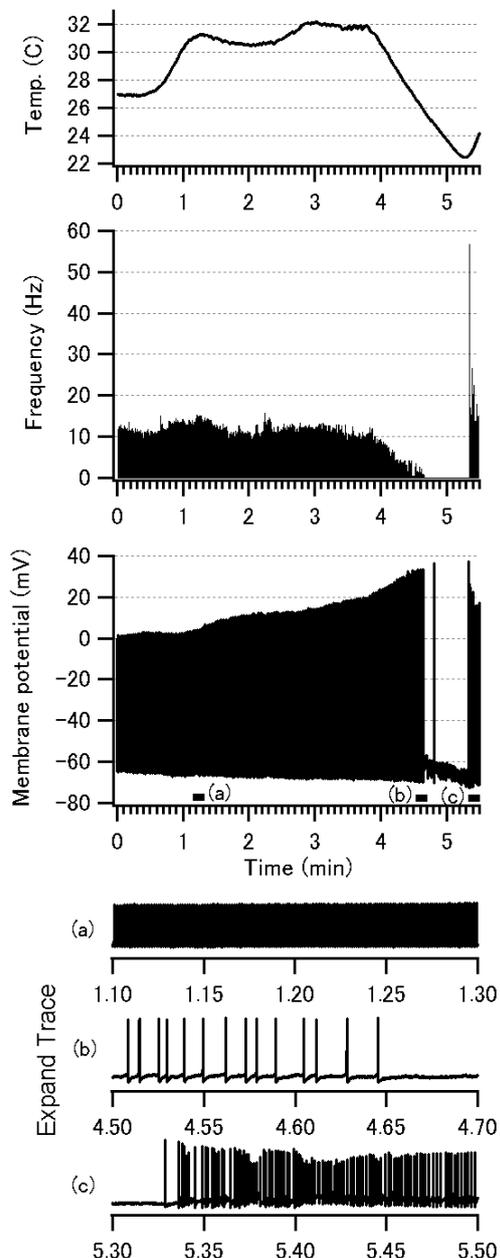


図2. 温度変化による自発発火頻度の変動

(3) 今後の展望

今後、さらに薬理実験など詳細な解析を行いながら、細胞外グルコース濃度変化や温度変化による自発発火頻度の変動を引き起こす分子実体を同定する予定である。海馬神経細胞では温度感知に関する分子実体が TRPV4 チャンネルであると同定されている

(Shibasaki, K. et al, J Neurosci 2007)。しかし TRPV4 が活性化される温度域が $27 \sim 34^{\circ}\text{C}$ であることから、図2で見られるような 23°C 付近の急激な自発発火の再開には、別の分子が関与していると考えられる。また別の温度感知分子である 2-pore 型カリウムチャネルの TREK-1 と TRAAK は活性化される温度域が $25 \sim 42^{\circ}\text{C}$ なので(Noel, J. et al, EMBO J 2009)、黒質網様部 GABA 作動性ニューロンでは他の温度感受分子の存在が期待される。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長友 克広 (NAGATOMO KATSUHIRO)

弘前大学・大学院医学研究科・奨励研究員

研究者番号：30542568

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし