

テクニカルノート

スライスパッチクランプ法を用いた 一次運動野ニューロンとシナプス機能の解析

木田裕之, 美津島大

山口大学大学院医学系研究科システム神経科学分野(生理学第二) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : シナプス可塑性, パッチクランプ, AMPA受容体, GABA_A受容体

和文抄録

パッチクランプ法は細胞レベルで脳機能を解明するための有用なツールである。パッチクランプ実験を成功させるために、本稿では1) 良質な脳サンプル標本を得るための注意点, 2) 顕微鏡下における脳スライス標本の観察の方法, 3) 細胞へのアプローチとパッチ膜の形成の手順を解説する。さらに細胞特性やシナプス機能解析の実験例を挙げて実験手法を紹介する。

はじめに

パッチクランプ法は1976年にNeherとSakmannにより初めて開発された実験手法で、現在では電気生理学実験に幅広く用いられている¹⁾。パッチクランプ法は細胞膜を吸引してガラスピペットと細胞膜を非常に密に接着させる事で、漏れ電流が非常に小さくなり ($> 1 \text{ G}\Omega$)、それに伴い小さな信号電流、特にシングルチャネル記録ができるという利点がある。さらに1981年の全細胞記録 (ホールセル記録) の開発によって、細胞全体の記録シナプス電流を記録することが可能になった (図1)²⁾。その後、スライス・パッチクランプ法が開発され、正常なシナプス構築を維持した脳組織スライス標本を解析することにより、シナプス伝達をはじめとする神経細胞の電気活動の解析が飛躍的に進歩した³⁾。ここでは、

私たちが行っているスライスパッチクランプ法^{4, 5)}の基本的な手法について、大脳皮質一次運動野の細胞記録を例に挙げて概説する。

1. 脳スライス標本の作製

スライスパッチ実験の成否は良質な脳スライス標本が作製できるかに依存する。標本作成までの各工程でいくつかの注意点があるが、深麻酔から脳の取り出しまでの工程を冷却下で迅速に行うことが細胞死を防ぐための大きな骨子である。

(1) 準備

灌流前にはすべての実験器具 (シリンジ, アロンアルファ, スポイト, トリミング用のブレードを含む) を氷上にて冷却しておく。ビプラトーム台の中

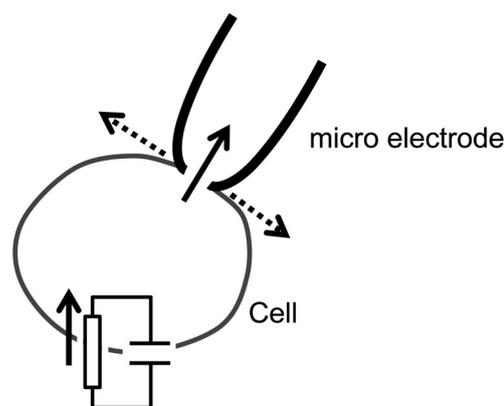


図1

ギガシール法によるホールセル記録。ギガシール部を流れる電流 (点線) は無視できるため、細胞膜を流れる電流と電極を流れる電流は等しくなる (実線)。

にも氷を敷き詰め、万遍なく冷えるように水を入れておく。また氷冷ダイセクションバッファー (表1) は混合ガス (5% CO₂ / 95% O₂) をバブリングさせてガスを飽和させておく (図2A)。氷冷ダイセクションバッファーを用いる理由は、脳を十分に冷やすことで細胞の酸素需要を低くすることにより、スライス作製中に起こる細胞死を少なくするためである。なおスライスに用いる刃は油膜をとるために、あらかじめアセトンとエーテル (1:1) に浸して保存しておく。使用前に綿棒で念入りに油膜を落とすが、その際、刃を傷つけないように十分に注意する。スライス保存用チャンバーのサイズに合わせて紙を切り取り、インターフェイスチャンバーの準備をする (図2D)。

(2) 灌流, 脳の摘出

4週齢SD系 (Sprague Dawley) 雄ラットを深麻酔 (ソムノペンチル, 50 mg/kg) 後、開腹して、大動脈弓よりガスを飽和させた氷冷ダイセクションバッファー (100 ml) を用いて脱血灌流する。その後、ハサミを用いて断頭し、素早く頭蓋骨から脳を取り出す手順を図2Bに示す。取り出した脳は速やかに上記の氷冷飽和バッファー内に入れて、約5分間十分に冷やす。その間、バブリングも持続するが、脳がバッファー内で回転しないよう十分注意する。

(3) 脳スライス作製, 保存

ダイセクションバッファーで浸した紙上に脳を置き、神経線維の走行に沿う角度で、脳をトリミングする (図2C)。大脳皮質の各領域や海馬において錐体細胞はそれぞれ固有の角度を持って並んでいるため、このトリミング角度は特に重要である。目

安として、スライス時にビブラトームのブレードが皮質表面に対して垂直に当たるようにするとよい。トリミングした面を下にして、脳をスライス作製用金属製円形ステージに木工用アロンアルファ®で固定する。通常のアロンアルファ®でも良いが、粘性が強い木工用アロンアルファ®の方が使いやすい。脳周囲の余分なダイセクションバッファーを残ったる紙片で除き、脳を円形ステージに接着させる。接着は速やかに完了するので、飽和ダイセクションバッ

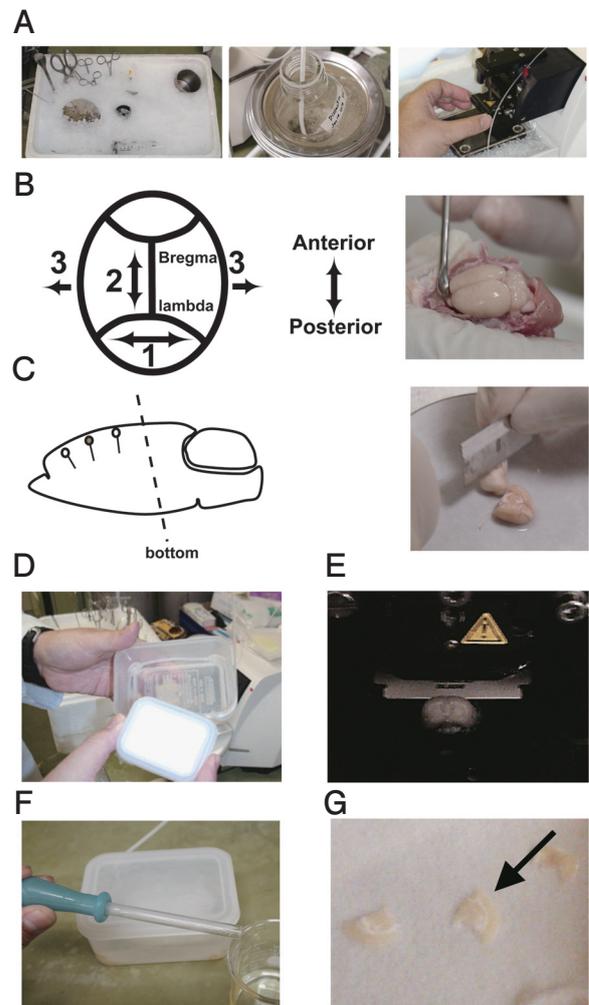


図2

A: 実験前の準備。器具とバッファーを十分冷却しておく。B: 頭蓋骨を開ける手順と摘出した脳。小脳テントに沿って左右に切り (1)、正中を切り上げる (2)。頭蓋骨を左右に開く (3)。C: 脳のトリミング。神経細胞には軸索走行があるため、ターゲットとする細胞 (灰色) の軸索を切断することないようにスライス方向を決める必要がある。D-G: スライス標本の作製と保存。実験前にインターフェイスチャンバーを用意しておく (D)。スライス作製後 (E) は先の細くないスポイト (F) を用いて、スライスした脳 (矢印) を移動させ、チャンバー内aCSF液面と気面の境界部分に静置する (G)。

表1 ダイセクションバッファーの組成
Dissection Buffer (Total 1L)

	Concentration (mM)
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.25
KCl	2.5
CaCl ₂	0.5
MgCl ₂ · 6H ₂ O	7
Choline chloride	90
Ascorbic acid	11.6
Pyruvic acid	3.1
NaHCO ₃	25
Glucose	25

ファーで満たしたスライス作製用チャンバー内に、円形ステージに固定した脳を入れ、ビブラトーム (Leica vibratome, VT-1200S) に固定する。スライス作製用チャンバー内のダイセクションバッファーはバブリングを継続する。

一方、脳スライス保存用のインターフェイスチャンバーには人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid, 以下, aCSF) (表 2) を入れておき、バブリングを開始してガスを飽和させておく。インターフェイスチャンバーではろ紙と切片が液面とほぼ同じになるよう水位を調節しておく。ビブラトームで厚さ350 μm 脳の冠状断を作製したら (図 2 E), チャンバー内で必要部分をトリミングする。トリミング後の脳スライスは切片移動用のスポイト (図 2 F) で回収して、インターフェイスチャンバー内のろ紙上に速やかに移す。バブリングを継続しながら水面とガスの境界面に切片を広げ、室温で静かに維持する (図 2 G)。

2. 脳スライス標本の固定と顕微鏡下での観察

細胞周囲はaCSFに囲まれた状態であり、細胞内の電位 (膜電位) を測定するためには、細胞内外を電気的に絶縁しなければならない。パッチクランプ法では記録電極に細胞膜を密着させることによってギガオームのシール抵抗が得られる。

(1) 細胞の観察

バブリングしたaCSFを循環させながら、水浸状態で脳スライスは顕微鏡下でスライスアンカーを用いて固定する (図 3 A)。スライス深部の細胞を観察するために、波長の長い赤外線フィルターを正立顕微鏡 (倍率600倍, Olympus BX51) ステージ下

の光路におき、ビデオエンハンサーを介して赤外線微分干渉カメラ (C2741-79, 浜松ホトニクス) を用いて細胞を観察する (図 3 B)。細胞と電極の先端が両方見える位置に合わせる。その際、対物レンズをチャンバーのガラス底面にぶつけて、破損しないように注意する。

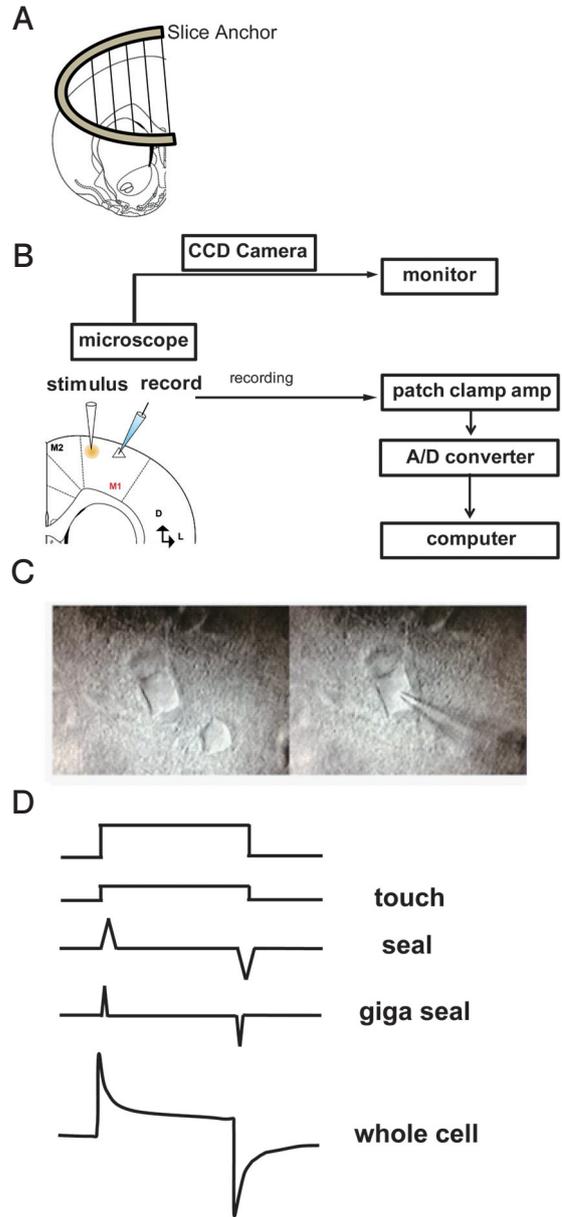


図 3

A: 脳スライス標本の固定法。ナイロンを張ったスライスアンカーで固定する。B: スライスパッチクランプ記録のための実験セットの例。C: ギガシールを形成するための細胞へのアプローチ。D: ホールセル法の手順。細胞膜に電極先端が触れ (cell attached), 陽圧を解除するとシールができるため、電流値が小さくなる (seal)。吸引すると抵抗値が大きくなり、やがてギガオームに達する (giga seal)。陰圧パルスを与えると、パッチ膜部分が破れホールセルの状態になる (whole cell)。

表 2 aCSFの組成

artificial CSF (Total 1L)	
	Concentration (mM)
KCl	2.5
NaCl	118
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1
Glucose	10
NaHCO ₃	26
MgCl ₂	4
CaCl ₂	4

(2) 記録電極の作製と細胞内液

芯入ガラス管微小電極 (GD-1.5, Narishige, JAPAN) はブラー (P-97, Sutter Instruments) を用い加熱, 牽引して作製する. ガラス管微小電極内に挿入する銀線は, 予めハイターに浸しておき, 黒く腐食させておく必要がある. 電極内部は実験に応じた細胞内液 (表3) で充填し, 抵抗は4-7 MΩのものを用いる. フィルター (Millex-GV) を通してガラス管内にパッチ内液を注入する. この時, 電極先端に気泡が入らないように注意する.

(3) 細胞へのアプローチとパッチ膜の形成

陽圧を付した状態で電極をスライス内に侵入させ, 細胞上の組織を吹き飛ばしながら, 細胞にアプローチし, ターゲット細胞表面に電極を当ててくぼみをつくる (図3C). 速やかに陽圧を解除すると, 細胞膜がパッチ電極に張り付いてくるためシール抵抗がどんどんと大きくなる. 電極内に弱い陰圧をかけてギガオームシール (1 GΩ以上) を形成した後, パルス状に強い陰圧をかけて記録電極下の細胞膜を破る (図3D).

3. スライスパッチクランプ法の記録例

我々は大脳皮質運動野のII/III層の細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行い, 以下の研究課題を行っている. パッチクランプアンプは1本の電極で, 電圧固定とその時に流れる電流の測定を同時に行うことができる.

(1) Current clamp法: 細胞発火特性の解析

定電流パルス (-100から+400 pA) を注入し脱

表3 細胞内液の組成 (Voltage clamp法)

Intracellular Solution for voltage clamp (Total 200 mL)

	Concentration (mM)
CsMeSO ₃	115 (127.5)*
CsCl	20 (7.5)*
HEPES	10
EGTA	0.6
1M MgCl ₂	2.5
Na ₂ ATP	4
Na ₃ GTP	0.4
Na phosphocreatine	10

* low Cl concentration for miniature recordings

分極させることにより, 細胞膜の特性 (膜抵抗, 膜容量) だけでなく, 静止膜電位や活動電位の閾値なども明らかにすることができる. また500ミリ秒, 50-400 pAの各注入電流に対する平均発火頻度をプロットすると, 注入電流と発火頻度の関係を調べることができる (図4A).

(2) Voltage clamp法: 電気刺激によるシナプス後電流の記録

電気刺激によって誘発されるシナプス後電流を記録できる (図4B). 記録チャンバー内にはピクロトキシン (Sigma, 0.1 mM) とクロロアデノシン (Sigma, 4 μM) を還流させた. 刺激電極 (ユニークメディカル) はタングステン電極を用い, 一次運動野II/III層 (外側2mm), 記録部位から200-300 μm内側に設置した. 細胞内液のCl⁻濃度を低く保ち (表3*), ネルンストの式に従えば, Cl⁻の平衡電位は-60 mVになる. 従って静止膜電位付近である-60 mVで電位を固定すると, AMPA電流, 脱分極電位+40 mVに固定するとNMDA電流も合わせて記録できる.

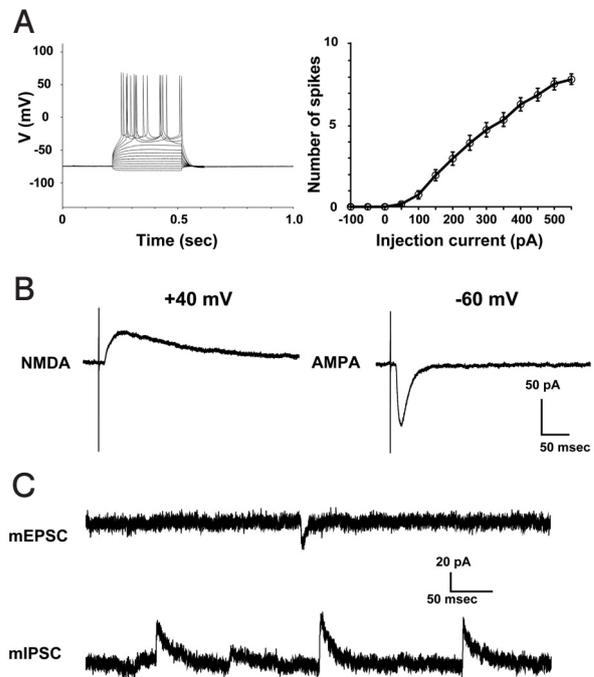


図4

A: 電流固定法によって誘発された活動電位 (左図) と注入電流に対する発火頻度の関係. B: 電気刺激によって誘発されたAMPA電流 (-60mV固定下), NMDA電流 (+40mV固定下). C: 電位固定法によって記録されたmEPSC (上) とmIPSC (下).

(3) Voltage clamp法：微小シナプス後電流の記録

-60 mVに固定し、電位依存性Naチャンネル選択的阻害剤であるテトロドトキシン (TTX, Wako, 0.5 μ M) およびNMDA受容体選択的阻害剤APV (Sigma, 100 μ M) をaCSFに加え還流させると自発性の微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC, 以下mEPSC) が記録できる。mEPSCの頻度には伝達物質の放出確率とシナプス下膜側の変化の両者が影響するが、振幅はシナプス下膜での受容体の感受性と推定できる。従ってmEPSCはシナプスそのものの性質を表し、シナプス前細胞側とシナプス後細胞側の可塑性を細胞ごとに網羅的に解析することが可能である。またAMPA電流の反転電位付近である15 mVに電位を固定すると (海馬では0 mV)、同一細胞から微小抑制性シナプス後電流 (miniature IPSC, 以下mIPSC) も記録できる (図4C)。本実験から、AMPA受容体を介した興奮性シナプスの入力状態とGABA_A受容体を介する抑制性シナプスの入力状態を1つ1つの錐体細胞ごとに解析できる⁵⁾。

おわりに

脳機能を解明するためには、培養細胞・分離神経細胞等を使ったin vitro実験、実験動物を扱うin vivo実験、ヒトを用いた非侵襲計測 (fMRI, PET) まで目的・階層に応じて様々な方法を組み合わせる必要がある。スライスパッチクランプ法はin vivoとin vitroの中間に位置するex vivo実験に位置づけられ、細胞レベルで膜特性やシナプス電流を高い精度で記録できる。さらにGFPをtagとする遺伝子導入法^{4, 5)}により特定の分子機能を1細胞レベルで解析できる。また蛍光トレーサーインジェクションによる細胞の可視化によって特定領域に投射しているニューロンの機能を解析することも可能である⁶⁾。さらに近年では、ケージドグルタミン酸を用い、光でグルタミン酸をケージから放出させて、特定のシナプスを刺激する光スキャン刺激法⁷⁾ などにも応用されている。これらの新技術とも併用することにより、パッチクランプ法はさらに有用な実験手技として発展してゆくと考えられる。

引用文献

- 1) Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 ; 260 : 799-802.
- 2) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 ; 391 : 85-100.
- 3) Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 1989 ; 414 : 600-612.
- 4) Mitsushima D, Ishihara K, Sano A, Kessels HW, Takahashi T. Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 12503-12508.
- 5) Mitsushima D, Sano A, Takahashi T. A cholinergic trigger drives learning-induced plasticity at hippocampal synapses. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 2760.
- 6) Wang L, Conner JM, Rickert J, Tuszyński MH. Structural plasticity within highly specific neuronal populations identifies a unique parcellation of motor learning in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 2545-2550.
- 7) Yoshimura Y, Dantzker JL, Callaway EM. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* 2005 ; 433 : 868-873.