

アストロサイトの Na-K-2Cl 共輸送体活性化による 高カリウム時の脳スライスにおける 内因性光学シグナル

超分子分光研究分野 野村 保友

脳スライスにおける内因性光学シグナルは細胞の体積変化を反映する。細胞外カリウム濃度の増加に伴う内因性シグナルから細胞の体積調節機構を検討した。等張の条件で 4.5 mM から 10 mM へカリウム濃度を 45 分間増加させると、可逆的に透過光量は増加した。この変化は TTX, AP-5 および NBQX 処理によって興奮を抑制した条件下でも観察された。一方 Na-K-2Cl 共輸送体の特異的な阻害剤の bumetanide はシグナルを半減させた。特にこの抑制は錐体細胞層よりもアストロサイトが豊富な radiatum stratum で顕著であった。また Na-K-2Cl 共輸送体のアイソフォームの一つである NKCC 1 を認識するモノクローナル抗体によって免疫染色し細胞レベルでの分布を検討した。NKCC 1 はニューロンよりも少ないが、アストロサイトでも発現していることが確認された。二光子共焦点顕微鏡を用いてカルセインで染色した細胞を観察すると、高カリウムに対して樹状突起は影響されなかったが、アストロサイトのプロセスの直径は 1.2 倍に増加した。これらの結果から高カリウムによる内因性シグナルには NKCC 1 の活性化を介したアストロサイトの膨潤が寄与していると考えられた。

1 はじめに

神経活動に伴い細胞外カリウム濃度は変動し、その範囲は通常～3 mM から激しい興奮時には～13 mM に達する [1]。従来過剰なカリウムはアストロサイトが取り込み、浸透圧により水が細胞内に移行し細胞は膨潤すると考えられてきた。多くの研究者が培養アストロサイトでは高カリウム条件下で Na-K-2Cl 共輸送体の活性化に伴って、カリウムが取り込まれ、膨潤することを指摘した [2]。一方脳スライスにおいてはニューロンにだけ Na-K-2Cl 共輸送体が発現していると最近報告された [3]。本研究の目的は高カリウム条件下で観察される脳スライスの膨潤が Na-K-2Cl 共輸送体の活性化によるものなのか、膨潤に寄与するのがニューロンなのかアストロサイトなのかを明らかにすることである。脳スライスにおける内因性光学シグナルは細胞レベルの膨潤収縮を検出するために適した方法である [4,5]。内因性光学シグナルにおける各種阻害剤の効果、免疫染色及び 2 光子共焦点顕微鏡の結果から、アストロサイトの Na-K-2Cl 共輸送体活性化が高カリウム条件下での脳スライスの膨潤に寄与していることが明らかになった。

2 実験

2.1 内因性光学シグナル

光学フィルターなしのタングステンランプを光源とした倒立顕微鏡で脳スライスの透過像を観察し、CCD カメラで記録した画像を解析した。3 週齢ウイスターラット (オス) から厚さ 400 ミクロンの脳スライスを作製した。95%酸素 + 5%二酸化炭素混合ガスで飽和させた人工脳脊髄液 (120 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 KCl, 1.5 KH₂PO₄, 1.4 MgSO₄, 2 CaCl₂, 10 Glc in mM) 中でスライスを維持した。高カリウム人工脳脊髄液は 114.5 NaCl, 26 NaHCO₃, 8.5 KCl, 1.5 KH₂PO₄, 1.4 MgSO₄, 2 CaCl₂, 10 Glc in mM を含む。さらに活動電位とシナプス伝達を抑制するために 1.2 mM TTX, 100 mM AP-5, 20 mM NBQX を加えた。

2.2 免疫染色

常法に従ってホルムアルデヒドで固定した脳から 50 ミクロンの切片を調製した。免疫抗体で二重染色した。一次抗体は Na-K-2Cl 共輸送体アイソフォーム 1 (NKCC 1) に対するモノクローナル抗体を 1:1000、アストロサイトのマーカータンパクとして

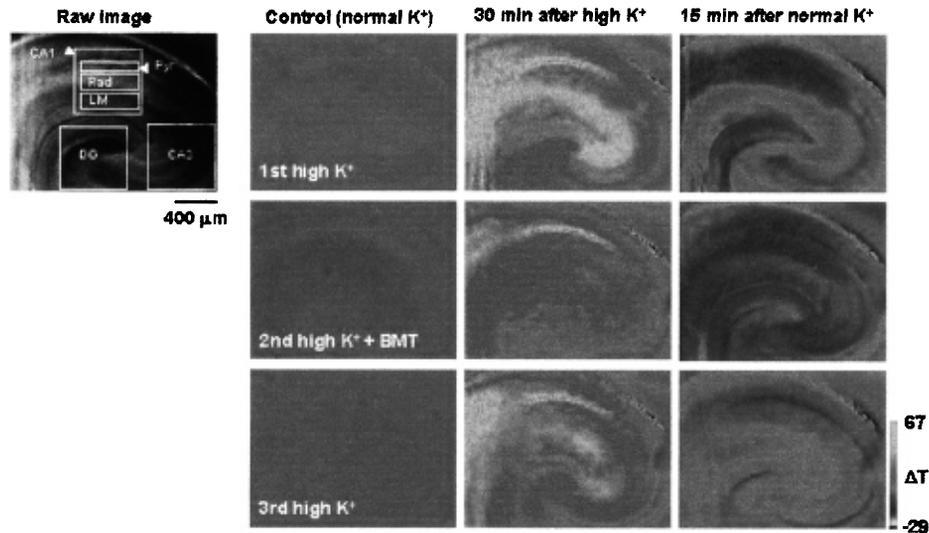


図1 高カリウム (10 mM) で観察される脳スライスの内因性光学シグナル。Bumetanide (BMT) はNa-K-2Cl 共輸送体の特異的阻害剤。

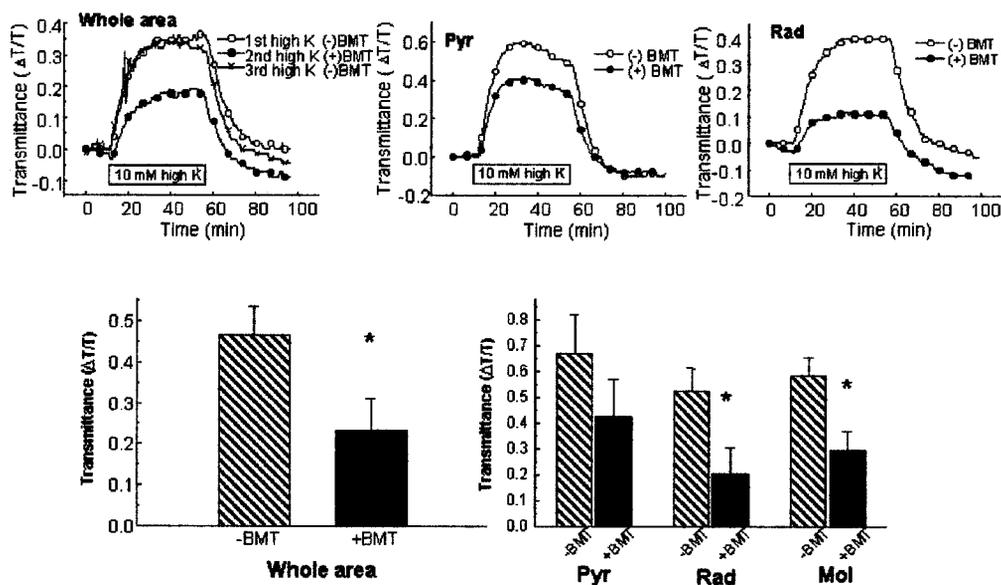


図2 内因性光学シグナルに及ぼす bumetanaide の効果 (5 スライス)

GFAP のウサギ抗体を 1:2000, ニューロンのマーカータンパクとしてグルタメートレセプターサブユニット 1 のウサギ抗体を 1:1000 の希釈で用いた。二次抗体は Cy 3 ラベルしたドンキー抗ウサギ抗体および Cy 2 ラベルしたドンキー抗マウス抗体をどちらも 1:1000 の希釈で用いた。

2.3 二光子共焦点顕微鏡

二光子共焦点顕微鏡 (ツアイス LSM 510) を用いた。TTX, AP-5, NBQX を含まない人工脳脊髄液中でスライスパッチを行い, 活動電位の有無から電

気生理学的にニューロンとアストロサイトを区別し, 電気泳動的にカルセインで 30 分間染色した。染色後, 単一細胞の三次元蛍光像を得て, 15 分間高カリウム灌流した時点で再度同一細胞の三次元蛍光像を得た。付属のソフトウェアで三次元蛍光像の強度プロファイルを解析した。

3 結果と考察

典型的な高カリウムによる内因性光学シグナルを図 1 に示した。大脳皮質の内側にある海馬は特徴的

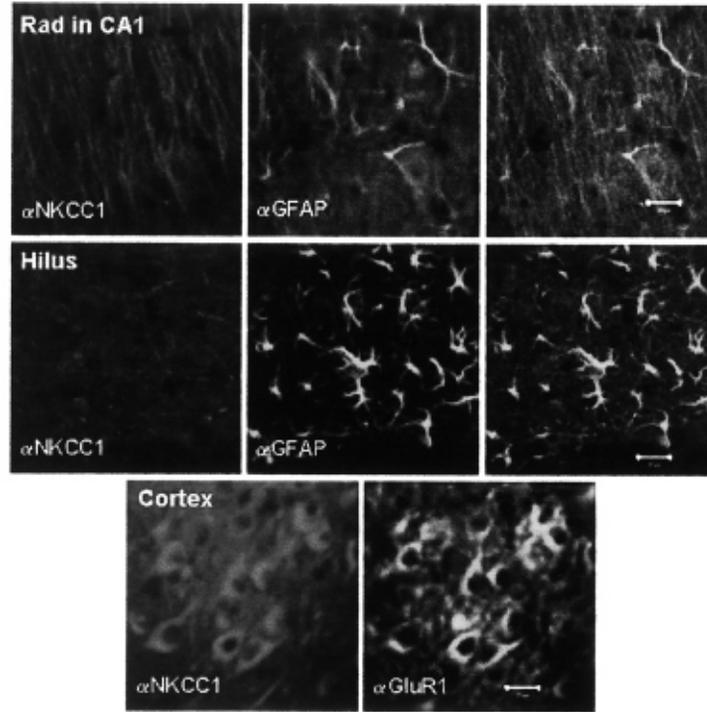


図3 脳切片における Na-K-2Cl 共輸送体の分布. バーは 20 ミクロンを示している.

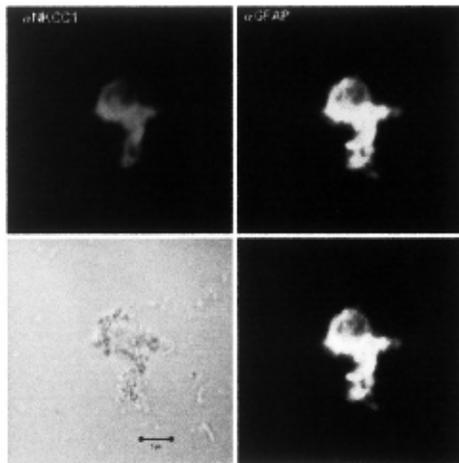


図4 単離アストロサイトにおける Na-K-2Cl 共輸送体の発現. バーは 5 ミクロンを示している.

な層構造をもち、大きく CA 1, CA 2, CA 3, DG 分けられる. CA 1 領域には特徴的な細胞構築があり、錐体細胞層 (Pyr) には CA 1 ニューロンの細胞体が局在し、アストロサイトが比較的少ない.

一方 Radiatum stratum 層 (Rad) は樹状突起とアストロサイトが豊富な領域である. 通常のカリウム濃度で灌流すると透過光量がどの領域でも変化せず、経時的に差画像を計算すると一様な画像になる. カリウム濃度を 4.5 mM から 10 mM に上げると透

過光量が不均一に増加する. このスライスに Na-K-2Cl 共輸送体の特異的阻害剤 bumetanide を与えると、カリウム濃度を増加させたときのシグナルは小さくなる. 図 2 は内因性光学シグナルの経時変化を示している. 45 分間カリウム濃度を増加させると透過光量の増加が内因性光学シグナルとして観察される. トランスポーターの阻害剤は全体のシグナルを半減させ、領域別に異なる応答を示す. アストロサイトが少ない領域 (Pyr) ではトランスポーターの寄与が少なく、アストロサイトの多い領域 (Rad) ではトランスポーターが強く寄与した. したがってこの領域の内因性光学シグナルにはアストロサイトのトランスポーターが寄与していることが示唆された.

実際にトランスポーターの分布を免疫染色で調べた. NKCC 1 はさまざまな細胞で発現しているが、NKCC 2 は腎臓だけに発現している. 図 3 に示すようにどの領域でもアストロサイトのマーカータンパクの GFAP とトランスポーターの分布は一致せず、むしろニューロンのマーカータンパクのグルタミン酸受容体の分布と一致していた. したがって内因性光学シグナルではアストロサイトのトランスポーターが機能しているという結果であったが、組織での発現を見ると、むしろニューロンにこのトランスポーターは多く発現していた. 次にニューロン

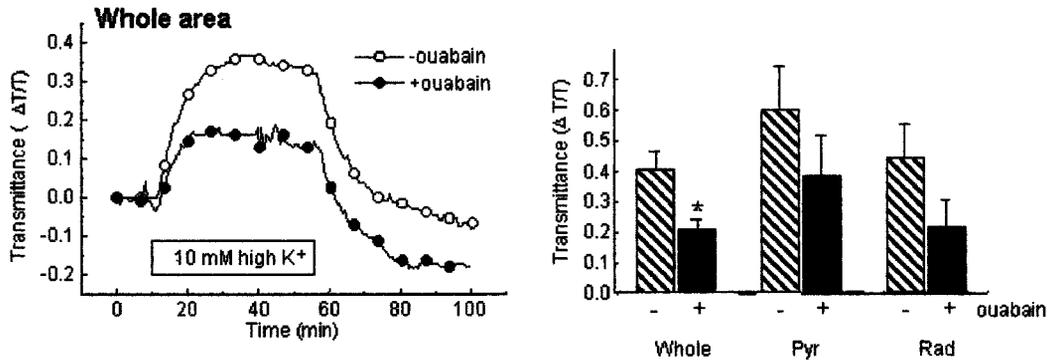


図5 Na-K ポンプの阻害剤 ouabain (1 mM) の効果

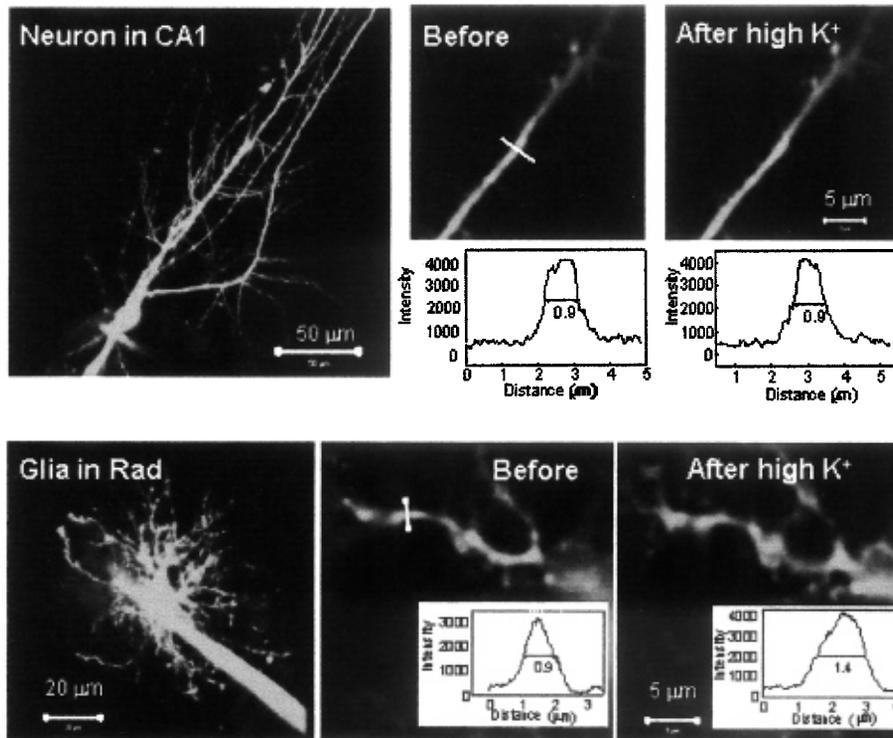


図6 ニューロンとアストロサイトの形態に及ぼす高カリウムの影響

の強いシグナルが弱いアストロサイトのシグナルをマスクしていると考えて、アストロサイトのアストロサイトだけを単離した(図4)。GFAP ポジティブのアストロサイトは弱いながらもトランスポーターの免疫活性を持っていた。したがってニューロンよりも低いレベルで発現しているアストロサイトのトランスポーターが内因性シグナルの50%に寄与していると考えられた。

Na-K ポンプの寄与を調べた(図5)。その阻害剤 ouabain は内因性光学シグナルを半分に抑制したことから、内因性光学シグナルにおける Na-K-2Cl 共

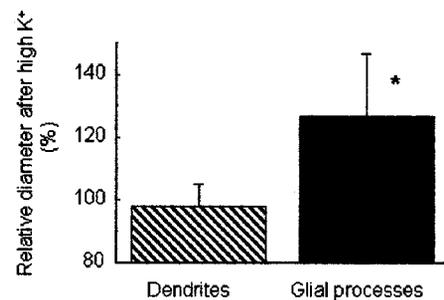


図7 高カリウム前後の樹状突起とプロセスの直径

輸送体以外の残り半分に Na-K ポンプが寄与して

いると考えられた。阻害剤をまとめて与えると内因性光学シグナルは80%ほど抑制された。

二光子共焦点顕微鏡で脳切片の中の個々のニューロンとアストロサイトを観察した(図6)。ニューロンの樹状突起の部分を拡大してその直径を評価した。カリウム濃度を増加させる前後で変化はなかった。一方アストロサイトのプロセスの直径は増加した(図7)。カリウム濃度の増加によりアストロサイトは低いレベルで発現している Na-K-2Cl 共輸送体

と Na-K ポンプによって膨潤するが、ニューロン特に dendrocyte は膨潤しなかった。細胞型特異的な膨潤は、ニューロンにだけ発現している K-Cl 共輸送体[6, 7]によって説明できる。このトランスポーターは細胞外に K-Cl を輸送するのでカリウムがたまらず、膨潤しない可能性がある。さらに樹状突起は細胞体に比べて頑丈な細胞骨格[8]をもつために膨潤しにくいかもしれない。

[参考文献]

- [1] W. Walz, *Neurochem. Int.*, 36, 291 (2000).
- [2] W. Walz, *Neurosci. Lett.*, 135, 243 (1992).
- [3] M.D. Plotkin, M.R. Kaplan, L.N. Peterson, S.R. Gullan, S.C. Hebert, E. Delpire, *Am. J. Physiol.*, 272, C173 (1997).
- [4] B.A. MacVicar, D. Hochman, *J. Neurosci.*, 11, 1458 (1991).
- [5] R.D. Andrew, B.A. MacVicar, *Neuroscience*, 62, 371 (1994).
- [6] C.M. Gillen, B. Forbush, *Am. J. Physiol.*, 276, C328 (1999).
- [7] C. Rivera, J. Voipio, J.A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma, K. Kaila, *Nature*, 397, 251 (1999).
- [8] P.G. Aitken, A.J. Borgdorff, A.J.A. Jutta, D.P. Kiehart, G.G. Somjen, W.J. Wadman, *Pflugers Arch.*, 436, 991 (1998).