

神経細胞のつながる仕組み

辰巳 仁史

■研究のねらい

脳は数百億ともいわれる神経細胞からなる情報処理装置である。脳が情報処理装置として巧みに動作する原理は不明であるが、神経細胞の間にシナプスが形成され細胞と細胞の間で情報を受け渡すことができることに、脳の情報処理の基本があると考えられている。すなわち脳の神経細胞の間にシナプスが形成されることで複雑な情報のネットワークが構築され、脳における情報処理が行われるようになると考えられる。

発生過程の神経細胞や培養神経細胞の神経突起の先端には成長円錐が観察される。神経成長円錐は細胞運動性が高く、神経突起伸長に必要な認識物質の識別を行い伸長方向を決定すると考えられている。そして信号を伝えるべき脳神経細胞に出会うとシナプスに変化すると考えられている。この神経成長円錐から、シナプスへの変化は神経科学における重要な研究課題である（図1）。

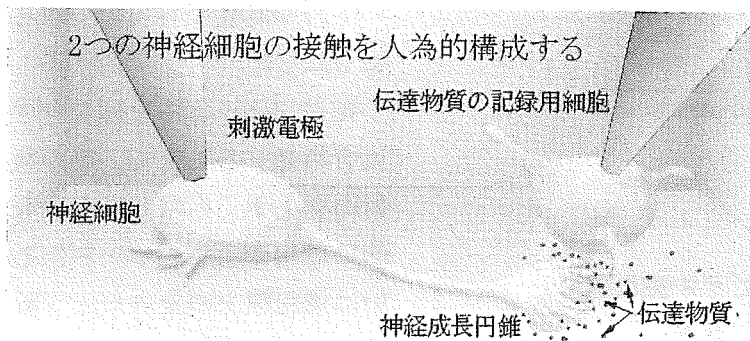


図1 研究と実験の概念図

本研究のねらいは、3つの先端的光学技術（ビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法、光ピンセット法、近接場光顕微鏡法）とパッチクランプ膜電流測定法を組み合わせ、マルチ計測顕微鏡の技術を開発し、脳神経細胞の成長円錐と標的細胞のあいだでおこなわれるシナプス形成の機構の解明に応用することである。具体的には、2つの神経細胞の間でおこなわれるシナプス形成の機構を解明する事で、多数の細胞間のシナプスより構成される脳の回路形成の基本原則を解明し、脳における「知」の構成の原理の一端を解明することを目標に研究を行った。

■研究の成果

1. 神経成長円錐を研究するためのマルチ計測顕微鏡技術の開発

本研究では3つの先端的光学技術、1) ビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法、2) 光ピンセット法、3) 近接場光顕微鏡法とパッチクランプ膜電流測定法を組み合わせ細胞の機能および形態の変化を研究する事のできるマルチ計測顕微鏡の技術を開発した。それ

それぞれの装置は単独で使用されることもあるが、本研究のように同時に同じ細胞を多面的に観察分析することに使用することで、単独の使用では得ることのできない多くの重要な情報を得ることができる。

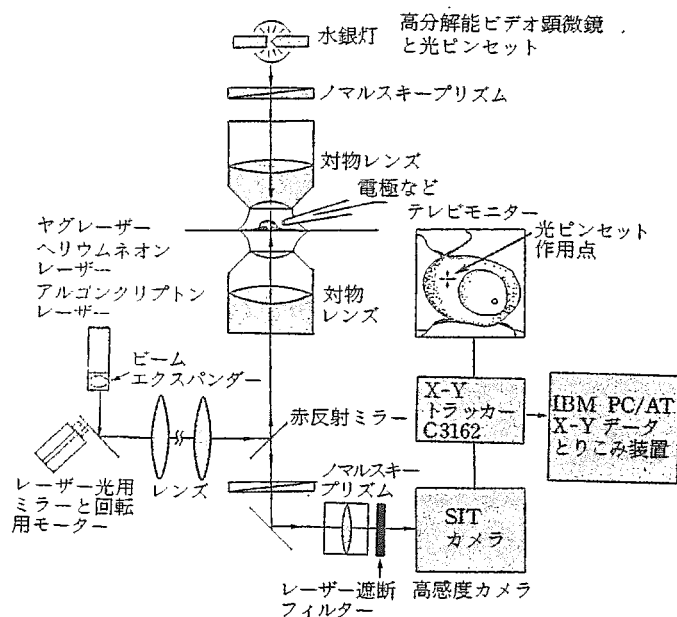


図2 光ピンセットとビデオ強化型微分干渉顕微鏡の構成

光技術である。本研究ではビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡にこの光ピンセットを組み込むことに成功し、ビーズを細胞に人為的に接触させて神経成長円錐部の細胞膜の特性を調べる事ができた。

近接場光顕微鏡法とは、ガラスなどの全反射面で発生する特殊な光、近接場光を用いて細胞の部分構造を観察する新しい細胞観察法である。ガラス反射面に極めて近い(200 ナノメートルほど)部分がこの近接場光で照らし出される。実際にはあらかじめ細胞を蛍光染色しておき、この近接場光を励起光として用いて細胞のガラス面に接着している部分構造だけを蛍光観察することができた。

先端的光学技術、1) ビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法、2) 光ピンセット法、3) 近接場光顕微鏡法とパッチクランプ膜電流測定法を組み合わせたマルチ計測顕微鏡の構成を図2で示す。また、これらの観察研究法の詳細については発表論文を参考にされたい。

ビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法とは、細胞の微細な構造を観察する事のできる微分干渉顕微鏡にビデオカメラを装着し、その画像信号をコンピュータによる画像処理を加える事で、肉眼では捕らえる事の困難な細胞の形態を観察する装置である。この装置を本研究では発展させ細胞から伸びるフィロポディアや神経成長円錐の上のビーズや金コロイド粒子を10 ナノメートルの精度で可視化できるようにした。

光ピンセット法とはレーザー光を集光することで、光の放射圧を上手く応用して三次元的に細胞や人工のビーズあるいは細胞膜上の金コロイド粒子を非接触で操作する新しい

2. 神経成長円錐からの伝達物質の放出と細胞間の接着形成

上記の高分解能マルチ計測顕微鏡を用いて、神経成長円錐という微小な細胞構造からの伝達物質の放出と細胞の形の変化を調べた。そのため以下のような実験の工夫を行った。

ラットの大脳基底核の神経細胞の神経神経成長円錐から放出される可能性のある伝達物質はアセチルコリンである。この受容体をもつ神経細胞（上頸神経節神経細胞）からパッチクランプ法で電気的な記録を行った。この細胞を伝達物質アセチルコリンのセンサーとして用いる。すなわちパッチクランプ法で電気的な記録している神経細胞を神経成長円錐部に接触させて、神経成長円錐部からこぼれてくる神経伝達物質を極めて高感度に検出した。またビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法により肉眼では捕らえる事の困難な細胞の形態を同時に観察した。実験の概念を図1に示す。

センサーに用いた神経細胞の電気的な変化から神経の活動に伴い、伝達物質アセチルコリンがラットの脳神経細胞の神経成長円錐部から放出されている事を示す電気信号（図3のB）が記録された。またビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法による観察から、神経成長円錐とセンサーの細胞の間に接着構造が形成されることを示す映像が捕らえられた（図3のA）。すなわち、センサー細胞と神経成長円錐部の間を結ぶ細胞の構造（細長いフィロポディア）が映像として捕らえられた。これは、従来ほとんど知られていなかった中枢神経細胞の成長円錐のもつ性質である。

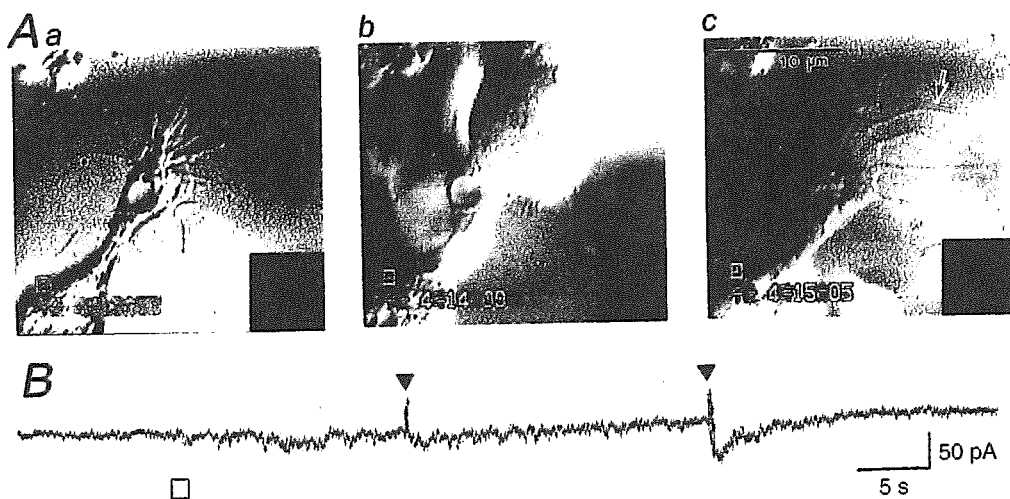


図3 成長円錐にセンサー細胞を接触させ電気的な記録をとる

A図：ビデオ強化型高倍率微分干渉顕微鏡法の映像

B図：センサーに用いた神経細胞の電気的活動の記録。下振れが電気的応答で伝達物質の放出を示す。

Ac 図で細胞間に細い細胞構造（矢印）が形成されていることがわかる。

3. 接着形成の機構

接着形成がどのような経過で生じるかを検討するために、細胞にかわり微小ビーズを用いた研究をおこなった。ビーズを用いることで、細胞にまさに接着する時点でのビーズの振る舞いを、ビデオ顕微鏡で観察し分析する事で接着の性質を調べた。興奮している神経細胞の神経成長円錐部にビーズの集団を吹きかけて細胞とビーズの間に形成される接着の時間経過を調べた。また、光ピンセット法によりビーズを直接細胞に接着させて接着形成の起こるのを待ち、その後のビーズに力を加えて接着点の性質が変化していく事を分析した。接着形成は早い時間経過で起こること、また接着形成の後に細胞は接着点に力が加わることによって備えること、すなわち接着点は細胞骨格と結びつき接着点を介した力の発生を可能にするように準備する事がしめされた(図4)。言い換えると細胞は神経成長円錐部に力をかけて動く準備を分子レベルで始めると考えられる。

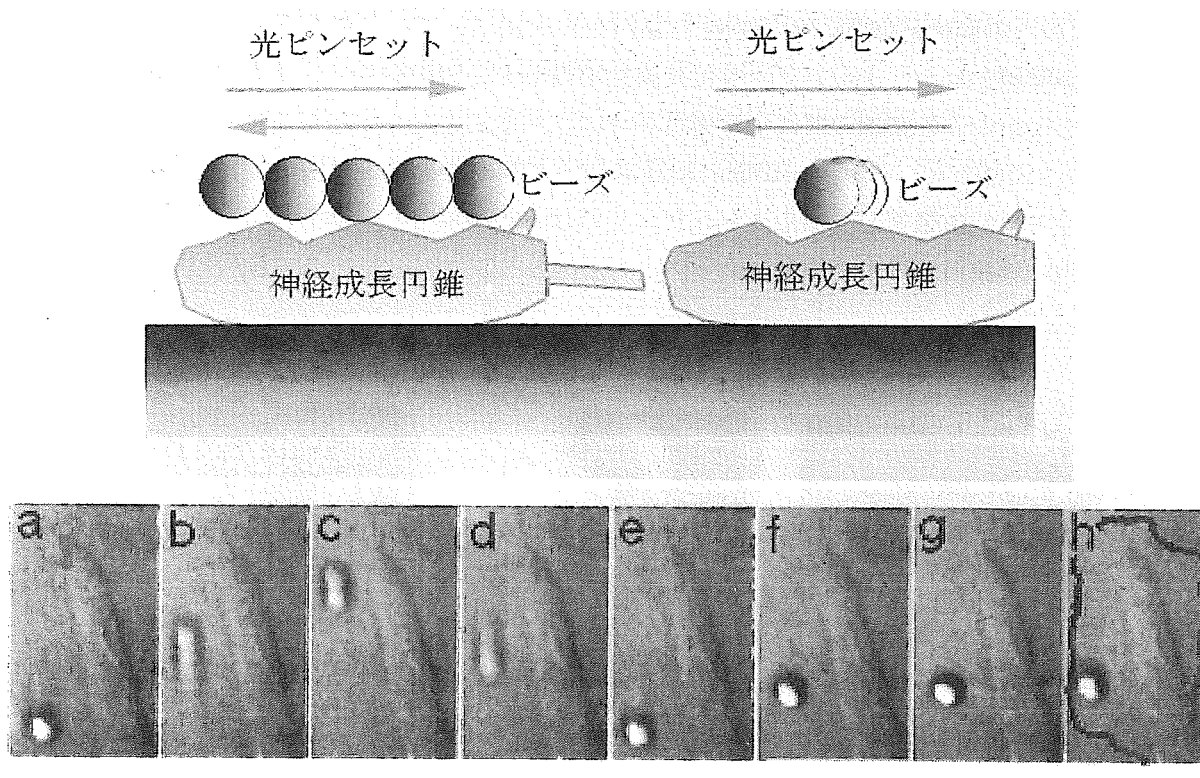


図4 光ピンセットによるビーズの神経成長円錐の上の移動と接着
下図は実際のビーズの動きのこまどり撮影

4. まとめ

神経細胞の先端神経成長円錐は、標的細胞に到達する前から伝達物質の放出という化学情報伝達の本メカニズムをもっている。また、驚くべき事にこの伝達物質の放出と連関して、

急速な細胞間の接着形成がおこなわれる事を示唆するデータが得られた。

本研究の示唆することは、脳という情報処理装置は情報処理を行いながら形成される。言い換えれば脳は神経接続が完了する前から、神経活動による伝達物質の放出という情報の発信（ソフトウェア）と細胞間に接着構造を構築する事（ハードウェア）が表裏一体となって作られていくことである（図5）。

■今後の展開

接着形成の分子機構が不明であるので、それを新しい視点から詳しく検討できるように近接場現象を応用した細胞の観察を始めた。

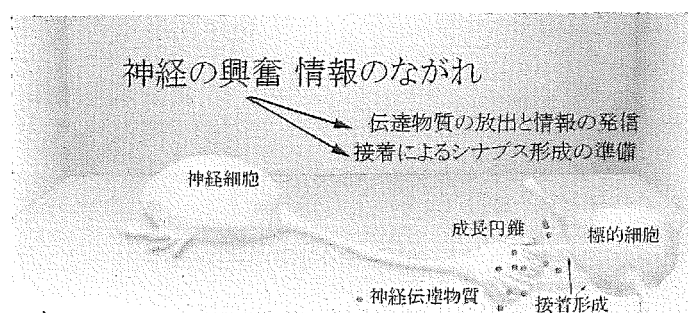


図5 神経細胞につながる（シナプス形成）の最初の現象
神経興奮とそれに続く神経成長円錐で見られた情報と物の動き

この新しい光技術により細胞の膜が接着など生命反応を起こしたときの現象を分子レベルで検討できるようになりつつある。また遺伝子導入で特定の蛋白分子が光のように改変し、分子の光をたよりに神経シナプスの形成されていく様子を近接場イメージングする研究が進行している。

■発表論文リスト

- Tatsumi H., Katayama Y., (1995) Analysis of Ca^{2+} homeostasis in neurons dissociated from rat nucleus basalis: Neuroscience Research 22:259-266
- Ono A., Tatsumi H., Yamamoto K., Katayama Y., (1995) Human B lymphocytes respond to Epstein-Barr virus with an increase in intracellular Ca concentration. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 42:9-18
- Maheswari R. U., Tatsumi H., Katayama Y., Ohtsu M., (1995) Observation of subcellular structure of single neurons with an illumination mode photon scanning tunneling. Optics Communication 120:325-334
- Tatsumi H., Katayama Y., (1995) Na dependent Ca influx by depolarization in neurons dissociated from rat nucleus basalis. Neuroscience Letters 196:9-12
- Tatsumi H., Tsuji S., Anglade P., Motelica-Heino I., Soeda H., Katayama Y., (1995) Synthesis, storage and release of acetylcholine at and from growth cones of rat central cholinergic neurons in culture. Neuroscience Letters 202:25-28

- Maheswari R.U., Monobe S., Tatsumi H., Katayama Y. Ohtsu M., (1996) Observation of Subcellular Structures of Neurons by an Illumination Mode Near-Field Optical Microscope under an Optical Feedback Control. *Optical Review* 3:463-467
- Soeda H., Tatsumi H., Katayama Y., (1997) Neurotransmitter release from growth cones of rat dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience* 77:1187-1199