

LECTURES

パッチクランプ用記録電極の蛍光可視化

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室

石川 大介

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室, 独立行政
法人科学技術振興機構 さきがけ

池谷 裕二

要 旨

遺伝子工学の技術進歩に伴い、蛍光標識されたニューロンからパッチクランプ記録を行う機会が増えている。しかし、ガラス電極はほぼ無蛍光性であるため、標的細胞へアプローチする前に、透過光型顕微鏡下で電極を再視認する必要があった。我々はこの問題を蛍光性アルブミンでガラス電極先端をコートすることで解決した。これにより蛍光標識ニューロンとガラス電極を蛍光顕微鏡下で同時に可視化でき、標的細胞へのアクセスが容易になった。

キーワード：ホールセル記録, GFP, 蛍光, イメージング, 共焦点レーザー顕微鏡

1. 緒 言

脳は様々なタイプのニューロンの集合ダイナミクスによって作動しているため、その機構を解明するためには、特定のニューロンの活動を選択的に記録することが不可欠である。そのための代表的な手法として、標的パッチクランプ記録法がある。たとえば、脳スライス標本において微分干渉コントラスト顕微鏡 [1] やドットコントラスト顕微鏡 [2] を用いて特定のニューロンを同定し、ホールセル記録を行うことができる。

近年、遺伝子工学の技術進歩により、特定のニューロンに蛍光タンパク質を発現させることができるようになってきている。たとえば、細胞の種類 [3-7] や位置 [8, 9], 細胞の発達 [10, 11], あるいは、活性依存的 [12, 13] に、特異的な蛍光標

識が可能になった。ニューロンを生きた状態で可視化できることは、機能解明のうえで強力な武器となる [9, 14, 15]。しかし、パッチクランプ記録に用いるガラス電極は可視光領域ではほぼ無蛍光性であるため、蛍光標識されたニューロンを同定したのちに、蛍光顕微鏡から透過光型顕微鏡に切り替えて細胞と電極を再度観察する必要がある。このため光学的に複雑な顕微鏡システムが必要であり、また光学収差が問題となることもある。

上記の問題を解決するために我々は、蛍光性アルブミンでガラス電極の表面を被覆する手法を開発した。アルブミンは、血清や卵白に豊富に存在する水溶性の生体タンパク質である。水中で安定であり無毒だが、高いガラス接着性がある。この性質を利用し、蛍光色素が共役したウシ血清アル

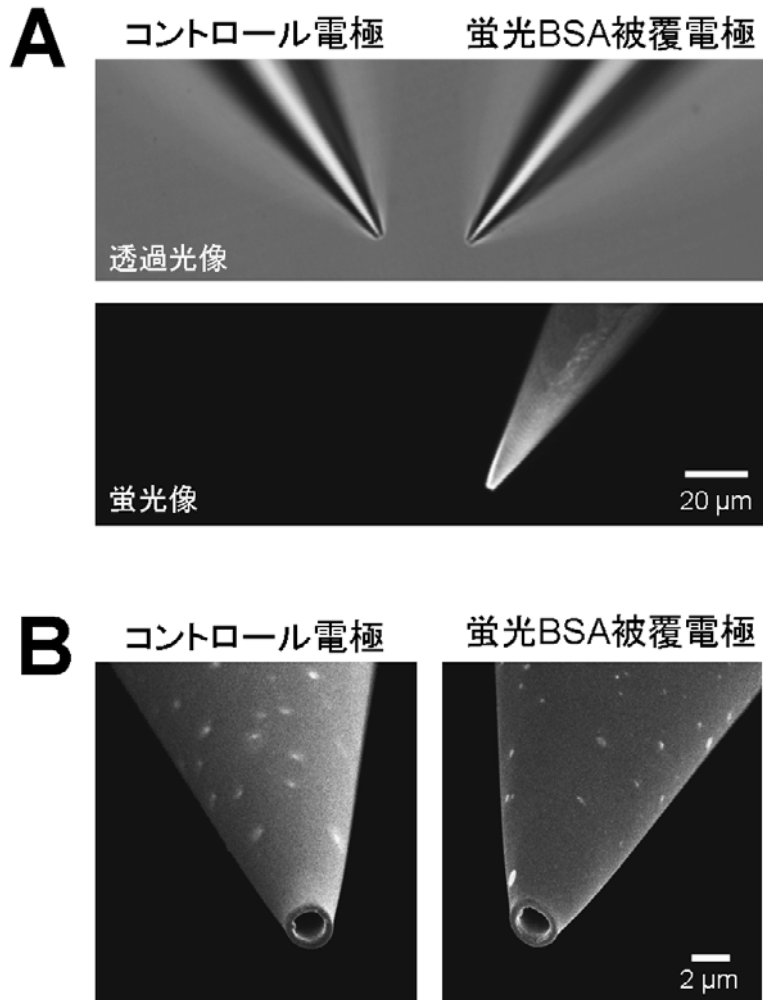


図1. 蛍光 BSA 被覆電極とコントロール電極との観察像の比較
 A. 通常ガラス電極（コントロール）と蛍光 BSA を被覆したガラス電極の比較（上段：透過光像，下段：蛍光像）。蛍光 BSA 被覆電極は蛍光顕微鏡下で視認できる。
 B. 走査型電子顕微鏡像。蛍光 BSA 被覆を行っても目立った汚れや形状の変化は観察されない。

ブミン (bovine serum albumin : BSA) でパッチクランプ記録用電極の表面被覆を行った。とりわけ、Alexa Fluor 488 を共役した BSA (BSA-Alexa 488 ; A-13100, インビトロジェン) を用いると、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) と同じ励起波長で可視化できるため汎用性が高い。

II. 方 法

非特異的吸着を防ぐために、蛍光 BSA 溶液の調製に使用するすべてのチップやチューブをあらかじめ 0.1% BSA に 60 秒間ほど浸したものを用いる。最終濃度 0.02% となるように蛍光 BSA を 0.1M リン酸緩衝生理食塩水に溶解させ、これを 1 ml のチューブに分注し、4°C にて保存する。長期保存する場合はアジ化ナトリウム (NaN_3) が最終

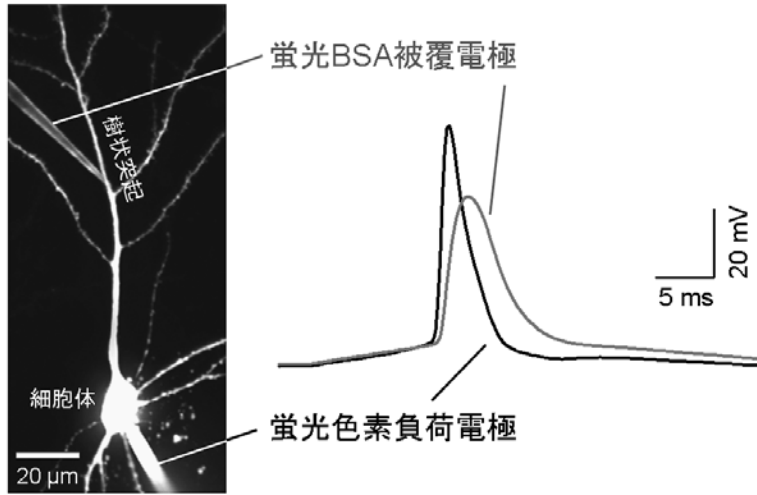


図2. 蛍光電極を用いた樹状突起ホールセル記録
 通常のホールセル記録法により海馬 CA3 錐体細胞に蛍光色素 Alexa Fluor 488 を注入し、神経線維を可視化したのち、蛍光 BSA 被覆電極を用いて樹状突起にホールセル記録を行った。細胞体の活動電位よりも時間遅れを持った活動電位が樹状突起から記録される。

濃度 3mM となるように添加しておくとい。

被覆はガラス電極をパッチクランプ記録に用いる直前に行う。あらかじめ内液を注入した電極に 50~60hPa の陽圧を負荷した状態で、電極先端部を蛍光 BSA 溶液に 5~10 秒間浸した。以上の手順により、図 1A で示すように、蛍光顕微鏡下でガラス電極を可視化できるようになる。図 1B は電極先端の走査型電子顕微鏡像である。蛍光 BSA を被覆してもパッチクランプ記録に問題となるような塵埃等は電極先端に付着していない。また、被覆前後で電極抵抗に変化は認められなかった。

蛍光 BSA 被覆電極は落射型蛍光顕微鏡や二光子励起レーザー顕微鏡でも可視化できるが、オンライン画像化という観点から、高速で画像を取得できるニポウ式ディスク型共焦点顕微鏡を用いることを推奨する。我々は、ニポウ式ディスク型共焦点ユニット (CSU-X1, 横河電機) および背面照射 CCD カメラ (iXon DV897, アンドール) を用い、高開口数の 16 倍または 40 倍の水浸型対物レンズを通じて毎秒 10 フレームの撮影速度で蛍光像を取得している。必要に応じて中間変倍レンズを挿入することもある。

蛍光 BSA 被覆電極を用いることでパッチクランプ記録の質に影響が出るかどうかを調べるため、培養海馬スライス標本の CA3 錐体細胞から電気生理学的記録を行った。膜容量、膜抵抗、直列抵抗を測定したが、蛍光 BSA 被覆電極と非被覆のガラス電極 (コントロール電極) との間で統計的に有意な差は観測されなかった。

実験例を図 2 に示す。Alexa Fluor 488 を錐体細胞の細胞体からホールセル記録によって注入し、神経突起を可視化した。蛍光 BSA 被覆電極の先端を 40 倍対物レンズと 2 倍中間変倍レンズで拡大モニターしながら、樹状突起から再現性よくパッチクランプ記録を行うことができた。

なお、実験例は少ないながら、類似の方法でガラス電極の内壁を被覆することもできることを確認している。したがって、二光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* 脳における標的パッチクランプ記録にも応用可能であると考えられる。

III. 結 論

我々は、蛍光 BSA によりガラス電極先端の表面を被覆することで可視化し、蛍光顕微鏡のみを

用いて標的ニューロンまたはその神経突起からパッチクランプ記録を行った。蛍光 BSA 被覆は、実験操作的に簡便で、信頼性が高いため、標的パッチクランプ記録の多くの事例に柔軟に適用できると期待している（特許出願番号 2010-027141）。

文 献

1. Dodt H-U & Zieglansberger W: Visualizing unstained neurons in living brain slices by Infrared DIC-videomicroscopy. *Brain Research* **537**: 333-336, 1990
2. Dodt H-U, Frick A, Kampe K & Zieglansberger W: NMDA and AMPA receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *European Journal of Neuroscience* **10**: 3351-3357, 1998
3. Oliva A-A Jr, Jiang M, Lam T, Smith K-L & Swann J-W: Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *Journal of Neuroscience* **20**: 3354-3356, 2000
4. Galarreta M & Hestrin S: Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12438-12443, 2002
5. Metzger F, Repunte-Canonigo V, Matsushita S, Akeermann W, Diez-Garcia J, Ho C-S, Iwasato T, Grandes P, Itohara S, Joho R-H & Knopfel T: Transgenic mice expressing a pH and Cl⁻ sensing yellow-fluorescent protein under the control of a potassium channel promoter. *European Journal of Neuroscience* **15**: 40-45, 2002
6. Meyer A-H, Katona I, Blatow M, Rozov A & Monyer H: In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *Journal of Neuroscience* **22**: 7055-7064, 2002
7. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K & Kaneko T: Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *Journal of Comparative Neurology* **467**: 60-79, 2003
8. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage F-H & Verma I-M: Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of Virology* **72**: 8150-8157, 1998
9. Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S, Licznernski P, Waters J, Margrie T-W, Helmchen F, Denk W, Brecht M & Osten P: Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 18206-18211, 2004
10. Saito T & Nakatsuji N: Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. *Developmental Biology* **240**: 237-246, 2001
11. van Praag H, Schinder A-F, Christie B-R, Toni N, Palmer T-D & Gage F-H: Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**: 1030-1034, 2002
12. Barth A-L, Gerkin R-C & Dean K-L: Alteration of neuronal firing properties after in vivo experience in a FosGFP transgenic mouse. *Journal of Neuroscience* **24**: 6466-6475, 2004
13. Wang K-H, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M & Tonegawa S: In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* **126**: 389-340, 2006
14. Mainen Z-F, Maletic-Savatic M, Shi S-H, Hayashi Y, Malinow R & Svoboda K: Two-photon imaging in living brain slices. *Methods* **18**: 231-239, 1999
15. Shi S-H, Hayashi Y, Petralia R-S, Zaman S-H, Wenthold R-J, Svoboda K & Malinow R: Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**: 1811-1816, 1999