

〔原著論文〕

## マウス中脳黒質から急性単離したGABA作動性ニューロンの グルコース感受性応答

—穿孔パッチクランプ法による解析—

菅 世智子<sup>1)</sup>、山田 勝也<sup>2)</sup>

### 要 旨

中脳黒質網様部 (SNr) は、高頻度の発火活動を営むGABA作動性ニューロンを主要構成ニューロンとし、大脳基底核で処理された情報を出力する役割で知られている。このニューロンは、酸素やグルコースといったエネルギー基質の脳内における供給低下を感知して発火頻度を変化させる性質をもつことを報告してきた。しかしそのエネルギー基質の感知機序について、低酸素応答に関しては確立しているが、低グルコース応答の感知機序はわかっていない。今回、この機序の解明を目的に、SNrニューロンの低グルコース応答が単一ニューロンに内在する性質であるか、あるいは細胞間相互作用が介在して実現される性質であるのかについて検討した。

本研究により、急性単離したSNrGABA作動性ニューロンは、低グルコース負荷時に脱分極応答を示すことが明らかとなった。また発火頻度の応答パターンは、既に報告した脳スライスによる実験結果と類似していた。これらの結果から、SNrニューロンのグルコース感受性機序が、単一SNrニューロンに内在する性質に少なくとも一部は依存すること、またSNrの低グルコース応答は脱分極による機構だけでは説明できないことが示唆される。

キーワード：脳代謝、電気生理、膜電位、自発発火頻度

### 序 論

中脳黒質網様部 (SNr) は、運動制御に重要な役割を果たす大脳基底核の出力を担当する神経核で、GABAを神経伝達物質として放出するGABA作動性神経細胞 (ニューロン) を主要な構成ニューロンとしている<sup>1)-2)</sup>。一方SNrのGABA作動性ニューロンは、脳内で最も高頻度の自発発火活動を営むことでも知られており<sup>1)</sup>、その発火活動維持のため酸素やグルコースなどのエネルギー基質に対する要求性が高いと想像される。実際SNrのGABA作動性ニューロンが脳内の酸素ならびにグルコースの低下に鋭敏に反応してその自発発火活動を変化させることをこれまで報告してきた<sup>3)-4)</sup>。同様の結果は他のグループによっても支持されている<sup>5)-7)</sup>。

その生理的役割として、低酸素応答に関しては脳が低酸素状態に陥った際にこれを感知して自発発火頻度を低下させることで危険な全般発作 (generalized seizure) の

発生を抑え、脳ならびに生命を保護していることを明らかにしてきた<sup>3)</sup>。実際脳内酸素分圧が正常の1/4程度に低下して細胞内アデノシン3リン酸 (ATP) 濃度が減少すると、SNrのGABA作動性ニューロンに高濃度に発現するATP感受性カリウムチャネル ( $K_{ATP}$ チャネル)<sup>8)</sup>が開閉し、 $K^+$ イオンが細胞外へ流出することにより細胞興奮が抑制されて発火頻度が低下する。SNrGABA作動性ニューロンの発火低下は全般発作を抑制することが古くから知られており、SNrは、脳内酸素低下時に自発発火を低下させることで生命保護の役割を果たしていると考えられる<sup>9)-11)</sup>。この仮説は複数のグループにより異なる方法で確認され支持されている<sup>5)</sup>。

一方、SNrニューロンの低グルコース応答に関しては、その生理的意義ならびに分子機構共によくわかっていない。空腹や飢餓により血糖値が低下すると、これに連動して脳内の細胞外グルコース濃度も低下する。実際われわれは脳スライスを用いた実験から、SNrのGABA作動

1) 弘前医療福祉大学 (〒036-8102 青森県弘前市小比内三丁目18-1)

2) 弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座 (〒036-8562 青森県弘前市在府町5番地)

性ニューロンの大多数は細胞外グルコース濃度を通常用いられる 10mM から 6 ないし 4mM 程度に穏やかに低下させると、その自発発火頻度を低酸素の場合とは逆に上昇させることを明らかにした<sup>4)</sup>。より低いグルコース濃度では自発発火は停止することから、上記の性質は脳虚血のような病態とは異なり、生理的応答である可能性がある。同様の結果は最近、他の研究グループの独立した研究により確認された<sup>7)</sup>。

脳内グルコース濃度の低下により発火頻度を上昇させるニューロンは、歴史的には視床下部外側核 (LH) など限られた脳領域でおよそ 20% 程度のニューロンが示す性質として最初に大村らが見出し、空腹時の摂食行動との関連が議論され、グルコース感受性ニューロン (glucose-sensitive neuron) と名づけられた<sup>11)</sup>。しかし以来半世紀近く経っても、グルコース低下感知の分子機構は視床下部でも SNr と同様、不明のままである<sup>12)</sup>。

そこで本研究では、SNrGABA 作動性ニューロンの低グルコース応答が、単一 SNr ニューロンのもつ内在的性質に由来するものであるか、あるいは他の細胞要素 (神経細胞やグリア細胞など) との相互作用により現れる性質であるのかを調べるため、マウス脳組織から酵素処理により急性単離した単一 SNr ニューロンに様々なグルコース濃度を負荷した際の応答を、細胞内環境に影響の少ない穿孔パッチクランプ法を用いて電気生理学的に解析した。

## 方法

本研究における動物実験は、弘前大学動物実験委員会の承認を経て、また「弘前医療福祉大学研究倫理に関する指針」に従って、弘前大学にて実施した。黒質神経細胞の単離は、従来報告した方法<sup>3)</sup>に準じ、これに若干の改良を加えておこなった。

まず生後 15 ~ 18 日令の C57BL6J マウス (オス 17 匹) をウレタン麻酔 (1.2 g/kg) の上断頭して脳を取り出し、ただちに氷冷したリンガー液<sup>a)</sup>につけて冷やした。

a) リンガー液 Standard Krebs-Ringer solution の組成 (in mM) : NaCl 127, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.4, MgSO<sub>4</sub> 1.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.24, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucose 10; 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 飽和 (pH 7.4)。

次いで SNr を含む中脳を剃刀で他の部分と分離し、マイクロスライサー (堂阪 EM 製 Zero1) の氷冷ステージに固定し、氷冷リンガー液中で厚さ 400 ミクロンの脳切片 (冠状断) とした。作製した脳切片は膜電位を回復させる目的でリンガー液を循環させたインキュベーター (ハーバード社製) 中に静置した (室温)。なおこの週令のマウスでは、SNr を含む脳切片は 2 枚程度となる。

酵素処理によるニューロンの単離は、プロネース



10 μm

図1 マウス黒質網様部 (SNr) の典型的な急性単離ニューロンの明視野顕微鏡像

(1 mg / 6ml) を含むリンガー液にて、20分から25分、31度で処理した。酵素処理時間はマウスの週令により調節した。左右の SNr を HEPES バッファー<sup>b)</sup> 中に入れ実体顕微鏡下で観察しながら、SNr 部分のみを先端を楕円形にしたマイクロシリンジの針を用いてパンチアウトし、HEPES バッファーを入れた 35mm ディッシュ中に移し、倒立顕微鏡で観察しながら数種類の先端径をもつガラスピペットを順次使用して組織片をピペット内を往復させることで穏やかに SNr ニューロンを単離 (トリチュレーション) した (図 1)。

b) HEPES バッファーの組成 (in mM) : NaCl 150, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl 2, HEPES 10, Glucose 10; (PH 7.4 by Tris)

単離した SNr ニューロンから、常法に従い、HEPES バッファーをかき流した (1 mL/min) 35mm ディッシュ中で、倒立顕微鏡 (Olympus IMT-2, Tokyo) 下で目視しながら室温 (23-28°C) で、抵抗値 3~5 MΩ 程度のガラスパッチピペット<sup>c)</sup> を用いて記録した。なお SNrGABA 作動性ニューロンには ATP 感受性カリウムチャンネルが発現し、通常のコールドセルパッチクランプ法でカレントクランプモードで記録すると細胞内 ATP の減少により同チャンネルが開閉して自発発火活動が次第に減弱する。そこで本実験は先行研究に倣って Gramicidine (0.1g/ml) による穿孔パッチクランプ法を用いて神経活動を記録した<sup>3)</sup>。また SNr を構成する主要ニューロンは GABA 作動性ニューロンであるが、一部ドーパミン作動性ニューロンも存在する。ドーパミン作動性ニューロンは GABA 作動性ニューロンに比較して広いスパイク幅を持ち、同一

件において自発発火頻度が低く、過分極通電時に明瞭なH電流 (hyperpolarization-activated, cyclic AMP-dependent non-selective cation current; Ih) を示すことがよく知られている。そこでこれらの基準<sup>3)</sup>をもとにGABAニューロンの同定をおこなった。

c) ピペット内液の組成: KCl 150, HEPES 10, (PH 7.2 by Tris)

実験時、グルコース濃度を 10mM から低下させる場合は、sucrose 濃度を増やすことで浸透圧の変化を防止した。薬理学的実験はすべてバス投与にて実施した。試薬は Pronase (CALBIOCHEM, Canada), Gramicidine (SIGMA, St. Louis, MO) 製を使用した。

信号は EPC7 (List 社製, Germany) を用いて増幅し、オシロスコープおよび XY レコーダーにて電流および膜電位変化をモニターするとともに PCM エンコーダー (NIHON KOHDEN, Tokyo) を介してビデオテープに記録した。記録は、off-line にてビデオテープから PCM デコーダー、AD 変換器 (Digidata1340, 米国 Axon 社製, Foster

City, CA) を介してデジタル化した上、市販ソフトウェア (Clampex 8, Axon 社製) によりパーソナルコンピュータ (Windows 98) に取り込み、解析した。統計処理にはマイクロソフト社エクセル 4.0 ならびに Stat View 4.0 を使用し、Student's paired *t*-test で比較した。数値は平均値 ± SD で表した。

## 結果

PD15~18 のマウス SNr から急性単離した 13 例の GABA 作動性ニューロンに対し、外液のグルコースを 10mM から 8mM, 6mM, 4mM へと 3 通りに低下させ、投与前と投与中の膜電位応答ならびに自発発火頻度の変化を比較した。まずグルコース濃度を 10mM から 8mM へとわずかに低下させたところ、投与中の膜電位は全例で投与前より上昇した (図 3 A)。図 2 A に典型例を示す。平均値は投与前  $-56.2 \pm 4.3\text{mV}$ 、投与中  $-52.0 \pm 3.8\text{mV}$  で、平均上昇分は  $4.2 \pm 3.2\text{mV}$  であった。ただし膜電位上昇のばらつきが大きく、*t* 検定では有意差を示すにいたら

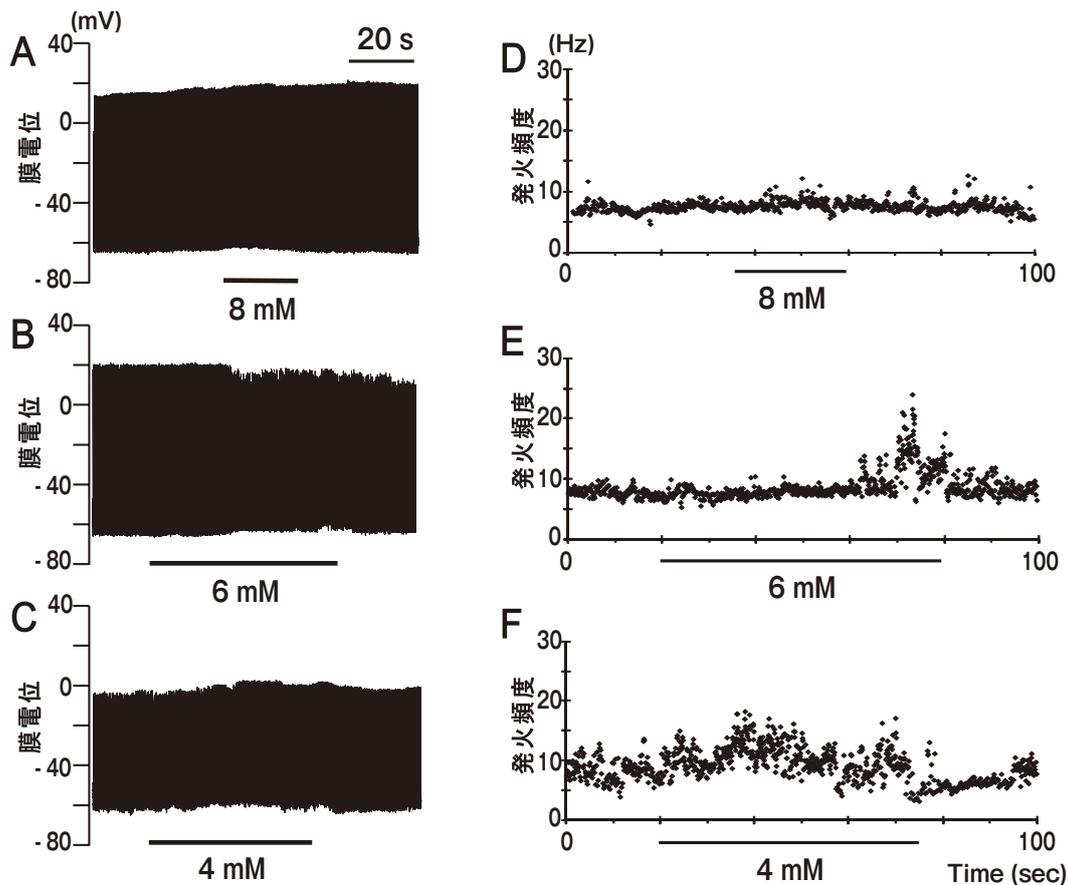


図2 急性単離 SNrGABA作動性ニューロンの低グルコース負荷に対する典型的な膜電位応答ならびに自発発火応答 A-F, 細胞外のグルコース濃度を 10mM から 8, 6, 4mM に低下させた際の膜電位 (A-C) ならびに発火頻度 (D-F) の代表的変化。膜電位はいずれの濃度においても、グルコース負荷時に脱分極した。なお発火頻度が高いため表示された時間スケールでは個々のスパイクを識別できない。発火頻度は、8mM においてはわずかな上昇傾向、6mM では一過性的上昇、4mM では持続的上昇を示した。

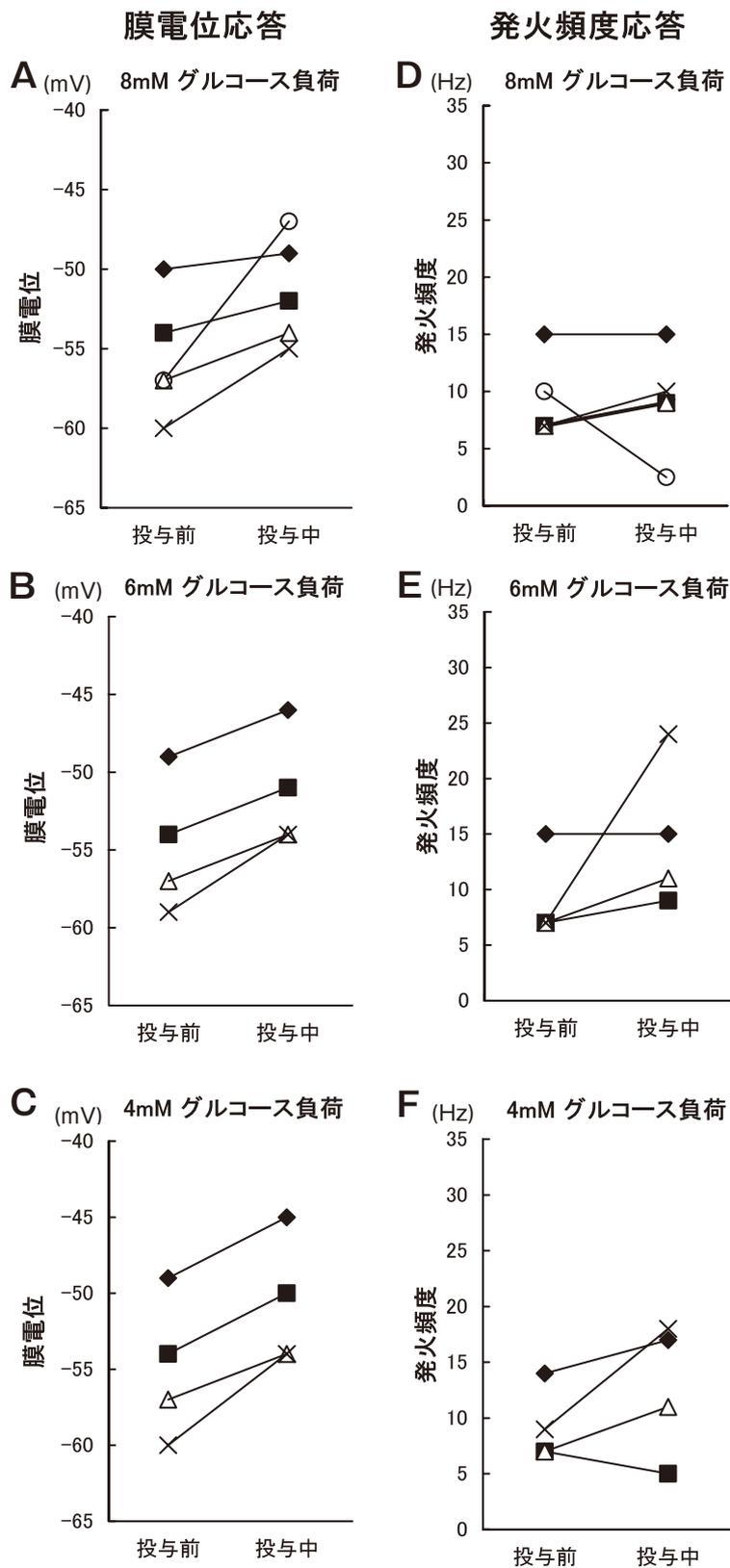


図3 8,6,4mMグルコース負荷に対するSNrGABA作動性ニューロンの膜電位応答ならびに自発発火応答のまとめ  
細胞外のグルコース濃度を10mMから8,6,4mMに低下させた際の膜電位応答(A-C)ならびに発火頻度応答(D-F)のまとめ。AとD, BとE, CとFにおいて、同一シンボルで表されたものは同一ニューロンを示す。A-C, 膜電位はいずれのグルコース濃度においても脱分極を示した。D-F, 発火頻度応答には増加、減少、無変化の3つのパターンが見られたが、どの濃度においても発火頻度の増加を示したニューロンが多いことがわかる。

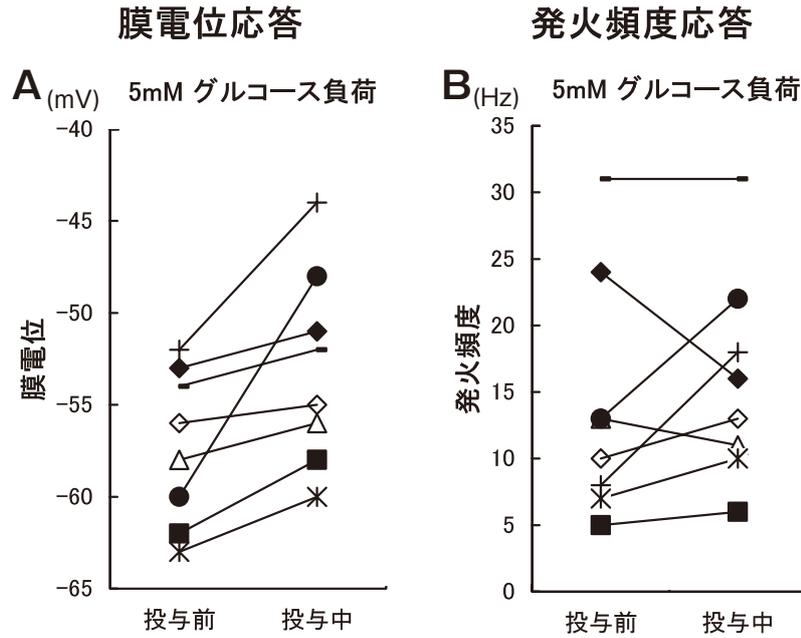


図4 5mMグルコース負荷に対するSNrGABA作動性ニューロンの膜電位応答ならびに自発発火応答のまとめ  
細胞外のグルコース濃度を10mMから5mMに低下させた際の膜電位応答(A)ならびに発火頻度応答(B)のまとめ。AとBにおいて、同一シンボルで表されたものは同一ニューロンを示す。A, すべての例で脱分極が認められた。B, 発火頻度応答には、増加、減少、無変化の3つのパターンが見られたが、発火頻度の増加を示したニューロンが多いことがわかる。

なかった ( $p=0.0578$ ; paired  $t$ -test)。

一方8mMグルコース負荷に対する自発発火頻度の変化については、ごくわずかに発火頻度の上昇傾向を示したものが5例中に3例あり、残りの1例は全く変化なく、更に1例は発火頻度が減少し、3通りの変化のパターンがみられた(図3D)。図2Dに発火頻度変化の例を示す。発火頻度上昇を示した3例についての発火頻度の平均値は、10mMグルコース時の $7.0 \pm 0.0\text{Hz}$ に対し8mMグルコース下では $9.3 \pm 0.5\text{Hz}$ で、上昇傾向が認められた ( $p=0.019$ ,  $n=3$ , paired  $t$ -test)。

次に外液のグルコース濃度を10mMから6mMに低下させた場合、8mMの場合と同様に全例で膜電位は上昇を示した。典型例を図2Bに示す。すなわち平均値は、投与前の $-56 \pm 4.7\text{mV}$ から投与中に $-52.5 \pm 4.0\text{mV}$ へと上昇し、その差は $3.5 \pm 0.9\text{mV}$ で、統計的に有意な上昇を示した ( $p=0.0059$ ; paired  $t$ -test, 図3B)。自発発火頻度の変化については、4例中3例が発火頻度の上昇を示し、うち1例では3倍以上の大きな頻度上昇を示した(図2E)。また8mMの場合と同じく発火頻度の変わらないものが1例あった。例数に比して分散が大きく、6mMでの上昇群の平均をとると、10mMにおける $7.0 \pm 0.0\text{Hz}$ に対し6mMでは $14.7 \pm 6.6\text{Hz}$ で、平均値は増大したが有意差は認められなかった ( $p=0.2446$ ,  $n=3$ , paired  $t$ -test, 図3E)。

外液のグルコース濃度を10mMから4mMに低下させた場合も、8mMや6mMの場合と同様に全例で膜電位が上昇した。典型例を図2Cに示す。平均値は $-56.0 \pm 4.7\text{mV}$ から $-51.8 \pm 4.1\text{mV}$ へと、 $4.3 \pm 1.1\text{mV}$ の有意な上昇を示した ( $p=0.0066$ ; paired  $t$ -test, 図3C)。自発発火頻度は、4例中3例が上昇を示し、うち1例は2倍に発火頻度が上昇した(図2F)。また発火頻度低下を示したニューロンも1例あった。4mMでの上昇群の平均をとると、投与前の $10.0 \pm 2.9\text{Hz}$ に対し、投与中に $15.3 \pm 3.1\text{Hz}$ へと増加したが、例数に対しばらつきが大きく有意差は認められなかった ( $p=0.1028$ ,  $n=3$ , paired  $t$ -test, 図3F)。

以上の8, 6, 4mMの3通りのグルコース濃度に対する自発発火頻度の変化を見ると、いずれの群でも発火頻度の上昇傾向を示したものが多かった。そこで6mMと4mMの中間の5mMを選び、例数を増やして実験をおこなった。8個のSNrGABA作動性ニューロンに対し、外液のグルコースを10mMから5mMに1分間低下させたところ、膜電位は全例で上昇した。すなわち投与前の $-57.3 \pm 3.9\text{mV}$ から投与中に $-53.0 \pm 5.0\text{mV}$ に変化し、その差は平均 $4.3 \pm 3.6\text{mV}$ で、統計的に有意な上昇を示した ( $p=0.0160$ ; paired  $t$ -test, 図4A)。一方自発発火頻度の変化については、8例中5例(62.5%)が増大を示し、2例が減少、1例は変化がなかった(図4B)。発火頻

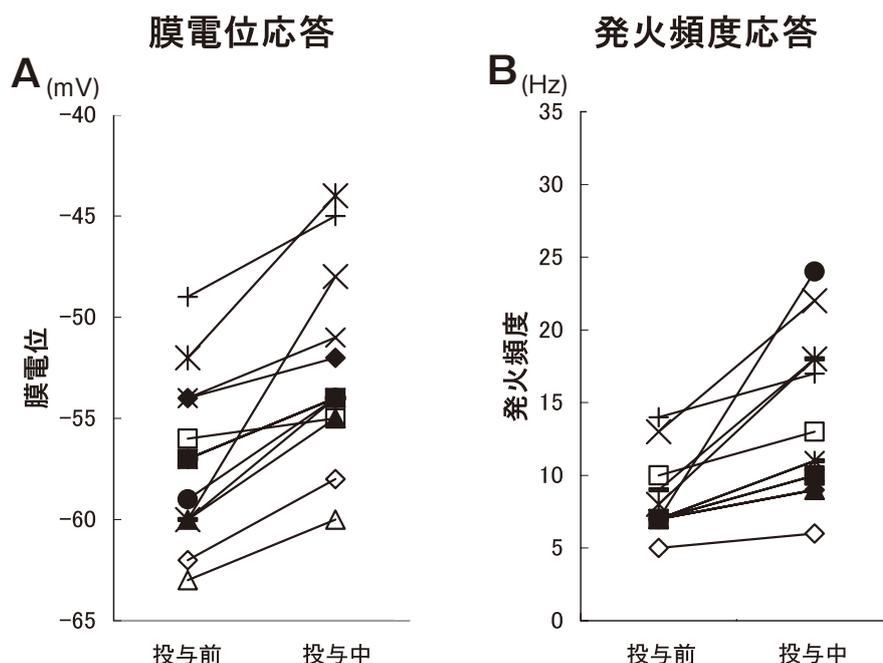


図5 低グルコース負荷時(8, 6, 5, 4mM)に発火頻度上昇を示したすべてのSNrGABA作動性ニューロンの膜電位応答ならびに自発発火応答のまとめ

図3および図4に示したニューロンのうち、低グルコース負荷時に発火頻度上昇を示したすべてのニューロンの膜電位応答(A)ならびに発火頻度応答(B)。AとBにおいて、同一シンボルで表されたものは同一ニューロンを示す。A, すべての例で脱分極が認められた。B, 発火頻度の増加の程度には大きいものと小さいものが認められたが、膜電位の程度との間に明確な相関は認められない。

度の増大を示した5例について統計的検討をおこなったところ、10mMでの $8.6 \pm 2.7\text{Hz}$ に対し5mMでは $13.8 \pm 5.7\text{Hz}$ で、平均値は増加傾向を示した( $p=0.0446$ ; paired *t*-test)。

以上の8, 6, 4 mMおよび5mMグルコース負荷の結果を総合すると(図5 A, 5 B)、細胞外グルコース低下時に膜電位は投与前の $-56.0 \pm 3.9\text{mV}$ から、投与中 $-51.9 \pm 4.1\text{mV}$ へと平均 $4.1 \pm 2.8\text{mV}$ の有意な上昇を示した( $n=21$ ,  $p < 0.0001$ )。また自発発火については、頻度上昇を示したニューロンの割合は66.7% (14/21)で、この上昇群について発火頻度の増加は統計的に有意であった( $p=0.0009$ , paired *t*-test)。一方、14.3% (3/21)のニューロンは、脱分極応答を示しながら発火頻度が変わらず、また発火頻度が低下したニューロンは19.0% (4/21)存在した。

### 考 察

本研究は、中脳黒質網様部SNrから急性単離したGABA作動性ニューロンのグルコース感受性についての初めての報告である。

マウスのSNrニューロンを急性単離したのち、*h*電流がなく、スパイク幅が狭いことを基準として同定したGABA作動性ニューロンに対して、外液のグルコース濃度を10mMから8, 6, 4mM、もしくは5mMに低下させた

際の膜電位変化ならびに自発発火頻度の変化の有無を検討した。その結果、測定した全例で膜電位の上昇すなわち脱分極応答が認められた。自発発火頻度の変化については、上昇するもの、変化しないもの、低下するものの3通りの応答パターンが示された。全GABA作動性ニューロンに占める発火頻度上昇群の割合は66.7%で、頻度上昇群のみについて解析すると、有意な発火頻度の上昇が示された。

SNrGABA作動性ニューロンの低グルコース応答のパターンは、脳のグルコース感受性ニューロンを視床下部で最初に報告した大村裕らの定義<sup>11)</sup>によるグルコース感受性ニューロン(glucose-sensitive neuron)、グルコース非感受性ニューロン(glucose-insensitive neuron)、グルコース応答性ニューロン(glucose-responsive neuron)の応答パターンと類似しており、またこれまで報告してきた脳スライス実験の結果(6 mMグルコース負荷時で約70%が発火頻度上昇、4mM時で約80%が上昇、残りは低下もしくは無変化)<sup>5)</sup>とも類似している。従ってSNrニューロンのグルコース感受性機序の少なくとも一部はニューロンの内在的性質に依存していることが示唆される。また全例が脱分極応答を示したにもかかわらず、発火頻度の変化には3通りのパターンが存在していたことから、脳のグルコース応答性は、少なくとも黒質網様部においては脱分極だけでは説明できないことが示唆された。

本研究における細胞の記録数は十分多いとは言えないが、SNrは他の神経核と比べ、安定した自発発火を示すニューロンを急性単離することが難しく、穿孔パッチクランプをおこなった報告は少ない。脳の唯一のエネルギー源であるグルコースに対するニューロンの感受性や非感受性がどのような細胞内機構によっておこるのか、今後例数を増やした本格的な解析の結果が待たれる。

これまでにSNrのGABA作動性ニューロンのグルコース感受性を調べた実験には、*in vivo*実験<sup>7,14)</sup>や、マウス急性脳スライスの細胞外記録法を用いて調べた筆者らの以前の報告<sup>13)</sup>があり、いずれにおいても本論文の結果と共通する発火頻度上昇を示すニューロンの存在が示されている。ここで脳スライスによる実験結果<sup>13)</sup>を本単離細胞実験と比較すると、全体の反応パターンはおおよそ類似しているが、いくつかの違いも認められた。スライスでは8mMグルコース負荷では発火頻度が変化しないのに、単離細胞では変化を認めたこともその一つである。また脳スライス実験と比較して、単離細胞では低グルコース負荷時の発火頻度のはっきりした変化を示すものの割合が、どの濃度でも少ない傾向が見受けられた。

こうした脳スライス実験の結果と急性単離細胞実験の結果の違いについて注意すべきこととして、両者の実験条件には、動物の週令、溶液組成などに違いがあることが指摘できる。脳スライス実験では完全な成熟マウスからでもSNrスライスの作成が容易であるのに対して、SNrGABA作動性ニューロンの急性単離は生後20日を越えると急速に成功率が低下する。ニューロンのグルコース感受性は成熟動物の*in vivo*実験で確立されたもので、成熟SNrニューロンの急性単離は大きな技術的課題である。

また自発発火頻度の違いについても注意する必要がある。実際、正常酸素分圧下での急性単離SNrニューロンの発火頻度は多くの場合10Hz以下であるのに対して、*in vivo*や脳スライスにおいては数10Hzで、大きく異なる。高い自発発火が持続的に維持されている状態では、わずかなエネルギー基質の低下によってもエネルギーの供給と消費の平衡が崩れ、自発発火頻度が変化して、脳スライスの場合のような鋭敏なグルコース感受性をもたらすのかもしれない。あるいは脳スライス環境にある細胞間相互作用が、SNrのグルコース感受性の鮮明化に役立っている可能性もある。

また脳スライスでは通常33℃度付近で実験を実施するが、急性単離細胞実験ではニューロン活動をより長時間維持する目的で、室温で通常記録する。しかし温度が低下すると発火頻度も低下し、我々の経験では22℃以下では急性単離SNrニューロンの自発発火は停止する。自発発火活動が低い場合、高頻度発火時と比較して

グルコースや酸素といったエネルギー基質に対する要求性が小さくなると予想され、グルコース低下時の発火頻度の変化が小さくなったり、時間経過が遅くなる可能性も考えられる。

本研究では、低グルコースを負荷した全てのSNrGABA作動性ニューロンが脱分極応答を示した。これは低酸素負荷時にSNrニューロンが過分極応答を示したことと対照的である<sup>3)</sup>。序文に記したように、低酸素時にはATP感受性カリウムチャネルの開口により過分極がおきるが、本研究では低グルコース負荷時に発火頻度の低下した例でも脱分極応答がおきたことから、ATP感受性カリウムチャネルの開口とは明らかに異なるメカニズムが関与していると考えられる。

脱分極が起きる原因として、一般に陽イオンの流入、陰イオンの流出、ポンプ活動の低下やATP産生の増加が考えられる。ちなみに視床下部外側核の低グルコース応答の機序について、ポンプ活動の低下によるという主張もある。しかし少なくともSNrでは、全ての細胞が脱分極しながらも発火頻度は上昇のみならず、変化なし、あるいは減少を示した例もあったことから、ポンプ活動の低下に起因する脱分極によって発火頻度が上昇するという説明はできない。

ニューロンの低グルコース応答の生理的意義は、視床下部外側核で大村らにより摂食との関連が示されたが<sup>11)</sup>、SNrの低グルコース感受性の生理的意義についてはよくわかっていない。そもそも脳の正常細胞外グルコース濃度には諸説あり<sup>12)</sup>、本論文でいうところの「低グルコース」が果たして生理的範囲に含まれるか否か、直接的証拠はない。しかし以下に述べる理由により、本研究における低グルコース応答は生理的範囲の応答である可能性がある。

前段で述べたようにSNrGABA作動性ニューロンには、機能的にもmRNAレベルでもATP感受性カリウムチャネルが高濃度に発現しており、コンダクタンスの大きな同チャネルが開口すれば過分極するか、もしくは大きなシャunting効果（脱分極を打ち消す作用）により発火頻度は必ず低下する<sup>11)</sup>。SNrニューロンは、酸素濃度が生死を分ける境界濃度に達すると、ATP感受性カリウムチャネルが開口して発火頻度を低下させるため、本結果の示すように過分極を伴わず、なおかつ発火頻度の可逆的上昇が主な応答である低グルコース負荷は、脳が危険な状態に陥るレベルとは考えにくい。

推定だが、むしろ本論文において取り扱っている応答は、グルコースの生理的濃度範囲において、SNrがグルコース低下を感知して摂食行動の制御になんらかの形で生かす上で役立っている可能性がある。実際、SNrの機能には、眼球運動、歩行運動の制御への関与のほか、摂

食に関連した顎や手の運動にも関与することが古くから知られている<sup>14)-15)</sup>。

またSNrニューロンの軸索は、感覚の中継核として重要な視床、視覚情報処理をおこなう発生学的に古い皮質である上丘、運動リズム形成の制御を司る脳幹といった広い領域に投射して、これらの領域を持続的に抑制している<sup>1)</sup>。SNrは脳内エネルギー基質の低下に際して発火頻度を上昇させることでこれらの脳部位への抑制を強化し、緊急性を要しない脳の情報処理に伴うエネルギー消費を防ぐなどの役割を果たしている可能性も考えられる。脳の唯一のエネルギー源と言われるグルコースの脳内レベルの低下を感知する細胞内機構を解明する詳細な研究と、その生理的役割を明らかにする更なる実験が必要である。

### 謝 辞

本実験の基礎となる研究をおこなった米国エモリー大学のHongji Yuan博士、京都大学の稲垣暢也博士、データ整理や実験設備のセットアップに助力いただいた弘前大学統合機能生理学講座の長友克広博士、マウスの維持管理に助力いただいた古川正仁氏、佐々木綾子氏、神由紀子氏、および成田のみ子氏に深謝します。なお本研究は、科研費19590203、独立行政法人 科学技術振興機構重点地域研究開発推進プログラム（育成研究）「蛍光ブドウ糖トレーサー法の実用化技術の開発」、平成19年度および20年度弘前大学学長指定重点研究（Grant for Priority Research Designated by the President of Hirosaki University）、および平成21年度弘前大学機関研究の助成を受けて行なわれたものである。

（平成22年1月22日）

### 引用文献

1. Hikosaka, O., Takikawa, Y. and Kawagoe, R. : Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol. Rev.* 80(3): 953-978, (2000).
2. Oertel, W.H., Tappaz, A., Berod, A. and Mugnaini, E. : Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. *Brain Res. Bull.* 9: 463-474, (1982).
3. Yamada, K., Ji, J.-J., Yuan, H., Miki, T., Sato, S., Horimoto, N., Shimizu, T., Seino, S. and Inagaki, N. : Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science.* 292: 1543-1546, (2001).
4. Yamada, K. and Inagaki, N. : ATP-sensitive K(+) channels in the brain: sensors of hypoxic conditions. *News. Physiol. Sci.* 17: 127-130, (2002).
5. Yuan, H., Yamada, K. and Inagaki, N. : Glucose sensitivity in mouse substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 355(3): 173-176, (2004a).
6. Munoz, A., Nakazaki, M., Goodman, J. C., Barrios, R., Onetti, C. G., Bryan, J. and Aguilar-Bryan, L. : Ischemic preconditioning in the hippocampus of a knockout mouse lacking SUR1-based K<sub>ATP</sub> channels. *Stroke* 34: 164-170, (2003).
7. Velisek, L., Veliskova, J., Chudomel, O., Poon, K.-L., Robeson, K., et al. : Metabolic environment in substantia nigra reticulata is critical for the expression control of hypoglycemia-induced seizures. *J. Neurosci.* 28(38): 9349-9362, (2008).
8. Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, IV, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, I., Seino, S. and Bryan, J. : Reconstitution of I<sub>KATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* 270: 1166-1170, (1995).
9. 山田勝也, 稲垣暢也 : 「低酸素状態において脳を保護するATP感受性カリウムチャネルの働き」. *生体の科学*. Vol. 53(4), 290-294, (2002).
10. Yamada, K. and Inagaki, N. : Neuroprotection by K<sub>ATP</sub> channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38(6): 945-949, (2005).
11. Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., Wayner, M.J. : Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature.* 222: 282-284, (1969).
12. 山田勝也 : 「大脳基底核におけるグルコース代謝」. *Brain & Nerve.* 61(4): 381-388, (2009).
13. Yuan, H., Yamada, K. and Inagaki, N. : Multiminute oscillation in mouse substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 355: 136-140, (2004b).
14. 西野仁雄 : 「摂食行動と大脳基底核」. 伊藤正男編, *脳と運動*, 東京, 平凡社. 331-355 (1983).
15. Nishimuta, K., Sasamoto, K., Ninomiya, Y. Neural activities in the substantia nigra modulated by stimulation of the orofacial motor cortex and rhythmical jaw movements in the rat. *Neuroscience* 113: 915-923 (2002).

---

## Glucose-sensitivity of GABAergic neurons acutely dissociated from midbrain nucleus substantia nigra of mouse: an analysis by a perforated patch clamp method

Suga, Sechiko<sup>1)</sup> Yamada, Katsuya<sup>2)</sup>

1) Hirosaki University of Health and Welfare, 18-1, 3chome, Hirosaki 036-8102, Japan.

2) Department of Physiology, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036-8562, Japan.

### Abstract

The midbrain nucleus substantia nigra pars reticulata (SNr) consists mainly of GABAergic neurons that exhibit high-frequency spontaneous firings. SNr has been known to output information processed in the basal ganglia. On the other hand, we have shown that SNr neurons change their firing rate when they sense a shortage of energy substrates, i.e. oxygen/glucose concentration, in the brain. To get closer to an understanding of the mechanism for glucose sensing, we examined whether or not the glucose sensitivity of SNr neurons is an intrinsic property of single neurons or is mediated by intercellular relationships.

To summarize, it was revealed that acutely dissociated GABAergic neurons in SNr were depolarized in response to moderately lowered glucose. The response patterns of firing rate resembled results we reported previously using acute slice. These results suggest that the mechanism for sensing the lowered glucose of SNr neurons depends at least upon the intrinsic properties of single SNr neurons, and the glucose responsiveness cannot be produced solely by membrane depolarization.

Key words: brain metabolism, electrical physiology, membrane potential, spontaneous firing rate