

1 目的

GFP を発現させた神経細胞と株化した培養細胞とを比較・観察して、神経細胞の形態についての理解を深める。また、抗体を用いた免疫染色により、神経機能を支える様々なタンパク質のうち、シナプス電位を発生させるグルタミン酸受容体と活動電位を発生させる電位依存性 Na^+ チャンネルの細胞内局在を理解する。

2 原理

神経細胞は、情報処理装置としての特徴を備えている。大きく分けて、細胞体、樹状突起、軸索という3つの構造から成り立っている。

細胞体は、核を持つ。内部にはカリウムを多く含む細胞質ゾル・他の動物細胞と同様の細胞内小器官(ミトコンドリアや小胞体など)をもつ。

樹状突起は、他の細胞から情報を受け取り、その情報を電子シグナルに変換する。細胞体から複数出ており、さらに枝分かれている。

軸索は、活動電位を発生させて、他の細胞に情報を伝える機能を持っている。細胞体からは1本のみ出ており、細胞から出たあと末端付近で多く枝分かれている。別名神経線維とも言われる。

図 1. 神経細胞の構造

3 実験操作

3.1 実験器具・機器

- ・ピペットマン
- ・スライドガラス
- ・蛍光顕微鏡
- ・共焦点レーザー顕微鏡

3.2 試薬類

- ・PBS 緩衝液
- ・ブロッキング溶液
- ・1 次抗体溶液
- ・2 次(蛍光)抗体溶液
- ・封入剤

3.3 手順

- ①試料は用意されていたものを用いた。マウス胎児より取り出した海馬神経細胞を 17 日間カバーストリップ上で培養し、4%パラホルムアルデヒド(PBS)で固定したものである。
- ②①にブロッキング溶液を 500 μ L 加えて浸し、室温で 20 分間ブロッキング反応を行った。
- ③ブロッキング溶液を取り除き、1 次抗体溶液を 500 μ L 加えた。一つはグルタミン酸受容体に対するもので、もう一つは電位依存性 Na^+ チャネルに対するものである。その後 60 分間室温で反応を行わせた。
- ④③の試料から 1 次抗体溶液を取り除き、PBS を 500 μ L ずつで 3 回洗浄を行った。
- ⑤PBS を取り除き、2 次抗体溶液 500 μ L 加え、45 分間室温で反応を行わせた。このとき、蛍光物質が退色しないようにカバーを被せた。
- ⑥⑤の待ち時間で、予め用意されていた GFP を発現させた培養細胞と神経細胞を、蛍光顕微鏡によって観察した。その後それぞれ写真撮影を行った。
- ⑦⑤の試料から 2 次抗体溶液を取り除き、PBS を 500 μ L ずつで 3 回洗浄を行った。
- ⑧⑥のカバーストリップを、封入剤を用いてスライドガラス上にマウントした。
- ⑨スライドガラス上にマウントした培養神経細胞を、蛍光顕微鏡によって観察した。その後それぞれ写真撮影を行った。

4 実験結果

写真は、このレポートの末尾に添付した。

4.1 GFP の発現した培養細胞と神経細胞

レポート末尾に添付した写真より、培養細胞は円状に発現しているのに対し、神経細胞は円状に発現しているものに加えて、軸索や樹状突起も発現しているのが見て取れる。これより、原理で述べたような神経細胞の構造を実際に観察し、その独特な構造を確認することができた。

4.2 グルタミン酸受容体及び電位依存性 Na^+ チャンネルの神経細胞内局在

電気依存性 Na^+ チャンネルの写真では、神経細胞全体に赤色も緑色も蛍光を示していた。このことより、電気依存性 Na^+ チャンネルは、神経細胞全体に発現していると考えられる。

グルタミン酸受容体の写真では、緑色の蛍光は神経細胞全体にあったが、赤色の蛍光は細胞体と樹状突起でのみ見られた。このことより、グルタミン酸受容体は細胞体および樹状突起で発現していると考えられる。

5 課題

5.1 GFP 発現神経細胞の特徴と培養細胞との比較

神経細胞の構造の特徴は、原理や結果 4.2 で述べた。

神経細胞の中心にある細胞体は、一般的な細胞と同様に円状であるが、そこから 2 種類の線(軸索と樹状突起)が出ていることが、構造の大きな違いである。

5.2 シナプス電位の発生から活動電位の発生に至るメカニズム

そもそもシナプスとは、神経細胞間の情報伝達の間である。高等生物に多く存在する化学シナプスでは、シナプスに情報を持ってくるシナプス前細胞とシナプスから情報を受け取るシナプス後細胞間における、神経伝達物質のやりとりが関与する。

活動電位がシナプス前細胞の軸索末端まで到達すると、シナプス前細胞へ Ca^{2+} が流入し、シナプス小胞がシナプス前細胞の細胞膜と融合することで神経伝達物質が細胞外へ放出される。放出された神経伝達物質の一つであるグルタミン酸はシナプス後細胞の樹状突起に

存在するグルタミン酸依存イオンチャネルと結合し、チャネルが開き Na^+ が細胞内に流入することでシナプス電位が生じ、小さな脱分極が発生する。この脱分極によって前述とは異なるグルタミン酸依存チャネル群を阻害する Mg^{2+} が遊離され、チャネルが開き Ca^{2+} が細胞内に流入する。以上のような受容体により正電荷が流入した細胞膜では、脱分極により細胞内が正に帯電し、電位差によって負に帯電する細胞内へ活動電位が発生する。この電位を感知して細胞膜上の Na^+ チャネルが開き、 Na^+ が流入することで正に帯電する。神経細胞全体に存在する電位依存性 Na^+ チャネルはこの電位の流れによって軸索末端に向け電位を伝えていく。 Na^+ チャネルには自動的な不活性化機構があり、細胞膜の脱分極が続いたとしても、すぐ閉じ不活性か状態となる。この不活性化状態は膜電位が静止電位と同程度に戻っても続き、その間チャネルは開かない。そのため正電荷による電位の流れは活動電位の伝わる方向とは逆方向にあっても、膜電位は変化しない。

6 引用・参考文献

- ・神経細胞の特徴 ― 脳の世界

URL : http://web2.chubu-gu.ac.jp/web_lab/mikami/brain/10-1/index-10-1.html

- ・『Essential 細胞生物学』 訳・中村桂子他 南江堂出版