

平成22年5月6日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19590214
研究課題名 (和文) 細胞内カルシウムストアの膜電位変化による細胞間シグナリング
研究課題名 (英文) Intercellular signaling by changes in the membrane potential of intracellular calcium stores
研究代表者 山下 勝幸 (YAMASHITA MASAYUKI) 奈良県立医科大学・医学部・教授 研究者番号：20183121

## 研究成果の概要 (和文)：

発生初期胚の網膜神経上皮では細胞内 Ca ストアからの Ca 放出により細胞間で同期した Ca オシレーションが起こる。細胞内 Ca ストアを構成する核膜を電位感受性蛍光色素でラベルし、高速共焦点スキャナと光電子増倍管を用いて蛍光測定することにより、高周波数のバースト状膜電位変動が周期的に生じることを明らかにした。この膜電位変動が核膜と細胞膜の容量を介した電気的結合を可能にすると考えられる。

## 研究成果の概要 (英文)：

Synchronous Ca oscillation is caused by releases of Ca from intracellular Ca stores in retinal neuroepithelium. High-speed fluorescence measurement of store membrane potential revealed that periodic repeats of a burst of high-frequency voltage fluctuations occur in the store membrane potential. Electrical coupling across the cells may be mediated by the series capacitance of the store membrane and the plasma membrane.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞生理学

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca ストアを形成する小胞体と核膜には Ca 放出チャネル以外に Ca 依存性 K チャネルが存在する。これらのチャネルを通るイオン電流により Ca ストアの膜電位が変化すると予想される。そこで、オルガネラをラベルする電位感受性蛍光色素[DiOC<sub>5</sub>(3)]を用いて核膜の電位変化を測定したところ、Ca ストアの膜電位が自発的にオシレートする

ことを発見した (Yamashita, M. *et al.*, *FEBS J.*, 273: 3585-3597, 2006)。この結果に基づき、細胞内 Ca ストアからの Ca 放出制御の新規モデルとして 'luminal potential model' を提唱した (Yamashita, M., *FEBS Lett.*, 580: 4979-4983, 2006)。しかし、Ca ストアの膜電位変動の周波数特性は、ビデオカメラでの測定では時間分解能が不足し不明であった。そこで、新たな測定方法として

光電子倍增管を用い、高時間分解能で蛍光測定することを試みた。また、細胞が興奮性である場合、活動電位の発生に伴い電位依存性 Ca チャネルを通して細胞外から Ca 流入が起こると予想される。そこで、細胞内電位記録法により、興奮性の有無を検討する必要性が生じた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内 Ca ストアの膜電位変動の周波数特性を解析し、どのような周波数分布で Ca ストアの膜電位が変動するかを明らかにすることを目的とした。それにより、細胞内 Ca ストアの膜に存在するイオンチャネルの活動が急峻な膜電位変化を起こし、これが Ca イオンをストアから駆出するとともに、核膜と細胞膜との密着部を介して容量性電流による電氣的結合が起こるといふ、これまでにない仮説を検証することを主眼とした。また、活動電位の発生により電位依存性 Ca チャネルが活性化され、細胞外からの Ca 流入による細胞内 Ca 濃度の上昇が起こることも考えられたので、この点を電気生理学的に明らかにすることを目的とした。具体的には、細胞の膜特性を測定し、脱分極刺激に対して活動電位が発生するか、また、一定電流を通電することにより入力抵抗を測定し、さらにギャップ結合による細胞間連絡が存在するかを検討した。

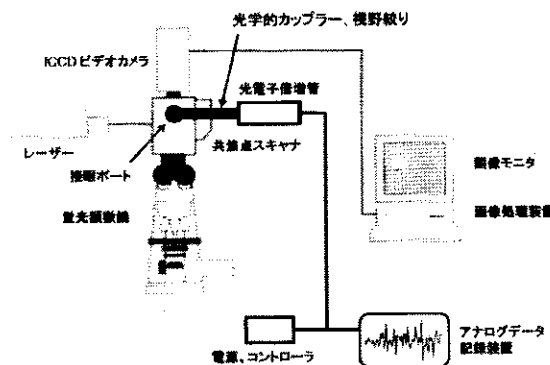
以上を総合的に検討して、Ca オシレーションが多細胞間で同期化する機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では実験標本として孵卵 3-11 日の鶏胚網膜を使用し、以下の実験を行った。

### (1) Ca ストアの膜電位変動の周波数解析

細胞内 Ca ストアは小胞体と核膜から構成され、これらをラベルする電位感受性蛍光色素である DiOC<sub>5</sub>(3)を用いて、鶏胚網膜神経上皮を染色した。ニポウディスク型共焦点スキャナの接眼ポートから蛍光を分岐し光電子倍增管 (浜松ホトニクス、H5784) に直接入力させた (下図参照)。



増幅されたアナログ信号はサンプリング周波数 4 KHz にて A-D 変換しパソコンに連続記録した。周波数パワースペクトラム分析のために高速フーリエ解析をオフラインにて行った。

### (2) 細胞内電位記録

ガラス管微小電極を用いて、網膜神経上皮細胞の膜特性を測定した。

### (3) 蛍光色素の細胞内注入

ガラス管微小電極を細胞内に刺入し、蛍光色素 (Alexa Fluor 488) を電気泳動的に注入した。この細胞内染色により、細胞の形態、及び、突起の有無を明らかにした。また、ギャップ結合の存在を確認した。

### (4) Ca 蛍光測定

Ca 感受性蛍光色素 (Oregon Green 488 BAPTA-1 AM) を細胞にロードし、細胞内 Ca 濃度変化を測定した。また、ガラス管微小電極を用いて Oregon Green 488 BAPTA-1 のカリウム塩を細胞内注入し、単一細胞の Ca 濃度変化を記録した。

### (5) 薬物投与

Carbenoxolone をギャップ結合の阻害剤として使用した。Mibefradil を T 型 Ca チャネルの阻害剤として使用した。Paxilline を BK 型チャネルの阻害剤として使用した。また、テトロドトキシンを電位依存性 Na チャネルの阻害剤として使用した。

### (6) 免疫染色

蛍光ラベルした T 型 Ca チャネルの抗体 (抗 Ca<sub>v</sub>3.1 抗体) を用いて、このチャネルの存在を形態学的に検討した。

## 4. 研究成果

細胞増殖期の神経上皮細胞と、ニューロンに分化した直後の網膜神経節細胞から細胞内電位記録を行った。また、Ca 感受性蛍光色素を用いた光学的測定を行い、以下の点を明らかにした：

(1) Alexa Fluor 488 の細胞内注入による色素の拡散、及び、carbenoxolone の投与実験から、網膜神経上皮細胞間にギャップ結合が存在すること、

(2) このギャップ結合により、神経上皮細胞の入力抵抗が極めて低く保たれていること、即ち、細胞膜電位が安定化されていること、

(3) 神経上皮細胞に脱分極刺激を与えても活動電位を発生しないこと、

(4) 分化直後の網膜神経節細胞では、脱分極刺激を与えても活動電位を発生せず、mibefradilの投与実験、及び、免疫染色の結果から、T型Caチャンネルを介したCa流入が生じること、

(5) Paxillineの投与実験からCa依存性Kチャンネル(BK型チャンネル)が細胞膜に存在すること、及び、このBKチャンネルは、T型Caチャンネルを介したCa流入により活性化され再分極を起こすこと、

(6) 神経上皮細胞と分化直後の網膜神経節細胞において、自発的なCaオシレーションが細胞間で同期して起こり、このCaオシレーションは細胞外からのCa流入によるものではなく、細胞内CaストアからのCa放出によって生じること。

本研究ではさらに、細胞内Caストアを構成する小胞体と核膜を電位感受性蛍光色素でラベルし、その蛍光を高速型共焦点スキャナで捉えた後、光電子倍增管を用いて蛍光強度変化を高時間分解能で計測し、以下の点を明らかにした：

(7) これまで高感度ビデオカメラで記録していた周期的な膜電位変化は、実は、高周波数(> 200 Hz)のバースト状膜電位変動が周期的に生じるものであったこと、

(8) このバースト状膜電位変動は、細胞内Ca濃度の上昇と一致して生じること、即ち、細胞内CaストアからのCa放出に伴って生じること、

(9) イノシトール三リン酸を産生する刺激、即ち、ムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるカルバコールの投与により、このバースト状膜電位変動が刺激前に比べてより高頻度に生じること。

本研究の独創的な点は、ニポウディスク型高速共焦点スキャナに光電子倍增管を直接接続するという、これまででない測定方法を開発することにより、高い時間分解能で蛍光強度変化を記録することに成功し、上記(7)の発見に至った点である。国内外においてこのような報告は初めてである。また、神経上皮細胞のみならず、新生ニューロンにおいても活動電位に依存しないCaオシレーション、即ち、細胞内Caストアからの周期的なCa放出が、細胞間で同期して起こることを明らかにしたことは、本研究の新規な点である。

上記(7)の発見をもとに、現在、高周波数の膜電位変動に伴う容量性電流の計測を試みている。また、新たな発想として、この容量

性電流は細胞間で同期したCaオシレーションを起こすだけでなく、発生・再生過程の中枢神経においてシナプス入力未形成の時期に同期したスパイク発射を起こすメカニズムにもなると思われ、現在、このアイデアを検証中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Synchronization of  $Ca^{2+}$  oscillations: Is gap junctional coupling sufficient? Yamashita, M. *FEBS J.* 277:277-277 (2010) (査読有)
- ② Synchronization of  $Ca^{2+}$  oscillations: a capacitative (AC) electrical coupling model in neuroepithelium. Yamashita, M. *FEBS J.* 277: 293-299 (2010) (査読有)
- ③ Synchronous  $Ca^{2+}$  oscillation emerges from voltage fluctuations of  $Ca^{2+}$  stores. Yamashita, M. *FEBS J.* 275: 4022-4032 (2008) (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 山下勝幸 網膜神経上皮細胞間におけるカルシウムオシレーションの同期化メカニズム 第32回日本神経科学大会 2009年9月17日 名古屋
- ② Masayuki Yamashita Voltage fluctuations of calcium store in retinal neuroepithelium. 36<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences 2009年7月28日 京都
- ③ 山下勝幸 細胞内カルシウムストアの膜電位とカルシウムオシレーション 解剖学・生理学連携シンポジウム “種々の細胞内現象と細胞内小器官に対する形態および機能面からのアプローチ” 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月30日 岡山
- ④ 山下勝幸 発生初期網膜の電気生理学的解析 シンポジウム “網膜を材料にした多角的アプローチにより組織細胞の姿を知る” 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009年3月29日 岡山
- ⑤ Masayuki Yamashita Synchronous calcium oscillation emerges from voltage fluctuations of calcium stores. The 9<sup>th</sup> International Congress on Cell Biology 2008年10月9日 Seoul

⑥ 山下勝幸 カルシウムストアの膜電位変動  
によるカルシウムオシレーションの同期化  
第31回日本神経科学大会 2008年7月9日 東京

⑦ 山下勝幸 カルシウムストアの膜電位変動  
によるカルシウムオシレーションの同期化  
第85回日本生理学会大会 2008年3月26日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 勝幸 (YAMASHITA MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20183121

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし