

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590211

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電氣的結合

研究課題名（英文）Intercellular electrical connections 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）：細胞内カルシウムストアは小胞体と核膜から構成される。本研究では網膜神経上皮細胞を対象とし、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出により核膜の膜電位が変化すること、及び、核膜の膜電位変動に伴う容量性電流により細胞間で同期した活動電位が生じることを明らかにした。さらに、網膜神経上皮組織内に細胞外電位勾配が存在することを発見した。この電位勾配は網膜神経節細胞の軸索伸長の方向決定に必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular calcium stores are formed from the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope. In the present study, it was revealed in retinal neuroepithelial cells that the membrane potential of the nuclear envelope is altered by the release of calcium from intracellular calcium stores and that synchronous spike discharges are caused by capacitative currents associated with the voltage changes of the nuclear envelope. Moreover, it was found that an extracellular voltage gradient exists in the retinal neuroepithelium. The presence of an endogenous electrical potential gradient was necessary for the correct guidance of retinal ganglion cell axons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生体膜、チャネル、トランスポーター、能動輸送、オルガネラ、
発生・再生生理学

1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウムストアは小胞体と核膜から構成される。これらオルガネラの膜にはカルシウム放出チャネル、カルシウム依存性（BK 型）カリウムチャネル、及び、カルシウムポンプが存在する。申請者は、オルガネ

ラをラベルする電位感受性蛍光色素を用いて、カルシウム放出によるカルシウムオシレーションに伴いカルシウムストアの膜電位が高周波数のバースト状変動を示すことを明らかにした (Yamashita, FEBS J. 275: 4022-4032, 2008)。本研究では発生初期の神

経上皮組織を実験対象とした。神経上皮組織は双極性細胞から構成され、基底側において核膜が細胞膜と密着している。カルシウム流出とカリウム流入によりカルシウムストアの膜電位が高周波数で変動すると、この電位変動に伴う容量性電流が、核膜と細胞膜の容量を介して細胞間で流れると想定される。核膜のカリウムチャンネルを流れるカリウム電流は、露出した核膜からのパッチクランプ記録により測定できた (Yamashita et al., FEBS J. 273: 3585-3597, 2006)。しかしながら、細胞膜が無傷な細胞において、カルシウムストアの膜電位変動に伴う容量性電流は未だ記録されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を明らかにすることを目的とした：

- (1) カルシウムストアのバースト状膜電位変動の周波数特性を明らかにする。
- (2) カルシウムストアの膜電位変動に伴う容量性電流を細胞外から記録する。
- (3) 容量性電流による細胞膜電位変化とスパイク発射との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究方法の概要

発生初期鶏胚の網膜神経上皮を、オルガネラをラベルする電位感受性蛍光色素 [DiOC₅(3)] で染色した。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接続し、膜電位変動の周波数スペクトラムを解析した。また、網膜表面から金属電極にてスパイク発射を記録した。さらに、網膜神経上皮内の細胞外電位を、ガラス管微小電極を用いて記録した。

(2) 実験装置と記録

発生初期鶏胚から網膜神経上皮を摘出し、核膜をラベルする電位感受性蛍光色素 [DiOC₅(3)] を用いて核膜の膜電位変化を記録すると同時に、カルシウム感受性蛍光色素 (Fura-2 と Fura Red) を用いて細胞内カルシウム濃度変化を記録した。ニポウディスク型高速共焦点スキャナの接眼部に光電子倍增

管を接続し、膜電位変動のアナログデータを保存した。この測定装置で得られたアナログデータを、オフラインで高速フーリエ変換をおこない周波数スペクトラムを解析した。また、細胞内カルシウムストアの膜電位変化とスパイク発射との同時記録をおこなった。この記録では、電位感受性蛍光色素 [DiOC₅(3)]、共焦点スキャナ、及び、光電子倍增管を用いて、小胞体・核膜の膜電位変化をアナログ記録し、同時に、網膜表面から金属電極を用いて細胞外からスパイク電位を記録した。両者のアナログ信号を PowerLab に保存し、小胞体・核膜の膜電位変化とスパイク電位との相互相関解析をおこなった。

網膜神経上皮内の細胞外電位記録には、NaCl (2 M) 溶液を充填したガラス管微小電極 (電極抵抗: 108-200 MΩ) を内境界膜の直下に刺入した。定電流パルス (40 pA, 5 ms in duration, 0.5 s-interval) の通電により抵抗値の変化を測定した。増幅器は細胞内電位記録用増幅器を用いた。

(3) 網膜器官培養

孵卵 3-4 日目の鶏胚から摘出した網膜を、20%牛胎児血清を加えた DMEM 溶液にて、24 時間、5% CO₂ 下で培養した。軸索の染色は、calcein-AM (10 μM, 30 分) で生細胞を蛍光染色することによりおこなった。

4. 研究成果

(1) 平成 22 年度研究成果

カルバミルコリンの投与により細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を起こすと、細胞内カルシウム濃度の上昇に先行して DiOC₅(3) の蛍光強度が増大した。また、自発的に生じる DiOC₅(3) のバースト状変動の周波数特性を解析した結果、200-300 Hz の成分が主であった。核膜と細胞膜が密着し細胞体どうしが隣接する場合、核膜の膜電位変動に伴う容量性電流が細胞膜を通過することにより細胞膜電位が変動し、細胞膜に存在する電位依存性ナトリウムチャンネルが活性化され細胞間で同期した活動電位が発生すると予想される。そこで、DiOC₅(3) で染色した網膜から核膜の自発的な膜電位変化を記録すると同時に、網膜の表面から金属電極にて活動電位を記録した。その結果、DiOC₅(3) の蛍光強度の増大開始時点に一致

してバーストスパイク発射が網膜神経節細胞間で同期して生じることが明らかになった。核膜の自発的な膜電位変化は、テトロドトキシンでスパイク発射を停止させ、さらに、興奮性神経伝達物質受容体の阻害剤を添加しても起こったことから、細胞間で同期したバーストスパイク発射は核膜の膜電位変動により誘起されると考えられる。これらの成果は、Yamashita, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406: 107-111 (2011)として発表した。

(2) 平成 23 年度研究成果

上記論文の補足データ（オンラインのみ）として、核膜の膜電位変化に同期した、網膜の内境界膜の外側における電位変化を発表した。平成 23 年度では、ガラス管微小電極を用いて、網膜の内境界膜の内側において細胞外電位を記録した結果、内境界膜の内外において電位差が存在することを発見した。この電位は、網膜外の電位を基準として、内境界膜の内側が正の直流電位であった。その大きさは最大約 8 mV であった。さらに、この細胞外直流電位の大きさは、網膜の領域により異なっていた。最大値は網膜背側部で記録され、腹側部ではほぼゼロであり、網膜内において細胞外電位勾配が形成されることを発見した。

(3) 平成 24 年度研究成果

最終年度では、網膜神経上皮組織に存在する細胞外直流電位について詳細な解析をおこなった。網膜の各領域から、網膜神経上皮の内境界膜の内側（上皮組織の基底側）において細胞外電位を記録した。その結果、正の直流電位の大きさは網膜の領域によって異なり、網膜周辺部から眼杯腹側部へ向かう細胞外電位勾配が形成されることを明らかにした。この電位勾配の大きさは、網膜中央部において約 15 mV/mm であった。また、この電位勾配の方向は、網膜中央部で最初に分化する網膜神経節細胞の軸索走行の方向と一致する。このことから電気的な軸索誘導の可能性が考えられ、以下にこの可能性を検討した。細胞外直流電位は上皮型ナトリウムチャネルの阻害剤であるアミロライドにより抑制された。そこで、鶏胚眼胞と網膜器官培養系にアミロライドを添加すると、網膜神経節細胞の軸索走行が擾乱を受けた。これらの結果から、神経

上皮組織の基底側に存在する細胞外電位勾配は、軸索伸長開始時点における伸長方向のガイダンスキューであることが示唆された。以上の研究成果は、Yamashita, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431: 280-283 (2013)として発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Masayuki Yamashita, From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 534: 64-70, (2013) doi: 10.1016/j.abb.2012.07.016 査読有
- ② Masayuki Yamashita, Electric axon guidance in embryonic retina: Galvanotropism revisited. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431: 280-283 (2013) doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.115 査読有
- ③ Masayuki Yamashita, Neuroepithelium potential: Polarized currents produce extracellular voltage gradient. *International Journal of Developmental Neuroscience* 30: 664-665 (2012) doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.03.312 査読有
- ④ Masayuki Yamashita, Ion channel activities in neural stem cells of the neuroepithelium. *Stem Cells International* 2012: 6 pages (2012) doi:10.1155/2012/247670 査読有
- ⑤ Masayuki Yamashita, Nuclear envelope potential: An origin of the first correlated neural activity. *Neuroscience Research* 71: e313-e313 (2011) http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2011.07.1366 査読有
- ⑥ Masayuki Yamashita, Fluctuations in nuclear envelope's potential mediate synchronization of early neural activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406: 107-111 (2011) doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.004 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 山下勝幸 細胞外電位勾配による網膜神経節細胞の軸索ガイダンス 第90回日本生化学会大会 2013年3月27日～3月29日、タワーホール船堀、東京都

- ② 山下勝幸 細胞外電位勾配による軸索ガイダンス 第35回日本神経科学大会
2012年9月18日～9月21日、名古屋国際会議場、名古屋市
- ③ Masayuki Yamashita, Neuroepithelium potential: Electric axon guidance by extracellular voltage gradient. 8th FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum of Neuroscience, July 14~July 18, 2012, International Convention Center, Barcelona, Spain
- ④ 山下勝幸 神経上皮電位：発生初期網膜に存在する細胞外電位勾配 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日～3月31日、長野県松本文化会館、松本市
- ⑤ Masayuki Yamashita, Neuroepithelium potential: Polarized currents produce extracellular voltage gradient. 19th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, January 11~January 14, 2012, Tata Institute of Fundamental Research (TIFR), Mumbai, India
- ⑥ 山下勝幸 核膜電位：同期的神経活動の起源 第34回日本神経科学大会 2011年9月14日～9月17日、パシフィコ横浜、横浜市
- ⑦ Masayuki Yamashita, Nuclear envelope potential: an origin of the first correlated neural activity. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, July 14~July 18, 2011, Fortezza da Basso, Florence, Italy
- ⑧ 山下勝幸 核膜電位：カルシウム放出に伴う電位変動による容量性電気的結合 第88回日本生理学会大会 2011年3月28日～3月30日、パシフィコ横浜、横浜市（震災にて誌上開催）
- ⑨ 山下勝幸 細胞内カルシウムストアの膜電位ゆらぎによる細胞間連絡【招待講演】 第87回日本生理学会大会、2010年5月19日～5月21日、盛岡市民文化ホール、盛岡市

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