

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 31日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659037

研究課題名（和文） 二光子顕微鏡によるLIVEイメージング：生きたイカで細胞膜修復装置を明らかにする

研究課題名（英文） Live Imaging for Two-photon microscopy: Membrane repair in Squid Giant Axon.

研究代表者

三宅 克也 (KATSUYA MIYAKE)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30219745

研究成果の概要（和文）：20世紀初頭、ウニ卵を用いて、海水中のカルシウム（細胞外）が素早い細胞膜の修復に必要であるという現象が報告された。しかしながら、近年培養細胞などを用いてこの現象が再発見されるまで、この細胞膜修復現象は長い間忘れ去られていた。また、この細胞膜損傷修復は我々の体の中において生理的条件下で常におこっている現象であることも証明され、シナプスに見られる神経伝達物質放出機構と似た小胞輸送によって修復されることが考えられている。この膜修復は、上皮細胞、線維芽細胞、および筋細胞などについて多く報告されているが、神経細胞の膜修復については詳しい機構はわかっていない。本研究は、生きたイカ（*Loligo pealei*, *Todarodes pacificus*）を用い、多光子レーザー顕微鏡によって神経線維の膜修復をリアルタイムで観察した。膜修復マーカーとして、FM試薬、カルセイン-AM, Rhodamin-dextranおよびカルシウムインジケータ色素を用いた。その結果、一般の細胞は細胞外カルシウムが膜損傷部から細胞内に侵入することにより、細胞膜修復装置のスイッチが入り、小胞融合による膜修復が行われるのに比べ、イカ巨大神経内では、細胞外カルシウムをスイッチとしない非常にゆっくりとした小胞融合が観察された。一方、細いイカ神経線維内では、小胞が素早く膜損傷部に融合する様子をLIVEイメージングで捉えることができた。

研究成果の概要（英文）：Plasma membrane disruption is a common form of cell injury in mammalian tissues under physiological conditions. Cell survival depends on the initiation of a rapid (second time-scale) resealing response that is mounted only in the presence of physiological levels of extracellular Ca^{2+} . Vesicle-vesicle and vesicle-plasma membrane fusion events occurring in cortical cytoplasm surrounding the defect are thought to be a crucial element of the resealing mechanism. Axolemmal repair has been also studied extensively in invertebrate giant axons because their large size facilitates the use of many techniques. However, it is not clear how to repair axolemmal injury which usually takes minutes to hours time scale. Therefore, we observed how to reseal axolemmal

disruption with several fluorescent probes, FM dye, Calcein-AM, Rhodamin or FITC-Dextran (RhDx, FDx, 10kD) and fluo4-AM using multi-photon microscope. First, we examined individual narrow axons from the squid fin nerve bundle. FM1-43 was loaded by the cut ends of fin nerves to show internal vesicles, and then wounded the axolemma by two photon laser. The FM1-43-positive vesicles were recruited the way of the membrane-membrane contacts leading to the homotypic and very rapid (second time scale) exocytic fusion events required for membrane repair in the narrow fin nerve. Whereas, FM 1-43 or Ca^{2+} by fluo4-AM did not get into the axoplasm of the giant axon through the axolemmal disruption. Furthermore, when natural sea water containing FDx (10kD) was injected, the fluorescence spread throughout the axoplasm. These results suggest that high Ca^{2+} did not cause rapid fusion of intracellular membranes, creating a boundary that prevents spreading of FDx throughout the cytoplasm. We propose that the slow speed of calcium diffusion through axoplasm density leads to the slow axolemmal repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	2,500,000	360,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞機能形態学（細胞膜修復）

1. 研究開始当初の背景

20世紀初頭、ウニ卵を用いて、海水中のカルシウム（細胞外）が素早い細胞膜の修復に必要であるという現象が報告された。しかしながら、近年培養細胞などを用いてこの現象が再発見されるまで、この細胞膜修復現象は長い間忘れ去られていた。また、この細胞膜損傷修復は我々の体の中において生理的条件下で常におこっている現象であることも証明され、シナプスに見られる神経伝達物質放出機構と似た小胞輸送によって修復されることが考えられている。この膜修復は、上皮細胞、線維芽細胞、および筋細胞などについて多く

報告されているが、神経細胞の膜修復については詳しい機構はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、生きたイカの神経細胞および骨格筋細胞を用い、細胞膜ならびに細胞内小器官を蛍光標識し、二光子レーザー顕微鏡によって細胞膜修復装置のリアルタイムの動きを目で見ることを目的としている。

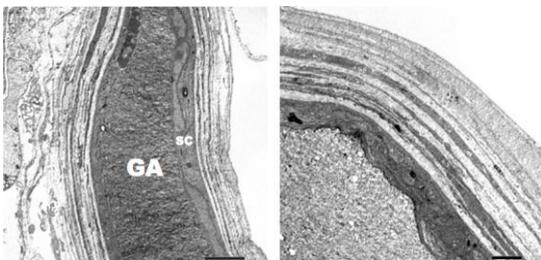
3. 研究の方法

本研究は、生きたイカ（*Loligo pealei*, *Todarodes pacificus*）を用い、二光子レーザ

一顕微鏡によって神経線維の膜修復をリアルタイムで観察した。膜修復マーカーとして、FM試薬、カルセイン-AM、蛍光dextranおよびカルシウムインジケータ色素を用いた。分離から観察まで1時間を目安とし、なるべく流海水や氷を用いて神経軸索の鮮度を保った。神経軸索分離後、すぐに1%グルタル・海水（8%グルタル・海水=1:7）に浸漬固定、透過型電子顕微鏡でも観察した。マイクロインジェクションによる膜形成についても検討した。

4. 研究成果

透過型電子顕微鏡により、数層のシュワン細胞（SC）と結合組織に保護された無傷の巨大神経軸索（GA）を迅速に採取されていることを確認した。実験に供した無傷のイカ巨大神経内は電子密度が高く無構造で、小胞、ライゾゾームなど膜成分を持つ細胞内小器官を確認することは困難であった。



巨大神経軸索の膜修復速度は細い軸索に比べ非常に遅い（図1）

細い神経軸索は小胞同士が融合したパッチ融合小胞によって素早く（sec[~]）修復したが、巨大神経軸索の修復は遅く（min[~]）、大きな損傷時には完全には修復しなかった。また膜が閉じなくてもFM1-43は膜損傷部から軸索内に侵入することが出来なかった。

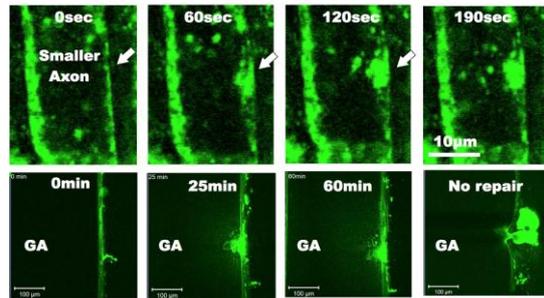


図1

巨大神経軸索原形質にはFMは流入できない（図2）

生きたイカより取り出した新鮮な神経軸索をCalcein-AMに10分浸漬後、FM4-64を混ぜた自然海水内で、顕微鏡下でハサミによって軸索を損傷した。その結果、Calcein-AMは損傷部からゆっくりと漏れ続けたが、神経軸索原形質内にFM蛍光は確認できなかった。よって、損傷膜が修復されなくてもFM蛍光膜色素は非常に密度の高い軸索原形質内には、流入拡散できないと考えられた。

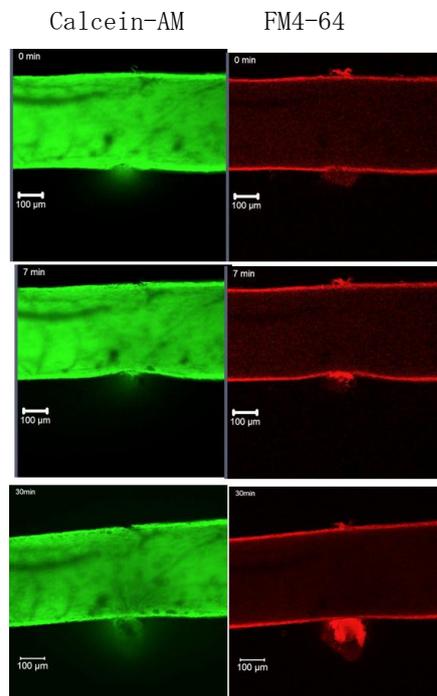


図2

巨大神経軸索原形質にはCa²⁺も流入できない（図3）

Rhodamin-Dextran (RhDx, 10KD) を軸索内にインジェクションし, Fluor4-AMに軸索を10分浸漬した後, 自然海水内で二光子レーザーによって損傷した. RhDxは損傷部からゆっくりと漏れ続けたが, 軸索内にカルシウムの流入を示すfluor4-AMの発光は確認できなかった. よって, 損傷膜が修復されなくても, Ca^{2+} は密度の高い軸索内には流入しないと考えられた.

Fluor4-AM RhDx 10K

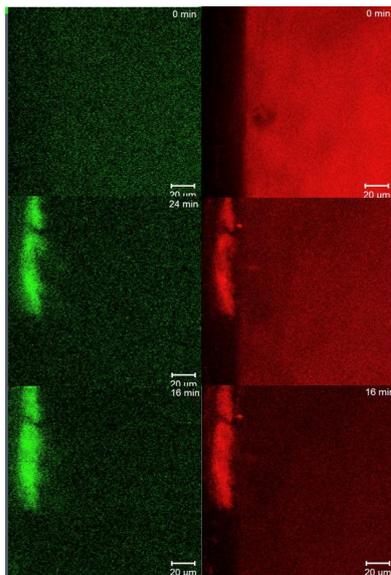


図 3

巨大神経軸索内ではカルシウムを注入しても膜は瞬時に集まることができない (図 4)

イカ神経軸索原形質に、カルシウムを含む自然海水に溶かしたFITC-Dextran (FDx, 10KD) をマイクロインジェクションしたが、膜に包まれず、ゆっくりと軸索内に拡散していった.

下の写真は、ヒトデ卵にFDxをインジェクションした同様の実験. カルシウム存在下では膜に包まれFDxの拡散がおこらないが、カルシウムが存在しなければ、卵内に拡散する (Terasaki, Miyake, McNeil, JCB, 1997)

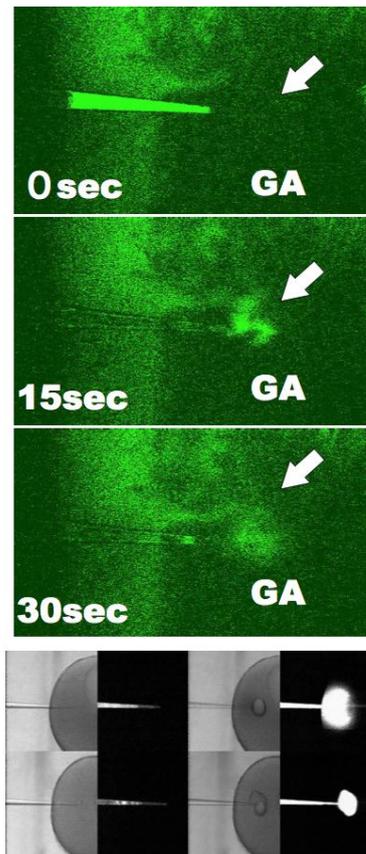


図 4

5. まとめ

一般の細胞の細胞膜修復は秒単位で行われるが、イカの巨大神経軸索の原形質の構造は特殊であり、細胞膜が破れてもカルシウムが侵入できない. よってイカ巨大神経軸索では、カルシウムを引き金とした膜修復は行われず、分単位から時間単位のゆっくりとした修復が行われる.

6. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

三宅克也, 荒木伸一 「高感度多光子顕微鏡による細胞膜修復のLIVE イメージング」, 顕微鏡 vol. 46 (Suppl. 2. p. 109-112).

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi Y. The C2A domain in dysferlin is important for association with

MG53(TRIM72). PLoS Curr.
4:e5035add8caff4., 2012.

Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H., Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. PLoS One. 8(4):e61540, 2013.

[学会発表] (計16件)

1. Miyake K., Egami Y., McNeil P. L., Araki N., MICAL an F-actin-disassembly factor links membrane repair. J. Physiol. Sci., Vol. 61, Suppl. 1, p. S271, 2011.

2. 三宅克也, 松田知栄, 江上洋平, 濱田 萌, 林 由起子, 荒木伸一. 高感度多光子顕微鏡による細胞膜修復の LIVE イメージング, 2011. 日本解剖学会, 第 66 回中国・四国支部学術集会、徳島、2011.

3. 三宅克也, 松田知栄, 江上洋平, 濱田 萌, 林 由起子, 荒木伸一. GaAsP搭載型多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング: アネキシン小胞による細胞膜修復. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 3.26-28. 2012.

4. 三宅克也, H. M. Fishman, H. C. Pant, J. Zimmerberg, 荒木伸一. GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング: イカ神経線維の細胞膜修復, 第 67 回中国・四国支部学術集会、宇部、2012.

5. 松尾巴瑠奈, 塚本真由, 濱田 萌, 三宅克也, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング: アネキシン A4 および A7 小胞による細胞膜修復. 日本解剖学会, 第 67 回中国・四国支部学術集会. 宇部, 2012

6. 濱田 萌, 三宅克也, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. GaAsP搭載型多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング: 細胞膜修復時におけるアネキシン結合タンパクS100A11の動態, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

7. 松尾巴瑠奈, 三宅克也, 塚本真由, 濱田萌, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング: 細胞膜修復時におけるアネキシンA4の動態, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

8. 塚本真由, 三宅克也, 松尾巴瑠奈, 濱田萌, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング: 細胞膜修復時におけるアネキシンA7の動態、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

9. 三宅克也, H. M. Fishman, H. C. Pant, J. Zimmerberg, 荒木伸一. GaAsP搭載型多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング: イカ神経線維の細胞膜修復. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

10. Miyake K., Egami Y., Matsuda C., Hamada M., Hayashi Y., McNeil P. L., Araki N. MICAL1 an F-actin-disassembly factor links membrane repair. 第118回日本解剖学

会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

1 1. Miyake K., Tanaka T., McNeil P.L., Araki N., Requirement for cholesterol in membrane repair indicates a possible mechanism by which statins cause muscle injury. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3.28-30, 2013.

1 2. Matsuda C., K Miyake, K Kameyama, H Takeshima, E Keduka, N Araki, I Nishino, YK Hayashi. Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International WMS Congress, Algarve, Portugal, Oct.19, 2011.

1 3. Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Araki N, Nishino I and Hayashi Y., Dysferlin and affixin in sarcolemmal repair. New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference. New Orleans, LA, USA. June 18, 2012.

1 4. Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Araki N, Nishino I and Hayashi Y., Dysferlin and affixin is involved in sarcolemmal repair. 17th International congress of the World Muscle Society. Perth, Australia. Oct.10, 2012

1 5. Miyake K., Egami Y., Matsuda C., Hamada M., McNeil P.L., Araki N., MICAL1 an F-actin-disassembly factor links membrane repair. America Society for Cell Biology, Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, Dec.15-19, 2012.

1 6. M. Ghochani, G. Humphrey, J. Farrington, K. Miyake, K. Micheva, B. Busse, P. Blank, S. Smith, J. Zimmerberg. Multiple Antibody Co-localization Imaging of Skeletal Muscle. Biophysical Society 57th Annual Meeting, Phyladelphia, PA, USA, Feb.2-6, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 克也 (MIYAKE KATSUYA)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号 : 30219745

(2)研究分担者

田中 享 (TANAKA TORU)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 60217049

(3)連携研究者

荒木 伸一 (ARAKI SHINICHI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号 : 10202748

江上 洋平 (EGAMI YOUHEI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号 : 80432780

松田知栄 (MATSUDA CHIE)
独立行政法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル部門・主任研究員
研究者番号 : 50344099

深井直実 (FUKAI NAOMI)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号 : 60134681

金川 基 (KANAGAWA MOTOI)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 00448044