

9) 筋細胞膜興奮性の分化とCaイオン

高橋 國太郎*

研究目的

原索動物ホヤの幼生の横紋筋細胞は卵発生後、15°Cにおいて30時間程度の短時間で分化しかつ一個体の幼生に含まれる筋線維は6本と極めて少い。この筋細胞への神経筋接合は他の脊椎動物の骨格筋におけるのと同様に、コリン作動性である。したがって *in vivo* で筋細胞の初期分化のモデルとして適当である。

ホヤ幼生の発生は受精時点をそろえると、極めてよく同期するので形態的な発生段階を一定温度における発生時間によって表現できる。このホヤ筋細胞膜の分化はまず神経胚の時期にアセチルコリンエステラーゼが出現するのが最初である。次の機能分化は幼生がオタマジャクシ幼生の形をとり始める尾芽期において予定筋細胞膜にアセチルコリン受容体が発現することである。このとき同時にCa電流の増大がおこって、活動電位が出現する。

これに多少先行して、予定筋細胞と他の胚細胞との間の電気緊張性細胞間連絡の減少がおこる。また、筋細胞にCa電流が増大するときには、他の興奮性組織である予定神経細胞にはNa電流の増加がある。

これらの筋細胞分化の初期変化及びそれに関連しておこる現象は互いに何の関係もないようにも見えるが、一つの因子として細胞内のCaイオンの変動を考えると説明できる部分もある。細胞内Caイオンの増加が電気緊張性結合の消失を惹き起すことはよく知られている。またホヤ発生卵においては、細胞内で

Caの貯蔵庫として考えられているミトコンドリアが予定筋細胞に異常に多く集積してくる事実も知られている。そこでは我々はホヤ卵をもちいた卵細胞内灌流法を開発し、細胞内のCaイオンのレベルを直接的に変化させ、卵細胞のCa電流およびNa電流に対する効果を解析した。

研究方法

細胞内のCaイオン量を変化するには、Caイオノフォアを細胞膜に吸着させて外液からCaの流入を増加させるか、ミトコンドリアの呼吸を阻害してCaイオンを細胞内で放出させる等の方法がある。しかし、いずれの場合もCaイオンの量を定量的に変化させるのは困難である。本研究においては卵細胞膜の一部に穴をあけ、そこから高濃度のCa緩衝液を直接流入する方式をとった。図1に示すのがその装置の略図である。装置は上の隔壁と下の隔壁にわかれ、下の隔壁には細胞内に流入させるCa緩衝液すなわち内液が灌流されている。上の隔壁には外液としての人工海水が入れている。この二つの隔壁は通常は細胞内記録にもちいるガラス電極の一部を加工して作った微小漏斗で連結されている。この漏斗の中に図の様に、あらかじめ、プロネースで表面をきれいにした卵を密着させる。上の隔壁の位置を調節すると、下の隔壁の静水圧は数mm陰圧となっている。すると卵は壁に密着するだけでなく、内液に接する漏斗の下部に面した部分の細胞膜が自然に破れて、細胞内は下の隔壁の内液につながる。ここで

*東京大学医学部脳研究所生理

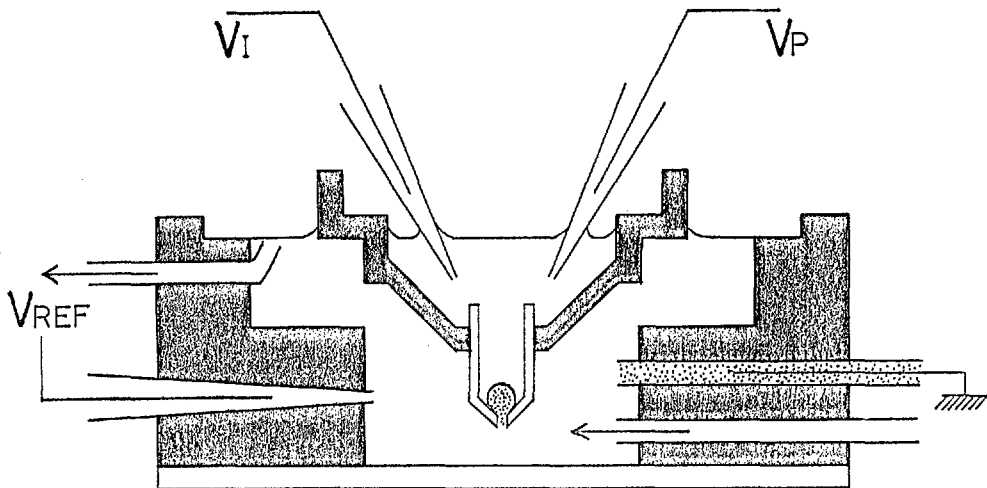


図1 卵細胞内灌流装置の概要

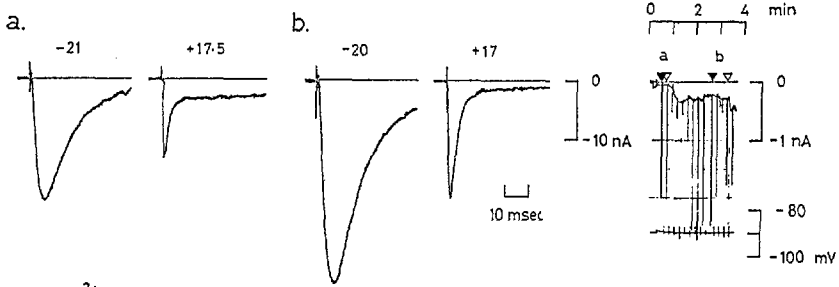
外液側を細胞外，内液側を細胞内と考えて，細胞膜に -90 mV がかかるように膜電位固定をおこなう．さらに階段状の膜電圧変化を与えて膜を脱分極すると無傷の卵細胞膜における同様の Na および Ca 電流を観察できる．破れた細胞膜の大きさは漏斗の下部の口に等しく，これは卵の直径の $1/4 \sim 1/3$ の大きさにまですることができるので，内液の交換はすみやかに起こるものと予想される．実際にも，細胞内液の交換を確めるために，内液には Ca イオンのキレート剤である EGTA などの他に陽イオンとして外液に含まれると同量の Na イオンをいれておく．すると無傷の卵細胞では $+60\text{ mV}$ 附近にあった Na 電流の反転電位が灌流開始後20分ほどで $+5\text{ mV}$ 以下の低い値になり，細胞内に Na イオンが十分に流入したことがわかる．もちろんこの Na 電流は反転電位が低いことの他は無傷の卵細胞膜で見られるものと変りはない．このように装置が効率よく細胞内液の交換をおこなっていることがわかったので，これをもちいて細胞内液の Ca イオンを変化させる実験をおこなった．

研究成果

図2は $3.3 \times 10^{-5}\text{ M}$ の Ca イオンを含む Ca

緩衝液とキレート剤のみで Ca イオン濃度がほぼ零と考えられる緩衝液をそれぞれ卵細胞内に灌流した場合を示したものである．aは卵細胞膜が破れた直後の記録で，細胞内成分がまだ通常のものと同様と変っていない時期であり，bは3~4分経過して Na 電流の反転電位の変化から少なくとも $1/3$ 以上の内液が Ca 緩衝液で置換されたと思われるときに記録したものである． Ca 緩衝液は約 100 mM の EGTA あるいは DPTA-OH で作製してあるので， $1/3$ 以上の置換がおこなわれた場合，細胞内の Ca イオン濃度は緩衝液のそれと同程度と等しいと考えてよい．したがってbの時期においては内液の成分はAの卵では $3.3 \times 10^{-5}\text{ M}$ ，Bの卵ではほぼ零と思われる．記録は膜電位が約 -20 mV で最大の Na 電流と約 $+20\text{ mV}$ 附近で最大の Ca 電流（速いところにあるピークは Na 電流によるもの）を示してある．内液が正常のものと同様でないaではAの卵でもBの卵でも Na 電流および Ca 電流に差がないが，bの時点では Ca イオンがないときはaの時点のものと同様でないのに高濃度の Ca イオン溶液を灌流した場合は Na 電流が約2倍に Ca 電流は逆に半分になった．このことは細胞内の Ca イオン濃度が Na チャンネルにも Ca チャンネルにも

A. $3.3 \times 10^{-5} \text{ Ca}^{2+}$ (57Ca, 50 GEDTA, 50 DPTA-OH)



B. zero Ca^{2+} (50 GEDTA, 50 DPTA-OH)

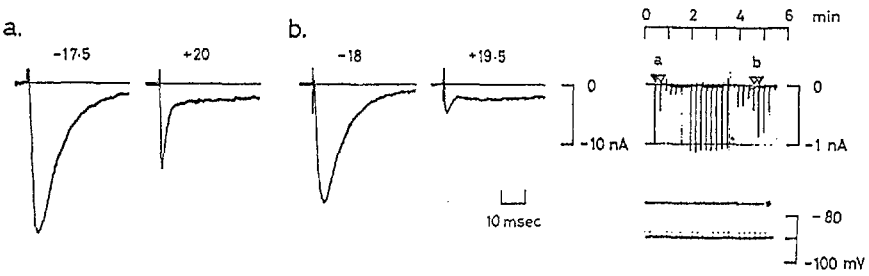


図2 卵細胞に高 Ca^{2+} イオン濃度の Ca 緩衝液を灌流した場合の Na 電流および Ca 電流に対する効果

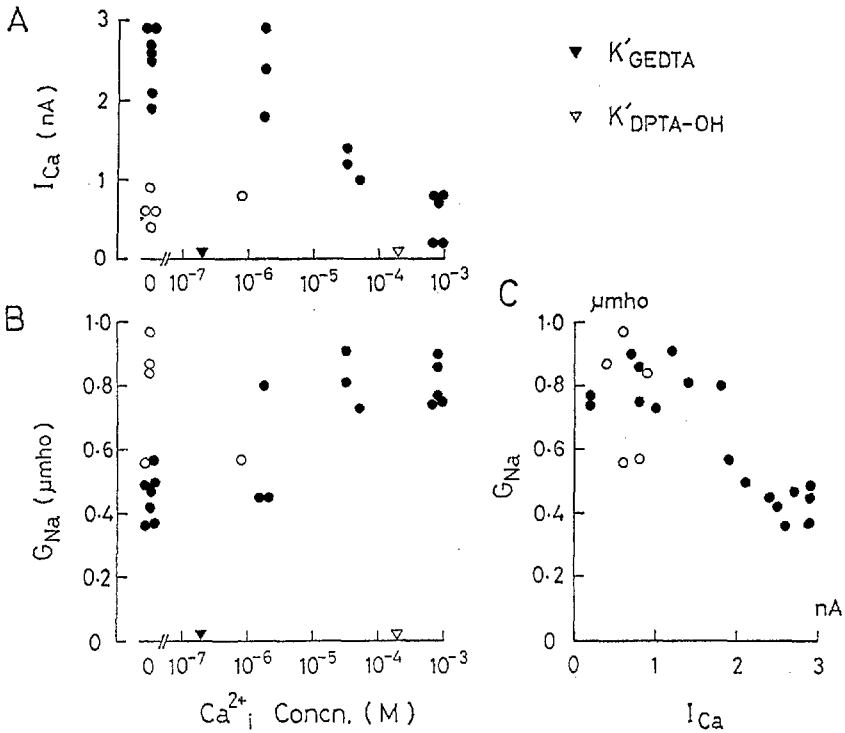


図3 最大 Ca 電流値 (図A) および Na 弦コンダクタンス値 (図B) の細胞内 Ca イオン濃度に対する関係. 図C は Ca 電流と Na コンダクタンスの間に相反関係があることを示したもの.

影響があるが、その効果が相反的であることを示した。色々な Ca イオン濃度の溶液を23個の卵に灌流して得られた結果をまとめてグラフにしたのが図3である。AではCa電流の最大値を、Bでは反転電位附近での弦コンダクタンスを縦軸にとって、灌流した溶液中のCaイオン濃度に対してプロットした。図から明らかのように、Ca電流は 10^{-6}M 以上で減少し始め 10^{-3}M では1/10以下になる。Na電流は逆に 10^{-6}M あたりから増え始め、 10^{-5}M から 10^{-4}M あたりで最大になる傾向を示す。勿論mM以上の高濃度のCaイオン中ではNa電流も消失してしまう。最大のCa電流値に対してその卵細胞での最大のNaコンダクタンスをプロットしたのが図Cである。ここではNa電流とCa電流の間にはっきりした相反関係が見られた。

研究の考察

このようなNaチャンネルおよびCaチャンネルに対する細胞内Caイオンの効果は正常のホヤ卵の発生過程において予定筋細胞あるいは予定神経細胞が示す興奮性の変化とよく似た相反的な変化である。いうなればCaチャンネルが増大する筋細胞での変化はCaイオン濃度の減少の効果に類似し、神経細胞での変化はCaイオン濃度の増加の効果と似ている。しかしよく調べて見ると分化した細胞での特徴的な変化であった閾値の変化はCaイオンの場合は見られない。また実際の分化の際は筋細胞ではNa電流は減少するだけでなく、完全に消失してしまう。このような事実はCaイオンだけが分化の要因となり得ないことを示している。しかし一方分化における変化は直接的なCaイオンの効果とことなり瞬時的な変化でなく時間がかかる。したがって多くの二次的な変化を含む可能性もある。

そこで卵細胞において示されたCaイオンの効果から筋細胞の分化の一つの因子として細胞内Caイオン濃度の減少があると考えerことは不当ではない。

文 献

- 1) Takahashi, K., Miyazaki, S. & Kidokoro, Y., Development of excitability in embryonic muscle membranes in certain tunicate. *Science*, 171: 415-418, 1971.
- 2) Miyazaki, S., Takahashi, K. & Tsuda, K., Calcium and sodium contributions to regenerative responses in the embryonic excitable cell membrane. *Science*, 176: 144-1443, 1972.
- 3) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yoshii, M., Membrane currents of the tunicate egg under the voltage clamp condition. *J. Physiol.*, 254: 607-638, 1976.
- 4) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yoshii, M., Two components of the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate. *J. Physiol.*, 255: 527-561, 1976.
- 5) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yamashita, N., Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 267: 465-495, 1976.
- 6) Takahashi, K. & Yoshii, M., Effects of internal free Ca upon the Na and Ca channels in the tunicate egg analysed by the internal perfusion technique. *J. Physiol.* in press. 1978.

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

研究目的

原索動物ホヤの幼生の横紋筋細胞は卵発生後,15 において 30 時間程度の短
期間で分化しかつ一個体の幼生に含まれる筋線維は 6 本と極めて少い.この筋
細胞への神経筋接合は他の脊椎動物の骨格筋におけるのと同様に,コリン作動
性である.したがって in vivo で筋細胞の初期分化のモデルとして適当である.