

ラット無毛部皮膚より単離したメルケル細胞の大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流

山下 由朗 齋藤 真之介 内田 憲之

Large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ currents of Merkel cells dissociated from rat glabrous skin

Yoshiro YAMASHITA Shinnosuke SAITO Noriyuki UCHIDA

Abstract

This study investigated the Ca^{2+} -activated K^+ currents (K_{Ca}) of Merkel cells, which were freshly dissociated from rat glabrous skin, using whole-cell and excised patch configurations of the patch clamp technique. With the whole-cell voltage clamp, the application of slow (50 mV/s) voltage ramps from -100 to +100 mV produced an N-shaped current-voltage (I-V) relationship. Maximum current activation occurred at $+38.0 \pm 10.6$ mV ($N = 14$). Replacement of extracellular Ca^{2+} by Mg^{2+} and the addition of 2 mM EGTA abolished the N-shaped I-V relationship, and 1 mM TEA reduced it to $< 40\%$. Using inside-out patches with symmetrical 150 mM KCl solutions, channels were observed with a slope conductance of 280 pS and a reversal potential of 0 mV. Reducing the $[\text{K}^+]_o$ to 5 mM shifted the reversal potential, which was expected for a K^+ selective channel. The channel open-state probability (P_o) was increased by increasing cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$. P_o also increased with depolarization. These data indicate the presence of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channels in Merkel cells.

Key words : Merkel cell, large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ current, patch clamp, glabrous skin,
キーワード : メルケル細胞、大コンダクタンス Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流、パッチクランプ、無毛部皮膚

諸言

指先などの表皮基底膜に存在するメルケル細胞¹⁾は、感覚神経終末膨大部と化学シナプス様結合をし、シナプス前部の細胞質には多数の有芯小胞が集積し、そして周りのケラチノサイトに指状に突き出す微絨毛を有している²⁾。また、触刺激に対して遅順応性 (slowly adapting) I (SA-I) 型応答を示す皮膚受容野の下には必ずメルケル細胞と感覚神経終末膨大部の形成する複合体 (メルケル細胞・神経複合体 Merkel cell-neurite complex) が存在する。この複合体は、特に指先などに局在し、物の形や肌理の識別、かつ2点弁別や点字の識別に最も貢献する触受容器であることが報告されている³⁾。この複合体がSA-I型受容器であることに異議を唱える研究者はないが、真の刺激受容部位 (機械-電気変

換チャンネルが存在する部位) はどこかとなると、メルケル細胞説のもの⁴⁻⁸⁾、神経終末部だけにあるという説^{9,10)}や、また、両方に存在することにより特徴的なSA-I型応答が生ずるとする仮説¹¹⁾もあり、永らく論争的である。

最近、遺伝的にメルケル細胞のみを欠如したマウスが作られ、その皮膚からはSA-I型応答は得られないことから、同応答発生には少なくともメルケル細胞が必要であることが証明された⁸⁾。このように、げっ歯類のメルケル細胞には機械-電気変換チャンネルが必要であることが明らかとなったが、その他のイオンチャンネルの報告は少なく、電位依存性イオンチャンネル電流として K^+ 電流 (一過性外向きAと遅延K) と Ca^{2+} 電流の電気生理学的報告¹²⁾があるのみだった。最近、電位依存性 K^+ チャンネル、 Ca^{2+} 依存性 K^+ (K_{Ca})チャンネルと電位依存性 Ca^{2+}

チャンネルの存在が免疫組織学的に証明された^{13,14)}。また、電気生理学的薬理学的研究から新たに K_{Ca} チャンネル電流の存在も示唆されているが、反応電流をコンピュータで演算処理して分離、識別するというもので数10分も時間を要する方法が用いられている^{13,14)}。

我々は、1回のランプ波¹⁵⁾を使用することによって電位固定増幅器の出力波計から直接に K_{Ca} チャンネル電流を計測し、I-V 関係を5秒内に作成できたので報告する。また、単一チャンネル電流記録から、同チャンネルのコンダクタンスは、280 pSであることを示す。

材料、方法、

動物は生後2~5週令のSDラットを使用した。実験前日にラット腹腔内に蛍光色素キナクリン二塩酸塩 (Sigma, USA) を注入 (10-15 mg/kg 体重) した⁵⁾。この蛍光色素は表皮内ではメルケル細胞にのみ選択的に取り込まれるので、同細胞を蛍光識別できる。本実験は熊本大学医学部及び九州保健福祉大学における動物実験規定に適合し、承認された。

実験当日、ラットはウレタンの腹腔内注射 (3g/kg 体重) で深麻酔し、鎮痛された。無毛部皮膚 (足底部) から 1x2mm の皮膚片が切り出され、混合ガス (95% O_2 -5% CO_2) でバブルした培養液 (31°C, pH=7.45) に浸された。ラットは過量のウレタン投与で安楽死された。メルケル細胞の単離、識別法は以前の我々の方法と同じだった¹²⁾。簡単に記すと、表皮をコラゲナーゼと機械処理することによって単離された細胞は標準外液 (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, Tris base で pH は 7.4) を含むプラスチック皿にまかれた。底に付着した単離メルケル細胞の存在するプラスチック皿は、ステージ固定式正立落斜蛍光・明視野・微分干渉顕微鏡 (BX51WI, オリンパス) 下に置かれ、メルケル細胞に全細胞膜電位固定法や、単一チャンネル電流を測定するためにパッチクランプ電位固定法を適用した¹⁵⁾。膜電位固定増幅器 (Axopatch200B, Axon Instruments, USA) を使用し、応答電流はオシロスコープや感熱式記録計に出力され、かつ A/D コンバータである Digidata 1320A (Axon Instruments, USA) を介してデータレコーダに記録された。外液は、通常は上記の標準外液であった。外液を無 Ca^{2+} 外液や 150 mM KCl 溶液に変える時には、Y-tube 法を用いて細胞の周りの液を瞬時 (50 msec 内) に交換した。無 Ca^{2+} 外液は 2 mM Ca^{2+} を 2 mM EGTA と Mg^{2+} で置き換えて作り、また 150 mM KCl 外液は、

NaCl と置き換えられた。全細胞膜電位固定法でのピペット内液は 150 mM KCl だった。パッチクランプ電位固定法でのピペット内液は 150 mM KCl と 5 mM KCl を含む標準外液を混ぜ合わせて 5, 30, 60, 150 mM K^+ 濃度の外液を作成した。実験は室温 (23-26°C) で行われた。データ値は特に記さない限り、平均 \pm S.E. である。

結果

まず初めに、メルケル細胞の電流-電圧 (I-V) 関係を調べた。通常の方法としては、-100 ~ +100 mV まで 10 mV か 20 mV 刻みのステップパルス (数百 msec) を与えて、応答電流をそれぞれ 21 か 11 回測り、I-V 関係を作成するというものだった¹²⁻¹⁴⁾。今回の実験では、全細胞膜電位固定下の細胞に、-100 ~ +100 mV のランプ状電位変化 (50 mV/sec) を1回だけ与えて、I-V 関係を作成した。標準外液での場合では、応答電流 (I_m) は、外向き電流のこぶを作ることににより N-shape を示した (図 1. a)。こぶは $+38.0 \pm 10.6$ mV ($n=14$) の電位 (V_m) で極大値を示した。次に無 Ca^{2+} 外液に変えてみるとこぶが消え N-shape でなくなった (図 1. b)。最後に標準外液に戻すとこぶが回復し N-shape になった (図 1. c)。このことより、メルケル細胞は、細胞外 Ca^{2+} に依存する外向き電流を 0 mV から +100 mV の範囲で発生し、その極大値は +38 mV 付近にあることが明らかとなった。

こぶ状の外向き電流は、 K^+ チャンネル電流であることが予想されたので、 K^+ チャンネルブロッカーの効果調べた。電位依存性の遅延 K^+ 電流や K_{Ca} 電流のブロッカーである 1 mM TEA (tetraethylammonium)¹⁶⁾ は Ca^{2+} 依存性外向き電流を 60 % 以上抑制した (図 2, A)。一

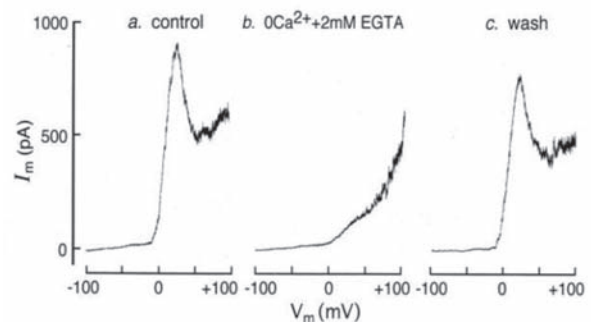


図 1. メルケル細胞の電流-電圧 (I-V) 関係と無 Ca^{2+} 外液の効果。横軸 V_m は固定電位 (mV)。縦軸 I_m は反応電流 (pA)。この I-V 関係は、全細胞膜電位固定下の同一細胞に、-100 ~ +100 mV のランプ状電位変化 (50 mV/sec) を与えて求められた。a と c: 標準外液中での応答電流。b: 無 Ca^{2+} 外液での応答電流。

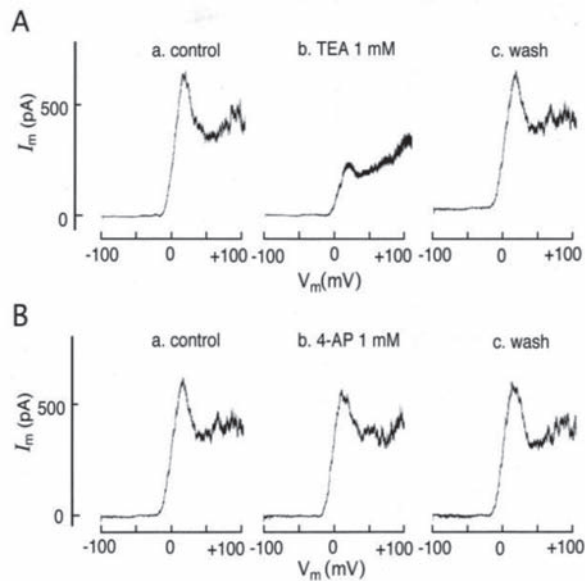


図2. Ca^{2+} 依存性電流に対する K^+ チャネルブロッカーの効果。図1と同じ方法でI-V関係は求められた。1 mM TEAは Ca^{2+} 依存性電流を60%以上抑制した(A)が、1 mM 4-APはほとんど無効であった。

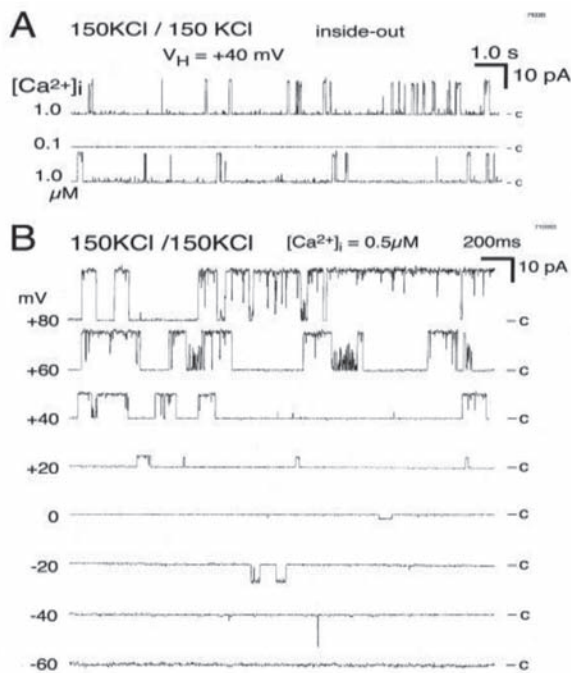


図3. inside-out patch 記録法による Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流の証明。A. symmetrical 150 mM KCl 溶液にて観察される種々の保持電位 (V_H) におけるチャネル電流への細胞内膜面 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 濃度の影響。 $V_H = +40$ mV。-cはチャネル閉鎖レベルを示す。B. 種々の保持電位 (V_H) におけるチャネル電流。脱分極電位でチャネル活動が増す。電位依存性である。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $0.5 \mu\text{M}$ に固定。

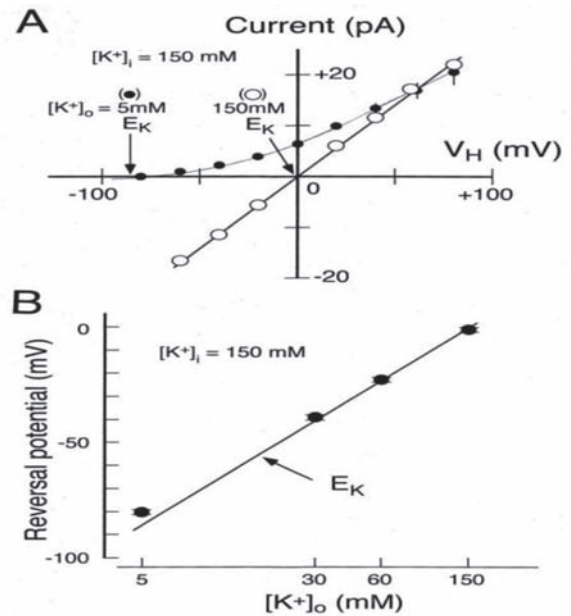


図4. 単一 K^+ チャネル電流の逆転電位。A. 内膜面の K^+ 濃度 ($[\text{K}^+]_i$) は 150 mM と一定にしておいて、細胞外膜面側 (pipette 内) の K^+ 濃度 ($[\text{K}^+]_o$) を 5 mM (●) と 150 mM (○) に変えた時の単一チャネル電流のI-V関係。チャネル電流の向きは、いずれも K^+ の平衡電位 (E_K) 付近で逆転する。symmetrical 150 mM KCl 溶液でのチャネルコンダクタンスは、280 pS であった。

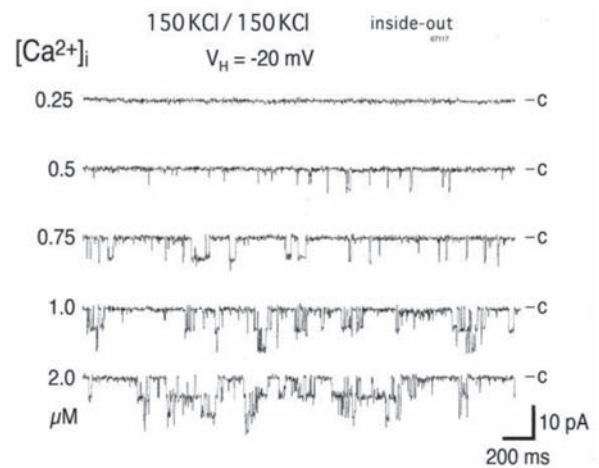


図5. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の影響。 Ca^{2+} 濃度の増加でチャネルの開離率が增加する。-cはチャネル閉鎖レベルを示す。 $V_H = -20$ mV。

方、一過性外向き K 電流 (A 電流) の選択的ブロッカーである 1 mM 4-AP (4-aminopyridine)¹²⁾ はほとんど無効であった (図2,B)。以上の結果や Ca^{2+} チャネルの存在などを考え合わせると、メルケル細胞膜には Ca^{2+} チャネルを介する細胞外 Ca^{2+} 流入により活性化される TEA 感受性 KCa チャネルの存在することが示唆された。

そこで、メルケル細胞膜に KCa チャネルが実際存在するかどうか、パッチクランプ法の inside-out patch 様式

を用いて確かめた。細胞内外とも 150 mM KCl 溶液とし、保持電位 (V_H) +40 mV にて、細胞内膜面 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 濃度を 1.0 μ M (図 3A 上段) から 0.1 μ M (図 3A 中段) に変えると、チャネル電流の発生が止まった。元に戻すとチャネル電流が観察された (図 3A 下段)。-c はチャネル閉鎖レベルを示す。このことより、 K_{Ca} チャネル電流であることが確かめられた。

このことを確認後、 K_{Ca} チャネルの電位依存性を調べた (図 3B)。 $[Ca^{2+}]_i$ は 0.5 μ M に固定し、 V_H を -60 から +80 mV に 20 mV 刻みで変えてみたところ、脱分極側で開確率が高くなった。また、-c はチャネル閉鎖レベルを示すが、この例では単一チャネル電流の向きが +5 mV 付近で逆転することがわかる。この逆転電位の 5 例の平均は、図 4A の白丸 (○) で示され、S.E. は小さい値なので白丸に隠れている。白丸を結んだ線から 0 mV で逆転することがわかった。これは、symmetrical 150 mM KCl 溶液中での K^+ の平衡電位 (E_K) = 0 mV と一致し、この直線の傾きよりチャネルコンダクタンスは 280 pS であると計算された。次に pipette 内 (細胞外膜面側) の K^+ 濃度 ($[K^+]_o$) を 5 mM (●) に変えて単一チャネル電流の I-V 関係を求めた。約 -80 mV 付近で逆転することがわかり、ネルンストの式で求められる K^+ の平衡電位 $E_K = -85$ mV に近い (図 4A)。pipette 内 $[K^+]_o$ を 5, 30, 60, 150 mM に変えて逆転電位 ($N=5$, SE は一部平均マーク ● に隠れている) を求め、まとめたのが図 4B である。各逆転電位は、直線で示された E_K 値と一致することから、チャネル電流は間違いなく K^+ チャネル電流であることが証明された。以上の結果より、ラットメルケル細胞膜には、symmetrical 150 mM KCl 溶液中で 280 pS の大コンダクタンスをもつ Ca^{2+} 依存性 K^+ (BK_{Ca}) チャネルの存在することが明らかとなった。

次に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の効果を詳しく調べた (図 5)。symmetrical 150 mM KCl 溶液中で、 $V_H = -20$ mV で記録しているので、下向きの電流が記録されている。生理的範囲内の 0.25 から 2.0 μ M への増加に比例して多くのチャネル電流が観察された。

最後に、これまでの実験では、細胞内膜面側溶液組成は 150 mM KCl 溶液と低濃度の Ca^{2+} のみであった。細胞内には元々 ATP や Mg^{2+} が存在するので¹⁷⁾、その効果を調べた。同一標本を用いて細胞内膜面側に ATPMg を与える前 (図 6A) と後 (図 6B) でチャネル電流の発生を比べてみた。4mM ATPMg が存在すると特に +40, +80 mV の電位でチャネル開確率が増加し、多くのチャネル電流が観察された (図 6B)。

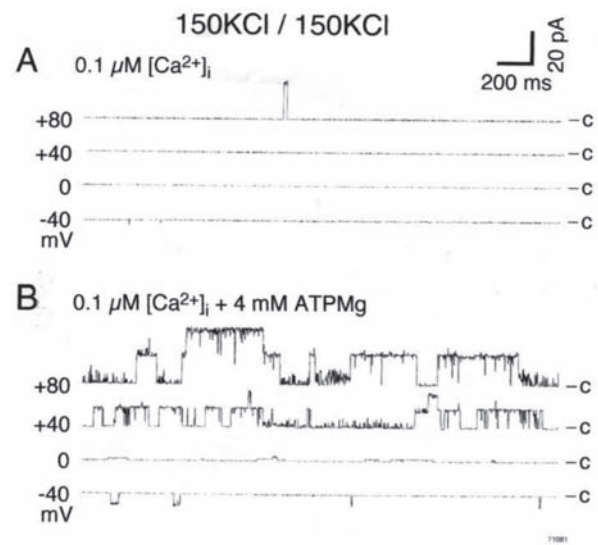


図 6. 細胞内修飾因子 ATPMg の効果。1.0 μ M $[Ca^{2+}]_i$ における 4mM-ATPMg 投与の効果。

考察

今回の実験手法では、ラットメルケル細胞に Ca^{2+} 依存性 K^+ (K_{Ca}) チャネル電流の存在を容易に示すことができた。これまでの通常の方法としては、全細胞膜電位固定法を適用したメルケル細胞に、-100 ~ +100 mV まで 10 mV か 20 mV 刻みのステップパルス (数 100 msec) を 21 回か 11 回与えて応答電流の大きさを測り、コンピュータで演算処理して I-V 関係を作成するというものだった¹²⁻¹⁴⁾。今回の研究では、全細胞電位固定下の同細胞に、-100 ~ +100 mV のランプ状電位変化 (50 mV/sec) を 1 回だけ与えて、その反応電流から直ちに I-V 関係を作成できた。 K_{Ca} チャネルの I-V 関係は N-shape を示す場合が多いが¹⁸⁾、メルケル細胞では報告がなかった¹²⁻¹⁴⁾。この原因としてステップパルス法の場合には何回もパルスを与えなければならないその度に細胞内に Ca^{2+} が流入し直径 10 μ m 以下のメルケル細胞は弱ったものと推測される。しかし、今回の手法は 1 回のランプ波電圧を与えるのみで、大部分のメルケル細胞にこぶ状の外向き電流をもつ N-shape が得られ、かつ、2 秒で済む。したがって、今回の実験手法はメルケル細胞の Ca^{2+} 依存性 K^+ (K_{Ca}) チャネル電流の特徴や役割の今後の研究に多いに貢献するだろう。

次に、ラットのメルケル細胞膜には、TEA 感受性で 280 pS の大コンダクタンスをもつ Ca^{2+} 依存性 K^+ (BK_{Ca}) チャネルの存在することが初めて明らかとなった。種々の細胞の BK_{Ca} チャネルは、一般に symmetrical 150 mM KCl 溶液中で、250 ~ 300 pS の単一チャネルコ

ンダクタンスを持つことが報告されている¹⁸⁾。今回は BK_{Ca} チャネルの特異的阻害薬である iberiotoxin¹⁹⁾ の効果は試されなかったが、メルケル細胞が BK_{Ca} チャネルを持つことが示唆される。感覚細胞における BK_{Ca} チャネルの働きを調べてみると、サンショウウオ杆体視細胞での BK_{Ca} チャネルは、視細胞からの神経伝達物質放出を促進することが報告されている²⁰⁾。対照的に蝸牛内有毛細胞では、リアノジン受容体と BK_{Ca} チャネルは共同して、内有毛細胞からの神経伝達物質放出を抑制するように働くことが提案されている²¹⁾。ラット口髭洞毛のメルケル細胞にも、リアノジン受容体を介するカルシウム誘発性カルシウム放出 (CICR) の起こることが知られているが²²⁾、メルケル細胞の BK_{Ca} チャネルの役割については、今後の課題である。

最近、espin というタンパク質は有毛細胞の不動毛に局在し、espin の突然変異は、聴覚障害や前庭機能障害を起こすことが報告された²³⁾。さらに espin は同じ機械受容細胞と見なされるメルケル細胞から指状に突き出す微絨毛^{2,24)}にも局在していることがわかった²³⁾。有毛細胞では微絨毛の先端に機械-電気変換チャネルが存在するが²⁵⁾、メルケル細胞の微絨毛の役割は明らかでない。

今回の研究で、メルケル細胞の K_{Ca} 電流はステップパルスではなくランプ波を使用することによって簡単に描け、かつ 280 pS の BK_{Ca} チャネル電流であることが明らかとなった。

5. 引用文献

- 1) Merkel, F.: Tastzellen und Tastkoerperchen bei den Hausthieren und beim Menschen. Arch. Mikr. Anat. 11: 636-652, 1875.
- 2) Cauna, N.: Functional significance of the submicroscopical, histochemical and microscopical organisation of the cutaneous receptor organs. Anat. Anz. 111(Suppl):181-197, 1962.
- 3) Johnson, K. O.: The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. Curr. Opin. Neurobiol. 11:455-461, 2001.
- 4) Iggo, A., Muir, A. R.: The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. J. Physiol(Lond). 200:763-796, 1969.
- 5) Baumann, K. I., Hamann, W., Leung, M. S.: Acute effects of neomycin on slowly adapting type I and type II cutaneous mechanoreceptors in the anaesthetized cat and rat. J. Physiol (Lond). 425:527-544, 1990.
- 6) Ikeda, I., Yamashita, Y., Ono, T., et al.: Selective phototoxic destruction of rat Merkel cells abolishes responses of slowly adapting type I mechanoreceptor units. J. Physiol (Lond). 479:247-256, 1994.
- 7) Cha, M., Ling, J., Xu, G-Y., et al.: Shear mechanical force induces an increase of intracellular Ca^{2+} in cultured Merkel cells prepared from rat vibrissal hair follicles. J. Neurophysiol. 106: 460-469, 2011.
- 8) Maricich, S. M., Wellnitz, S. A., Nelson, A.M., et al.: Merkel cells are essential for light-touch responses. Science. 324:1580-1583, 2009.
- 9) Gottschaldt, K. M., Vahle-Hinz, C.: Merkel cell receptors; structure and transducer function. Science 214: 183-186, 1981.
- 10) Mills, L. R., Diamond, J.: Merkel cells are not the mechanosensory transducers in the touch dome of the rat. J. Neurocytol. 24:117-134, 1995.
- 11) Yamashita, Y., Ogawa, H.: Slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units associated with Merkel cells in frogs and effects of direct currents. Somatosens. Mot. Res. 8:87-95, 1991.
- 12) Yamashita, Y., Akaike, N., Wakamori, M., et al.: Voltage-dependent currents in isolated single Merkel cells of rats. J. Physiol (Lond). 450:143-162, 1992.
- 13) Piskorowski, R., Haeberle, H., Panditrao, M. V., et al: Voltage-activated ion channels and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release shape Ca^{2+} signaling in Merkel cells. Pflugers Arch. 457(1):197-209, 2008.
- 14) Boulais, N., Pennec, J.-P., Lebonvallet, N., et al: Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. PLoS. ONE. 4(11): e7759. 2009.
- 15) Molleman, A.: Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology. John Willey & Sons. West Sussex. 2002.
- 16) Neely, A., Lingle, C. J.: Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. J. Physiol(Lond). 453: 97-131. 1992.
- 17) Prosser C. L.: Inorganic ions. In Comparative Animal Physiology. 3rd ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia, pp15-22. 1973.
- 18) Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., et al: Varieties of calcium-activated potassium channels. Annu. Rev. Physiol. 51:385-99. 1989.

- 19) Candia, S., Garcia, M. L., Latorre, R.: Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Biophys J.* 63(2): 583-590. 1992.
- 20) Xu, J. W., Staughter, M. M.: Large-conductance Calcium-activated potassium channels facilitate transmitter release in salamander rod synapse. *J. Neurosci.* 25(33): 7660-7668, 2005.
- 21) Beurg, M., Hafidi, A., Skinner, L. J., et al.: Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *Eur. J. Neurosci.* 22(5):1109-1119, 2005.
- 22) Senok, S. S., Baumann, K. I.: Functional evidence for calcium-induced calcium release in isolated rat vibrissal Merkel cell mechanoreceptors. *J. Physiol (Lond).* 500:29-37, 1997.
- 23) Sekerková, G., Zheng, L., Loomis, P. A., et al: Espins are multifunctional actin cytoskeletal regulatory proteins in the microvilli of chemosensory and mechanosensory cells. *J. Neurosci.* 24(23): 5445-5456. 2004.
- 24) Yamashita, Y., Toida, K., Ogawa, H.: Observation of Merkel cells with scanning electron microscopy. *Neurosci. Lett.* 159:155-158, 1993.
- 25) Lumpkin, E. A., Hudspeth, A. J. : Detection of Ca^{2+} entry through mechanosensitive channels localizes the site of mechanoelectrical transduction in hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10297-10301. 1995.