

5 筋細胞の細胞内電位測定

Intracellular Recording from Frog Sartorius Muscle Fibers

(by H. Shibuya)

a. 目的

- 1) 細胞内電位記録法を用いて、カエル縫工筋の単一筋細胞の静止電位を記録する。
- 2) 静止電位が K^+ の平衡電位にほぼ等しいことを確かめる。
- 3) 筋枝神経を電気刺激し、生じる単一筋細胞の活動電位を観察、記録する。
- 4) 神経-筋の興奮伝導のメカニズム、筋収縮の機構について考察する。

b. 解説

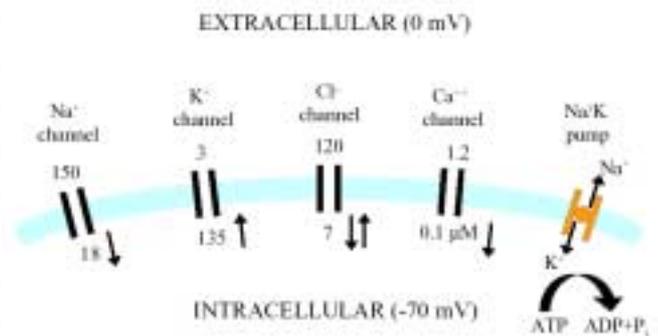
細胞は非常に薄い細胞膜に覆われており、細胞内外ではそのイオン組成が著しく異なる。そして細胞膜のもつイオンの選択的透過性により、細胞膜を介して電位差が存在する。この電位を膜電位 (transmembrane potential) と呼ぶ。もし細胞膜にこのイオンの選択性が無く、中性分子 (ex., KCl etc.) が通過するのであるならば、電位差は生じない。

神経細胞や筋細胞などの興奮性細胞は一過性に膜電位が変動しうる性質を有し、これが興奮伝導やシナプスでの情報伝達と密接に関連している。このような興奮性細胞の非活動時の膜電位を静止 (膜) 電位と呼ぶ。

Typical ionic concentrations

	Squid Giant Axon	Frog Sartorius Muscle	Human Red Blood Cell
Intracellular			
Na ⁺	50	13	19
K ⁺	397	138	136
Cl ⁻	40	3	78
Extracellular			
Na ⁺	437	110	155
K ⁺	20	2.5	5
Cl ⁻	566	90	112

Ions Move Through Specific Ion Channels

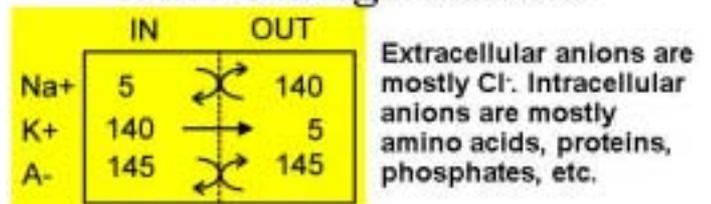


1) 静止 (膜) 電位

静止状態の細胞膜は K^+ に対して高い透過性を示すが、他のイオン (i.e., Na^+ , Cl^- etc.) に対する透過性は極めて低い (透過係数 $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0.04 : 0.2$)。よって細胞内外で電位差がないとすると濃度勾配 (拡散力) に従って細胞内に多く存在する K^+ は細胞外側へ移動 (拡散 diffusion) しようとする。 K^+ は 1 価の陽性の電荷を帯びているから K^+ が細胞内から細胞外へ流出すると細胞内は陰性に帯電する。

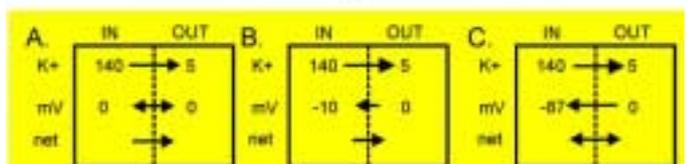
結果として、陽性の K^+ が細胞外へ拡散しようとするのを引き止める電気的な力 (クーロン力) が生じる。このクーロン力と拡散力が丁

The Resting Potential



The arrows indicate whether or not the ion can cross the membrane. Only K⁺ crosses.

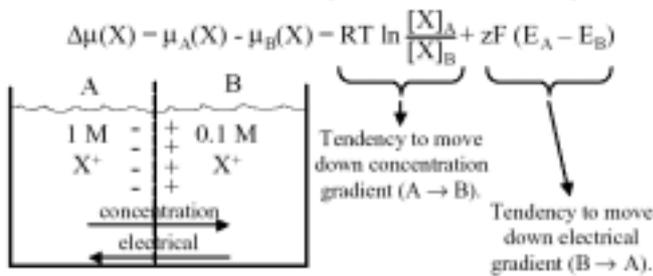
The Resting Potential



度つりあうと、そのイオンの正味の動きが無くなる。このときの電位は電気化学ポテンシャル (= 拡散力 + クーロン力) がゼロとなる電位で、これをイオンの平衡電位 ((Equilibrium potential, E_j) と呼ぶ。前述したように静止状態の細胞膜は K^+ に対して高い透過性を示すので、他のイオンの影響を無視すると、静止(膜)電位は K^+ の平衡電位 (Equilibrium potential, E_K) となる。ある特定のイオンの平衡電位は次式の Nernst の式で表される。

Electrochemical Equilibrium

1. X^+ diffuses A→B, down its concentration gradient.
2. X^+ diffuses B→A, down its electrical gradient.
3. Direction of net movement depends on whether the concentration effect or the electrical effect is greater.
4. These effects can be described by the ion's electrochemical potential (μ).



(Nernst Equation)

Where R is the gas constant, T the temperature, z the valence of the ion and F the Faraday constant. $[K^+]_o$ and $[K^+]_i$ are the external and internal potassium ion concentrations so that for $T=20^\circ\text{C}$ the cell has an E_K of -85 mV . Analogous calculations can be applied for all other ionic species leading to the specific Nernst reversal potential.

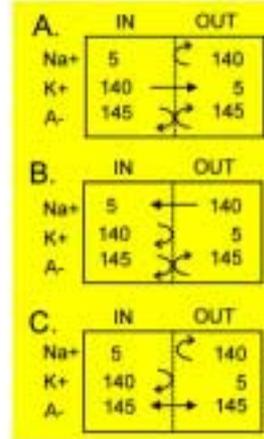
The Goldman, Hodgkin, Katz (GHK) equation

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

Driving force		Net driving force × Permeability (P_{ion})	Net flux
Chemical	Electrical		
Extracellular side	Na^+ +++	↓ × P_{Na} = ↓	↓
Cytoplasmic side	Na^+ ---		
Extracellular side	K^+ +++	↑ × P_K = ↑	↑
Cytoplasmic side	K^+ ---		
Extracellular side	Cl^- +++	↔ × P_{Cl} = ↔	↔
Cytoplasmic side	Cl^- ---		

Ion	Cytoplasm (mM)	Extracellular fluid (mM)	E_{ion} (mV)
K^+	400	20	-75
Na^+	10	145	+60

The Resting Potential



- The potential in A is -87 mV .
- The potential in B is $+87\text{ mV}$.
- The potential in C is 0 mV .

Nernst Equation

$$\Delta\mu(X) = RT \ln \frac{[X]_A}{[X]_B} + zF(E_A - E_B)$$

At equilibrium, $0 = RT \ln \frac{[X]_A}{[X]_B} + zF(E_A - E_B)$

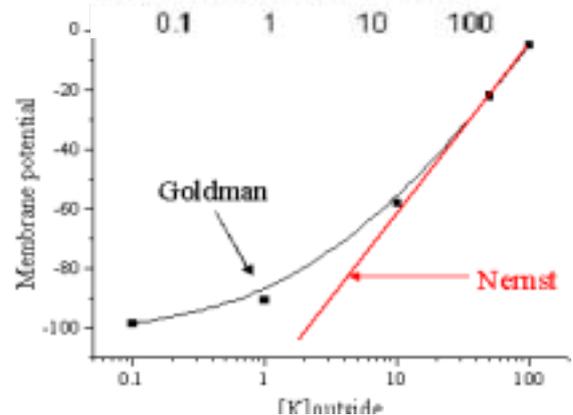
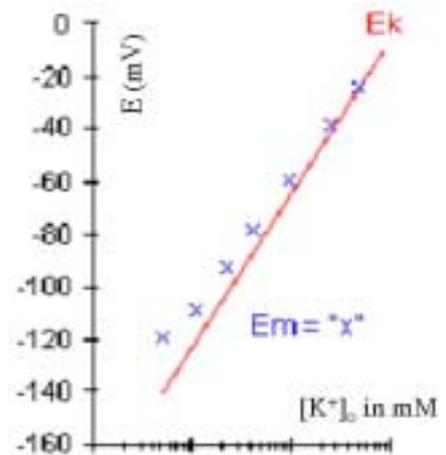
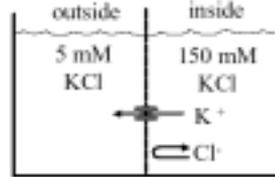
Solving for $(E_A - E_B)$ gives the Nernst equation:

$$(E_A - E_B) = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_A}{[X]_B}$$

For this example,

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

$$E_K = 58 \log \frac{5}{150} = -85\text{ mV}$$



(Rt. Upper figure)

The x's represent the measured membrane potentials at various $[K^+]_o$, and the straight line represents the relationship between the potassium equilibrium potential and $[K^+]_o$ calculated from the Nernst Equation.

(Lt. figure)

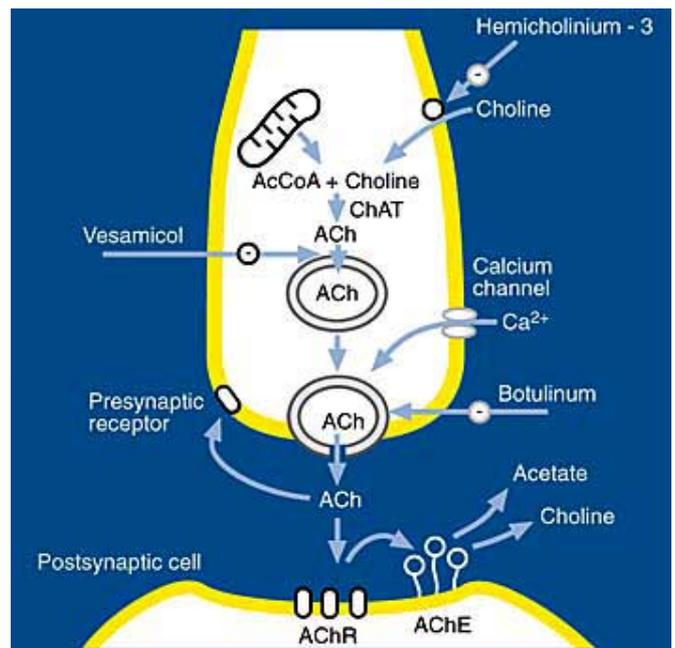
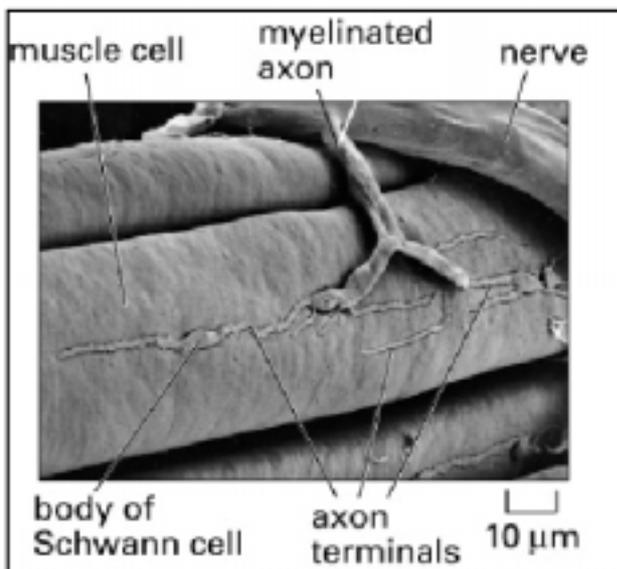
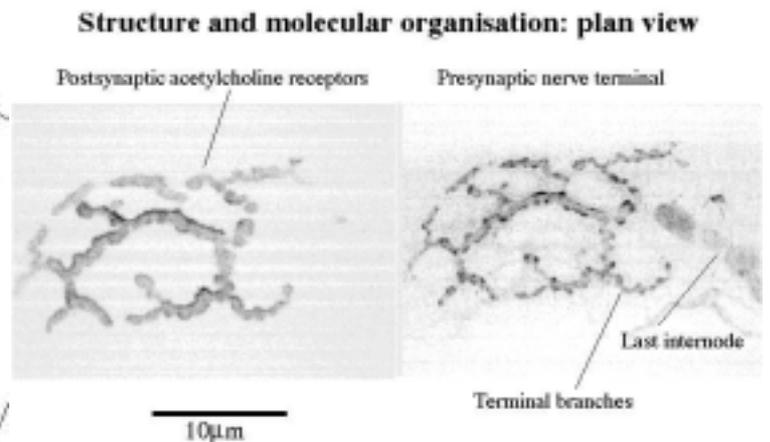
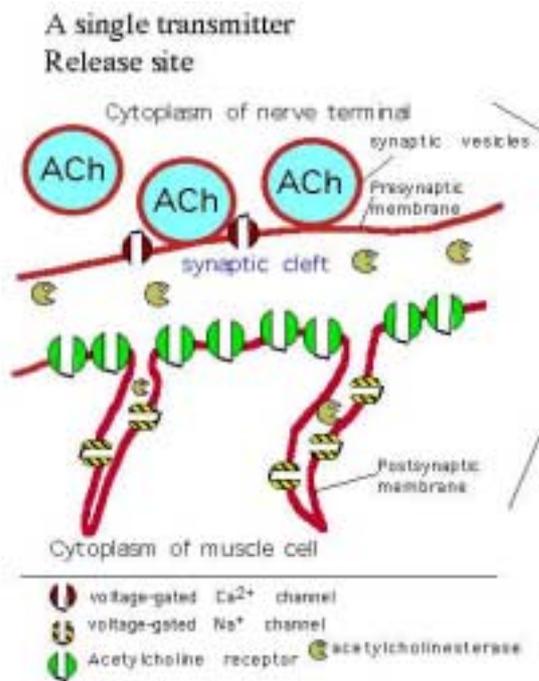
Driving force and membrane permeability determine ion flux.

The movement of Na, K, and Cl ions across the neuronal membrane is determined jointly by the electrochemical forces acting on each ion and the permeability to that ion. The fluxes illustrated here pertain to a cell with a membrane potential of -60 mV under the ionic conditions shown in the table.

The vertical arrows depict the strength of each force or ion flux, whereas the horizontal arrows indicate no net force or flux.

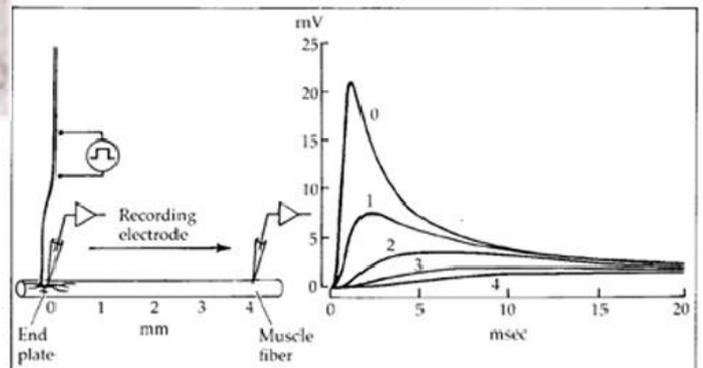
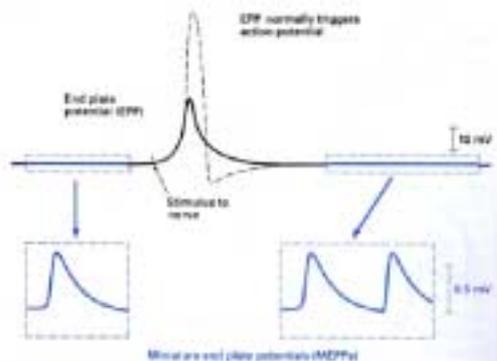
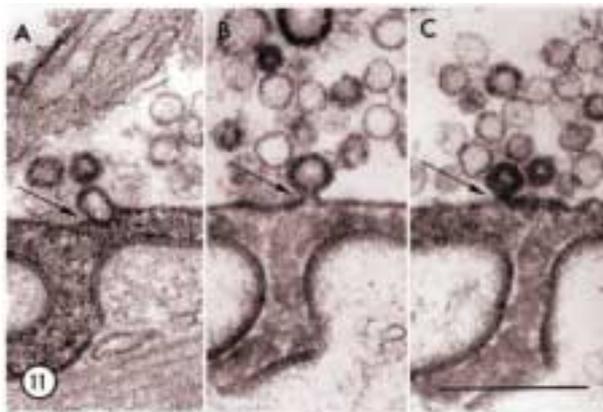
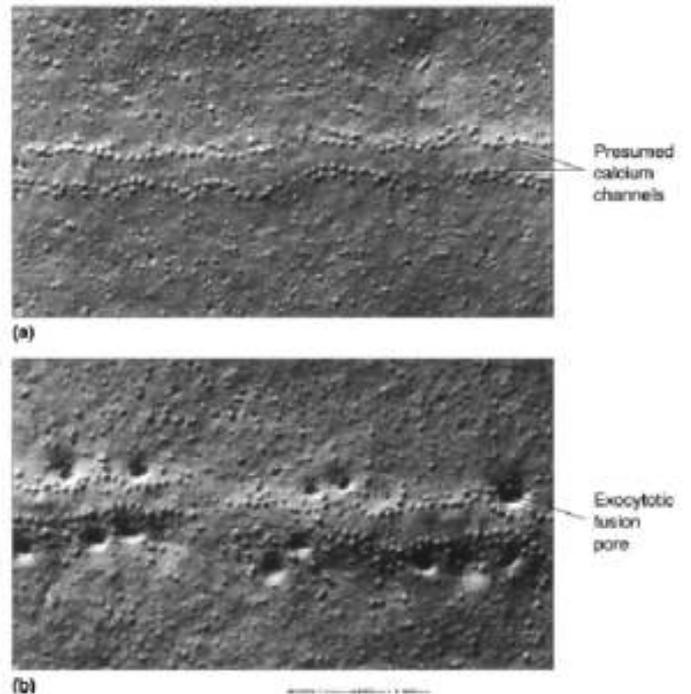
2) 筋細胞の活動電位の発生機序

神経終末にあるシナプス小胞には化学伝達物質のアセチルコリン (ACh) が貯蔵されている。



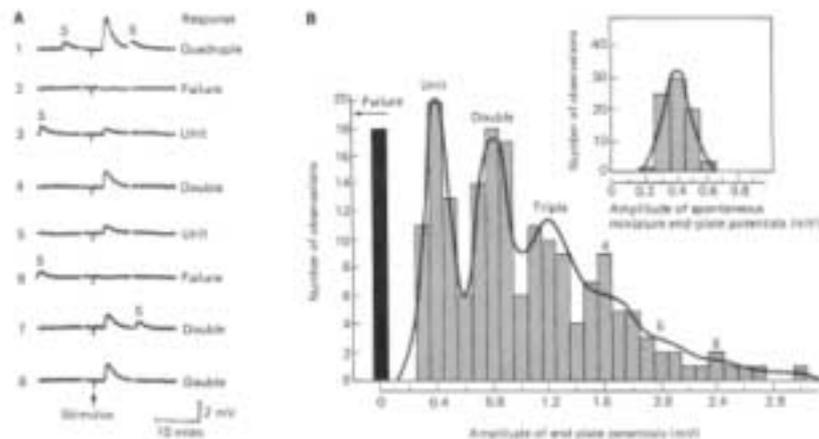
小胞内に貯蔵されている ACh が開口放出 (exocytosis: 仮説) によりシナプス間隙へ放出されると、終板 (endplate: シナプス後膜) に存在する ACh 受容体に結合し終板電位 (興奮性シナプス電位) を発生する。この放出は、静止状態に於いて自発的に起こる量子的放出 (quantal release: 仮説) と活動電位による細胞外 Ca^{2+} の神経終末への流入によって起こる放出とに分けられる。前者による終板電位は特に微小終板電位 (miniature end-plate potential, mEPP) と呼ばれ、運動神経の活動電位によって発生する終板電位は mEPP の整数倍となる。この終板電位は、電気緊張性電位である。

Synaptic terminal and vesicles: Freeze fracture



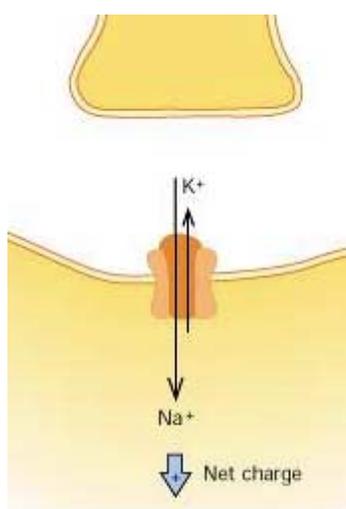
Waveform of epp measured by an intracellular electrode close to (0) and at 1 and 4 mm from the nerve ending, showing decay of synaptic potentials with distance. (From [3] after Fatt and Katz, 1951 [1]).

Probabilistic Nature of Release: Quantal Content and Calcium Levels



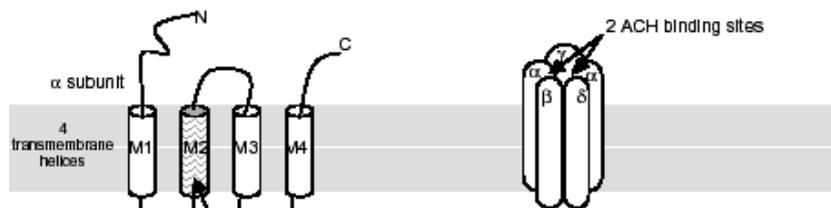
Transmitter is released in quanta. A. Thus recordings from the postsynaptic muscle cell reveal responses that have amplitudes that are multiples of a single quantal size. These responses were recorded in a solution with low Ca and high Mg to reduce the probability of release. B. Many recordings of the form in A can be pooled to develop an

骨格筋細胞の終板電位は、前述したように ACh が ACh 受容体に結合することによって、終板に存在する特殊なイオンチャンネル（ニコチン性 ACh 受容体チャンネル: nAChR channels）が開き、イオンの流れが生じるから発生する興奮性シナプス電位である。このように伝達物質によって開くチャンネルをリガンド感受性チャンネル（ligand-gated channels）と呼び、後述する電位依存性チャンネル（voltage-dependent channels）や機械刺激受容チャンネル（mechano-sensitive channels）とは区別される。nAChR channels の特徴は、陰イオンの通過を許さず、陽イオンに対する非選択的な透過性を有する事であり [Na⁺ 及び K⁺, それに多少 Ca²⁺ が関係している]、チャンネルを通る電流への各イオンの寄与は主として電気化学ポテンシャルによって決まる。



Nicotinic ACh Receptor
 -ligand bound receptor. ACh is a neurotransmitter that binds to the POSTSYNAPTIC membrane receptor in the synapse. When 2 ACh bind to the nAChR, the channel undergoes a conformational change that opens the channel to allow positive ions to flow into it. There are 5 subunits, each made of 4 transmembrane alpha helices. The pore is made up of 1 helix from each of the 5 subunits (the M2 helix). It is found in the neuromuscular junction (NMJ).

- Made of 5 subunits: 2 α β γ δ .
- Each subunit is composed of 4 helices. M1, M2, M3, and M4



The M2 helix is special.

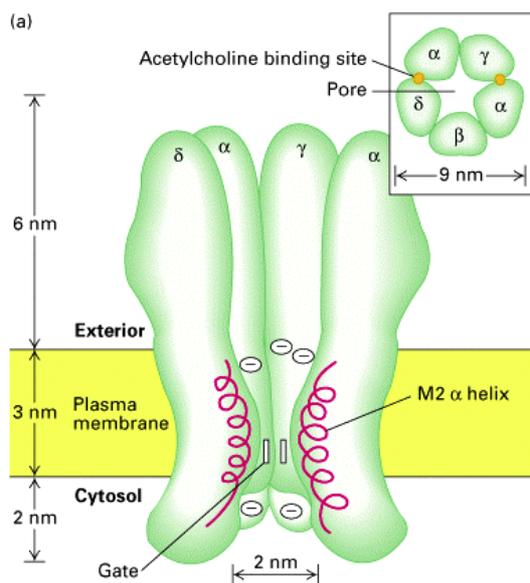
An M2 helix from each of the 5 subunits creates a "5 helix" bundle that undergoes a conformational change in opening the channel after ACh binds.

Leucines face into the channel when it is closed.

Bind 2 ACh molecules

Small polar residues face away from channel when it is closed

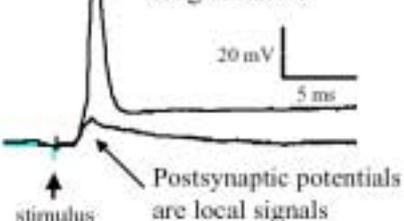
This picture is similar to the one see in the Lehninger textbook.



Signals in the Nervous System

Signals are brief changes in the electrical potential difference across the plasma membrane of neurons.

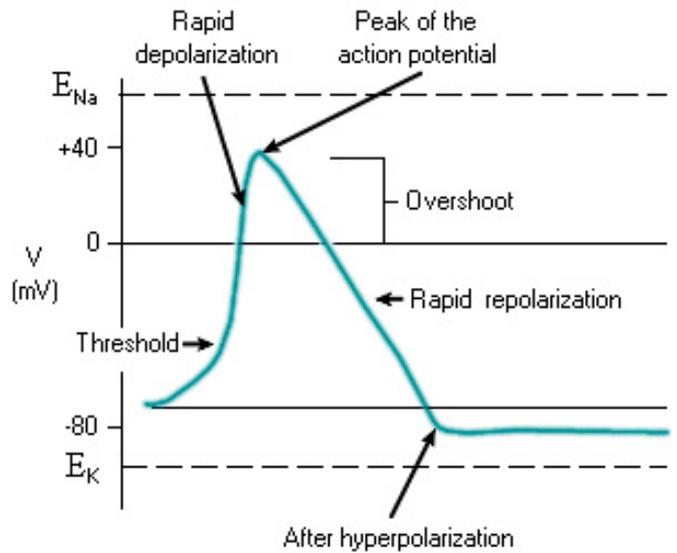
Action potentials are signals that can travel long distances



終板電位によって生じた電気緊張性電位は、終板周囲の細胞膜を脱分極するが、この脱分極が空間的・時間的加算を受け、あるレベル（閾値: threshold）に達すると、Na⁺ に対する透過性亢進（透過係数 $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0.23$ ）が引き起こり、活動電位が発生

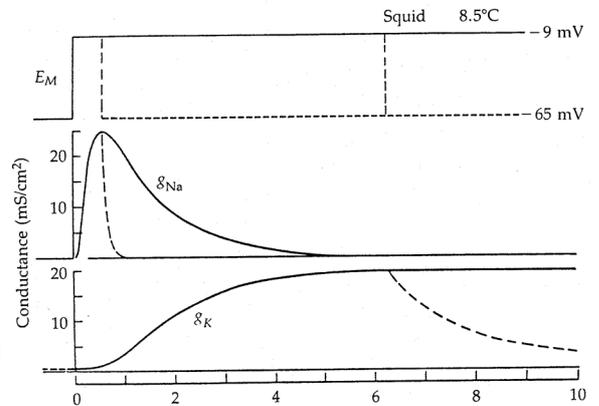
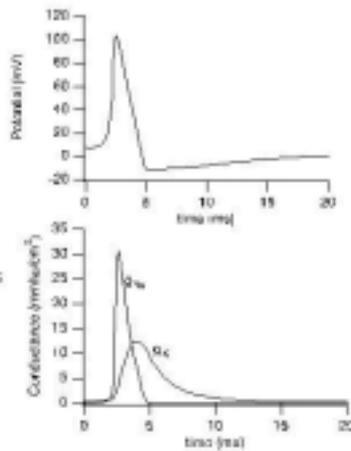
する。

このように電位によって開閉するチャンネルを電位依存性チャンネルという。活動電位の発生は、電位依存性 Na^+ チャンネルの自己再生的な活性化によるものであり、興奮性膜は静止状態から急激に脱分極し、活動電位の脱分極相を形成する。そのピークは Na^+ の平衡電位 E_{Na} (+50 ~ 60 mV) に近づくが、数 msec 後に生じる Na^+ チャンネルの不活化と電位依存性 K^+ チャンネルの活性化による K^+ の外向き流のため、最終的に活動電位の振幅が決まり、再分極層が形成される。

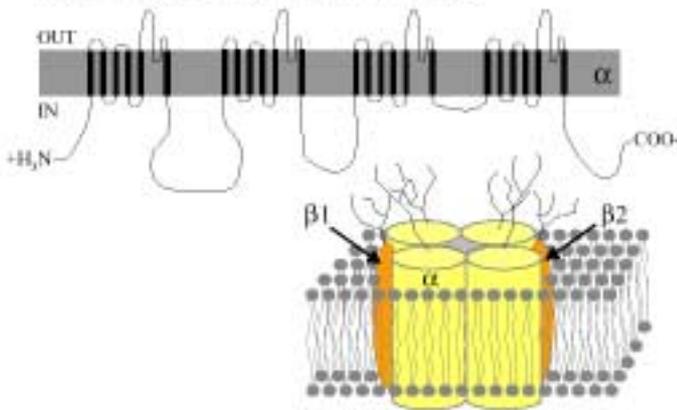


An action potential

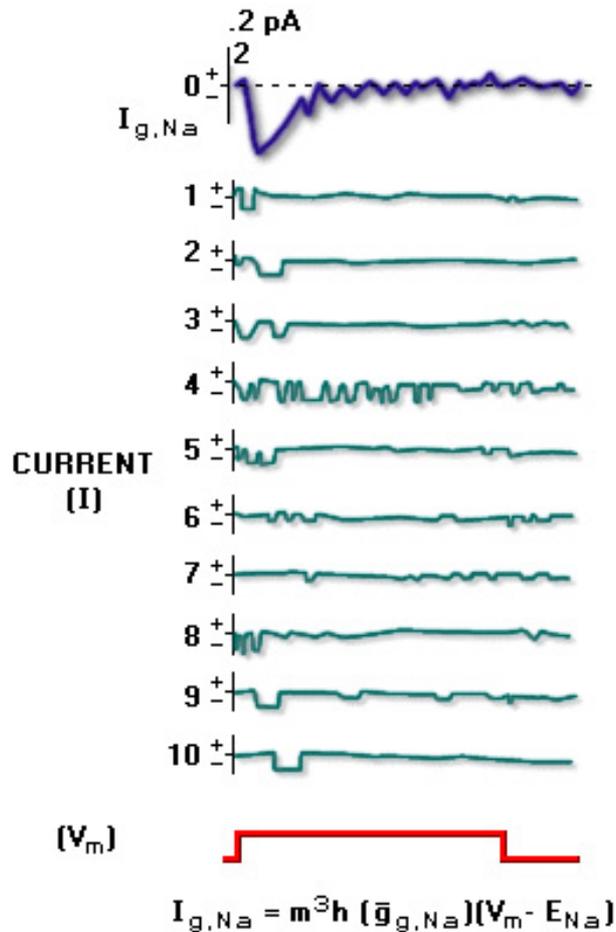
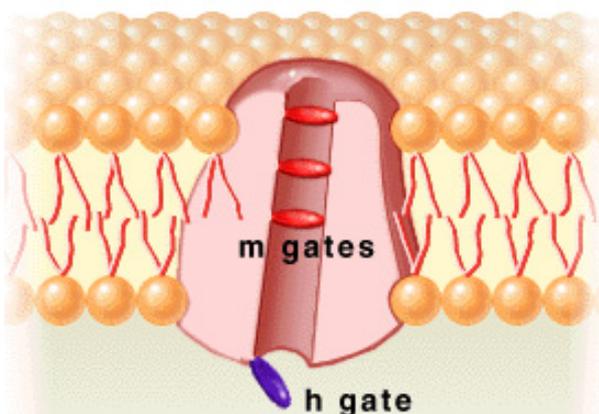
- g_{Na} increases quickly, but then inactivation kicks in and it decreases again.
- g_{K} increases more slowly, and only decreases once the voltage has decreased.
- The Na^+ current is autocatalytic. An increase in V increases m , which increases the Na^+ current, which increases V , etc.
- Hence, the threshold for action potential initiation is where the inward Na^+ current exactly balances the outward K^+ current.

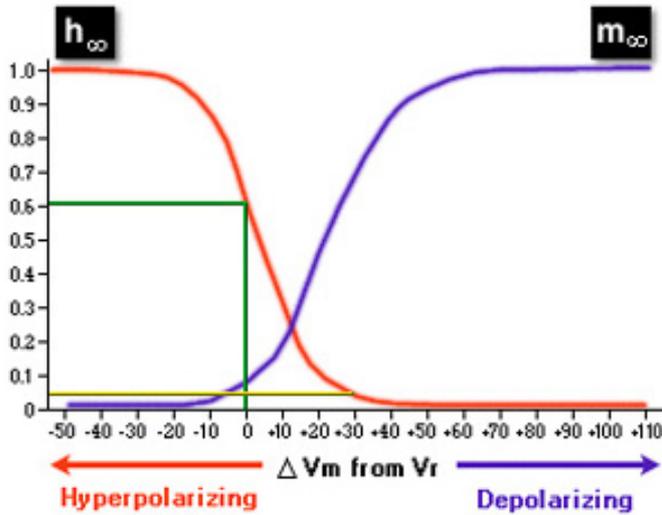


The Voltage-Gated Na^+ Channel



Voltage Gated Sodium Channel



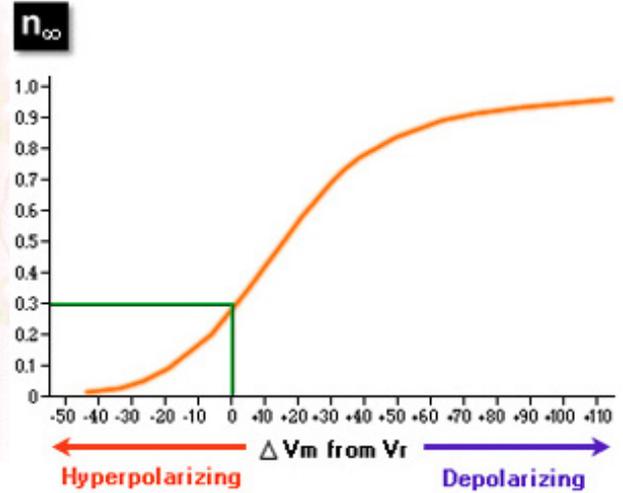
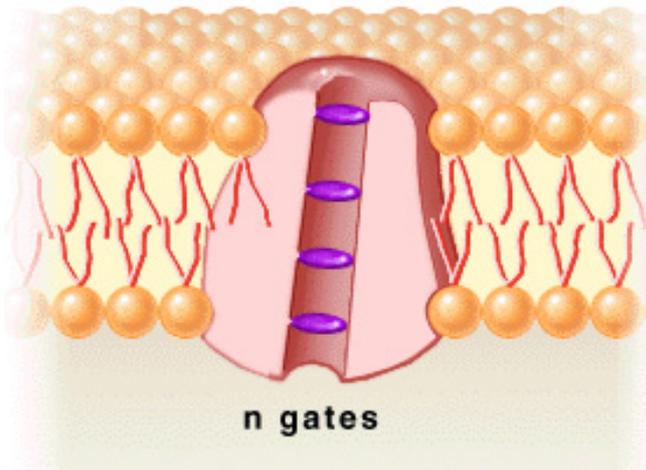


Sodium Channel: Resting Conditions

The graphs in the figure show the voltage dependencies of the m and the h gates of the sodium channel. At the resting potential, $m_{\infty} = 0.05$ (follow the yellow line) and $h_{\infty} = 0.6$ (follow the green line) and the open probability for a sodium channel ($P_o = m^3h$) is very small (0.0075%). Therefore, the current passing through the voltage-gated sodium channels at the resting potential is negligible.

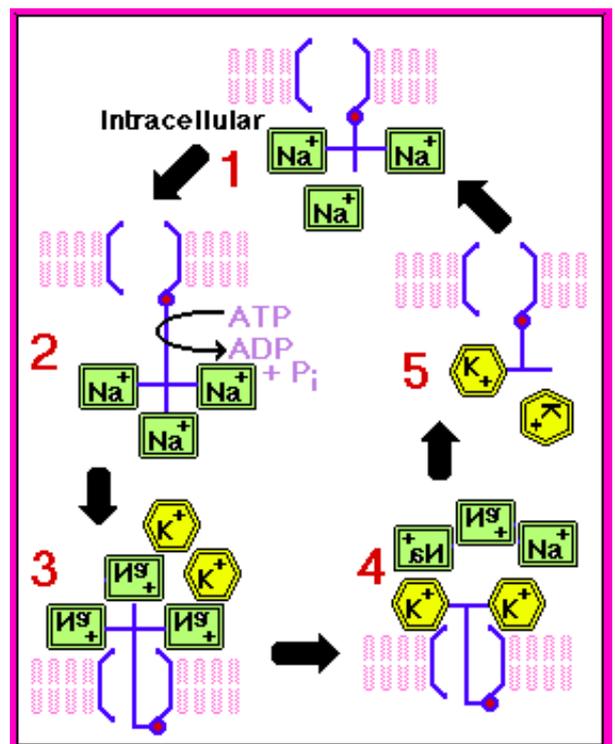
Voltage Gated Potassium Channel

$$I_{g,K} = n^4 \bar{g}_{g,K} (V_m - E_K)$$



3) Na⁺ の不均等分布を作る細胞の原動力

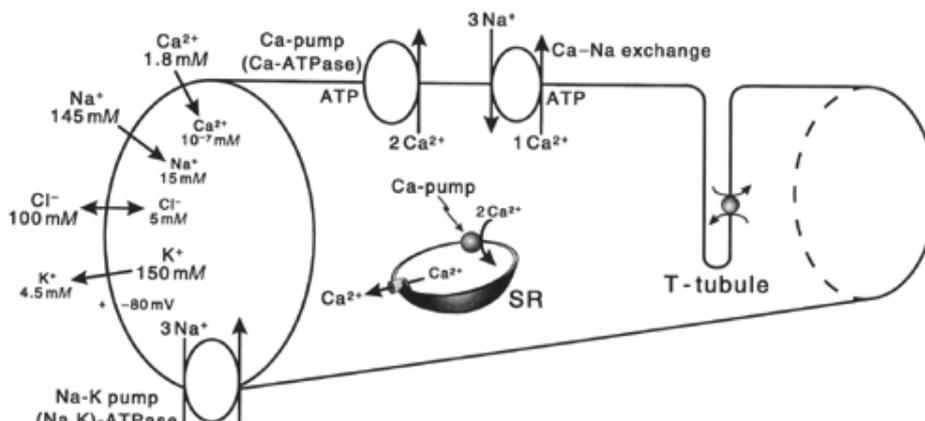
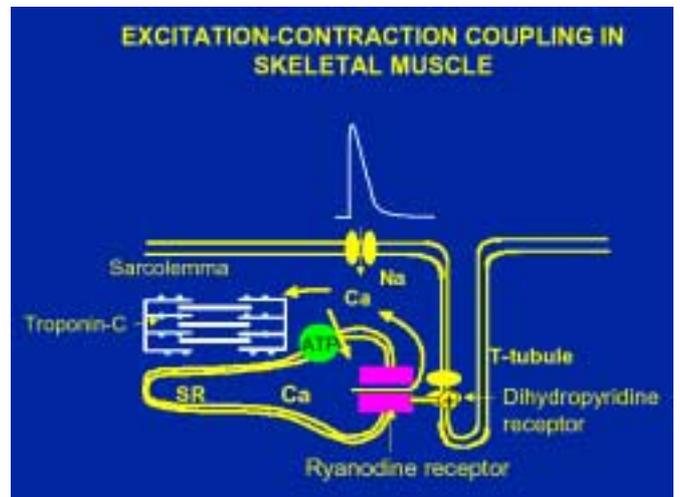
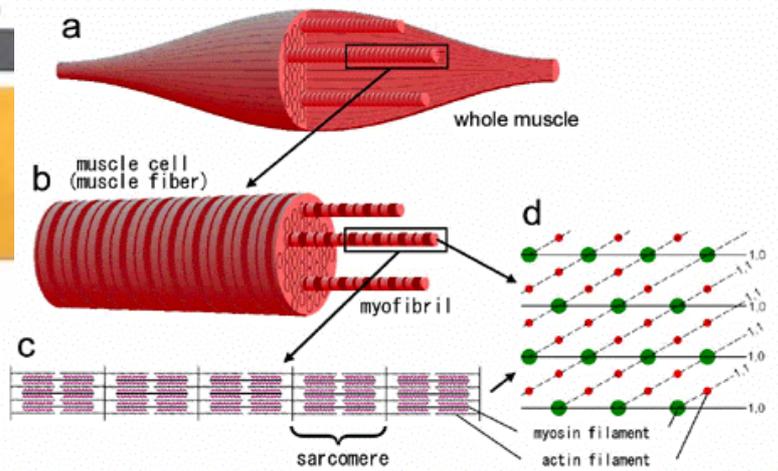
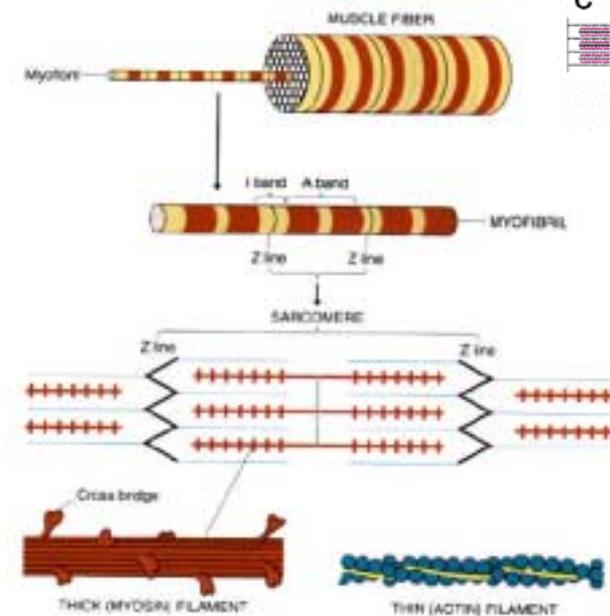
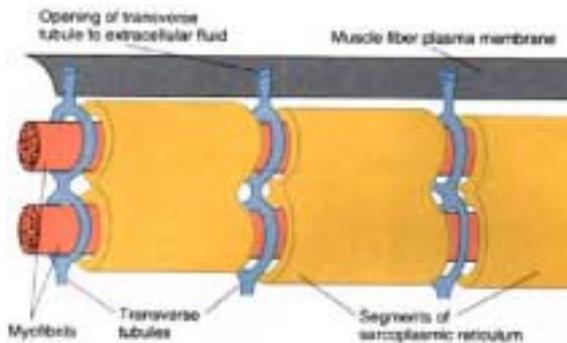
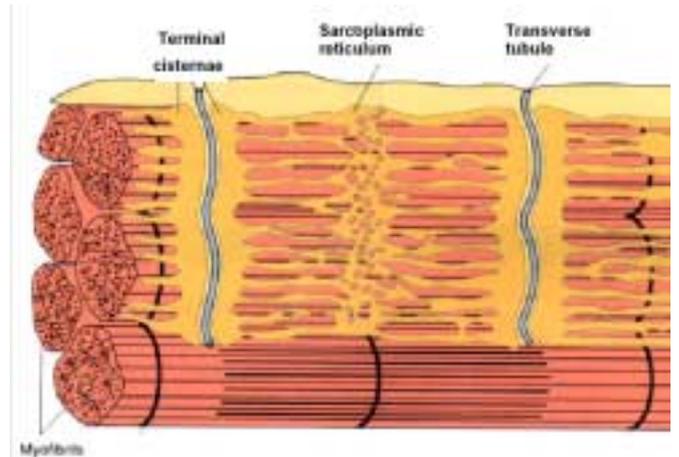
活動電位が発生したとき、Na⁺ イオンが細胞内へ流れ込むが、その実際の量は極めてわずかなので、数発の活動電位が発生しても細胞の大部分の場所で細胞内外の Na⁺ の濃度差は変化がないとみなせる。しかし、何発も活動電位を発生していくと、次第に細胞内 Na⁺ 濃度が高くなり、濃度勾配の減少に因る活動電位振幅の低下がもたらされるであろう。この現象を防ぐため、興奮性細胞膜は細胞内へ流入した Na⁺ を細胞外へ汲み出す仕組みをもっている。これは Na⁺ ポンプとして知られている。Na⁺ ポンプは、生体エネルギー貯蔵物質である ATP (adenosine triphosphate) を消費しつつ能動輸送により細胞内 Na⁺ を細胞外へと運ぶ。

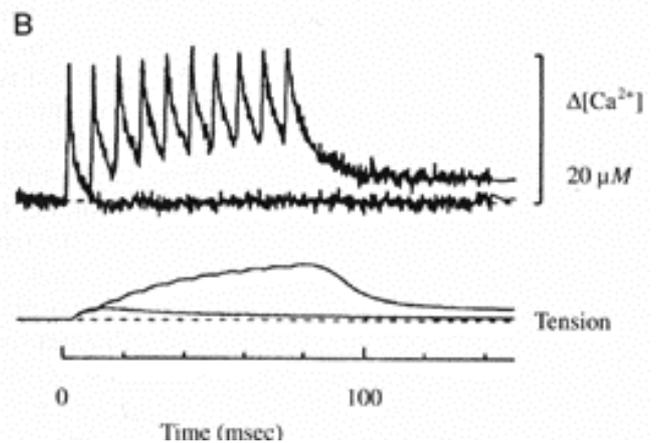
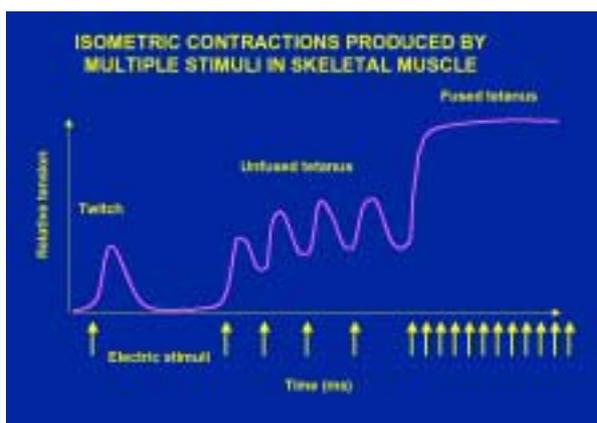
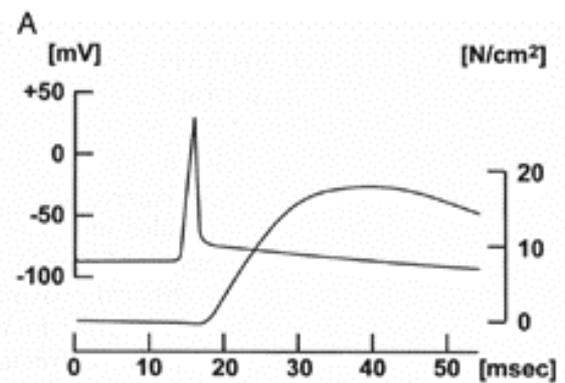
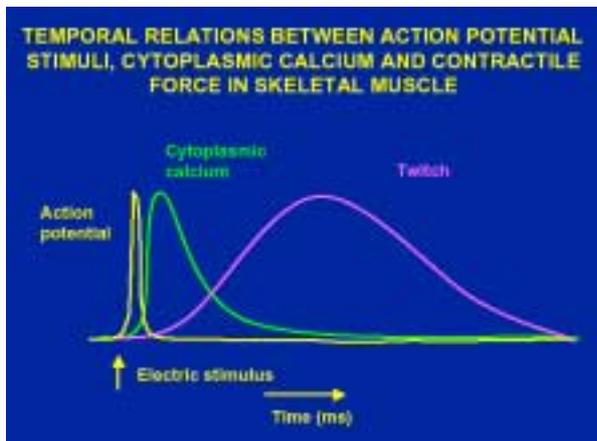
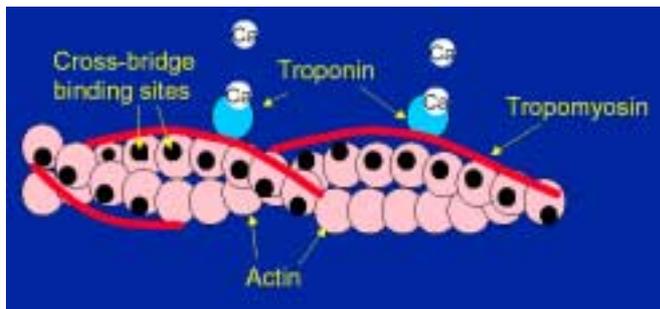
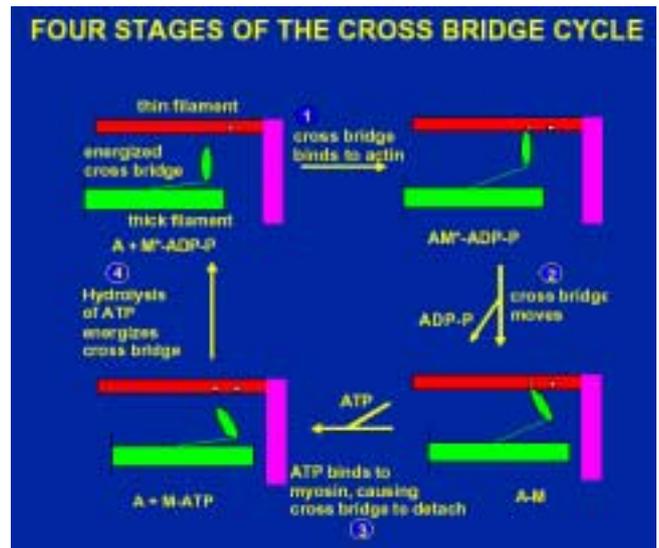
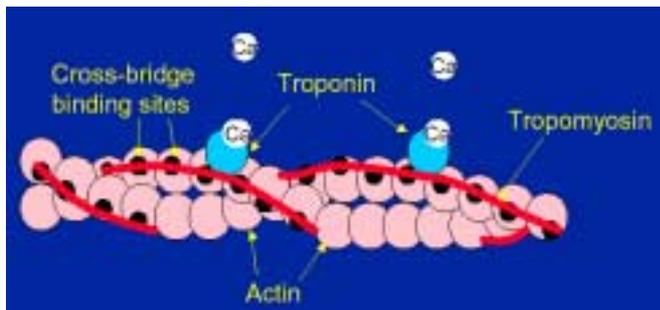
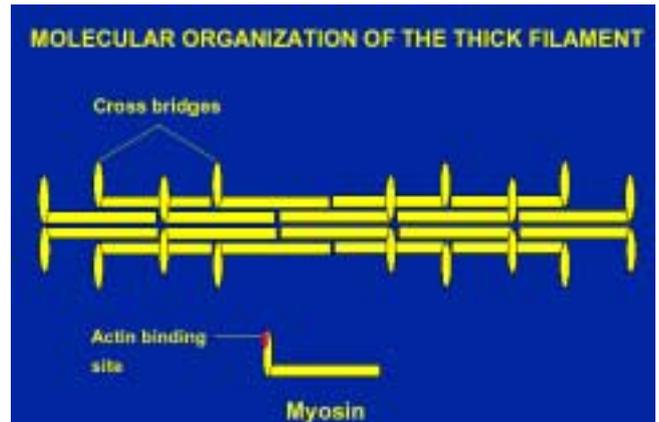
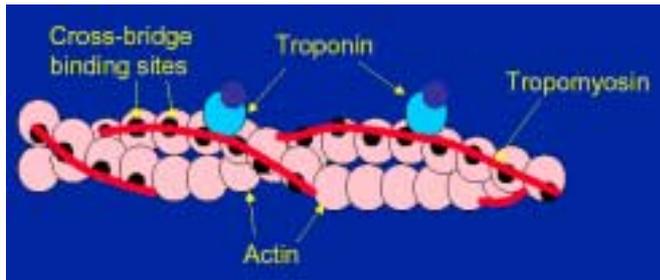


Na⁺-K⁺ ポンプはその代表例である。

4) 興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling)

筋膜 (sarcolemma)に発生した活動電位は、横行小管系 (transverse tubular system: T-system) を伝搬し、それが筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) に伝わると、SRに貯蔵されていた Ca²⁺ が筋漿中に放出される。この Ca²⁺ が収縮蛋白質トロポニン C と結合することにより、ミオシンの架け橋 (cross bridge) とアクチンフィラメントが結合することにより筋線維は短縮する (滑り説: sliding theory)。

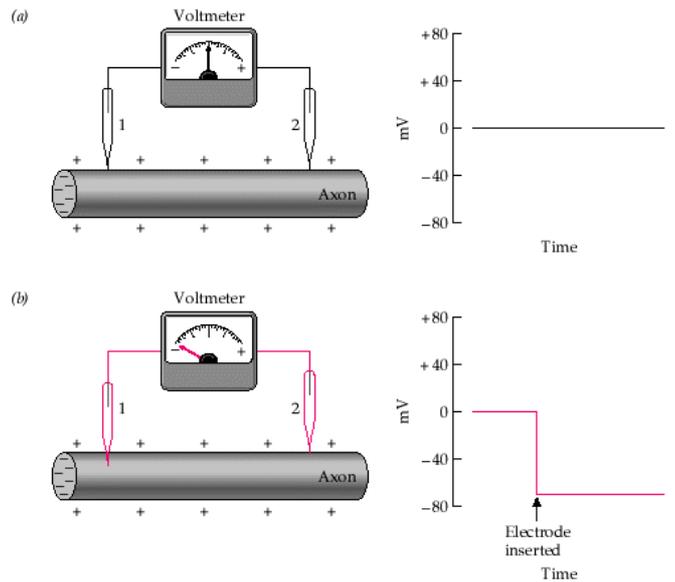




c. 実習の手技

1) 膜電位の測定は、マイクロマニピュレーターを用いて筋細胞内に電極（探査電極）を刺入し、細胞外（外液中）にもう一本の電極（不関電極）を置き、それらの電極により細胞内外の電位を導出することにより二つの電極間の電位差が計測されることによって行われる（細胞内記録: intracellular recording)。細胞膜を損傷することなく細胞内に刺入できる微小探査電極として、縦引き電極プラーによって先端の口径を $1\ \mu\text{m}$ 以下にしたガラス毛细管が用いられる。このガラス毛细管には、通常 3M-KCl の電解質溶液が充填される。

本実習では、種々の細胞外 K^+ 濃度に対する静止（膜）電位を測定し、静止（膜）電位が K^+ の平衡電位に近いことを実験的に確かめる。



Intracellular Recording from a Squid Axon



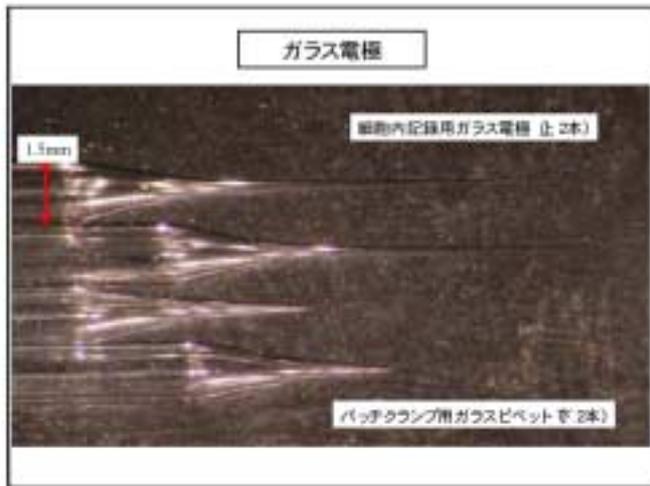
ME-7

This micromanipulator can be mounted either on a stereotaxic instrument, or independently. It has fine adjustment in three dimensions, and the vertical fine adjustment knob is a large-sized drum to facilitate manipulation. Moreover, since the vertical fine adjustment drive is mounted on an arch, the angle can be freely changed to positions which are not possible with other electrode carriers which are mounted on AP frame bars.

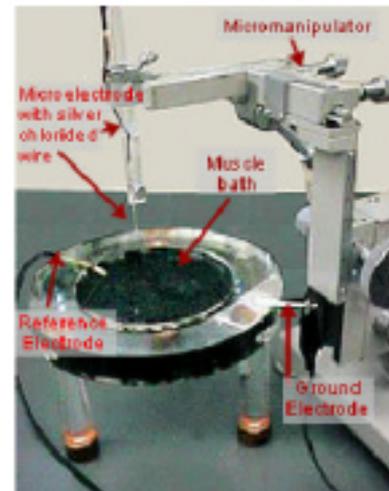


PE-2

Designed for pulling glass capillaries into microelectrodes to be used for recording electric potential of the cells in the biological experiment. This full automatic and vertical pulling type puller is suitable for pulling thick glass capillaries (2mm-4mm) and capable of producing long yet relatively sturdy microelectrodes to be used for experiments in the central nervous system.



Select a glass microelectrode and place it in the holder of the micromanipulator provided. Insert an Ag/AgCl wire into the electrode. Also, place an Ag/AgCl bath electrode directly into the Ringer's solution, connect both electrodes to the amplifier.

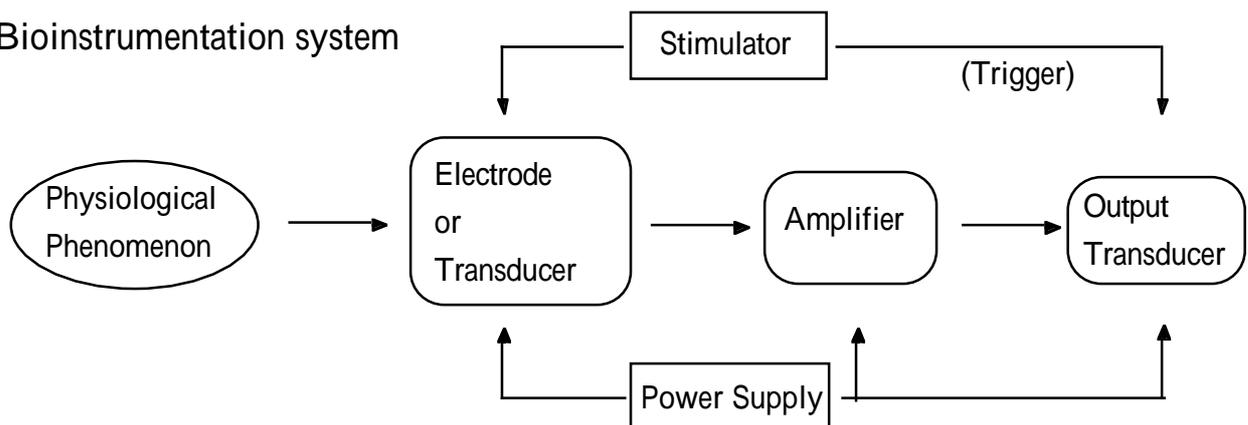


2) 準備と器具

蛙、蛙神経筋標本作成用手術用具一式、アクリル製標本箱、蛙神経筋標本、標本固定用ピン、各種 K^+ 濃度溶液、縦引き電極プラー (講座に設置)、ガラス微小電極用ガラス管、ガラス微小電極保持用クリップ、電極充填用溶液 (3M-KCl) と充填用注射器、マイクロマニピュレータ、

記録用銀線と微小電極用前置増幅器 (差動増幅器: 信号入力端子が2組あり、出力側には両入力電圧の差を増幅した電圧が得られる)、メモリオシロスコープ (VC-10 or -11)、トレシング・ペーパー (観察記録用方眼紙)、刺激装置 (SEN-3201 or 3301)、アイソレーター、刺激用電極、各種接続コード、平均値と標準偏差及び対数計算機能付計算機 (各自持参すること)。

Bioinstrumentation system



3) 種々の K^+ 濃度を含む溶液 (細胞外溶液) (単位: mM)

	KCl	NaCl	CaCl ₂	Tris buffer
1.0mM-KCl	1.0	116.5	1.8	3.0
正常Ringer液	2.5	115.0	1.8	3.0
5.0mM-KCl	5.0	112.5	1.8	3.0
10.0mM-KCl	10.0	107.5	1.8	3.0
50.0mM-KCl	50.0	67.5	1.8	3.0

cf. 溶液は、すべて5倍の濃縮液と

して作成してあるので、蒸留水を使って必要分だけ希釈して使用すること。

4) 較正電圧

予め、Calibrator (較正電圧発生装置) から較正電圧 (既知の電圧) を導出し、その電圧を DC 増幅器 (直流増幅器) を介してオシロスコープ上に描出する。そうすると較正電圧の入力された分だけオシロスコープのビームが変動する。この操作 (較正: calibration) によって、実験中基線からのビームの変動がどれくらいの電圧変動に対応するかがわかるようになる。本実験では、既に較正しているので改めて行う必要はないが、すべての計測機器に於いてこのような操作は必要であることを心に留めておく。

d. 実験項目

1) 次の順序に従って静止 (膜) 電位を測定し、さらに活動電位を観察、記録する。

摘出した縫工筋標本 (神経筋標本) を筋の内側 (筋上膜の付着していない方) を上にして、アクリル標本箱に移し、軽く伸張した状態 (生体長の約 130%) でピンで固定し、1.0 mM-KCl 溶液をアクリル標本箱に筋が浸るまで注ぎ、約 10 分間静置して溶液が浸透し膜電位が安定するのを待つ。この間に刺激電極を縫工筋筋枝神経に、ガラス微小電極をマイクロマニピュレータにセットし、電気刺激及び記録できる状態にしておく。次に電気刺激の量を徐々に上げていき、それによって収縮する筋線維の数が増えていく事 (spacial summation, recruitment) を肉眼により観察する。ある程度の刺激量になると数の増加は見られなくなるが、このときの刺激を最大刺激と呼ぶ。以下に述べる活動電位の観察・記録には、最大上刺激を用いる。実験中、標本は特に縫工筋筋枝神経は損傷されやすいので無理な力がかからないよう最善の注意を払う事。

静止 (膜) 電位を測定する際は、マイクロマニピュレータの粗動ダイヤルを使わずガラス微小電極 (探査電極) を外液中に置く。そして外液中の不関電極との間に電位差 (接触電位差) があれば補償回路でこれらを等電位とする (微小電極用増幅器のデジタルメータをゼロに合わせる)。そしてオシロスコープのビーム (DC 増幅器による DC 記録 and/or AC 増幅器による AC 記録) を基線に合わせる。次に、マイクロマニピュレータの微動ダイヤルを少しずつ回しながらガラス微小電極 (探査電極) の先端を細胞内に刺入する。ガラス微小電極 (探査電極) が筋細胞内に刺入されれば、微小電極用増幅器のデジタルメータにその電位が表示され、同時にオシロスコープの DC 記録上で細胞内電位に見合ったビームの基線からのずれが生じる。AC 記録の場合は、膜電位が安定すると基線にもどる。

5 個以上の異なった筋細胞の静止 (膜) 電位を測定し、その平均値と標準偏差を求める。

Cf. AC 増幅器は別名 CR 増幅器と呼ばれ、変化分を増幅する装置である。増幅する現象の周波数にあわせてこの増幅器は設定されなければならないが、それを決定するのは、低域通過フィルタ (low pass filter: 別名 high cut filter: f_{hc}) と高域通過フィルタ (high pass filter: low cut filter: f_{lc}) である。前者は、遮断周波数 f_{hc} を境にそれよりも低い周波数を通過させ、それよりも高い周波数を遮断する特性をもつフィルタを意味している。後者は其の逆である。低域遮断周波数 (f_{lc}) を決める用語として増幅器の時定数が用いられるが、一般に経過の遅い現象を増幅する場合は時定数を大きくし、早い現象の場合は時定数を小さくする。

2) 5 個以上の筋細胞から静止 (膜) 電位を計測した後、微小電極が筋細胞内に刺入された状態で筋枝神経を最大上刺激で単一刺激して、誘発される筋細胞の活動電位を観察する。そして、メモリオシロスコープ上の DC and/or AC 記録をトレーシング・ペーパーにスケッチし、それを班内でコピーし、レポートに添付する。スケッチに於ける注意点として、トレーシング・ペーパーの縦・横のスケール幅がどれだけの量に対応しているのか (gain & sweep velocity of oscilloscope)、外液 K^+ 濃度、刺

激条件を記載しておく事。スケッチ終了後は、注意深く縫工筋筋枝神経を刺激電極から外し、外液に浸す（スケッチ終了前に装置をさわるとメモリオシロスコープ上のビームが消える事があるので注意する）。そして、現外液を破棄し、次の外液と交換する。

通常、筋活動電位による筋収縮により、ガラス微小電極の先端は折れてしまうので、新しいガラス微小電極を用いる方が賢明である。

Cf. 等尺性収縮により張力を同時に測定したと仮定すると、筋収縮に先行して活動電位がみられるはずである（興奮－収縮連関）。

3) 外液の K^+ 濃度を正常 Ringer 液、5.0 mM、10.0 mM、50.0 mM の順に取り替え、1)、2) をくり返す（最大刺激設定等は省略する）。各外液交換後は膜電位の安定化のため、最低 10 分待つ。

4) 外液の K^+ 濃度と膜電位の関係を片対数表に表示する。そして、Nernst の式から得られた結果と比較する。また、外液の K^+ 濃度と活動電位の関係も比較・考察する。

【設問】

問 1

実験結果、Nernst の式、Goldman-Hodgkin-Katz の式、膜の等価回路の意味をふまえて、静止（膜）電位のメカニズムについて論ぜよ。

問 2

活動電位の発生および伝播の機構、特徴について論ぜよ。

問 3

神経筋接合部シナプスにおける伝達物質の放出について論ぜよ。

問 4

シナプス電位の発生および伝播の機構につき、活動電位との対比により論ぜよ。

問 5

Na^+ チャンネルの電位依存的な開閉の分子機構およびアセチルコリン受容体チャンネルの分子構造について論じ、本実験結果を考察せよ。

問 6

筋肉の正常な収縮、弛緩機構について論ぜよ。またその異常について列挙・説明し、本実験で見られた現象を説明せよ。

(other key words)

Contraction & contracture

K contracture

Caffeine contracture

Injury current

Rigor mortis

