

(原 著)

塩素感受性蛍光色素SPQによる
ラット耳下腺細胞内Cl⁻濃度の判定

谷村 明彦, 東城 庸介, 松本 仁人

北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

(主任: 松本 仁人教授)

Determination of intracellular free chloride
concentrations in rat parotid acinar cells using the
chloride-sensitive fluorescent indicator SPQ

Akihiko TANIMURA, Yosuke TOJYO and Yoshito MATSUMOTO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Yoshito MATSUMOTO)

Abstract

Intracellular free chloride concentrations ($[Cl^-]_i$) in rat parotid acinar cells were determined with the Cl⁻ sensitive fluorescent indicator SPQ. The $[Cl^-]_i$ was calculated from the SPQ fluorescence based on Englom's method. The resulting level of $[Cl^-]_i$ of the rat parotid acinar cells was estimated to be 73.4 ± 1.9 mM (mean \pm S.E., $n=31$). Stimulation with 10μ M carbachol, a muscarinic agonist, decreased the $[Cl^-]_i$ to 50.1 ± 3.1 mM ($n=12$). The ED_{50} of carbachol necessary to change the $[Cl^-]_i$ was 1.0μ M. A similar decrease in $[Cl^-]_i$ was elicited with 10 nM of substance P or 10μ M of phenylephrine, an α -adrenergic agonist. When the intracellular Ca^{2+} stores were previously depleted, no agonist-induced decrease in $[Cl^-]_i$ was observed, suggesting that the decrease in $[Cl^-]_i$ is induced by the increase in cytosolic Ca^{2+} concentration. No detectable change in $[Cl^-]_i$ was observed when cells were stimulated with 1μ M isoproterenol, a β -adrenergic agonist which induces the production of cyclic AMP. This suggests that the $[Cl^-]_i$ in rat parotid acinar cells is not regulated by the cyclic AMP pathway.

Key words: Parotid cell, SPQ, Intracellular chloride, Fluid secretion

受付: 平成9年10月15日

緒 言

耳下腺腺房細胞における水分分泌はムスカリン受容体, α アドレナリン受容体, サブスタンスP受容体などのCa²⁺動員性受容体を介して惹起され, アミラーゼの分泌はcAMPの生成と連関する β アドレナリン受容体を介して起こる¹⁾。

水分分泌には形質膜を介するNa⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, H⁺などのイオン輸送が重要である。特に灌流液からCl⁻を除去すると, 耳下腺の水分分泌が著しく抑制される事から, Cl⁻が重要な働きをしていると考えられている²⁻⁴⁾。Cl⁻は耳下腺腺房細胞の基底側から細胞内に取り込まれ, 管腔側のCl⁻チャンネルを介して管腔内に放出される。このCl⁻の放出により生じる負の電位的勾配と浸透圧勾配により, 管腔内にNa⁺と水が流入し原唾液が生成されることが考えられている。この考えはイオン輸送系の阻害剤を用いた灌流実験や, 原唾液のイオン組成を調べた研究結果から広く支持されている⁵⁾。また最近では, ムスカリン受容体刺激によって耳下腺細胞のCl⁻チャンネルが開閉し, 細胞外にCl⁻イオンが放出される事が細胞レベルでも確かめられている^{2,6)}。しかし, 水分分泌の刺激によって細胞内Cl⁻イオン濃度([Cl⁻]_i)がどのように変化するのか正確にはわかっていない。

近年, イオン感受性蛍光色素を生きた細胞に取り込ませる事によって, 細胞内のイオン濃度の変化をリアルタイムで測定する事が可能になってきた。6-Methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ)は塩素イオンと特異的に結合し, 塩素との結合により蛍光強度が減弱する蛍光色素である⁷⁾。本研究では, この色素を用いて耳下腺浮遊細胞の[Cl⁻]_iの測定を試みた。さらに, 耳下腺腺房細胞の水分分泌におけるCl⁻イオンの動きを明らかにするため, 受容体刺激による[Cl⁻]_iの変化を定量的に解析した。

材料と方法

ラット耳下腺細胞浮遊液の調整

Wistar系雄ラット(8-12週令, 200-300g)をエーテル麻酔し, 心嚢瀉血により屠殺の後, ただちに耳下腺を摘出した, 耳下腺を細切し, トリプシンとコラゲナーゼ処理により耳下腺腺房細胞を分離した⁸⁾。調製した耳下腺腺房細胞は0.2%のアルブミンを含むハンクスーヘペス液(HBSS-H)中に分散させ, 10mMのSPQ(同人化学研究所, 熊本)を加え37°Cで60分間インキュベートしSPQを細胞内に取り込ませた。その後, HBSS-Hで耳下腺腺房細胞を洗浄して細胞外のSPQを除去した後, 細胞浮遊液を実験に用いた。

蛍光測光

SPQを取り込ませた耳下腺腺房細胞を37°Cに保温されたキュベット中で連続攪拌し, 340nmの励起波長によって発する460nmの蛍光強度をHitach F2000蛍光光度計(日立)を用いて測定した。検量線を作製するためにSPQを取り込ませた細胞を10 μ Mナイジェリシン(K⁺/H⁺イオノフォア)と10 μ Mトリブチルチン(Cl⁻/OH⁻イオノフォア)処理し, Cl⁻透過性細胞を作製した。[Cl⁻]_iを30, 60, 90, 120, 150mMと変化させ蛍光強度(F)を測定した(Fig. 1a)。その後, 0.1%のTriton X-100により細胞を可溶化し, さらに150mMKSCNを加えてイオン結合型SPQの蛍光(F_{min})を測定した。これらの値からEngblomらの方法⁹⁾に基づいて検量線を作製した(Fig. 1b)。

実験はSPQを取り込ませた耳下腺腺房細胞をHBSS-Hに浮遊させ, この細胞浮遊液(2ml)に刺激薬(10 μ l)を添加し, 刺激に伴う蛍光強度の変化を0.5秒間隔で測定した。[Cl⁻]_iを算出するために, 実験の最後にTriton-X100(0.1%)処理により細胞を可溶化して溶液中([Cl⁻]_i=150mM)のSPQ蛍光を測定し, 次に150mMのカ

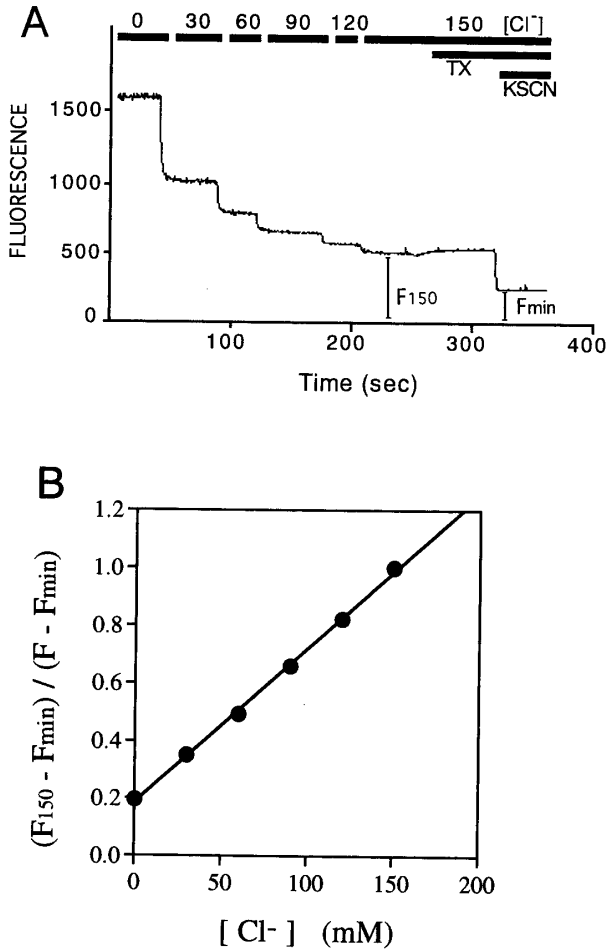


Fig. 1 A: SPQ fluorescence at different $[Cl^-]_i$. SPQ-loaded rat parotid acinar cells were suspended in the calibration medium (150mM K-gluconate, 1.8mM Ca-gluconate, 20mM Hepes, pH 7.4), and treated with nigericin and tributyltin. The SPQ fluorescence of these Cl^- -permeable cells was monitored at different Cl^- concentrations (as indicated in the figure). Cells were then solubilized by 0.1% Triton x-100 (TX), and exposed to 150mM KSCN to measure the minimum SPQ fluorescence (F_{min}). B: Relationship between SPQ fluorescence and $[Cl^-]_i$. SPQ fluorescence in 150mM Cl^- ($F_{150} - F_{min}$) divided by the fluorescence in various concentrations of Cl^- ($F - F_{min}$) is plotted against $[Cl^-]_i$.

リウム・チオシアネートを添加しSPQの最小蛍光を求めた。これらの値と検量線から得られた消光係数からEngblomらの方法⁹⁾に基づいて耳下腺細胞の $[Cl^-]_i$ を算出した。

試薬類

カルバコール, サブスタンスP, イソプロテレンオール, アトロピン, ナイジェリシン, トリブチルチン, コラゲナーゼ, トリプシン, トリプシン阻害剤はSigma社製 (St. Louis, Mo, USA) を用いた。フェニレフリンは日本チバガイギー (兵庫) から入手した。

結 果

SPQを取り込ませたラット耳下腺細胞をムスカリン受容体刺激薬, カルバコールで刺激した時の $[Cl^-]_i$ の変化を調べた。Fig. 2 a-fは0.1-100 μ Mのカルバコール刺激による耳下腺細胞内のSPQの蛍光強度の変化である。0.3 μ M以上のカルバコールにより一過性の蛍光強度の増加が認められ, その変化は10 μ Mではほぼ最大となった。SPQの蛍光強度から $[Cl^-]_i$ を算出すると無刺激時の $[Cl^-]_i$ は 73.4 ± 1.9 mM (Mean \pm S E, n = 31) であった。10 μ Mのカルバコールで刺激した時の $[Cl^-]_i$ は 50.1 ± 3.1 mM (n = 12) であった。カルバコール濃度と刺激後の $[Cl^-]_i$ をFig.3に示す。カルバコール濃度の増大にともなって $[Cl^-]_i$ の低下は大きくなり, 10 μ Mのカルバコールによりほぼ最大の反応が認められた。 $[Cl^-]_i$ の変化におけるカルバコールの ED_{50} 値は1.0 μ Mであった。

カルバコールと同様に細胞内Ca²⁺濃度の上昇を起こす α 受容体作動薬, フェニレフリンやタキキニン受容体作動薬, サブスタンスP刺激は一過性に $[Cl^-]_i$ を低下させた。10 μ Mのフェニレフリンおよび10nMのサブスタンスP刺激により, $[Cl^-]_i$ はそれぞれ 14.5 ± 0.6 mM (n = 3) および 23.9 ± 5.5 mM (n = 4) 低下した。これらの $[Cl^-]_i$ の変化が細胞内Ca²⁺濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇と関連した反応である事を示すため, 細胞外Ca²⁺の存在下と非存在下での反応の違いを調べた。溶液中にCa²⁺が存在する時, 細胞をカルバコール (10 μ M) で刺激しアトロピンでム

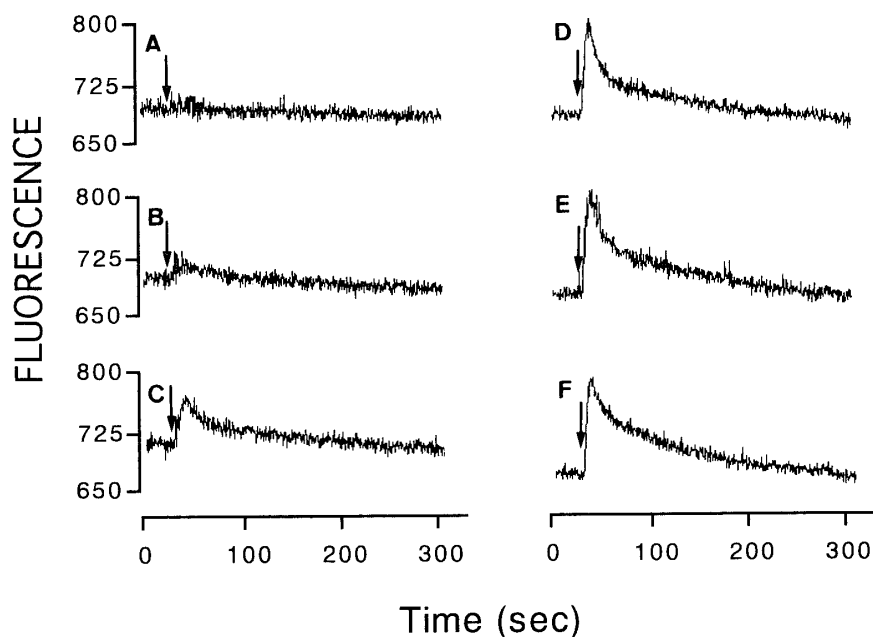


Fig. 2 Effect of carbachol (CCh) on SPQ fluorescence. SPQ-loaded rat parotid acinar cells were stimulated with different concentrations of CCh (arrows). A: $0.1\mu\text{M}$, B: $0.3\mu\text{M}$, C: $1\mu\text{M}$, D: $3\mu\text{M}$, E: $10\mu\text{M}$, F: $100\mu\text{M}$.

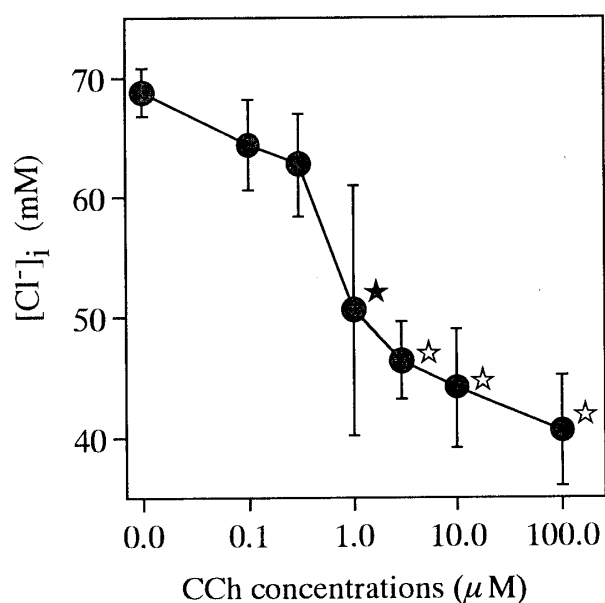


Fig. 3 Changes in $[\text{Cl}^-]_i$ with CCh-stimulation. $[\text{Cl}^-]_i$ at the peak of the SPQ fluorescence after CCh-stimulation. Mean \pm S. E. ($n=3$), ★: $P < 0.05$. ☆: $P < 0.01$ (Bonferroni-test).

スカリン受容体を遮断した後、サブスタンス P (Fig. 4) あるいはフェニレフリン (Fig. 5 a) で刺激したところ再び $[\text{Cl}^-]_i$ の低下が観察された。EGTAを含む Ca^{2+} -free 溶液中では、カルバ

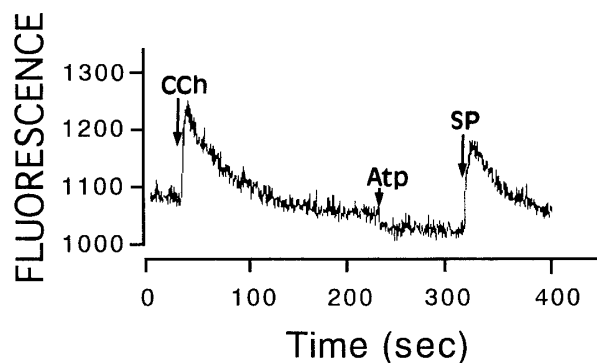


Fig. 4 Changes in SPQ fluorescence with CCh and substance P stimulation. SPQ-loaded rat parotid acinar cells were stimulated with $10\mu\text{M}$ CCh in HBSS-H, and then blocked by atropine (Atr). Subsequently, cells were stimulated with $10\mu\text{M}$ substance P.

コール刺激による $[\text{Cl}^-]_i$ の低下が起こったが、その後のフェニレフリン刺激による $[\text{Cl}^-]_i$ の低下は起こらなかった (Fig. 5b)。

β -アドレナリン受容体刺激は耳下腺線房細胞の細胞内CAMPレベルを上昇させるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対しては効果がない⁸⁾。そこで、 β -アドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレ

ノールが $[Cl^-]_i$ の低下を起こすか否か調べた。
 Fig.6に示すように、1 μ Mのイソプロテレノールは $[Cl^-]_i$ に対し影響を与えなかった。

考 察

本研究では分泌刺激によるラット耳下腺細胞の $[Cl^-]_i$ の変化を蛍光色素を用いて定量的な解析を行った。その結果、無刺激時の耳下腺細胞の $[Cl^-]_i$ は約73mMで、カルバコール刺激により約50mMまで低下する事が示された。唾液腺細胞の $[Cl^-]_i$ の測定は微小電極や放射性同位元素を用いた方法でも試みられている。Nauntoftらのグループは ^{36}Cl と 3H_2O を用いて細胞内のClと水の含量の変化を測定し、無刺激時のラット耳下腺細胞の $[Cl^-]_i$ は60-75mMであると推定している^{2,10}。また、Lau and Case¹¹はCl⁻電極を使ってアセチルコリン刺激(10 μ M)により $[Cl^-]_i$ が約42mMから34mMまで低下する事を報告している。今回用いた蛍光色素による $[Cl^-]_i$ 測定法は微小電極法に比べ簡便で、しかも $[Cl^-]_i$ の変化をリアルタイムで測定できるという点から様々な細胞での利用が期待される。

$[Cl^-]_i$ は細胞の種類によって大きく異なる。神経細胞などの $[Cl^-]_i$ は一般的に低く10mM程度である^{9,12}。それに対し、気道上皮細胞¹³、鼻上皮細胞¹⁴、顎下腺導管細胞¹⁵、密集班(腎)細胞¹⁶、耳下腺腺房細胞¹⁷など水の分泌や吸収に関係する細胞の $[Cl^-]_i$ は比較的高い(40-60mM)。水の移動には細胞外へのCl⁻の放出が必要である事から、水分分泌や吸収を行う細胞では $[Cl^-]_i$ が比較的高く保たれているのではないかと考えられる¹⁸。

$[Cl^-]$ の低下と細胞内情報伝達物質

細胞内Ca²⁺濃度の上昇を起こす受容体アゴニストであるカルバコール、サブスタンスP、フェニレフリンはいずれも $[Cl^-]_i$ の低下を起こした。またアゴニスト刺激による $[Cl^-]_i$ の低下はCa²⁺ストアを枯渇させると起こらなくなった。これらの結果は、 $[Cl^-]_i$ の低下は細胞内Ca²⁺濃度の上昇に依存している事を支持する。Arreolaらは耳下腺腺房細胞にはCl⁻の透過性

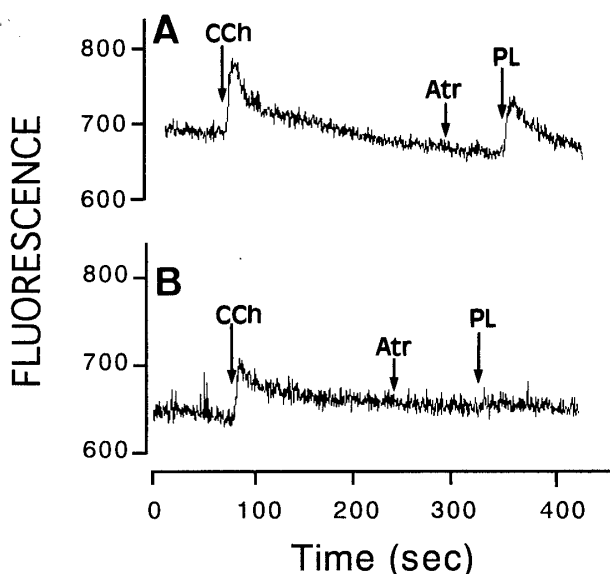


Fig. 5 Changes in SPQ fluorescence with CCh and substance P stimulation. A: SPQ-loaded rat parotid acinar cells were stimulated with 10 μ M CCh in HBSS-H, and then blocked by atropine (Atr). Subsequently, the cells were stimulated with 10 μ M phenylephrine (PL). B: A similar experiment was carried out in the Ca²⁺-free HBSS-H.

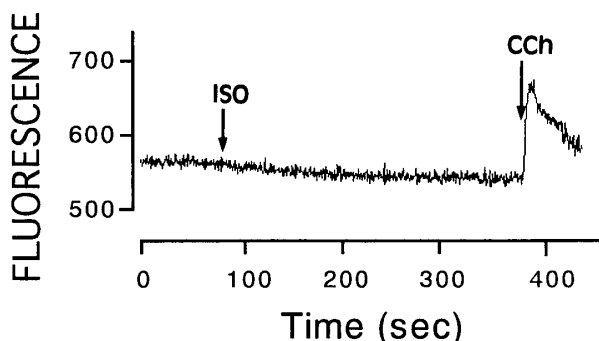


Fig. 6 Changes in SPQ fluorescence with isoproterenol and CCh stimulation. SPQ-loaded rat parotid acinar cells were stimulated with 1 μ M isoproterenol (ISO) in HBSS-H, and then with 10 μ M CCh.

の異なる3種類のCa²⁺依存性Cl⁻チャンネルが存在することを報告している¹⁹⁾。水分泌の過程では、Cl⁻が管腔側に放出される事による負の電氣的勾配によりNa⁺が管腔側へ移動し、その浸透圧勾配により管腔側へ水が分泌されると考えられている^{2,3)}。従って、Cl⁻を放出するCl⁻チャンネルは管腔側に局在すると考えられているが、それを証明する直接的な証拠は未だに得られていない。

角膜上皮、汗腺細胞、気管支の分泌細胞、結腸由来の培養細胞 (T84cell, HT29 cell) などではcAMPによって開口するCl⁻チャンネルが存在する事が知られている¹⁸⁾。一方、耳下腺細胞ではcAMPの著しい上昇を引き起こすISO刺激 (1 μM) でも [Cl⁻]_iは変化しなかった事から、cAMP依存性のCl⁻チャンネルは耳下腺細胞には存在しないと考えられる。

Cl⁻取り込み機構

カルバコール、サブスタンスPおよびフェニレフリンによる [Cl⁻]_iの低下は一過性で時間とともにもとのレベルまで回復した。すなわち、放出されたCl⁻は何らかの取り込み機構で細胞内に再吸収されたと考えられる。ラット耳下腺腺房細胞におけるCl⁻の取り込み機構としてNa⁺/K⁺/2 Cl⁻共輸送体と、Cl⁻/HCO₃⁻交換体が考えられる^{2,3)}。この実験ではHCO₃⁻を含まない溶液を用いているためCl⁻/HCO₃⁻交換体は機能していないはずである。従ってこの実験では、Cl⁻は主にNa⁺/K⁺/2 Cl⁻共輸送体によって取り込まれたと考えられる。ラット耳下腺細胞のNa⁺/K⁺/2 Cl⁻共輸送体はcAMPによるリン酸化によってその機能が亢進する事が報告されている^{20,21)}。Na⁺/K⁺/2 Cl⁻共輸送体の機能亢進は [Cl⁻]_iの上昇を起こす事が予想されたが、本研究ではイソプロテレノール刺激による [Cl⁻]_i変化は見られなかった (Fig.6)。Na⁺/K⁺/2 Cl⁻共輸送体はCl⁻をNa⁺やK⁺と共に取り込み細胞内の浸透圧を上昇させると考

えられる³⁾。この浸透圧の変化により細胞内への水が取り込まれて容積が増大し、結果的にイオン濃度は変化しなかったのではないかと考えられる。今後これらの事を明らかにするために、刺激による細胞内イオン濃度と細胞の容積変化を含めて検討を行う事が必要と考えられる。

結 論

Cl⁻感受性蛍光色素SPQを用いてラット耳下腺腺房細胞の細胞内Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) を定量的に解析した。

1) ラット耳下腺細胞の [Cl⁻]_iは73.4±1.9mMで、10 μMのカルバコール刺激により50.1±3.1mM (n=12) まで低下した。

この [Cl⁻]_iを起こすカルバコールのED₅₀値は1.0 μMであった。

2) サブスタンスP (10nM) やフェニレフリン (10 μM) 刺激はカルバコール刺激と同様に [Cl⁻]_iを低下させた。

3) カルバコール刺激による [Cl⁻]_iの低下はCa²⁺-free液中でも観察されたが、一度Ca²⁺-free液中で刺激してCa²⁺ストアを枯渇させると次の刺激では [Cl⁻]_iの低下は起こらなかった。

4) cAMP生成と関連するイソプロテレノール (1 μM) 刺激は [Cl⁻]_iを変化させなかった。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No.04771460) により行われた。

文 献

1. Baum, B. J.; Regulation of salivary secretion, L. M. Steebny (ed): The salivary system, 123-134, CRC Press, Boca Raton, 1987.
2. Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells, Am. J. Physiol., 263: G823-G837, 1992.
3. Turner, R. J.: Ion transport related to fluid

- secretion in salivary glands, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 694 : 24-35, 1993.
4. 東城庸介, 谷村明彦: 唾液腺, *生体の科学*, 47 : 359-362, 1996.
 5. Young, J. A., Cook, D. I., van Lennep, E. W., Roberts, M.; Secretion by the major salivary glands, L. R. Johnson (ed): *Physiology of the gastrointestinal tract*, 773-815, Raven Press, New York, 1987.
 6. Petersen, O. H.: Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells, *J. Physiol.*, 448 : 1-51, 1992.
 7. Verkman, A. S.: Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators, *Am. J. Physiol.*, 259 : C375-C388, 1990.
 8. Tanimura, A. Matsumoto, Y. and Tojyo, Y.: Evidence that isoproterenol-induced Ca^{2+} -mobilization in rat parotid acinar cells is not mediated by activation of β -adrenoceptors, *Biochem. Biophys. Acta*, 1055 : 273-277, 1990.
 9. Engblom, A. C. and Akerman, K. E.: Determination of the intracellular free chloride concentration in rat brain synaptoneuroosomes using a chloride-sensitive fluorescent indicator, *Biochim Biophys Acta*, 1153 : 262-266, 1993.
 10. Nauntote, B. and Poulsen, J. H.: Effects of Ca^{2+} and furosemide on Cl^{-} transport and O_2 uptake in rat parotid acini, *Am. J. Physiol.*, 251 : C175-C185, 1986.
 11. Lau, K. R. and Case, R. M.: Evidence for apical chloride channels in rabbit mandibular salivary glands; A chloride-selective microelectrode study, *Pflugers Arch*, 411 : 670-675, 1988.
 12. Inoue, M., Hara, M., Zeng, X.-T., Hirose, T., Ohnishi, S., T., Y., Uriu, T., Omori, K., Minato, A. and Inagaki, C.: An ATP-driven Cl^{-} pump regulated Cl^{-} concentrations in rat hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.*, 134 : 75-78, 1991.
 13. Verkman, A. S., Chao, A. C. and Hartmann, T.: Hormonal regulation of Cl^{-} transport in polar airway epithelia measured by a fluorescent indicator, *Am. J. Physiol.*, 31 : C23-C31, 1992.
 14. Huang, S. J., Chan, H. C. and Wong, P. Y.: Adrenaline-regulated Cl^{-} transport in cultured single rat epididymal cells measured by an entrapped Cl^{-} -sensitive fluorophore, *J Physiol Lond*, 474 : 183-191, 1994.
 15. Lau, K. R., Evans, R. L. and Case, R. M.: Intracellular Cl^{-} concentration in striated intralobular ducts from rabbit mandibular salivary glands, *Pflugers Arch*, 427 : 24-32, 1994.
 16. Salomonsson, M., Gonzalez, E., Kornfeld, M. and Persson, A. E.: The cytosolic chloride concentration in macula densa and cortical thick ascending limb cells, *Acta Physiol Scand*, 147 : 305-313, 1993.
 17. Foskett, J. K.: $[Ca^{2+}]_i$ modulation of Cl^{-} content controls cell volume in single salivary acinar cells during fluid secretion, *Am J Physiol*, 259 : C998-1004, 1990.
 18. Gogelein, H.: Chloride channels in epithelia, *Biochim. Biophys. Acta*, 947 : 521-547, 1989.
 19. Arreola, J., Park, K., Melvin, J. E. and Begenisich, T.: Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells, *J Physiol Lond*, 490 : 351-362, 1996.
 20. Paulais, M. and Turner, R. J.: Beta-adrenergic upregulation of the $Na^{+}-K^{+}-2Cl^{-}$ cotransporter in rat parotid acinar cells, *J Clin Invest*, 89 : 1142-1147, 1992.
 21. Tanimura, A., Kurihara, K., Reshkin, S. J. and Turner, R. J.: Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid $Na^{+}-K^{+}-2Cl^{-}$ cotransporter, *J. Biol. Chem.*, 270 : 25252-25258, 1995.