

〔総説〕

カルシウムシグナルと唾液分泌機能

東城 庸介

北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

Calcium signaling and salivary secretory function

Yosuke Tojyo

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

Abstract

Calcium ion (Ca^{2+}) plays an essential role as a second messenger in secretion of water and electrolytes in salivary glands. Many studies using fluorescent Ca^{2+} indicators such as quin-2 and fura-2 have shown that stimulation of muscarinic, α -adrenergic, or substance P receptors cause a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in salivary gland cells resulting from the production of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP_3). The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response is attributed to Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} store followed by Ca^{2+} entry across the plasma membrane. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is initiated in the apical pole of acinar cells and then rapidly spreads as a Ca^{2+} wave toward the basolateral region. The apical-to-basal pattern of Ca^{2+} signaling is probably important to activate the ion transport systems in salivary glands. In this review, I discuss mechanisms and physiological significance of the polarized Ca^{2+} signaling in salivary gland cells.

キーワード：カルシウムシグナル，唾液腺，唾液分泌，カルシウム蛍光指示薬，イメージング

1. はじめに

体重60kgの人が体内に保持するカルシウム量は約1kgである。その約99.5%がヒドロキシアパタイトとして骨や歯に存在しており，血液や軟組織に含まれるカルシウム量はわずか0.5%に過ぎない。硬組織以外のカルシウムは量的には取るに足りないものであるが，その一部は細胞内外の体液中にイオン化した形 (Ca^{2+}) で存在し，細胞機能を調節するセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。

Ca^{2+} と細胞機能との関わりを初めて記載したのはリンゲル液で有名な英国の生理学者，Sydney Ringer (1835-1910) であろう。Ringerは，カエル摘出心臓を使って収縮実験をしていた時 Ca^{2+} を含まない栄養液中では心臓収縮が止まってしまうことに気づき，心臓収縮に Ca^{2+} が無くてはならないイオンであることを発見した (Ringer, 1883)。Ringerの報告は細胞機能と Ca^{2+} を結びつ

けた最初の発見と考えられているが，この時代は Ca^{2+} がなぜ筋収縮に必要なのかわからず，その後，細胞機能と Ca^{2+} との関係に注目する研究者はほとんどいなかったようである。 Ca^{2+} が筋収縮のセカンドメッセンジャーであることを確立したのは我が国の江橋節郎教授 (当時東京大学医学部薬理) である。江橋教授が提唱した「筋収縮の Ca^{2+} 説」(1960年代) は，その後一大ブームとなる Ca^{2+} シグナル研究の先駆けになったと言えよう。

現在， Ca^{2+} は，筋収縮ばかりでなく，ホルモン分泌，神経伝達物質の放出，細胞運動，細胞分裂，代謝，遺伝子発現，受精など多岐にわたる機能を制御する最も基本的なメッセンジャーであると考えられている。唾液腺における分泌反応も Ca^{2+} によって制御されることはよく知られている。特に，水・イオン分泌では Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして必須の役割を果たしている。本稿では，細胞内 Ca^{2+} シグナルの概要を説明すると共に，唾

受付：平成17年3月31日

唾液腺細胞を使った私たちの研究の一端を紹介する。

2. Ca^{2+} シグナルとは

Ca^{2+} 濃度には細胞の内外で大きな差がある。細胞外の体液中には1～2mMの Ca^{2+} が存在するのに対し、細胞内（細胞質）の Ca^{2+} 濃度は100 nM以下で、実に細胞外の1万分の1以下である。これは細胞膜に存在する Ca^{2+} ポンプによって Ca^{2+} が常に細胞外にくみ出されていること、また、細胞内には Ca^{2+} を取り込んで貯蔵する Ca^{2+} 貯蔵部位が存在することによる。細胞内にある Ca^{2+} 貯蔵庫の実体は小胞体（筋肉組織では筋小胞体）であることが多くの研究によって明らかにされており、おそらく小胞体内腔には細胞外液に近い濃度の Ca^{2+} が貯蔵されていると思われる。細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫は Ca^{2+} ストア（store）あるいは Ca^{2+} プール（pool）と呼ばれ、細胞が刺激を受けるとストアからの Ca^{2+} 放出、さらには細胞外からの Ca^{2+} 流入が起きて、細胞質の Ca^{2+} 濃度は非刺激時の数倍から数十倍に上昇する。この様にして動員された Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして様々な細胞機能を活性化することから、この一連の反応をカルシウムシグナルという（図1）。

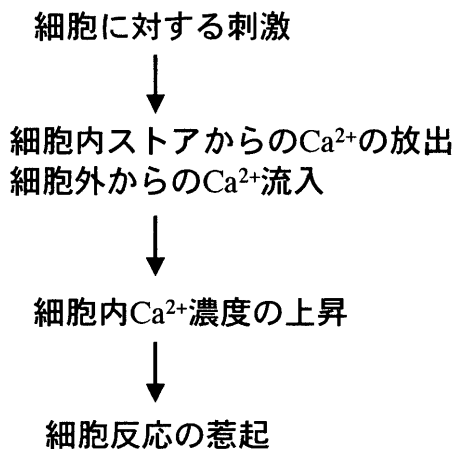


図1 細胞反応と Ca^{2+}

Ca^{2+} 動員のメカニズムについては1970年以降世界的に研究が進められてきた。神経や筋肉などの活動電位を発生する細胞（興奮性細胞）では膜の脱分極が引き金になって、小胞体あるいは筋小胞体から Ca^{2+} が放出される。また細胞膜に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされる。しかし、外分泌腺細胞や肝細胞などの非興奮性細胞における Ca^{2+} 動員のメカニズムについては1980年代までよくわからなかった。1975年、英国のR. H. Michellは、受容体を刺激するとホスホリパーゼCという酵素の働きによって細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質の代謝亢進

が起き、その結果 Ca^{2+} が動員されるという仮説を提唱した（Michell, 1975）。この説には反対する研究者も多く、 Ca^{2+} 動員が先かイノシトールリン脂質代謝が先かといった論争が長く続いたが、1983年、同じ英国の生物学者M. J. Berridgeが、イノシトールリン脂質の分解産物であるイノシトール1, 4, 5-三リン酸（ IP_3 ）が細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を引き起こすことをラットの膵臓腺房細胞を使った研究で見事に証明し（Streb et al., 1983; Berridge and Irvine, 1984）、この論争に終止符が打たれた。現在、イノシトールリン脂質代謝を介する Ca^{2+} 動員のメカニズムはほぼ明らかになっている。すなわち、アゴニストが細胞膜受容体に作用すると、GTP結合タンパク質の一種であるGqタンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化する。その結果、イノシトールリン脂質の代謝亢進が起き、ホスファチジルイノシトール4, 5-二リン酸（ PIP_2 ）の加水分解によって生成された IP_3 が小胞体に作用して Ca^{2+} 動員を引き起こす（図2）。唾液腺細胞でもこのシグナル伝達が分泌機能を制御する中心的な役割を果たしていることは広く認められている。

小胞体（ Ca^{2+} ストア）の膜には IP_3 が結合するイオンチャンネル型受容体が存在する。 IP_3 が受容体に結合するとチャンネルが開き、 Ca^{2+} が小胞体内腔から細胞質へ遊離される。ちなみに IP_3 受容体を発見し、クローニングしたのは現在東京大学医科学研究所におられる御子柴克彦教授である。現在 IP_3 受容体の機能解析や構造解析が活発に行われているが、この分野でも日本人研究者の功績は大きい。 IP_3 受容体の分子構造や調節機構については御子柴教授の最近の総説を参照してほしい（御子柴, 2003）。

3. 細胞内 Ca^{2+} 測定の革命

細胞内（細胞質）の Ca^{2+} 濃度が極めて低い（100 nM以下）ことは既に述べた。読者の中にはnMオーダーの極微量の Ca^{2+} 濃度をいったいどの様にして測定するのだろうかと疑問に思う方もいるに違いない。確かに1980年頃までは細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）を正確に測定することはかなり難しい作業であった。 Ca^{2+} イオン電極やエクオリンという発光タンパク質を使う方法があったが、電極の細胞内挿入や発光タンパク質の細胞内注入にはかなり高度な技術が必要であり、誰でもすぐにはできないものではない。ところが1980年代、Roger Y. Tsienというアメリカの若い研究者（当時大学院生）が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の正確な測定を可能にする画期的な試薬を開発し（Tsien, 1980；

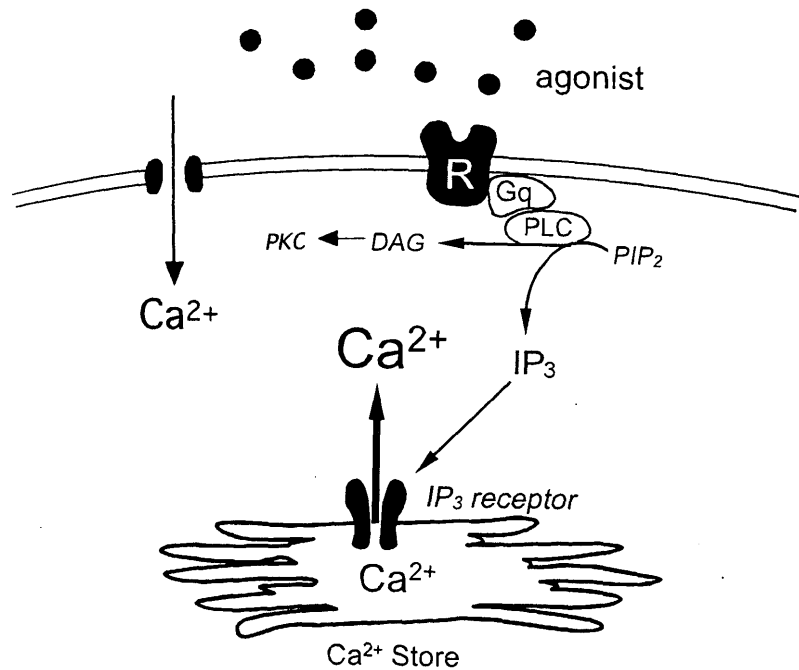


図2 イノシトールリン脂質代謝を介するCa²⁺動員. R, 受容体; Gq, GTP結合タンパク質; PLC, ホスホオリパーゼC; PIP₂, ホスファチジルイノシトール4, 5-二リン酸; IP₃, イノシトール1, 4, 5-三リン酸; DAG, ジアシルグリセロール; PKC, プロテインキナーゼC

Grynkiewicz et al., 1985), Ca²⁺シグナル研究の新時代が始まった. すなわち, Ca²⁺蛍光指示薬quin-2, fura-2の出現である (図3). quin-2は1980年, fura-2は1985年に発表され, あっという間に世界中の細胞シグナルの研究者に受け入れられた. この試薬を使えばだれでも [Ca²⁺]_iを容易に測定することができる. 研究経験の全くない学生でも1週間, いや2, 3日練習すれば測定することが可能であろう. それほど簡単である.

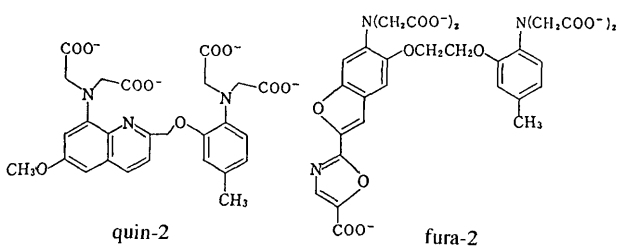


図3 R. Y. Tsienによって開発されたCa²⁺蛍光指示薬の構造

Ca²⁺蛍光指示薬はCa²⁺キレート剤に蛍光発色団を組み込んだ水溶性化合物で, 細胞膜を透過しない. Tsienはこの化合物にアセトキシメチル (AM) 基を付加し, 脂溶性にした. AM基を付けた蛍光指示薬は容易に細胞膜を通過し, 細胞内のエステラーゼで加水分解を受け, freeのquin-2やfura-2になり, 細胞内に貯留する (図4). その細胞に励起光を照射すると細胞は蛍光を発する. これらのCa²⁺蛍光指示薬はnMオーダーのCa²⁺の変化を感知して蛍光強度を変化させるので, その変化を蛍

光光度計で測定することにより [Ca²⁺]_iを算定することができる.

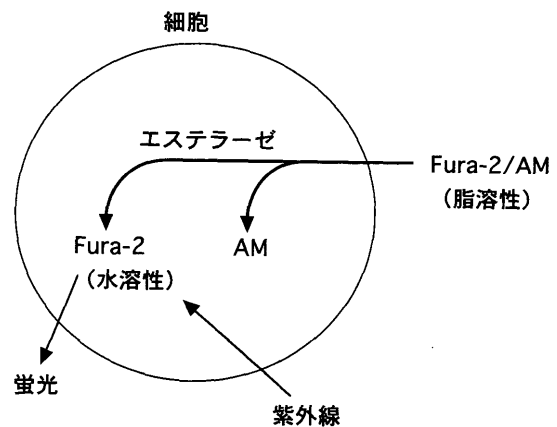


図4 fura-2/AMは細胞内に取り込まれた後, 細胞内エステラーゼによってfura-2になり, 細胞内に貯留する. fura-2を紫外線で励起し, 発生する蛍光の強度をモニターする.

最初が開発されたquin-2の場合, [Ca²⁺]_i測定のためには高濃度 (~1.0mM) を細胞内に入れる必要があり, またCa²⁺結合能が強過ぎるため細胞機能に影響する等の欠点もあり, 現在はほとんど使用されなくなった. 一方, fura-2はquin-2より30倍以上蛍光強度が強く, 低濃度の取り込みで十分な蛍光が得られることから今でもCa²⁺蛍光指示薬として最も頻用されている.

quin-2やfura-2の出現から20年が過ぎ, これらの試薬以外にも様々な特性を持ったCa²⁺蛍光指示薬が開発さ

れ、それぞれの実験目的や測定機器に合わせて使用されている。例えば、mag-fura-2は Ca^{2+} 感受性が低いので、細胞内オルガネラ内の高濃度 Ca^{2+} を測定するのに適している。また、calcium green C_{18} などの膜結合性 Ca^{2+} 蛍光指示薬は、細胞内オルガネラ近傍の Ca^{2+} 変化を測定するために使われている。これまでに開発された Ca^{2+} 蛍光指示薬は優に30種類は下るまい。quin-2を発表した当時まだ20代であったTsien（現在カリフォルニア大学サンジエゴ校教授）はその後も画期的な可視化蛍光プローブを次々に開発し、常にバイオイメージング研究の先頭を走っている。昨年も第9回慶応医学賞を受賞、2000万円の賞金を受けたとの新聞記事を読んだ。生命現象をリアルタイムで可視化することを可能にしたTsienの功績は極めて大きく、ひょっとするとノーベル賞受賞も近いかも知れない。

4. 唾液腺細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

ところで蛍光指示薬を用いて唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を初めて測定したのは誰であろうか。1980年頃、唾液腺細胞を非興奮性細胞のモデル細胞として用いる研究者が多かったため、すでに複数のグループが唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を試みていたようである。その中で、論文として初めて発表した研究者はおそらく札幌医科大学薬理の竹村晴夫博士であろう。竹村博士は、カルバコール（ムスカリン受容体アゴニスト）によって引き起こされ

るラット耳下腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応をquin-2を使って初めて定量的に示した（Takemura, 1985）。この論文は、それまで ^{45}Ca の流入・流出実験から推測するに過ぎなかった Ca^{2+} の動きを直接的な実験的証拠として示したものであり、唾液腺分泌の研究者から高い評価を受けた。竹村論文に続き、 Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いた Ca^{2+} 動態の研究が次々に発表され（Merritt and Rink, 1987a; 1987b; Aub and Putney, 1987; Gray, 1988）、唾液腺細胞における Ca^{2+} シグナルの仕組みが徐々に明らかにされてきた。

私たちの研究室では1988年に日立の分光蛍光光度計（F-2000）を購入し、唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を開始した。F-2000蛍光光度計は蛍光強度を自動的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ （nM）に変換する機能を内蔵しているなど、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を目的に開発された大変使いやすい機種である。ここでラット耳下腺の懸濁細胞（suspension）を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定の手順（図5）と実験結果の一例を紹介する。

ラット耳下腺を眼科用鉗でミンスし、トリプシン、さらにコラゲナーゼを含むハンクス緩衝液でインキュベートする。トリプシン処理の後、必ずトリプシンインヒビターで短時間処理してトリプシン活性を止める必要がある。これが不十分だと細胞のダメージが大きく、きれいな結果が期待できない。最後に組織をナイロンメッシュ（女性用ストッキングで充分）で濾過し、濾液中の細胞を遠心で集め、ハンクス液で2、3回細胞を洗って、6～10 mlの細胞懸濁液を調製する。こうして得た細胞の

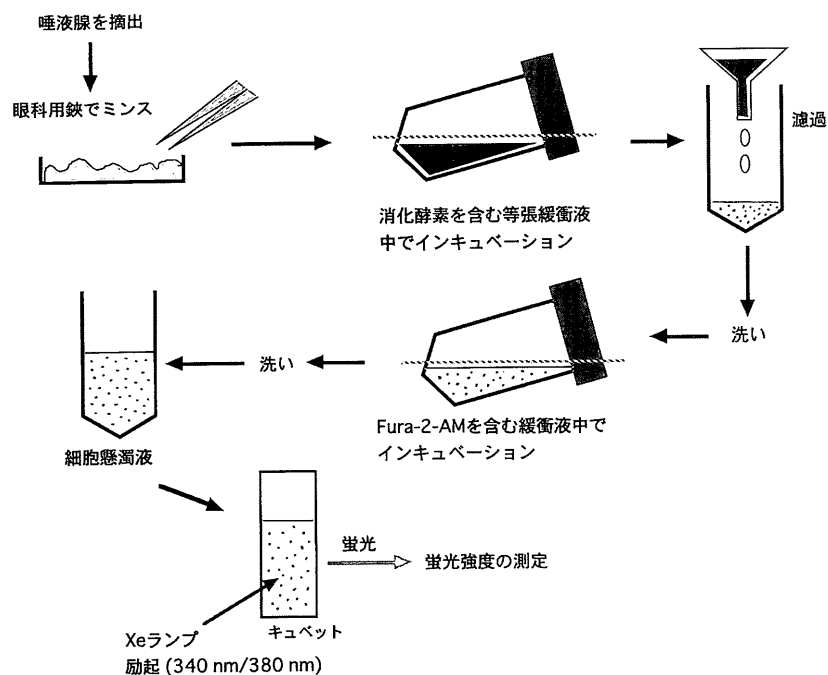


図5 唾液腺の懸濁細胞の調製とfura-2による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

大部分は単一細胞あるいは数個の細胞から成る腺房である。トリプシン処理をせずにコラゲナーゼ処理のみで調製した細胞はぶどうの房状の細胞塊として得られ、分泌実験には適しているが、 Ca^{2+} 測定に使うとノイズが大きく、きれいなデータは得られない。調製した細胞を2 μM fura-2/AMを含む緩衝液中で30分から1時間インキュベートし、fura-2を細胞内に取り込ませる。fura-2を含まない緩衝液で細胞を洗い、細胞外のfura-2/AMを除いた後、細胞懸濁液を石英セルに移し、スターラーで細胞を攪拌しながら蛍光強度を計測する。fura-2を取り込んだ細胞に340 nmの励起光をあてると Ca^{2+} 濃度の上昇により細胞が発する蛍光強度が上昇する。一方、380 nmの励起光をあてると蛍光強度は Ca^{2+} 濃度の上昇により低下する。この性質を利用し、340 nmと380 nmの励起光を0.5秒間隔で交互に照射し、蛍光強度の比(340 nm/380 nm)から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を算出する。

図6はラット耳下腺腺房細胞のムスカリン受容体をカルバコールで刺激した時の蛍光強度の変化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化である。340 nmの励起光による蛍光強度は上昇し、380 nmの励起光による蛍光強度は低下する。この値をGrynkiewicz et al. (1985)の式に入れて計算すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時変化に変換することができる。図7に示すように、カルバコールによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は刺激直後に見られる大きなピークとその後の持続的上昇の2相性からなる。アトロピン(ムスカリン受容体アンタゴニスト)を前もって添加すると完全に抑制されることから、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応がムスカリン受容体の活性化によることがわかる。刺激直後に見られる大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出反応である。これは細胞外液の Ca^{2+} を除いてもほぼ同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が惹起されることから理解できる。細胞外からの Ca^{2+} 流入はストアからの Ca^{2+} 放出よりやや遅れて始まると考えられている。アゴニスト刺激が続く限り、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が続き、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時より高いレベルが維持される。

ラット耳下腺細胞にはムスカリン受容体の他に、 α_1 -アドレナリン受容体やサブスタンスP受容体などのイノシトールリン脂質代謝を亢進させる受容体が存在する。これらの受容体を刺激した時も大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が引き起こされることが知られている。一方、 β -アドレナリン受容体は耳下腺アミラーゼの開口分泌において中心的な役割を果たしている受容体であるが、この受容体の活性化が Ca^{2+} 動員を起こすか否かについては今まで様々な議論が行われてきた。1990年頃までは β -受容体を介するアミラーゼ開口分泌の最終的な細胞内メッセン

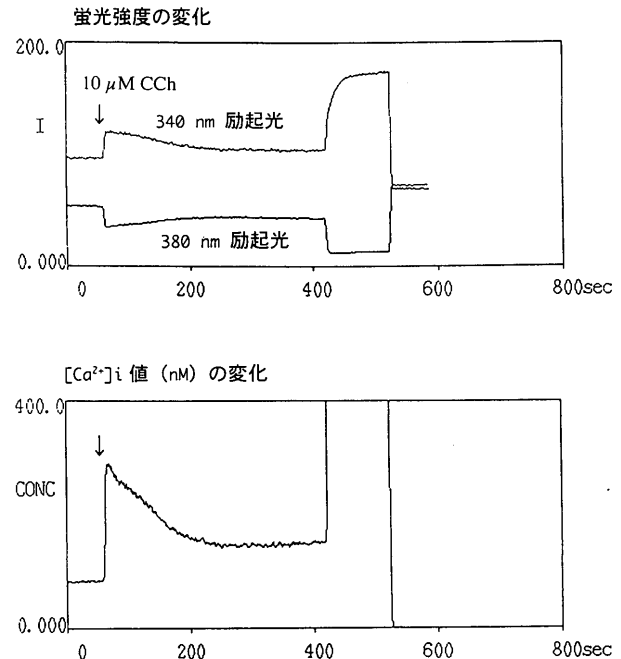


図6 fura-2を取り込ませたラット耳下腺細胞の蛍光強度の変化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇。矢印で10 μM カルバコール(CCh)を添加した。

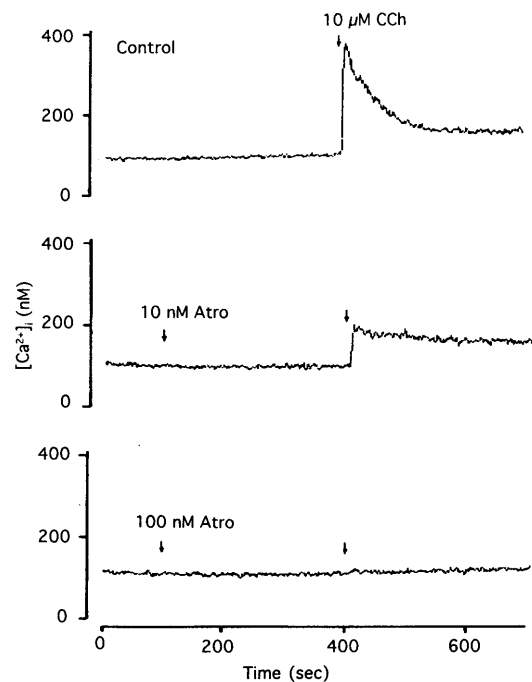


図7 ラット耳下腺細胞におけるカルバコール(CCh)刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇とアトロピン(Atro)による抑制。

ジャーは Ca^{2+} であると考えた研究者が多かった(Putney, 1977; Butcher and Putney, 1980)。しかし、アミラーゼ分泌の最大反応を引き起こす1 μM イソプロテレンール(β -受容体アゴニスト)は耳下腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させない(Hughes et al., 1989; Tanimura et al., 1990; Tojyo et al., 1998)。以前、アメリカNIHのグループが、ラット耳下腺細胞を比較的高濃度($\sim 100 \mu\text{M}$)のイソプロテ

レノールで刺激するとイノシトール代謝の亢進と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こすことを報告したが (Horn et al., 1988), その後この反応はイソプロテレノールの極弱い α -作用によることが明らかになった (Hughes et al., 1989; Tanimura et al., 1990). 現在では β -受容体を介する Ca^{2+} 動員については否定的な研究者が多い. ただし, ラット顎下腺の導管細胞は例外で, β -受容体の活性化によって弱い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が起きることが明らかになっている (Dehaye et al., 1993). 私たちもこの現象を確認しているが (Nezu et al., 2000; 2005), その生理的意義についてはまったくわかっていない. β -受容体-cyclic AMP系を介する耳下腺アミラーゼの分泌機構については他に総説 (田隈, 1991; 東城, 田隈, 1995) があるので参照してほしい.

5. 唾液腺細胞における Ca^{2+} 流入機構 (容量性 Ca^{2+} 流入)

細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} が放出されるとやや遅れて細胞外からの Ca^{2+} 流入が起きることは既に述べた. ところで Ca^{2+} 放出が起きるとなぜ Ca^{2+} 流入が引き起こされるのだろうか. 興奮性細胞の場合は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通して Ca^{2+} が流入することはよく知られているが, 唾液腺細胞などの非興奮性細胞には電位依存性 Ca^{2+} チャンネルがないので, Ca^{2+} がどのようなメカニズムで流入するのかは Ca^{2+} シグナルの研究者にとって興味深い研究対象であった. 20年ほど前, アメリカのNIEHS (国立環境衛生研究所) にいる J. W. Putney, Jr は, 非興奮性細胞の Ca^{2+} 流入機構の説明として「容量性 Ca^{2+} 流入」(Capacitative Ca^{2+} entry) と呼ばれ仮説モデルを提唱した (Putney, 1986; 1990). この仮説によると, 非興奮性細胞の Ca^{2+} 流入は細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇の程度に依存して活性化され, イノシトールリン脂質代謝や IP_3 産生と直接的には関係がないという. 当初このモデルは「実験の根拠に乏しい馬鹿げた理論だ」などとかなり辛辣な批判を受けたようであるが, 今日では非興奮性細胞における最も有力な Ca^{2+} 流入モデルとして多くの研究者に受け入れられている. 私は口腔生化学の田隈教授, 残念にも先年亡くなられた北里大学解剖学の故瀬川彰久博士と Putney の研究室を訪問したことがある (図8). 当時, Putney は「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルを発表したばかりの少壮の研究者であったが, その後このモデルが世界的に注目を集め, Putney 自身が Ca^{2+} シグナル研究の分野で今日のように大きな影響力を持つようになることはとても予想できなかった.

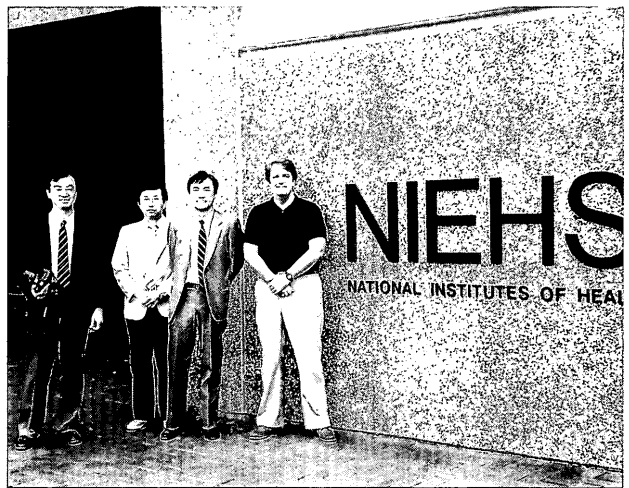


図8 1988年にPutneyの研究室を訪問した時. 右端からPutney博士, 北里大学の瀬川彰久博士, 筆者, 口腔生化学の田隈泰信教授.

実は「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルの誕生には唾液腺細胞を使った Ca^{2+} シグナルの研究が多大な貢献をしている. このモデルの生みの親である Putney は, 元々唾液腺の水・イオン分泌機構の研究者であったが, この仮説を提唱した頃は, 耳下腺細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 動態やイノシトールリン脂質代謝を精力的に研究していた. 「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルは耳下腺細胞を使った彼の一連の研究成果に基づいて提唱されたものであり, 唾液腺の研究が基本的な細胞機構の解明に結びついた代表的な例と言える. 私たちも以前, ラット耳下腺細胞の Ca^{2+} 流入がリン酸化酵素阻害薬や脱リン酸化酵素阻害薬によって増強したり低下したりすることを報告した (Tojyo et al., 1995a; 1995b). 私たちの実験結果は, 「容量性 Ca^{2+} 流入」がタンパク質のリン酸化や脱リン酸化によって調節されていることを示唆しているが, 残念ながらそれ以上に研究を進展させることはできなかった. 1990年代, transient receptor potential (TRP) と名付けられたイオンチャンネル遺伝子が同定され, これが「容量性 Ca^{2+} 流入」に関与するイオンチャンネルの正体ではないかといわれているが (Zhu et al., 1996), 未だ十分な確証はない. 「容量性 Ca^{2+} 流入」の分子機構の全貌が解明されるにはまだ時間がかかりそうである.

6. 唾液腺細胞の Ca^{2+} イメージング

細胞懸濁液を使った Ca^{2+} 測定実験では細胞集団の平均的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化を知ることはできるが, 一つの細胞の, ましてや細胞内の特定地域の Ca^{2+} の動きをとらえることは不可能である. 近年は光学機器や画像解析技術が著しく進歩し, 一つの細胞の微弱な蛍光を画像として可視化することが可能になった. 人間の欲望とは果てしないもので, 私たちは細胞懸濁液による実験だけでは満足できず, ぜひ個々の唾液腺細胞の Ca^{2+} 動態を見てみたい

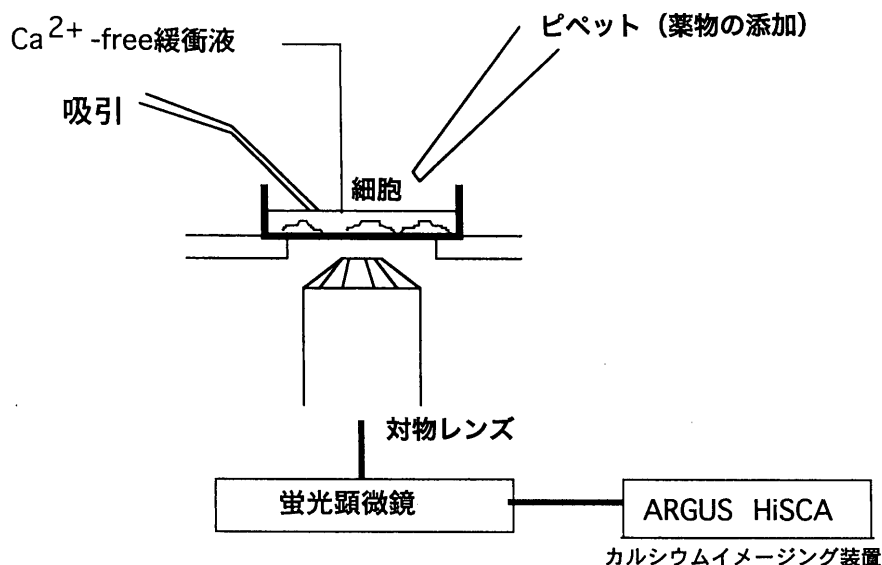


図9 カルシウムイメージングの実験システム。

と思うようになった。幸運にも1996年に浜松ホトニクス社の Ca^{2+} イメージングシステム (ARGUS HiSCA) を私たちの研究室に設置することができ、イメージング実験を本格的に開始した。

fura-2を取り込ませたラット耳下腺の細胞懸濁液を直径1 cm程の測定用チャンバーに注入し、しばらく放置するか軽く遠心して細胞をチャンバー底部のカバーガラスに固着させる。チャンバーのカバーガラスを前もってCell-Takでコートしておくこと細胞が固着しやすい。チャンバーを倒立蛍光顕微鏡のステージに固定し、細胞に340nmと380nmの励起光を照射し、細胞から発する蛍光を高速冷却CCDカメラで取り込み、その情報をコンピューター処理により画像化する (図9)。

唾液腺の腺房細胞は形態的に極性を持つ典型的な細胞である。すなわち、腺腔側には多数の分泌顆粒が密集しているのに対し、核や小胞体は基底側に偏っている。それゆえ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇、すなわちストアからの Ca^{2+} 放出反応が細胞のどの部域で始まり、どのように広がるかは大変興味ある問題であった。小胞体は主に基底側に分布していることから当初 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は基底側領域で始まるだろうと考えられていたが、実際に腺房細胞をカルバコールで刺激すると、その反応は腺腔膜の近傍で始まり、1~2秒で細胞全体に広がることわかった (図10A) (Tojyo et al., 1997)。これは Ca^{2+} ウエーブと呼ばれる現象で、膵臓腺房細胞や涙腺細胞でも見られる。私たちは、 Ca^{2+} ウエーブの発生は IP_3 受容体の細胞内分布に極性があるためではないかと考え、細胞内ストアを IP_3 で直接刺激して Ca^{2+} ウエーブが惹起されるかどうか調べた。 IP_3 は水溶性物質なので細胞膜を通らない。そこで、サ

ポニン (植物に含まれる界面活性剤) で細胞膜に小さな穴を開け、膜結合性 Ca^{2+} 蛍光試薬calcium green C_{18} で細胞内ストアの膜をラベルした後、ケージド IP_3 (不活性基と結合した IP_3) の光分解によって IP_3 を瞬時に遊離させた。その結果、 IP_3 がカルバコール刺激の時と同様の腺腔側から始まる Ca^{2+} ウエーブを引き起こすことがわかった (図10B) (Tanimura et al., 1998)。この結果は、 IP_3 に対する感受性が細胞内の部位によって異なること、 IP_3 に特に感受性の高い Ca^{2+} ストアが腺腔側に存在することを示している。免疫組織学的研究でも IP_3 受容体の分布が腺腔側に偏っていることが示されており、 Ca^{2+} イメージングの実験結果と良く符合する (Nezu et al., 2002)。

腺腔側に局在する高感受性 Ca^{2+} ストアの正体は何か。分泌顆粒は腺腔側に密に分布し、分泌顆粒には高濃度の Ca^{2+} が含まれていることから、以前、膵臓腺房細胞の分泌顆粒が Ca^{2+} ストアとして Ca^{2+} シグナルの発生に重要であるとする説が提唱され (Gerasimenko et al., 1996)、かなり注目された。しかし、前もって分泌顆粒を放出させておいた耳下腺細胞と顆粒を含む耳下腺細胞では Ca^{2+} ウエーブのパターンに全く差がないこと、ウエスタン・ブロットでは分泌顆粒膜に IP_3 受容体が検出されないことなどから、私たちは分泌顆粒が Ca^{2+} ストアであるという仮説には懐疑的である (Nezu et al., 2002)。顎下腺導管細胞の腺腔側には小胞体から独立した小さなvesicleが局在し、それが高感受性 Ca^{2+} ストアとして機能していると報告があるが (Yamamoto-Hino et al., 1998)、十分な確証はない。小胞体が主に基底側領域に分布しているにもかかわらず、 Ca^{2+} 動員は腺腔膜近傍で始まるという

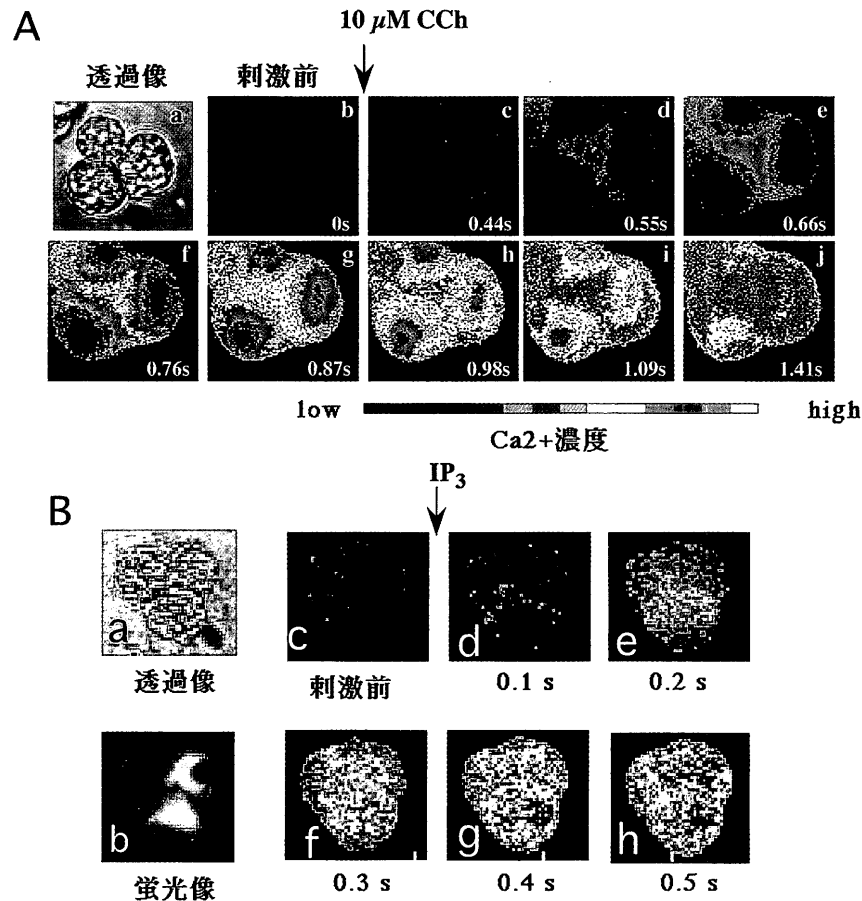


図10 ラット耳下腺腺房細胞におけるカルシウムウエーブ.

A: fura-2を取り込ませた細胞を10 μ Mカルバコール (CCh) で刺激し, イメージング装置 (ARGUS-HiSCA) でCa²⁺反応をモニターした. (a), 透過像; (b) - (j), Ca²⁺反応の疑似カラー像.

B: サポニン処理した細胞をcalcium green C₁₈でラベルし, ケージドIP₃の光分解によって瞬時にIP₃を遊離させた. (a), 透過像; (b), 蛍光像, (c) - (h), Ca²⁺放出反応の疑似カラー像.

現象は, 今でも一つの謎である. しかし, 近年, 外分泌腺細胞の小胞体はトンネルのように一つに繋がっており, その先端が腺腔膜近傍に分布しているとする「小胞体トンネル説」が提唱された (図11) (Petersen et al., 2001). この仮説では, IP₃受容体の密な部分が小胞体の先端 (腺腔側) に存在し, 基底側領域の小胞体から取り込まれたCa²⁺は小胞体の内腔を通過して腺腔側に移動し, IP₃受容体チャネルから細胞質に放出される. すなわち小胞体はCa²⁺が通るトンネル・ネットワークを形成しているというのである. この考えはCa²⁺ウエーブを説明するモデルとしても大変魅力的な仮説であり, 現在かなり有力である.

7. 水・イオン輸送におけるCa²⁺シグナルの役割

唾液腺細胞には様々なイオンチャネルやイオン輸送体が存在し (図12), Ca²⁺シグナルによってこれらのイオン輸送系が活性化し, 水分分泌が引き起こされる (東城, 谷村, 1996). 特に, 腺腔膜に存在するCl⁻チャネルと基底側膜に存在するK⁺チャネルはCa²⁺依存性イオンチャ

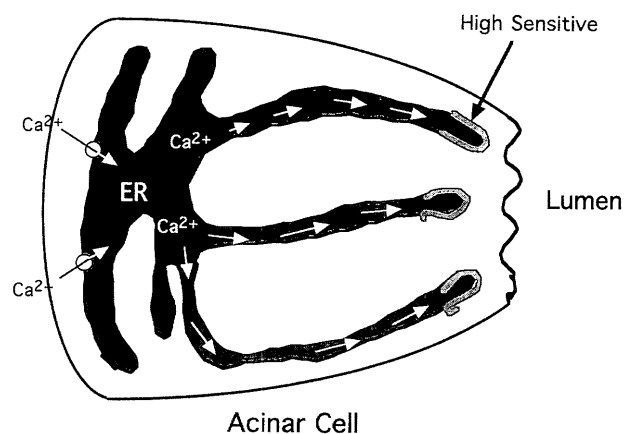


図11 小胞体ネットワークはCa²⁺が通るトンネルである. Ca²⁺は基底側領域で小胞体に取り込まれ, 小胞体内腔を通過して拡散する. 腺腔膜近傍に分布する小胞体はIP₃に対して感受性が特に高く, IP₃によって引き起こされるCa²⁺放出反応は腺腔側領域で始まる.

ネルであり, [Ca²⁺]_iの上昇が引き金になって開口する. Cl⁻チャネルとK⁺チャネルが開口するとCl⁻は細胞内から腺腔内へ, K⁺は細胞内から間質液側に放出される. [Ca²⁺]_i上昇が水分分泌にとって必須であることはBAPTA

(Ca²⁺キレート剤)を細胞内に入れておくとK⁺放出は止まってしまう (Tojyo et al., 1993) ことから明らかである。また基底側膜に存在するNa⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体も重要な役割を果たしている。共輸送体は持続的にCl⁻を細胞内に取り込み、基底側から腺腔側へのCl⁻の流れを作っていると考えられている。このNa⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体の機能が止まってしまうと細胞内へのCl⁻の供給がうまく行かず、水分泌は停止する。こうしてCl⁻が腺腔内に移動すると、負の電荷に引かれてNa⁺が細胞間隙を通過して腺腔内に移動することになる。腺腔内へのNaClの移動は基底側と腺腔側との間で浸透圧勾配をつくり出すので水が細胞間隙あるいは細胞内を通過して腺腔内へ動く。これが現在考えられている水分泌機構の概略である。

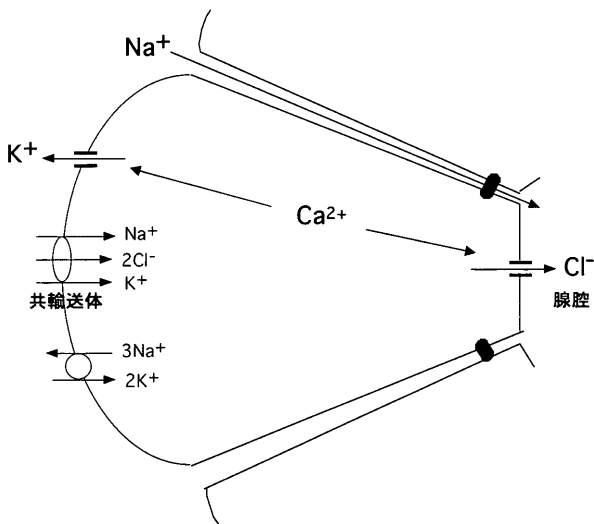


図12 唾液腺腺房細胞に存在する主なイオン輸送系

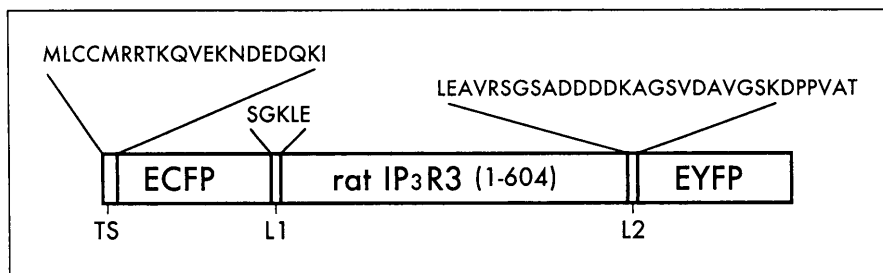
近年、唾液腺に存在するアクアポリン5という水チャネルの一種が唾液分泌の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた (Ma et al., 1999)。アクアポリン5の腺腔膜への移動がムスカリン受容体アゴニ

スによって促進されるとする報告があり (Ishikawa and Ishida, 2000)、水チャネルの機能がCa²⁺シグナルによって制御されているか否かは今後の重要な研究課題である。

唾液腺細胞のイオン輸送系の活性化になぜCa²⁺ウエーブが必要なのかについては充分にはわかっていない。しかし、腺腔内へのCl⁻の移動が水移動を起こす第一の駆動力であるので、Ca²⁺ウエーブによってCa²⁺依存性Cl⁻チャネルが最初に開口することはイオン輸送系を連鎖的に活性化させる上で理にかなった細胞反応であるのかも知れない。非生理的機序で [Ca²⁺]_iを上昇させるCa²⁺イオノフォアやタブシガージン単独ではアゴニスト刺激に匹敵するK⁺放出反応を起こすことはできない (Tojyo et al., 1993)。これはCa²⁺シグナルの特異的な時空間パターン (Ca²⁺ウエーブ) が唾液腺における水分泌に重要であることを示唆している。唾液分泌におけるCa²⁺ウエーブの役割については谷村が別の総説 (谷村, 2001) で考察しているので、それを参照してほしい。

8. 今後の展望

これまでの研究で唾液腺細胞におけるCa²⁺シグナルのおおよその仕組みが明らかになってきた。今後の目標はCa²⁺シグナルと他のシグナル分子とを同時に可視化し、シグナル分子間の連関性や相互作用を明らかにすることである。イノシトールリン脂質代謝の亢進によりIP₃とジアシルグリセロールが生成し、Ca²⁺動員と共にプロテインキナーゼC (PKC) が活性化する。もし、IP₃やPKCの時空間動態を [Ca²⁺]_iの変化と同時に可視化することができればCa²⁺シグナル研究の新たな地平を切り開くことが可能であろう。近年、クラゲ発光タンパク質Green Fluorescent Protein (GFP) とシグナル分子との融合タンパク質を生きた細胞に発現させ、シグナル分子の細胞内での動きを可視化することが試みられている。私たちの



Luminous Inositol Trisphosphate-Binding Domain for Ratiometric Analysis

LIBRA

図13 IP₃の蛍光分子センサーLIBRAの構造。TS, 細胞膜局在シグナル; L1 and L2, リンカー部位; rat IP₃R (1-604), ラットのタイプ3 IP₃受容体のリガンド結合部位; ECFP, enhanced cyan fluorescent protein; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein.

研究室でもPKCやIP₃受容体のGFP融合タンパク質を培養細胞に発現させ、これらの情報分子の機能解析や動態解析を行ってきた (Tanimura et al., 2002; Morita et al., 2002; Morita et al., 2004). さらに、最近、谷村助教授が中心になって、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したIP₃の蛍光分子センサーLIBRAを開発し、細胞内IP₃動態の解析を開始した (Tanimura et al., 2004). LIBRAは、IP₃受容体のリガンド結合ドメインの両端に2つの蛍光タンパク質 (CFPとYFP) を融合した新しい蛍光プローブである (図13). 現在、LIBRAを生きた培養細胞に発現させ、さらに同じ細胞にCa²⁺蛍光指示薬を導入し、IP₃とCa²⁺の細胞内動態の同時解析を行っている。将来は、LIBRAを唾液腺細胞に発現させ、IP₃、Ca²⁺、PKCの動きをイメージングシステムを使って総合的に解析することができればと考えている。いつの日かこの総説の続きとして、GFPを使った可視化解析の研究成果を紹介したい。

謝 辞

本学会誌に総説を書く機会を与えてくれた編集委員長の和泉博之教授に心から感謝申し上げます。また、これまで私と一緒に唾液腺細胞のCa²⁺シグナル研究を担ってくれた谷村明彦助教授、森田貴雄助手、根津顕弘助手に感謝いたします。

文 献

- Aub DL and Putney JW, Jr. Mobilization of intracellular calcium by methacholine and inositol 1, 4, 5-trisphosphate in rat parotid acinar cells. *J Dent Res* 66, 547-551, 1987.
- Berridge MJ and Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321, 1984.
- Butcher FR and Putney JW, Jr. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13, 215-249, 1980.
- Dehaye JP, Valdez IH and Turner RJ. β -Adrenergic stimulation and cAMP mobilize Ca²⁺ from an IP₃-insensitive pool in rat submandibular granular ducts. *Am J Physiol* 265, C1356-C1362, 1993.
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV and Petersen OH. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* 184, 473-480, 1996.
- Gray PTA. Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonists in rat parotid acinar cells. *J Physiol(Lond)* 406, 35-53, 1988.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450, 1985.
- Horn VJ, Baum BJ and Ambudkar IS. β -Adrenergic receptor stimulation induces inositol trisphosphate production Ca²⁺ mobilization in

- rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 263, 12454-12460, 1988.
- Hughes AR, Takemura H and Putney JW, Jr. Does β -adrenoceptor activation stimulate Ca²⁺ mobilization and inositol trisphosphate formation in parotid acinar cells? *Cell Calcium* 10, 519-525, 1989.
- Ishikawa Y and Ishii H. Aquaporin water channel in salivary glands. *Jpn J Pharmacol* 83, 95-101, 2000.
- Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ and Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274, 20071-20074, 1999.
- Merritt JE and Rink TJ. Rapid increases in cytosolic free calcium in response to muscarinic stimulation of rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 262, 4958-4960, 1987a.
- Merritt JE and Rink TJ. Regulation of cytosolic free calcium in fura-2-loaded rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 262, 17362-17369, 1987b.
- Michell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415, 81-147, 1975.
- 御子柴克彦. IP₃レセプター. *日薬理誌* 121, 241-253, 2003.
- Morita T, Tanimura A, Nezu A and Tojyo Y. Visualization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type III with green fluorescent protein in living cells. *Cell Calcium* 31, 59-64, 2002.
- Morita T, Tanimura A, Nezu A, Kurosaki T and Tojyo Y. Functional analysis of the green fluorescent protein-tagged inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 3 in Ca²⁺ release and entry in DT40 B lymphocytes. *Biochem J* 382, 793-801, 2004.
- Nezu A, Tanimura A and Tojyo Y. Characterization of the Ca²⁺ response mediated by activation of β -adrenoceptors in rat submandibular ducts. *Jpn J Pharmacol* 84, 25-31, 2000.
- Nezu A, Morita T, Tanimura A and Tojyo Y. Comparison of agonist-induced Ca²⁺ responses in rat submandibular acini and ducts. *Arch Oral Biol* 50, 585-592, 2005.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Irie K, Yajima T and Tojyo Y. Evidence that zymogen granules do not function as an intracellular Ca²⁺ store for the generation of the Ca²⁺ signal in rat parotid acinar cells. *Biochem J* 363, 59-66, 2002.
- Petersen OH, Tepikin A and Park MK. The endoplasmic reticulum: one continuous or several separate Ca²⁺ stores? *Trends Neuroscience* 24, 271-276, 2001.
- Putney JW, Jr, Weiss SJ, Leslie BA and Marier SH. Is calcium the final mediator of exocytosis in the rat parotid gland? *J Pharmacol Exp Ther* 203, 144-155, 1977.
- Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12, 1986.
- Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11, 611-624, 1990.
- Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol(Lond)* 4, 29-42, 1883.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ and Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* 306, 67-69, 1973.
- Takemura H. Change in cytosolic free calcium concentration in isolated rat parotid cells by cholinergic and β -adrenergic agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 131, 1048-1055, 1985.
- 田隈泰信. 耳下腺のアミラーゼ分泌機構-“穴あき細胞”の利用-. *東日本歯学雑誌* 10, 1-14, 1991.
- Tanimura A, Matsumoto Y and Tojyo Y. Evidence that isoproterenol-induced Ca²⁺-mobilization in rat parotid acinar cells is not mediated

- by activation of β -adrenoceptors. *Biochim Biophys Acta* 1055, 273–277, 1990.
- Tanimura A, Matsumoto Y and Tojyo Y. Polarized Ca^{2+} release in saponin-permeabilized parotid acinar cells evoked by flash photolysis of 'caged' inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochem J* 332, 769–772, 1998.
- 谷村明彦. 唾液腺細胞の Ca^{2+} シグナルと水・電解質分泌の調節機構. *歯科基礎医学会誌* 43, 343–352, 2001.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Hashimoto N and Tojyo Y. Interplay between calcium, diacylglycerol, and phosphorylation in the spatial and temporal regulation of PKC α -GFP. *J Biol Chem* 277, 29054–29062, 2002.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Turner RJ and Tojyo Y. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in single living cells. *J Biol Chem* 279, 38095–38098, 2004.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Activation of β -adrenoceptors does not cause any change in cytosolic Ca^{2+} distribution in rat parotid acinar cells. *Eur J Pharmacol* 360, 73–79, 1990.
- 東城庸介、田隈泰信. 唾液腺-耳下腺腺房細胞における分泌機能と情報伝達. *生体の科学* 46, 278–285, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A, Matsumoto Y and Sugiya H. Staurosporine enhances Ca^{2+} entry induced by depletion of intracellular Ca^{2+} stores in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 17, 32–40, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Suppression of capacitative Ca^{2+} entry by serine/threonine phosphatase inhibitors in rat parotid acinar cells. *Jpn J Pharmacol* 69, 381–389, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Imaging of intracellular Ca^{2+} waves induced by muscarinic receptor stimulation in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 22, 455–462, 1997.
- 東城庸介, 谷村明彦. 器官-その新しい視点. 唾液腺, *生体の科学*, 47, 359–362, 1996.
- Tojyo Y, Tanimura A, Matsui S and Matsumoto Y. Carbachol-induced potassium release in rat parotid acini: comparison of the roles of cytosolic Ca^{2+} and protein kinase C. *Jpn J Pharmacol* 63, 439–446, 1993.
- Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties and prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396–2404, 1980.
- Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Segawa A, Adachi E, Yamashina S, Fujimoto T, Sugiyama T, Furuchi T, Hasegawa M and Miko-shiba K. Apical vesicles bearing inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors in the Ca^{2+} initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. *J Cell Biol* 141, 135–142, 1998.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E and Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85, 661–671, 1996.