

原 著

## ラット耳下腺からの唾液分泌に対するギャップ結合細胞間連絡の影響

杉田 誠, 広野 力, 柴 芳樹  
菅野 義信

### Effect of Gap Junctional Intercellular Communication on Salivary Secretion in Rat Parotid Gland

Makoto Sugita, Chikara Hirono, Yoshiki Shiba  
and Yoshinobu Kanno

(平成6年2月9日受付)

#### 結 言

唾液腺からは交感、副交感神経の二重支配により、水分、アミラーゼなどの酵素及びムチンが分泌される<sup>1-4)</sup>。ラット耳下腺ではムスカリン性及び $\alpha$ -アドレナリン性刺激により細胞内カルシウム濃度上昇を介し電解質や水が<sup>5,6)</sup>、 $\beta$ -アドレナリン性刺激でcAMP産生を介しアミラーゼが分泌される<sup>7,8)</sup>。腺房細胞間にはギャップ結合が良く発達し、ギャップ結合を介する細胞間連絡も腺房細胞からの分泌の調節に関与していると考えられる<sup>9-11)</sup>。

膵臓では、外分泌腺腺房細胞間のギャップ結合は27 kDaの蛋白質で構成され<sup>12,13)</sup> 内分泌腺細胞間のギャップ結合は43 kDa蛋白質で構成されている<sup>14)</sup>。現在ではギャップ結合を構成するチャンネル蛋白質(コネクソン)は6個のサブユニット、コネキシンから成ることが明らかになった<sup>15)</sup>。膵臓外分泌腺からのアミラーゼ分泌はアセチルコリン刺激で引き起こされるが、ギャップ結合細胞間連絡は無刺激時のアミラーゼ分泌を抑制し、刺激時の分泌には影響しない<sup>10)</sup>。耳下腺でのギャップ結合を構成するチャンネル蛋白質(コネクソンとコネキシン)の種類ならびにその分泌への影響は未だ明かではない。

ギャップ結合細胞間連絡の分泌に及ぼす影響を解明するためには、ギャップ結合の機能がある腺房とギャップ結合のない単離腺房細胞における分泌を比較する必要がある。 $\beta$ -アドレナリン性刺激でのアミラーゼ分泌は耳下腺分離腺房細胞での測定方法が確立しているが<sup>16)</sup>、ムスカリン性及び $\alpha$ -アドレナリン性刺激による分泌現象を耳下腺分離腺房細胞で観察する方法は確立していない。顎下腺の分離腺房細胞で開発したムスカリン性及び $\alpha$ -アドレナリン性刺激による分泌能測定法としての蛍光色素カルセインを用いた方法で<sup>17)</sup>、耳下腺の分離腺房細胞からの分泌を調べた。耳下腺腺房細胞内に取り込ませた蛍光色素カルセインとアミラーゼの二種の分泌系で、ギャップ結合の機能がある分離腺房とギャップ結合のない単離腺房細胞における、分泌刺激による反応性の違いを比較し、それぞれの分泌系でのギャップ結合細胞間連絡を介する調節機構を検討した。

#### 材料ならびに方法

##### (1) 抗体の作製

27 kDa ギャップ結合蛋白質を大量に精製するために、雄性ウィスター系ラット肝臓ホモジェネイトを遠心し、ペレットを20 mM 水酸化ナトリウムに分散した。次に遠心操作により不溶性分画を得た後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により27 kDa蛋白質を分離した<sup>18,19)</sup>。

雄性 BALB/c マウスを27 kDa蛋白質で免疫し、通法によりモノクローナル抗体を作製した。抗体の特異

広島大学歯学部口腔生理学講座(主任:菅野義信教授)本論文の要旨は平成4年12月の第37回日本唾液腺学会及び平成5年4月の第70回日本生理学会大会において発表した。本研究は一部文部省科学研究費(平成4年度, No. 03454430)によった。

性はラット肝臓蛋白質のイムノブロッティング及び組織染色性で確認した。

## (2) 組織染色

雄性ウィスター系ラット (約 300 g) の耳下腺を 0.3% paraformaldehyde, 10 mM sodium metaperiodate 及び 75 mM lysine-HCl を含むリン酸緩衝溶液 (PLP 固定液) で灌流し, Tissue-Tek O.C.T. compound (Miles Inc.) で包埋後, 液体窒素で凍結した。次いで  $-20^{\circ}\text{C}$  で  $16\ \mu\text{m}$  に薄切した。

凍結切片を 0.4% TritonX-100 を含む phosphate buffered saline (以下 PBS: Triton) で洗い, 1% BSA, 0.4% TritonX-100 を含む PBS (以下 BSA 溶液) で室温で 30 分間インキュベートした。抗 27 kDa モノクローナル抗体を BSA 溶液で 1000 倍希釈して切片に 1 時間反応させ PBS: Triton で洗った。次いで FITC ラベルした抗マウス IgG 抗体の 200 倍希釈 BSA 溶液で 1 時間反応させ PBS: Triton で洗浄後, 90% グリセリン + 0.1 M TrisHCl (pH 8.5) + 0.1% para phenylenediamine の混合液を用いて包埋した。落射型蛍光顕微鏡 (Nikon type 104) の B 励起で観察し, フィルム (Kodak Tri-X) に撮影した。

## (3) イムノブロッティング

ショ糖密度勾配遠心法で, ラット耳下腺ホモジェネイトより細胞膜粗分画を得た。20 mM 水酸化ナトリウム処理後遠心して得たペレット (NaOH 不溶性分画) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し, ニトロセルロース紙に転写した。抗体の非特異的結合をブロックエース (雪印乳業) で阻害した後, 抗 27 kDa モノクローナル抗体を反応させた。以後はブロッティングキット (アマーシャム) を用いてビオチン化抗マウス IgG, ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼの順に反応させた。最後に基質を加えて抗体の結合したバンドを発色させた。

## (4) カルセイン及びアミラーゼ分泌の測定

雄性ウィスター系ラット (約 300 g) をペントバルビタール麻酔後, 耳下腺を摘出し細切した後, 0.1% コラゲナーゼを含む Krebs Henseleit Ringer (KHR) 中で 30 分間処理した。ピペットで吸引, 排出を繰り返し細胞塊を分散させ, ナイロンメッシュにより  $50\text{--}100\ \mu\text{m}$  の腺房と  $10\text{--}50\ \mu\text{m}$  の単離腺房細胞の二種の細胞群に分け, カルセイン及びアミラーゼ分泌を測定した。

カルセインの細胞内負荷と放出量の測定は以下の方法で行った<sup>17)</sup>。細胞外液中にカルセインのエステル型

であるカルセイン-AM ( $5\ \mu\text{M}$ ) を加え  $37^{\circ}\text{C}$ , 10 分間インキュベートすると, カルセイン-AM は細胞内に入り, 内因性のエステラーゼによりカルセインに加水分解され, 細胞内に残留する。遠心操作により外液のカルセイン-AM を除去した後, 外液中に分泌刺激物質を加えると, 細胞内カルセインは一部細胞外に放出される。細胞外に放出されたカルセイン量及び細胞内に残留するカルセイン量を蛍光測定 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 510 nm) により求め, 最初に細胞内に取り込まれた総カルセインのうち何%が刺激により放出されたかを測定した。結果は各々 3 例以上の実験の平均値で示した。

アミラーゼ分泌の測定は Bernfeld の方法に従った<sup>16)</sup>。分離した細胞を分泌刺激物質存在下で 20 分間インキュベートし, 外液中に分泌したアミラーゼ量及び細胞内に残留したアミラーゼ量を求め, 総アミラーゼ量に対する割合で分泌量を示した。この結果も各々の実験で 3 例以上の平均値で示した。

## 結 果

ラット肝臓 27 kDa ギャップ結合蛋白質に対するモノクローナル抗体により, ラット耳下腺の凍結切片を蛍光抗体法で染色した。腺房細胞間の接合部に抗 27 kDa ギャップ結合抗体の結合部位が点在し, 導管は染まらなかった (図 1)。

ラット耳下腺のホモジェネイトより遠心分離した細胞膜粗分画からのアルカリ不溶性分画には, 抗体の結合する分子量約 27 kDa の蛋白質があり, 耳下腺において 27 kDa ギャップ結合蛋白質の存在が確認された (図 2)。

単離腺房細胞において細胞内に負荷した蛍光色素カルセインは, カルバコール (CCh)  $10^{-6}\text{M}$  及びノルアドレナリン (NA)  $10^{-6}\text{M}$  刺激で放出したが, イソプロテレノール (IPR)  $10^{-6}\text{M}$  刺激ではほとんど放出しなかった (図 3)。一方, IPR 及び NA 刺激でアミラーゼは顕著に分泌したが, CCh 刺激による分泌は少なかった (図 3)。

分泌刺激物質によるカルセインとアミラーゼ分泌をギャップ結合の機能がある腺房とギャップ結合のない単離腺房細胞とで比較した。 $10^{-6}\text{M}$  CCh 刺激によるカルセインの放出は腺房よりも単離腺房細胞で多く, カルシウムイオノフォア A23187  $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$  刺激によっても単離腺房細胞の反応性が高かった (図 4)。一方,  $10^{-6}\text{M}$  IPR 刺激によるアミラーゼ分泌は単離腺房細胞よりも腺房で顕著に増加し, dibutyryl cyclic AMP  $10^{-3}\text{M}$  刺激でも腺房の反応性が高かった (図 5)。

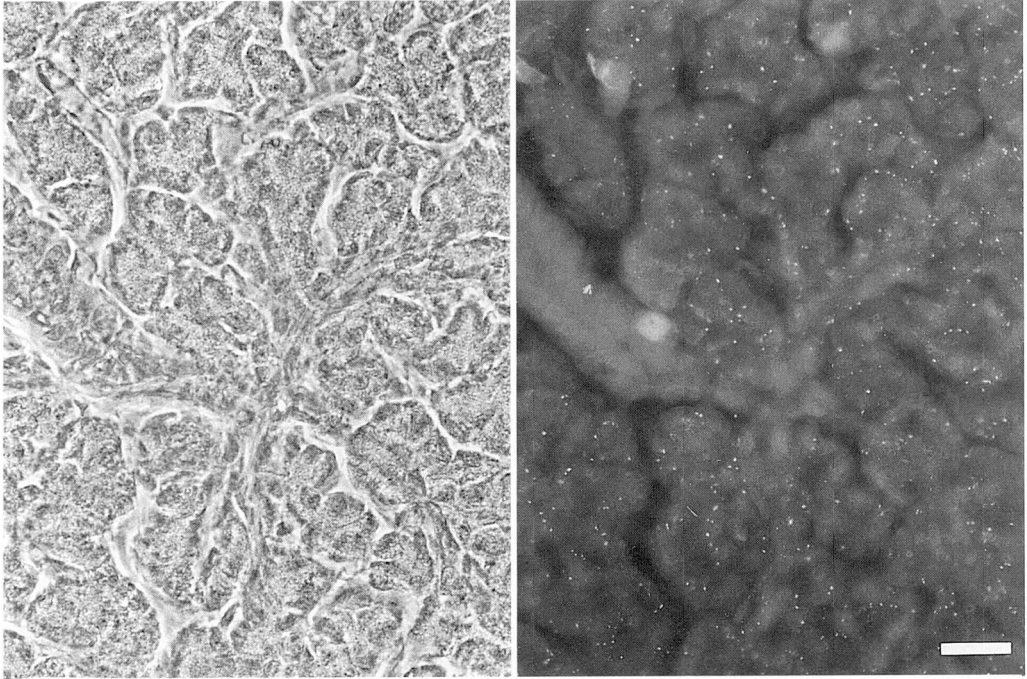


図1 ラット耳下腺の抗 27 kDa モノクローナル抗体による組織染色。白線は 20  $\mu\text{m}$  を示す。

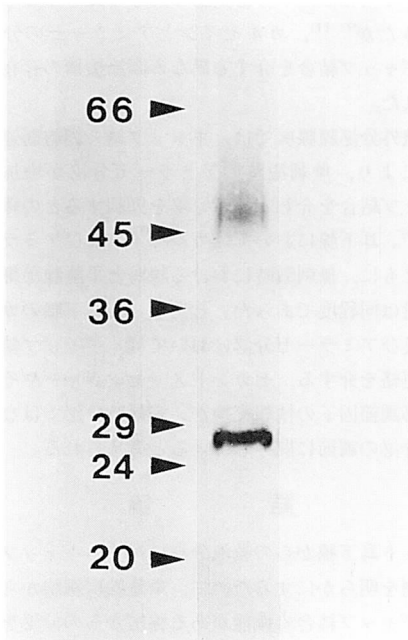


図2 抗 27 kDa モノクローナル抗体によるラット耳下腺膜分画のイムノプロット。左側数字は標準蛋白質分子量 (kDa) を示す。

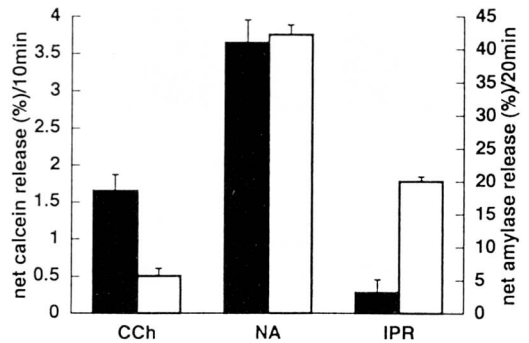


図3 単離腺房細胞での副交感及び交感神経作働薬によるカルセインとアミラーゼ分泌への影響。  
 $10^{-6}\text{M}$  カルバコール (CCh),  $10^{-6}\text{M}$  ノルアドレナリン (NA),  $10^{-6}\text{M}$  イソプロテレノール (IPR) によるカルセイン及びアミラーゼ分泌量を各々■, □で示してある。

カルセイン分泌とアミラーゼ分泌の反応性は、ギャップ結合の機能がある腺房とギャップ結合のない単離腺房細胞とで異なることが明らかとなった。

### 考 察

単離腺房細胞で細胞内カルセインの放出は、CCh及びNA刺激で生じ、それぞれアトロピンおよびフェノキシベンザミンにより抑制されたことより、ム

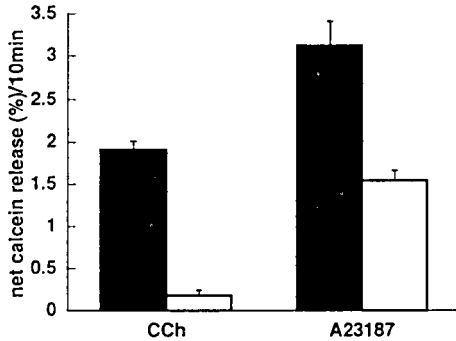


図4 単離腺房細胞と腺房における CCh 及び A23187 刺激によるカルセイン放出。  
 $10^{-6}$ M カルバコール (CCh) と  $2.5 \times 10^{-6}$ M A23187 による単離腺房細胞と腺房からの分泌を各々■, □で示してある。

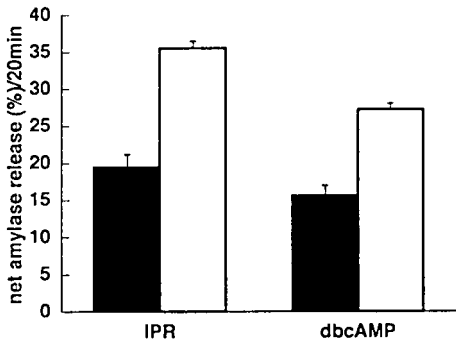


図5 単離腺房細胞と腺房における IPR 及び dbcAMP によるアミラーゼ分泌。  
 $10^{-6}$ M イソプロテレノール (IPR) と  $10^{-3}$ M dibutyl cyclic AMP (dbcAMP) による単離腺房細胞と腺房からの分泌を各々■, □で示してある。

スカリン性受容体及び  $\alpha$  受容体を介する分泌現象と考えられる。唾液腺では、ムスカリン性及び  $\alpha$ -アドレナリン性刺激により G 蛋白を介し PL-C が活性化され、 $IP_3$  が産生される<sup>20)</sup>。 $IP_3$  産生により  $IP_3$  感受性の細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離と、それに続く細胞外からのカルシウム流入などのカルシウム動員が電解質及び水輸送に必要とされる<sup>5,6,21,22)</sup>。カルセインの放出は A23187 刺激で生じることより、細胞内カルシウム濃度上昇を介する分泌現象で、主に  $\beta$ -アドレナリン性刺激による cyclic AMP 産生を介して開口分泌されるアミラーゼ分泌とは、異なる分泌系である。

色素によっては、ある種の細胞内小器官に特異的に蓄積することが報告されているが<sup>23,24)</sup>、今回カルセイ

ン-AM の形で細胞内に負荷したカルセインは細胞質にび漫性に存在した。したがってカルセイン放出は、カルシウム依存性の液性分泌との関連が強く、細胞膜の電解質や水に対する透過性亢進によるもの可能性が高い。

外分泌腺ではギャップ結合が良く発達し、膵臓外分泌腺には 27 kDa コネキシンで構成されたギャップ結合があり、内分泌腺では 43 kDa コネキシンでギャップ結合が構成されている<sup>14)</sup>。ラット耳下腺でのギャップ結合も膵臓外分泌腺と同様に、27 kDa 蛋白質で構成されるものがあることが明らかとなった。

ラット耳下腺での分泌に対するギャップ結合の役割を明らかにするために、腺房と単離腺房細胞からの分泌を比較すると、CCh 及び A23187 刺激によるカルセイン放出は、腺房よりも単離腺房細胞で顕著であった。IPR 及び dibutyl cyclic AMP 刺激によるアミラーゼ分泌は、逆に単離腺房細胞よりも腺房において増強された。したがって、ムスカリン性刺激や  $\alpha$ -アドレナリン性刺激により、細胞内カルシウム濃度上昇を介して引き起こされるカルセイン放出は、ギャップ結合を介する細胞間連絡で抑制されることが示唆された。一方、 $\beta$ -アドレナリン性刺激により cyclic AMP 産生を介して引き起こされるアミラーゼ分泌は、ギャップ結合の存在により促進された。ギャップ結合を介する情報伝達が分泌調節に関与していると考えられてきたが<sup>9-11)</sup>、カルセインとアミラーゼの分泌系で、ギャップ結合を介する異なる調節機構の存在が示唆された。

膵臓外分泌腺腺房では、ギャップ結合細胞間連絡の離断により、無刺激時のアミラーゼ分泌が増加し、ギャップ結合を介し安静時分泌を抑制するとの報告がある<sup>10)</sup>。耳下腺においてはカルセイン及びアミラーゼ分泌ともに、無刺激時における腺房と単離腺房細胞の分泌量は同程度であった。したがって耳下腺のカルセイン及びアミラーゼ分泌においては、ギャップ結合細胞間連絡を介する、セカンドメッセンジャーやその他の分泌調節因子の情報交換が、安静時分泌ではなく刺激時分泌の調節に関与していると考えられる。

## 結 論

ラット耳下腺からの唾液分泌に対するギャップ結合の役割を明らかにするために、単離腺房細胞からの分泌とギャップ結合の機能がある腺房からの分泌を比較した。ラット耳下腺の腺房細胞間には、分子量 27 kDa の蛋白質で構成されたギャップ結合が良く発達している。CCh や NA 刺激により単離腺房細胞から蛍光色素カルセインが放出された。IPR や NA 刺激では

アミラーゼ分泌が促進された。CCh 刺激によるカルセイン放出は、腺房からのものに比べ、単離腺房細胞からのものが顕著であった。A23187 刺激によるカルセイン放出も CCh と同様に、腺房に比べ単離腺房細胞で顕著であった。一方、IPR 刺激により単離腺房細胞よりも腺房からアミラーゼが多く分泌された。dibutyryl cyclic AMP 刺激によるアミラーゼ分泌も単離腺房細胞よりも腺房で顕著であった。耳下腺からの細胞内カルシウム濃度上昇を介するカルセイン分泌と、cyclic AMP 産生を介するアミラーゼ分泌に対し、ギャップ結合細胞間連絡による、抑制的と促進的に働く二種類の異なる調節機構が存在すると考えられる。

## 文 献

- Case, R.M., Conigrave, A.D., Novak, I. and Young, J.A.: Electrolyte and protein secretion by the perfused rabbit mandibular gland stimulated with acetylcholine or catecholamines. *J. Physiol. (Lond.)* **300**, 467-487, 1980.
- Gallacher, D.V. and Petersen, O.H.: Stimulus-secretion coupling in mammalian salivary glands. *Int. Rev. Physiol.* **28**, 1-52, 1983.
- Williams, J.A., Korc, M. and Dormer, R.L.: Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated acini. *Am. J. Physiol.* **235**, E517-E524, 1978.
- Baum, B.J.: Neurotransmitter control of secretion. *J. Dent. Res.* **66**, 628-632, 1987.
- Nauntofte, B.: Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am. J. Physiol.* **263**, G823-G837, 1992.
- Petersen, O.H.: Stimulus-secretion coupling: Cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol.* **448**, 1-54, 1992.
- Butcher, F.F., Goldman, J.A. and Nemerovski, M.: Effect of adrenergic agents on  $\alpha$ -amylase release and adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in rat parotid slices. *Biochem. Biophys. Acta.* **392**, 82-94, 1975.
- Quissell, D.O., Watson, E. and Dowd, F.J.: Signal transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **3**, 83-107, 1992.
- Kanno, Y. and Loewenstein, W.R.: Low resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space. *Nature* **201**, 194-195, 1964.
- Meda, P., Bruzzone, R., Knodel, S. and Orci, L.: Blockage of cell-to-cell communication within pancreatic acini is associated with increased basal release of amylase. *J. Cell Biol.* **103**, 475-483, 1986.
- Sasaki, Y., Shiba, Y. and Kanno, Y.: Suppression of intercellular communication in acinar cells from rat submandibular gland by cholinergic and adrenergic agonists. *Jpn. J. Physiol.* **38**, 531-543, 1988.
- Dermietzel, R., Leibstein, A., Frixen, U., Janssen-Timmen, U., Traub, O. and Willecke, K.: Gap junctions in several tissues share antigenic determinants with liver gap junctions. *EMBO J.* **3**, 2261-2270, 1984.
- Hertzberg, E.L. and Skibbens, R.V.: A protein homologous to the 27,000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissues. *Cell* **39**, 61-69, 1984.
- Meda, P., Chanson, M., Peper, M., Giordano, E., Bosco, D., Traub, O., Willecke, K., Aoumari, A., Gros, D., Beyer, E.C., Orci, L. and Spray, D.C.: In vivo modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells. *Exp. Cell Res.* **192**, 469-480, 1991.
- 菅野義信: ギャップ結合の構造と機能; イオンチャンネル1 (東田陽博編). メジカルビュー社, 東京, 144-154, 1993.
- Bernfeld, P.: Amylases, alpha and beta. In: *Methods in Enzymology*. ed. Colowick SP and Kaplan NO, Academic Press, New York, pp 149-158, 1955.
- Shiba, Y., Sugita, M., Hirono, C., Sasaki, Y. and Kanno, Y.: Salivary secretion and gap-junction permeability in the rat submandibular gland. In: *Salivary secretion-Control and mechanisms*. ed. Murakami M, Seo Y and Ishikawa T, National Institute for Physiological Sciences., Okazaki, Japan, pp 41-44, 1992.
- Hertzberg, E.L. and Gilula, N.B.: Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 2138-2147, 1979.
- Hertzberg, E.L.: A detergent-independent procedure for isolation of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **259**, 9939-9943, 1984.
- Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**, 315-325, 1993.
- Merritt, J.E. and Rink, T.J.: Rapid increases in cytosolic free calcium in response to muscarinic stimulation of rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 4958-4960, 1987.
- Hughes, A.R., Takemura, H. and Putney, J.W.Jr.: Kinetics of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol cyclic 1,2,4,5-triphosphate metabolism in intact rat parotid acinar cells. Relationship to calcium signalling. *J. Biol. Chem.* **263**, 10314-10319, 1988.
- Berglindh, T., DiBona, D.R., Ito, S. and Sachs, G.: Probes of parietal cell function. *Am. J.*

- Physiol.* 238, G165-G176, 1980.
- 24) Okada, Y. and Ueda, S.: Electrical membrane responses to secretagogues in parietal cells of the rat gastric mucosa in culture. *J. Physiol. (Lond.)* 354, 109-119, 1984.