

広大科研  
19  
17591939  
0100453979

---

変異体の機能解析による唾液腺  
 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体活性制御機構の解明

---

17591939

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 廣野 力

広島大学図書

0100453979



歯科学院医歯薬学総合研究科助教授

## はじめに

本研究報告書は平成17年度～平成18年度科学研究費補助金による（基盤研究（C））「変異体の機能解析による唾液腺 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体活性制御機構の解明」の研究成果をとりまとめたものである。

唾液中の水分は唾液成分の99%を占め、重炭酸イオン、アミラーゼ、ムチン、抗菌物質や成長因子など健康な口腔機能を維持・発現するために必要な唾液成分や味覚の発現のための溶媒としての役割、洗浄作用、円滑作用などに必要である。唾液腺における電解質輸送は間質（組織液）より唾液の水分を同時に引き込むため、その輸送制御機構解明は唾液分泌の制御機構解明と直接結びつく。

本研究では、イオンチャネルと共に唾液腺電解質輸送の中心的役割を演じている $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の活性制御機構を解明する目的で開始した。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体は $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ と2個の $\text{Cl}^-$ を同時に細胞内に取り込むが、その輸送活性は我々が開発した生理的条件下で分泌時の $\text{Cl}^-$ 取り込み活性と細胞内 $\text{Cl}^-$ 濃度を単一細胞で同時測定できる新しいパッチクランプ法で測定した。これは、電極からの $\text{Cl}^-$ イオン供給のないグラミシジン穿孔パッチクランプ法を唾液腺分泌細胞に適用し、これまで単一細胞では測定不可能だったイオン供給活性を反映した $\text{Cl}^-$ 分泌を電流として実時間的に測定する方法である。また、従来の生化学的な $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体活性測定法では活性化初期の過渡的な変化しか測定していないが、本法では $\text{Cl}^-$ イオン分泌時の定常状態でも測定できる。細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、 $\text{cAMP}$ 濃度や $\text{Cl}^-$ 濃度による輸送体活性制御を細胞・分子レベルで分離解析し、これらの因子による制御機構の相互関係を明らかにすることで、唾液腺等外分泌腺の水分分泌を駆動する $\text{Cl}^-$ 分泌の $\text{Cl}^-$ 供給調節機構を明らかにすることを目指している。

ところが、分泌細胞では $\text{Ca}^{2+}$ や $\text{cAMP}$ で $\text{Cl}^-$ チャネルも $\text{Cl}^-$ 輸送体も活性化される。  $\text{Cl}^-$ チャネルの開口で細胞内の $\text{Cl}^-$ 濃度が低下するので、 $\text{Cl}^-$ 輸送体活性が変化し



ても、その原因が細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度やcAMP濃度の上昇なのか細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の低下なのかが分からない。これまでのラット耳下腺腺房細胞Cl<sup>-</sup>輸送の解析はこの点が考慮されていなかった。そこで細胞内Ca<sup>2+</sup> やcAMP濃度と無関係にCl<sup>-</sup>チャネルを開閉させるために培養細胞に人工イオンチャネルを組み込む方法も検討した。今後、この方法とNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体野生型・変異型の遺伝子導入を併用し、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体に対する細胞内Ca<sup>2+</sup> やcAMPの影響、および、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体活性の細胞内Cl<sup>-</sup>濃度依存性を分子レベルで分離解析し、Cl<sup>-</sup>輸送体活性調節機構の解明を進めて行く。

## 研究組織

研究代表者： 廣野 力 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授)

研究分担者： 柴 芳樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授)

研究分担者： 杉田 誠 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手)

研究分担者： 岩佐佳子 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手)

## 交付決定額(配分額)

金額単位 (円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2,300,000	0	2,300,000
平成18年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,300,000	0	3,300,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

広野 力：唾液腺の電解質輸送，日本薬理学会誌，vol.127，No.4，  
2006年4月

### (2) 口頭発表

広野 力，杉田 誠，岩佐佳子，柴 芳樹：カルバコールによるラット耳下腺導管細胞の $\text{HCO}_3^-$ 電流応答の多様性．第47回歯科基礎医学会学術大会，2005年9月30日

広野 力：電解質輸送と唾液腺機能評価．第79回日本薬理学会年会，

2006年3月10日

広野 力, 新谷隆英, 杉田 誠, 岩佐佳子, 柴 芳樹 : カルバコール刺激でラット耳下腺腺房細胞から分泌されるCl<sup>-</sup>電流のイソプロテレノールおよびフォルスコリンによる抑制, 第80回歯科基礎医学会学術大会, 2006年9月23日

C. Hirono: Regulation of Cl secretion by muscarinic cholinergic and adrenergic stimulation in acinar cells of rat salivary glands.  
3<sup>rd</sup> International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen, Oct 22, 2006.

広野 力、新谷 隆英、杉田 誠、岩佐 佳子、柴 芳樹 : ラット耳下腺腺房細胞でノルエピネフリンにより誘発される振動性Cl<sup>-</sup>分泌のβ受容体刺激を介する抑制, 第84回日本生理学会大会, 2007年3月20日

# 研究成果

## I. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の機能解析に適した細胞系の確立に関する研究

### 概要

野生型の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体とcAMP依存性のCl<sup>-</sup>チャネルであるCFTR Cl<sup>-</sup>チャネルを有することが報告されている培養細胞MDCKとCalu-3の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体活性をグラミシジン穿孔パッチ陰イオン電流解析法によりイオン電流として測定した。細胞内cAMPを上昇させるためフォルスコリン + IBMXで刺激したところ、Calu-3細胞では内向きの陰イオン電流が記録され、Cl<sup>-</sup>チャネルの透過性増大による陰イオン電流の誘導が示唆されたが、電流の持続性は低く、輸送体活性の解析にはこのままでは適さないと思われた。

ラット耳下腺腺房細胞やCalu-3細胞よりさらに扱いやすいHEK294細胞に $\text{Ca}^{2+}$ ・cAMPシグナル系の影響を受けない人為的なCl<sup>-</sup>チャネルを組み込み、イオン電流が誘発されることを示した。

HEK294細胞はヒト由来でありヒトの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体を発現しているため、ヒトの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体に対する抗体で染色された。この細胞に陽イオン性合成脂質リポソームを使用してラットの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体遺伝子を導入するにあたり、導入を確認するため、ラットの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体に対する抗体を使用した。その結果、ラットの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体蛋白質が発現することが蛍光抗体法で確認された。今後、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  共輸送体野生型・変異型の遺伝子導入細胞で、Cl<sup>-</sup>輸送体活性調節機構の解明を進めて行く。

### 1. 目的

唾液腺細胞からの Cl<sup>-</sup>分泌は唾液中の水・電解質の分泌を引き起こす中心的な役

割を持っている。Cl<sup>-</sup>分泌では分泌の出口で唾液腺細胞の腺腔側にあるイオンチャネルのほかに、Cl<sup>-</sup>を細胞内に取り込む Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体が重要である。一般に、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体の活性は、基質としての Cl<sup>-</sup>とは別に細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度に依存し、分泌に伴う細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度の低下により結合蛋白の活性化がおり、その結果 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体蛋白の特定部位がリン酸化されることが、共輸送体を活性化しているとされている。一方、ラット唾液腺の腺房細胞では、細胞内 Cl<sup>-</sup>濃度低下よりはむしろ Ca<sup>2+</sup>・cAMP の両シグナル系で共輸送体が活性化されると報告されているが、唾液腺ではそれぞれの活性化因子を独立に変化させにくく、各因子間の関連も含めた分子機構は不明な点が多い。本研究では、培養細胞の発現系で Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体の Cl<sup>-</sup>輸送機能を野生型と変異型で比較解析することにより、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体活性の制御機構の解明を目指している。

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体の遺伝子NKCC1を培養細胞に導入して機能解析を行うにあたり導入に適した細胞を選択する目的で、遺伝子導入前のMDCK細胞、Calu-3細胞および HEK294細胞にパッチクランプ法を適用し内在性のCl<sup>-</sup>分泌機能をイオン電流を測定した。

次に、ラットのNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体遺伝子（野生型）を導入するにあたり、導入効率のよい培養細胞を使用するため、野生型のNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体(NKCC1)遺伝子を含むプラスミド（変異型作製のための実験を参照）を用いNKCC1遺伝子の導入効率を調べた。

## 2. 方法

### (1) 培養細胞の調製

#### MDCK細胞

ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、シグマ）に5%牛胎児血清とペニシリン

ン+ストレプトマイシンを規定濃度となるように添加したものを培養液とした。細胞を継代の後トリプリン溶液で培養ディッシュより剥離・分散させKHR (Krebs-Henseleit Ringer:103mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.6mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8mM Glucose, 4.9mM Na-pyruvate, 2.7mM Na<sub>2</sub>-fumarate, 4.9mM Na-glutamate, 12.5mM HEPES, pH=7.4)中でパッチクランプによる測定を行った。

#### Calu-3細胞

DMEM/F-12 1:1 混合液に5%ないし10%牛胎児血清とペニシリン+ストレプトマイシンを規定濃度となるように添加したものを培養液とした。細胞を継代の後トリプリン溶液で培養ディッシュより剥離・分散させKHR中で測定した。

#### HEK294細胞

DMEMに5%ないし10%牛胎児血清とペニシリン+ストレプトマイシンを規定濃度となるように添加したものを培養液とした。細胞を継代の後トリプリン溶液で培養ディッシュより剥離・分散させKHR中で測定した。

### (2) イオン電流の測定

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体で運び込まれるイオン量は本来+-のion fluxが打ち消しあって電流として測れないが、グラミシジン穿孔パッチ陰イオン電流解析法では、電極の先端に一価の小陽イオンのみを通すグラミシジンポアを形成させ、細胞のCl<sup>-</sup>チャネルを開口させることで、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体から流入した+-のion fluxを振り分ける。電極には陰イオンのfluxと大きさの等しい陽イオンのfluxが流れ込むので、陰イオンのflux (分泌) を陽イオン電流として測定めあできる。この方法で分泌時の共輸送体活性を持続的に測定することができる。さらに、チャネル透過性の変化をモニターするために、電圧にパルスを重ね

させてコンダクタンスの変化も調べた。

電極はボロシリケートガラスキャピラリー(Sutter Instrument; B150-110-10)をパッチクランプ電極作成用のプラー(成茂科学; PP-83)で引き、先端を電熱線で加熱することにより滑らかにした後、ピペット内溶液(150mM KCl, 10mM HEPES, 0.1mg/ml gramicidin, pH7.2)を満した。この電極をホルダーを介してマニプレーター(成茂科学; MWO-3, OM-102)に取り付け倒立顕微鏡下で細胞表面に接触させたのち陰圧を掛けてシールを形成した。

細胞外液は通常は連続的に灌流し、薬物投与は灌流液中に薬物を添加することで行った。ただし、人工イオンチャネルを形成させるペプチドの添加実験では外液の灌流を停止し、高濃度の薬物原液をバスに滴下することで行った。

### (3) NKCC1遺伝子導入法

#### プラスミドの増殖

pBK-CMV発現ベクターに組み込まれた野生型 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送遺伝子プラスミドをNational Institute of Dental and Craniofacial ResearchのJames Turner博士より入手し、大腸菌コンピテントセル(Competent High DH5 $\alpha$ , Toyobo) DH5 $\alpha$ に取り込ませたものを、カナマイシン選択寒天培地上で37°C 1日培養後に出現したコロニーを5ml培地で1日増殖させた。菌体を遠心で回収後、キアーゲン社のMini prepで精製し、制限酵素による分解産物のアガロース電気泳動を行って、泳動パターンよりプラスミドに $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送遺伝子が含まれていることを確認した。続いてプラスミドを含む菌体を250ml培地で37°C 24時間増殖させた。遠心により回収した菌体からpBK-CMV-NKCC1プラスミドを精製キット(Maxi Prep, Qiagen)を用いて精製した。一部を制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動によりNKCC1遺伝子の分子量を確認した(図1)。具体的には、制限酵素EcoR1とXba1で処理したものを泳動し既知のサイズのDNAのサイズマーカーのバンドの位置と比較することにより、分解産物の3週類のバンドは

4.2kbase, 2.9kbase, 1.2kbaseであり、分子量の面からはpBK-CMV-NKCC1がほぼ正しく複製されている可能性が高いことが示された。

#### 培養細胞への遺伝子導入

遺伝子導入時に細胞密度が40–90%になるように調製した培養細胞懸濁0.5 mlを24wellプレートに播種し、一晚培養した。無血清のDMEM30  $\mu$  lにプラスミド1  $\mu$  gを加えてピペティングでよく混和し、陽イオン性合成脂質からなるカチオン性リポソームを含むtransfection試薬HilyMax（同仁化学）4  $\mu$  lを加えピペティングでよく混和し、15分間静置した。混合液を24wellプレートの1wellに加え、細胞全体に行き渡るようにプレートを数回振とうした。場合によって2–4時間後に培地交換を行い、1–2日培養後、蛍光抗体法による染色等を行った。

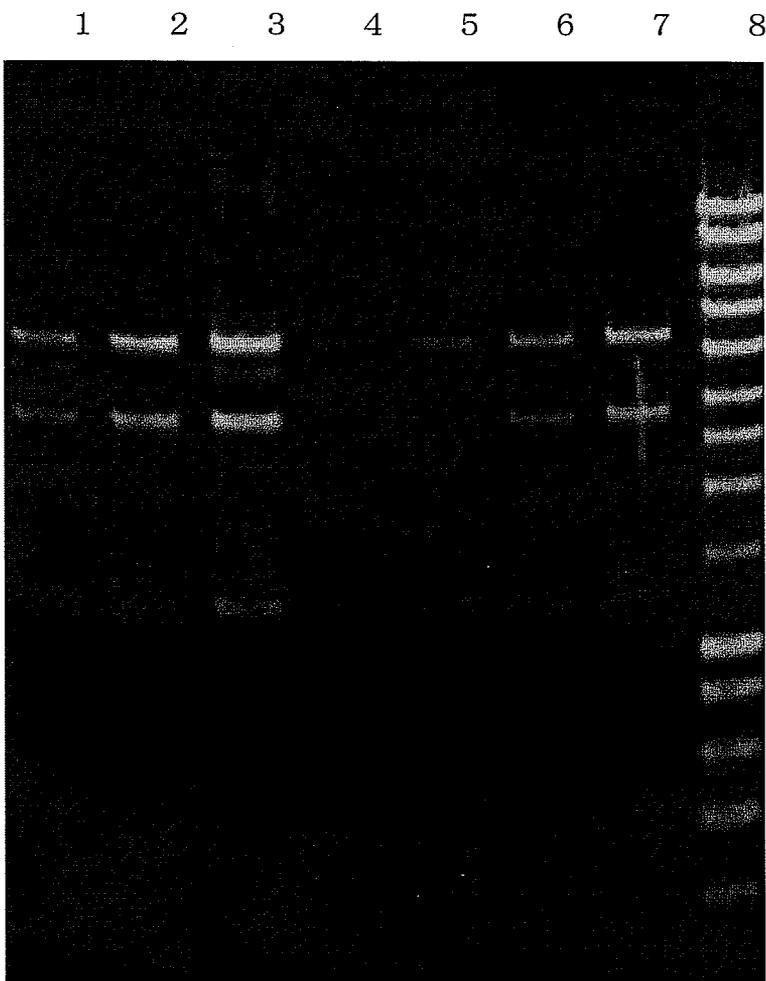


図1 大腸菌 (Competent High DH5 $\alpha$ , Toyobo) 内で増殖させたpBK-CMV-NKCC1プラスミドを精製後、制限酵素で切断したもののアガロースゲル電気泳動パターン。大腸菌 (Competent High DH5 $\alpha$ , Toyobo) 内で通法に従って大量増殖させたpBK-CMV-NKCC1プラスミドを精製キット (Maxi Prep, Qiagen) を用いて精製した。一部を制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動によりNKCC1遺伝子の分子量を確認した。lane 1, 2, 3は1回目に回収したプラスミドそれぞれ0.5 $\mu$ l, 1 $\mu$ l, 2 $\mu$ l制限酵素EcoR1とXbaR1で処理したものを泳動した。Lane4, 5, 6, 7は2回目の回収実験で得られたプラスミド0.2 $\mu$ l, 0.5 $\mu$ l, 1 $\mu$ l, 2 $\mu$ l用いて同様に処理した。Lane 8はDNAのサイズマーカーで上から10k, 8k, 6k, 5k, 4k, 3k, 2.5k, 2k, 1.5k, 1kbase (以下省略) である。EcoR1とXbaR1で3週類のバンド4.2kbase, 2.9kbase, 1.2kbaseが見られ、分子量の面からはpBK-CMV-NKCC1がほぼ正しく複製されている可能性が高いことが示された。サイズマーカーの量は上から200 $\mu$ g, 160 $\mu$ g, 120 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, 80 $\mu$ g, 60 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 40 $\mu$ g, 30 $\mu$ g, 20 $\mu$ g (以下省略) である。これらより、1回目の回収時のプラスミド濃度は120ng/ $\mu$ l, 2回目は60ng/ $\mu$ lと推定された。

#### (4) 蛍光抗体法

##### rNKCC1の染色

1 - 2 日培養した細胞を含む24wellプレートの培養液を捨て、 $-20^{\circ}\text{C}$ に冷却したエタノール0.5mlを加え、30秒後にエタノールを除去し、0.4%TritonX100/PBSで2回洗浄した。1%牛血清アルブミン (BSA) /PBS 0.5 mlで1時間ブロッキングした後、200倍希釈したRabbit Anti-rNKCC1抗体を 1% BSA + 0.4%Triton X 100/PBS 0.2 ml 2時間反応させ、0.4%TritonX100/PBSで3回洗浄後、Anti-Rabbit IgG-FITC Conjugate 0.2mg/0.5ml(sc-2012, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を200倍希釈したものを1時間作用させた。洗浄後、90%グリセリン/PBSを滴下して倒立蛍光顕微鏡 (Nikon, Diaphot) 下でB励起にて24wellプレートのまま蛍光像を観察した。対物レンズは20倍を用い、顕微鏡用デジタルカメラ (Nikon, Digital Sight DS-L1) にて撮影した。

##### hNKCC1の染色

ヒトのNKCC1の染色には、Goat Anti-hNKCC1抗体 (NKCC1(N-16):sc-21545, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を 1% BSA + 0.4%TritonX-100/PBS 0.2 ml 2時間反応させた。2次抗体はAlexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) conjugate 2mg/ml (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.)を1% BSA + 0.4% TritonX 100/PBS 0.2 mlで200倍希釈して使用した。

### 3. 結果

#### (1) Forskolin刺激に対する応答

Forskolin刺激時にCalu-3細胞ではコンダクタンスの増加と共に内向き電流

が誘導された (図 2)。この電流は持続性がなく、イオン種の解析には至らなかったが、膜電位を 5 mV のパルス重畳時以外は  $K^+$  の平衡電位の  $-80\text{mV}$  に保持しているため、陰イオン電流 (おそらく  $Cl^-$  電流) と推定される。他の培養細胞では、forskolin 刺激でイオン電流は殆ど誘導されなかった。

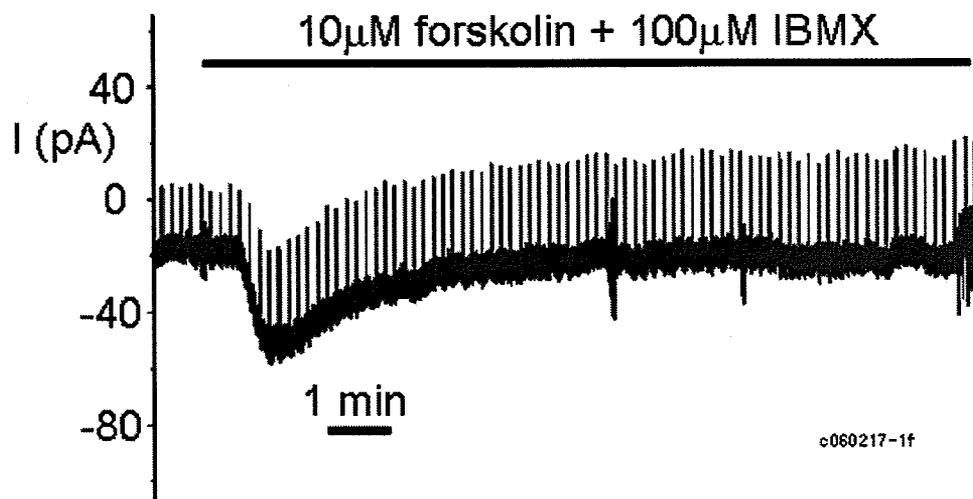


図 2 Calu-3細胞で $10\mu\text{M}$  forskolin +  $100\mu\text{M}$  IBMXにより誘導された内向き電流とコンダクタンスの増加。

## (2) 人工 $Cl^-$ チャネルの細胞膜への組み込みによるイオン電流の誘導

グリシン受容体のイオンチャネル部のチャネルポアを形成するアミノ酸配列一部に変更を加えたペプチド T19R,S22W (KKKKPARVGLGITTVLTMRTQW) は細胞外からの投与で細胞膜に組み込まれて陰イオン透過性の人工イオンチャネルを形成する (Biophys J. 15;90:2138-2150, 2006)。このペプチドを最終濃度が  $35\mu\text{M}$  となるように希釈して加えると添加後数分以内でコンダクタンスの増加を伴う内向きイオン電流が誘発された。しかし、この電流は一過性で

あった。(図3)

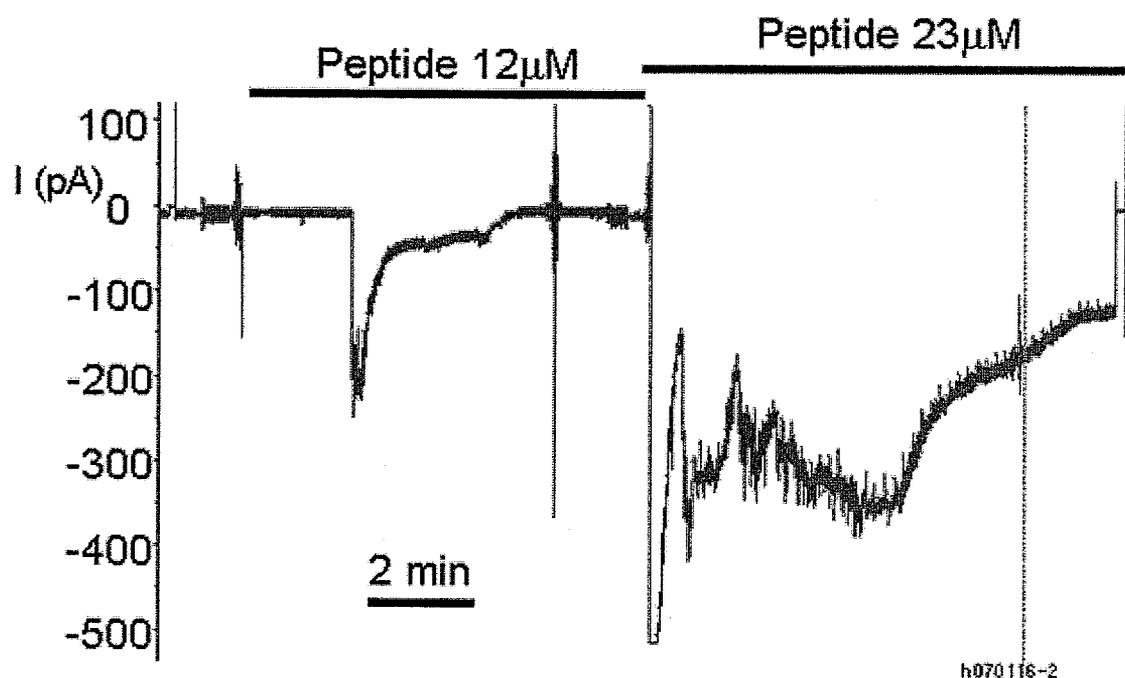


図3 HEK293細胞（遺伝子導入前）に外液からペプチドを作用させ、Cl<sup>-</sup>透過性的人工イオンチャネルを細胞膜に形成させたときの一過性内向きイオン電流。ペプチドは灌流を停止したバスに直接滴下した。図中のペプチド濃度はバス中の外液（KHR）で希釈されたと仮定した場合の最終濃度を示す。

### (3) rNKCC1の染色

rNKCC1導入前の培養細胞（HEK293とMDCK）はヒトのNKCC1（hNKCC1）抗体では染色されたが（図4，5）、rNKCC1抗体では染色されなかった（図6，7）。rNKCC1導入後はrNKCC1抗体で染色された細胞が、HEK293では約50%（図8，9）観察された。MDCKでもrNKCC1導入前はrNKCC1抗体で染色されないが（図10

, 1 1)、導入後は約10%程度の染色が見られた(図1 2, 1 3)。なお、撮影は24wellプレートの底部を介して励起光を照射しているため、写真では比較的明るく染まっている細胞のみの蛍光像が見えている。

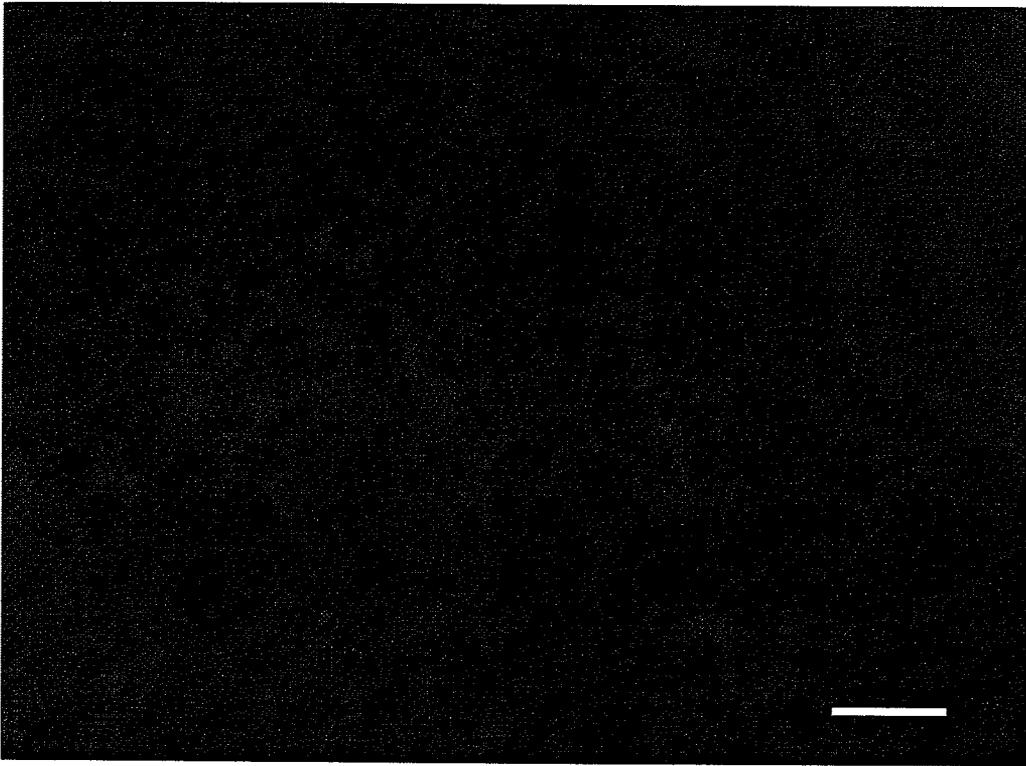


図4 HEK293の内在性NKCC1のhNKCC1染色像。バーは50 $\mu$ m。 01010



図5 図4の透過像。同倍率。

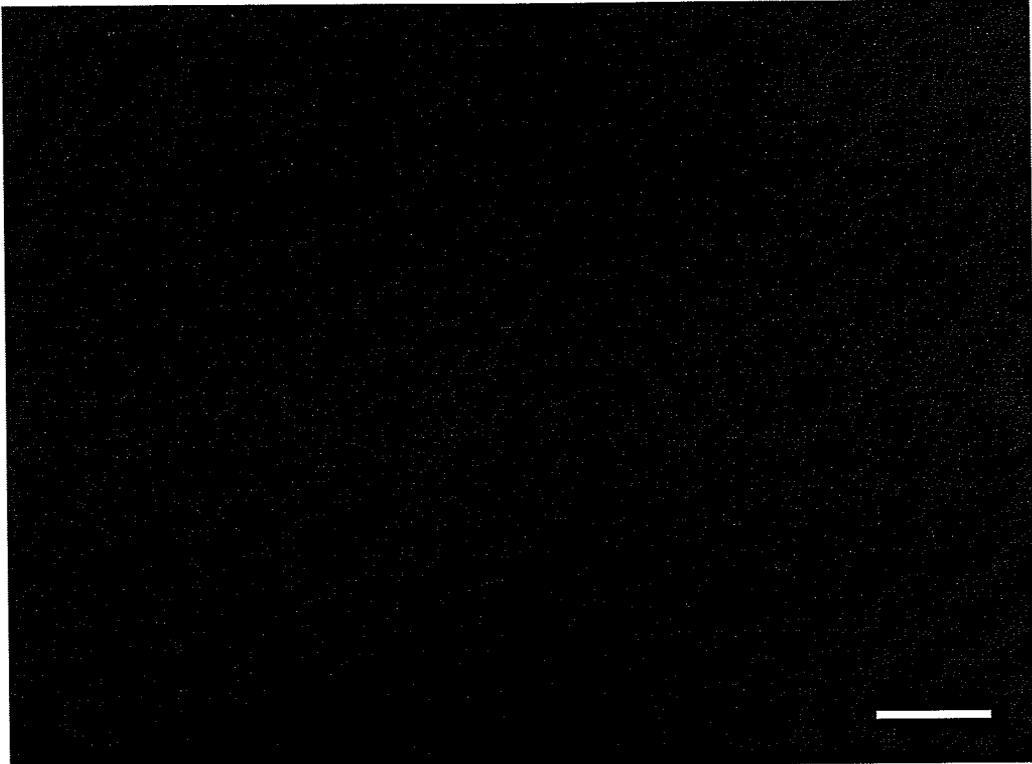


図6 遺伝子導入前のHEK293のrNKCC1染色像。バーは50 $\mu$ m。 021014

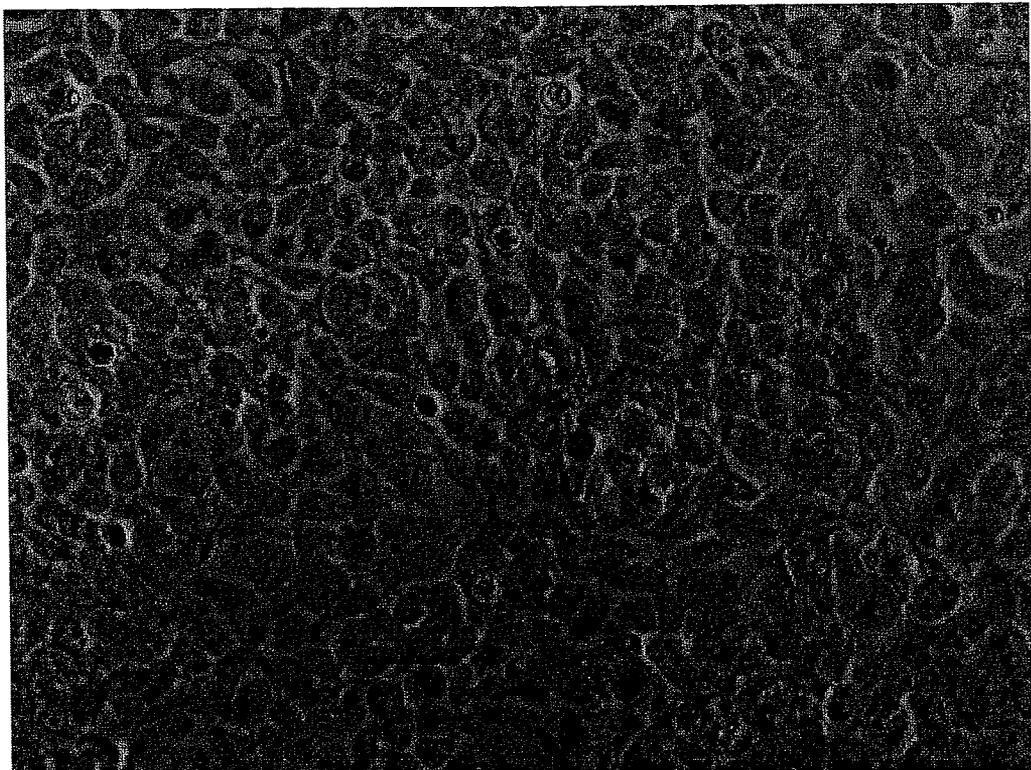


図7 図6の透過像。同倍率。

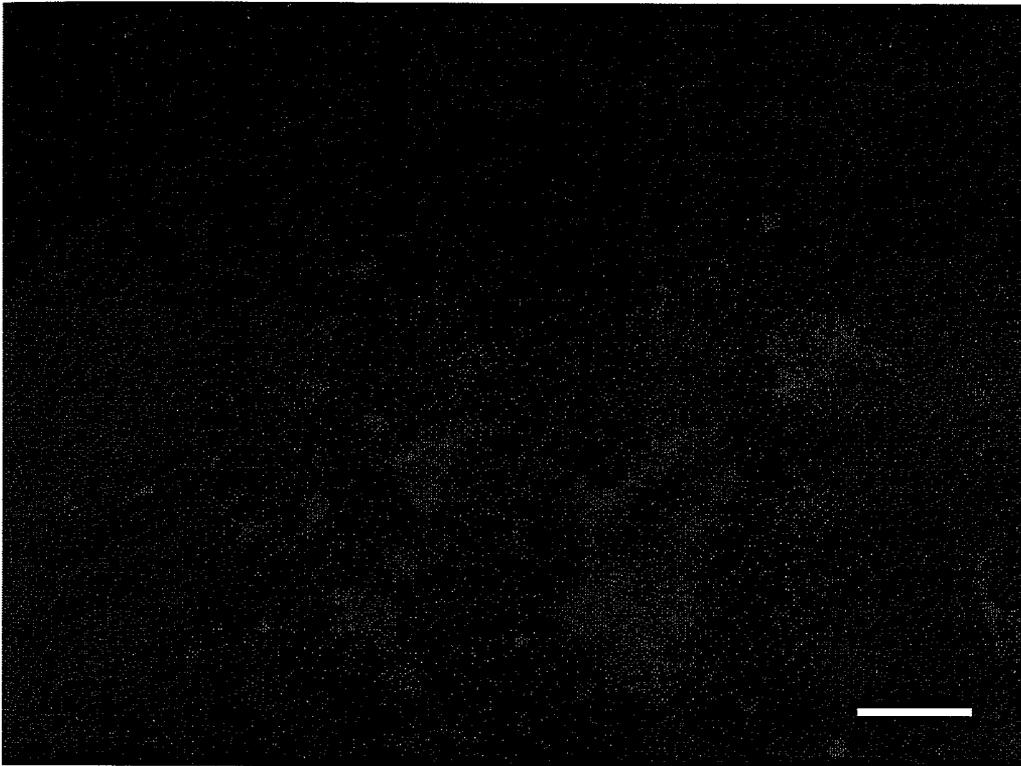


図8 rNKCC1遺伝子を導入したHEK293のrNKCC1染色像。バーは50 $\mu$ m。02025

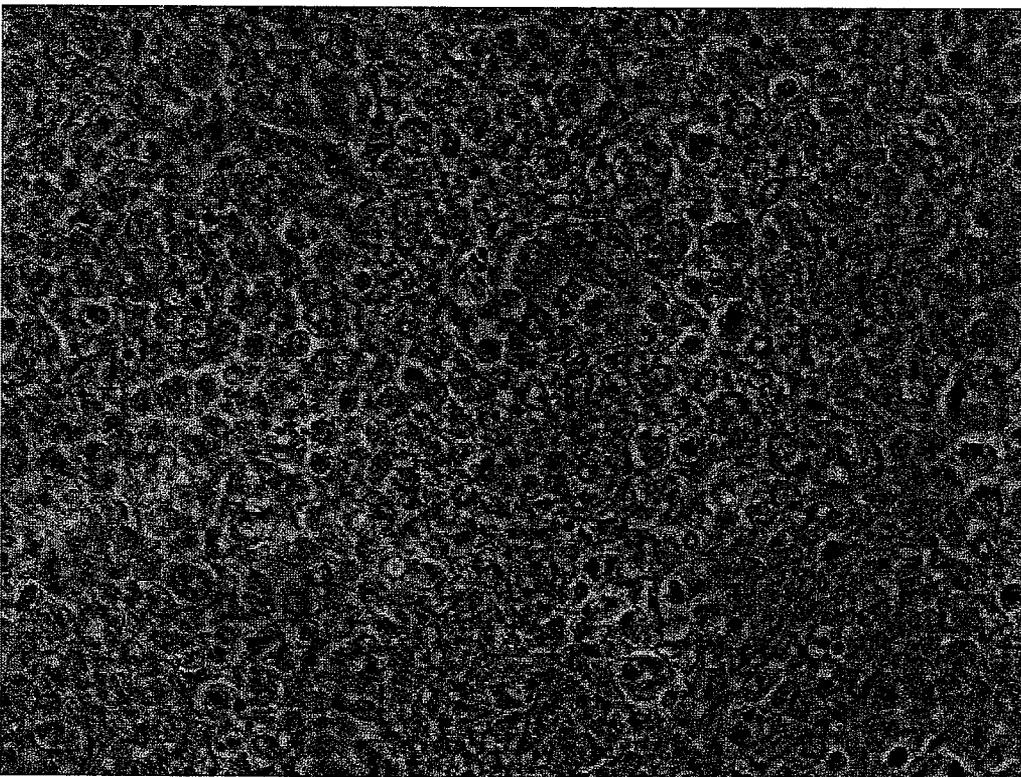


図9 図8の透過像。同倍率。

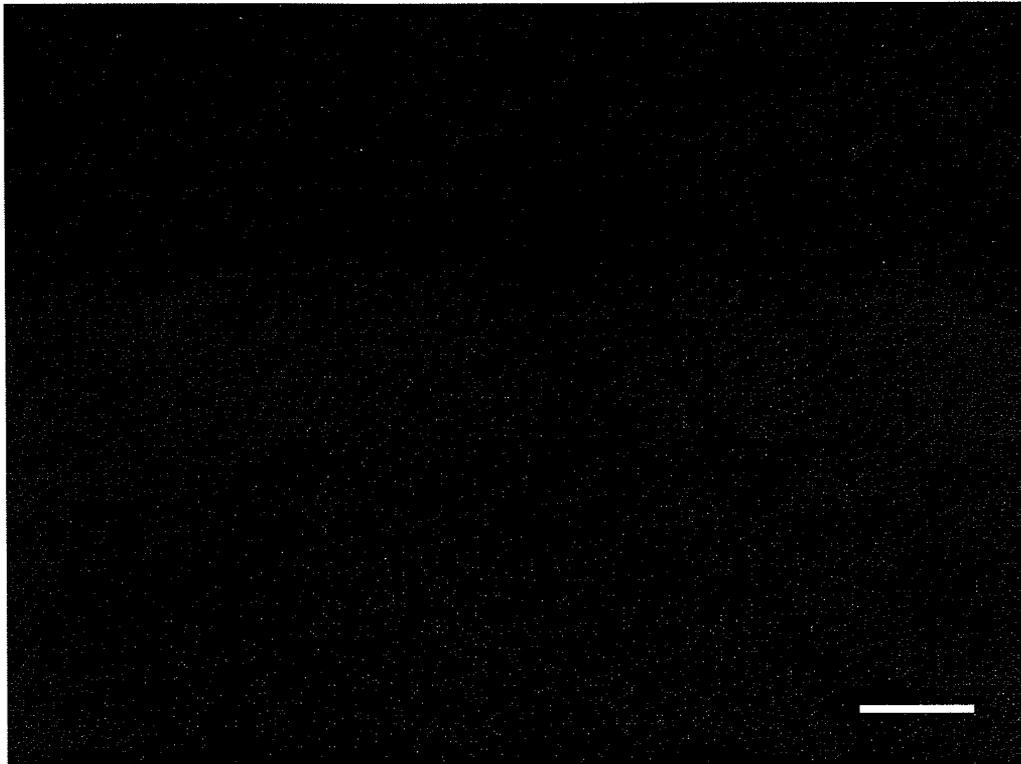


図10 遺伝子導入前のMDCKのrNKCC1染色像。バーは50 $\mu$ m。14234016

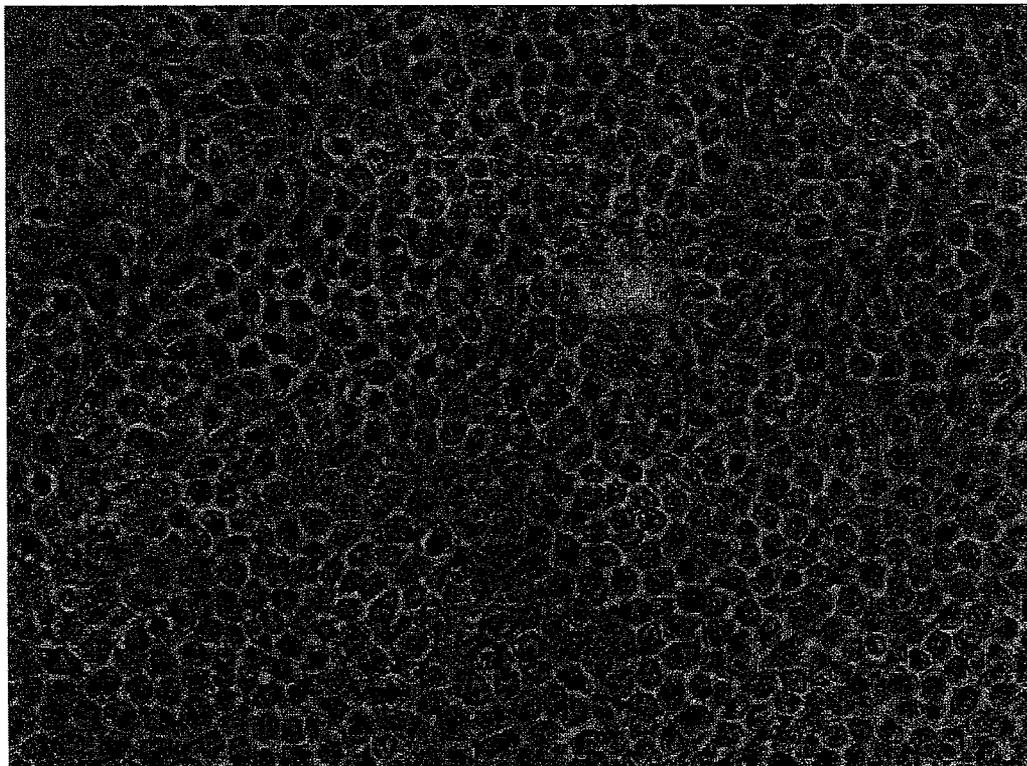


図11 図9の透過像。同倍率。

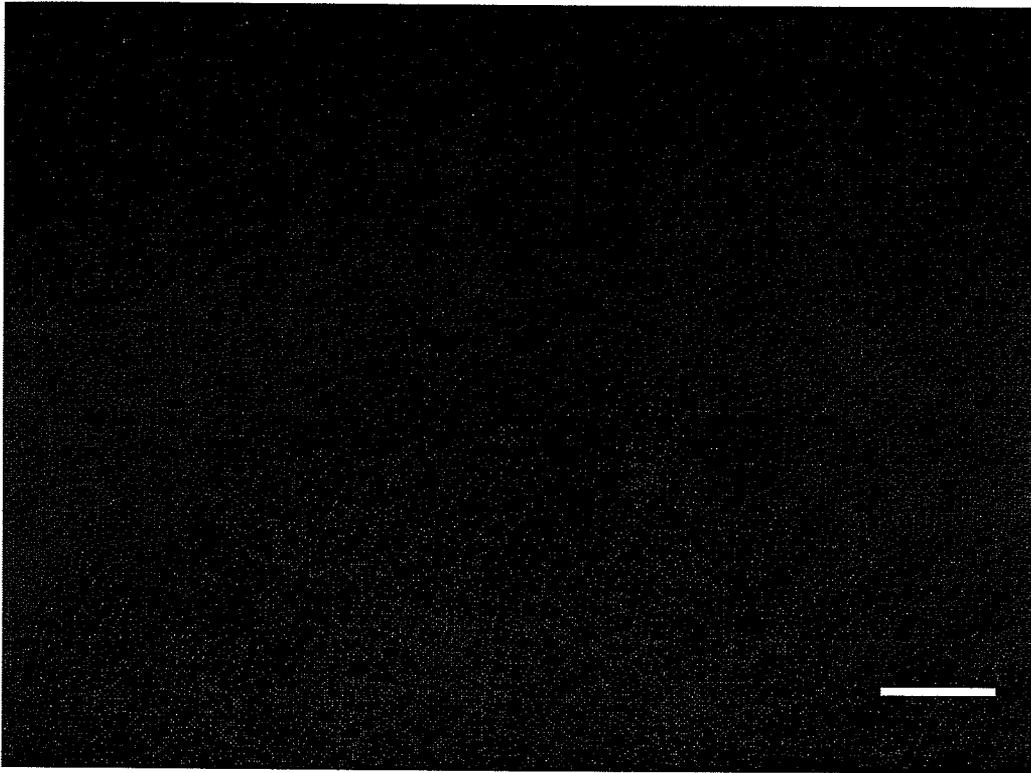


図 1 2 rNKCC1遺伝子を導入したMDCKのrNKCC1染色像。バーは50 $\mu$ m。14233012

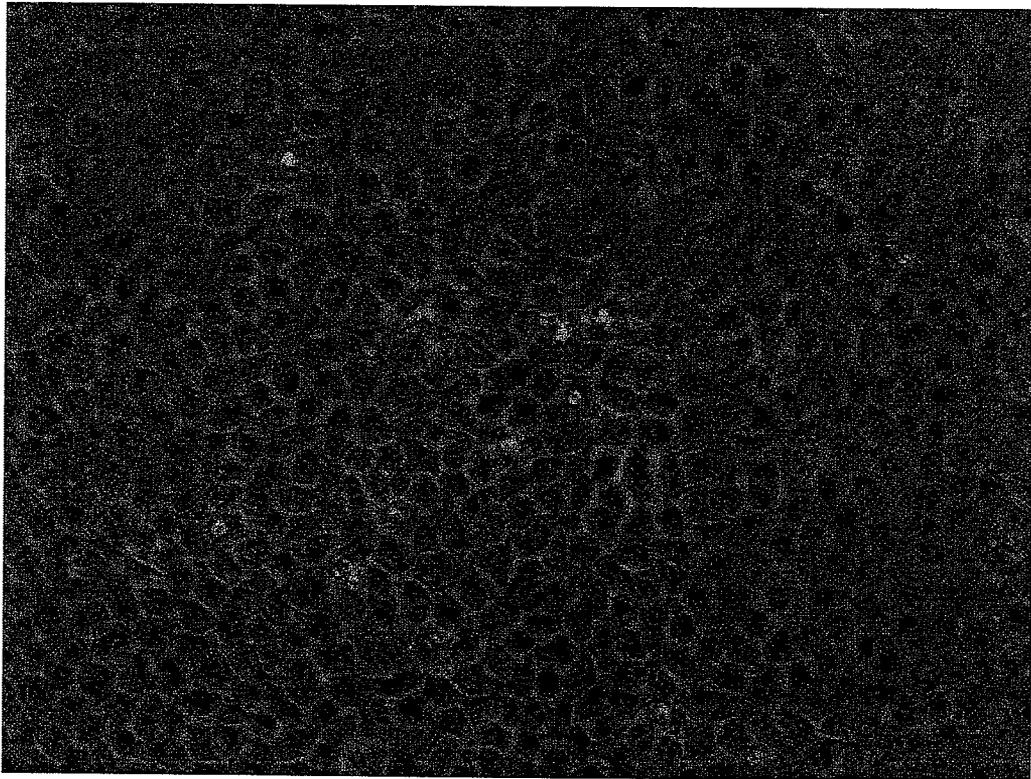


図 1 3 図 1 2 の透過像。同倍率。

#### 4. 考察

本研究で使用した3種類の培養細胞を比較すると、取り扱いの容易さの点からはHEK293細胞が最も優れており、Calu-3が最も扱いにくかった。遺伝子導入効率はHEK293細胞がMDCK細胞より優れていた。パッチクランプ法の適用はどの細胞でも可能であった。従って、HEK293細胞が3種類の中では最適と思われる。

フォルスコリン刺激や人工イオンチャネルの投与では一過性のイオン電流が誘発された。コンダクタンスが増加しているにもかかわらずイオン電流(分泌)が持続しないことは、持続的なイオンの取り込みがない、即ち、イオン輸送体が活性化されているとしても、その機能活性が低いことを示唆する。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送遺伝子導入による輸送体機能の解析に適してしる細胞系である可能性が高いことが期待される。

本研究により野生型の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送遺伝子プラスミドを培養細胞に導入する方法と発現している機能の測定を行う実験系はほぼ確立できた。今後は、遺伝子導入により機能発現している細胞の選択的機能測定、ないし、遺伝子導入した細胞群の集合のままの機能測定法の確立並びに変異型遺伝子作製とその発現系を用いた細胞のイオン輸送活性変化の分子レベルの解析実験を行っていく。

## II. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体（野生型） $\text{Cl}^-$ 輸送活性調節機構の解明

### 概要

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 $\text{Cl}^-$ 輸送活性の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性およびcAMP依存性等機能解明の唾液腺腺房細胞における可能性を検討するため、カルバコール(CCh)刺激時 $\text{Cl}^-$ 電流に対する $\beta$ 受容体刺激効果、および、ノルアドレナリンによる $\alpha$ 受容体・ $\beta$ 受容体同時刺激の効果を調べた。

グラミシジン穿孔パッチ記録下で耳下腺および顎下腺の分離腺房細胞をムスカリン性アセチルコリン受容体作用薬のCChで刺激すると振動性内向き電流が誘導された。この電流は $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体阻害剤のブメタニドで抑制されたので、電流のキャリアーは $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体で細胞内に供給される $\text{Cl}^-$ であることが示された。電流の振幅が安定した5-7分後に $\beta$ 受容体作用薬のイソプロテレノールや細胞内のcAMP産生を亢進させる同様の効果を持つforskolin + IBMXを添加すると振動性電流が抑制された。これより、cAMPはイオンチャネルや $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体の活性を低下させることで、電解質分泌を抑制し、結果的に唾液の水分分泌を減少させることが示唆された。

顎下腺分離腺房細胞を $\alpha$ 受容体刺激のフェニレフリンで刺激するとCCh刺激時と同様の振動性内向き電流が誘導された。この電流は $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体阻害剤のブメタニドで抑制されたので、電流のキャリアーは $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体で細胞内に供給される $\text{Cl}^-$ であることが示された。さらに、 $\beta$ 受容体刺激と同様のcAMP産生促進効果があるフォルスコリン刺激でフェニレフリン誘導振動性内向き電流が減少した。また、 $\alpha$ 受容体・ $\beta$ 受容体の両方を刺激する交感神経伝達物質のノルアドレナリンで誘導される振動性内向き電流は時間と共に振幅が減少するが、この減少は $\beta$ 受容体拮抗薬のプロプラノロールで抑えられた。以上より、 $\alpha$ 受容体刺激で誘導される $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体活性

とCl<sup>-</sup>チャネル活性がβ受容体刺激によるcAMP産生で抑制されることが明らかになった。この機構は交感神経刺激で誘発される唾液分泌量が少ない一要因となっているのであろう。

## I. 目的

唾液分泌は、副交感神経と交感神経の二重支配により調節され、どちらも促進的である。腺房細胞での電解質と水の分泌機構は、神経伝達物質のアセチルコリンやノルアドレナリン(NA)が、それぞれムスカリン性受容体とαアドレナリン受容体に結合し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることから始まる。Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は、腺腔側のCl<sup>-</sup>チャネルを開き、細胞内のCl<sup>-</sup>が腺腔に放出される。Cl<sup>-</sup>が腺腔にK<sup>+</sup>が間質に流出することにより、腺腔内が間質に対して電位的にマイナスになり、この電位勾配に従ってNa<sup>+</sup>が間質から腺腔内に移動しNaClが分泌される。腺腔内のNaClによる浸透圧の上昇により水が間質から腺腔に移動し、水が分泌され、血漿と等張の原唾液となる。Cl<sup>-</sup>分泌によって減少した細胞内Cl<sup>-</sup>を補充するために輸送体が細胞外(間質)からCl<sup>-</sup>などを取り込むことによって電解質・水分分泌が持続する<sup>1-6)</sup>。

一方、NAが、βアドレナリン受容体に結合すると、サイクリックAMP(cAMP)濃度が上昇し蛋白質が分泌され、水分分泌は起こらない。蛋白質の分泌は主に交感神経刺激による分泌顆粒の開口分泌でありβアドレナリン受容体を介する細胞内cAMP濃度上昇によるA-キナーゼの活性化により、アミラーゼを含む分泌顆粒膜が腺腔側の細胞膜と融合し、内容物が放出される。臓器レベルでは、ムスカリン性受容体刺激で誘導される水分分泌はβ受容体刺激により耳下腺では増強、顎下腺では抑制されると報告されている<sup>7,8)</sup>。細胞レベルでは、Cl<sup>-</sup>分泌にはCa<sup>2+</sup>

依存性 Cl<sup>-</sup>チャネル透過性の増大と Cl<sup>-</sup>輸送体活性の亢進が必要である。ムスカリン性受容体刺激で誘導される Cl<sup>-</sup>チャネルの透過性の亢進は、β受容体刺激により耳下腺では増強、顎下腺では抑制される。交感神経βアドレナリン受容体の単独刺激で Cl<sup>-</sup>分泌は起こらないが、細胞内 cAMP 濃度上昇を介して Cl<sup>-</sup>輸送体活性が増大する<sup>9,10</sup> (図 2)。しかし、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇して Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネル透過性が増大し、Cl<sup>-</sup>分泌が起こっている時に cAMP 濃度が上昇すると Cl<sup>-</sup>分泌がどのように変化するかは不明である。

細胞レベルの Cl<sup>-</sup>分泌は Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネル透過性と Cl<sup>-</sup>輸送体活性を反映した Cl<sup>-</sup>電流の測定で解析できる。Cl<sup>-</sup>電流の測定は、ホールセルパッチクランプ法およびグラミシジン穿孔パッチ法などがあり、従来のホールセルパッチクランプ法では電極と細胞間で Cl<sup>-</sup>が自由に行き来でき、Cl<sup>-</sup>が電極から無制限に供給されるので Cl<sup>-</sup>チャネルの透過性のみを反映した Cl<sup>-</sup>電流を測定していることになる (図 1 左)。しかし、今回用いたグラミシジン穿孔パッチ法では、電極先端部が接する細胞膜に形成させたグラミシジンポアは 1 価の低分子陽イオンは通すが陰イオンは通さないので、電極から細胞内に Cl<sup>-</sup>が流入せず、細胞内の Cl<sup>-</sup>等の陰イオン環境は生体内に近い状態に保たれる。また、Cl<sup>-</sup>チャネルから分泌される Cl<sup>-</sup>は、主に、Cl<sup>-</sup>輸送体で細胞内に取り込まれたものとなる。このような原理により、分泌刺激時には Cl<sup>-</sup>輸送体活性と Cl<sup>-</sup>チャネルの透過性の両方を反映した Cl<sup>-</sup>分泌が測定できる<sup>11, 12, 13</sup> (図 1 右)。どちらの場合も、K<sup>+</sup>電流がイオンチャネルを流れないように K<sup>+</sup>の平衡電位の -80mV に固定すれば陰イオン電流のみを測定できる。

本研究では、グラミシジン穿孔パッチ法を用いた Cl<sup>-</sup>電流の解析により、ラットの耳下腺と顎下腺の腺房細胞において細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる (Ca<sup>2+</sup>シグナルを発生させる) ムスカリン性受容体および

$\alpha$  アドレナリン受容体刺激で誘導される  $\text{Cl}^-$  分泌の  $\beta$  アドレナリン受容体刺激 (cAMP シグナル) による調節機構を細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

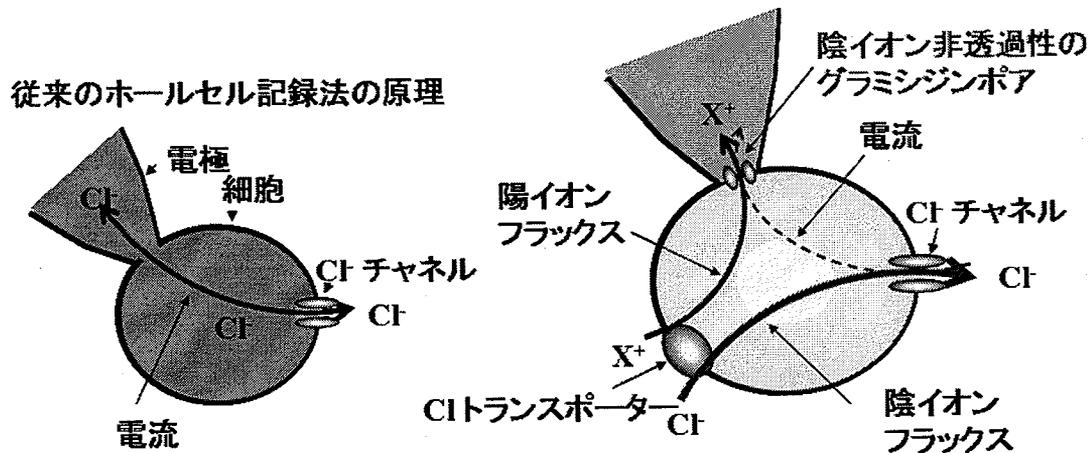


図 1. グラミシジン穿孔パッチ法の原理

ホールセルパッチクランプ法では陰圧により細胞膜を破壊し、電極と細胞間を導通させる。 $\text{Cl}^-$  が電極から無制限に供給されるので  $\text{Cl}^-$  チャンネルの透過性のみを反映した  $\text{Cl}^-$  電流を測定していることになる。グラミシジン穿孔パッチ法では、グラミシジンによって電極と細胞間を導通させる。グラミシジンポアは 1 価の低分子陽イオンは通すが陰イオンは通さないの、電極から細胞内に  $\text{Cl}^-$  が流入せず、細胞内の  $\text{Cl}^-$  等の陰イオン環境は生体内に近い状態に保たれる。また、 $\text{Cl}^-$  チャンネルから分泌される  $\text{Cl}^-$  は、主に、 $\text{Cl}^-$  輸送体で細胞内に取り込まれたものとなる。分泌刺激時には  $\text{Cl}^-$  輸送体活性と  $\text{Cl}^-$  チャンネルの透過性の両方を反映した  $\text{Cl}^-$  分泌が測定できる。

## 2. 材料および方法

### (1) ラット唾液腺腺房細胞の調製方法

雄性 Wistar ラット (310~460g、日本チャールズ・リバー) を、ペントバルビタール (70mg/kg) の腹腔内投与による麻酔の後、耳下腺および顎下腺を摘出した。摘出唾液腺は KHR (Krebs-Henseleit Ringer: 103mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.6mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.1mM  $\text{MgCl}_2$ ,

25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.8mM Glucose, 4.9mM Na-pyruvate, 2.7mM Na<sub>2</sub>-fumarate, 4.9mM Na-glutamate, 12.5mM HEPES, pH=7.4) 中で細切し、0.02% EDTA 溶液 + トリプシン溶液 (0.05%) 4 ml に分散させ、37°C で 7~10 分間処理した。トリプシンを洗浄後、0.16% コラゲナーゼ (新田ゼラチン S-1) 溶液で 37°C、25 分間処理し、ピペッティングにより細胞を分散させた。分散させた細胞をポリ L リジンで表面処理した 5mm カバーガラスに接着させた。

## (2) 電流測定方法

グラミシジン穿孔パッチ法で使用した電極はボロシリケート ガラス キャピラリー (Sutter Instrument; B150-110-10) をプラー (成茂科学; PP-83) で引き、先端を熱処理により滑沢にした後、ピペット内溶液を満たして作製した。電極は 3 次元油圧マイクロマニピュレーター MWO-3 と MO-102 に取り付け倒立顕微鏡下で細胞表面に接触後陰圧によりシールを形成した。最長 20 分までにシリーズ抵抗値が 30MΩ 以下になったものを測定した。ピペット内溶液は、150mM KCl, 10mM HEPES, 0.1mg/ml gramicidin, pH7.2 の組成のものを用いた。実験は室温で行い、チャンバー内を持続的に KHR 溶液で灌流した。データの記録と解析は、A/D コンバーター PowerLab または MacLab (ADInstruments, NSW, Australia) でデジタル化して記録解析ソフトウェア Chart (ADInstruments, NSW, Australia) で行った。有意差の検定は Paired Student's t-test により行った。

## (3) 使用薬物

カルバコール (carbamylcholine chloride, CCh)、イソプロテレロール (DL-isoproterenol hydrochloride, IPR)、プロプラノロール (DL-propranolol hydrochloride, Prop) は、ナカライテスクより、

forskolin、IBMX(3-isobutyl-methylxanthine)、ノルアドレナリン(L-(-)-norepinephrine bitartrate, NA)、グラミシジン(gramicidin D)は、Sigma より、トリプシン溶液(0.25% trypsin, with EDTA-4Na)は、Gibco より購入した。

### 3 結果

#### (1) カルバコール(CCh)誘導振動性 Cl<sup>-</sup>電流に対する β 受容体刺激の影響

ラット耳下腺腺房細胞にグラミシジン穿孔パッチ法を適用し、陰イオン電流を測定すると、CCh 刺激で持続的な振動性内向きイオン電流が誘導された(図2)。この電流は Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体阻害剤のブメタニドで抑制されたので共輸送体で細胞内に取り込まれた Cl<sup>-</sup>によって運ばれていることが示された。

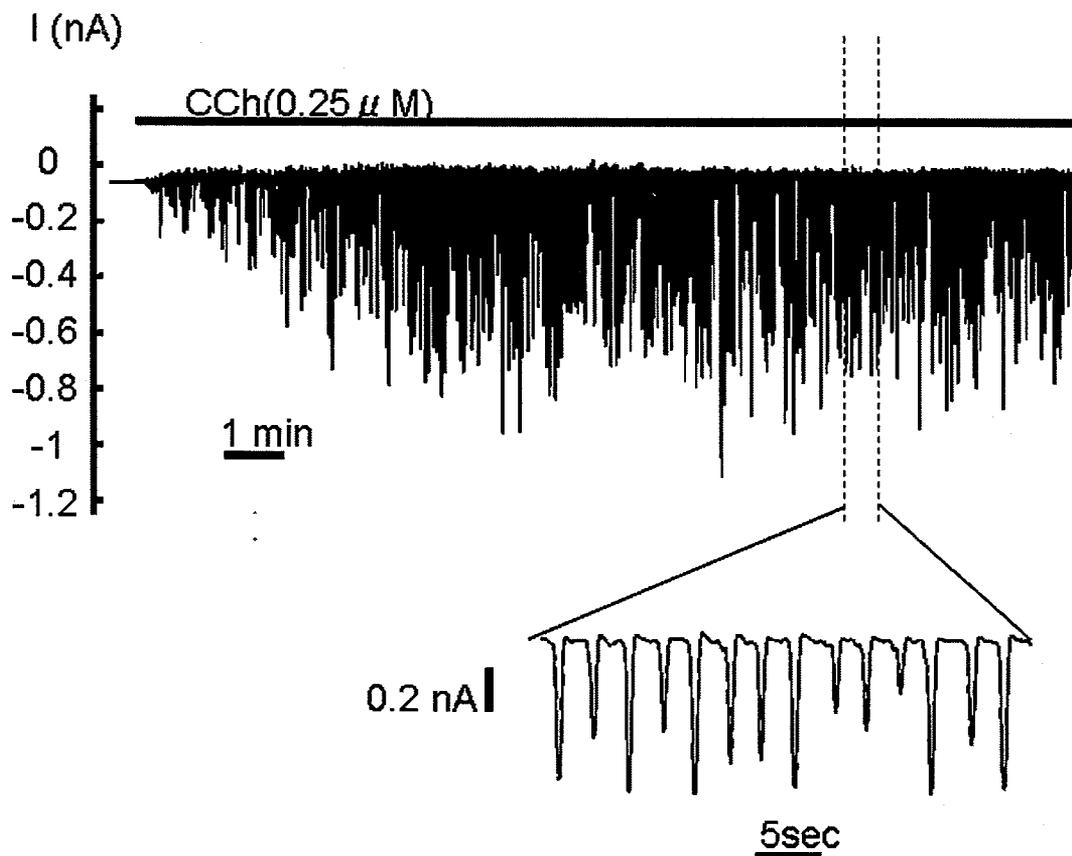


図2. ラット耳下腺腺房細胞の CCh 誘導振動性  $\text{Cl}^-$  電流

グラミシジン穿孔パッチ法で  $-80\text{mV}$  に電位固定を行い、CCh 刺激で得られた持続性の振動性内向き電流を示す。マイナス方向の電流は  $\text{Cl}^-$  イオンの分泌に相当する。下は、一部の時間軸を拡大して示した。  $\text{Ca}^{2+}$  振動により 2 から 3 秒の周期で振動している。

### イソプロテレノール (IPR) の効果

耳下腺腺房細胞に CCh ( $0.25\ \mu\text{M}$ ) 刺激開始後 5 分以上経過して電流が安定している時に、 $\beta$  受容体刺激薬の IPR ( $1\ \mu\text{M}$ ) を加えると、 $\text{Cl}^-$  電流が抑制された(図 3)。膜電位は、CCh 刺激により過分極方向に変化した、IPR の添加では殆ど変化しなかった。

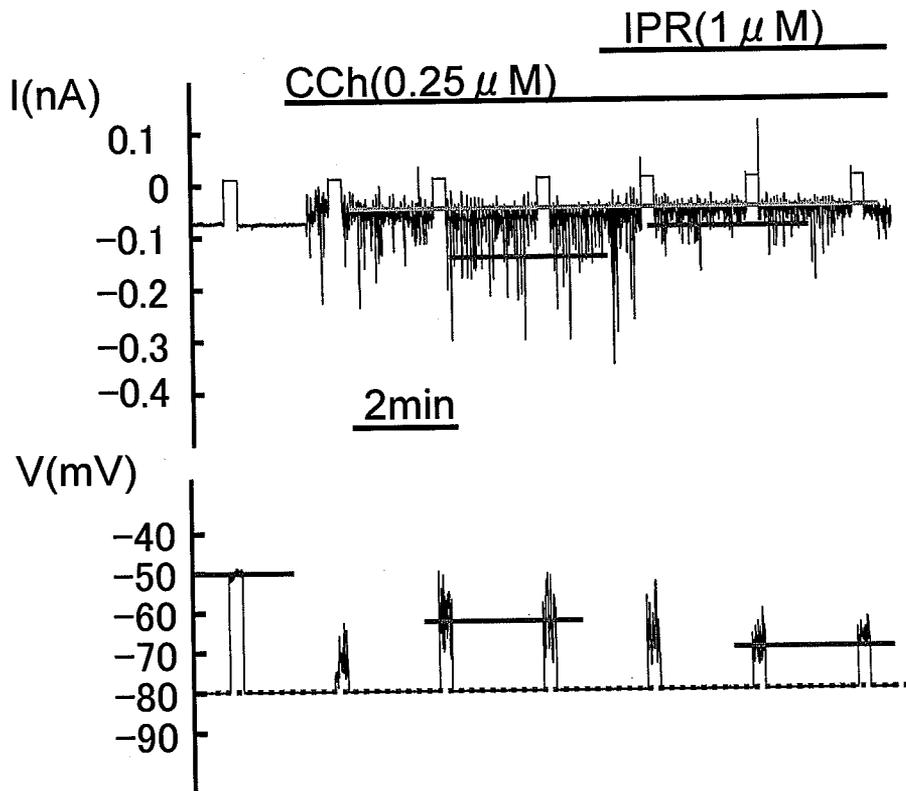


図3. ラット耳下腺腺房細胞の CCh 刺激時に IPR を添加した時の振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位の変化

CCh ( $0.25 \mu\text{M}$ ) 刺激開始後 5 分経過して電流が安定している時に、 $\beta$  受容体刺激薬の IPR ( $1 \mu\text{M}$ ) を加えると、振動性  $\text{Cl}^-$  電流が抑制された。下の図は、膜電位の変化を示している。パッチクランプアンプを、カレントクランプモードに切り替えて測定した膜電位のおよその平均値は、刺激前よりも、CCh 刺激後に過分極方向に変化した。

ラット顎下腺腺房細胞に CCh ( $0.25 \mu\text{M}$ ) 刺激を行うと、耳下腺腺房細胞と同様に振動性  $\text{Cl}^-$  電流が誘導された(図4)。CCh 刺激開始後 5 分経過して、電流値(30 秒間の電流の積分値を 1 秒間あたりに換算した値)を細胞の大きさの違いを補正するため膜容量で割った値(平均±標準誤差)は、耳下腺で  $2.15 \pm 0.62 \text{ A/F}$  ( $n=7$ )、顎下腺で  $5.23 \pm 0.79 \text{ A/F}$  ( $n=7$ )であり顎下腺の方が有意に大きかった( $p=0.01$ )。顎下腺腺房細胞でも同様に IPR ( $1 \mu\text{M}$ ) で振動性  $\text{Cl}^-$  電流が抑制された(図4)。

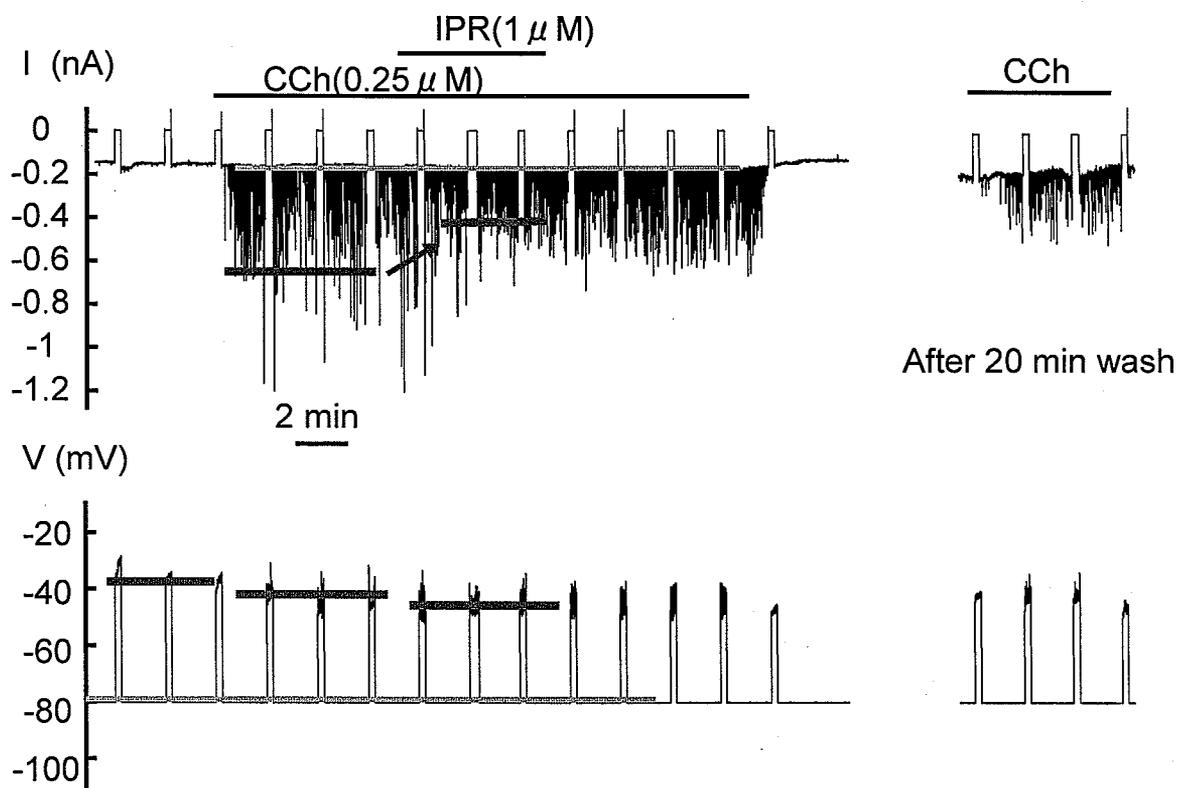


図4. ラット顎下腺腺房細胞の CCh 刺激時に IPR を加えた時の振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位  
 顎下腺腺房細胞でも同様に IPR ( $1 \mu\text{M}$ ) で振動性  $\text{Cl}^-$  電流が抑制された。IPR を取り去って 20 分経っても回復しない。β 効果は、長い間持続することが判明した。膜電位には、顕著な変化がない。

#### Forskolin + IBMX の効果

IPR は β 受容体に作用し細胞内の cAMP 濃度を上昇させるので、やはり cAMP 濃度を上昇させる forskolin + IBMX の効果を調べた。耳下腺腺房細胞を CCh で刺激した後 forskolin + IBMX を加えると振動性  $\text{Cl}^-$  電流が減少した。この抑制効果は cAMP を介して  $\text{Cl}^-$  分泌が抑制されたことを示唆する。Forskolin 添加前と後との  $\text{Ca}^{2+}$  振動の頻度の差異は無かった(図 5)。

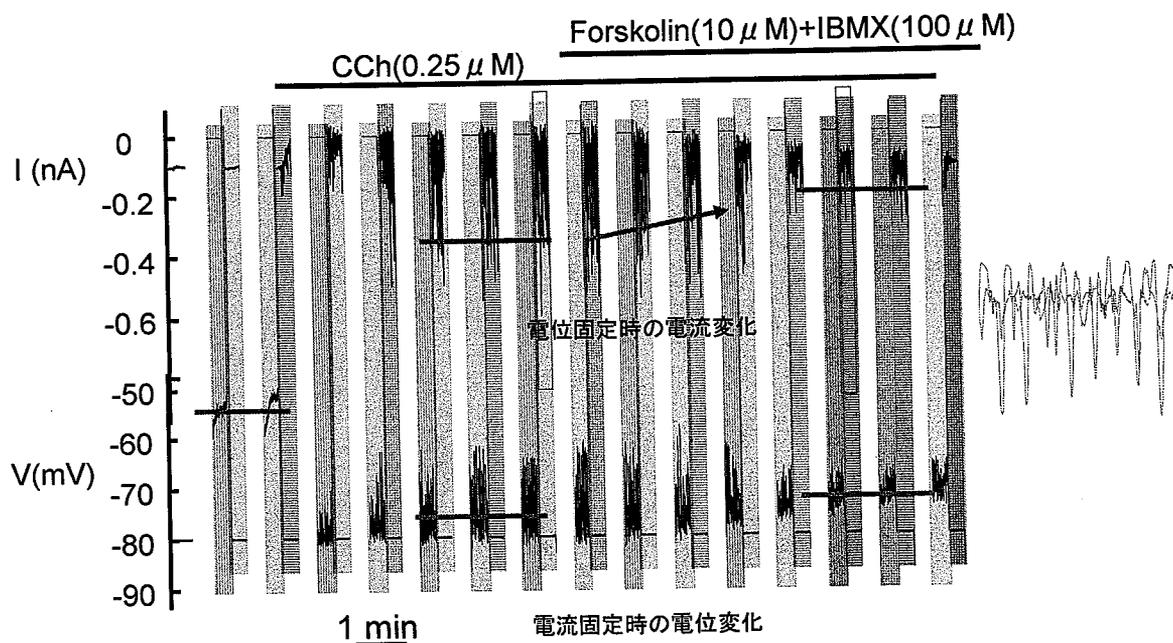


図5. ラット耳下腺腺房細胞の CCh 刺激時に forskolin+IBMX を添加した時の振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位の変化  
 左の図では、CCh で刺激を行い約6分後に forskolin+IBMX を加えると振動性  $\text{Cl}^-$  電流が減少した。右の挿入図は、抑制される前と後との  $\text{Ca}^{2+}$  振動の頻度の差異を示したグラフである。差異は無いことが示されている。ピンクは電位固定時の電流変化を、青は電流固定時の電位変化を表している。

耳下腺腺房細胞の CCh 誘導、振動性  $\text{Cl}^-$  電流は forskolin 添加で有意に抑制され、forskolin 添加前と後では、 $\text{Ca}^{2+}$  振動の頻度の有意な差が見られなかった(図6)。

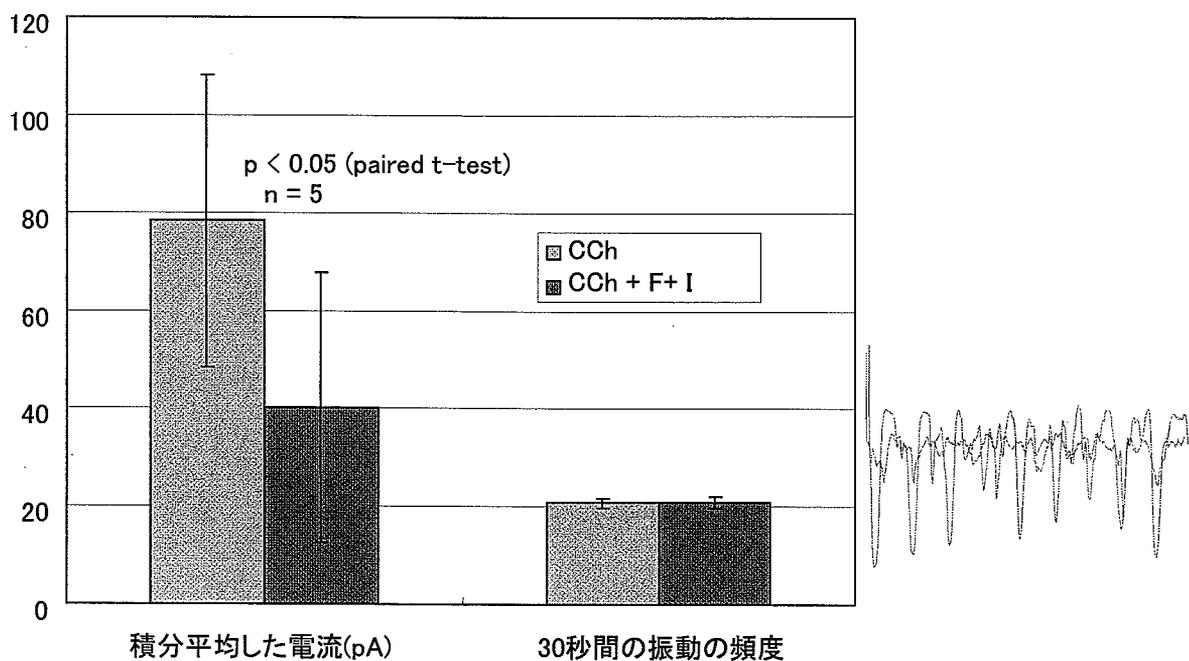


図6. ラット耳下腺腺房細胞のCCh誘導振動性Cl<sup>-</sup>電流に対するforskolin添加の影響

30秒間の電流の積分値を1秒間あたりになおした電流値と、30秒間のCa<sup>2+</sup>振動の頻度を、5個の細胞についての平均と標準誤差で表している。右の挿入図は、30秒間の電流の振動の頻度を示したもので、Ca<sup>2+</sup>振動の頻度を反映している。Forskolin+IBMXを加えて5分後の変化は、電流は抑制されたが、振動の頻度の差は見られなかった。

顎下腺でも同様にforskolin+IBMXを加えると、振動性Cl<sup>-</sup>電流が抑制された。Forskolin+IBMX添加前と後との、Ca<sup>2+</sup>振動の頻度の顕著な差はなかった(図7)。膜電位は顎下腺腺房細胞でもCCh刺激時に過分極を起こしていた。

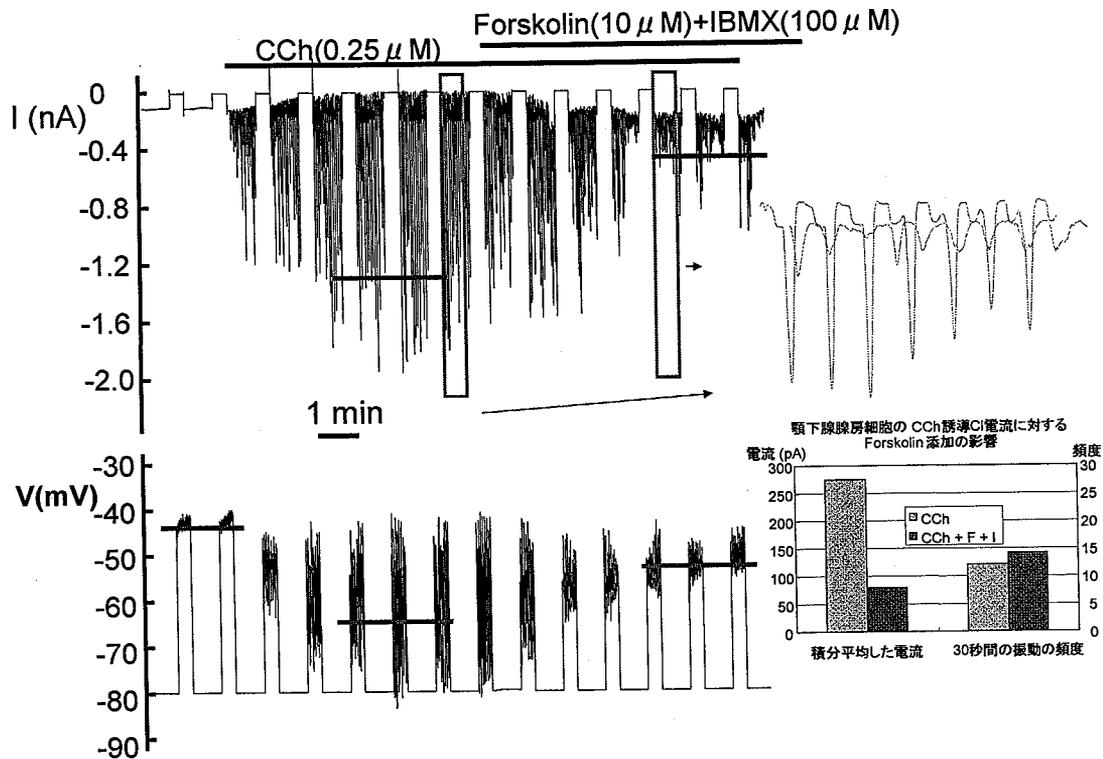


図7. ラット顎下腺腺房細胞の CCh 刺激時に forskolin+IBMX を添加した時の振動性 Cl<sup>-</sup>電流および膜電位変化  
 左の図では、CCh で刺激を行い forskolin+IBMX を添加すると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が減少する。右上の挿入図は、抑制される前と後との Ca<sup>2+</sup>振動の頻度に差異の無いことを示す。右下の挿入図は、ラット顎下腺腺房細胞の CCh 誘導振動性 Cl<sup>-</sup>電流に対する forskolin 添加の影響を表しており、積分平均した電流は forskolin 添加で Cl<sup>-</sup>電流は抑制され、30 秒間の振動の頻度は forskolin+IBMX 添加で変化がなかった。

### CCh 刺激非存在下での IPR および forskolin+IBMX の効果

ラット唾液腺腺房細胞に IPR および forskolin+IBMX で刺激を行っても Cl<sup>-</sup>電流および膜電位に変化は見られなかった (図8)。唾液腺の臓器レベルでは β 受容体刺激のみで水分分泌が起こらないが細胞レベルでも IPR や forskolin+IBMX のみの刺激で Cl<sup>-</sup>は分泌されないことが示めされた。

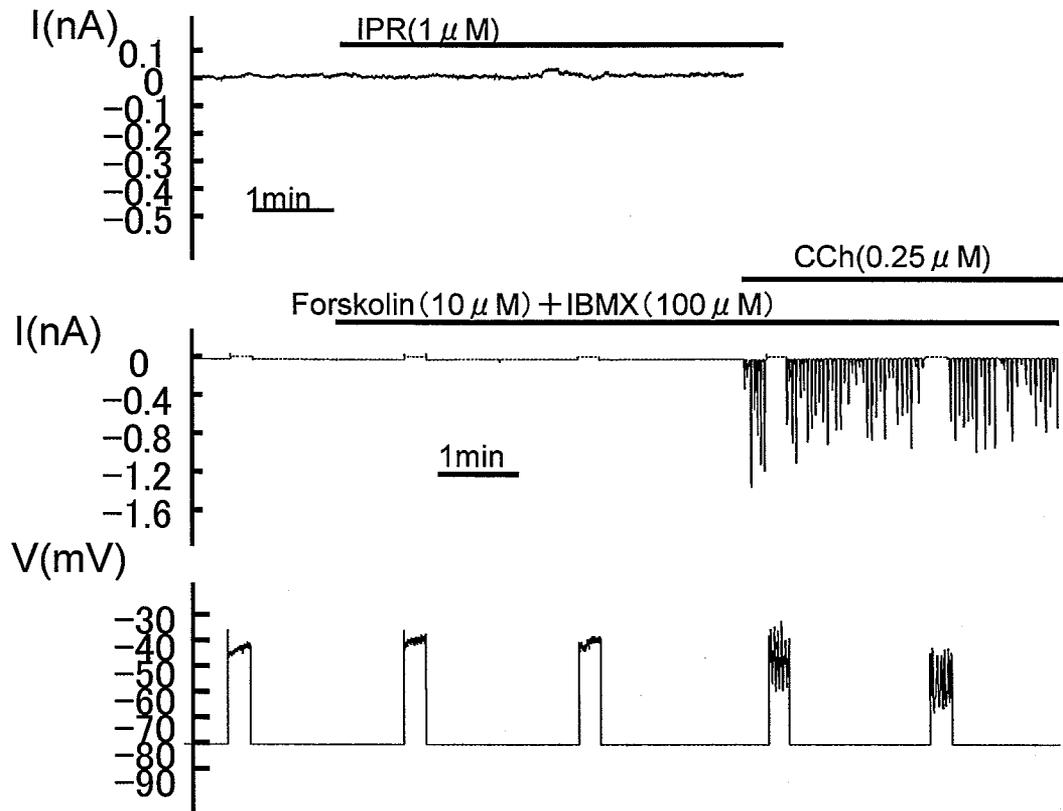


図8. ラット耳下腺腺房細胞における IPR 刺激および forskolin+IBMX 刺激の効果

上の図は、耳下腺腺房細胞で IPR( $1\mu\text{M}$ ) のみでの刺激効果を示しているが、 $\text{Cl}^-$ 電流に顕著な変化が見られない。中央の図は顎下腺腺房細胞で同様に、forskolin( $10\mu\text{M}$ )+IBMX( $100\mu\text{M}$ )で刺激した場合であるがこの場合も  $\text{Cl}^-$ 電流に変化はみられなかったが、この後 CCh 添加により  $\text{Cl}^-$ 電流が誘導された。

以上より、CCh 刺激時の  $\text{Cl}^-$ 電流は耳下腺、顎下腺ともに細胞内 cAMP 濃度を上昇させる IPR や forskolin+IBMX の添加で抑制されることが示された。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動の頻度は影響を受けなかった。

(2) アドレナリン受容体刺激で誘導される振動性  $\text{Cl}^-$ 電流について  
ノルアドレナリン(NA)は、 $\alpha$ アドレナリン受容体と  $\beta$ アドレナリン受容体に作用し、それぞれ細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と細胞内 cAMP 濃度を上昇

させる。NAで刺激したときの振動性Cl<sup>-</sup>電流の変化、および、 $\alpha$ アドレナリン受容体刺激のみの効果を推定するために、 $\alpha$ アドレナリン受容体作用薬フェニレフリン刺激での振動性Cl<sup>-</sup>電流と $\beta$ アドレナリン受容体遮断薬存在下のNA誘導振動性Cl<sup>-</sup>電流を測定し、Cl<sup>-</sup>チャネルおよびCl<sup>-</sup>輸送体の活性を調べた。また、これらの結果からNAの $\beta$ アドレナリン受容体刺激効果を推測した。

#### NAで誘導される振動性Cl<sup>-</sup>電流

NA (0.5  $\mu$ M)で、 $\alpha$ および $\beta$ 受容体を刺激した時のグラミシジン穿孔パッチ法でラット耳下腺腺房細胞のCl<sup>-</sup>分泌をイオン電流として測定した(図9)。NA添加から約7分で振動性Cl<sup>-</sup>電流は最高値に達し、その後減少していく。これは $\alpha$ 受容体刺激効果が $\beta$ 受容体刺激効果より早く現れるためと考えられる。このことから、約7分後に $\beta$ 受容体刺激効果でCl<sup>-</sup>電流が抑制されCl<sup>-</sup>分泌が減少したことが推定される。挿入図で示すように、Cl<sup>-</sup>電流が抑制される前と後とのCa<sup>2+</sup>振動の頻度の差異が無い。

顎下腺腺房細胞をNA (1  $\mu$ M)で刺激すると耳下腺腺房細胞と同様の結果が得られたが、顎下腺腺房細胞の方が振動性Cl<sup>-</sup>電流のピーク値が大きく、また、最大値に達するのも早い傾向にあった(図10)。NA (1  $\mu$ M)で刺激した場合の単位膜容量あたりの電流ピーク値は、耳下腺で $14.6 \pm 3.3$  A/F (n=4)、顎下腺では $28.6 \pm 2.0$  A/F (n=4)であり顎下腺の方が有意に大きかった(p=0.05)。これらの原因は、顎下腺の方がCl<sup>-</sup>チャネルの透過性が大きいのか、または、Cl<sup>-</sup>輸送体活性が高いからであると考えられる。右の図では、Cl<sup>-</sup>電流が抑制される前と後との、Ca<sup>2+</sup>振動の頻度の差異を示すが、顕著な差は見られない。

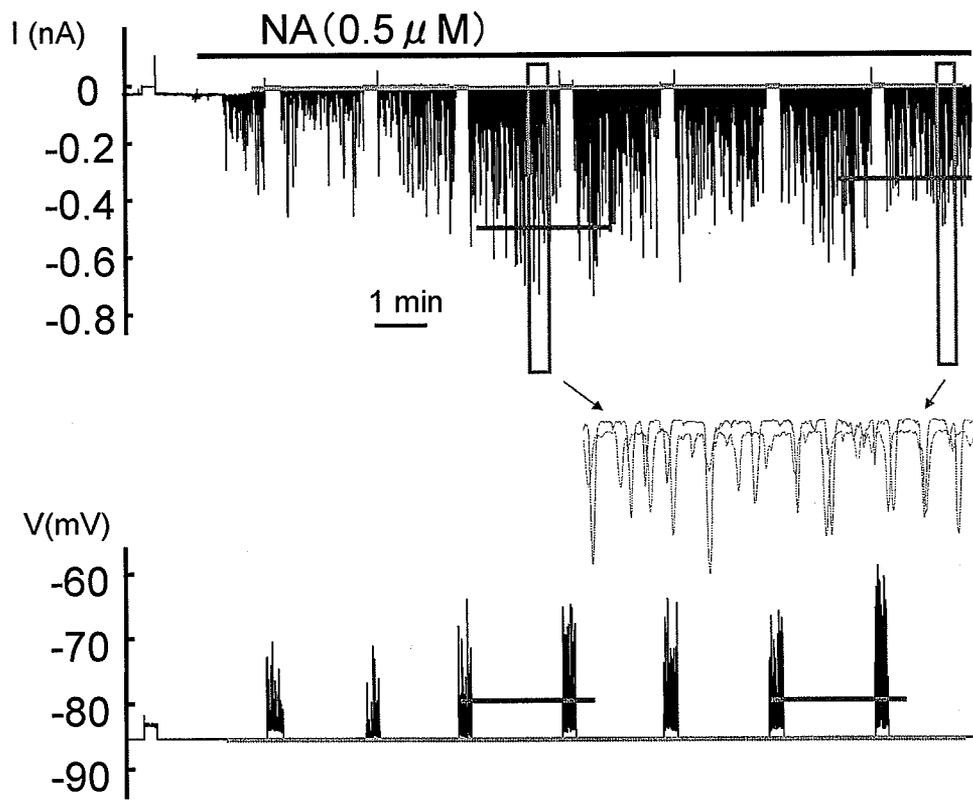


図9. ラット耳下腺腺房細胞においてノルアドレナリン(NA)で誘導される振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位  
 NA ( $0.5 \mu\text{M}$ )で、 $\alpha$ 、および $\beta$ 受容体を刺激した時のグラミシジン穿孔パッチ法でラット耳下腺腺房細胞の  $\text{Cl}^-$ 分泌をイオン電流として測定した。NA添加から、約7分で $\alpha$ 受容体効果により、振動性  $\text{Cl}^-$ 電流は最高値に達しそれから $\beta$ 受容体効果により減少した。挿入図は、抑制される前と後との、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動の頻度の差異を示す。

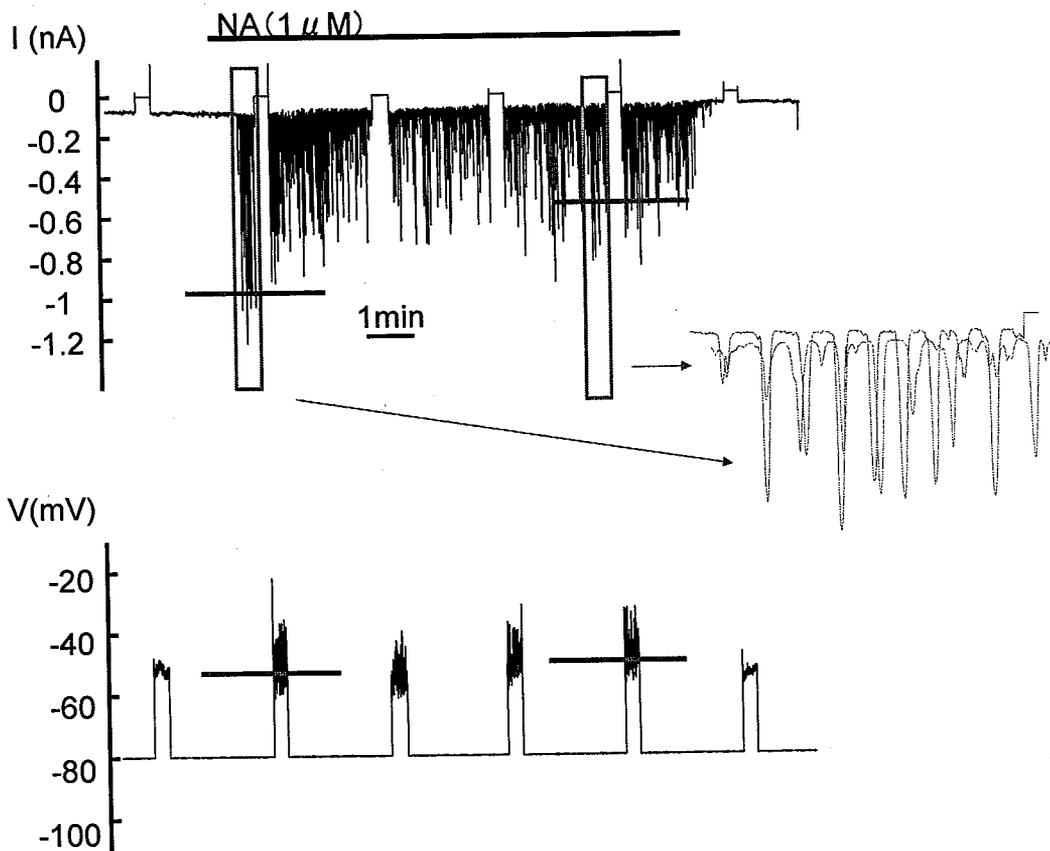


図 10. ラット顎下腺腺房細胞においてノルアドレナリン(NA)で誘導される振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位  
 顎下腺腺房細胞を  $\text{NA}$  ( $1\ \mu\text{M}$ ) で刺激すると耳下腺腺房細胞と同様の結果であったが、顎下腺腺房細胞の方が、最大値に達するのが早い傾向にあった。右の挿入図は、抑制される前と後との、 $\text{Ca}^{2+}$  振動の頻度の差異を示したものであるが、顕著な差はなかった。

### NA 刺激時の振動性 $\text{Cl}^-$ 電流に対するプロプラノロール (Prop) の効果

耳下腺腺房細胞に  $\beta$  受容体遮断薬のプロプラノロール (Prop ;  $0.1\ \mu\text{M}$ ) を添加した後、3分後に  $\text{NA}$  ( $1\ \mu\text{M}$ ) を添加した。Prop 存在下での、 $\text{NA}$  刺激は、振幅がほぼ一定で減少しない振動性  $\text{Cl}^-$  電流を誘導した。その後、Prop を取り去って  $\text{NA}$  刺激のみにすると振動性  $\text{Cl}^-$  電流が減少し、 $\text{NA}$  刺激時の  $\beta$  受容体刺激効果による抑制が働いたことが

示唆された (図 11)。

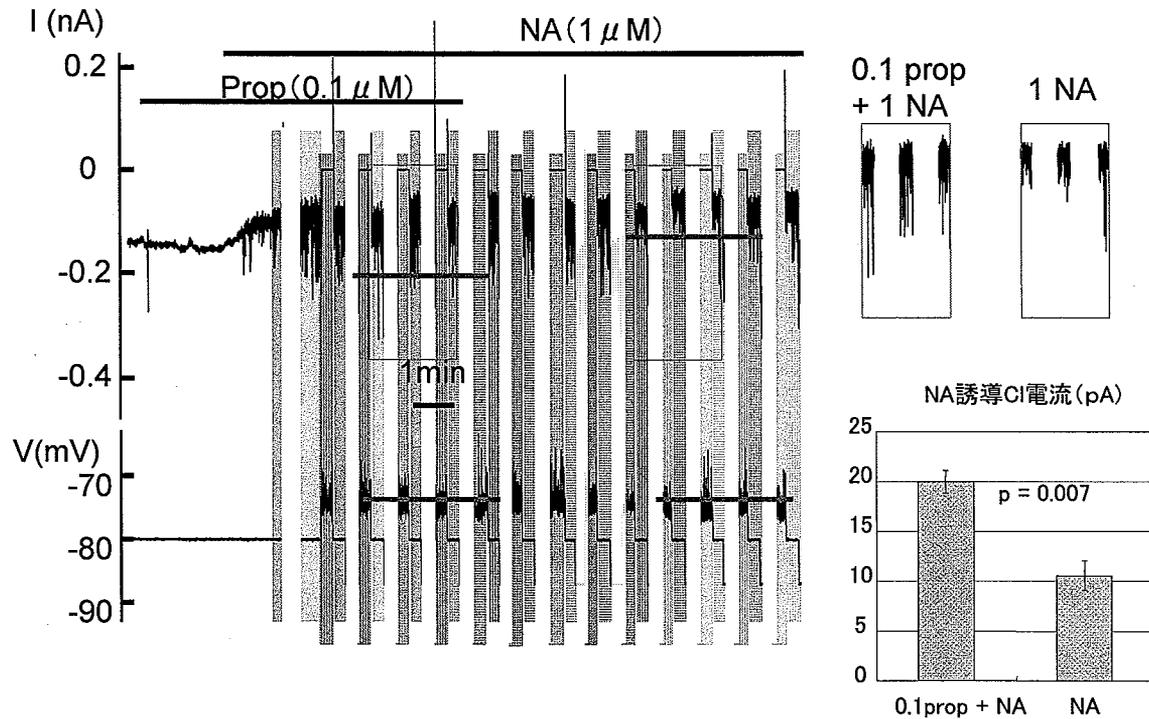


図 11. ラット耳下腺腺房細胞の Prop 存在下で NA により誘導される振動性 Cl<sup>-</sup>電流および膜電位変化

腺房細胞にプロプラノロール (Prop ; 0.1 μ M) を添加後、3 分後に NA (1 μ M) 添加した。Prop の添加のみでは振動性 Cl<sup>-</sup>電流は起こらず、3 分後に NA で刺激すると振幅がほぼ一定の振動性 Cl<sup>-</sup>電流が誘導された。その後、Prop を除去し NA のみにすると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が減少した。右上の挿入図は、Prop+NA を加えたときと、NA 刺激のみのときの振動性 Cl<sup>-</sup>電流の測定量をそれぞれ 3 箇所抜き出したグラフである。両者を比較すると、右下の挿入図のように Prop 除去後に振動性 Cl<sup>-</sup>電流が抑制されている。

顎下腺に Prop (0.1 μ M) 加え、約 4 分後に NA (1 μ M) をさらに加えた。Prop だけでは、振動性 Cl<sup>-</sup>電流は誘導されないが、NA を加えると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が誘導され、約 20 分後でも抑制されなかった。その後、Prop を取り去り、NA のみにすると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が減少した。これは、Cl<sup>-</sup>分泌に対する β 受容体刺激の抑制効果を示唆する。3

点の解析でも耳下腺と同様に有意に抑制された(図 12)。

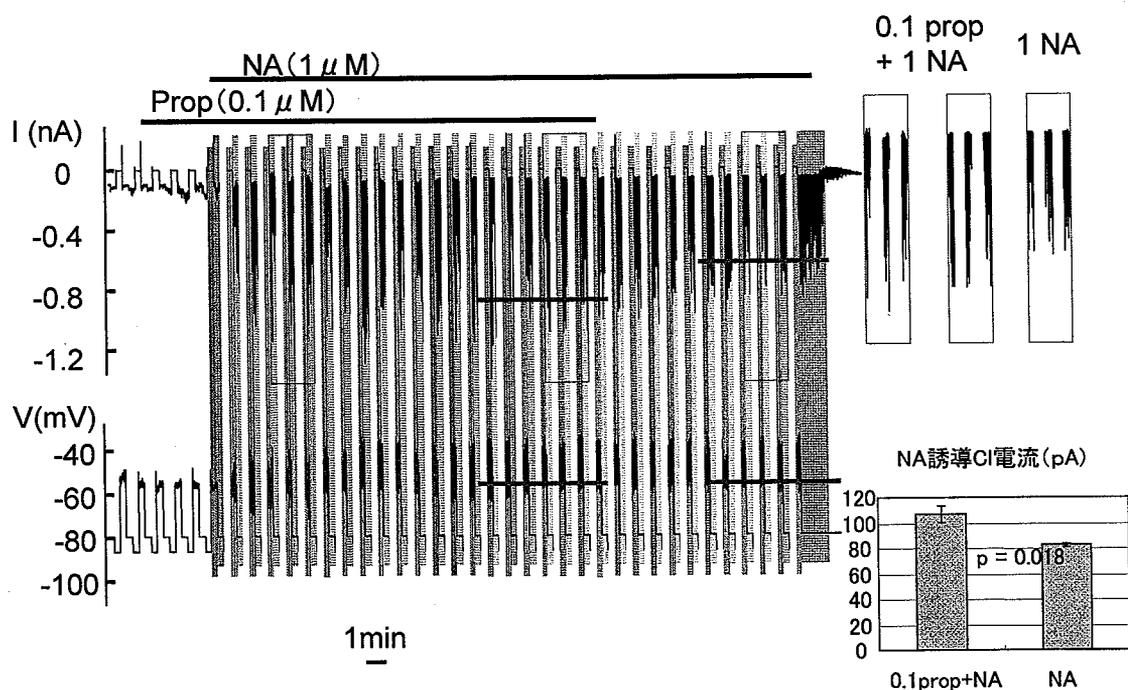


図 12. ラット顎下腺腺房細胞に Prop を加えた後、NA を加えたときの振動性 Cl<sup>-</sup>電流および膜電位

顎下腺に Prop (0.1 μM) 加え、約 4 分後に NA (1 μM) をさらに加えた。Prop だけでは、振動性 Cl<sup>-</sup>電流は誘導されないが、NA を加えると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が誘導され、約 20 分後でも抑制されなかった。その後、Prop を取り去り、NA のみにすると振動性 Cl<sup>-</sup>電流が減少した。右上の挿入図は、Prop+NA を加えたときと、NA 刺激のみのときの振動性 Cl<sup>-</sup>電流の測定量をそれぞれ 3 箇所抜き出したグラフである。両者を比較すると、右下の挿入図のように Prop を取り去った後に振動性 Cl<sup>-</sup>電流が抑制された。

### フェニレフリン刺激による振動性 Cl<sup>-</sup>電流

顎下腺腺房細胞を 5 μM フェニレフリンで刺激すると持続性の振動性 Cl<sup>-</sup>電流が誘導された (図 13)。この電流の振幅は刺激開始後 10 分程度でも減衰しなかった (5 例中 5 例)。従って、α 受容体刺激のみでは CCh 刺激と同様に時間が経過しても減少しない持続性の Cl<sup>-</sup>が誘発されることが示された。

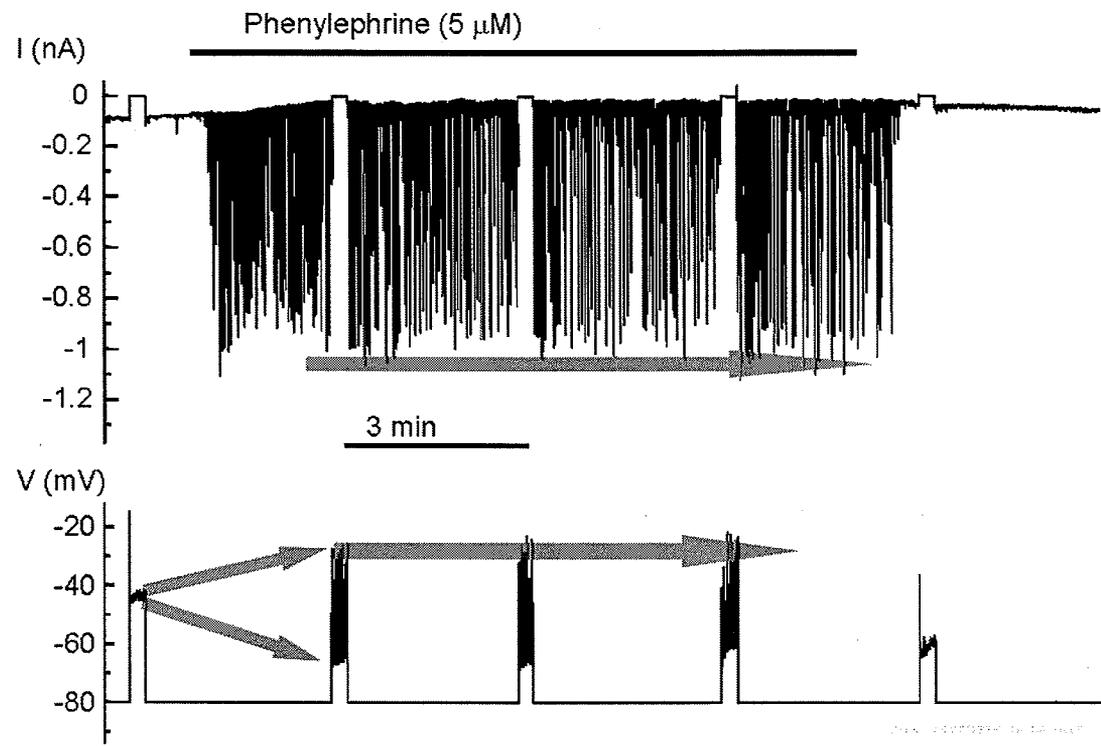


図 13. ラット顎下腺腺房細胞においてフェニレフリンで誘導される振動性  $\text{Cl}^-$ 電流および膜電位

顎下腺腺房細胞をフェニレフリン ( $5\ \mu\text{M}$ ) で刺激すると NA ( $1\ \mu\text{M}$ ) で刺激する場合と同様に立ち上がりの早い振動性  $\text{Cl}^-$ 電流および膜電位変化が誘導されたが、CCh 刺激時と同様に時間が経過しても振動性電流の振幅は減少しなかった。

#### フェニレフリン刺激で誘導される振動性 $\text{Cl}^-$ 電流の forskolin+IBMX の添加による抑制

顎下腺腺房細胞を  $5\ \mu\text{M}$  フェニレフリンで刺激し持続性の振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が誘導されたいる状態で、forskolin+IBMX を添加すると電流の振幅が減少した (図 14)。

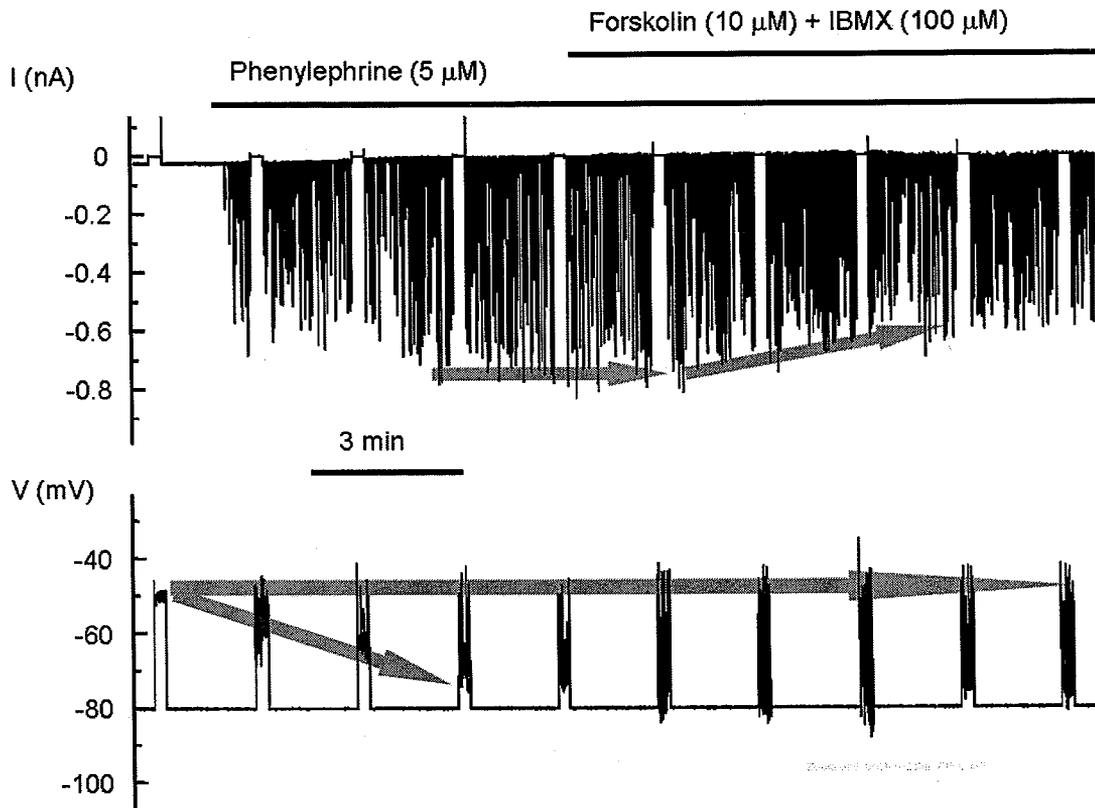


図 1 4 . ラット顎下腺腺房細胞のフェニレフリン刺激時に forskolin+IBMX を添加した時の振動性  $\text{Cl}^-$  電流および膜電位変化  
 フェニレフリンで刺激を行い forskolin+IBMX を添加すると振動性  $\text{Cl}^-$  電流が減少する。

実験 2 では NA 刺激により、時間が経過すると振動性  $\text{Cl}^-$  電流が減少することが示された。Prop 添加時に NA 刺激を行うと振動性  $\text{Cl}^-$  電流は一定であるが、Prop を取り除くことにより  $\text{Cl}^-$  電流は抑制された。 $\alpha$  受容体刺激では  $\text{Cl}^-$  分泌が誘導され、 $\beta$  受容体刺激により  $\text{Cl}^-$  分泌が抑制されることが示唆された。

### (3) 生理的状態での $\text{Cl}^-$ 分泌調節について

ここまでの解析は、ホールセルパッチクランプ法に比較すれば生理的条件下により近いと言えるが、膜電位を  $-80\text{mV}$  に設定したので、この点に関してはホールセルパッチクランプ法と同じく生理的条件と

は言えない。そこで、パッチクランプアンプを電位固定から 1~2 分間に 10~15 秒間だけ電流固定 (0 A) に切り替えて生理的な膜電位を測定し、その膜電位の平均値から振動性 Cl<sup>-</sup>電流の生理的狀態における駆動力を計算し、測定値を補正することで、生理的狀態での Cl<sup>-</sup>分泌に相当する Cl<sup>-</sup>電流値を推定した。

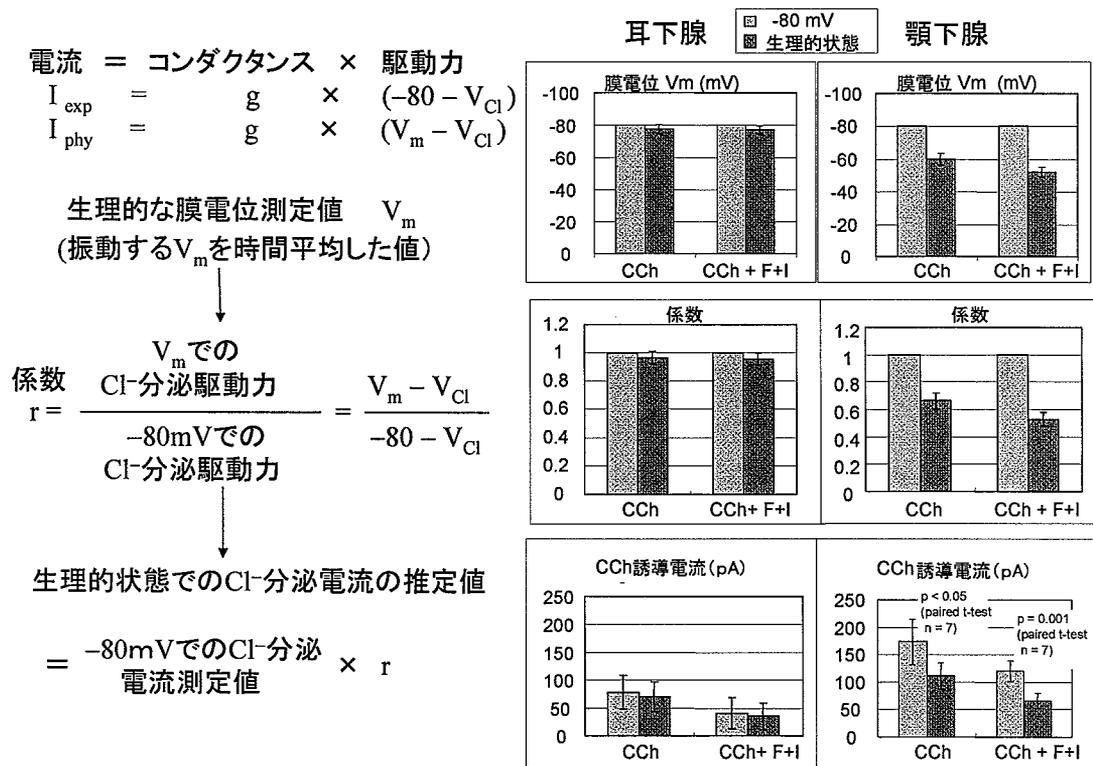


図 15. 生理的狀態での Cl<sup>-</sup>分泌電流の解析

CCh 刺激中の電流は、コンダクタンスと駆動力の積であり、電流の測定の際には駆動力は  $-80 - V_{\text{Cl}}$  ( $V_{\text{Cl}}$  は Cl<sup>-</sup>の平衡電位;  $-21 \text{ mV}$ ) となるが、生理的狀態では駆動力は  $V_m - V_{\text{Cl}}$  となる。生理的狀態での電流は、それぞれの状態の駆動力の比から求めた係数  $r$  を  $-80 \text{ mV}$  での電流測定値に掛けたものになる。左のグラフ群は耳下腺 ( $n=5$ )、右のグラフ群は顎下腺 ( $n=7$ ) で、上から順に腺房細胞の膜電位、駆動力の係数、分泌される Cl<sup>-</sup>電流を示したもので、青のバーは、 $-80 \text{ mV}$  での値で赤のバーが生理的狀態の値を示している。それぞれのグラフの中の左のバー群は CCh 刺激時の値で、右のバー群は CCh+F+I の刺激時の値である。

CCh 刺激中の電流は、コンダクタンスと駆動力の積である。電流の測定の際は、膜電位  $V_m$  を  $-80\text{mV}$  に固定しているので駆動力は  $-80 - V_{Cl}$  ( $V_{Cl}$  は  $\text{Cl}^-$  の平衡電位) となるが、生理的狀態では  $V_m$  は  $-80\text{mV}$  ではないので一般的に駆動力は  $V_m - V_{Cl}$  となる。生理的狀態での電流の推定値は、それぞれの狀態の駆動力の比から求めた係数  $r$  を  $V_m = -80\text{mV}$  での電流測定値に掛けたものになる。実験で用いた  $V_{Cl} (-21\text{mV})$  は細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度 ( $50\text{mM}$ )<sup>14)</sup> から計算したものである。

ラット耳下腺腺房細胞の生理的狀態では、CCh 刺激時に膜電位 ( $-77.7 \pm 2.7\text{mV}$ ) から計算した駆動力は  $-56.7 \pm 2.7\text{mV}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  での駆動力 ( $-59\text{mV}$ ) とほぼ等しい。これより生理的狀態の  $\text{Cl}^-$  分泌電流の推定値 ( $70.2 \pm 23.7\text{pA}$ ) は、 $V_m = -80\text{mV}$  での測定値 ( $78.4 \pm 29.9\text{pA}$ ) と大差ない値になる (図 15)。

ラット耳下腺腺房細胞の生理的狀態では、CCh + F + I の刺激時に膜電位 ( $-77.2 \pm 2.5\text{mV}$ ) から計算した駆動力は  $-56.2 \pm 2.5\text{mV}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  での駆動力 ( $-59\text{mV}$ ) とほぼ等しい。 $\text{Cl}^-$  分泌電流は  $V_m = -80\text{mV}$  の時は  $40.1 \pm 27.7\text{pA}$ 、生理的狀態での推定値は  $34.8 \pm 23.3\text{pA}$  で CCh 刺激のみに比べると、 $V_m = -80\text{mV}$  の時と同じように生理的狀態でも  $\text{Cl}^-$  分泌は cAMP シグナルにより抑制されていると推定される (図 15)。

ラット顎下腺腺房細胞の生理的狀態では、CCh 刺激時に膜電位 ( $-60.0 \pm 3.4\text{mV}$ ) から計算した駆動力は  $-39.0 \pm 3.4\text{mV}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  での駆動力 ( $-59\text{mV}$ ) の  $0.66 \pm 0.06$  倍となり、 $\text{Cl}^-$  分泌電流は  $V_m = -80\text{mV}$  の時は  $173.2 \pm 40.8\text{pA}$ 、生理的狀態での推定値は  $111.6 \pm 23.1\text{pA}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  の時と比べて減少している (図 15)。

ラット顎下腺腺房細胞の生理的狀態では、CCh + F + I の刺激時に膜電位 ( $-52.0 \pm 3.2\text{mV}$ )、駆動力は  $-31.0 \pm 3.2\text{mV}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  の時の  $0.53 \pm 0.05$  倍となり、 $\text{Cl}^-$  分泌電流は  $V_m = -80\text{mV}$  の時は  $120.1$

$\pm 18.5\text{pA}$ 、生理的状态の時  $65.6 \pm 13.5\text{pA}$  で、 $V_m = -80\text{mV}$  の時と同じように生理的状态でも  $\text{Cl}^-$  分泌は cAMP シグナルにより抑制されていると推定される(図 15)。

CCh 刺激時の単位膜容量あたりの  $\text{Cl}^-$  電流値を耳下腺と顎下腺とを比較すると、 $V_m = -80\text{mV}$  では耳下腺は  $2.15 \pm 0.62 \text{ A/F}$  ( $n=7$ )、顎下腺は  $5.23 \pm 0.79 \text{ A/F}$  ( $n=7$ ) で顎下腺の方が耳下腺に比べて有意に電流値が大きかった。生理的状态での推定値では耳下腺は  $2.11 \pm 0.59 \text{ A/F}$  ( $n=7$ )、顎下腺は  $3.59 \pm 0.70 \text{ A/F}$  ( $n=7$ ) であり、顎下腺の方が耳下腺に比べて大きい傾向にあることが示された。

実験 3 では、CCh 刺激時のラット耳下腺腺房細胞は  $V_m = -80\text{mV}$  の時と生理的状态の推定値では  $\text{Cl}^-$  分泌は変わらず、どちらの場合も cAMP 系で抑制されることが示された。CCh 刺激時のラット顎下腺腺房細胞は  $V_m = -80\text{mV}$  に比べて生理的状态の時では、膜電位が浅く、駆動力が小さいので、 $\text{Cl}^-$  分泌が減少している。したがって cAMP 系による抑制は、生理的状态ではさらに増強されていると推定される。膜電位測定により、細胞レベルで生理的状态の  $\text{Cl}^-$  分泌が推定でき cAMP 系の抑制効果が生理的状态でも示唆された。

#### 4. 考察

本研究ではグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用い、唾液腺腺房細胞の交感神経・副交感神経作用薬による  $\text{Cl}^-$  分泌制御機構を解析した。

##### (1) CCh 誘導振動性 $\text{Cl}^-$ 電流

CCh 誘導振動性  $\text{Cl}^-$  電流値は顎下腺腺房細胞のほうが耳下腺腺房細胞より大きい傾向があった。細胞の大きさが異なるので、その影響を

除くために単位膜面積当りの  $\text{Cl}^-$ 電流値に変換したところ  $-80\text{mV}$  では、顎下腺腺房細胞の方が有意に  $\text{Cl}^-$ 電流値が大きかった ( $p=0.01$ )。ホールセル記録法で測定した  $\text{Cl}^-$ 電流も同様の傾向にある<sup>7,8)</sup>。CCh誘導振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が定常値に達する時間についても、顎下腺腺房細胞の方が早かった。ホールセル記録法で測定した  $\text{Cl}^-$ 電流も同様の傾向にあるので、CCh刺激時にチャネルの透過性の増大が迅速であるためと考えられる<sup>7,8)</sup>。

CCh刺激時の膜電位は、耳下腺腺房細胞では  $-77.7 \pm 2.7\text{mV}$  で、顎下腺腺房細胞では  $-60.0 \pm 3.4\text{mV}$  で耳下腺腺房細胞の方が過分極の程度が大きい。耳下腺腺房細胞の膜電位は  $\text{K}^+$ の平衡電位の  $-80\text{mV}$  に近いから、膜電位の差には  $\text{K}^+$ チャネルが関与し、耳下腺腺房細胞は顎下腺腺房細胞より  $\text{K}^+$ の透過性が大きいと推定される。

耳下腺および顎下腺の腺房細胞において、CChによるムスカリン性受容体刺激時に IPR 刺激や forskolin+IBMX で細胞内 cAMP 濃度を上昇させると振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が抑制された。IPR や forskolin+IBMX のみの刺激では、 $\text{Cl}^-$ は分泌されないことから細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇している状態で  $\beta$ 受容体刺激(cAMPシグナル)が作用すると振動性  $\text{Cl}^-$ 電流 ( $\text{Cl}^-$ 分泌)は抑制されることが示唆された。

ところが、耳下腺では CCh 刺激時の  $\text{Cl}^-$ チャネル活性が IPR で増強される<sup>7)</sup>。したがって、耳下腺では  $\beta$ 受容体刺激により  $\text{Cl}^-$ 輸送体活性が抑制されている可能性が高い。顎下腺においても、CCh 刺激時のイオンチャネルおよび  $\text{Cl}^-$ 輸送体を含む  $\text{Cl}^-$ 輸送機構が抑制されていることが示されたが、顎下腺では CCh 刺激時の  $\text{Cl}^-$ チャネル活性が IPR で抑制されるので、 $\beta$ 受容体刺激により  $\text{Cl}^-$ 輸送体活性が少なくとも増強はされていない、即ち、変化しないかまたは抑制されていると推定される。

$\text{Cl}^-$ 輸送体は IPR 単独作用で (リン酸化を介して)活性が約 3 倍に増

大しているという報告があるが<sup>15)</sup>、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在化での cAMP の作用は報告されていない。Evans ら<sup>16)</sup>によると、ムスカリン性受容体刺激(CCh)および  $\alpha_1$  アドレナリン受容体刺激では  $\text{Cl}^-$  輸送体活性が 15~20 倍に増大する。また、 $\text{Cl}^-$  輸送体活性の増大は  $\text{Cl}^-$  チャネルの開口で細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が低下した結果、輸送体蛋白のリン酸化を介して起こるといふ報告もある<sup>17,18)</sup>。

交感神経  $\beta$  アドレナリン受容体の単独刺激では  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Cl}^-$  チャネルが開口しないので  $\text{Cl}^-$  分泌は起こらないが、細胞内 cAMP 濃度上昇を介して  $\text{Cl}^-$  輸送体活性が増大する<sup>9,10)</sup>。しかし、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇して  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Cl}^-$  チャネル透過性が増大し、 $\text{Cl}^-$  分泌が起こっている時に cAMP 濃度が上昇すると  $\text{Cl}^-$  分泌は抑制される可能性が高い。

耳下腺での CCh 刺激時の水分分泌は cAMP により増強される場合と、抑制される場合がある<sup>7,19)</sup>。本研究では CCh 刺激時の細胞レベルの  $\text{Cl}^-$  分泌が cAMP により抑制された。灌流唾液腺や In vivo の実験と細胞レベルで異なる場合があるのは、前者では自立神経系が唾液腺の血管や循環系全体に作用することにより、水分分泌が変化することも関与しているであろう。一方、顎下腺では灌流実験で CCh 刺激時の水分分泌は  $\beta$  受容体刺激により抑制されると報告されている<sup>8)</sup>。この機構として、CCh 刺激時の細胞レベルの  $\text{Cl}^-$  分泌が  $\beta$  受容体刺激により抑制されることが今回示された。さらに CCh 刺激と  $\beta$  受容体刺激との相互作用における血管収縮が関与するとの報告がある<sup>20,21)</sup>。

## (2) NA 誘導振動性 $\text{Cl}^-$ 電流

唾液腺を NA で刺激すると粘度の高い少量の唾液が分泌される。NA は、 $\alpha$  受容体刺激効果と  $\beta$  受容体刺激効果の二つを併せ持つ。ラット耳下腺腺房細胞および顎下腺腺房細胞で NA 刺激により誘導された振

動性  $\text{Cl}^-$ 電流は増加した後減少した。しかし、Prop 存在化での NA 刺激や  $\alpha$  受容体作用薬刺激では減衰しない振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が誘導されたことから、初期は  $\alpha$  受容体刺激により振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が誘発され、その後、 $\beta$  受容体刺激効果により振動性  $\text{Cl}^-$ 電流が抑制されると考えられる。

### (3) 生理的条件下での $\text{Cl}^-$ 分泌の推定

耳下腺の膜電位は  $-80\text{mV}$  に近かったので、 $V_m = -80\text{mV}$  での  $\text{Cl}^-$ 電流の測定値と生理的状态での計算値では、 $\text{Cl}^-$ 分泌に顕著な差が見られなく生理的状态でも CCh 刺激時に forskolin+IBMX の添加で抑制されるという推測結果となった。顎下腺腺房細胞で、 $-80\text{mV}$  と生理的状态での膜電位が異なるのは、 $\text{K}^+$ チャネルの膜電位への寄与の程度が耳下腺腺房細胞に比べて小さいことによると考えられる。生理的状态での駆動力の計算値が、CCh 刺激時に forskolin+IBMX の添加でわずかにするので  $\text{Cl}^-$ 電流もさらに減少するという推測結果となり、生理的状态でも  $\beta$  受容体刺激により  $\text{Cl}^-$ 分泌が抑制されていることが推定される。

### (4) $\beta$ 受容体刺激による $\text{Cl}^-$ 分泌抑制効果の生理学的意義

交感神経活動では、少量で粘度の高い唾液を分泌する。交感神経伝達物質 NA は、 $\alpha$  受容体刺激効果と  $\beta$  受容体刺激効果があり  $\alpha$  受容体刺激効果により唾液は分泌されるが、その後  $\beta$  受容体刺激効果が働き水分分泌は抑制される。今回の実験で、細胞レベルの  $\text{Cl}^-$ 分泌を測定し、 $\alpha$  受容体刺激では  $\text{Cl}^-$ 分泌が誘導され、 $\beta$  受容体刺激により  $\text{Cl}^-$ 分泌が抑制されることが示されたことで、臓器レベルでの水分分泌の抑制は細胞レベルの  $\text{Cl}^-$ 分泌の抑制に起因する可能性が高い。また、全唾液分泌量の 65%を分泌する顎下腺では、副交感神経活動による唾液分泌時

に $\beta$ 受容体刺激が生じると、水・電解質分泌が抑制される。顎下腺腺房細胞レベルの $\text{Cl}^-$ 分泌は、ムスカリン性受容体刺激で誘導され、 $\beta$ 受容体刺激により抑制されることが示されたことで、唾液分泌の抑制は細胞レベルの $\text{Cl}^-$ 分泌の抑制によると考えられる。耳下腺では副交感神経活動時に $\beta$ 受容体刺激で増強されるという報告があるが<sup>7)</sup>、全唾液に占める割合が少ないため増強の影響が顕著ではないと推定される。唾液分泌は、臓器・個体レベルでは血管調節系など腺房細胞以外の因子によって調節されている部分もあるが、腺房細胞レベルでの $\beta$ 受容体刺激による $\text{Cl}^-$ 分泌抑制も唾液分泌に大きな役割を果たしていると結論づけられる。

## 参考文献

1. Nauntofte B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. *Am J Physiol.* 263: G823-G837, 1992.
2. Pertersen OH. Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol.* 448: 1-51, 1992.
3. Cook DI, Van Lennep EW, Roberts, ML and Young JA. Secretion by the major salivary glands. Johnson L. R. (ed), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 1061-1117, Raven Press, New York, 1994.
4. 東城庸介, 谷村明彦 : 唾液腺, *生体の科学* 47:359-362, 1996.
5. Melvin JE. Chloride channels and salivary gland function. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10: 199-209, 1999.
6. 広野 力, 柴 芳樹. 唾液の分泌機構. *小児歯科臨床* 5 : 20-27, 2000.
7. Hirono C, Sugita M, Furuya K, Yamagishi S, Shiba Y. Potentiation by isoproterenol on carbachol-induced  $K^+$  and  $Cl^-$  currents and fluid secretion in rat parotid. *J Membr Biol.* 164: 197-203, 1998

8. Tanaka S, Shiba Y, Nakamoto T, Sugita M, Hirono C. Modulation of carbachol-induced  $\text{Cl}^-$  currents and fluid secretion by isoproterenol in rat submandibular acinar cells. *Jpn J Physiol.* 49: 335-343, 1999.
9. Tanimura A, Kurihara K, Reshkin SJ, Turner RJ. Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter. *J Biol Chem.* 270: 25252-25258, 1995.
10. Kurihara K, Nakanishi N, Moore-Hoon ML, Turner RJ. Phosphorylation of the salivary  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: C817-C823, 2002.
11. Hirono C, Shiba Y. Analyses of anion secretion by the gramicidin-perforated patch recording in secretory epithelial cells. *Recent Res Devel Membr Biol.* 1: 11-21, 2002.
12. 広野 力, 杉田 誠, 岩佐 佳子, 柴 芳樹 グラミシジン穿孔パッチ陰イオン電流解析法によるラット耳下腺単一腺房細胞での分泌陰イオン動態の解明 *日本唾液腺学会誌* 44: 60-62, 2003.
13. Sugita M, Hirono C, Shiba Y. Gramicidin-perforated patch recording revealed the oscillatory nature of secretory  $\text{Cl}^-$  movement in salivary acinar cells. *J Gen Physiol.* 124, 59-69, 2004.
14. 谷村明彦, 東城庸介, 松本仁人. 塩素感受性蛍光色素 SPQ によるラット耳下腺細胞内  $\text{Cl}^-$ 濃度の判定. *東日本歯学雑誌* 16: 271-278,

1997.

15. Paulais M, Turner RJ.  $\beta$ -Adrenergic upregulation of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter in rat parotid acinar cells. *J Clin Invest.* 89:1142-1147, 1992.

16. Evans RL, Turner RJ. Upregulation of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter activity in rat parotid acinar cells by muscarinic stimulation. *J Physiol.* 499: 351-359, 1997.

17. Darman RB, Forbush B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem.* 277: 37542-37550, 2002.

18. Dowd BF, Forbush B. PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem.* 278: 27347-27353, 2003.

19 Murakami M, Yoshimura K, Segawa A, Loffredo F, Riva A. Relationship between amylase and fluid secretion in the isolated perfused whole parotid gland of the rat. *Eur J Morphol*, 38: 243-247, 2000.

20. Gjørstrup P. Blood flow and secretion in the submaxillary gland of the rabbit during stimulation of the autonomic nerves. *Acta Physiol Scand.* 115: 91-95, 1982.

21. Izumi H, Karita K. The vasodilator and secretory effects elicited by sympathetic nerve stimulation in cat submandibular gland. *J Auton Nerv Syst.* 48: 143-151, 1994.