

# TPP<sup>+</sup>電極によるエールリッヒ腹水癌細胞の膜電位測定 と代謝に共役した変化

沖増英治\*・昇公一\*・小林純郎\*\*・洲崎悦子\*・内海耕慥\*

(\*生物学教室・\*\*新居浜基礎医学研究所)

## Measurement of Membrane Potential Change in Ehrlich Ascites Tumor Cells Coupled with the Cell Metabolism by means of a Selective-Electrode for Tetraphenylphosphonium Ion (TPP<sup>+</sup>)

Eiji OKIMASU\*, Koichi NOBORI\*, Sumio KOBAYASHI\*\*,  
Etuko SUZAKI\* and Kozo UTSUMI\*

\*Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Kochi 781-51, Japan;

\*\*Niihama Medical Research Center, Niihama 792, Japan

**Abstract.** Since alterations in the transmembrane potential are known to be involved in the mechanism of both excitation-contraction coupling in muscle and in stimulus-secretion coupling in non-excitable cells, several investigators indicated the possibility that a change in the membrane potential might play a role in metabolic disorder of Ehrlich ascites tumor cells (EATC). Because direct measurement of the membrane potential with microelectrodes is not feasible owing to the size of the cell, we investigated the application of an indirect method by which the transmembrane potential was determined using a lipophilic cation, TPP<sup>+</sup>. 1. By measuring the time-dependent TPP<sup>+</sup> uptake, it was possible to estimate the membrane potential accurately without affecting the O<sub>2</sub> uptake of the cells. 2. The TPP<sup>+</sup> response depended on temperature and K<sup>+</sup> concentration in the reaction medium. It reflected the changes in K<sup>+</sup> diffusion potential. 3. By this method, the resting potential was about -70 mV, which is rather higher than those reported by other methods. 4. This method showed the remarkable changes in the membrane potential coupled with energy metabolism in EATC caused by glucose and also offered important informations about other metabolic parameters. 5. The depolarization in EATC parallel to its amino acid uptake was also detectable.

From these evidences, the TPP<sup>+</sup> electrode was shown to be fairly suitable for the analysis of stimulation-response coupled with metabolic change in EATC.

## 緒 言

癌細胞は外部情報に従うことなく無限に増殖する性質を持ち細胞外からの膜を介した代謝調節、いわゆるSignal Transductionのmechanismに異常があると考えられている。この様な細胞膜におけるSignal Transductionに関して近年、特に発癌遺伝子の生成物、例えはTyrosine kinase<sup>1)</sup>が注目され、これを解析するために細胞表面リガンド・レセプター複合体形成に伴う受容体蛋白のTyrosine kinaseの活性化等も重要な研究課題となっている<sup>2)</sup>。またこの様な細胞外の刺激に対する細胞の応答反応には多くのものが知られている。この中には神経細胞や筋肉細胞に見られると同じ様な膜電位変化がある。特に血球系の細胞の応答反応は著しく、神経細胞のそれと類似して細胞膜電位の変化は刺激伝達に重要な機能を持つと考えられ、測定されている<sup>3) 4) 5) 6)</sup>。

このような理由から、癌細胞の刺激応答に関する膜電位変化を測定する目的で色々な方法が特に腹水癌細胞で試みられ、多くの研究結果が報告してきた<sup>7) 8) 9)</sup>。測定には現在、微小電極を挿入する方法と疎水性イオンの膜電位に依存した細胞内外への出入りから測定する二つの方法<sup>8) 9) 10)</sup>が使用されているが、前者の方法には細胞膜障害と技術的な難点があり、後者の方法には毒性<sup>11) 12)</sup>と測定可能な応答速度の限界に問題があり、特に近年最もよく使用してきたシアニン系色素は腹水癌細胞のATP合成に依存した呼吸阻害<sup>13)</sup>や、Ca<sup>++</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel阻害<sup>14)</sup>の作用が明らかにされていて、エネルギー依存性反応を測定するには難点があると考えられている。また<sup>3</sup>H-tetraphenylphosphoniumの細胞内取込み測定を放射性同位元素から追究する<sup>15)</sup>には経時的变化の多いこの種の反応の測定には不適当である。このような理由から本研究ではエールリッヒ腹水癌細胞(Ehrlich Ascites Tumor Cells, EATC)の刺激に応答する膜電位変化を測定するためTPP<sup>+</sup>電極法を応用した経時的測定を検討し、この方法が細胞応答反応の解析に極めて有効な手段であることを明らかにしたので報告する。

## 材料と方法

材料にはマウス腹腔内に10<sup>6</sup> cellsのEATCを移植し、その増殖期に相当する移植後7~9日目の細胞を採取し、Krebs-Ringer-Phosphate (KRP) buffer (pH 7.4) 液にて洗浄し、実験に供した。細胞膜電位は加茂らの方法<sup>16)</sup>に従いTetraphenylphosphonium ion (TPP<sup>+</sup>) 電極を作製し、高感度pHメーターに接続して37 °C 4 mlの2.5×10<sup>-6</sup> M TPP<sup>+</sup>を含むKRP中のTPP<sup>+</sup>濃度変化より測定した。尚絶対値は次式により計算した。

$$\Delta\psi = 2.3(RT/F)\log(v/V) - 2.3(RT/F)\log [10^{F\Delta E/2.3RT} - 1] \dots \dots \quad < 1 >$$

ここでFはファラデーの定数、Rは気体定数、Tは絶対温度、Vは反応液の容積。vは測定された腹水癌細胞の容積、ΔEは電極電位変化量（電極内と反応液中のTPP<sup>+</sup>濃度差の変化より求められた電位差）を示す。

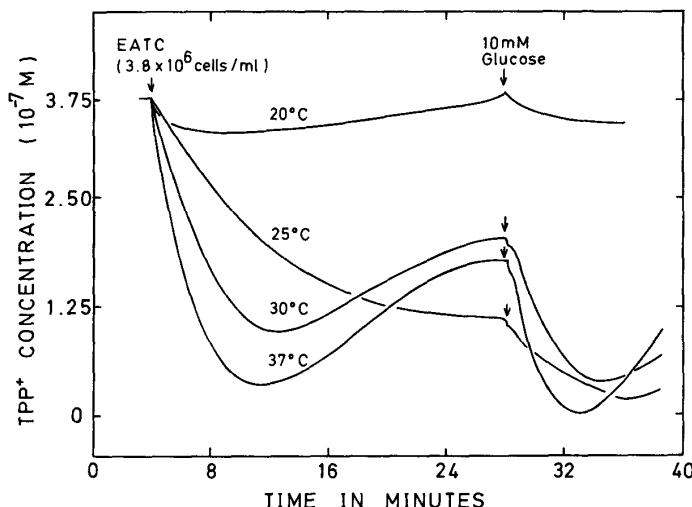
酸素消費は閉塞系反応液中でクラーク型酸素電極により溶存酸素量の変化から測定した。細胞外液中のpH変化は高感度pHメーターによった。細胞内pH変化はAcridine orangeの差スペクトラム ( $\Delta A$ , 490-530nm)<sup>17)</sup>を島津Dual wave length spectrophotometer (UV-300)にて経時に測定した。<sup>16)</sup> 尚、細胞数の測定はHematocytometerによった。

また実験に使用したOuabain, Antimycin A, Rotenone, Amytal, 2-deoxyglucose, 3-O-methylglucose, Cytochalasin B, Phlorizinは、シグマ社の物を使用した。その他使用した試薬はすべて半井化学の特級試薬である。

## 結果と考察

### 1. エールリッヒ腹水癌細胞内へのTPP<sup>+</sup>取込みとその要因

脂溶性イオンであるTPP<sup>+</sup>はEATCの細胞膜電位に依存して細胞内に出入りするが、 $10^{-4}$  Mのような高濃度ではEATCのエネルギー転換反応を阻害する。しかし $10^{-5}$  M以下の濃度ではほとんど細胞内エネルギー代謝に影響を与える。<sup>18)</sup> 本実験には $2.5 \times 10^{-6}$  Mで測定した。即ちEATCは $2.5 \times 10^{-6}$  MのTPP<sup>+</sup>を含む37 °CのKRPの溶液中で速やかにTPP<sup>+</sup>を取り込み、一定時間後(約10分)に再び放出を始めた後、定常状態となりかなり動的状態を反映した。この取り込みや放出反応はFig.1に示すごとく温度依存性が大きく、20 °C以下においてはほとんど取り込みが認められなか



**Fig.1.** Time course of TPP<sup>+</sup> uptake by EATC in the presence or absence of glucose and its temperature dependency.

EATC ( $3.8 \times 10^6$  cells/ml) were incubated in KRP solution containing  $2.5 \mu\text{M}$  TPP<sup>+</sup>. The concentration of TPP<sup>+</sup> in the medium was monitored by TPP<sup>+</sup> specific electrode.

った。この定常状態のEATCにグルコースを添加するとき、再び一過的なTPP<sup>+</sup>の取り込みを示し、この場合でも複雑な代謝調節を反映した。ここでグルコースに依存したTPP<sup>+</sup>の電極応答も温度依存性であることはいうまでもない。また低K<sup>+</sup>溶液中で取込まれたTPP<sup>+</sup>はNa<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>等のイオノホアであるグラミシジンの添加に伴い速やかに放出され(結果は示していない)、細胞膜の静

止電位がK<sup>+</sup>の勾配に依存していることが示唆された。

EATCのTPP<sup>+</sup>取込みが細胞内外のK<sup>+</sup>勾配に依存して起こることから、浸透圧をNa<sup>+</sup>で調節して、KRP溶液中のK<sup>+</sup>濃度を変化させると、Fig.2aに示すごとく低K<sup>+</sup>溶液中で高いTPP<sup>+</sup>取込みが認められ、K<sup>+</sup>の濃度が増大するにつれてTPP<sup>+</sup>取込みの度合いは低下した。これをK<sup>+</sup>の対数値に対してプロットすると、反応液中のK<sup>+</sup>とTPP<sup>+</sup>の取込みの間にはFig.2bのように直接的な相関性が認められた。このことはEATCの細胞膜は比較的K<sup>+</sup>をよく透過し、細胞膜外のK<sup>+</sup>濃度に依存したK<sup>+</sup>の拡散電位に依存してTPP<sup>+</sup>が取込まれることを示唆する。またグルコースに依存した取込みも同様にK<sup>+</sup>の対数値に直線的な相関を示し、グルコース代謝によるエネルギーが膜電位形成に大きく関与していることも明らかにされた。

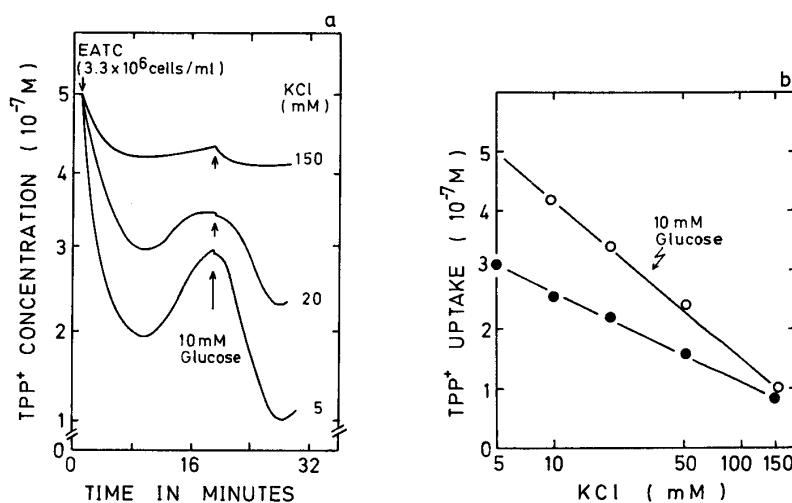


Fig.2. Changes in TPP<sup>+</sup> uptake by EATC as a function of the log [K<sup>+</sup>].

EATC ( $3.3 \times 10^6$  cells/ml) were incubated in various mixtures of Na<sup>+</sup>-KRP containing 2.5  $\mu$ M TPP<sup>+</sup> in the presence or absence of 10 mM glucose at 37 °C.

a. Time course of TPP<sup>+</sup> uptake.

b. Linear relationship between TPP<sup>+</sup> uptake and extracellular K<sup>+</sup> concentration. The maximum uptake of TPP<sup>+</sup> in the presence (○—○) or absence (●—●) of 10 mM glucose. Other conditions were as described in Fig.1.

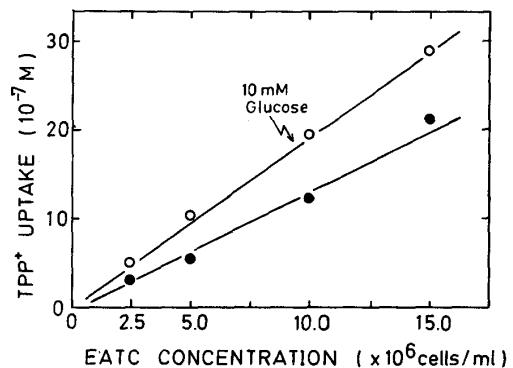
## 2. エールリッヒ腹水癌細胞の静止電位

種々濃度のEATC ( $2.5 \times 10^6$  cells/ml ~  $1.5 \times 10^7$  cells/ml)へのTPP<sup>+</sup>の取込みはFig.3に示すごとく細胞数と取込まれるTPP<sup>+</sup>の間には直線関係が成立する。今、EATCの平均細胞直径と核の平均直径を求め、球体として細胞質の容積を計算し、前式<1>より $\Delta\psi$ を計算するとEATCの平均静止電位は-70.3 mVとなった。この値はこれまでのEATCで求められた値(-60 mVないし-30 mV)<sup>9) 19)</sup>とし比較して高値であった。これまでの研究で明らかにされているごとく<sup>16) 20)</sup> 分離ミトコンドリアはその膜電位に依存して速やかにTPP<sup>+</sup>をミトコンドリア内に取込むことが明らかにされている。従って、本研究で見られるようにEATC内に定常状態にまでTPP<sup>+</sup>を取込むためにかなりの長時間を必要とする場合には細胞質内に取込まれた

$\text{TPP}^+$ が速やかにミトコンドリアに取込まれるため、結果的に見かけの値として高くなったものと考えられる。

Fig.3. Constant level of  $\text{TPP}^+$  uptake in EATC suspension as a function of cell number.

Experimental conditions were the same as described in Fig.1. Maximum uptake in the presence(○—○) or absence(●—●) of 10 mM glucose.



### 3. グルコースに依存した膜電位形成とその阻害

EATCは一過的に $\text{TPP}^+$ を取り込み定常状態となるが、上述のようにグルコース添加でその酸化エネルギーに依存して再び一過的な $\text{TPP}^+$ の取り込みを示す。このグルコースに依存した $\text{TPP}^+$ の取り込みはFig.4bに示すとく、 $\text{CN}^-$ 、アミタール、アンチマイシン等のミトコンドリアのエネルギー転換反応の阻害剤によっては阻害されず、 $\text{NaF}$ のような解糖系の阻害剤あるいはサイトカラシンBやフロリジンのようなグルコースの取り込み阻害剤や2-デオキシグルコース、メチルグルコース等のグルコース代謝拮抗剤で著しく阻害され、この反応が添加されたグルコースの代謝に依存していることを示した。また細胞膜電位が $\text{K}^+$ の勾配に依存する事からも明らかのように、 $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase阻害剤であるウアバインでも強く阻害された(Fig.4a)。

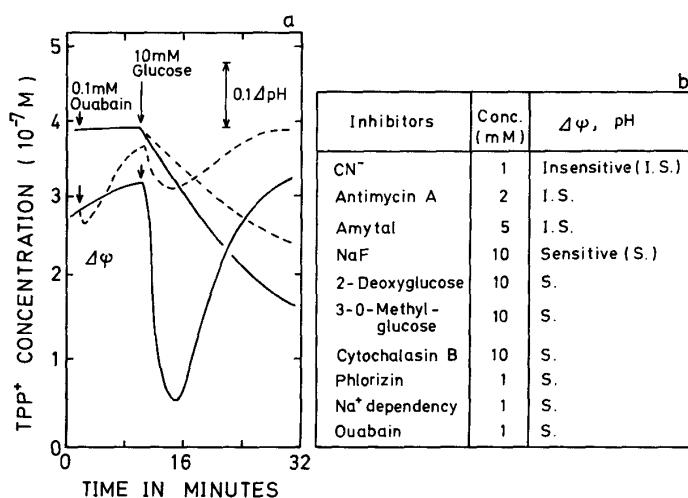


Fig.4. Effect of various inhibitors on the glucose-dependent  $\text{TPP}^+$  uptake and pH change.

EATC ( $1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ ) were incubated in the KRP solution containing various inhibitors at 37 °C. Other experimental conditions were as described in Fig.1.

a. Effect of ouabain on the time course of glucose-induced  $\text{TPP}^+$  uptake and pH change.

Extracellular pH change was recorded by high sensitive pH meter.

b. Sensitivity of glucose-induced  $\text{TPP}^+$  uptake and pH change to various inhibitors.

#### 4. エールリッヒ腹水癌細胞のグルコース添加に伴う代謝応答

$2.5 \times 10^{-6}$  MのTPP<sup>+</sup>を含む37 °CのCa<sup>++</sup>free KRP溶液中に懸濁されたEATCは上述のTPP<sup>+</sup>取込みのみの他に極めて強い一過性のO<sub>2</sub>消費、それと平行したCa<sup>++</sup>の取込みが認められる。その後、経時的にTPP<sup>+</sup>及びCa<sup>++</sup>の放出があり、一定の状態となる。この時シアニン色素で見られた呼吸阻害は全くなかった<sup>13)</sup>。また10 mMのグルコースを添加すると、クラビトリーエフクトとして知られる一過的な呼吸の増大とCa<sup>++</sup>の取込み、細胞内の酸性化やH<sup>+</sup>の細胞外への放出が同時に示された

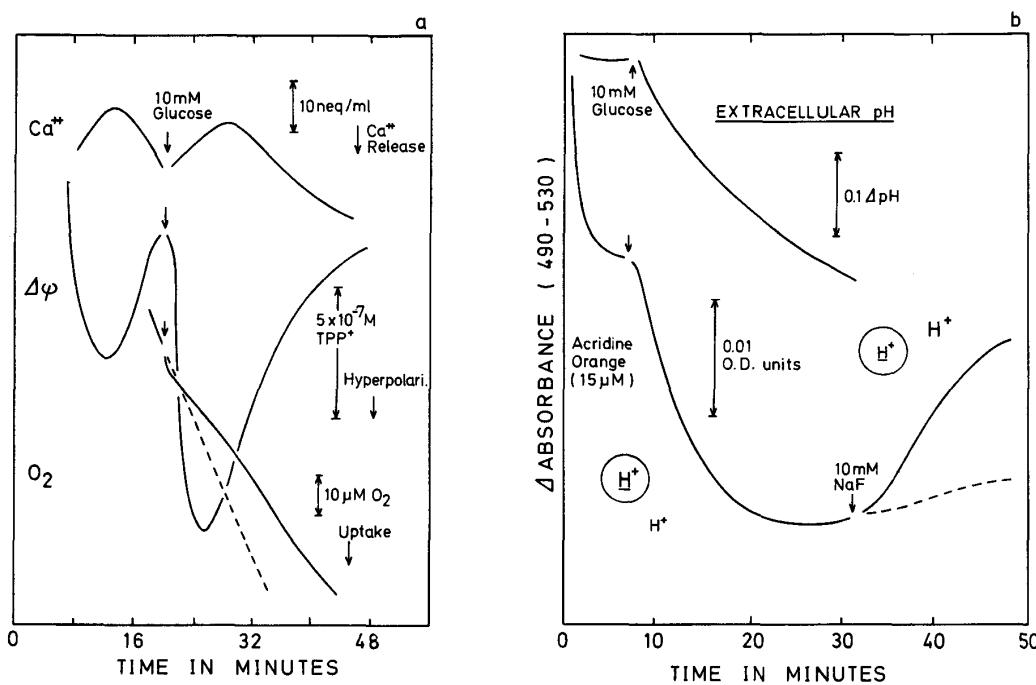


Fig.5. Glucose-dependent changes in various metabolic parameters of EATC.

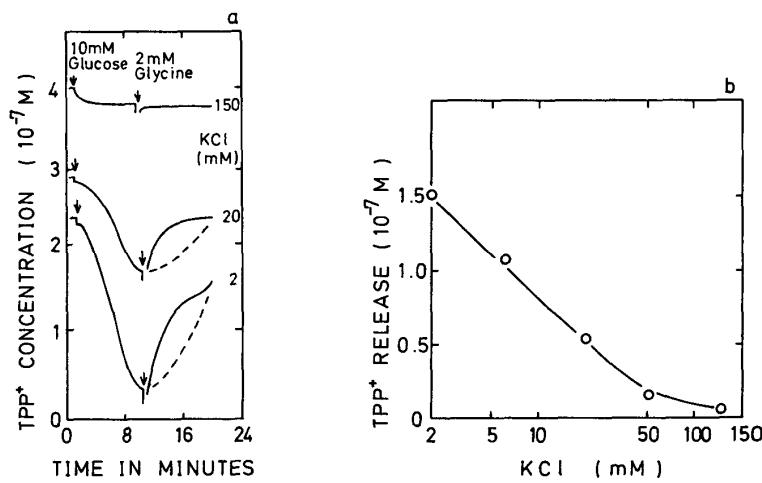
EATC ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were incubated in Ca<sup>++</sup> free KRP solution at 37 °C.

- Time course of membrane potential ( $\Delta\psi$ ), Ca<sup>++</sup> uptake (Ca<sup>++</sup>) and oxygen uptake (O<sub>2</sub>). Extracellular Ca<sup>++</sup> concentration and O<sub>2</sub> uptake were monitored by Ca<sup>++</sup> specific electrode and oxygen electrode respectively.
- Time course of intra- and extra-cellular pH changes. Intracellular pH change was monitored by the differential spectrum of acridine orange ( $\Delta A_{490-530}$ ) using dual wave length spectrophotometer (Shimadzu UV-300).

(Fig.5a,b)。TPP<sup>+</sup>の取込みはこれらの反応の中で最も早期に、また最も著しいものとして測定される。そしてこれに続くTPP<sup>+</sup>の放出には、Ca<sup>++</sup>の放出が共役して認められた。このことはTPP<sup>+</sup>存在下ではシアニン色素(diS-C<sub>3</sub>-5)で見られたような酸素消費の阻害はなく（結果は示していない）、TPP<sup>+</sup>存在下にもエールリッヒ腹水癌細胞のグルコース添加に伴う色々な代謝応答の測定が充分可能であり、細胞障害を伴うことなしに他の代謝応答反応とともに膜電位測定も可能であることを示唆する。

### 5. エールリッヒ腹水癌細胞のアミノ酸取込みの膜電位依存性

ここでTPP<sup>+</sup>電極の応用例として膜電位に依存したEATCの細胞生理的な反応を示す。すでに明らかにされているごとく、EATCは細胞膜電位に依存してアミノ酸を取込む。従ってその取込みがEATC懸濁液のK<sup>+</sup>に大きく依存することは良く知られた事実である。<sup>19)</sup>しかしFig.6a,bに示すごとく50 mM以上のK<sup>+</sup>中ではNa<sup>+</sup>が90 mM以下となるために、Na<sup>+</sup>依存性のアミノ酸取込みがNa<sup>+</sup>の低下のため急激に低下するものと考えられる。このようなアミノ酸取込みによる



**Fig.6.** Effect of glycine on the TPP<sup>+</sup> accumulation of EATC at different concentrations of K<sup>+</sup>.

Added glycine concentration was 2 mM. Other conditions were as in Fig.1 except that EATC number used was  $3.5 \times 10^6$  cells/ml.

- a. Time course of glycine-induced TPP<sup>+</sup> efflux at different K<sup>+</sup> concentrations.
- b. K<sup>+</sup> dependent profile of glycine-induced TPP<sup>+</sup> efflux in suspension of EATC.

膜電位の低下はアミノ酸の取込みと共に輸送するNa<sup>+</sup>に起因するものと考えられる。また同時にこのときK<sup>+</sup>が放出されイオンのneutralizationが共役している可能性もある。何れにしてもこのアミノ酸の取込みの原動力がNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseによるelectrogenic operationによることは、このアミノ酸取込みがウワバインで阻害されることからも明らかである（結果は示していない）。

以上、TPP<sup>+</sup>電極法はEATCのエネルギー代謝に影響を与えることなく、細胞膜電位の測定をすることが可能で、癌細胞代謝を解析する手段として利用できることを明らかにした。

### 結論

腹水癌細胞の代謝調節や刺激応答の解析を行う目的でTPP<sup>+</sup>電極による細胞膜電位測定を試み、次の結果を得た。

1. TPP<sup>+</sup>電極法により細胞膜の膜電位に依存した経時的なTPP<sup>+</sup>の取込み放出がかなり正確に測定可能である。
2. この反応は温度依存性であり、反応液中のK<sup>+</sup>に強く依存し、K<sup>+</sup>の拡散電位に依存する膜電位変化を大きく反映している。
3. この方法で測定されるEATCの静止電位はほぼ-70 mVで、他の方法で測定されたものよりやや高いが、これは平衡状態に達するのにかなりの長時間を必要としミトコンドリア膜電位が関与するためと考えられる。
4. この方法により、例えばグルコース添加によるEATCのエネルギー代謝に共役した膜電位変化をよく示し、他の代謝パラメーターと共に重要な情報を提供する。
5. EATCのアミノ酸取込みとも平行して脱分極応答が示される。

以上のことからTPP<sup>+</sup>電極法はEATCの刺激応答の解析に有効な方法であることが明らかにされた。

#### 文 献

- 1) Takeya, T. and Hanafusa, H. *Cell* **32**, 881-894, 1983.
- 2) Ullrich, A. *Nature* **313**, 756-761, 1985.
- 3) Utsumi, K., Sugiyama, K., Miyahara, M., Naito, M., Awai, M. and Inoue, M. *Cell Struct. & Funct.* **2**, 203-209, 1977.
- 4) Utsumi, K., Miyahara, M., Okimasu, E., Sugiyama, K. and Inoue, M. *Physiol. Chem. & Phys.* **11**, 365-369, 1979.
- 5) Friedhoff, L.T. & Sonenberg, M. *Blood* **61**, 180-185, 1983.
- 6) Seligmann, B.E., Gallin, E.K., Martin, D.L., Shain, W. and Gallin, J.I. *J. Memb. Biol.* **52**, 257-272, 1980.
- 7) Gallin, E.K. and Gallin, J.I. *J. Cell Biol.* **75**, 277-289, 1977.
- 8) Laris, P.C., Perschadsingh, H.A. and Johnstone, R.M. *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 475-488, 1976.
- 9) Akerman, K.E.O. *Biochim. Biophys. Acta* **546**, 341-347, 1979.
- 10) Smith, T.C. and Robinson, S.C. *J. Cell Physiol.* **106**, 399-406, 1981.
- 11) Smith, T.C. and Robinson, S.C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **95**, 722-727, 1980.
- 12) Conover, T.E. and Schneider, R.F. *J. Biol. Chem.* **256**, 402-408, 1981.
- 13) Okimasu, E., Akiyama, J., Shiraishi, N. and Utsumi, K. *Physical. Chem. & Phys.* **11**, 425-433, 1979.
- 14) Simons, T.J.B. *J. Physiol.* **288**, 481-507, 1979.
- 15) Lichtshtein, D., Kaback, H.R. and Blume, A.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 650-654, 1979.
- 16) Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. *J. Memb. Biol.* **49**, 105-121, 1979.
- 17) Heinz, A., Sachs, G. and Schafer, J.A. *J. Memb. Biol.* **61**, 143-153, 1981.
- 18) Kuroki, M., Kamo, M., Kobatake, Y., Okimasu, E. and Utsumi, K. *Biochim. Biophys. Acta* **693**, 326-334, 1982.
- 19) Laris, P.C., Bootman, M., Perschadsingh, H.A. and Johnstone, R.M. *Biochim. Biophys. Acta*.

512, 397-414, 1978.

20) 沖増英治, 黒木光行, 内海俊彦, 小林純郎, 内海耕慥 感光色素 **88**, 48-56, 1981.

21) Johnstone, R.M. *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 366-373, 1972.

(1986年8月1日受理)