

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06865

研究課題名(和文) TASK1チャンネルによるアドレナリン分泌調節とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) The physiological role of TASK channel-induced adrenaline secretion

研究代表者

松岡 秀忠 (Matsuoka, Hidetada)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90374991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌細胞におけるTASK1チャンネルの機能調節機構について解析した。NGF およびムスカリン存在下でのTASK1チャンネルの機能調節に、クラスリン依存性エンドサイトーシスが関与することを明らかにした。PC12細胞におけるムスカリン刺激に伴うTASK1チャンネルエンドサイトーシスは、PKC-Pyk2-Src pathwayが関与することを示唆した。さらに、TASK1チャンネルの細胞膜局在化の機構について解析した結果、TASK1チャンネルは、p11タンパク質との結合時、細胞質に局在し、その結合の解離により、細胞膜へと移行し、局在化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、TASK1チャンネルの機能調節機構を明らかにした。ムスカリン受容体によるKチャンネルの抑制は、多くのチャンネルが、gatingの変化によって制御されていることが知られている。今回申請者は、Kチャンネルの1つであるTASK1チャンネルの抑制には、gatingの変化だけでなくエンドサイトーシスが関与することを世界で初めて明らかにした。本研究成果は、TASKチャンネルファミリーの機能制御機構を明らかにするとともに、未解明の多くのKチャンネルの機能制御機構の解明を推進するものと期待され、学術的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：I investigated the function and physiological role of TASK1 channels in endocrine cells. Pharmacological and molecular biological analyses showed that TASK1 channels are regulated by the clathrin-dependent endocytosis in NGF- and muscarine-stimulated adrenal medullary and PC12 cells. Furthermore, it showed that muscarine-induced endocytosis of TASK1 channels is regulated through PKC-Pyk2-Src pathway in PC12 cells. Additionally, TASK1 channels were localized at plasma membrane in PC12 cells is due to a lack of p11 protein. On the other hand, the treatment with NGF of PC12 cells was induced the expression of p11 proteins and resulted in a change in membrane localization of TASK1 channels. These results indicate that TASK1 channels were translocated and localized to plasma membrane by dissociating from p11 proteins.

研究分野：細胞生理学

キーワード：TASKチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

多様な生理機能に重要な働きをする2PドメインKチャンネルファミリーのTASKチャンネルに注目し研究を進めている。副腎髄質細胞のアドレナリン分泌システムにおけるTASK1チャンネルの役割と機能調節の分子機構を解析し、内分泌細胞におけるTASK1チャンネルの重要性が示唆された。しかしながら、生理機能発現に果たすTASK1チャンネルの役割やその機能調節機構の詳細については不明なままである。本課題におけるTASK1チャンネルの機能および生理学的意義の解明が、副腎髄質での細胞内カルシウムシグナリングやホルモン分泌機構の解明を推進するものと期待される

## 2. 研究の目的

本課題では、内分泌細胞の生理機能発現におけるTASK1チャンネルの分子基盤の解明を最終目的とし、内分泌細胞のホルモン分泌機構におけるTASK1チャンネルの機能およびその生理的意義を詳細に解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養・トランスフェクション

PC12細胞は、serum starvation後、NGF刺激またはムスカリン刺激を行った。また、各阻害剤処理は、各刺激の前後行った。PC12細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法を用いた。単離AM細胞は、Ca<sup>2+</sup> free平衡塩溶液に30分間置いた後、NGF刺激またはムスカリン刺激を行った。

### (3) ウェスタンブロット法

serum starvation後、PC12細胞をムスカリンまたはNGF刺激した。得られた細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロット法により、Src、Pyk2の発現・活性化を検出した。ラット副腎皮質・髄質、PC12細胞±NGF、NEK293T細胞におけるp11タンパク質の発現についても、各細胞抽出液を調整し、ウェスタンブロット法を用い検出した。

### (4) Proximity ligation assay

Duolink In Situ kit (Olink Bioscience社)を用いたProximity ligation assayにより、TASK1チャンネルとSrc kinases、TASK1チャンネルとp11、Pyk2とSrc kinasesの相互作用について解析した。PLA反応の検出は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

### (5) 免疫染色法・顕微鏡観察

AM 細胞における TASK1 チャンネルおよびエンドサイトーシス関連分子は、免疫染色法で検出した。PC12 細胞における endogenous および exogenous TASK1 チャンネルおよびエンドサイトーシス関連分子は GFP 蛍光および免疫染色法で検出した。各蛋白質の細胞内局在は、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4 . 研究成果

TASK1 チャンネルエンドサイトーシスの分子機構をさらに詳細に解析した。PC12 細胞におけるムスカリン刺激に伴う TASK1 チャンネルエンドサイトーシスに PKC $\alpha$  の活性化が重要な役割を果たすことを明らかにした。ムスカリン刺激により活性化した PKC $\alpha$  が、Pyk2 のセリン残基のリン酸化を亢進させることによって、PKC $\alpha$  と Pyk2 の相互作用、さらには Pyk2 と Src の細胞膜での相互作用を促進することを明らかにした。PKC-Pyk2-Src pathway を介して、TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスが誘導されていることを示唆した。

近年、細胞内タンパク質の p11(S100A10)が TASK1 チャンネルと相互作用し、細胞膜へのトラフィッキングに関与することが報告された。そこで、TASK1 チャンネルの細胞膜局在への p11 の関与についても解析した。副腎髄質細胞由来 PC12 細胞において、通常培養では、p11 タンパク質の発現はほとんど認められず、一方、神経成長因子 NGF で分化刺激すると p11 タンパク質の発現上昇が認められた。それら(NGF 有無)細胞での TASK1 チャンネルの細胞内局在を観察した結果、通常培養の PC12 細胞では、ほとんどが細胞膜局在を示し、NGF 刺激した PC12 細胞では、ほとんどが細胞質(ER 近傍)局在を示した。さらに、通常培養の PC12 細胞に myc tag-p11 タンパク質を一過性に発現させた細胞での TASK1 チャンネルの細胞内局在を観察したところ、細胞膜から細胞質へと局在の変化が観察された。p11 タンパク質の発現量により TASK1 チャンネルの細胞内局在が異なることを明らかにした。以上の結果より、p11 タンパク質は、通常、TASK1 チャンネルを ER に留めておき、細胞外刺激に伴い、解離することで TASK1 チャンネルを細胞膜へと移行させていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuoka H, Pokorski M, Harada K, Yoshimura R, Inoue M	4. 巻 68
2. 論文標題 Expression of p11 and heteromeric TASK channels in rat carotid body glomus cells and nerve growth factor differentiated PC12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 679-690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155420955246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue M, Matsuoka H, Harada K, Mugishima G, Kameyama M	4. 巻 472
2. 論文標題 TASK channels: channelopathies, trafficking, and receptor-mediated inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - Eur J Physiol-	6. 最初と最後の頁 911-922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02403-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue M, Harada K, Matsuoka H.	4. 巻 5,872
2. 論文標題 Mechanisms for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced increase in excitability in guinea-pig and mouse adrenal medullary cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 172956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172956.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka H, Harada K, Mashima K, Inoue M.	4. 巻 65
2. 論文標題 Muscarinic receptor stimulation induces TASK1 channel endocytosis through a PKC-Pyk2-Src pathway in PC12 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Signal.	6. 最初と最後の頁 109434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2019.109434.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada K, Matsuoka H, Inoue M.	4. 巻 31;132(11).
2. 論文標題 STIM1-dependent membrane insertion of heteromeric TRPC1-TRPC4 channels in response to muscarinic receptor stimulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 229389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.227389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada K, Matsuoka H, Inoue M.	4. 巻 372(3)
2. 論文標題 Expression and regulation of M-type K+ channel in PC12 cells and rat adrenal medullary cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 457-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2824-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Matsuoka H, Lesage F, Harada K.	4. 巻 33(1)
2. 論文標題 Lack of p11 expression facilitates acidity-sensing function of TASK1 channels in mouse adrenal medullary cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 455-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800407RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Harada K, Matsui M, Matsuoka H.	4. 巻 15;843
2. 論文標題 Differences among muscarinic agonists in M1 receptor-mediated nonselective cation channel activation and TASK1 channel inhibition in adrenal medullary cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 104-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.11.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keita Harada, Hidetada Matsuoka, Yuchio Yanagawa, Masumi Inoue
2. 発表標題 副腎におけるアロプレグナロン産生細胞の同定、および副腎髄質細胞におけるGABAシグナル機構の成長における変化
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidetada Matsuoka, Keita Harada, and Masumi Inoue
2. 発表標題 The roles of p11 for the localization and heteromeric channel formation of TASK1 and TASK3 isoforms
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会 / 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuoka H and Inoue M
2. 発表標題 Molecular mechanism for muscarinic receptor-mediated endocytosis of TASK1 channels in rat adrenal medullary cells
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuoka H, Harada K, Inoe M
2. 発表標題 The roles of p11 for the localization and heteromeric channel formation of TASK1 and TASK3 isoforms
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------