

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790228

研究課題名(和文) アドレナリン分泌機序におけるTASKチャネルの機能と生理的意義の解明

研究課題名(英文) The mechanism of the function and physiological role of TASK channel in adrenaline secretion

研究代表者

松岡 秀忠 (MATSUOKA, hidetada)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：90374991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌細胞におけるTASK1チャネルの機能調節の分子機構について、薬理的・分子生物学的手法を用いて解析した。NGF存在下の副腎髄質細胞およびPC12細胞において、TASK1チャネルは、ジロイシンモチーフを介したクラスリン依存性エンドサイトーシスによって制御されていることを明らかにした。さらに、その制御には、Src/PI3K/PLCが重要な役割を果たすことを示唆した。また、NGF長期存在下では、遺伝子・蛋白質レベルで発現抑制が観察された。以上の結果より、TASK1チャネルは、エンドサイトーシスによる細胞膜発現の制御、遺伝子・蛋白質レベルでの発現制御によって機能調節されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I investigated the molecular mechanism of regulation of TASK1 channels in endocrine cells. Pharmacological and molecular biological analyses showed that TASK1 channels are regulated by the clathrin-dependent endocytosis in NGF-stimulated adrenal medullary and PC12 cells. Mutation analysis of the TASK1 channel revealed that the dileucine motif was involved in at least part of the endocytosis. Furthermore, I showed that Src, PLC and PI3K are involved in NGF-induced endocytosis of TASK1 channels in PC12 cells. Additionally, the expression of TASK1 channels at the protein and mRNA levels was suppressed in PC12 cells treated with NGF for 2 weeks. These results indicate that NGF suppresses the expression of TASK1 channels in the plasma membrane via not only endocytosis but also the inhibition of gene transcription.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：TASKチャネル エンドサイトーシス

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チャネルファミリーのTASKチャネルに注目し研究を進めている。現在までに、TASK1チャネルがラット副腎髄質細胞のカテコールアミン分泌調節に関与し、運動時のアシドーシスのセンサーとして機能することを示唆した。また、TASK1チャネルの機能調節機構の一端を明らかにした。内分泌細胞におけるTASK1チャネルの重要性は示唆されたが、生理機能発現に果たすTASK1チャネルの役割やその活性調節機構の詳細については不明なままである。よって、本課題におけるTASK1チャネルの作用機序および活性制御機構の解析が、副腎髄質細胞のカルシウムシグナリングの解明、さらには、内分泌細胞でのカルシウムシグナリングおよびホルモン分泌機構の解明へとつながるものと考えられる。

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チャネルの分子基盤の解明を最終目的とし、内分泌細胞におけるTASK1チャネルの機能調節機構を分子レベルで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刺激を行った。また、各阻害剤処理は、NGF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。

(2)Proximity ligation assay

TASK1チャネルとTASK3チャネル、TASK1チャネルとSrc kinaseの相互作用について解析するため、Duolink In Situ kit(Olink Bioscience社)を用いて、Proximity ligation assayを行った。

TASK1、TASK3、Src kinase発現プラスミドを様々な組み合わせ(GFP-TASK1/myc-TASK1など)で、リポフェクション法を用いて、PC12細胞に導入した。PLA反応の検出は、コンフォーカル顕微鏡を用いた。

(3)免疫染色・顕微鏡観察

PC12細胞におけるendogenousおよびexogenous蛋白質は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、コンフォーカル顕微鏡で観察した。

(4)Quantitative RT-PCR

NGF刺激前後でのTASK1チャネルの遺伝子発現量について、Quantitative RT-PCRで解析した。TaqMan Fast Cells-to-CT Kit(Invitrogen)を用いてRT reactionを行い、StepOnePlus Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いてTASK1チャネルmRNA量を同定した。コントロールには、アクチンを用いた。

4. 研究成果

TASK1チャネルは、神経細胞などではホモ2量体またはTASK3とのヘテロ2量体を形成することが知られている。PC12細胞におけるTASK1チャネルの2量体形成について、Proximity ligation assayで解析した。その結果、PC12細胞では、TASK3チャネルとは2量体形成しておらず、TASK1チャネルはホモ2量体で存在していることが明らかとなり、副腎髄質細胞では、TASK1チャネルはホモ2量体で存在していることが示唆された。

次に、TASK1チャネルのクラスリン依存性エンドサイトーシスを制御するシグナル伝達系について解析した。TrkAの下流因子(TrkA、PI3K、PLC、MEK)の関与について、各種阻害剤を用いて解析した。TrkA、PI3K、PLC阻害剤処理したPC12細胞において、TASK1チャネルのエンドサイトーシスの抑制が観

察された。MEK 阻害剤処理では、エンドサイトーシスの抑制は観察されなかった。さらに、PLC の下流因子 PKC についても阻害剤を用いて解析を行った。その結果、PKC の 3 つの isoform (conventional, novel, atypical) のうち、conventional PKC 阻害剤処理細胞で TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスの抑制が観察された。

また、NGF 刺激依存的に TASK1 チャンネルのチロシンリン酸化レベルが亢進することから、Src kinase の関与について検討した。Src 阻害剤処理細胞やドミナントネガティブ Src 発現細胞において、TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスの抑制が観察された。さらに、Proximity ligation assay より、Src kinase と TASK1 チャンネルが NGF 刺激依存的に相互作用する様子が観察された。

次に、NGF 存在下での TASK1 チャンネルの遺伝子発現変化について調べた。Quantitative RT-PCR 法を用いて解析した結果、長期間の NGF 存在下では、TASK1 チャンネル mRNA 量の減少が観察された。

以上の結果より、TASK1 チャンネルのエンドサイトーシス制御には、PI3K pathway、PLC-PKC pathway、Src kinase の活性化および相互作用が関与することが示唆された。また、TASK1 チャンネルの機能調節に蛋白質レベルでの制御 (recycling and/or degradation pathways) に加え、遺伝子レベルでの発現抑制も関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Inoue M, Harada K, Nakamura J, Matsuoka H. Regulation of α 3-containing GABA_A receptors in guinea-pig adrenal medullary

cells by adrenal steroids. Neuroscience Sep3;253C:245-255 2013

Matsuoka H., Harada K, Nakamura J, Inoue M. Nerve growth factor-induced endocytosis of TWIK-related acid-sensitive K⁺ 1 channels in adrenal medullary cells and PC12 cells Pflugers Arch-European Journal of Physiology-.2013 Jul;465(7):1051-64.

Inoue M, Harada K, Matsuoka H., Nakamura J, Warashina A. Mechanisms and roles of muscarinic activation in guinea-pig adrenal medullary cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Sep 15;303(6):C635-44

[学会発表](計2件)

Hidetada Matsuoka and Masumi Inoue Nerve growth factor-induced endocytosis of TWIK-related acid-sensitive K⁺1 channels in adrenal medullary cells and PC12 cells The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences, Shizuoka, Japan (2013.9.4-9.7)

Hidetada Matsuoka, Keita Harada, and Masumi Inoue NGF-induced endocytosis of TASK1 channels in adrenal medullary cells and PC12 cells 第89回日本生理学会大会 (2012.3.29-3.31,長野県松本市文化会館(長野))

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松岡 秀忠 (MATSUOKA, Hidetada)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：90374991

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：