

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号： 11501
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 20H01009
研究課題名 癌細胞増殖能に関わるリークK⁺チャネルの細胞内局在部位の解明

研究代表者

野呂田 郁夫 (norota, ikuo)

山形大学・医学部・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：TASK-3は、幾つかの癌細胞において細胞表面のみならずミトコンドリア内膜にも発現している。この細胞内の局在変化が細胞増殖能にどのように影響するかを調べるために、TASK-3の変異体を作製し、細胞内の発現と局在を調べた。酸感受性領域の点変異を作製し、膜電流を評価したところ、野生型と比べて電流-pH関係の傾きが鈍くなる変異体H98Kと殆ど酸感受性を示さない変異体H98Rを見出した。一方、複数の癌細胞株においては、外来TASK-3のミトコンドリアへの発現が殆ど観察されなかった。TASK-3の細胞内局在と細胞増殖能への影響については未だ不明である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2ポアドメインカリウムイオンチャネルである TASK-3 は、筋肉や神経、内分泌組織などの興奮性に関わっている。このチャネルは酸感受性領域を持っており、様々な病態に関係していることが知られている。本研究で発見したユニークな酸感受性の機能欠失体は、発現系細胞の病態モデルへの利用をはじめ、TASK-3が関係する様々な疾患の研究への応用が可能であると思われる。

研究分野：薬理学

キーワード：TASK-3 K2Pカリウムチャネル 酸感受性 pH 細胞内局在 癌細胞 ミトコンドリア

1. 研究の目的

2ポドメインカリウムイオンチャネルである TASK-3 は筋肉や神経、内分泌などの組織の興奮性に関与している。細胞レベルでは、細胞表面に発現して静止時や興奮時に細胞内から細胞外へカリウムイオンを僅かに通過させている。このような現象は細胞膜から漏れ出ているように観察されるので、漏れ電流や背景電流と呼ばれている。この電流は膜電位をカリウムイオンの平衡電位に近かせるように働く。

生理的な環境では興奮性に大きく関わっているチャネルであるが、多くの癌細胞で過剰に発現し、癌患者の生存率に影響することが知られている。TASK-3 が過剰発現している幾つかの癌細胞では、細胞表面のみならず、ミトコンドリアにも発現していることが報告されている。この TASK-3 のミトコンドリアへの局在が癌細胞の増殖にとってどの程度重要なのかは不明である。TASK-3 は癌細胞においても静止膜電位の維持に貢献しているが、メラノーマやケラチノサイトの細胞株ではミトコンドリア代謝と細胞の増殖能にも関係しており、ミトコンドリア内の K^+ 濃度を調整して代謝と恒常性に関わっていると考えられている。

このような研究結果から、ミトコンドリア内膜に局在する TASK-3 が増殖能に関わっていると考えられるが、この関係を調べた報告は未だない。これらの関連性を明らかにするには、癌細胞の形質膜がミトコンドリア内の何れかに、TASK-3 を偏在させて増殖能を評価する必要がある。現状では細胞内の局所ごとにタンパクの機能や発現を調節する術がないため、この局在と増殖の関係性を解き明かすことは難しい。

本研究では、癌細胞における TASK-3 の細胞内局在の意義を明らかにするために、ミトコンドリアの pH 環境に注目した。TASK-3 は酸感受性の領域を有するので、ミトコンドリア膜管腔の pH 環境（中性から弱酸性）では影響を受け易いと思われる。酸感受性が増強する変異体や酸感受性を持たない TASK-3 が出来れば、ミトコンドリアに特異的な TASK-3 の機能獲得体もしくは機能喪失体として働くのではと考えた。

この研究では、TASK-3 の酸感受性部位の感受性を変えた変異体を作製し、その変異体を癌細胞株のミトコンドリアに発現させ、増殖能を調べることを目的とした。このような TASK-3 の変異体は、形質膜ではあまり影響を受けずに、ミトコンドリア内膜ではカリウムの透過性に影響して、結果的に ATP 産生に影響しうるとされた。しかしながら、癌細胞の発現系において、外来 TASK-3 をミトコンドリア内に発現させることは出来なかった。本研究では、酸感受性が減弱した TASK-3 の機能欠失体を新たに見出した。しかし、TASK-3 がミトコンドリア内においてどのように細胞増殖に影響するかは未だ不明のままである。

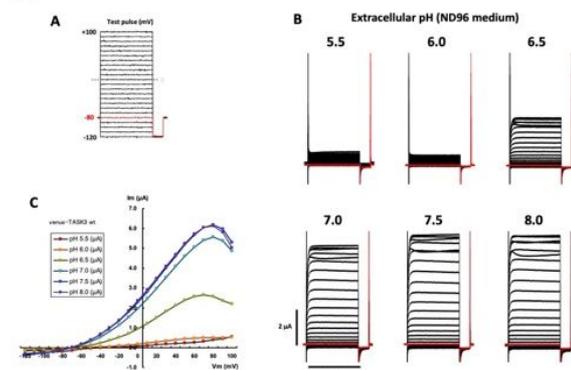
2. 研究成果

(1) TASK-3 変異体のリーク K^+ 電流と酸感受性の評価

アフリカツメガエル卵母細胞に野生型の TASK-3 と酸感受性部位の変異体 H98K と H98R の RNA をそれぞれインジェクションし、48 時間後に二電極膜電位固定法により電流と膜電位の関係を調べた。

図 1

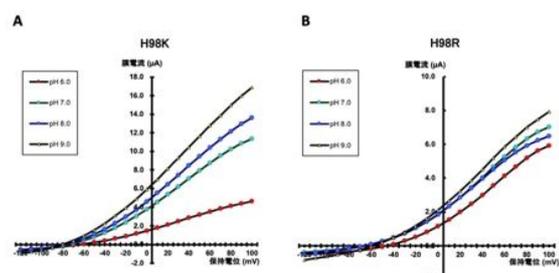
細胞外液 pH 7.5 の条件において、TASK-3 野生型では、細胞膜の保持電位（図 1A）を高くすると K^+ の平衡電位 -78 mV 付近を境に外向き（プラス側）に流れ出し、電位勾配により電流量が大きくなった。この実験において典型的なリーク K^+ 電流が観察された。（図 1B；代表例）細胞外液を酸性にすると、高電位側の電流が小さくなり、膜電流と電圧関係の曲線の傾きは、細胞外 pH に依存して小さくなった。（図 1C；代表例）



変異型 H98K も、膜電流と電圧関係の曲線の傾きが、細胞外 pH に依存して小さくなったが、pH 6.0 の電流量は野生型よりも大きい。（図 2A；代表例）

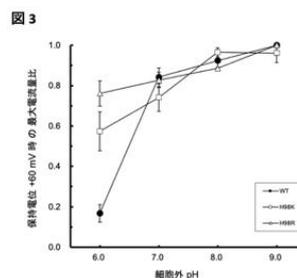
変異型 H98R は、曲線の傾きが余り変わらず、pH 6.0 における電流量は、野生型に比べ著しく大きい。（図 2B；代表例）細胞膜の保持電位 $+60$ mV における電流量と細胞外 pH の関係は、中性からアルカリ側の範囲では野生型と変異体の間で大きな違いはない。

図 2



一方、酸性側では、野生型の電流量は小さく、変異体 H98K の電流量が中程度、変異体 H98R の電流量が大きくなっている。(図3)

細胞外 pH 6.0 における電流量の序列は、野生型(H98) < H98K < H98R である。この順位は塩基性アミノ酸の等電点と同じであり、塩基性が強いほど閉じにくくなることが判明した。酸感受性部位の変異体 H98K と H98R は、酸感受性の機能喪失体であることが確かめられた。

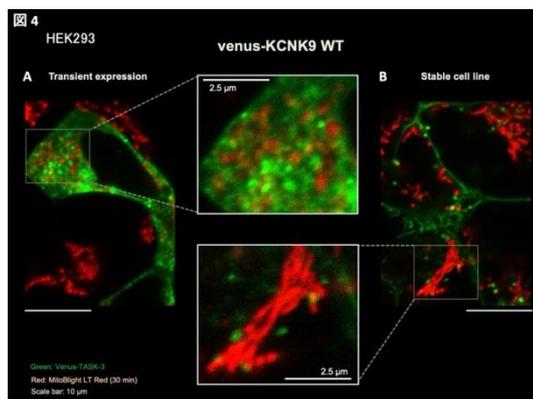


(2) 細胞内局在

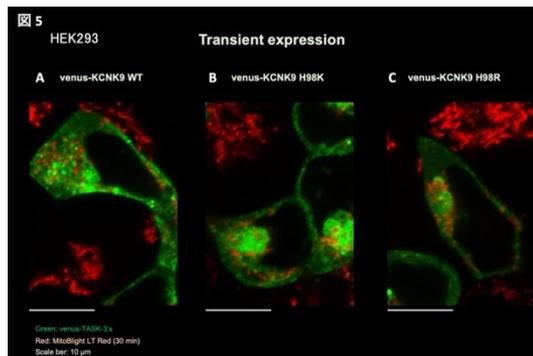
TASK-3 の細胞内局在を調べるために、HEK293 細胞株と PANC-1 細胞株に野生型と変異体の DNA をポリエチレンイミンにより導入し、ガラス底のシャーレで培養し、ミトコンドリアの指示薬 MitoBlight-LT red を負荷して生細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

HEK293 細胞株の一過性の発現において、細胞内にミトコンドリア指示薬で染められた赤色 (555 nm 励起; 568-1000 nm 検出) の小さな楕円が観察され、細胞質全体に Venus の蛍光を反映する緑色 (488 nm 励起; 525-578 nm 検出) が観察された。(図 4A; 代表例) ミトコンドリアと TASK-3 の共局在の可能性を示す黄色の領域が細胞内のごく一部に認められた。

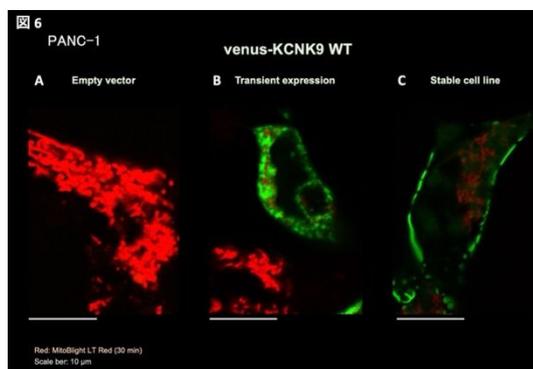
HEK293 細胞株の安定発現株でも、細胞内に赤色の小さな楕円が観察された。緑色も観察されたが、主に細胞の縁で観られ、細胞の内側では緑色の斑点が赤色の近傍で観察された。黄色の領域はごく僅かであるが主に赤色に隣接していた。(図 4B; 代表例)



HEK293 細胞株の一過性の変異体の発現は、野生型と同様にミトコンドリアと TASK-3 の共局在の可能性を示す黄色の領域が細胞内の僅かに認められた。(図 5A, B, C; 代表例)



PANC-1 細胞株の一過性の発現において、野生型は細胞内に赤色の小さな楕円が観察され、細胞質全体に緑色が観察された。黄色の領域は殆ど観察されなかった。(図 6B; 代表例) データとして示していないが、変異体も同様であった。PANC-1 細胞株の安定発現株では、細胞内に赤色の小さな楕円が観察されたが、緑色は主に細胞の縁に局限して観察されたのみであった。黄色の領域は全く観察されなかった。(図 6C; 代表例) 電位依存性のカリウムチャネル(KCNQ1-EGFP, KCNH2-EGFP) の発現と比較したが、TASK-3 の方が発現している細胞の数が極端に少なかった。(データとして示していない。)



ミトコンドリアソーティングシグナルが N 末端に存在する可能性を考慮し、野生型の KCNK9 の C 末端に EGFP を標識した DNA も観察を試みたが、細胞の内側で EGFP の蛍光を反映する緑色の斑点だけが観察され、形質膜と思われる部位には観察されなかった。(データとして示していない。)

HEK293 細胞株では一過性発現、安定発現ともミトコンドリアに僅かに発現している可能性が示された。一方、PANC-1 細胞株では一過性発現、安定発現ともミトコンドリアには殆ど発現していない。生細胞観察において、遺伝子導入された細胞株では、外来性の TASK-3 がミトコンドリアに局在しないか少ない可能性があることが明らかになった。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------