

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08555

研究課題名(和文) 副腎髄質細胞のTASKチャネルの分子実体と機能：ノックアウトマウスを用いた研究

研究課題名(英文) Molecular identity of TASK channels in adrenal medullary cells: A research with knockout mice

研究代表者

井上 真澄 (Inoue, Masumi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40223276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外液のpHの低下は、ラット副腎髄質細胞においてTASK1様チャネルを抑制して、カテコールアミン分泌を促進する。しかし、TASKチャネルの分子構造は、不明である。そこで、この問題をgene knockout法を用いて検討した。pH低下による脱分極性内向き電流及びカテコールアミン分泌は、TASK1の遺伝子欠損により抑制されたが、TASK3の遺伝子欠損では影響されなかった。TASK1様免疫反応物は主に細胞辺縁に局在したが、TASK3様免疫反応物はほとんど存在しなかった。以上の結果から、副腎髄質細胞においてTASK1 homomerが酸のセンサーとして機能していると結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が激しい運動をすると、血中のアドレナリンの濃度は著明に増加する。この副腎髄質細胞から分泌されたアドレナリンは、筋の疲労からの回復に關与する。このアドレナリンの分泌には、細胞外液のpHの低下によるTASKチャネル活性の減少が關与すると考えられている。ただ、副腎髄質細胞に発現しているTASKチャネルの分子構造は不明であった。本研究は、遺伝子ノックアウト法をもちいて、マウス副腎髄質細胞に発現しているTASKチャネルがTASK1ホモ二量体であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A decrease in external pH induces catecholamine secretion through inhibiting TASK1-like channel activity in rat adrenal medullary chromaffin (AMC) cells. However, the molecular identity of TASK channels remains an open question. Thus, a gene knockout approach was used to elucidate the molecular structure of TASK1-like channels in mouse AMC cells. The development of a depolarizing inward current or catecholamine secretion in response to a decrease in external pH was abolished by deletion of the TASK1 gene, but not by that of the TASK3. TASK1-like immunoreactive (IR) material was predominantly located at the cell periphery in mouse AMC cells, whereas TASK3-like IR material was minimally present at the cell periphery. These results indicate that homomeric TASK1 channels function as an acid sensor in mouse AMC cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アシドーシス 副腎髄質細胞 カテコールアミン TASKチャネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2つのポアがある2PKチャンネルは、種々の細胞において静止膜電位形成に関わる。2PKチャンネルは、6つのサブグループに分類され、その中の1つがTASKサブファミリーである。TASKサブファミリーには、TASK1、TASK3、TASK5が属している。TASK5は発現系においてチャンネル活性を示さなかった。一方、TASK1とTASK3は、それぞれ2つのサブユニットが合わさって、ホモ2量体またはヘテロ2量体を形成して、チャンネル機能を発現することが知られている。TASKチャンネルの1つの特徴は、外液のHイオンにより抑制されることである。抑制のIC₅₀(半分に抑制する濃度)は、TASK12量体では、pH7.3~pH7.5、TASK32量体ではpH6.8である。中枢神経細胞や心筋細胞において、TASK1/3ヘテロチャンネルが発現していることが、電気生理学的解析や生化学的解析から明らかになっている。一方、ラット副腎髄質(AMC)細胞が不活化した細胞系であるPC12細胞では、TASK1とTASK3が発現しているが、ヘテロ2量体を形成しない。これらの結果は、細胞はそれぞれ果たす機能に従って、TASKホモ、またはTASKヘテロチャンネルの発現を制御していると考えられる。しかし、その分子機序はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

AMC細胞は、血液を介して種々の液性情報や神経系を介して神経情報を受容して、アドレナリンを分泌している。分泌されたアドレナリンは、ストレス反応において重要な役割を担っている。激しい運動をすると、ノルアドレナリンよりアドレナリンの血中濃度が著明に上昇する。一方、軽い運動の場合は、相対的にノルアドレナリンの上昇が大きい。ノルアドレナリンとアドレナリンの血中濃度の変化は、それぞれ交感神経系と副腎髄質系の活動を反映しているので、激しい運動では交感神経系よりは副腎髄質系がより選択的に活性化されると考えられる。しかし、その機序はほとんど解明されていない。分泌されたアドレナリンは、骨格筋のβ₂受容体を刺激して、Naポンプ活性をあげる。激しい運動時には骨格筋の活動電位の発生が増加しているので、細胞外にKイオンの流出が起こり、骨格筋表面にはKイオンが蓄積する。このKイオンの蓄積は、骨格筋膜電位の脱分極を誘発して、筋の興奮性を抑制する。アドレナリンによるNaポンプ活性の上昇は、細胞外Kイオンの骨格筋内への取り込みを促進する結果、筋は膜興奮性を回復させる。つまり、アドレナリンの分泌は、筋の疲労からの回復を促進する。運動時のアドレナリンの分泌促進は、合理的生体反応と言える。激しい運動は、血中のpHを7.1~6.9にまで下げる。このため、激しい運動は、アシドーシスを介してAMC細胞からのアドレナリン分泌を促進する可能性がある。

我々はラットAMC細胞においてTASKチャンネルが発現していることを明らかにした。このTASKチャンネルは、運動時のアシドーシスのセンサーとして働いている可能性がある。しかし、AMC細胞のTASKチャンネルの分子実体は解明されていない。本研究では、その分子実体をTASKチャンネルノックアウト(KO)マウスを用いて、電気生理学的、細胞生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的解析。

用いる動物は、野生型、TASK1 KO、TASK3 KOマウスである。頸椎損傷したマウスから、副腎を取り出す。顕微鏡下で副腎から皮質を取り除いた髄質をコラゲナーゼで処理する。その後顕微鏡下で機械的にAMC細胞を単離する。この単離AMC細胞から穿孔パッチクランプ法により、保持電位-50 mVで全細胞電流を記録する。

(2) アンペロメトリー法による分泌測定

直径5 μmの炭素電極を細胞表面に接触させて、1個の分泌顆粒の分泌をスパイク様電流として記録する。分泌量は、単位時間あたりの電流量により定量化する。

(3) 免疫細胞化学的検討

すでに抗体の選択性が確認されている抗TASK1抗体、及び抗TASK3抗体を用いてAMC細胞の免疫染色を行う。酵素処理により得られたAMC細胞を4%パラホルムアルデヒド固定を行った後、抗TASK抗体、そして2次抗体で処理する。免疫反応は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。TASK1様、及びTASK3様免疫反応物の量は蛍光量で定量化する。

4. 研究成果

(1) 分泌の測定

野生型マウスより得た単離AMC細胞からのカテコールアミン分泌を、アンペロメトリー法により測定した。非刺激時はほとんど分泌は誘発されなかったが、pH6.8の細胞外液を還流すると、カテコールアミン分泌が誘発された。TASKチャンネル抑制薬のA1899を細胞外に投与しても、分泌は誘発されたが、Ca依存性Kチャンネルの抑制薬のcharybdotoxinやapaminを投与しても、分泌は誘発されなかった。これらの結果は、マウスAMC細胞において、静止膜電位形成にTASKチャンネルは関与しているが、Ca依存性Kチャンネルは関与していないことを示唆する。pH6.8、及びA1899により誘発される分泌は、TASK1遺伝子のKOで抑制されたが、TASK3遺伝

子の KO では影響を受けなかった。これらの結果は、マウス AMC 細胞に発現している TASK チャンネルは、ホモ TASK1 チャンネルであることを示唆する。

(2) 全細胞電流記録

アシドーシスによる TASK チャンネルの抑制を、単離 AMC 細胞から穿孔パッチクランプ法により、全細胞電流を記録して検討した。外液の pH を 7.4 から 0.3 または 0.4 のステップで 6.0 まで低下させると、TASK チャンネルの抑制による内向き電流が可逆的に誘発された。この抑制の IC50 は pH 7.03 であった。この pH 低下による内向き電流発生は、TASK3 遺伝子を KO しても影響を受けなかったが、TASK1 遺伝子の KO により消失した。ただ、-50 mV の保持電流レベルは、TASK1 遺伝子の KO によっては影響を受けなかった。この結果は、KO による TASK1 チャンネルの欠損の影響は、他の K チャンネルにより代償されることを示唆する。

ruthenium red は、ホモ TASK1、またはヘテロ TASK1/3 チャンネルを抑制しないが、ホモ TASK3 チャンネルは抑制する。野生型 AMC 細胞において発現している TASK チャンネルがヘテロ TASK1/3 チャンネルであるならば、TASK1 遺伝子 KO の AMC 細胞では、ホモ TASK3 チャンネルが形成されることが予想される。そこで、この可能性を ruthenium red を用いて検討した。10 μ M ruthenium red の投与により、野性型ばかりでなく、TASK1-KO AMC 細胞においても内向き電流は発生しなかった。この結果は、AMC 細胞において TASK3 タンパクは発現していないことを示唆する。

(3) 免疫細胞化学的解析

AMC 細胞における TASK1 と TASK3 の発現を、免疫細胞化学的に検討した。野生型 AMC 細胞には、TASK1 様免疫反応物が細胞辺縁に局在していた。一方、TASK3 免疫反応物はわずかしが観察されなかった。TASK1 遺伝子の KO により、TASK1 様免疫反応物はほぼ完全に消失したが、TASK3 様免疫反応物の量は変化しなかった。TASK3 遺伝子の KO は、わずかな TASK3 様免疫反応物を消失させたが、TASK1 様免疫反応物の量には影響を及ぼさなかった。これらの免疫細胞化学的解析結果は、マウス AMC 細胞に主に発現している TASK チャンネルは、TASK1 であることを示している。さらに、TASK1 遺伝子の KO による TASK1 チャンネルの欠損は、TASK3 以外の K チャンネルの up-regulation により代償されることを示唆する。

(4) 代償チャンネル

pH 7.4 からの外液 pH の低下は、TASK1 KO AMC 細胞において内向き電流を誘発しなかった。さらに、保持電位 -50 mV での保持電流値は TASK1 遺伝子の KO により影響を受けなかった。これらの結果は、TASK1 チャンネルの欠損による影響の代償に、TALK2 チャンネルが関与する可能性があることを示唆する。TALK2 チャンネルは、アルカリ側で著明にチャンネル活性を増加することが知られている。そこで、外液の pH をアルカリに変化させて、全細胞電流に対するその影響を検討した。TASK1 遺伝子の KO により、pH 9.0 誘発性外向き電流の大きさ、及び TALK2 様免疫反応物の量は、有意に増加した。これらの結果は、遺伝子 KO による TASK1 チャンネルの欠損は、マウス AMC 細胞において TALK2 チャンネルの up-regulation により少なくともその一部は代償されていると考えられる。

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Masumi, Matsuoka Hidetada, Harada Keita, Mugishima Go, Kameyama Masaki	4. 巻 印刷中
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 - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 Matsuoka Hidetada, Harada Keita, Mashima Keisuke, Inoue Masumi	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 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109434 ~ 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 Inoue Masumi, Harada Keita, Matsuoka Hidetada	4. 巻 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 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172956 ~ 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 Inoue Masumi, Harada Keita, Matsui Minoru, Matsuoka Hidetada	4. 巻 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 European Journal of Pharmacology	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 -

1. 著者名 Inoue Masumi, Matsuoka Hidetada, Lesage Florian, Harada Keita	4. 巻 33
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 The FASEB Journal	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 該当する

1. 著者名 Inoue Masumi, Matsuoka Hidetada, Harada Keita, Kao Lung-Sen	4. 巻 470
2. 論文標題 Muscarinic receptors in adrenal chromaffin cells: physiological role and regulation of ion channels	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pflugers Arch	6. 最初と最後の頁 29 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-017-2047-2	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 該当する

1. 著者名 Matsuoka Hidetada, Inoue Masumi	4. 巻 595
2. 論文標題 Molecular mechanism for muscarinic M1 receptor-mediated endocytosis of TWIK-related acid-sensitive K ⁺ channels in rat adrenal medullary cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 6851 ~ 6867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/jp275039	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 Keita, Matsuoka Hidetada, Inoue Masumi	4. 巻 372
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 and Tissue Research	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/s00441-018-2809-y	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

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

1. 発表者名 Inoue Masumi, Matsuoka Hidetada, Harada Keita
2. 発表標題 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates Na ⁺ -permeable cation channels in mouse and guinea-pig adrenal medullary cells
3. 学会等名 Europhysiology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue Masumi, Matsuoka Hidetada, Harada Keita
2. 発表標題 Regulation of TRPC channels by muscarinic receptors in guinea-pig adrenal medullary cells
3. 学会等名 7th Focused Meeting on Cell Signalling (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上真澄、松岡秀忠、原田景太
2. 発表標題 マウス副腎髄質細胞においてp11蛋白の発現の欠如は、TASK1チャネルの酸性感知能を促進する
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue M, Matsuoka H, Harada K
2. 発表標題 Molecular identity and functions of TASK1-like channels in adrenal medullary cells
3. 学会等名 19th ISCCB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Inoue M, Matsuoka H, Harada K
2. 発表標題 TASK1 channels as a pH sensor in mouse adrenal medullary cells: analysis with gene knockout
3. 学会等名 Experimental biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
連携研究者	松岡 秀忠 (Matsuoka Hidetada) (90374991)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	
連携研究者	原田 景太 (Harada Keita) (50399200)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	