

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月15日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500360

研究課題名（和文）副腎髄質細胞におけるGABA_A受容体サブユニットの構成の分子機序研究課題名（英文）Molecular mechanism for subunit combination of GABA_A receptors in adrenal medullary cells

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

研究成果の概要（和文）：モルモット副腎髄質(AM)において GABA は濃度依存性に Cl⁻ 電流を誘発した。この GABA 濃度応答関係は、allopregnanolone により最大値及び Hill 係数を変えることなく左に並行移動した。GABA 誘発性電流は、Zn イオンにより抑制され、flunitrazepam により促進された。α3 様及びγ2 様免疫反応物が AM 細胞の細胞膜に認められた。

研究成果の概要（英文）：GABA produced Cl⁻ currents in dose-dependent manner in guinea-pig adrenal medullary (AM) cells. This GABA dose-response relationship was shifted in the leftward direction with no changes in maximum and Hill's coefficient by allopregnanolone. GABA-induced currents were suppressed by Zn²⁺ and enhanced by flunitrazepam. α3- and γ2-like immunoreactivities were detected at the cell periphery of AM cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：神経科学

キーワード：シグナル伝達、神経科学、生理学、発現制御

1. 研究開始当初の背景

副腎髄質(AM)細胞は、交感神経節前線維を介して神経情報を受容して、カテコールアミンを分泌する内分泌細胞である。中枢神経系の主な抑制性神経伝達物質であるγ-aminobutyric acid(GABA)は、副腎髄質では神経線維には分布せず、AM細胞に局在している。AM細胞では(1)GABA

は GABA 合成酵素の GAD67 を介して合成されている、(2)小胞 GABA 輸送体(VGAT)はシナプス様小胞(SLMV)には局在せず、カテコールアミンを含有しているクロマフィン顆粒(LDCV)に局在している、(3)GABA は GABA_A 受容体を介して AM 細胞を脱分極させ、カテコールアミン分泌を誘発することが明らかになった

(Matsuoka et al J Physicol 586:4825-4842, 2008)。これらの結果は、GABA は AM 細胞において paracrine として機能していることを示唆している。

2. 研究の目的

副腎髄質は副腎皮質に覆われている。さらに、副腎髄質に流入する血液の一部は、intraadrenal portal vascular system を介して副腎皮質からくる。この為、AM 細胞は高濃度の副腎皮質ホルモンにさらされている。副腎皮質はミネラルコルチコイドやグルココルチコイドばかりでなく、neuroactive steroid も分泌している。GABA が AM 細胞に対して paracrine として働いているのであれば、AM 細胞は GABA 受容体を介して副腎皮質からの neuroactive steroid の液性情報を受容していることになる。

GABA_A 受容体に作用する neuroactive steroid には allopregnanolone (ALLO) が含まれる。しかし、これまで AM 細胞の GABA_A 受容体に対する ALLO の作用は十分には明らかにされていない。さらに、AM 細胞において GABA_A 受容体は paracrine としての GABA、そして ALLO の情報を受容する為、その受容体のサブユニット構成は特殊化していることが予想される。

そこで本研究では、(1) AM 細胞の GABA_A 受容体に対する ALLO の作用、(2) AM 細胞の GABA_A 受容体のサブユニット構成、(3) その分子機序に関して検討する。

これらの研究を介して、AM 細胞における GABA を介したシグナル伝達の機能の一端を考察する。

3. 研究の方法

(1) 副腎髄質の灌流

麻酔下でラット及びモルモットから副腎を取り出す。副腎静脈にカニューレを挿入して逆向性に Krebs 液を灌流する。Ca 蛍光色素の fluo4-AM を AM 細胞に取り込ませた後、AM 細胞をおおっている副腎皮質細胞を顕微鏡下で取り除く。共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光画像を 5 秒に一回取得する。

(2) 電流の記録

モルモット副腎髄質を collagenase で処理した後、倒立顕微鏡のステージ上に設置した灌流装置上で、AM 細胞を機械的に単離する。その後 20 分間静止させた後、Krebs 液を灌流する。薬物は灌流液に加えて投与する。パッチ電極にはおもに K isethionate を含んだ人工細胞内液を充てんする。Cl⁻ イオン濃度は 40mM である。全細胞電流はニスタチン法を用

いて行う。

(3) 免疫細胞化学

モルモット AM 細胞をディッシュ上で機械的に単離する。細胞がディッシュの底に接着後、4%パラホルムアルデヒドを含む液で細胞を固定する。膜の穿孔と非特異的結合の抑制を行った後、GABA_A 受容体サブユニットに対する抗体、そして二次抗体で処理する。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫反応に由来する蛍光を観察する。免疫反応物の半定量化は ImageJ ソフトを用いて行う。

(4) GABA_A 受容体サブユニット発現の調節

AM 細胞由来の cell line である PC12 細胞を NGF 存在下、または dexamethasone 存在下で 1 週間培養した後、cell lysate を作製する。イムノブロット法を用いて、それぞれの cell lysate 中の GABA_A 受容体サブユニットを半定量化する。

4. 研究成果

(1) モルモット AM 細胞の GABA に対する反応

モルモット副腎静脈にカニューレを挿入して逆行性に副腎髄質を灌流した。Ca 色素を取り込ませた AM 細胞を 30 μM GABA を投与して刺激すると、Ca 蛍光が増加した。この Ca 蛍光の増加の程度と領域は、30 μM ニコチン刺激により得られた Ca シグナルとほぼ同じであった。一方、ラット副腎髄質の灌流実験では、GABA 刺激により得られた Ca シグナルの領域は、ニコチン刺激により得られた Ca シグナルの領域の約 1/3 であり、またその Ca シグナルの増加の程度はニコチンにより誘発されたものより有意に小さかった。これらの灌流実験の結果は、ラットと異なりモルモットでは、すべての AM 細胞が GABA の受容体を発現していることを示している。

そこで、GABA 受容体の性質を単離モルモット AM 細胞を用いて詳細に検討した。調べたすべてのモルモット AM 細胞において保持電位 -60mV で GABA は内向き電流を誘発した。この内向き電流は 10 μM bicuculline により完全に抑制されたことにより、GABA_A 受容体を介していることが明らかになった。

GABA 誘発性電流のピーク値の用量反応関係は、Hill 係数 1.43、EC₅₀ 32.4 μM のロジスティック式で近似出来た。ALLO は濃度依存的に GABA により誘発された電流を増加させた。0.1 μM ALLO 存在下で、GABA 用量反応曲線は、最大値及び Hill 係数を変えることなく左方に並行移動し、GABA の EC₅₀ は約 1/20 に小さくなった。この結果、0.1 μM ALLO 存在下で

0.1 μ M GABA でも電流が誘発されるようになった。さらに、ALLO は GABA 誘発性電流の脱活性化過程を有意に遷延させた。

(2) GABA_A受容体の薬理学的性質

GABA_A受容体のサブユニット構成を明らかにする為、まずその薬理学的性質を調べた。Zn イオンの細胞外投与は、濃度依存的に 10 μ M GABA 誘発性電流を抑制した。3 μ M から 100 μ M Zn イオン存在下での GABA 誘発性電流のピーク値の濃度依存的抑制の理論曲線による近似は、GABA 誘発性電流の Zn イオンに感受性を持つ構成成分の割合が 92% と 100% とした場合で、大きな違いはなかった。この結果は少なくとも 10 μ M GABA により活性化される GABA 受容体は、サブユニット構成に関して均一であることを示唆する。

2 価の Zn イオンと異なり 3 価の La イオンは、100 μ M において GABA 誘発性電流を 38% 増強させたが、10 μ M では影響を与えなかった。60mM エタノールは 10 μ M GABA 誘発性電流に全く作用しなかった。

ベンゾジアゼピン受容体アゴニストの flunitrazepam は濃度依存的に 10 μ M GABA 誘発性電流を促進した。同様の促進は zolpidem によっても観察された。

(3) GABA_A受容体サブユニットの蛋白レベルでの解析

RT-PCR 法による mRNA レベルでの解析では、ラット副腎髄質では GABA_A受容体サブユニットの $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\gamma 2$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、及び δ が、発現していた。そこで、これらのサブユニットに注目して蛋白レベルでの検討を行った。モルモット副腎髄質のホモジェネートをイムノブロッティングすると、抗 $\alpha 1$ 抗体により 50kDa のバンド、抗 $\alpha 3$ 抗体により 58kDa のバンド、抗 $\gamma 2$ 抗体により 50kDa のバンドが認識された。さらに、単離モルモット AM 細胞において、 $\alpha 3$ 様免疫反応物及び $\gamma 2$ 様免疫反応物は、おもに細胞辺縁に局在していた。一方、 $\alpha 1$ 様免疫反応物は細胞辺縁よりは細胞質に分布していた。

(4) GABA_A受容体サブユニットの発現調節

GABA_A受容体サブユニットの発現がどのような因子により制御されているかを、PC12 細胞を dexamethasone 存在下、NGF 存在下で 1 週間培養して検討した。PC12 細胞の cell lysate 中にも $\alpha 1$ 及び $\alpha 3$ がイムノロット法により認められた。これらのサブユニットの量は NGF または dexamethasone 処理により変化しなかった。

(5) まとめ

AM 細胞において GABA は、GABA_A受容体

を介して脱分極を誘発する。GABA 誘発性電流が flunitrazepam により促進されることは、GABA_A受容体が δ でなく、 γ を含むことを示している。この GABA_A受容体の $\alpha \beta \gamma$ 構成は、誘発性電流が 60mMethanol により増強されないことから支持される。

Zn イオンは濃度依存的に GABA 誘発性電流を抑制し、その IC₅₀ は約 15 μ M であった。一方、La イオンは全く抑制作用を持たず、100 μ M 濃度でむしろ促進的効果を持った。これらの結果は、 $\alpha \beta \gamma$ の構成が $\alpha 1 \beta 3 \gamma 2$ や $\alpha 6 \beta 3 \gamma 2$ でないことを示している。

イムノプロットと免疫染色法により、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 及び $\gamma 2$ の発現が確認された。さらに、細胞膜またはその近傍には、 $\alpha 1$ よりも $\alpha 3$ 様免疫反応物が主に認められた。

薬理学的性質とこれらの免疫細胞化学の結果は、モルモット AM 細胞のおもな GABA_A受容体のサブユニット構成が、 $\alpha 3 \beta \gamma 2$ であることを強く示唆する。 $\alpha 3$ の発現レベルにはグルココルチコイドは関与しないことが考えられる。GABA 誘発性電流の EC₅₀ は 32 μ M であり、GABA_A受容体は比較的低親和性であった。この低親和性が ALLO により著明な増加を引き起こす要因になっている可能性がある。

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 8 件)

- ① Akira Warashina, Masumi Inoue, Ca²⁺ imaging in perfused adrenal medullae, J UOEH, 査読有、34 巻、2012
- ② Koichi Ogawa, Keita Harada, Yutaka Endo, Sueko Sagawa, Masumi Inoue, Heterogeneous levels of oxidative phosphorylation enzymes in adrenal glands, Acta Histochem, 査読有、113 巻、2011、24-31
- ③ Hidetada Matsuoka, Keita Harada, Jun Nakamura, Mitsunori Fukuda, Masumi Inoue, Differential distribution of synaptotagmin-1, -4, -7, and -9 in rat adrenal chromaffin cells, Cell Tissue Res, 査読有、344 巻、2011、41-50
- ④ Keita Harada, Hidetada Matsuoka, Takeyoshi Sata, Akira Warashina, Masumi Inoue, Identification and Role of Muscarinic Receptor Subtypes

Expressed in Rat Adrenal Medullary Cells, J Pharmacol Sci, 査読有、117 巻、2011、253-264

- ⑤ Masumi Inoue, Keita Harada, Hidetada Matsuoka, Akira Warashina, Paracrine role of GABA in adrenal chromaffin cells, Cell Mol Neurobiol, 査読有、30 巻、2010、1217-1224
- ⑥ Keita Harada, Hidetada Matsuoka, Jun Nakamura, Mitsunori Fukuda, Masumi Inoue, Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells, J Neurochem, 査読有、114 巻、2010、617-626
- ⑦ Keita Harada, Hidetada Matsuoka, Naohiro Fujimoto, Yutaka Endo, Yoshitaka Hasegawa, Akira Matsuo, Yuta Kikuchi, Teturo Matsumoto, Masumi Inoue, Localization of type-2 angiotensin 2 receptor in adrenal gland, J Histochem Cytochem, 査読有、58 巻、2010、585-593
- ⑧ Hidetada Matsuoka, Keita Harada, Tomoya Ikeda, Kouta Uetsuki, Takeyoshi Sata, Akira Warashina, Masumi Inoue, Ca²⁺ pathway involved in the refilling of store sites in rat adrenal medullary cells, Am J Physiol Cell Physiol, 査読有、296 巻、2009、889-890

[学会発表] (計7件)

- ① 松岡秀忠, NGF-induced endocytosis of TASK1 channels in adrenal medullary cells and PC12, 第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、松本文化会館 (長野県)
- ② 井上真澄, Regulation of TASK channel expression in adrenal medullary cells and PC12 cells, 第10回日韓脳科学・心筋・平滑筋合同シンポジウム、2012年2月18日、慶州教育文化会館 (韓国)
- ③ 原田景太, 副腎髄質細胞におけるシナプトタグミンサブタイプ-1, -4, -7, -9の局在解明, 第62回西日本生理学会、2011年10月14日、佐賀大学 (佐賀県)
- ④ 井上真澄, Identification of muscarinic receptor subtypes expressed in rat adrenal medullary cells and their role in synaptic transmission, 第9回日韓脳科学・心筋・平滑筋合同シンポジウム、2010年11月25日、KKR 鹿児島敬天閣 (鹿児島県)
- ⑤ 井上真澄, GABA is stored in chromaffin granules and functions as paracrine in

adrenal chromaffin cells, 15th International Symposium on Chromaffin Cell Biology, 2009年

11月13日、Merida (Mexico)

- ⑥ 井上真澄, ラット副腎髄質細胞におけるムスカリン受容体を介した神経情報伝達, 第60回西日本生理学会、2009年11月6日、福岡県歯科医師会館
- ⑦ 井上真澄, Molecular mechanisms for a paracrine role of GABA in adrenal chromaffin cells, Synaptic Inhibition in Health and Disease Conference, 2009年10月16日、Chicago (USA)

6. 研究組織

(1) 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

(3) 連携研究者

原田 景太 (HARADA KEITA)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：50399200
松岡 秀忠 (MATSUOKA HIDETADA)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：90374991
藁科 彬 (WARASHINA AKIRA)
産業医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：50064580