

## 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 21 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790222

研究課題名（和文）アドレナリン分泌機序における TASK チャンネルの機能と情報伝達機構の  
解明研究課題名（英文）The mechanism of function and regulation of TASK channels  
in endocrine cells

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

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 チャンネルは、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が明らかとなった。さらに、その制御には、Src によるチロシンリン酸化、PI3K 活性、PLC $\gamma$  活性が重要な役割を果たすことが示唆された。

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. Furthermore, it was suggested that NGF-induced endocytosis of TASK1 channels is regulated by its posttranslational modification through activation of Src and the direct or indirect effects of activation of both PLC $\gamma$  and PI3 kinase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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 チャンネル、エンドサイトーシス、PC12 細胞、NGF、Src、クラスリン

## 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。現在までに、TASK ファミリーのうち、TASK1 チャンネルがラット副腎髄質細胞において、pH 依存的なカテコール

アミン分泌調節に関与すること、副腎髄質においてTASK1チャンネルが運動時のアシドーシスセンサーとして機能することを示唆した。このように、内分泌細胞におけるTASK1チャンネルの重要性は示唆されたが、その詳細な機能や活性制御の機構についての報告はほとんどない。本課題におけるTASK1チャン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チャン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チャン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) TASK1 チャンネル変異体の作製

各 TASK1 チャンネル変異体は、quick change site directed mutagenesis 法を用いて作製した (Y317F、Y340F、L263A、L264A)。その他発現ベクター (AP180-myc、Rab5-GFP、HA-/Flag-TrkA(WT/Y760F/Y794F)) は、譲り受けたものを使用した。

### (2) 細胞培養・トランスフェクション

PC12 細胞および PC12nnr5 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 細胞および PC12nnr5 細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法を用いた。

### (3) 免疫染色・顕微鏡観察

副腎髄質細胞における内在性の TASK1 チャンネ

ルは、免疫染色法で検出した。

PC12 細胞における内在性の TASK1 チャンネルおよび TrkA、HA-/Flag-/myc-融合蛋白質、エンドソームマーカー蛋白質、AP 複合体ファミリー (AP2 複合体) は免疫染色法で検出した。GFP-TASK1 チャンネル(野生型・変異型)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) ウェスタンブロット・免疫沈降

PC12 細胞および GFP-TASK1 チャンネル(野生型・変異型)を発現させた PC12 細胞を阻害剤存在下・非存在下で 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内在性 TASK1 チャンネル、GFP-TASK1 チャンネル(野生型・変異型)の発現、Src、Akt の発現・活性化を検出した。また、免疫沈降法により NGF 刺激による TASK1 チャンネルのチロシン酸化状態を検出した。

## 4. 研究成果

通常、副腎髄質細胞および PC12 細胞では、TASK1 チャンネルは、細胞膜局在を示す。ところが、NGF 存在下では、TASK1 チャンネルは細胞膜から細胞質へと移行する様子が観察された。また、その他細胞外刺激によっても同様の細胞内局在変化が観察された。

この細胞内局在変化について、各種阻害剤 (エンドサイトーシス阻害剤) や強制発現系 (AP180-myc) を用いて解析した。その結果、TASK1 チャンネルの NGF 刺激に伴う細胞内局在変化は、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が示唆された。

次に、クラスリン依存性エンドサイトーシスに重要なアミノ酸残基の同定を行った。作製した変異体のうち、263、264 番目のジロイシンモチーフ変異体 (L263A、L264A) において、

エンドサイトーシスの抑制が観察された。LL263/264 のジロイシンモチーフが、TASK1 チャンルのエンドサイトーシス制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、TASK1 チャン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。

ウエスタンブロット・免疫沈降法により、NGF 刺激依存的に TASK1 チャンルのチロシンリン酸化が亢進することが観察された。さらに、Src 阻害剤処理やドミナントネガティブ Src 発現によって TASK1 チャンルのエンドサイトーシスが抑制され、Src が TASK1 チャンルのエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

さらに、各阻害剤 (TrkA、PI3K、PLC) および TrkA 欠損 PC12 細胞を用いた解析の結果、TrkA 阻害剤処理 PC12 細胞および TrkA 欠損細胞において、TASK1 チャンルエンドサイトーシスの完全な抑制が観察された。また、PI3K、PLC 阻害剤処理 PC12 細胞および TrkA Y760F/Y794F を再導入した TrkA 欠損 PC12 細胞においては、一部 TASK1 チャンルのエンドサイトーシスが抑制された。

以上の結果より、TASK1 チャンルの機能調節にジロイシンモチーフ (LL263/264) を介したクラスリン依存性エンドサイトーシスが関与し、その制御には、TrkA のチロシンキナーゼ活性、Src によるチロシンリン酸化制御、PI3K、PLC 両酵素による直接的あるいは間接的な制御が重要な役割を果たすことが示唆された。

## 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 6 件)

① Harada K, Matsuoka H, Sata T, Warashina A, Inoue M. Identification and Role of Muscarinic Receptor Subtypes Expressed in Rat Adrenal Medullary Cells *J Pharmacol Sci* 2011 117(4):253-64

② Matsuoka H, Harada K, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M. Different distribution of synaptotagmin-1, -4, -7, and -9 in rat adrenal chromaffin cells. *Cell and Tissue Research* 2011 Apr;344(1):41-50.

③ Ding N, Yamashita U, Matsuoka H, Sugita T, Tsukada J, Noguchi J, Yoshida Y. Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-Cell leukemia. *Cancer* 2011 Jun 15;117(12):2735-46

④ Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Warashina A. Paracrine Role of GABA in Adrenal Chromaffin Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 Nov;30(8):1217-24.

⑤ Harada K, Matsuoka H, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M. Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells. *J Neurochem*. 2010 Apr 30 Jul;114(2):617-26.

⑥ Harada K, Matsuoka H, Fujimoto N, Endo Y, Hasegawa Y, Matsuo A, Kikuchi Y, Matsumoto T, Inoue M. Localization of Type-2 Angiotensin II Receptor in Adrenal Glands. *J Histochem Cytochem*. 2010 Jul;58(7):585-93.

〔学会発表〕（計2件）

① 松岡秀忠、原田景太、井上真澄 副腎髄質細胞におけるTASK1 チャネルの機能と情報伝達機構の解明

第61回西日本生理学会(2010.10.15 長崎大学医学部(長崎))

② 松岡秀忠、原田景太、井上真澄 生活習慣病における副腎髄質ホルモン分泌機構の分子メカニズムとその作用機序の解明

第28回産業医科大学学会総会(2010.10.12 産業医科大学(福岡))

## 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