

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460306

研究課題名(和文) 副腎髄質におけるムスカリン受容体生理機能のノックアウトマウスを用いた解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological role of muscarinic receptors in the adrenal medullary cell by using muscarinic receptor deficient mouse

研究代表者

原田 景太 (HARADA, Keita)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50399200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低血糖時の副腎髄質からのカテコールアミン分泌におけるムスカリン受容体の役割を調べるために、ムスカリン受容体ノックアウトマウスを用い実験を行った。24時間絶食させたマウスにインスリンを投与し血糖値を下げ、血中のカテコールアミン量の経時変化を野生型マウスと比較した。しかしながら、両者に有意な差はみられなかった。モルモット副腎髄質細胞やPC12細胞を用いた実験により、ムスカリン受容体によるカテコールアミン分泌に非選択的陽イオンチャネル(TRPCチャネル)がSTIM1分子と共に関わっていることがわかり、ムスカリン刺激にTRPCチャネルの細胞内局在が変化することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We have examined that the role of muscarinic receptors on the catecholamine secretion of adrenal medullae during hypoglycemia by using muscarinic receptors-deficient mice (KO mouse). After fasting for 24h, insulin was dosed in KO and wild-type (WT) mice and the amount of catecholamine in the plasma of both mice was compared. There was no significant difference between the catecholamine amount in the plasma of KO mice and that of WT mice. On the other hand, it was found that non-selective cation channels (TRPC channels) together with STIM1 molecule were involved in the catecholamine secretion on the muscarinic stimulation in guinea-pig adrenal medullary (AM) cells. We have also demonstrated that TRPC channels were translocated from cytoplasm to cell periphery in response to muscarine in guinea-pig AM cells and PC12 cells.

研究分野：分子生理学

キーワード：ムスカリン受容体 ノックアウトマウス 低血糖 カテコールアミン 副腎髄質細胞 TRPCチャネル

1. 研究開始当初の背景

血中の糖が減少すると、副腎髄質細胞からカテコールアミンが分泌される。放出されたカテコールアミンは受容体を介して肝臓のグリコーゲンの分解を促進し、糖の血中への放出を増強する。以前から、インスリンにより誘発された低血糖は血中のアドレナリン量を増加するが、ノルアドレナリン量はそれほど変化しないこと、一方、血圧低下や低温曝露では血中のアドレナリンに比べてノルアドレナリン量が著明に増加することが知られていた。これらの *in vivo* の実験結果は、副腎髄質アドレナリン細胞と副腎髄質のノルアドレナリン細胞と交感神経節細胞が異なる中枢神経支配を受けていることを示唆しており、この示唆は最近の形態学的、機能的解析の結果と一致する。

ラットから取り出した副腎を逆行性に人工液で灌流する、いわゆる灌流実験において、ムスカリン受容体刺激はアドレナリンの分泌を促進するが、ニコチン受容体刺激では相対的にノルアドレナリンの分泌量が多い。これらの結果は、ニコチン受容体はアドレナリン細胞とノルアドレナリン細胞の両細胞に分布するが、ムスカリン受容体はアドレナリン細胞に選択的に分布していることを示唆している。低血糖の情報が特異的に伝達されるアドレナリン細胞に選択的にムスカリン受容体が発現しているのであれば、そのムスカリン受容体は低血糖の情報伝達を仲介している可能性がある。

2. 研究の目的

腎髄質細胞ではニコチン受容体を介した神経伝達がほとんどであるが、同じアセチルコリン受容体であるムスカリン受容体も発現している。このムスカリン受容体を介した神経伝達の生理的役割の詳細は現在まで明らかにされていないが、糖尿病や高血圧などの病態への関与や低温・低酸素と言った厳しい環境条件下での同受容体を介した神経伝達の関与が示唆される。本研究では、ムスカリン受容体ノックアウトマウスを用い、低血糖条件下においてムスカリン受容体サブタイプの発現分布の変化、カテコールアミン分泌への影響、マウスの生存率を調べ、ムスカリン受容体の生理的役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

単一のムスカリン受容体サブタイプを欠損したシングルノックアウト (KO) マウスや複数のサブタイプを欠損した多重 KO マウスを作製する。作製した KO マウスの副腎髄質細胞においても発現するサブタイプの同定を免疫細胞染色法により行う。野生型および確立した KO マウスから順次インスリン投与実験を行い、副腎内・血中カテコールアミンおよび血中グルコースの定量を行う。また、

空腹時インスリン投与による野生型とムスカリン受容体 KO マウスの生存率の差の有無についても検討する。ムスカリン受容体がアドレナリン細胞に選択的に分布するかどうか、免疫組織染色法により観察する。ムスカリン受容体の遺伝子を破壊することによりアドレナリン合成酵素 (PNMT) の mRNA および発タンパク質レベルで現量が変化するかどうか、それぞれリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により調べる。

4. 研究成果

(1) ラット、マウス、モルモットの副腎髄質細胞およびラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞において、免疫学的手法によりムスカリン受容体サブタイプの発現およびその分布について調べ、結果を以下の表にまとめた。

表1 ムスカリン受容体サブタイプの発現および分布

	M1	M2	M3	M4	M5
rat	細胞質 +-	-	膜 +	膜 ++	膜 +++
guinea-pig	細胞質 +	-	細胞質 ++	膜 ++	膜 +++
mouse	細胞質 +	-	細胞質 ++	膜 ++	膜 +++
PC12	細胞質, 膜 +	膜 +	細胞質 ++	膜 ++	膜 ++

(2) ムスカリン受容体ノックアウトマウスを用いアンペロメトリー法によるカテコールアミン分泌を観測した結果、マウス副腎髄質細胞ではムスカリン受容体サブタイプ1がムスカリン刺激によるカテコールアミン分泌に関与していることがわかった。

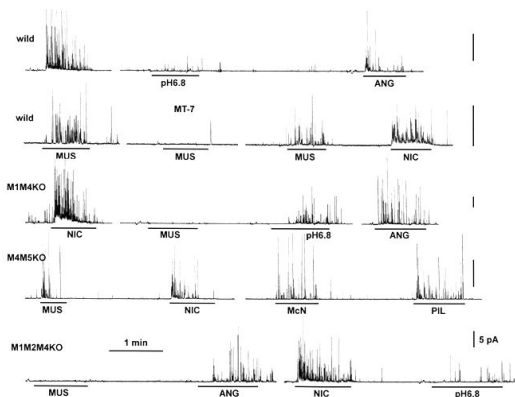


図1 KO マウスと野生型マウスのアンペロメトリー法によるカテコールアミン分泌観測

(3) 低血糖時における副腎髄質および血中カテコールアミン量を KO マウスと野生型マウスで比較した。マウスを 24 時間絶食させたのちインスリンを腹腔内投与した。投与後、0、1、2、4 時間後副腎摘出および採血を行い、副腎内および血漿中カテコールアミンを HPLC により測定した。KO マウスと野生型マウスの間に有意な差は観られなかった。

(4) 以前の研究によりモルモット副腎髄質のムスカリン刺激によるカテコールアミン分泌において、非選択的陽イオンチャネル (TRPC チャンネル) が関与していることがわかった。そこで、その分子メカニズムをモルモットおよび PC12 細胞を用い調べた。モルモット副腎髄質細胞には TRP チャンネル 1、4 および 5 が発現しており、休息時には、1、4 は細胞質に局在しているが、ムスカリン刺激により細胞辺縁へ局在が移動することがわかった。一方サブタイプ 5 は刺激の有無に関わらず細胞膜に局在した。

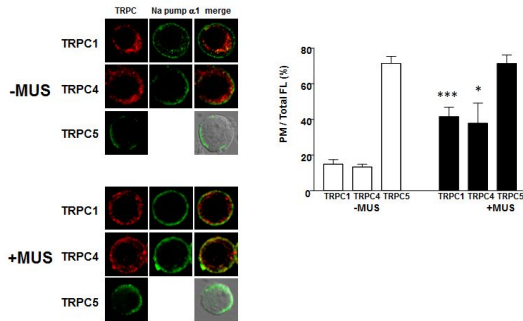


図 2 モルモット副腎髄質細胞における TRPC チャンネル 1、4、5 の発現とムスカリン刺激によるそれらの局在変化

(5) Proximity Ligation Assay (PLA) 法により TRPC チャンネル 1 と 4 がヘテロマーを形成することが分かり、ムスカリン刺激により PLA 反応物は一部細胞辺縁へ移動した。ヘテロマーの形成量はムスカリン刺激前後で変化がなかった。(4) および (5) の結果より、モルモット副腎髄質細胞におけるムスカリン刺激によるカテコールアミン分泌には TRPC1 と 4 が関わっていることがわかった。

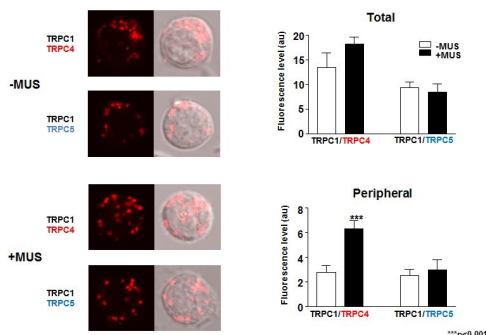


図 3 PLA 法による TRPC チャンネルヘテロマー形成の観察およびムスカリン刺激によるそ

の局在変化

(6) ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用い、より詳細な分子メカニズムを調べた。強制発現させた TRPC1 と 4 は STIM1 分子依存的にヘテロマーを形成した。

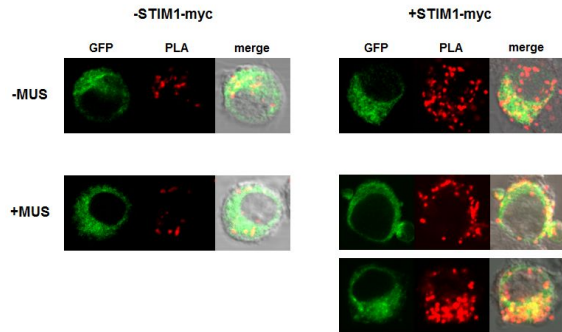


図 4 PC12 細胞における TRPC1・4 ヘテロマー形成への STIM1 分子の影響の PLA による観察

(7) モルモット副腎髄質細胞においては、TRPC1 と 5 のヘテロマーを形成量は 1 と 4 のヘテロマーより少なく、また 1/5 ヘテロマーはムスカリン刺激による局在の変化も観測されなかった。そこで PC12 を用い、TRPC1 と 5 がヘテロマーを形成するかどうか調べた。モルモット副腎細胞の内在性 TRPC5 と同様に、PC12 に強制発現させた TRPC5-GFP は細胞膜に局在した。

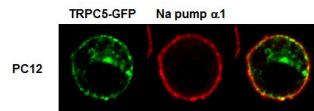


図 5 TRPC5-GFP の PC12 細胞内局在

PLA 法により、PC12 細胞内における外在性 TRPC1-GFP と TRPC5-GFP のヘテロマー形成を観察したが、STIM1 分子の有無に関わらずヘテロマーはほとんど形成されなかった。

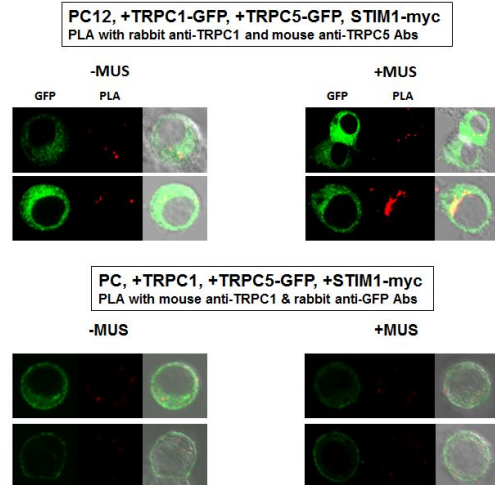


図6 PC12細胞における TRPC1・5ヘテロマー形成の観察

TRPC5の活性はCa結合タンパク、CaBPの存在により不活性化されることが報告されている。CaBPのPC12細胞内発現をしらべたところ、細胞膜付近にその局在が集中していた。

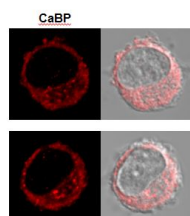


図7 PC12細胞におけるCaBPの局在

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 1 件)

Harada K, Matsuoka H, Miyata H, Matsui M, and Inoue M Identification of muscarinic receptor subtypes involved in catecholamine secretion in adrenal medullary cells by genetic deletion. Br. J. Pharmacol., 172, 1348-1359, 2015 (査読有) doi: 10.1111/bph.13011.

[学会発表](計 2 件)

原田景太・松岡秀忠・井上真澄、PC12細胞におけるTRPCチャンネル1と4の機能的再構成、第65回西日本生理学会、平成26年10月23日、「琉球大学研究者交流施設50周年記念館(沖縄・那覇)」

原田景太・松岡秀忠・井上真澄、PC12細胞におけるTRPCチャンネルヘテロマー形成におけるSTIM1の役割、第93回日本生理学会、平成28年3月22日-24日、「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 景太 (HARADA, Keita)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50399200