

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460306

研究課題名(和文) アドレナリン分泌機序におけるTASKチャネルの生理的意義の解明

研究課題名(英文) The physiological role of TASK channel in adrenaline secretion

研究代表者

松岡 秀忠 (Matsuoka, Hidetada)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90374991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌細胞におけるTASK1チャネルの機能および生理的意義について解析した。NGFおよびムスカリン存在下でのTASK1チャネルの機能調節に、クラスリン依存性エンドサイトーシスが関与することを明らかにした。さらに、チャネルエンドサイトーシスの制御機構を解析し、NGF、ムスカリン存在下では、異なる分子機構によって制御されていることを明らかにした。また、TASK1チャネルKOマウスを用いた解析により、TASK1チャネルKOマウスの副腎髄質細胞では、pH感受性の低下、アドレナリン分泌量の減少を示し、アドレナリン分泌促進にTASK1チャネルが重要な役割を果たすことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：I investigated the function and physiological role of TASK1 channels in endocrine cells. Pharmacological and molecular biological analyses showed that TASK1 channels are regulated by the clathrin-dependent endocytosis in NGF- and muscarine-stimulated adrenal medullary and PC12 cells. Additionally, it showed that the molecular mechanisms regulating channel endocytosis differ between NGF-induced endocytosis and muscarine-induced endocytosis. The AM cells prepared from TASK1 KO mice indicated the decrease of pH sensitivity and adrenaline secretion, suggesting TASK1 channels play an important role in a sensor of acidosis and adrenaline secretion in AM cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：TASKチャネル

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。副腎髄質(AM)細胞のアドレナリン分泌システムにおけるTASK1チャンネルの役割と機能調節の分子機構を解析し、内分泌細胞におけるTASK1チャンネルの重要性が示唆された。しかしながら、生理機能発現に果たすTASK1チャンネルの役割やその機能調節機構の詳細については不明なままである。

本課題におけるTASK1チャンネルの機能および生理学的意義の解明が、副腎髄質での細胞内カルシウムシグナリングやホルモン分泌機構の解明を推進するものと期待される。また、TASK1チャンネルKOマウスを用いた個体レベルでの解析は、カテコールアミンの異常高値を示す心筋梗塞、糖尿病、慢性腎不全等の副腎疾患に関わる多くの生命現象の分子的理解を推進するものと期待される。

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、内分泌細胞のホルモン分泌機構におけるTASK1チャンネルの機能およびその生理的意義を詳細に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養・トランスフェクション

PC12細胞は、serum starvation後、NGF刺激またはムスカリン刺激を行った。また、各阻害剤処理は、各刺激の前後行った。PC12細胞への遺伝子導入は、リポフェクション法を用いた。単離AM細胞は、Ca²⁺ free平衡塩溶液に30分間置いた後、NGF刺激またはムスカリン刺激を行った。

(2) Proximity ligation assay

Duolink In Situ kit(Olink Bioscience社)を用いたProximity ligation assayにより、TASK1チャンネルとSrc kinasesの相互作用につ

いて解析した。PLA反応の検出は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(3) 免疫染色法・顕微鏡観察

AM細胞におけるTASK1チャンネルおよびエンドサイトーシス関連分子は、免疫染色法で検出した。PC12細胞における endogenous および exogenous TASK1 チャンネルおよびエンドサイトーシス関連分子は GFP 蛍光および免疫染色法で検出した。各蛋白質の細胞内局在は、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) マウス AM 細胞の電気生理学的実験

WT および TASK1 チャンネル KO マウス副腎髄質をコラゲナーゼで処理して、AM細胞を単離した。この単離細胞から穿孔パッチクランプ法を用いて全細胞電流を記録した。また、アンペロメトリー法を用いて、単離 AM 細胞からのカテコールアミン分泌を測定した。pH 依存性のカテコールアミン分泌量を WT と TASK1 チャンネル KO マウス間で比較した。

4. 研究成果

NGF 刺激に伴う TASK1 チャンネルのクラスリン依存性エンドサイトーシスの制御機構について解析した。TrkA の下流因子の関与について、各種阻害剤を用いて解析した。TrkA、PI3K、PLC 阻害剤処理した PC12 細胞において、TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスの抑制が観察された。さらに、PLC の下流因子 PKC についても阻害剤を用いて解析した結果、在来型 PKC が TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

また、NGF 刺激によって TASK1 チャンネルのチロシンリン酸化の亢進が観察されたので、Src kinase の関与についても調べた。その結果、Src kinase による TASK1 チャンネルの 370 番目の Tyr のリン酸化が、チャンネ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、Proximity ligation assay により、

Src kinase と TASK1 チャンネルの NGF 刺激依存的一過性の相互作用もチャンネルのエンドサイトーシスに關与することが示唆された。

以上の結果より、TASK1 チャンネルのエンドサイトーシス制御には、PI3K pathway、PLC-PKC pathway、Src kinase の活性化および相互作用が關与することが示唆された。また、ムスカリン存在下での TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスについても、AM 細胞および P12 細胞を用いて解析した。薬理的・分子生物学的手法を用いて解析した結果、チャンネルエンドサイトーシスを制御する分子機構について明らかにした。これらの結果は、論文にまとめ現在投稿中である。

次に、TASK1 チャンネル KO マウスの AM 細胞を用いて、アドレナリン分泌における TASK1 チャンネルの役割について解析した。その結果、WT の AM 細胞では、細胞外 pH 変化に应答して、内向き電流が発生するのに対し、TASK1KO マウス AM 細胞では、この電流应答の消失が觀察された。

また、pH 変化に应答して WT の AM 細胞では、カテコールアミンの分泌促進が觀察されたが、TASK1KO マウス AM 細胞では、そのような変化は觀察されなかった。以上の結果より、アドレナリン分泌促進に TASK1 チャンネル発現が必要であることが示唆され、その詳細について現在解析中である。

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 4 件)

Suzukia S, Koshimizu H, Adachi N, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta K, Mikia T. Functional interaction between BDNF and mGluR II in vitro: BDNF down-regulated mGluR II gene expression and an mGluR II agonist enhanced BDNF-induced BDNF gene expression in rat cerebral cortical neurons Peptides 2017 Jan 21;89:42-49

査読有り

Harada K, Matsuoka H, Fujihara H, Ueta Y, Yanagawa Y, Inoue M GABA signaling and neuroactive steroids in adrenal medullary chromaffin cells Frontiers in Cellular Neuroscience 2016 Apr 18 doi: 10.3389/fncel.2016.00100. 査読有り

Matsuoka H, Inoue M. Src mediates endocytosis of TWIK-related acid-sensitive K⁺ 1 channels in PC12 cells in response to nerve growth factor Am J Physiol Cell Physiol. 2015 Aug 15;309(4):C251-63 査読有り

Harada K, Matsuoka H, Miyata H, Matsui M, Inoue M. Identification of muscarinic receptor subtypes involved in catecholamine secretion in adrenal medullary chromaffin cells by genetic deletion. Br J Pharmacol. 2015;172(5):1348-59. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

Matsuoka H, and Inoue M Molecular mechanism for NGF-induced endocytosis of TASK1 channels in rat adrenal medullary cells and PC12 cells 第 93 回日本生理学会大会 (2016.3.22~24.札幌コンベンションセンター(北海道札幌市))

松岡秀忠、原田景太、井上真澄 副腎髄質細胞および PC12 細胞における TASK1 チャンネルエンドサイトーシスの分子機構 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会 合同大会 (2015.3.21~23.神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市))

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・講師

研究者番号：90374991