

Title	cGMP依存性蛋白キナーゼの活性化によるTASK3コンダクタンスの抑制
Author(s)	田中, 千恵
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/52330">https://doi.org/10.18910/52330</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 田 中 千 恵 )	
論文題名	cGMP依存性蛋白キナーゼの活性化によるTASK3コンダクタンスの抑制
<p>論文内容の要旨</p> <p><b>【背景・目的】</b></p> <p>筋の収縮力の調節は、運動単位の動員と、個々の運動ニューロンの発火頻度の調節によって達成され、運動単位の動員は「サイズの原理」に基づいて行われることが知られている (Henneman &amp; Olson 1965)。これは、細胞径が小さい、即ち、入力抵抗が高い運動ニューロンである程、一定の興奮性シナプス後電流 (EPSC) に対して大きな興奮性シナプス後電位 (EPSP) が生じることによるものと考えられている。噛み締め運動において咬合力を増していく時にも、閉口筋支配運動ニューロン (JCMN) の軸索伝導速度が遅い、つまり細胞径が小さい運動単位から順に動員される (Yemm 1977)。</p> <p>細胞の入力抵抗や静止膜電位は、漏洩K<sup>+</sup>電流によって支配的に決定され (Goldman 1943)、ニューロンの漏洩K<sup>+</sup>電流はTASK1およびTASK3サブユニットの二量体であるチャネルによって担われている (Lesage et al. 1996)。三叉神経運動核 (TMN) にはTASK1およびTASK3のmRNAが極めて高いレベルで発現していることから (ラット; Karschin et al. 2001)、三叉神経運動ニューロンの入力抵抗や静止膜電位は、TASK1およびTASK3によって支配的に決定されると考えられる。ラット成獣TMN背外側部閉口筋領域のニューロンに対する免疫組織化学実験の結果から (榎村 2011)、TASK1/1チャネルは主に細胞体膜に存在し、静止膜電位と細胞体の入力抵抗を担うと考えられ、一方、TASK3/3チャネルは樹状突起膜に存在し、樹状突起へのシナプス入力抵抗を担うと想定される。従って、閉口筋の等尺性収縮時には、TASK1/1およびTASK3/3コンダクタンスによって運動単位の序列動員様式が決定され、これらのコンダクタンスを調節する因子によって、序列動員様式が修飾を受けていることが示唆される。</p> <p>TMNは一酸化窒素 (NO) 作動性ニューロンの入力を受けており (Pose et al. 2005)、TASK1/1コンダクタンスはNO-環状グアノシン-リン酸 (cGMP) -cGMP依存性蛋白リン酸化酵素 (PKG) 系の活性化によって上方制御を受けることが知られている (Toyoda et al. 2010)。実際小型JCMNでは、cGMP可溶性アナログ8-Br-cGMPの投与により入力抵抗が低下した。しかしながら、TASK3/3が発現する樹状突起を豊富に持つ大型JCMNでは、入力抵抗は必ずしも低下しなかった。また、大型JCMN周囲を電気刺激して誘発されたEPSPの振幅は、8-Br-cGMP投与によって増大した (深津 2012)。これらのことから、TASK3/3コンダクタンスは、PKGの活性化により下方制御を受ける可能性が考えられた。そこで本研究では、PKGを活性化させる8-Br-cGMPの投与によりTASK3/3コンダクタンスがどのように修飾されるかを明らかにすることを目的に以下の実験を行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>(1) 培養哺乳類細胞におけるTASKチャネル発現実験：継代培養したHEK293細胞・CHO細胞・COS-7細胞・A9細胞に対し、リポフェクション法によってTASK1あるいはTASK3と蛍光蛋白のcDNAを導入した。導入から通常12時間 (4~48時間) 後に培養液から取り出し、HEPES Ringer液を灌流した記録チャンバーに移し、赤外線微分干渉・蛍光顕微鏡下で蛍光蛋白を発現している細胞を視覚的に同定した。その内、形態が正常かつカバーガラスへの接着が良好な細胞に対して全細胞パッチクランプを形成し、膜電流の計測を試みた。</p> <p>(2) アフリカツメガエル卵母細胞におけるTASKチャネル発現実験：雌性のアフリカツメガエルから摘出した卵巣より、成熟卵母細胞 (Stage V/VI) を選別し1~2日静置後、鋭利なガラスピペットを用いてT7-TASK1あるいはT7-TASK3 cRNAを注入した。注入1~3日後、ND96溶液を灌</p>	

流した記録チャンバーに移し二電極電位固定記録を行った。細胞外pH (7.4および8.4) は、ND96液に添加するNaOH量を変えて調整した。8-Br-cGMPは細胞外灌流液に100  $\mu$ M投与した。

#### 【結果】

(1) 培養哺乳類細胞におけるTASKチャンネル発現実験：いずれの種の培養細胞においても、TASK3導入細胞は、記録前に崩壊するか、記録を開始することができても安定した状態を維持できなかった。これらの現象は、リポフェクションの条件の調整、細胞外液の浸透圧・pH・K<sup>+</sup>濃度の調整、細胞外液へのCs<sup>+</sup>・Ba<sup>2+</sup>・Zn<sup>2+</sup>添加では回避できなかった。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞におけるTASKチャンネル発現実験：TASK1, TASK3いずれのcRNAを注入した卵母細胞においても二電極刺入直後の膜電位が $-79.8 \pm 9.9$  mV ( $n = 14$ ) となり、+60 mVへの電位パルスも対する定常電流の振幅は数百nA～数 $\mu$ Aに達した。蒸留水注入細胞では、膜電位が $-60$  mVより脱分極側にあり、pH依存性電流は観察されなかった。

・TASK1 cRNA注入例：電流応答の振幅は、pH 7.4よりもpH 8.4の方が大きく、明瞭なpH依存性が認められた。また、8-Br-cGMP投与により電流応答の振幅は有意に増加した。その増加量は、pH 8.4の時よりもpH 7.4の方が大きかった。以上の所見は、TASK1/1チャンネルの電流特性と8-Br-cGMPによる影響に関する報告 (HEK293細胞；Toyoda et al. 2010) の内容とほぼ一致していた。

・TASK3 cRNA注入例：電流応答の振幅は、pH 7.4よりもpH 8.4の方が大きかったが、その相対的な差はTASK1の場合よりも有意に小さかった。この所見は、TASK3/3チャンネルの電流特性 (COS-7細胞；Kim et al. 2003) とほぼ一致していた。8-Br-cGMPを投与すると、電流応答の振幅は有意に減少した。

#### 【考察】

培養哺乳類細胞を用いたTASKチャンネル発現実験において、いずれの種の培養細胞においても、TASK3蛋白の発現は認められたが、HEPES Ringer液中では安定した状態を維持できなかった。このことから、培養細胞においては、TASK1/1の約2倍の単一チャンネルコンダクタンス (Kim 2003) と20倍以上の開確率を持つTASK3/3 (Kim et al. 2000) が細胞膜上へ大量に発現することによって、K<sup>+</sup>イオンのホメオスタシスに深刻な影響を与えることで細胞死へとつながっているか、あるいは、細胞内に集積したTASK3サブユニット蛋白が何らかの細胞障害性を呈している可能性が考えられた。

アフリカツメガエル卵母細胞にTASK3 cRNAを注入した例では、8-Br-cGMP投与によって電流応答が有意に抑制されたが、pH 7.4におけるコンダクタンスの変化率 (減少率) は、TASK1 cRNA注入例のpH 7.4におけるコンダクタンスの変化率 (増加率) に比べ小さかった。これは、TASK3/3チャンネルの発現レベルが高く、それらを燐酸化するのに十分な内因性PKG酵素活性が得られなかったことが一因であると考えられた。

卵母細胞に発現させたTASK3/3チャンネルの電流は、TASK1/1チャンネルとは対照的に、8-Br-cGMP投与により有意に抑制された。このことは、TMNに投射するNO作動性ニューロンが活動することで、NO-cGMP-PKG系が活性化され、TASK1/1チャンネルおよびTASK3/3チャンネルがそれぞれ上方制御・下方制御を受けることを示唆する。TASK1/1が豊富に発現している小型JCMNでは、PKGの活性化によってTASK1/1が上方制御を受けることで、細胞全体の入力抵抗が低下すると伴に静止膜電位が過分極する。その結果、小型JCMNの動員閾値は上昇する。一方、大型JCMNでは、発達した樹状突起上にTASK1/3およびTASK3/3が高密度に発現しているため、PKGが活性化されることで、主にTASK3/3の下方制御による樹状突起の局所入力抵抗の上昇によりEPSPの振幅が増大する一方で、細胞全体の入力抵抗や静止膜電位はTASK1/1の上方制御とTASK3/3の下方制御の効果が相殺されることで顕著な変化は生じないことが想定される。結果として、EPSPの振幅増大によって、大型JCMNの動員閾値は低下すると考えられる。従って、TMNに投射するNO作動性ニューロンが興奮している状態では、小型JCMNと大型JCMNの動員閾値の分布が狭まり、これらが同期的に活性化される動員様式へと切り換えられることが強く示唆される。

#### 【結論】

TASK3/3コンダクタンスは、TASK1/1コンダクタンスとは逆に、NO-cGMP-PKG系の活性化により下方制御を受けることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 田 中 千 恵 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	姜 英男
	副 査	教授	阪井 丘芳
	副 査	准教授	長島 正
	副 査	准教授	中村 渉
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>閉口筋の等尺性収縮時には運動単位の序列動員が生じる。その様式を決定する漏洩 K 電流を担う TASK1/1 及び TASK3/3 コンダクタンスが、三叉神経運動核 (TMN) に投射する一酸化窒素 (NO) 作動性線維の活性化時にどのように修飾されるかを解明するため、アフリカツメガエル卵母細胞に TASK1/1 あるいは TASK3/3 チャネルを発現させ、NO 投与と同等の効果をもつ 8-Br-cGMP を灌流投与した際に生じるコンダクタンス変化を電気生理学的に記録解析した。</p> <p>その結果、TASK1/1 コンダクタンスは 8-Br-cGMP の投与によって増加するが、逆に TASK3/3 コンダクタンスは減少することが明らかとなった。このことは、TMN 閉口筋領域への NO 入力によって、TASK1/1 発現量が相対的に少なく入力抵抗の高い小型運動ニューロンと、TASK3/3 を豊富に発現する樹状突起が発達した入力抵抗の低い大型運動ニューロンとの間の入力抵抗の差が縮小し、サイズの異なる閉口筋運動ニューロン群がより同期的に活性化される動員様式へと切り換えられることを示唆している。</p> <p>本研究の結果は、閉口筋の等尺性収縮運動の制御機構を理解する上で、極めて重要な知見であると考えられ、本論文を博士 (歯学) の学位取得に値するものと認める。</p>			