

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,千惠
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52330
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

## 学位論文

# 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

# 大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻・顎口腔機能再建学分野

田中 千惠

### 背 景

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<sup>1,2)</sup>.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(excitatory postsynaptic current;以下 EPSC)に対して大きな興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential;以下 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(jaw-closing motoneuron;以下 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<sup>3,4)</sup>.

細胞の入力抵抗や静止膜電位は、漏洩 K+電流によって支配的に決定され<sup>5</sup>, ニューロンにおいてその電流を担っているのは TWIK-related acid-sensitive K+(以 下 TASK) 1 および TASK3 チャネルであることが知られている<sup>6-8</sup>). TASK チャ ネルは、膜貫通ドメインを 4 つ、ポアドメインを 2 つ有するサブユニットの二 量体により形成されており、その組み合わせにより、TASK1/1 ホモ二量体型チ ャネル、TASK3/3 ホモ二量体型チャネルおよび TASK1/3 ヘテロ二量体型チャネ ルに分類される<sup>8)</sup>. TASK1 および TASK3 は哺乳類の脳内に広く分布しており<sup>9-11)</sup>、三叉神経運動核(trigeminal motor nucleus;以下 TMN)には TASK1 および TASK3 の *m*RNA が極めて高いレベルで発現していることから<sup>12)</sup>、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<sup>13)</sup>、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.

TMN は一酸化窒素(nitric oxide;以下 NO)作動性ニューロンの入力を受けて おり<sup>14</sup>, TASK1/1 コンダクタンスは NO-環状グアノシンーリン酸(cyclic guanosine monophosphate;以下 cGMP)ーcGMP 依存性蛋白燐酸化酵素(cGMPdependent protein kinase;以下 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<sup>15,16</sup>). 実際小型 JCMN では, cGMP 可溶性アナログ 8bromoguanosine 3′,5′-cyclic monophosphate(以下 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 を発現する樹状突起が豊富な大型 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<sup>17)</sup>. 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.

### 方 法

本研究は、大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査・承認を得て実施した (承認番号 2873、研究課題名「TASK チャネルの電気生理学的特性の解明」).

### 1. 培養哺乳類細胞における TASK チャネル発現実験

培養哺乳類細胞に強制発現させた TASK1/1 チャネル電流に対する 8-Br-cGMP

投与の影響をみた先行研究があることから<sup>15,16)</sup>,先ずは,継代培養した培養哺乳 類細胞に TASK3/3 チャネルを発現させる実験を行った.

pIRES2-DsRed2-TASK3 cDNA 溶液(1 µg/µl;国立循環器病研究センター研究 所血管生理学部室長岡澤慎博士より供与) 3.8µl, Opti-MEM (GIBCO 社製) 750 µl, Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen 社製) 4.5 µl を試験管内に注入し攪拌 して 5 分間静置後, Lipofectamine LTX (Invitrogen 社製) 13.5µl を加え攪拌し 30 分間静置して,リポフェクション反応液を調製した.継代培養し poly-L-lysine コ ートカバーガラス (松浪硝子工業社製) 上に播かれた HEK293 (EC85120602-F0; ヒト胎児腎由来,上皮細胞様), CHO (EC85050302-F0;モンゴルキヌゲネズミ 卵巣由来,上皮細胞様), COS-7 (EC87021302-F0;アフリカミドリザル腎由来, 線維芽細胞様), A9 (EC85011426-F0;マウス結合組織由来,線維芽細胞様) の 各細胞 (全て DS ファーマバイオメディカル社製) をリポフェクション反応液に 3~6 時間浸漬した後,通常の培養液に移し,蛋白を発現するまで通常 12 時間 (4 ~48 時間) 静置した. HEK293, COS-7, A9 の培養には Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% ウシ胎仔血清, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (全て GIBCO 社製), CHO の培養には Ham's F-12 Nutrient Mixture (GIBCO 社製), 10% ウシ胎仔血清, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin をそれぞれ用いた.

記録時には細胞を培養液から取り出し,HEPES Ringer 液(123 mM NaCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 100 mM HEPES, 5 mM D-glucose; NaOH で pH を 7.4 に 調整)を灌流した記録チャンバーに移し,赤外線微分干渉(infrared-differential interference contrast;以下 IR-DIC)・蛍光顕微鏡(BX-51WI IR-DIC/FL,オリンパ ス社製)下で,緑色の励起光に対し赤色の蛍光を発する DsRed2 蛋白(励起極大 波長 554 nm,蛍光極大波長 591 nm)を発現している細胞を同定し,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(図 1)に対して全細胞パッチ

クランプ(whole-cell patch clamp)を形成した.顕微鏡写真の撮影には,赤外線 CCD カメラ(C5999,浜松ホトニクス社製)およびイメージプロセッサー(ARGUS 20,浜松ホトニクス社製)を用いた.

### 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

本実験は本学医学系研究科分子細胞薬理学教室で実施した.

#### 卵母細胞の単離

雌性のアフリカツメガエル (Xenopus laevis) をフレークアイス中に埋没し麻酔 した.カエルを氷上に仰向けに置き,70%エタノールで腹部を消毒後,右または 左下腹部をメスで1 cm 程切開して卵巣を引き出し,その一部を採取して ND96 液 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 50 µg/ml ゲンタマイシン; NaOH で pH を 7.4 に調整) に移した.切開創の筋層と皮膚を それぞれ縫合した後,覚醒させてから水槽に戻した.卵巣を採取したカエルは, 治癒を待つため次回使用までに 2 か月以上の間隔を空けた.採取した卵巣の房 は,コラゲナーゼ (GIBCO 社製; 1.8~2.0 mg/ml) 添加 OR-2 液 (82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES; NaOH で pH を 7.4 に調整) 中に約 2 時 間浸漬した後,濾胞細胞層を除去し卵母細胞を単離した. ND96 液中で一晩静置 後,動物極と植物極の境界が明瞭な,成熟した卵母細胞 (Stage V/VI) を選別し た.

#### ● 卵母細胞への cRNA の注入

pIRES2-ZsGreen1-TASK1 および pIRES2-ZsGreen1- TASK3 cDNA (共に,国立 循環器病研究センター研究所血管生理学部室長岡澤慎博士より供与)から切り 出した TASK1, TASK3 を,pcDNA3.1<sup>(-)</sup>発現ベクター (Life Technologies 社製) の T7 プロモーター下流にサブクローンし,プラスミド DNA を精製した.環状 プラスミドの TASK1 および TASK3 終端より下流部分を,制限酵素 HindIII を用 いて切断して得られた直鎖化 DNA を鋳型とし,RNA ポリメラーゼによる転写 反応によって,T7-TASK1 および T7-TASK3 cRNA を合成した(上記作業は本学 医学系研究科分子細胞薬理学教室古谷和春助教による).T7-TASK1 あるいは T7-TASK3 cRNA 溶液(1 μM/μl)に diethylpyrocarbonate 処理済み蒸留水を加えて 100 倍希釈したものを,ブロックインキュベーターB1-516(ASTEC 社製)を用いて 65℃×5 分間加温した後,微量高速冷却遠心機 MX-15(トミー精工社製)で 15,000 回転×10 分間遠心分離した.ガラス管(外径 1.50 mm,内径 1.10 mm,長さ 100 mm;G86150T-4,Warner Instruments 社製)をガラス微小ピペット作製装置 PE-21 (成茂科学器械社製)で一段引きし,さらに実体顕微鏡下で先端を折って先端径 が 20 μm 前後となるように調整した.遠心分離した cRNA 溶液の上清を注入し たガラス微小ピペットを,気圧式微量注入器 PLI-100(Harvard Apparatus 社製) にセットし,実体顕微鏡下で卵母細胞に cRNA 溶液を注入した.注入量が 50 nl

程度になるように注入圧の大きさおよび持続時間を調整した.

### ● TASK 電流の記録

硼珪酸ガラス管(外径 1.50 mm,内径 1.17 mm,長さ 150 mm;GC150TF-15,
Warner Instruments 社製)を、ガラス微小ピペット作製装置 PC-10(成茂科学器械 社製)で二段引きし、記録電極用ピペットを作製した.ピペットに1%アガロー ス添加 3 M KCl を充填し、塩化銀で被覆した銀線を浸したものを記録電極とし て用いた.

*c*RNA 注入から 1~3 日後に, 卵母細胞を ND96 液で持続的に灌流した測定用 チャンバーに置き, 実体顕微鏡下で二電極電位固定記録 (two-electrode voltageclamp recording) 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, 8-Br-cGMP は細胞外灌流液に 100 μM 投与した. アフ リカツメガエルの卵母細胞には, Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャネルが発現していることが 報告されていることから<sup>18)</sup>, 同チャネル電流の遮断薬であるニフルム酸 (Sigma-Aldrich 社製)を各溶液に 0.1 mM 添加した.

二電極電位固定記録が確立された直後の膜電位を基線保持電位とし,持続時間 500 ms の矩形電位パルス (1 サイクル当たり-150~+60 mV の範囲で 30 mV 毎の8段階)を与え,そのときの膜電流応答を記録した.サイクル間隔は 60 秒 とした.細胞外灌流液は,(1) pH 7.4 の 8-Br-cGMP 不含 ND96 液(以下 Control)  $\rightarrow$  (2) pH 8.4 Control  $\rightarrow$  (3) pH 7.4 の 8-Br-cGMP 添加 ND96 液(以下+8-Br-cGMP  $\rightarrow$  (4) pH 8.4 +8-Br-cGMP, の順で 10 分毎に切り換えた.

二電極電位固定用増幅器 GeneClamp 500B(Molecular Devices 社製)からの信 号はアナログーデジタル変換器 DigiData 1322A(Molecular Devices 社製)を通じ てパーソナルコンピューターへ入力し,専用ソフトウェア Clampex 10(Molecular Devices 社製)を用いてハードディスクにデータファイルとして記録した.トレ ースデータからの電位レベルおよび電流の振幅の計測には,専用の解析ソフト Clampfit 10(Molecular Devices 社製)を用いた. TASK1/1 および TASK3/3 コンダ クタンスは,電流の逆転電位を-90 mV とみなして計算した.

#### 3. 統計学的処理

膜電位および膜電流の値は、平均値±標準偏差の形で示した.

二群間の平均の差の検定には Student's paired or unpaired *t*-test を, 三群以上の 間の検定には繰り返し測定のある二元分散分析および Fisher's protected least significant difference *post-hoc* test (以下 PLSD) をそれぞれ用いた. 有意水準は *p* <0.05 とした.

### 結 果

#### 1. 培養哺乳類細胞における TASK チャネル発現実験

いずれの種の培養細胞においても、TASK1 を導入したものについては、培養 液から取り出し HEPES Ringer 液中へ浸漬した後も、cDNA を導入していない細 胞と同様の形態を維持していたが、TASK3 を導入したものは、培養液中で崩壊 していたり、HEPES Ringer 液中へ移して、あるいは、全細胞パッチクランプを 形成して間もなく崩壊するか、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(図 2). これらの現象は、リポフェクションの条件(cDNA・ 試薬の濃度、反応時間、発現待ち時間)の調整、細胞外液の浸透圧(<±10%)・ pH (6.4~8.4)・K<sup>+</sup>濃度(<130 mM の範囲で Na<sup>+</sup>と等モル置換)の調整、細胞外 液への K<sup>+</sup>電流阻害薬 Cs<sup>+</sup> (<3 mM)・Ba<sup>2+</sup> (<1 mM)・Zn<sup>2+</sup> (<1 mM)<sup>19)</sup>の添加 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 チャネル発現実験

TASK1, TASK3 いずれの *c*RNA 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は-79.8±9.9 mV (n=14)となった.+60 mV へのパルスに対する定常電流の振幅は TASK1 *c*RNA を注入した卵母細胞では 472±168 nA (n=5), TASK3 *c*RNA を注入した卵母細胞では 2900±1040 nA (n=9)に達した.TASK チャネルはそれぞれ異なる pH 依存性を示すが<sup>20,21</sup>, *c*RNA 溶液の代わりに蒸留水を注入した細胞では,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.

#### 2-1 TASK1 cRNA を注入した卵母細胞の電流応答

TASK1 cRNA を注入した卵母細胞より得られた、矩形電位パルスに対する電

流応答の例を図3に示す.

pH 7.4 Control 溶液灌流中(図 3A, 青線) および pH 8.4 Control 溶液に切り換 えて 10 分後(図 3B, 緑線)にそれぞれ記録された応答電流は, 共に外向き整流 性様の電流-電位関係を示した.また, pH 8.4 Control の応答電流(図 3B, 緑線) は pH 7.4 Control のもの(図 3B, 青破線)に比べ増大し,明確な pH 依存性が認 められた. 8-Br-cGMP を含む溶液を灌流投与すると, pH 7.4(図 3C, 赤線)およ び pH 8.4(図 3D, 橙線)のいずれにおいても, Control 溶液灌流時(図 3C, 青 破線;図 3D, 緑破線)に比べ電流は増加した.上記の電流応答の特徴は, HEK293 細胞に発現させた TASK1/1 チャネルに関する報告<sup>16)</sup>等の多くの先行研究の結果 と一致していた.

図 4A に、図 3 で示した例について、pH 7.4 Control、pH 8.4 Control、pH 7.4 +8-Br-cGMP、pH 8.4 +8-Br-cGMP の各溶液灌流中に得られた応答電流の、電位パル スのオフセット直前 (10~5 ms)の振幅を計測して得られる電位-電流関係を示 す. 先行研究の結果と同様に、Goldman-Hodgkin-Katz (以下 GHK)型の外向き整 流性 <sup>21)</sup>を示した.図 4B に、5 個の卵母細胞から得られた平均の電位-電流関係 を示す.pH 8.4 Control 溶液灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流の 振幅を 1 として標準化した.+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅は、 Control 溶液灌流時 (p<0.001, PLSD) および+8-Br-cGMP 溶液灌流時 (p=0.0021, PLSD) 共に、pH 8.4 の方が pH 7.4 よりも有意に大きく、明瞭な pH 依存性が認 められた.また、+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅は、8-Br-cGMP 投与により、pH 7.4 では有意に増加したが(標準化値の変化量 +0.32±0.15、p < 0.001, PLSD)、pH 8.4 では有意な変化が認められなかった(同 +0.10±0.09、p= 0.18、PLSD).

#### 2-2 TASK3 cRNA を注入した卵母細胞の電流応答

TASK3 cRNA を注入した卵母細胞より得られた,矩形電位パルスに対する電流応答の例を図5に示す.

pH 7.4 Control 溶液灌流中(図 5A, 青線) および pH 8.4 Control 溶液に切り換 えて 10 分後(図 5B, 緑線) にそれぞれ記録された応答電流は, 共に外向き整流 性様の電流-電位関係を示した.また, pH 8.4 Control の応答電流(図 5B, 緑線) は pH 7.4 Control のもの(図 5B, 青破線)に比べ増大し, 明確な pH 依存性が認 められた.これらの特徴は,図 3 と図 4 に示した TASK1 cRNA 注入細胞の場合 と同様であった.しかし, 8-Br-cGMP を含む溶液を灌流投与すると, TASK1 cRNA 注入細胞の場合と対照的に, pH 7.4(図 5C, 赤線)および pH 8.4(図 5D, 橙線) のいずれにおいても, Control 溶液灌流時(図 5C, 青破線;図 5D, 緑破線)に 比べ電流は減少した.

図 6A に、図 5 で示した例について、pH 7.4 Control、pH 8.4 Control、pH 7.4 +8-Br-cGMP、pH 8.4 +8-Br-cGMP の各溶液灌流中に得られた応答電流の電位 – 電流 関係を示す. TASK3/3 コンダクタンスに関する先行研究の結果<sup>21)</sup>、および、図 4 に示した TASK1 cRNA 注入細胞における所見と同様に、GHK 型の外向き整流 性を示した.図 6B に、9 個の卵母細胞から得られた平均の電位 – 電流関係を示 す.pH 8.4 Control 溶液灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅 を 1 として標準化した.+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅は、 Control 溶液灌流時 (p < 0.001, PLSD) および+8-Br-cGMP 溶液灌流時 (p < 0.001, PLSD) 共に、pH 8.4 の方が pH 7.4 よりも有意に大きく、明瞭な pH 依存性が認 められた.+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅は、8-Br-cGMP 投与 により、pH 7.4 (標準化値の変化量 –0.062±0.056、p=0.0027、PLSD) と pH 8.4 (同 –0.059±0.034、p=0.0040、PLSD) で共に有意に減少し、TASK1 cRNA 注

入細胞の所見と反対の結果が得られた.

### 2-3 TASK1 cRNA 注入例と TASK3 cRNA 注入例のコンダクタンスの比較

TASK1 *c*RNA 注入例 (*n* = 5) および TASK3 *c*RNA 注入例 (*n* = 9) について, pH 8.4 Control 溶液灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流から計算 されるコンダクタンスを1として標準化した,+0 mV,+30 mV,+60 mV におけ るコンダクタンス値の平均値を図 7A および図 7B にそれぞれ示す. TASK1 *c*RNA 注入例および TASK3 *c*RNA 注入例いずれにおいても,保持電位や 8-Br-cGMP の 存否に関わらず,pH 8.4 のコンダクタンスは pH 7.4 より大きく (TASK1 : *p* < 0.0059, TASK3 : *p* < 0.001 ; PLSD) pH 依存性が認められたが,pH 7.4 ~ pH 8.4 間 の相対的な差は,TASK3 *c*RNA 注入例の方が TASK1 *c*RNA 注入例よりも有意に 小さくなった (*p* < 0.0038 ; unpaired *t*-test). この TASK3 *c*RNA 注入例におけるコ ンダクタンスの pH 依存性は,既に報告されている TASK3/3 チャネル電流の特 性 (COS-7 細胞)<sup>17)</sup>とほぼ一致していた.

TASK1 *c*RNA 注入例において, 8-Br-cGMP 投与によるコンダクタンスの有意 な増加は pH7.4 でのみ認められ (0 mV: +61±43%, p=0.0039; +30 mV: +61± 38%, p=0.0019; +60 mV: +56±28%, p<0.001; PLSD), pH 8.4 では見られな かった (0 mV: +12±8%, p=0.19; +30 mV: +11±8%, p=0.19; +60 mV: +9 ±8%, p=0.19). これらの所見は, TASK1/1 コンダクタンスの pH 依存曲線が 8-Br-cGMP 投与により酸性側へとシフトするという過去の報告 <sup>15,16</sup>と矛盾しなか った.

TASK3 cRNA 注入例において, 8-Br-cGMP 投与によるコンダクタンスの有意 な減少は pH 7.4 (0 mV: -6.7±8.0%, p=0.020; +30 mV: -7.3±6.8%, p=0.0065; +60 mV: -7.3±6.7%, p=0.0019; PLSD) と pH 8.4 (0 mV: -8.7±4.7%, p<0.001; +30 mV: -7.9±3.5%, p<0.001; +60 mV: -6.2±3.2%, p=0.0023) で共に見ら

れ、TASK1 *c*RNA 注入例の所見と反対の結果が得られた. pH 7.4 と pH 8.4 にお ける、8-Br-cGMP によるコンダクタンスの減少率が同程度(0 mV : p = 0.35 ; +30 mV : p = 0.74 ; +60 mV : p = 0.52 ; paired *t*-test) であることから、単に TASK1/1 の場合と逆の変化、つまり、TASK3/3 コンダクタンスの pH 依存曲線が 8-Br-cGMP 投与により塩基性側へとシフトするのではなく、別の機序でコンダクタンスが 抑制される可能性が想定された.

### 考察

培養哺乳類細胞を用いた TASK3 チャ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,蛍光蛋白の発現が認められたことから,TASK3 蛋白も共発現していたと考えられるが,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,TASK3 cDNA を導入した培養細胞においては,TASK1/1の約2倍の単一チャネルコンダクタンスと20倍以上の開確率<sup>20)</sup>を持つ TASK3/3が細胞膜上へ大量に発現することによって,電位パルスにより大きなTASK3/3電流が生じた時、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(p<0.0048, unpaired *t*-test). これは, TASK3/3 チャ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 チャネルの電流は, TASK1/1 チャネルとは対 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 チャネルおよび TASK3/3 チャ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 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 樹状突起の局所的入力抵抗の上昇により EPSP の振幅が増大するが、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.

### 謝 辞

本稿を終えるに当たり,本研究を行う機会を与えていただき,終始御鞭撻を賜 りました大阪大学大学院歯学研究科ロ腔生理学教室 姜英男 教授,同研究科顎 ロ腔機能再建学講座有床義歯補綴学・高齢者歯科学分野教室 前田芳信 教授に 深甚なる謝意を表します.また,本研究課題の実験手技の御指導を賜りました同 教室 齋藤充 講師,大阪大学大学院医学系研究科分子細胞薬理学教室 古谷和春 助教に深く感謝いたします.

最後に,本研究の円滑な進展のため,特別な御配慮御協力をいただきました大 阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座有床義歯補綴学・高齢者歯科学 分野教室,同研究科口腔生理学教室,医学系研究科分子細胞薬理学教室の教室員 各位に厚く御礼申し上げます.

### 文 献

- Henneman, E. and Olson, C.B. (1965): Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol*, 28, 581-598.
- 2) Miles, T.S., Poliakov, A.V. and Nordstrom, M.A. (1995): Response of human masseter motor units to stretch. *J Physiol*, **483**, 251-264.
- 3) Henneman, E. (1991): The size principle and its relation to transmission failure in Ia projections to spinal motoneurons. *Ann N Y Acad Sci*, **627**, 165-168.
- Yemm, R. (1977): The orderly recruitment of motor units of the masseter and temporal muscles during voluntary isometric contraction in man. *J Physiol*, 265, 163-174.
- Goldman, D.E. (1943): Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol*, 27, 37-60.
- Berg, A.P., Talley, E.M., Manger, J.P. and Bayliss, D.A. (2004): Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci*, 24, 6693-6702.
- Czirjak, G. and Enyedi, P. (2002): Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem*, 277, 5426–5432.

- Lesage. F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. and Barhanin, J. (1996): TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J*, **15**, 1004-1011.
- Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. and Zilberberg, N. (2001): Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2, 175-184
- Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D. and Bayliss, D.A. (2001): Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*, 21, 7491-7505.
- 11) Patel, A.J. and Honoré, E. (2001): Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci*, 4, 339-346.
- 12) Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K.H., Daut, J. and Karschin, A. (2001): Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K<sup>+</sup> channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol Cell Neurosci*, **18**, 632-648.
- 13) 榎村 徳仁 (2011): TASK1 チャネル抗体の作製および咬筋運動ニューロンに おける TASK1/3 チャネル発現分布の検討. 博士 (歯学) Thesis, 大阪大, 大阪.
- 14) Pose, I., Fung, S., Sampogna, S., Chase, M.H. and Morales, F.R., (2005): Nitrergic innervation of trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat. *Brain Res*, **1041**,

- 15) Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Dempo, Y., Ohashi, A., Hirai, T., Maeda, Y., Kaneko, T. and Kang, Y. (2008): cGMP activates a pH-sensitive leak K<sup>+</sup> current in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *J Neurophysiol*, 99, 2126-2133.
- 16) Toyoda, H., Saito, M., Okazawa, M., Hirao, K., Sato, H., Abe, H., Takada, K., Funabiki, K., Takada, M., Kaneko, T. and Kang, Y. (2010): Protein kinase G dynamically modulates TASK1-mediated leak K<sup>+</sup> currents in cholinergic neurons of the basal forebrain. *J Neurosci*, **30**, 5677-5689.
- 17) 深津 雄己 (2011): cGMP によるラット閉口筋運動ニューロンの興奮性の修飾.博士 (歯学) Thesis, 大阪大, 大阪.
- 18) Kusano, K., Miledi, R. and Stinnakre, J. (1982): Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol*, **328**, 143-170
- 19) Shioya, T., Matsuda, H. and Noma, A. (1993): Fast and slow blockades of the inward-rectifier K<sup>+</sup> channel by external divalent cations in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflugers Arch*, **422**, 427-435.
- 20) Kim, D. (2003): Fatty acid-sensitive two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 648-654.
- 21) Kim, Y., Bang, H. and Kim, D. (2000): TASK-3, a new member of the tandem pore

K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem*, **275**, 9340-9347.

- 22) Duprat, F., Lesage, M., Fink, R., Reyes, C., Heurteaux, M. and Lazdunski, M. (1997):
  TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J*, 16, 5464-5471.
- 23) Leonoudakis, D. Gray, A.T., Winegar, B.D., Kindler, C.H., Harada. M, Taylor, D.M., Chavez, R.A., Forsayeth, J.R. and Yost, C.S. (1998): An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci*, 180, 868-877.
- 24) Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu G, Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A. and Derst, C. (2000): TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem*, **275**, 16650-16657.
- 25) Lesage, F. (2003): Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, **44**, 1-7.
- 26) Kang, Y., Dempo, Y., Ohashi, A., Saito, M., Toyoda, H., Sato, H., Koshino, H., Maeda,
  Y. and Hirai, T. (2007): Nitric oxide activates leak K<sup>+</sup> channels in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *J Neurophysiol*, **38**, 3397–3410.
- 27) Bayliss, D.A., Sirois, J.E. and Talley, E.M. (2003): The TASK family: two-pore domain back ground K<sup>+</sup> channels. *Mol Interv*, **3**, 205-219.

- 28) Goldin, A.L. and Sumikawa, K. (1992): Preparation of RNA for injection into *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol*, 207, 279-297.
- 29) Goldin, A.L. (1992): Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*, 207, 266-279.
- 30) Stuhmer, W. (1992): Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol*, 207, 319-339.
- 31) Screq, H. and Seidman, S. (1992): *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol*, 207, 225-265.
- 32) Morton, M.J., O'Connell, A.D., Sivaprasadarao, A. and Hunter, M. (2003)
  Determinants of pH sensing in the two-pore domain K<sup>(+)</sup> channels TASK-1 and -2. *Pflugers Arch*, 445, 577-583

### 図表の説明

#### 図1 DsRed2 を発現した A9 細胞の顕微鏡像

pIRES2-DsRed2-TASK3 cDNA を導入し, DsRed2 蛍光蛋白を発現した A9 細胞の顕微鏡像. A は IR-DIC 像, B は蛍光像. スケールバーは 20 μm を表す.

#### 図 2 HEPES Ringer 液中で正常な形態を維持できなかった細胞の顕微鏡像

- A CHO 細胞の例. 1, 3 は IR-DIC 像, 2 は蛍光像. DsRed2 蛍光タンパクを発 現していない細胞 (矢頭) は,カバーガラスへの接着も良く,正常な細胞形 態を示していた (1, 2). それに対し, DsRed2 発現細胞 (矢印) は,カバー ガラスへの接着が悪く丸みを帯びており (1, 2),全細胞パッチクランプを 形成するためガラスピペットを接触させたところ細胞が崩壊した (3).スケ ールバーは 20 µm を表す.
- B HEK293 細胞の例. 1~3 は IR-DIC 像. HEPES Ringer 液に浸漬した直後は正常な形態を示していたが(1),3分後には丸みを帯びつつカバーガラスから剥離し始め(2),6分後には細胞のほぼ全体が剥離した(3;1,2の画像よりも高い位置に焦点がある).スケールバーは20 μm を表す.

#### 図3 TASK1 cRNA を注入した卵母細胞の電流応答の例

- A pH 7.4 Control 溶液灌流中の応答電流. 基線保持電位は-77 mV.
- B pH 8.4 Control 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(緑線). pH 7.4 Control
   溶液灌流時(青破線; A の青線と同じ)に比べ電流は増大した.
- C pH 7.4 +8-Br-cGMP 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(赤線). pH 7.4
   Control 溶液灌流時(青破線; A の青線と同じ)に比べ電流は増大した.
- D pH 8.4 +8-Br-cGMP 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(橙線). pH 8.4

Control 溶液灌流時(緑破線; Bの緑線と同じ)に比べ電流は増大した.

#### 図4 TASK1 cRNA を注入した卵母細胞における電位-電流関係

- A 図3に示した例について, pH7.4 Control, pH 8.4 Control, pH 7.4 +8-Br-cGMP,
   pH 8.4 +8-Br-cGMPの各溶液灌流中に得られた応答電流の,電位パルスのオ フセット直前(10~5 ms)の振幅を計測し,電位一電流関係をプロットした.
- B 5 個の細胞から得られた平均の電位-電流関係を示す. pH 8.4 Control 溶液 灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅を1とした.

#### 図5 TASK3 cRNA を注入した卵母細胞の電流応答の例

- A pH 7.4 Control 溶液灌流時の応答電流. 基線保持電位は-85 mV.
- B pH 8.4 Control 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(緑線). pH 7.4 Control
   溶液灌流時(青破線)に比べ電流は増大した.
- C pH 7.4 +8-Br-cGMP 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(赤線). pH 7.4
   Control 溶液灌流時(青破線)に比べ電流は減少した.
- D pH 8.4 +8-Br-cGMP 溶液に切り換えて 10 分後の応答電流(橙線). pH 8.4
   Control 溶液灌流時(緑破線)に比べ電流は減少した.

#### 図 6 TASK3 cRNA を注入した卵母細胞における電位-電流関係

- A 図5に示した例について、図3と同様にpH7.4 Control、pH8.4 Control、pH
   7.4+8-Br-cGMP, pH8.4+8-Br-cGMP 各溶液灌流中に得られた応答電流の電位
   -電流関係をプロットした.
- B 9 個の細胞から得られた平均の電位-電流関係を示す.pH 8.4 Control 溶液 灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流の振幅を1として標準化 した.

### 図7 TASK1 cRNA 注入例と TASK3 cRNA 注入例のコンダクタンスの比較

pH 8.4 Control 溶液灌流時の+60 mV への電位パルスに対する応答電流から計 算されるコンダクタンスを1として標準化した,+0 mV,+30 mV,+60 mV にお けるコンダクタンス値の平均値を示す. A は TASK1 cRNA 注入例 (n=5), B は TASK3 cRNA 注入例 (n=9). \*:p < 0.05 (同じ pH の Control に対して). #: p < 0.05 (pH 8.4 Control に対して). @:p < 0.05 (pH 8.4 +8-Br-cGMP に対して).











TASK1



# TASK3



**TASK3** 









- pH 7.4 Control pH 7.4 +8-Br-cGMP pH 8.4 Control
- pH 8.4 +8-Br-cGMP

\* p < 0.05, vs. Control at the same pH

- # *p* < 0.05, vs. pH 8.4 Control
- @ *p* < 0.05,
  - vs. pH 8.4 +8-Br-cGMP