

副腎皮質球状帯細胞におけるアンギオテンシン II による TASK チャネルの抑制

井上 真澄¹, 松岡 秀忠¹, 原田 景太¹, 菅原 明²

¹産業医科大学医学部, ²東北大学大学院医学系研究科

概要 アンギオテンシン II (AngII) は, K チャネルを抑制してアルドステロン分泌を促進する。球状層細胞を含めた副腎皮質細胞における TASK1 および TASK3 チャネルの発現は, mRNA レベルでは明らかになっているが, 蛋白レベルでの解析はまだない。さらに, AngII による TASK チャネルの活性制御も不明である。著者らは, 副腎髄質細胞及び PC12 細胞において, 神経成長因子 (NGF) は TASK1 チャネルのエンドサイトーシスを秒単位で誘発することを報告した。この NGF によるエンドサイトーシスには, TASK1 チャネルの di-leucine モチーフに AP-2 が結合することが不可欠である。TASK3 チャネルには, di-leucine モチーフが存在しないため, NGF 刺激してもエンドサイトーシスは起きない。もし, 皮質細胞において TASK1 と TASK3 が heteromer を形成しているのであれば, TASK3 は TASK1 とともに細胞内に取り込まれる可能性がある。そこで, 本研究では, マウス副腎皮質細胞および副腎皮質細胞由来の H295R 細胞を用いて, 皮質細胞における TASK チャネル発現の蛋白レベルでの解析, およびチャネルの細胞内局在に対する AngII 刺激の影響を検討した。

コラゲナーゼ処理により得られた単離マウス副腎皮質細胞において, TASK1 様免疫反応物はその一部が細胞辺縁に局在したが, 大部分は細胞質に分布していた。一方, TASK3 様免疫反応物の大部分は細胞辺縁に局在した。これら免疫反応物は, その大部分がそれぞれの遺伝子をノックアウトすることにより消失した。次に, GFP-TASK1 そして GFP-TASK3 を H295R 細胞に強制発現させて, それぞれの融合蛋白の細胞内分布を検討した。GFP-TASK1 の大部分は細胞質, GFP-TASK3 の大部分は細胞辺縁に局在した。H295R 細胞を AngII により刺激すると, GFP-TASK1 は細胞質だけに局在するようになった。GFP-TASK3 はその一部は細胞辺縁に存在したが, 大部分は細胞質に移行した。

これらの結果は, 副腎皮質細胞において TASK1 および TASK3 チャネルが蛋白レベルで発現していること, そして TASK1 はおもに細胞質に, TASK3 は細胞辺縁に局在することを示している。AngII 刺激により, 細胞辺縁の TASK1 は細胞内に取り込まれた。さらに, TASK3 も一部とりこまれることより, TASK3 の一部は TASK1 と heteromer を形成している可能性がある。

1. 目的

血中の K イオン濃度は, 極めて狭い範囲に維持されている。この維持にはアルドステロンが重要な役割を担っている。アルドステロンは, 腎臓の集合管において上皮性 Na チャネルの膜発現を増やし, Na イオンの再吸収を促進する。このことにより, K イオンの排泄が間接的に促進される。副腎皮質最外層の球状層細胞からのアルドステロン分泌は, アンギオテンシン II (AngII), そして血中 K イオン濃度のわずかな上昇により促進される。これらのアルドス

テロン分泌促進は, K イオンの細胞外への流出の減少によることが知られているが, 関与する K チャネルはまだ十分には解明されていない。TASK1 チャネルは, マウス副腎皮質全層にわたって mRNA レベルで発現が確認されたが (Davies ら, 2008), 蛋白レベルでの解析はこれまで報告されていない。さらに, TASK1 欠損マウスではアルドステロン分泌が促進された (Heitzmann ら, 2008)。一方, TASK3 チャネルは, マウス球状層細胞で mRNA 及び蛋白レベルで発現していることが示された (Penton ら, 2012)。

発現細胞系において TASK1 と TASK3 が heteromer を形成することが示されたことにより (Kang ら, 2004), 球状層細胞でも TASK1 が蛋白レベルで発現しているならば, TASK1 と TASK3 は heteromer として存在する可能性がある (Bandulik ら, 2015)。しかし, 副腎髄質細胞の不死化細胞である PC12 細胞においては, TASK1 と TASK3 は細胞膜の異なる領域に局在して, heteromer を形成していなかった (Matsuoka *et al.*, 2013)。このため, 球状層細胞の TASK チャンネルの分子実体は十分には解明されていない。

さらに, AngII による TASK チャンネル抑制の分子機序も解明されていない。TASK チャンネルの抑制を引き起こす受容体は, PTX 非感受性 G 蛋白と連動していることは種々の細胞において共通しているが, シグナル伝達に関しては一致していない。これまで, G 蛋白サブユニットの α_q が直接結合することによる抑制 (Chen ら, 2006), そして 2nd メッセンジャーの diacylglycerol による抑制 (Wilke ら, 2014) が提唱された。著者らは, 副腎髄質細胞及び PC12 細胞において, 神経成長因子 (NGF) は phospholipase C (PLC) 及び PI 3-kinase を介して TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスを秒単位で誘発することを報告した (Matsuoka *et al.*, 2013 & 2015)。さらに, PTX 非感受性 G 蛋白と連動している M1 ムスカリン受容体の刺激も, PLC を介して TASK1 チャンネルのエンドサイトーシスを促進した。PLC を介したエンドサイトーシスは, TASK1 チャンネルの di-leucine モチーフに AP-2 が結合することにより, 誘発される。この di-leucine モチーフは, TASK3 チャンネルには存在しない。もし, TASK1 と TASK3 が heteromer を形成しているのであれば, TASK3 は TASK1 とともに細胞内に取り込まれる可能性がある。そこで, 本研究では, マウス副腎皮質細胞およびヒト副腎皮質細胞由来の不死化細胞である H295R 細胞において, AngII 刺激により抑制される K チャンネルの分子実体, 及び抑制の分子機序を, 免疫細胞化学法及び細胞生物学的手法を用いて明らかにする。これらの解明は, K イオンのホメオスターシス機構の理解にとって不可欠である。

2. 方法

2.1 副腎皮質細胞の免疫細胞化学

TASK1 と TASK3 チャンネルのマウス副腎皮質細胞での

発現の有無を, 免疫細胞化学的に調べる。まず, 抗 TASK1 抗体と抗 TASK3 抗体の免疫活性を, GFP (green fluorescent protein)-TASK1 および GFP-TASK3 を PC12 細胞に強制発現させて検討する。PC12 細胞を, 10% FBS を加えた Dulbecco's modified Eagle's 液中で培養する。LipofectAMINE2000 試薬を用いてプラスミドを細胞に取り込ませて, GFP-TASK1 または GFP-TASK3 を発現させる。トランフェクション後 1 日培養した後, 4%パラホルムアルデヒドで細胞を 30 分固定する。PBS 液で洗浄後, 固定細胞を 0.3% triton-X 100 で処理して, 細胞膜を穿孔する。抗 TASK1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社), または抗 TASK3 抗体 (Alomone 社) で 1 日処理した後, Alexa546 結合二次抗体で処理する。蛍光像は共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて取得する。GFP の蛍光は, 励起波長として 488 nm レーザー光, エミッションフィルターとして 510-560 nm フィルターを用いる。Alexa 546 蛍光は, 励起光として 546 nm レーザー光, エミッションフィルターとして 560 nm long pass フィルターを用いる。GFP 蛍光を有する細胞に, TASK 様免疫蛍光が発現しているかを観察し, それぞれの抗体の特異性を検討する。

特異性が明らかになった抗体を用いて, マウス副腎皮質細胞における TASK1 または TASK3 チャンネルの発現の有無を免疫細胞化学的に検討する。野生型, TASK1 ノックアウト (KO), TASK3KO マウスを頸椎脱臼させた後, 実体顕微鏡下で, マウス副腎から髄質を取り除き, 副腎皮質を得る。副腎皮質切片をコラゲナーゼ含有 Ca 欠如液中で 30 分間振とうさせる。この酵素処理副腎皮質標本を glass-bottomed dish 上に載せ, 注射針を用いて細胞を機械的に分離する。30 分静置した後, 4%パラホルムアルデヒドで固定する。副腎皮質細胞におこる TASK1, TASK3 の発現の有無および細胞内局在を, 免疫細胞化学的に共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて検討する。

2.2 細胞生物学的解析

ヒト副腎皮質由来の cell line である H295R 細胞に, GFP-TASK1, または GFP-TASK3 を, Lipofect AMINE2000 試薬を用いて強制発現させて 1 日培養する。1 μ M AngII を 30 秒投与し, 細胞刺激を行う。AngII 刺激細胞, および非刺激細胞を, 4%パラホルムアルデヒドで固定した後, triton-X 100 処理により細胞膜を穿孔する。TASK1, TASK3 の細胞内局在が AngII 刺激により変化する

るかを、GFP 蛍光を、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察することにより検討する。

3. 結果

3.1 抗 TASK1 抗体、および抗 TASK3 抗体の選択性

免疫細胞化学法における抗体の免疫活性を調べるために、PC12 細胞に GFP-TASK1、または GFP-TASK3 蛋白を、プラスミドを用いて発現させて検討した。プラスミドを transfection 後 1 日培養した後固定し、抗 TASK1 抗体、または抗 TASK3 抗体で処理後、GFP を FITC 様蛍光、そして TASK1 様または TASK3 様免疫反応物を rhodamine 様蛍光で観察した。TASK1 様免疫反応物由来の蛍光は、GFP-TASK1 を発現した細胞のみに観察された。さらに、overlay 画像において、TASK1 様免疫反応物由来の rhodamine 蛍光と GFP 由来の FITC 蛍光はほとんど重なった。同様な結果は、GFP-TASK3 を発現した細胞においても観察された。TASK3 様免疫反応物由来の蛍光は、GFP-TASK3 を発現した細胞のみで観察された。これらの結果より、免疫細胞化学的実験において抗 TASK1 抗体および抗 TASK3 抗体の免疫活性は、かなり特異的であることが明らかになった。

3.2 単離マウス副腎皮質細胞における TASK1 と TASK3 の発現

副腎皮質細胞における TASK1 と TASK3 の発現の有無、および細胞内局在を免疫細胞化学的に検討した。TASK1 様免疫反応物はおもに細胞内に局在していた。免疫染色像を微分干渉 (DIC) 像に重ね合わせると、TASK1 様免疫反応物は脂肪の貯蔵部位である脂肪滴 (DIC 像ではごつごつした小胞の塊として観察される) には局在していなかった。一方、TASK3 様免疫反応物は、TASK1 様免疫反応物とは異なり、おもに細胞辺縁、たぶん細胞膜に局在した。

3.3 H295R 細胞における発現

TASK1 様免疫反応物と TASK3 免疫反応物が細胞の異なる部位に局在するという観察結果は、予想外であった。そこで、TASK1 と TASK3 の細胞内局在を、ヒト副腎皮質細胞由来の不死化細胞である H295R 細胞を用いてさらに検討した。細胞に GFP-TASK1 を強制発現させると、融合蛋白は細胞辺縁と細胞質に分布したが、その大部分は細胞質に局在した。一方、GFP-TASK3 を発現させると、

その大部分は細胞辺縁に局在した。

3.4 AngII の作用の免疫細胞化学的解析

H295R 細胞は AngII 受容体タイプ 1 を発現している。そこで、GFP-TASK1 を発現させた H295R 細胞を、1 μ M AngII で 30 秒間刺激した。刺激なし細胞ではわずかに細胞辺縁に局在している GFP-TASK1 が、刺激後は全くなくなった。この結果は、AngII 刺激により TASK1 が細胞内にエンドサイトーシスされたことを示唆する。同様に、GFP-TASK3 を発現させた細胞を AngII で刺激すると、GFP 蛍光の大部分は細胞内に局在した。この結果は、H295R 細胞においては GFP-TASK3 も AngII 刺激により細胞膜から細胞内に移行する可能性があることを示唆する。

4. 考察

Davies ら (2008) は、マウス副腎において *in situ* hybridization 法を用いて TASK3 の mRNA が副腎皮質の球状層と副腎髄質において発現していること、TASK1 の mRNA は副腎皮質の球状層から網状束状層にわたる皮質全層において強く発現していることを報告した。一方、Penton ら (2012) は、マウスの副腎皮質において TASK3 様免疫反応物が、メスでは主に球状層に観察されるのに対して、オスでは球状層から束状層までの広範囲の副腎皮質に観察されると報告した。このオスの TASK3 様免疫反応物の分布は、去勢することにより、メス型に変化し、この変化はテストステロンの投与により元に戻った。これらのことにより、テストステロンは副腎皮質での TASK3 チャネルの発現を増加させると考えられる。今回の実験では、オスのマウスの副腎皮質において球状層細胞だけを取り出すことが困難であった。このため、染色に用いた細胞の大部分は、束状層由来と考えられる。このオス副腎皮質細胞において、TASK1 様免疫反応物はおもに細胞質に局在していた。同様の局在は、H295R 細胞に GFP-TASK1 を強制発現させても観察された。このため、細胞質の TASK1 様免疫反応物は TASK1 由来であると考えられる。この結果は、ラット副腎髄質細胞の TASK1 蛋白の局在と異なる。副腎髄質細胞の内因性 TASK1、そして PC12 細胞に強制発現させた GFP-TASK1 は細胞膜に局在した。この髄質細胞と皮質細胞の違いは、副腎皮質細胞では TASK1 が小胞体で翻訳された後、ゴルジ複合体を經由して細胞膜

に膜輸送される過程が、何らかの原因で障害されている可能性があることを示唆する。一方、TASK3 様免疫反応物はおもにマウス副腎皮質細胞において細胞辺縁に局在した。H295R 細胞に強制発現させた GFP-TASK3 もおもに細胞辺縁に分布したことより、副腎皮質細胞において TASK3 の分布は、細胞膜またはその近傍に局在すると考えられる。

今回の TASK3 がおもに細胞膜またはその近傍、そして TASK1 がおもに細胞質に局在するという結論は、TASK チャンネルのノックアウトマウスの機能解析結果とも一致する。TASK3 遺伝子のノックアウトは、副腎皮質細胞の静止膜電位を著明に脱分極させたが (Penton ら, 2012), TASK1 遺伝子のノックアウトでは静止膜電位への影響はわずかであった (Heitzmann ら, 2008)。さらに、TASK3 遺伝子の欠損は、副腎皮質細胞における AngII により誘発される細胞内 Ca 濃度上昇、そして AngII による電流減少を著明に抑制した。mRNA レベルでの TASK1 チャンネルの発現は明らかなのに、機能解析では遺伝子欠損の影響がほとんど見られないという一見矛盾するこれまでの結果は、TASK1 チャンネルのおもな局在部位が細胞質であることよりうまく説明出来る。

AngII は副腎皮質細胞において TASK チャンネルを抑制して、膜電位を脱分極させる。H295R 細胞に発現させた GFP-TASK1 および GFP-TASK3 の細胞辺縁の局在も、AngII 刺激により減少した。この結果は、副腎皮質細胞においても、AngII により TASK1 および TASK3 がエンドサイトーシスにより細胞膜上でのチャンネル活性が減少することにより、膜電位の脱分極が起こる可能性があることを示唆する。TASK3 の C 末端にはエンドサイトーシスに関与する di-leucine モチーフがない。TASK3 が受容体刺激によりエンドサイトーシスされるということは、副腎皮質細胞においては別のエンドサイトーシスのモチーフが関与した可能性、それとも TASK3 の一部は TASK1 と heteromer を形成する結果、TASK1 の di-leucine モチーフを介してこの heteromer チャンネルがエンドサイトーシスされるようになった可能性が考えられる。

5. 文 献

Bandulik S, Tauber P, Lalli E, Barhanin J, Warth R:

Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *Pflugers Arch* 467: 1027-1042, 2015

Chen X, Talley EM, Patel N, Gomis A, McIntire WE, Dong B, Viana F, Garrison JC, Bayliss DA: Inhibition of a background potassium channel by Gq protein α -subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3422-3427, 2006

Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ: TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2203-2208, 2008

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, Wakil AE, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, Barhanin J: Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J* 27: 179-187, 2008

Kang D, Han J, Talley EM, Bayliss DA, Kim D: Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells. *J Physiol* 554: 64-77, 2004

Matsuoka H, Harada K, Nakamura J, Inoue M: Nerve growth factor-induced endocytosis of TWIK-related acid-sensitive K⁺ 1 channels in adrenal medullary cells and PC12 cells. *Pflugers Arch* 465: 1051-1064, 2013

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* 309: C251-C263, 2015

Penton D, Bandulik S, SCHEDA F, Haubs S, Tauber P, Reichold M, Cong LD, Wakil AE, Budde T, Lesage F, Lalli E, Zennaro M-C, Warth R, Barhanin J: Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. *Endocrinology* 153: 4740-4748, 2012

Wilke BU, Lindner M, Greifenberg L, Albus A, Kronimus Y, Bunemann M, Leitner MG, Oliver D: Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun* doi: 10.1038/ncomms6540, 2014

Suppression of TASK Channels in Adrenal Cortical Cells by Angiotensin II

Masumi INOUE¹, Hidetada MATSUOKA¹, Keita HARADA¹, Akira SUGAWARA²

¹University of Occupational and Environmental Health, ²Tohoku University

Summary

Angiotensin II (AngII) induces aldosterone secretion through inhibiting K⁺ channels in zona glomerulosa (ZG) cells. TASK1 and TASK3 channels in adrenal cortical (AC) cells including ZG have been detected at the mRNA, but not protein, levels. In addition, molecular mechanisms for AngII-induced inhibition of TASK channels remain an open question. We have reported that TASK1 channels in adrenal medullary cells and PC12 cells are internalized in the order of seconds in response to nerve growth factor (NGF). This internalization was triggered by AP-2 binding to a di-leucine motif present in the TASK1 channel. TASK3 channels were not internalized in response to NGF because of the lack of the di-leucine motif. If TASK3 forms a heteromer with TASK1 in AC cells, TASK3 is expected to be internalized with TASK1 in response to AngII. The present experiment was aimed to elucidate whether TASK channels are expressed in AC cells at the protein levels and how the intracellular distribution of TASK channels are affected by AngII. For these issues mouse AC cells and the human AC cell line H295R were used. Isolated AC cells were obtained with collagenase treatment of mouse adrenal cortical tissues. TASK1-like immunoreactive material (IR) in AC cells was mainly located in the cytoplasm and minimally at the cell periphery, whereas TASK3-like IR was predominantly at the cell periphery. The majority of TASK1- or TASK3-like IR was abolished by deletion of each gene. Consistent with the distribution of endogenous TASK channels, GFP-TASK1 and GFP-TASK3 channels exogenously expressed in H295R cells were present mainly in the cytoplasm and at the cell periphery, respectively. When H295R cells were stimulated by AngII, practically no GFP-TASK1 was detected at the cell periphery and GFP-TASK3 was trafficked to the cytoplasm from the cell periphery. The trafficking of GFP-TASK3 in H295R cells could be accounted for by heteromer formation of exogenous TASK3 with endogenous TASK1. The present results indicated that TASK1 and TASK3 channels in AC cells are mainly present in the cytoplasm and at the cell periphery, respectively. TASK1 channels at the cell periphery were internalized in response to AngII. In addition, part of TASK3 channels at the cell periphery were also internalized in response to AngII, raising the possibility that TASK3 makes a heteromer channel with TASK1.