

## 横隔神経運動ニューロンにおける TASK-1 チャネルの発現

桑名俊一 <sup>[1]</sup>	植草学園大学保健医療学部
原田尚子 <sup>[2]</sup>	慶應義塾大学医学部
角友起 <sup>[3]</sup>	植草学園大学保健医療学部
齋藤基一郎 <sup>[4]</sup>	植草学園大学保健医療学部
小池和子 <sup>[5]</sup>	植草学園大学保健医療学部
本田岳夫 <sup>[6]</sup>	慶應義塾大学医学部
仲嶋一範 <sup>[7]</sup>	慶應義塾大学医学部

### Immunohistochemical observation of TASK-1 channels in the phrenic motoneurons of the rat

Shun-ichi KUWANA	Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University
Naoko HARADA	School of Medicine, Keio Gijyuku University
Yuki KAKU	Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University
Kiichiro SAITO	Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University
Kazuko A. KOIKE	Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University
Takao HONDA	School of Medicine, Keio Gijyuku University
Kazunori NAKAJIMA	School of Medicine, Keio Gijyuku University

我々は、これまでに吸入麻酔薬セボフルランがラット脊髄の横隔神経運動ニューロンに作用し呼吸抑制を

- 
- [1] 著者連絡先：桑名俊一  
[2] 原田尚子  
[3] 角友起  
[4] 齋藤基一郎  
[5] 小池和子  
[6] 本田岳夫  
[7] 仲嶋一範

引き起こすことを明らかにしている。この呼吸抑制作用については、2回膜貫通型酸感受性  $K^+$ チャネル (TASK: Two pore domain acid-sensitive  $K^+$  channel) のサブタイプである TASK-1 チャネルの関与が示唆されている。本研究では、横隔神経運動ニューロンにおける TASK-1 チャネルの発現を免疫組織化学的に検討した。新生ラットの単離脳幹脊髄標本を用い、電気生理学的に横隔神経運動ニューロンの記録を行った。記録ニューロンを組織化学的に同定するために記録電極に Lucifer Yellow を混合しておいた。標本を固定した後、脊髄 C3~C4 レベルで厚さ  $40\mu\text{m}$  の切片を作成し、免疫組織化学的に TASK-1 チャネルを染色した。これにより、Lucifer Yellow の蛍光を発するニューロンが横隔神経運動ニューロンとして同定でき、そこに TASK-1 チャネルの発現とその存在が確認された。このことから、吸入麻酔薬セボフルランの脊髄を介する呼吸抑制は、横隔神経運動ニューロンの TASK-1 チャネルの活性化によって惹起されるものと考えられる。

キーワード：TASK-1 チャネル、横隔神経運動ニューロン、免疫組織化学、新生ラット、脊髄

Sevoflurane-induced respiratory depression has been reported to be due to the action on phrenic motor neurons. Two pore domain acid-sensitive  $K^+$  -1 (TASK-1) channels, which have sensitivity to sevoflurane, have been reported to be densely expressed in the spinal cord. We examined whether the TASK-1 channels in phrenic motor neurons were stained by immunohistochemical technique or not. Activity of the phrenic motor neuron was recorded by whole cell patch clamp technique in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rats. The electrode solution contained with Lucifer Yellow. After fixation of the preparation, the spinal-cord was cross-sectioned into a  $40\mu\text{m}$  thick slice. The TASK-1 channels of the slice were stained by immunohistochemical technique. The TASK-1 channels were expressed in the motor neurons of the ventral horn of the spinal cord. The phrenic motor neuron which presented the fluorescence of Lucifer Yellow also expressed the TASK-1 channels. Considering the data and our previous study, it seems that activation of TASK-1 channel in phrenic motor neurons by sevoflurane may induce an increase in  $K^+$  conductance (i.e.,  $K^+$  leakage), resulting in respiratory depression.

**Keywords** : Two pore domain acid-sensitive  $K^+$  -1 channel , Phrenic motor neuron, Immunohistochemistry, Respiratory depression, Isolated brainstem-spinal cord

## 1. はじめに

最近の分子生物学的構造解析や遺伝子解析から  $K^+$ チャネルは 100 以上もの種類に上ることが明らかとなっている。これらを大きく分けるとサブユニットの膜貫通 (pore) が 1 回あるいは 2 回リピート型に分類される。一回貫通型には膜電位感受性  $K^+$  ( $K_v$ ) チャネルや内向き整流性  $K^+$  ( $K_{ir}$ ) チャネルがあり、興奮性膜において静止膜電位を維持する上で重要な働きをしている。2 回リピート型 (Two pore domain  $K^+$  channel;  $K_{2p}$  channel) は、サブユニットタンパクが 6 回膜貫通するものと 4 回膜貫通するものに分類されている。 $K_{2p}$  channel にも大きなファミリーがあるが、その機能的役割については十

分に解明されていない<sup>1,2)</sup>。

我々は新生ラットの脳幹・脊髄標本を用い、吸入麻酔薬セボフルランが横隔神経運動ニューロンの膜電位を過分極させることを明らかにした<sup>3)</sup>。Smith らは、セボフルランが舌下神経運動ニューロンの  $K_{2p}$  チャネル、特に TASK (Two pore domain acid-sensitive  $K^+$ ) チャネルのサブタイプである TASK-1 チャネルを活性化して外向きの電流を増加させることを報告している<sup>4)</sup>。このことから、セボフルランによる横隔神経運動ニューロン過分極はセボフルランが TASK-1 チャネルを活性化して細胞内の  $K^+$  を流出させることによるものと思われた<sup>5)</sup>。

以上より、本研究では、セボフルランの呼吸抑制が TASK -1 チャネルを介することを明らかにする

ため、新生ラット単離脳幹脊髓標本を用いて横隔神経運動ニューロンにおける TASK-1 チャンネルを免疫組織化学的に染色し、その存在を同定することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 横隔神経運動ニューロンの同定

新生ラット (0～4 日齢) をエーテル深麻酔下で下部脳幹・脊髓を摘出した。摘出脳幹脊髓標本は酸素化した人工脳脊髄液 (ACSF, pH 7.4) で灌流維持した。図 1 に示すように標本を第 4 頸髄 (C4) レベルで切断し、切断面が灌流液面の直下で水平になるように壁面を利用して腹側を上に向けて曲げて、延髄部分をメッシュで固定した。呼吸性の神経活動を横隔神経を含む第 4 頸髄前根 (C4) から記録した。頸髄切断面の前角に微小電極を挿入し、C4 と同期して発火するニューロンに対してホールセルパッチクランプ法を用いて細胞内記録した<sup>6)</sup>。微小電極の電極液に蛍光色素、Lucifer Yellow を入れておくことで、組織切片標本上で記録したニューロンを標識した。

### 2.2 TASK-1チャンネルの免疫組織学的染色

Lucifer Yellow で標識した脳幹-脊髓標本を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で 2～8 時間固定した。ついで、30% sucrose/0.1M 中性リン酸緩衝液 (PBS) で置換した後、OCT で包埋し、クリオスタットで 40 $\mu$ m の厚さで薄切し、凍結切片を作製した。この時、蛍光顕微鏡を用いて Lucifer Yellow で標識された部位を確認し、標識が確認できたスライスを中心に免疫組織化学的反応による染色を行った。一次抗体にウサギ抗 TASK-1 抗体 (Alomone社 1:200) を反応させた後、PBS 洗浄後二次抗体として抗ウサギ IgG-biotinylated 抗体 (1:200) を反応させた。さらに strepto-avidin-TRITC (1:50) を反応させた。Laser Scanning Microscope (オリンパス社製, Fluoview300) を用いて、Lucifer Yellow および TRITC の蛍光を確認し同定した後に写真撮影した。

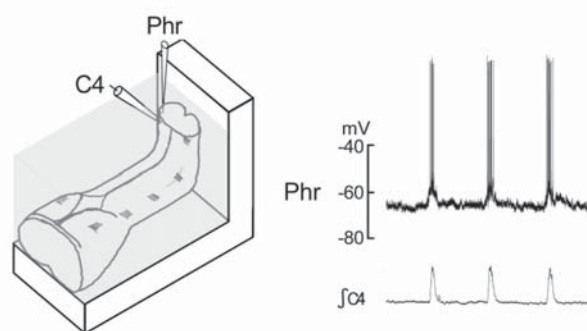


図 1. 単離脳幹脊髓標本からの横隔神経運動ニューロンの記録法。左図：標本と電極の配置。右図：横隔神経運動ニューロン (Phr) のホールセル記録。  
Jc4, 第 4 頸神経の呼吸性活動の積分値。

## 3. 結果

図 1 の右パネルは、ホールセルパッチクランプ法によって記録された横隔神経運動ニューロンの細胞内記録である。横隔神経を含む C4 前根神経の活動 (Jc4) に同期して、横隔神経運動ニューロン (Phr) が脱分極し発火していることが分かる。ニューロンの記録電極内液に Lucifer Yellow を入れておくことで、記録したニューロンが標識される。

図 2 は C3～C4 レベル脊髓前角の横断切片組織像である。Lucifer Yellow で標識された横隔神経運動ニューロンは緑の蛍光を発していた (図 2 上左)。この切片の TASK-1 をさらに TRITC で染色すると、赤紫色に蛍光を発するニューロンが観察された (図 2 上中)。このことから、多くの脊髓前角細胞に、TASK-1 チャンネルが存在していることが判明した。

Lucifer Yellow 像と TASK-1 チャンネル像を重ね合わせると、Lucifer Yellow で標識されたニューロンと TASK-1 チャンネルニューロンとが一致していることが分かる (図 2 上右)。図 2 の下図は、同じ標本に TASK-1 ペプチドを反応させたものである。赤紫の蛍光が大きく低下することから、上図の反応が TASK-1 に対して特異的であることを示している。

本研究では 3 例の横隔神経運動ニューロンを記録したが、そのすべてに TASK-1 チャンネルの発現と存在を確認することができた。

#### 4. 考察

本研究では、横隔神経運動ニューロンに TASK-1 チャネルが発現していることを免疫組織化学的に明らかにした。これにより、吸入麻酔薬による呼吸抑制の原因として、TASK-1 チャネルの活性化が強く示唆された。

中枢において TASK-1 チャネルは延髄の舌下神経核ニューロン<sup>4)</sup>、顔面神経運動核ニューロン<sup>7)</sup>や脊髄の運動ニューロン<sup>8)</sup>に発現していることが報告されている。本研究においても、脊髄前角の細胞体の大きなニューロンに TASK-1 チャネルの存在が確認された(図2)。

セボフルランに代表される吸入麻酔薬の作用機序については未だ明らかになっていない。我々は新生ラットの脳幹・脊髄標本を用い、セボフルランを脊髄のみに作用させたときには一回換気量の指標とされる第4頸髄前根(C4)神経活動の積分振幅が

減少すること、延髄にのみ作用させたときには呼吸数は減少するが、この振幅が減少しないことを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、脊髄におけるC4活動の減少は、セボフルランにより横隔神経運動ニューロンの膜電位が過分極することを明らかにしている。

セボフルランが GABA<sub>A</sub> リセプターの活性化を介し麻酔作用を引き起こすことが示唆されている。我々は、セボフルランによる呼吸数の減少が GABA<sub>A</sub> リセプター拮抗剤ピククリンの投与で回復することを明らかにしている。これは、延髄の呼吸抑制に関しては GABA<sub>A</sub> リセプターが関与していることを示している。しかしながら、脊髄での横隔神経運動ニューロンのセボフルランによる過分極はピククリンによって回復しないことも示している。したがって、脊髄の横隔神経運動ニューロンに対するセボフルランの抑制効果は GABA<sub>A</sub> リセプター以外の機序によって惹起されることが示唆された。すな

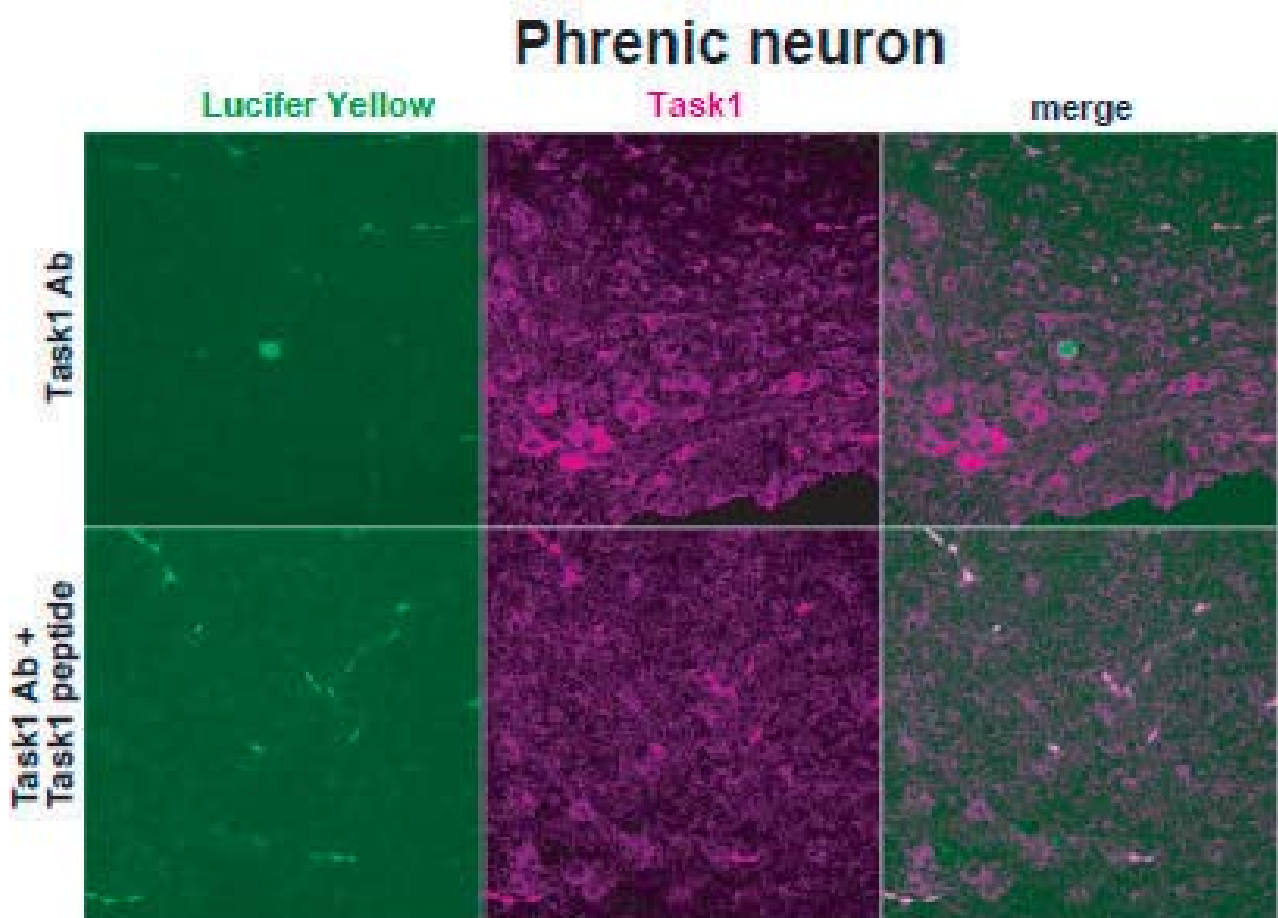


図2. Lucifer Yellow による横隔神経運動ニューロンの同定(上左)と TASK-1 チャネルの免疫組織化学的染色(上中)。Lucifer Yellow 蛍光細胞と TASK-1 チャネル蛍光細胞が重なっていることが分かる(上右)。下段は、TASK-1 ペプチドを反応させることによるネガティブコントロール。

わち、本研究の結果から、吸入麻酔薬による脊髄を介する呼吸抑制の原因として、TASK-1 チャンネルの活性化が強く示唆された。

吸入麻酔薬ハロセンが TASK-1 チャンネルを活性化することは良く知られており、その活性化は  $K^+$  イオンの流出を増加させる<sup>9)</sup>。その結果、静止膜電位が深くなり、神経の興奮性が低下する。セボフルランの呼吸抑制も横隔神経運動ニューロンの TASK-1 チャンネルを介して興奮性を低下させると思われた。

TASK-1 チャンネルは、細胞外液の酸性化で抑制されることが報告されている<sup>10, 11)</sup>。今後は、横隔神経運動ニューロンに対して電気生理学実験を行い、 $K$  電流に対するセボフルランおよび細胞外液 pH の影響を検討する必要がある。

## 5. 倫理的配慮

実験動物の取り扱いに関しては、「生理学領域による動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会平成 15 年改訂)に従った。また、本研究は、植草学園大学保健医療学部動物実験委員会の承認 (URAC08-01) を得たものである。

## 6. 謝辞

本研究は、植草学園大学共同研究費 (平成 22～23 年度) の助成を得たものである。

## 7. 文献

- 1) Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-pore domain subunits *Nature Reviews Neuroscience* 2001 ; 2 : 175-184.
- 2) Bayliss DA, Sirois JE, Talley EM. The TASK family: two-pore domain background  $K^+$  channels. *Mol Interv.* 2003 Jun ; 3 (4) : 205-219.
- 3) Kuribayashi J, Sakuraba S, Kashiwagi M, Hatori E, Tsujita M, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana S. Neural mechanisms of sevoflurane-induced respiratory depression in newborn rats. *Anesthesiology.* 2008 ; 109 : 233-242.
- 4) Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1991 ; 254 (5032) : 726-729.
- 5) Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C 3rd, Bayliss DA. The TASK-1 two-pore domain  $K^+$  channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci.* 2000 ; 20 (17) : 6347-6354.
- 6) Kuwana S, Okada Y, Natsui T. Effects of extracellular calcium and magnesium on central respiratory control in the brainstem-spinal cord of neonatal rat. *Brain Res.* 1998 ; 786 : 194-204.
- 7) Larkman PM, Perkins EM. A TASK-like pH- and amine-sensitive 'leak'  $K^+$  conductance regulates neonatal rat facial motoneuron excitability in vitro. *Eur J Neurosci.* 2005 ; 21 : 679-691.
- 8) Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci.* 2001 ; 21 : 7491-7505.
- 9) Washburn CP, Sirois JE, Talley EM, Guyenet PG, Bayliss DA. Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive  $K^+$  conductance. *J Neurosci.* 2002 ; 22 (4) : 1256-1265.
- 10) Koizumi H, Smerin SE, Yamanishi T, Moorjani BR, Zhang R, Smith JC. TASK channels contribute to the  $K^+$ -dominated leak current regulating respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci.* 2010 ; 30 (12) : 4273-4284.
- 11) Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. TASK, a human background  $K^+$  channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 1997 ; 16 (17) : 5464-5471.