

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592797

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法を用いた咬筋運動ニューロン興奮性制御におけるTASKの役割の解析

研究課題名(英文) Roles of TASK channels in the modulation of jaw-closing motoneuron activity

研究代表者

齋藤 充 (Saito, Mitsuru)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：50347770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経閉口筋運動ニューロンでは、四肢・体幹筋同様サイズの原理に基づいた序列動員が行われるが、不均一なTASK1/1及びTASK3/3チャネル分布により、細胞体径の分布幅に見合う範囲を上回って入力抵抗値は広範な分布を示した。この特徴が、伸張反射回路を介する筋紡錘感覚入力により精緻な張力調節を実現する最も基礎的な機構となっていることが考えられた。また、一酸化窒素作動性入力の活性化により、同ニューロンの動員様式が変調を受ける可能性が示された。これらの所見から、閉口筋の運動制御に関わる脳幹の神経回路は、四肢・体幹筋の制御に関わる脊髄レベルの神経回路とは根本的に異なる特徴を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The mastication of foods occurs during the slow-closing phase of the mastication cycle, in which isometric contraction of jaw-closing muscles is developed through the rank-ordered recruitment of jaw-closing motoneurons (MNs). However, its molecular mechanism remains unknown. Here we show that TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel-1 (TASK1) and TASK3 channels, which determine the input resistance and resting membrane potential, are differentially expressed between small and large MNs and play critical roles in the rank-ordered recruitment of jaw-closing MNs. The principle of the rank-ordered recruitment was originally proposed based on the conduction velocity of the motor nerve fibers innervating a set of muscle fibers. After a half-century, we for the first time disclosed the molecular mechanism for the rank-ordered recruitment of jaw-closing MNs.

研究分野：神経生理学

キーワード：口腔生理学 咬合 閉口筋 運動単位 序列動員 張力調節 TASKチャネル 三叉神経

1. 研究開始当初の背景

筋の活動張力は運動ニューロンが錘外筋を駆動することによって生み出される。1個の運動ニューロンとそれによって支配される筋線維を合わせて運動単位と呼ぶ。運動単位を構成する運動ニューロンの細胞体径・同軸索径と神経筋支配比(1個の運動ニューロンが支配している筋線維の数)・筋線維径・最大発揮張力の間には正の相関が認められる。そして、少なくとも四肢筋・体幹筋の等尺性収縮において筋全体の発揮張力を増して行く際には、伸張反射回路を介して、小さい運動単位から大きな運動単位へと序列的に動員されることが知られている(サイズの原理)。

咀嚼サイクルは大別して開口相・速い閉口相・遅い閉口相(咬合相)の3つから構成されている。遅い閉口相(咬合相)において食物の噛み締めが行われるが、この相は上下顎間距離が大きく変化しないため、ほぼ閉口筋等尺性収縮運動と見なすことができる。この時、閉口筋においても四肢筋・体幹筋に準じた運動単位の序列動員が行われていると考えられるが、閉口筋の伸張反射回路は四肢筋・体幹筋と異なる特徴を持っており、また食物の硬さに応じた非常に精緻な筋張力(咬合力)調節が可能であることが知られていることから、閉口筋に特異的な動員神経機構が存在する可能性も高い。

運動単位の動員の序列は運動ニューロンの入力抵抗に依存していると考えられている。入力抵抗は漏洩カリウム電流によって支配的に決定されており、ニューロンにおける漏洩カリウム電流は膜蛋白 TASK1 及び TASK3 の二量体(TASK1/1・TASK3/3・TASK1/1)であるチャネル(以下 TASK チャネル)によって担われていることが近年判明した。閉口筋運動ニューロンが位置する三叉神経運動核には TASK1 及び TASK3 遺伝子が豊富に発現していることが知られている。

2. 研究の目的

本研究は、精緻な咬合力調節を実現している最も基礎的な神経基盤と考えられる閉口筋運動ニューロンの動員機構について、四肢筋・体幹筋と同様な序列動員が生じるか否か、生じるならばどのような神経機構で実現されているのか、序列動員を調節し得る機構は何か、について *in vitro* の実験系で明らかにすることを目的とする。

その際、閉口筋運動ニューロンに対する筋紡錘感覚情報の入力をミミックする方法として、閉口筋筋紡錘情報の伝導伝達を担う三叉神経中脳路核ニューロンの軸索に対する電気刺激(従来法)に加え、同ニューロンの軸索に光刺激によって駆動されるチャンネルロドプシン2を発現させた動物を作製し、その動物から抽出した試料を用いる方法の実現を目指す。この方法は、当該の軸索のみを選択的に刺激できる利点があり、実験精度の

向上に大きく寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

- ・レーザーディセクション法による運動ニューロン細胞体の切り出しと定量的 RT-PCR 法による TASK 遺伝子の発現レベル解析：15~17日齢の両性ウイスターラットの脳幹を固定し、三叉神経運動核を含む厚さ20 μm のスライスを作製した。ここからレーザーを使って運動ニューロンの細胞体を切り出し、定量的 RT-PCR によって GAPDH(参照)、TASK1、TASK3 の mRNA レベルを調べた。
- ・免疫組織化学的手法による TASK1、TASK3 蛋白の発現様式の解析：三叉神経運動核を含む厚さ40 μm のスライスを作製した。抗 TASK1 抗体について、市販品は特異性が低い等の問題があったため、金子武嗣教授(京都大・院医・高次脳形態)の協力を受け、新規抗体を開発した。
- ・閉口筋運動ニューロンに対する筋紡錘感覚情報入力のみミミック：三叉神経運動核に対し背内側から進入する三叉神経中脳路核ニューロン軸索中枢枝の線維束にタングステン微小電極を刺入し、微小電気刺激を行う(従来法)。また、同ニューロンにチャンネルロドプシン2を発現する遺伝子組換え動物の作製を試みる。
- ・ホールセルパッチクランプ法による単一細胞/二細胞同時記録：7~14日齢ウイスターラットの脳幹から厚さ250~300 μm の前額断新鮮スライス標本作製し、赤外線微分干渉顕微鏡観察下で、閉口筋運動ニューロンから全細胞パッチクランプ記録を行った。
- ・膜電位感受性色素イメージング法：新鮮スライス標本に膜電位感受性色素200 μM RH414 を負荷し、専用のイメージングシステム(RedShirtImaging社製 NeuroCCD-SM)を用いてニューロン群の興奮様式を解析した。
- ・アフリカツメガエル卵母細胞発現系における TASK1/1、TASK3/3 チャネル電流の解析：二電極電位固定記録法を用いた。本実験の実施には倉智嘉久教授及び古谷和春講師(大阪大・院医・分子細胞薬理)の協力を得た。

4. 研究成果

(1) 三叉神経運動ニューロンを小型(細胞径15~20 μm)と大型(同35 μm 以上)の二群に分け TASK1 及び TASK3 mRNA 量の発現レベルについて解析したところ、TASK1 mRNA は大型細胞が小型細胞の約2.1倍、TASK3 mRNA は約20倍のレベルで発現していた。このことから、大型の三叉神経運動ニューロン程、多くの TASK1 と TASK3 を発現しており、入力抵抗は低いことが示唆された。

(2) 三叉神経運動核内のニューロンを抗 ChAT(コリンアセチルトランスフェラーゼ；

運動ニューロンのマーカー)抗体及び抗 TASK1 抗体(新規開発)或いは抗 TASK3 抗体に作用させた後、更に蛍光標識された二次抗体を作用させて、蛍光二重染色を行った。その結果、TASK1 及び TASK3 蛋白はそれぞれ専ら細胞体部及び樹状突起部の膜に発現しており、相補的な分布を示した。このことから、TASK1/3 ヘテロ二量体チャネルはほとんど存在しないこと、TASK3/TASK1 比は樹状突起に乏しい小型ニューロンで小さく、豊富な樹状突起を有する大型ニューロンで大きいことが明らかとなった。このことから、従来の入力抵抗に関する想定「漏洩コンダクタンスは概ね膜面積に比例して増大する(入力抵抗は概ね膜面積に反比例して低下する)」が少なくとも閉口筋運動ニューロンには該当しないことが明らかとなった。

(3) パッチクランプ単一細胞記録の結果より、閉口筋運動ニューロンの細胞径と入力抵抗・静止膜電位・閾膜電位との間には負の相関があることが明らかとなった。また、大きさが異なる二個の細胞からのパッチクランプ同時記録の結果より、筋紡錘感覚入力をミミックした連続電気刺激によって、高い入力抵抗を持つ小型の細胞が、大型細胞に比べ、常により低閾値・低閾膜電位で活性化し、同一の刺激に対する発火タイミングは先行していた。これらのことから、閉口筋においてもサイズの原理に基づいた序列動員が行われている可能性が示された。

(4) 三叉神経運動核には脚橋被蓋核・背外側被蓋核・腹内側延髄網様体等から一酸化窒素作動性線維の入力を受けることが知られている。また、当研究室の先行研究から TASK1/1 チャネルが一酸化窒素 - 可溶性グアニリルシクラーゼ - cGMP - cGMP 依存性蛋白燐酸化酵素(PKG)系の活性化により上方制御されることが知られている。そこで、一酸化窒素を投与する代わりに、cGMP の可溶性アナログである 8-Br-cGMP を投与し、閉口筋運動ニューロンに対する影響を調べた。小型運動ニューロンでは予想通り入力抵抗が低下したが、大型ニューロンでは変化の方向が一定でなく平均として有意な変化は示さなかった。このことから、8-Br-cGMP は TASK3/3 チャネルを下方制御することが示唆された。

(5) 8-Br-cGMP の TASK1/1 及び TASK3/3 に対する抑制をアフリカツメガエル卵母細胞における発現系で検証した。既報の通り、8-Br-cGMP は TASK1/1 の pH - コンダクタンス関係曲線を酸性側にシフトさせることで上方制御したが、TASK3/3 に対しては、pH 非依存的にコンダクタンスを低下させる抑制様式をとることが示唆された。

(6) 膜電位感受性色素を負荷したスライスに対して、筋紡錘感覚入力をミミックした連続電気刺激を行うと、連続刺激の進行に従っ

て、三叉神経運動核背外側にある閉口筋領域の興奮レベルが徐々に上昇するのが観察された。これはホールセルパッチクランプ記録時にも見られた、興奮性シナプス後電位(EPSP)の時間的加重により、より多くの運動ニューロンが動員されたためであると考えられる。8-Br-cGMP を投与すると、投与前に比べ各回の刺激に対する興奮レベルがそれぞれ上昇していた。二細胞パッチクランプ同時記録では、8-Br-cGMP 投与により大小の細胞の発火タイミングの差が縮小する傾向が認められた。以上のことから、8-Br-cGMP によって細胞径に依存した動員の時間差が縮小し、より多くのニューロンが同期的に活動することが示唆された。

(7) 三叉神経中脳路核ニューロンの軸索に特異的にチャネルロドプシン 2 を発現する動物の作製は実現できなかった。今後、同ニューロンに特異的に発現する蛋白を数種選定し、それらの組み合わせに応じて同光感受性チャネルを発現させる方法を今後も継続して検討して行く予定である。

・総括: 三叉神経閉口筋運動ニューロンでは、四肢筋・体幹筋と同様にサイズの原理に基づいた序列動員が行われるが、不均一な TASK1/1 チャネル及び TASK3/3 チャネルの分布により、細胞体径の分布の幅に見合う範囲を上回って入力抵抗値は広範な分布を示した。この特徴が、伸張反射回路を介する筋紡錘感覚入力により精緻な張力調節を実現する最も基礎的な機構となっていることが考えられた。また、一酸化窒素作動性入力の活性化により、同ニューロンの動員様式が変調を受ける可能性が示された。

別の研究プロジェクトにおいて、及び運動ニューロンのマーカー(NeuN 及び Err3)を用いた免疫組織化学的解析の結果から、閉口筋運動ニューロンには、運動ニューロンと同程度の小型細胞が存在することが判明した。

これらの所見から、閉口筋の運動制御に関わる脳幹レベルの神経回路は、四肢筋・体幹筋の制御に関わる脊髄レベルの神経回路とは根本的に異なる特徴を複数有していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Chung G, Saito M, Kawasaki Y, Kawano T, Yin D, Lee S, Kogo M, Takada M, Bae YC, Kim JS, Oh SB, Kang Y. Generation of resonance-dependent oscillation by mGluR-I activation switches single spiking to bursting in mesencephalic trigeminal sensory neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 41(8): 998-1012, 2015.

DOI: 10.1111/ejn.12858 査読有り

Sato H, Kawano T, Saito M, Toyoda H, Maeda Y, Türker KS, Kang Y. Teeth

clenching reduces arm abduction force. *Experimental Brain Research*, 232(7): 2281–2291, 2014.

DOI: 10.1007/s00221-014-3919-8 査読有り
Saito M, Tanaka T, Sato H, Toyoda H, Aoyagi T, Kang Y. A mathematical model of negative covariability of inter-columnar excitatory synaptic actions caused by presynaptic inhibition. *The European Journal of Neuroscience*, 38(7): 2999–3007, 2013.

DOI: 10.1111/ejn.12299 査読有り
Sato H, Toyoda H, Saito M, Kobayashi M, Althof D, Kulik A, Kang Y. GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition reverses inter-columnar covariability of synaptic actions by intracortical axons in the rat barrel cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 37(2): 190–202, 2013.

DOI: 10.1111/ejn.12041 査読有り
Tsukiboshi T, Sato H, Tanaka Y, Saito M, Toyoda H, Morimoto T, Turker KS, Maeda Y, Kang Y. Illusion caused by vibration of muscle spindles reveals an involvement of muscle spindle inputs in regulating isometric contraction of masseter muscles. *Journal of Neurophysiology*, 108(9): 2524–2533, 2012.

DOI: 10.1152/jn.00997.2011 査読有り

[学会発表](計12件)

齋藤 充, 佐藤 元, 豊田 博紀, 河野 奨, 尹 東旭, 姜 英男. 三叉神経中脳路核ニューロンにおいて観察される h 電流による AMPA 受容体電流の抑制には棘様微絨毛内の Na⁺マイクロドメインが関与している. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市) 2015 年 9 月.
尹 東旭, 齋藤 充, 佐藤 元, 河野 奨, 豊田 博紀, 姜 英男. 青斑核ニューロンと三叉神経中脳路核ニューロン間のシナプス結合様式の解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市), 2015 年 9 月.

Kang Y, Chung G, Saito M, Takada M, Bae YC, Kim JS, Oh SB. Enhancement of I_{NaP}-mediated resonance by mGluR-I activation induces burst firing in mesencephalic trigeminal sensory neurons. *The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, Washington (USA), November, 2014.

西村 佳世, 磯貝 由佳子, 齋藤 充, 豊田 博紀, 佐藤 元, 河野 奨, 山城 隆, 姜 英男. 三叉神経運動核閉口筋領域内の運動ニューロンの電気生理学および組織学的特性. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2014 年 9 月.

齋藤 充, 佐藤 元, 豊田 博紀, 山城 隆, 姜 英男. シンポジウム「口腔機能に関与するイオンチャネル/ニューロン/神経回

路研究の最前線 第 2 部 顎運動制御・摂食調節」三叉神経運動ニューロンの序列表の基盤となるイオンチャネル機構. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2014 年 9 月.
田中 千恵, 齋藤 充, 豊田 博紀, 佐藤 元, 河野 奨, 姜 英男. 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. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2014 年 9 月.

Saito M, Tanaka C, Furutani K, Okazawa M, Toyoda H, Sato H, Kurachi Y, Kang Y. Modulation of TASK currents by the activity of cGMP-dependent protein kinase. *The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, Pacifico Yokohama (Yokohama), September, 2014.

Toyoda H, Hirao K, Emura N, Saito M, Sato H, Kawano T, Kang Y. Involvement of TASK channels in rank-ordered recruitment of masseter motoneurons. *The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society*, Pacifico Yokohama (Yokohama), September, 2014.

Saito M, Isogai-Morita Y, Emura N, Toyoda H, Sato H, Kang Y. Rank-ordered recruitment of jaw-closing α -motoneurons depending on the activities of TASK1 and TASK3 channels in the rat. *The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego (USA), November, 2013.

西村 佳世, 磯貝 由佳子, 齋藤 充, 佐藤 元, 豊田 博紀, 山城 隆, 姜 英男. 三叉神経運動核咬筋領域内の運動ニューロンの電気生理学および形態学的特性. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市), 2013 年 9 月.

田中 千恵, 齋藤 充, 佐藤 元, 豊田 博紀, 姜 英男. 閉口筋運動ニューロンに対する興奮性シナプス伝達のゲート機構に関与する TASK3 電流の発現系における解析. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市), 2013 年 9 月.

Saito M, Isogai-Morita Y, Emura N, Toyoda H, Sato H, Kang Y. Rank-ordered recruitment of jaw-closing α -motoneurons depending on the activities of TASK1/3 channels in the rat. *Neuro 2013*, Kyoto International Conference Center (Kyoto), June, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 充 (SAITO, Mitsuru)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師(～2015 年 9 月)

鹿児島大学・歯学部歯学系・教授(2015 年 10 月～)

研究者番号: 5 0 3 4 7 7 7 0