

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300127

研究課題名(和文) 運動ニューロン漏洩KチャネルのNOによる活性化と序列動員の修飾

研究課題名(英文) Modulation of rank-ordered recruitment of motor units in the jaw-closing movement by leak K⁺ channels

研究代表者

姜 英男 (Kang, Youngnam)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50177755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経運動核閉口筋支配領域の運動ニューロン(MN)では、TASK1及びTASK3がMNの細胞体と樹状突起にそれぞれ相補的に発現しており、TASK1の発現量は大型MNの方が大きいため、入力抵抗が小さく、静止膜電位もより過分極にあった。さらに、PKG活性化によりTASK1は増強されるがTASK3は抑圧された。PKG活性化による入力抵抗の減少及び静止膜電位の過分極化は小型MNほど顕著であった。また、MNの細胞径分布は二峰性を示し、小型MN群はMN群の細胞径分布とほぼ同じであった。こうした所見は閉口運動における運動単位の序列動員の分子細胞基盤を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：The immunohistochemical analysis of motoneurons (MNs) in the trigeminal motor nucleus that innervates jaw-closing muscles revealed that TASK1 and TASK3 are complementary expressed in the soma and dendrites of MNs, respectively. The real-time RT PCR revealed that large MNs (>35 microm) expressed more TASK1/cell and TASK3 compared to small MNs (<20 microm). Consequently, larger MNs had smaller input resistance (IR) and more hyperpolarized resting membrane potentials (RMP) compared to smaller MNs. PKG activation enhanced TASK1 activity while it inhibited TASK3 activity. As the MN size becomes smaller, PKG activation more decreased the IR and hyperpolarized the RMP. The frequency distribution of sizes of alpha-MNs was found to display a bimodal distribution composed of smaller and larger alpha-MNs while gamma-MNs displayed a unimodal pattern of smaller size. These findings provide crucial molecular and cellular bases of the rank-ordered recruitment of motor units in the jaw-closing movement.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：三叉神経運動ニューロン 漏洩Kチャネル NO 序列動員

1. 研究開始当初の背景

漏洩 K⁺電流は、ニューロンの入力抵抗を変化させることによりシナプス入力のインパクトをダイナミックに変動させることができ、更に、静止膜電位に大きな影響を与えると古くから考えられてきた(Goldman 1943)。しかしながら、そのイオンチャネルの分子の実態が初めて解明され(Lesage et al. 1997)、その多様性や機能の詳細が判明したのは、比較的最近のことである。多様な漏洩 K⁺チャネル・ファミリーのなかで、TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK)チャネルと呼ばれる TASK1 及び TASK3 が、呼吸(chemosensitivity)や血圧制御(carotid body)に関与するニューロンを含めて、様々な CNS ニューロンに広く発現していることが知られるようになった(Bayliss et al. 2003; Lesage 2003)。こうした TASK チャネルは、様々な神経修飾物質による代謝調節型受容体の活性化を経て抑制を受けることが既に知られているが、それを活性化する内因性神経修飾物質は明らかになっていない。唯一、ハロセンなどの全身麻酔薬により活性化されることが知られている(Patel et al. 1999; Sirois et al. 2000)。こうした中で、我々は、前脳基底部のアセチルコリン作動性ニューロンにおいては、内因性神経修飾物質である一酸化窒素(NO)による cGMP-PKG 経路の活性化により漏洩 K⁺チャネルが活性化されることを初めて明らかにし(図1、*J. Neurophysiol.* 2007 & 2008 業績 3,5)、さらに、HEK 細胞に発現させた TASK1 チャネルが NO により、活性化されることを初めて証明した(図 2-3、*J Neurosci.* 2010)。TASK1 や TASK3 チャネルは、舌下神経や三叉神経運動ニューロンに特に強く発現しており(図4、Talley et al. 2000 & 2001; Karschin et al. 2001)、TASK チャネル抑制についての先駆的な研究が舌下神経運動ニューロンにおいてなされてきた(Talley et al. 2000; Berg et al. 2004)。

しかしながら、TASK チャネルの機能的重要性は、Henneman により確立されたサイズの原理として知られている運動ニューロンの序列動員において、最もよく認めることができる(Henneman, 1985 & 1991)。筋の等尺性収縮運動時には、運動単位或いは運動ニューロンは、そのサイズの小さいものから順に活動に参加するとされており、運動ニューロンの入力抵抗の大きいものから順に動員されていくと理解されている。従って、TASK チャネ

ルの制御は、そうしたサイズの原理に従った運動ニューロンの序列動員或いはその修飾において極めて大きな役割を果たすと考えられる(図 5)。一方、脚橋被蓋核コリン作動性ニューロン等は、三叉神経運動ニューロンに NO 作動性入力を送ることも知られている(Pose et al. 2005; Travers et al. 2005)。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 等尺性収縮運動である噛みしめ運動を引き起こす三叉神経運動ニューロンにおける序列動員(Yemm 1977; Miles 1995)に TASK チャネルが如何に関与するか?、(2) NO は序列動員をどの様に修飾するか?、また、(3) 従来、漠然と想定されてきた、細胞のサイズと入力抵抗との関係が TASK チャネルの発現パターンにより説明可能か? を解明することを目的とした。

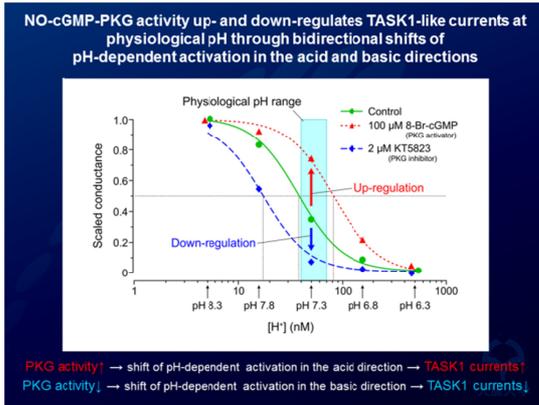
3. 研究の方法

- (1) TASK3 チャネル電流に対する NO の効果: TASK3 チャネルを発現させた HEK 細胞或いは卵母細胞において電位固定記録を行ない、TASK3 電流に対する NO の効果を解析する。
- (2) 三叉神経運動ニューロンにおける漏洩 K⁺電流に対する NO 効果と、細胞径・入力抵抗との関係: 脳幹スライス標本上の、様々な細胞径・入力抵抗を持ったニューロンにおいて漏洩 K⁺電流に対する NO の効果を記録し、その効果と細胞径・入力抵抗との相関を解析する。
- (3) TASK1 および TASK3 の抗体を用いて、三叉神経運動ニューロンにおける TASK チャネルの発現パターンを調べ、細胞径によるその差異の有無を調べる。
- (4) TASK1/3 mRNA の発現比率と細胞径の関係: ラット脳幹スライス標本から、レーザーマイクロディセクション法を用いて三叉神経運動ニューロンを、細胞径が 20 μm 以下と 40 μm 以上の二群に分けて採取し、それらに含まれる mRNA をリアルタイム PCR で解析し比較することにより、TASK1/3 mRNA の発現比率が、細胞径により異なるか否かを明らかにする。
- (5) Err3 抗体および NeuN 抗体を用いて、運動ニューロンと運動ニューロンが区別できることから、同抗体を用いて、三叉神経運動核における運動ニューロンと運動ニューロンの細胞径の分布パタ

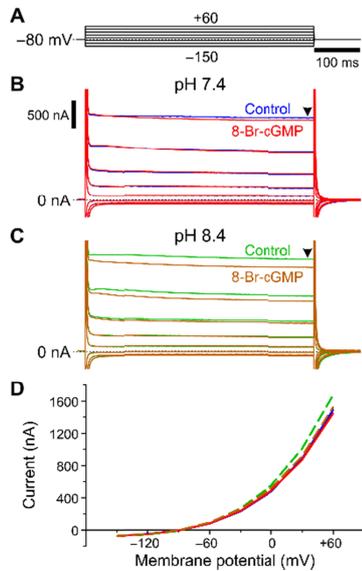
ーンを調べる。

4. 研究成果

(1) TASK1 を活性化する内因性活性物質は長らく不明であった。本研究において、No-cGMP-PKG シグナル伝達により TASK1 が活性化されることを初めて明らかにした(J Neuroscience, 2010)。



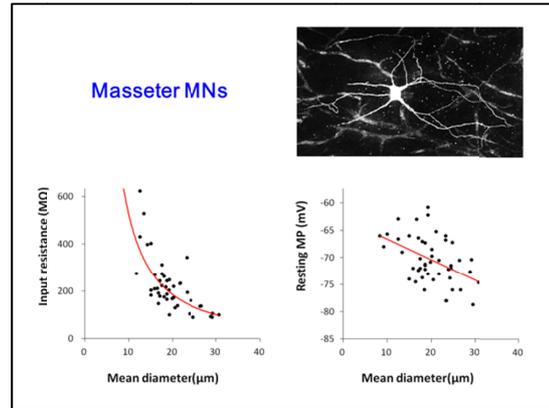
さらに、No-cGMP-PKG 系が TASK3 をどのように制御するかを調べた。



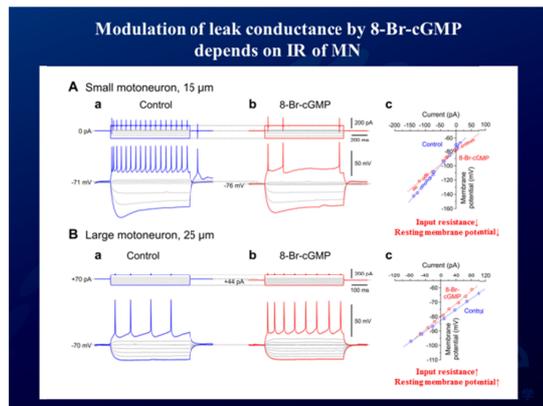
HEK, COS などの細胞では、TASK3 を発現させることはできたが、電流固定化で大きな K 電流を発生させると、それらの細胞は恒常性を無くし、それ以降の記録続行が不可であった。最終的に、卵母細胞に TASK3 を発現させて、その記録に成功した。No-cGMP-PKG 系は、TASK3 を抑圧することを初めて明らかにした (投稿準備中)。

(2) 三叉神経運動ニューロンの細胞径と入力抵抗の関係およびおける漏洩 K⁺電流に対する NO 効果：運動ニューロンの細胞径と入力抵抗の間には逆相関が認められた。また、細胞径と静止膜電位との間にも逆相関が認められた。これらの所見は、細胞径が大きくな

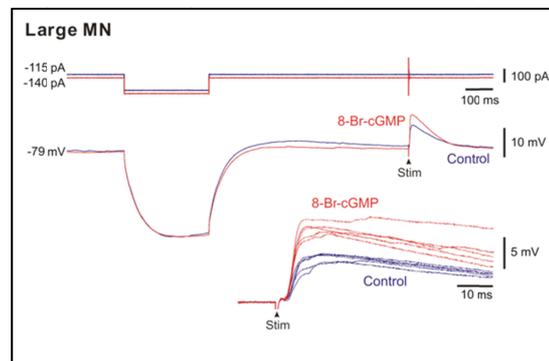
るにつれ、漏洩 K チャンネルの発現量が増えることを示唆している。



さらに、電流パルスの注入により求められる入力抵抗や静止膜電位が cGMP の投与によりどのような影響を受けるかを細胞径の小さな MN および大きな MN において調べた。その結果、小さな MN では、cGMP 投与により、入力抵抗は減少し、静止膜電位も過分極方向にシフトした。一方、大きな MN では、cGMP の投与により、入力抵抗は殆ど影響を受けないか或いは小さな増加が認められ、静止膜電位も変化しないか、僅かに脱分極方向にシフトした。



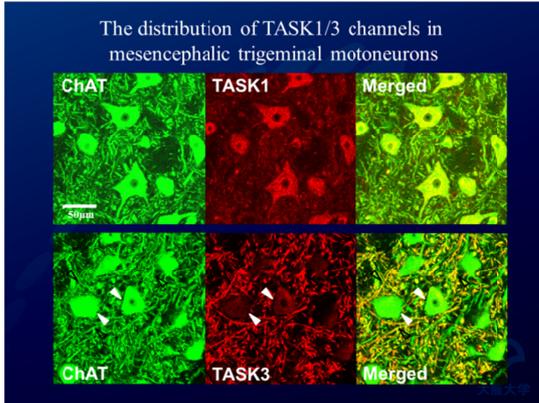
また、cGMP 投与により、細胞径の大きな MN では、EPSP の振幅が顕著に増加した。



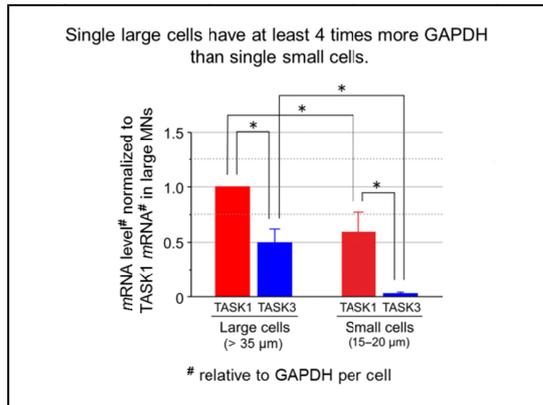
こうした所見から、TASK1 および TASK3 の発現パターンや発現量が、MN の細胞径に依存し

で異なる可能性が示唆された。

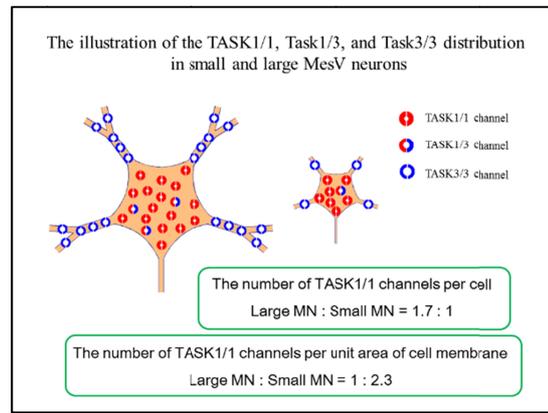
(3) TASK1 および TASK3 の抗体を用いて、三叉神経運動ニューロンにおける TASK チャンネルの発現パターンを調べた。その結果、TASK1 は、細胞径の大小に拘わらず、常に細胞体に発現しており、一方、TASK3 は主に樹状突起に発現していることが明らかになった。樹状突起は、大型の MN で特に発達しており、小型の MN では顕著ではなかった。



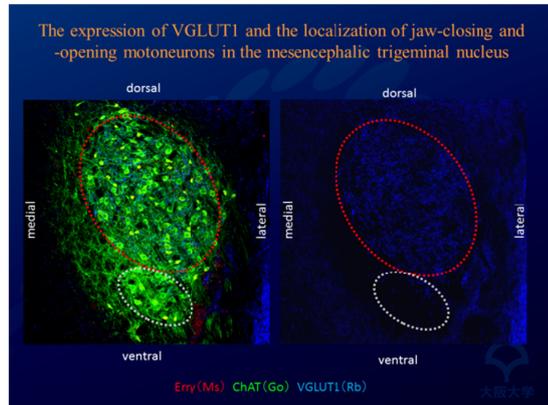
(4) レーザーマイクロダイセクション法を用いて、細胞径が 35 ミクロンより大きい MN を 80 個、15-20 ミクロンの細胞径の MN を 400 個サンプルし、real time RT-PCR を行い、TASK1, TASK3, GAPDH の mRNA 量を定量化した。その結果、大型 MN に比べて、小型 MN の TASK1 の発現量は 58%程度であり、TASK3 の発現量は 10%以下であった。



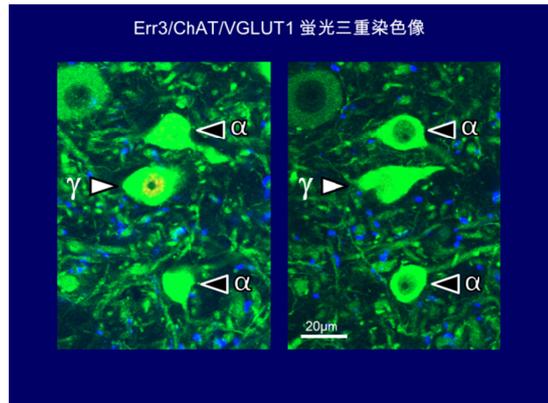
免疫組織化学的所見から、細胞体では、TASK1 のシグナルが強く、TASK3 のシグナルが弱いことより、主に TASK1/1 チャンネルが存在すると考えられ、一方、樹状突起では、TASK3 のシグナルが強く、TASK1 のシグナルが弱いことより、主に TASK3/3 チャンネルが存在すると考えられる。細胞体の表面積が大型 MN では、小型 MN より 4 倍大きいと考えると、TASK チャンネルの分布は、下図のようになっていると考えられる。



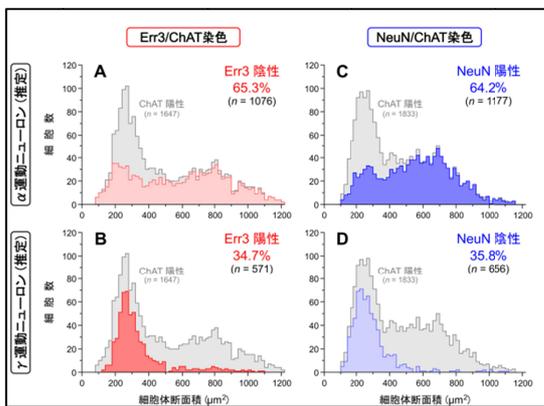
(5) Err3 抗体および NeuN 抗体を用いて、三叉神経運動核における 運動ニューロンと 運動ニューロンの細胞径の分布パターンを調べた。



その結果、これまで、脊髄や腰髄の運動神経核で知られていた 運動ニューロンと 運動ニューロンの細胞径の分布パターンとは異なり、 運動ニューロン(Err3 陽性)の細胞径と同様の小型 運動ニューロン(Err3 陰性)が存在することが明らかになった。



NeuN 抗体を用いて調べた結果も Err3 抗体を用いて調べた結果と同様なものであった。小型 MN 群は MN 群の細胞径分布とほぼ等しく、閉口筋 MN 群は小型細胞を多数含んでいた。



こうした所見は閉口運動における運動単位の序列動員を考える上で、重要な分子細胞基盤を与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

原著

Toyoda H, Saito M, Sato H, Tanaka T, Ogawa T, Yatani H, Kawano T, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced desensitization followed by unusual resensitization in GABA_A receptors in phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 double-knockout mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, Epub ahead of print, 2014. DOI: 10.1007/s00424-014-1511-5 査読有

Sato H, Kawano T, Saito M, Toyoda H, Maeda Y, Türker KS, Kang Y. Teeth clenching reduces arm abduction force. *Experimental Brain Research*, Epub ahead of print, 2014. DOI: 10.1007/s00221-014-3919-8 査読有

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: 2999–3007, 2013. DOI: 10.1111/ejn.12299 査読有

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: 190–202, 2013. DOI: 10.1111/ejn.12041 査読有

Tsukiboshi T, Sato H, Tanaka Y, Saito M, Toyoda H, Morimoto T, Türker 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: 2524–2533, 2012.

DOI: 10.1152/jn.00997.2011 査読有

Saito M, Toyoda H, Kawakami S, Sato H, Bae YC, Kang Y. Capsaicin induces theta-band synchronization between gustatory and autonomic insular cortices. *The Journal of Neuroscience*, 32: 13470–13487, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5906-11.2012 査読有

Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y. Protein kinase G dynamically modulates TASK1-mediated leak K⁺ currents in cholinergic neurons of the basal forebrain. *The Journal of Neuroscience*, 30: 5677–5689, 2010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5407-09.2010 査読有

Katai S, Kato K, Ueno S, Kang Y, Saruwatari M, Ishikawa N, Inoue M, Mikami A. Classification of extracellularly recorded neurons by their discharge patterns and their correlates with intracellularly identified neuronal types in the frontal cortex of behaving monkeys. *European Journal of Neuroscience*, 31: 1322–1338, 2010. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07150.x 査読有

Kim HY, Kim K, Li HY, Chung G, Park CK, Kim JS, Jung SJ, Lee MK, Ahn DK, Hwang SJ, Kang Y, Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ, Oh SB. Selectively targeting pain in the trigeminal system. *Pain*, 150: 29–40, 2010. DOI: 10.1016/j.pain.2010.02.016 査読有

総説

姜英男, 齋藤充, 豊田博紀, 佐藤元. 【口腔領域をめぐる神経基盤】噛みしめ運動における咬筋運動ニューロン序列動員の階層性制御機構. *脳* 21, 14: 385–391, 2011.

http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ac5nonid/2011/001404/018&name=0385-0391j&base=jamas_pdf 査読無

Kang Y, Saito M, Toyoda H, Sato H: Rank-ordered recruitment of masseter motoneurons by the activity of mesencephalic trigeminal neurons during slow closing phase of mastication cycle. *Journal of Oral Bioscience*, 52: 330–335, 2010. http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ct4biosc/2010/005204/005&name=0330-0335e&base=jamas_pdf 査読無

〔学会発表〕(計 28 件)

国際学会 - シンポジウム

Toyoda H, Saito M, Sato H, Kanematsu T, Hirata M and Kang Y. Phospholipase C-related inactive protein regulates the phasic and tonic inhibition in the barrel cortex. *The 11th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles*,

September 6, 2013, Shizuoka.

国際学会 - 一般講演

Toyoda H, Saito M, Sato H, Kanematsu T, Hirata M and Kang Y. Phospholipase C-related inactive proteins are involved in the regulation of phasic and tonic inhibition in the barrel cortex. *The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 11, 2013, San Diego.

Saito M, Isogai-Morita Y, Emura N, Toyoda H and Kang Y. Rank-ordered recruitment of jaw-closing a-motoneurons depending on the activities of TASK1 and TASK3 channels in the rat. *The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 11, 2013, San Diego.

Toyoda H, Ogawa T, Saito M, Sato H, Kanematsu M, Hirata M, Kang Y. Phospholipase C-related inactive protein modulates desensitization and resensitization of GABA_A receptor currents in the barrel cortex. *The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, October 14, 2012, New Orleans.

Tanaka Y, Sato H, Saito M, Tsukiboshi T, Maeda Y, Kang Y. A physiological method to determine the vertical dimension of occlusion. *Society for Neuroscience The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, October 14, 2012, New Orleans.

Toyoda H, Hirao K, Saito M, Sato H, Kang Y. cGMP differentially modulates leak K⁺ currents in masseter motoneurons. *The 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 13, 2011, Washington, USA.

Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y. Protein kinase G (PKG) bidirectionally modulates TASK1 currents in PKG-loaded HEK 293 cells. *The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 15, 2010, San Diego.

Sato H, Kawakami S, Toyoda H, Saito M, Bae YC, Kang Y. Electrophysiological properties of capsaicin-induced currents in layer II/III and layer V pyramidal cells of the insular cortex. *The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 15, 2010, San Diego.

Saito M, Sato H, Toyoda H, Kobayashi M, Althof D, Kulik A, Shigemoto R, Kang Y. Inter- and intracolumnar desynchronization by presynaptic GABA_B inhibition in the rat barrel cortex. *The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 15, 2010, San Diego.

Kawasaki Y, Saito M, Toyoda H, Sato H, Tanaka S, Kogo M, Kang Y. Membrane

hyperpolarization depresses AMPA currents in the primary sensory neuron of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 17, 2010, San Diego.

国内学会 - シンポジウム

齋藤 充, 豊田 博紀, 佐藤 元, 姜 英男. カプサイシンの島皮質での受容による内臓 - 内臓間自律神経反射の修飾の可能性. 日本味と匂学会第47回大会, 2013年9月7日, 仙台.

姜 英男. 噛みしめ運動から見た運動ニューロン序列動員の階層的制御機構 - 漏洩K⁺チャンネル分子 - 伸張反射回路 - 小脳内部モデル -, 大阪大学 MEI センターグローバル COE “in silico medicine” 第13回定例シンポジウム, 平成23年3月3日, 大阪.

〔図書〕(計2件)

Kang Y, Saito M, Toyoda H, Sato H. Recruitment of masseter motoneurons by the presumed spindle Ia inputs. *In: Breathe, Walk and Chew - The Neural Challenge: Part I (Progress in Brain Research, Vol. 187)* (Gossard JP, Dubuc R, Kolta A, Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 163–171, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-444-53613-6.00011-3

Kang Y, Toyoda H, Saito M, Sato H. Recruitment of masseter motoneurons by spindle Ia inputs and its modulation by leak K⁺ channels. *In: Interface Oral Health Science 2009* (Sasano T, Suzuki O, Eds.), Springer, Tokyo, pp. 60–65, 2010. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-99644-6_9

〔その他〕

ホームページ

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~phys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姜 英男 (KANG, Youngnam)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号. 5 0 1 7 7 7 5 5

(2) 研究分担者

豊田 博紀 (TOYODA, Hiroki)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号. 0 0 4 3 2 4 5 1

佐藤 元 (SATO, Hajime)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号. 1 0 4 3 2 4 5 2

齋藤 充 (SAITO, Mitsuru)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号. 5 0 3 4 7 7 7 0