

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659825

研究課題名(和文)光刺激を用いた入力線維の選択的活性化による運動ニューロン序列動員神経機構の解明

研究課題名(英文)Orderly recruitment of trigeminal motor neurons in response to selective activation of synaptic inputs by optical stimulation

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Frequency-dependent facilitation を示すというIa線維から閉口筋支配 運動ニューロン(MN)へのシナプス入力の特性を利用した通常の電気刺激法により序列動員が生じることをパッチクランプ同時記録法や膜電位測光法を用いて明らかにした。また、閉口筋運動神経核(JCMN)では、MNの細胞体径の分布は二峰性を示し、MNと同程度の小径のものが存在した。次に、電気生理学的膜特性に基づく分類を行った結果、MNはA型K電流を示す大型と低閾値型Caスパイク(LTS)を示す小型の二種類に分けられ、MNは特徴的なパルス後脱分極電位及び持続活性化型Na電流を示すことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Taking advantage of the synaptic nature that Group Ia inputs onto MNs in JCMN display frequency facilitation, we demonstrated the orderly recruitment of MNs in response to conventional electrical stimulation of Ia inputs using dual whole cell recordings and voltage-sensitive dye imaging methods. Since the orderly recruitment of motor units occurs depending on the soma size of MNs, we next examined the size distribution of jaw-closing MNs in the rat after identifying MN and MN by the expressions of orphan nuclear hormone receptor Err3 and neuronal DNA binding protein NeuN. The size distribution of jaw-closing MNs was bimodal, revealing the presence of many MNs as small as MNs. Furthermore, based on the electrophysiological membrane properties, jaw-closing MNs were divided into two subtypes; larger and smaller MNs showing A-type K<sup>+</sup> current and LTS Ca<sup>2+</sup> spike, respectively, and MNs were identified as displaying a characteristic pulse afterdepolarization.

研究分野：神経生理学・口腔生理学

キーワード：サイズの原理 序列動員 等尺性収縮 運動ニューロン 入力抵抗 Ia感覚神経入力 TASK 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

筋張力制御の基本機構として、Henneman (1985) により確立された「サイズの原理」として知られる運動ニューロンの序列動員が挙げられる。筋の等尺性収縮運動時には、運動ニューロンのサイズの小さいものから順に動員されると想定されている。これは、一定の興奮性シナプス電流に対し、入力抵抗の大きい小型運動ニューロンにはより大きなシナプス後電位が生じ、活動電位発生の閾膜電位により到達し易いためであると理解されている。しかしながら、どのような入力により等尺性収縮が引き起こされるかは必ずしも明らかではない。特に、咀嚼運動においては、歯根膜機械受容器や筋紡錘 Ia 感覚神経線維からの入力を除くと収縮力が減弱すること (Lavigne *et al.* 1987; Morimoto *et al.* 1989)、Ia インパルス活動は食物の硬さに応じて変化すること (Hidaka *et al.* 1997; Hidaka *et al.* 1999)、また、局所麻酔薬を用いて、Ia 感覚神経を麻痺させた場合の等尺性筋収縮の最大出力は下肢や手指筋では 30-40% 減少すること (Gandevia *et al.* 1990; Macefield *et al.* 1993) などから、Ia 感覚神経入力が、中枢パターン生成器からの入力とともに重要視されている。しかしながら、これまで、それらの入力系を選択的に活性化し、運動核  $\alpha$  運動ニューロンの序列動員を直接観察することに成功したという報告はない。マウス坐骨神経運動ニューロンに channelrhodopsin-2 を発現させた標本に光刺激を与えて序列動員を観察した報告がようやく昨年なされた (Michael *et al.*, *Nature Medicine*, 2010)。この報告では、channelrhodopsin-2 の発現密度が細胞の大小にかかわらず一定であるため、入力抵抗に従った序列動員がこれまでの想定通りに当然生じたもので、序列動員を引き起こす入力機構については何も明らかにしていない。一方、序列動員を決定づける入力抵抗、つまり、漏れ  $K^+$  チャンネルのタンパク分子として TASK1/3 チャンネルが近年同定されてきた。我々は TASK1 が一酸化窒素 (NO) により活

性化されることを初めて報告した。TASK1/3 チャンネルの働きを修飾することにより序列動員がどのように修飾されるかについては全く不明である。

## 2. 研究の目的

- (1) 閉口筋運動ニューロンにおける TASK1, TASK3 の発現と、TASK1, TASK3 コンダクタンスに対する NO の効果を解析する。
- (2) 閉口筋  $\alpha$  及び  $\gamma$  運動ニューロン (MN) をマーカー分子の発現に基づいて識別し、細胞径の分布と電気生理学的特性を明らかにする。
- (3) 前運動ニューロン (pMN) 或いは Ia 求心性線維 (三叉神経中脳路核ニューロン; MTN) の選択的活性化を行い、いずれの入力系が閉口筋 MN (JCMN) の序列動員により大きく関与するかを明らかにする。
- (4) TASK1, TASK3 電流の序列動員への関与を明らかにするため、光感受性 TASK1, TASK3 チャンネルキメラの開発をおこなう。

## 3. 研究の方法

- (1a) 抗 TASK1 及び抗 TASK3 抗体を用いて、JCMN における TASK チャンネルの発現パターンを免疫組織学的に調べ、細胞径によるその差異の有無を調べる。
- (1b) ラット脳幹スライス標本から、laser microdissection (LMD) 法を用いて JCMN を、細胞径が 15-20  $\mu\text{m}$  と 35  $\mu\text{m}$  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 RT-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。
- (1c) TASK1 或いは TASK3 チャンネルを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において電位固定記録を行ない、TASK1, TASK3 コンダクタンスに対する NO の効果を解析する。
- (1d) 脳幹スライス標本上の三叉神経運動核閉口筋領域にある様々な大きさのニュー

- ロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、漏洩  $K^+$ 電流に対する NO 効果、及び、細胞径と入力抵抗や閾膜電位等の関係を解析する。
- (2a) 抗 Err3 抗体及び抗 NeuN 抗体を用いて、三叉神経運動核閉口筋領域内の  $\alpha$ MN と  $\gamma$ MN を識別し (Friese et al. 2009)、細胞径の分布パターンを調べる。
- (2b) 三叉神経運動核閉口筋領域内のニューロンからホールセルパッチクランプ電流固定記録を行い、その電気生理学特性に基づいた分類を試みる。記録後に標本を固定し、Err3, NeuN, ChAT (MN のマーカー), VGLUT1 (Ia 由来興奮性シナプス終末のマーカー) について免疫組織化学分析を行う。
- (3) MTN 或いは pMN 特異的に ChR2-YFP 融合蛋白を発現させるバイラルベクターを設計する。プロモーターとして、それらのニューロンの軸索終末に発現している VGLUT1 (MTN) 或いは VGLUT2 (pMN) の 100kbp 未満のプロモーター群の中から適切な候補を探索する。完成したウィルスに関心部位近傍に微量注入することで蛋白を発現させるか、MTN への導入に関しては、エンベロープを狂犬病ウィルスのグリコプロテイン等を用いて偽型化した逆行性レンチウィルスを閉口筋に注入する方法も利用できる。蛋白を発現している軸索に対して青色光を高頻度反復照射することによってスパイク列を発生させ、三叉神経運動ニューロンへの興奮性シナプス入力を生じさせる。
- (4) ホタテガイ過分極性光受容細胞の電位依存性 A 型  $K^+$ チャネルは、光照射の間 C 型不活性化が除去されて安定した電流を生じることから (Shimatani & Katagiri, *J Neurosci*, 1995)、TASK チャネルの C 末端側のアミノ酸配列を、この A 型  $K^+$ チャネルのものと置換することにより、光照射によって TASK チャネルの C 型不活性化を除去し、電流を増強させることができるか検討する。

#### 4. 研究成果

(1a) JCMN では、TASK1 は細胞径の大小に関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 MN で特に発達しており、小型 MN では顕著ではなかった。

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 チャネルが存在すると考えられた。TASK1 と TASK3 シグナルの分布が相補的で重畳は僅かであることから、ヘテロな TASK1/3 はほとんど存在しないことが示唆された。

(1b) LMD 法を用いて、細胞径が 35  $\mu$ m 以上の大型 MN を 80 個、15–20  $\mu$ m の小型 MN を 400 個サンプルして、リアルタイム RT-PCR を行い、TASK1, TASK3, GAPDH の mRNA 量を定量化した。その結果、大型 MN における発現を基準とした時、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。

(1c) TASK1 を活性化する内因性活性物質は長らく不明であった。我々は 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 (Toyoda et al., *J Neurosci*, 2010)。そこで本研究では、NO-cGMP-PKG 系の活性化が TASK3 をどの様に修飾するかを調べた。HEK, COS, CHO, A9 等の哺乳類培養細胞では、TASK3 を発現させることはできたが、ホールセルパッチクランプ電位固定下では安定した記録が不可能であった。最終的に、アフリカツメガエル卵母細胞に TASK3 を発現させて、その記録に成功した。そして、TASK3 は NO-cGMP-PKG 系の活性化によって抑制されることを初めて明らかにした。NO-cGMP-PKG 系の活性化に

による TASK1 の上方制御がコンダクタンスの pH 依存曲線の酸性方向へのシフトによっていたのに対し、TASK3 コンダクタンスの抑制率は pH によって大きく変化しなかったことから、pH 依存曲線の延期正方向へのシフトによるものでないことが示唆された（投稿準備中）。

(1d) JCMN 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<sup>+</sup>チャンネルの発現量が増えることを示唆している。

更に、入力抵抗や静止膜電位が cGMP の投与によりどの様な影響を受けるかを小型及び大型 MN において調べた。その結果、小型 MN では入力抵抗は減少し、静止膜電位も過分極方向にシフトした。一方、大型 MN では、入力抵抗は殆ど影響を受けないか或いは僅かな増加が認められ、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、大型 MN では周囲の電気刺激によって誘発された EPSP の振幅が顕著に増加した。

こうした所見から、TASK1 及び TASK3 の発現パターンや発現量が、JCMN の細胞径に依存して異なる可能性が示唆された。

(2a) 腰髄前根ニューロンの細胞体径の分布は、全体として二峰性を示しており、小径及び大径の峰がそれぞれ専ら  $\gamma$ MN と  $\alpha$ MN で占められていた (Friese et al. 2009)。JCMN の細胞体型の分布は、全体として二峰性を示す点は腰髄前根ニューロンと類似していたが、小径の峰には  $\alpha$ MN (NeuN 陽性・Err3 陰性) も含まれ、 $\gamma$ MN (NeuN 陰性・Err3 陽性) と同程度に小さい  $\alpha$ MN の存在が明らかになった。

(2b) 三叉神経運動核閉口筋領域内の  $\alpha$ MN の内、大型の細胞は顕著な A 型 K<sup>+</sup>電流 ( $I_A$ ) を示すが、低閾値型 Ca<sup>2+</sup>スパイク (LTS) を示さないのに対し (1 型  $\alpha$ MN)、小型の細胞

は明瞭な LTS を示したが、 $I_A$  は顕著ではなかった (2 型  $\alpha$ MN)。このことから、閉口筋の  $\alpha$ MN は細胞径の分布が広いだけでなく、細胞径に応じて電気生理学的に 2 型に分かれていることが示され、序列動員に対応した電気生理学的膜特性を持つことが明らかになった。また、 $\gamma$ MN は特徴的なパルス後脱分極電位 (pulse-ADP) 及び持続活性化型 Na<sup>+</sup>電流 ( $I_{NaP}$ ) を示した。この pulse-ADP は、TRPC 等の様な Ca<sup>2+</sup>依存性陽イオン電流の抑制薬 flufenamic acid で抑えられた。

(3) 及び (4) については、本研究期間内にその目的を達成することができなかった。しかし、frequency-dependent facilitation を示すという Ia 線維から咬筋支配  $\alpha$ MN へのシナプス入力の特徴を利用した通常の電気刺激法により序列動員が生じることを、パッチクランプ同時記録法や膜電位測光法を用いて明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

### 原 著

Chung G, Saito M, Kawasaki Y, Kawano T, Yin DX, Lee S, Kogo M, Takada M, Bae YC, Oh SB, Kang Y. Generation of resonance-dependent oscillation by mGluR-I activation switches single spiking to bursting in mesencephalic trigeminal sensory neurons. *European Journal of Neuroscience*, 41; 998–1012, 2015. DOI: 10.1111/ejn.12858 査読有

Toyoda H, Saito M, Sato H, Kawano T, Kawakami S, Yatani H, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced lateral inhibition in the barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 in mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, Epub ahead of print, 2014. DOI: 10.1007/s00424-014-1592-1 査読有

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<sub>A</sub> receptors in phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 double-knockout mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467: 267–284, 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<sub>B</sub> 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

〔学会発表〕(計15件)

#### 国際学会 - シンポジウム

Kang Y, Saito M, Chung G, Kawasaki Y, Kogo M, Oh SB, Bae YC. Ionic mechanisms for switching the firing mode between a train of single spikes and bursting in mesencephalic trigeminal sensory neurons. *The International Symposium on Neuroscience in Orofacial Sensory-Motor Functions 2015*, May 10th, 2015, Osaka.

Saito M, Isogai-Morita Y, Nishimura K, Ota M, Toyoda H, Sato H, Kawano T, Kang Y. Morphological and electrophysiological properties of trigeminal  $\alpha$ - and  $\gamma$ -motoneurons. *The International Symposium on Neuroscience in Orofacial Sensory-Motor Functions 2015*, May 11th, 2015, Osaka.

Toyoda H, Hirao K, Emura N, Saito M, Sato H, Kawano T, Kuramoto E, Kaneko T, Kang Y. The role of TASK channels in rank-ordered recruitment of trigeminal jaw-closing motoneurons. *The International Symposium on Neuroscience in Orofacial Sensory-Motor Functions 2015*, May 11th, 2015, Osaka.

Kang Y, Sato H, Kawano T, Saito M, Toyoda H. Oscillation and synchronization of neuronal activity in the insular cortex implicated in the feeding behavior. *The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2014)*, November 2nd, 2014, Fukuoka,

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

Won JH, Saito M, Kang Y, Oh SB. Locus coeruleus modulates proprioceptive trigeminal

neuron activity by inhibiting hyperpolarization-activated current. *The International Symposium on Neuroscience in Orofacial Sensory-Motor Functions 2015*, May 10th–11th, 2015, Osaka.

Kawano T, Saito M, Toyoda H, Sato H, Kang Y. Enhanced CICR and SOCE in layer 3 pyramidal cells in the barrel cortex of PRIP-DKO mice. *The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 19, 2014, Washington DC.

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*, November 18, 2014, Washington DC.

Toyoda H, Saito M, Sato H, Kawano T, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhancement of lateral inhibition in the mouse barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2. *The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, November 17, 2014, Washington DC.

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<sub>A</sub> 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.

#### 国内学会 - シンポジウム

姜 英男, 豊田 博紀, 齋藤 充, 佐藤 元, 河野 奨. 摂食行動に關与する島皮質神経活動の周期的同期化. 第 92 回日本生理学会大会・第 120 回日本解剖学会全国学術集会合同大会, 2015 年 3 月 21 日, 神戸.

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.

[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

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