Osaka University Knowledge Archive

Title	咬筋及び顔面表情筋を支配する運動ニューロンにおけるTASKチャネルの発現様式
Author(s)	平尾, 圭子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57599
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【20】

氏　　名	平　尾　圭　子（ひら　お　けい　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２３７４０　号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年３月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**咬筋及び顔面表情筋を支配する運動ニューロンにおけるTASKチャネルの発現様式**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　髙田　健治 （副査） 教　授　姜　　英男　　准教授　竹村　元秀　　講　師　柿本　直也

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

TWIK-related acid-sensitive-K^+（TASK）1およびTASK3チャネルは、ニューロンの入力抵抗を決定する重要な要素であり、咬筋および顔面表情筋を支配する運動ニューロンにおいて特に豊富に発現している。TASKチャネルは二量体により形成されており、ホモダイメリック型（TASK1/1およびTASK3/3）だけでなく、ヘテロダイメリック型（TASK1/3）が存在する。これらのTASKチャネルはpH感受性が異なり、TASK3/3およびTASK1/3チャネルはTASK1/1チャネルと比較して2倍大きなシングルチャネルコンダクタンスを持つことが知られている。ニューロンの入力抵抗とサイズは反比例の関係を持つとされることより、TASK1とTASK3チャネルの発現様式がニューロンのサイズにより異なる可能性がある。咬筋の等尺性収縮が遂行される咬合時には、咬筋運動ニュー

ロンは入力抵抗の大きいものから順に動員されることが知られているが、顔面表情筋の制御と入力抵抗の関係については不明である。

本研究では、咬筋および顔面表情筋を支配する運動ニューロンにおいて、ニューロンのサイズおよび性別により、TASK1 と TASK3 チャネルの発現様式に差異が認められるかどうかをリアルタイム PCR 法およびパッチクランプ法を用いて調べ、運動様式が異なる二種類の運動ニューロンにおける TASK チャネルの役割を検討した。

【材料ならびに方法】

(1) 三叉神経運動核咬筋領域および顔面神経核における TASK1 および TASK3 mRNA の発現量の検討

生後 15~22 日齢の Wistar 系ラットを用いた。抱水クロラール麻酔下にて脳幹部を摘出・凍結後、クリオスタットにて三叉神経運動核と顔面神経核を含む厚さ 20 μm の連続冠状断脳幹スライス標本を作製した。レーザーマイクロダイセクションシステムにて運動ニューロンの細胞体を採取した。採取の際にデジタルスケールを用いて核を含む細胞体の短径と長径を測定し、それらの平均が 20μm 以下のものを小型ニューロン、40μm 以上のものを大型ニューロンとした。三叉神経運動核咬筋領域と顔面神経核から、細胞体の大きさと性別によりそれぞれ 4 種の群に分けて採取し、40~427 個の細胞体を 1 サンプルとした。抽出された RNA を逆転写し、cDNA を作製後、定量リアルタイム PCR を行った。内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。比較 Ct 法を用い、TASK1 と TASK3 の mRNA の発現量を相対定量した。

(2) 小型および大型三叉神経運動ニューロンにおける入力抵抗の比較

生後 5~10 日齢の Wistar 系ラットを用いた。ジエチルエーテル麻酔下にて脳幹を摘出し、マイクロスライサーにて三叉神経運動核を含む厚さ 250 μm の冠状断スライス標本を作製した。赤外線微分干渉顕微鏡下にて三叉神経運動ニューロンを同定し、同細胞に対してホールセルパッチクランプ記録を行った。細胞外灌流液には以下の組成 (mM) のものを用いた： 124 NaCl、1.8 KCl、1.2 KH_2PO_4、10 D-glucose、26 $NaHCO_3$、2.5 $CaCl_2$、1.3 $MgCl_2$。パッチ電極内液の組成 (mM) は、123 K -gluconate、8 KCl、10 NaCl、2 $MgCl_2$、2ATP-Na_2、0.3 GTP-Na_3、10 HEPES、0.1 EGTA とし、KOH で pH を 7.4 に調整したものを使用した。さらに組織学的解析を行うため、0.1%ルシファーイエローをパッチ電極内液に加えた。小型運動ニューロンと大型運動ニューロンから同時にホールセルを形成し、電流固定下で、持続時間 1 秒の電流パルス通電に対する電位応答を記録した。

【研究成績】

(1) TASK1 と TASK3 の mRNA 発現量および TASK1 mRNA に対する TASK3 mRNA の相対発現比について、三叉神経運動核咬筋領域および顔面神経核の大型ニューロン群および小型ニューロン群において、雌雄の間に有意の差は認められなかった。

三叉神経運動核では、TASK1 mRNA は大型ニューロン群に比べ、小型ニューロン群において有意に高い発現を示した ($p<0.01$)。対照的に TASK3 mRNA は、大型ニューロン群に比べ小型ニューロン群において、有意に低い発現を示した ($p<0.01$)。TASK1 mRNA に対する TASK3 mRNA の相対発現比の平均は、大型ニューロン群・小型ニューロン群ともに 1 より小さかった。また、相対発現比は、小型ニューロン群において大型ニューロン群に比べ、有意に小さい値を示した ($p<0.05$)。

顔面神経核では、TASK1 mRNA は大型ニューロン群に比べ、小型ニューロン群において有意に高い発現を示した ($p<0.05$)。TASK3 mRNA は、大型ニューロン群と小型ニューロン群間で有意の差は認められなかった。TASK1 mRNA に対する TASK3 mRNA の相対発現比の平均は、大型ニューロン群において 1 に近く、小型ニューロン群においては 1 より小さかった。相対発現比は、小型ニューロン群において大型ニューロン群に比べ、有意に小さい値を示した ($p<0.05$)。また、顔面神経核の大型ニューロン群における相対発現比は、三叉神経運動核咬筋領域の大型ニューロン群における相対発現比に比べ、有意に大きかった ($p<0.01$)。

(2) 同時記録された三叉神経の小型運動ニューロンでは、大型運動ニューロンに比べ、入力抵抗が高く、スパイクの見かけの発火閾値が低かった。

【考察ならびに結論】

三叉神経運動核咬筋領域において、大型運動ニューロンは TASK1/1 チャネルと TASK1/3 チャネルを約 1：2 の割合で発現しており、対照的に、小型運動ニューロンは多数の TASK1/1 チャネルと少数の TASK1/3 チャネルを発現している可能性が明らかになった。したがって、大型運動ニューロンは、漏洩 K^+ 電流が主にコンダクタンスの大きい TASK1/3 チャネルにより媒介されるため、比較的小さい入力抵抗を示し、小型運動ニューロンは、漏洩 K^+ 電流が主にコンダクタンスの小さい TASK1/1 チャネルにより媒介されるため、比較的大きい入力抵抗を示すと考えられる。このように、三叉神経運動核咬筋領域では、運動ニューロンのサイズにより TASK チャネルの発現様式が異なり、序列動員に適した漏洩 K^+電流を示していると考えられた。

一方、顔面神経核運動ニューロンにおいては、三叉神経運動核咬筋領域の運動ニューロンとは TASK チャネルの発現様式が異なり、三叉神経運動核咬筋領域の運動ニューロンに比べ、入力抵抗が低く、発火頻度が低い可能性が考えられた。したがって、顔面表情筋の収縮は咬筋と比べ穏やかであり、筋張力が小さいことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

運動ニューロンはその支配する筋が等尺性収縮を示す時には、そのサイズにしたがった序列動員を示すことが知られている。ニューロンのサイズと入力抵抗は反比例の関係にあるとされることより、入力抵抗を決定する漏洩 K^+電流の分子基盤である TASK チャネルの発現様式は、ニューロンのサイズにより異なる可能性がある。本研究は、この点に着目し、定量 PCR 法および電気生理学的手法を用いて、咬筋および顔面表情筋を支配する運動ニューロンにおける TASK チャネルの発現様式について検討したものである。

その結果、三叉神経運動核咬筋領域では、運動ニューロンのサイズにより TASK1 および TASK3 mRNA の発現様式と入力抵抗が異なることが明らかとなった。このことから、運動ニューロンのサイズにより、TASK チャネルの発現様式が異なり、序列動員に適した漏洩 K^+電流を示していることが示唆された。また、顔面神経核運動ニューロンにおいては、三叉神経運動核咬筋領域の運動ニューロンとは TASK チャネルの発現様式が異なり、同領域の運動ニューロンと比べ入力抵抗および発火頻度が低いことが示唆された。

以上の研究結果は、咬筋および顔面表情筋の運動制御を理解する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。