Osaka University Knowledge Archive

Title	抗TASK1抗体の作製および咬筋運動ニューロンにおけるTASK1/TASK3チャネル発現分布の検討
Author(s)	榎村, 徳仁
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59269
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

【41】

氏　　名	榎　村　徳　仁（えむらのりひと）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学　位　記　番　号	第　２５０４９　号
学位授与年月日	平成24年３月22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	**抗TASK1抗体の作製および咬筋運動ニューロンにおけるTASK1/TASK3チャネル発現分布の検討**
論文審査委員	（主査） 教　授　高田　健治 （副査） 教　授　姜　　英男　　准教授　竹村　元秀　　講　師　本間　志保

論　文　内　容　の　要　旨

〈研究目的〉

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細胞径の小さいもの、つまり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。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、咬筋運動ニューロンにおいて豊富に発現している。TASKチャネルは二量体であり、ホモダイメリック（TASK1/1およびTASK3/3）およびヘテロダイメリック （TASK1/3） チャネルが存在する。これらのTASKチャネルはpH感受性が異なり、また、TASK3/3チャネルは、TASK1/1チャネルと比較して約2倍の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。運動ニューロンの入力抵抗と細胞径は反比例の関係を持つとされ、またTASK1とTASK3サブユニット mRNA の発現様式が咬筋運動ニューロンの細胞径により異なることが既に示されている。しかし、細胞径の異なる運動ニューロンにおけるTASK1およびTASK3チャネルの細胞内局在は未だ明らかではない。

そこで、本研究では細胞径の異なる咬筋運動ニューロンにおいて、TASK1 およびTASK3サブユニットがどのような細胞内局在を示すのかを、免疫組織化学的に検討した。市販されている抗TASK1抗体はその特異性に疑問があるため、独自に抗TASK1抗体を設計・作製し、市販の抗TASK3抗体と共に使用した。

〈材料ならびに方法〉

1. 抗 TASK1 抗体の作製

TASK1 のアミノ酸配列の C 末端側に存在する、YKSREKLQYSIPMIIPRDLSTSDTC（残基 332–356） の配列のペプチドを委託合成した。合成したペプチドを maleimide 活性化 bovine serum albumin （BSA） とコンジュゲート反応させ、ペプチド・コンジュゲートを作製した。 ペプチド・コンジュゲートと complete Freud's adjuvant を注射筒内で混和し、エマルジョンを得た。Hartley 系モルモット （体重 200 g） に対してエマルジョンを皮内注射し、初回免疫を行った。初回免疫から 4 週間後、ペプチド・コンジュゲートと incomplete Freud's adjuvant を混和して得たエマルジョンを同様に皮内注射し、2 回目の免疫を行い、その 2 週間後に採血した。4℃で 12 時間のインキュベーションによってできた血餅から、血清を遠心分離した。得られた血清を硫酸アンモニウムで塩析し、IgG 粗分画サンプル溶液を得た後、アフィニティー精製により精製抗体を得た。

2. 抗 TASK1 抗体および抗 TASK3 抗体による免疫組織化学染色

Wistar 系ラット （体重 300 g） を使用し、三叉神経運動神経核を含む脳幹から 40 μm 厚の冠状断切片を作製した。運動ニューロンはアセチルコリン作動性であるので、アセチルコリン合成酵素である choline acetyltransferase （ChAT） の抗体および抗 TASK1 抗体あるいは抗 TASK3 抗体との蛍光二重染色を切片標本において行った。また、TASK1 の染色を行った各切片において、同一の撮影深度 （Z 軸座標） に細胞体の核が存在する大型および小型ニューロンの細胞体における TASK1 の輝度を計測し比較した。

ネガティブコントロール実験として、切片組織標本を用いた染色の際に、抗 TASK1 抗体の吸収試験を併せて行った。また、TASK1 遺伝子あるいは mock を導入した HEK293 細胞を用いて抗 TASK1 抗体を用いた染色を行い、抗 TASK1 抗体の特異性を検証した。

〈結果〉

TASK1 遺伝子を導入した HEK293 細胞における染色では細胞膜にシグナルが認められたが、mock を導入した HEK293 細胞ではシグナルは認められなかった。これにより作製した抗 TASK1 抗体の特異性を確認することができた。

切片組織標本における咬筋運動ニューロンの免疫組織化学染色の結果、細胞の大小に関わらず TASK1 は運動ニューロンの細胞体に発現しており、TASK3 は主に樹状突起に発現していることが明らかとなった。また、抗 TASK1 抗体の吸収試験では咬筋運動ニューロンにおいて TASK1 チャネルのシグナルは認められなかった。小型運動ニューロンの細胞体における TASK1 のシグナル強度は、大型運動ニューロンの約 1.6±0.1 倍であった。

〈考察〉

細胞の大小に関わらずラット咬筋運動ニューロンの細胞体には多数の TASK1/1 チャネルと少数の TASK1/3 チャネルが存在し、樹状突起には主に TASK3/3 チャネルが存在すると考えられる。リアルタイム PCR の結果より、大型運動ニューロンでは小型運動ニューロンに比べて細胞 1 個あたりの TASK3 サブユニット mRNA の発現量が約 11.3 倍多いことが分かっているが、これは大型運動ニューロンが小型運動ニューロンと比べて TASK3/3 チャネルを発現する樹状突起がより豊富であることを主に反映している。また、今回の実験より大型運動ニューロンでは小型運動ニューロンに比べて細胞 1 個あたりの TASK1/1 チャネルの個数が多いことが明らかとなった。本研究により明らかになった TASK1/1 および TASK3/3 チャネルの細胞内局在は、それぞれ、入力抵抗およびシナプス入力の修飾に直接関与する可能性を強く示唆し、それ故、序列動員に適した発現パターンであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ラット咬筋運動ニューロンの膜抵抗を決定する TASK1 および TASK3 チャネルの細胞内局在を明らかにするため、抗 TASK1 抗体を新たに作製し、免疫組織化学実験を行った。その結果、運動ニューロンの細胞体には、その径の大小に関わらず、主に TASK1/1 チャネルが多数存在し、樹状突起には主に TASK3/3 チャネルが多数存在することが明らかになった。このことは、TASK1/1 および TASK3/3 チャネルが、それぞれ、入力抵抗およびシナプス入力の修飾に関与する可能性を示唆している。

咬筋運動ニューロンは等尺性収縮の際に序列動員を示すことから、本研究は、咬合力調節に関与する分子基盤の解明に貢献するものであり、博士(歯学)の学位取得に値するものと認める。