

平成21年 5月15日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19791363
 研究課題名(和文) 咬合力調節に關与する γ 運動系神経機構の解明
 研究課題名(英文) Neural mechanisms of γ -motor system underlying modulation of bite force
 研究代表者： 齋藤 充 (SAITO MITSURU)
 大阪大学・大学院歯学研究科・講師
 研究者番号： 50347770

研究成果の概要：

(1) 三叉神経中脳路核(MTN)および三叉神経運動核(TMN)を同時に含むラット脳幹スライス標本上を作成し、MTNからTMNへの入力線維の経路と考えられるTMNの背内側部に置いた刺激電極で100Hzの連続微小刺激を与え、TMN内にある大きさの異なる2つの運動ニューロンからホールセル電流固定同時記録を行なった。刺激強度を徐々に上げていくと、入力抵抗の大きい運動ニューロンから先に発火し始め、連続刺激に対する発火頻度もより高かった。このことから、TMN運動ニューロンは、MTNからの興奮性入力により、入力抵抗の序列に従って動員されることが示唆された。(2) 1と同様の標本に膜電位感受性色素RH414を負荷した上で、TMN背内側部の連続微小刺激を行ない、TMNニューロンプールの興奮を光学的に測定した。連続する刺激列の後ろへ行く程、TMN背外側部閉口筋運動ニューロンプールに観察される光学信号応答の領域は大きくなり、最終的にはTMN背外側部全体にわたった。このことから、MTNからの興奮性入力は閉口筋運動ニューロンプール全体を支配し、動員される運動ニューロン群は興奮性入力の頻度に依存することが示唆された。(3) TMNニューロンからホールセル電位固定記録を行ないながら、TASK型漏洩 K^+ チャンネルを制御する8-Br-cGMPや Ba^{2+} 投与に対する電流応答を観察した。その結果、TMNニューロンにはTASK-1及びTASK-3が混在し、NO-cGMP-PKG系の活性化によってTASKチャンネルが制御されることで細胞の入力抵抗が変化し、運動ニューロンの動員様式が修飾される可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野： 医歯薬学
 科研費の分科・細目： 歯学・機能系基礎歯科学
 キーワード： 口腔生理学

1. 研究開始当初の背景

四肢や体幹の運動は、例えば野球バットやテニスラケットを振る等といった運動に代表される様に、動作距離が大きい等張性収縮運動の要素が強い。それに対し、咀嚼運動の可動範囲は四肢の運動に比べ小さく、また、実際に咀嚼力が発揮される運動範囲は更に小さいため、咀嚼運動の本質は「噛みしめ」のような等尺性収縮運動の制御にあると考えられる。随意的な「噛みしめ」時には、四肢筋における等尺性運動時と同様、サイズの原理に基づいた運動ニューロンの序列動員 (rank order recruitment) が実現されているとの報告があるが、その神経機構の詳細は明らかではない。

咀嚼運動系が、四肢運動系に比して最も特異な点は、 γ 運動系の関与の大きさである。ヒトの咬筋筋紡錘1個に含まれる錘内筋線維数は身体中で最大であり、四肢筋筋紡錘の数倍～十数倍である。それに対し、咬筋筋紡錘を支配する単一の Ia 群感覚神経線維は個々の α 運動ニューロンに対して数個のシナプスを与えるだけで、これは四肢筋の場合の数分の一である。一本の Ia 線維末梢枝は分枝して、通常複数の錘内筋線維の伸展受容器を支配するので、個々の錘内筋線維の伸展受容器が別々にインパルスを生じ、それらが一本の Ia 線維に収斂して、一連の時系列インパルス形成する。従って、多数の錘内筋線維を含む咬筋では、 γ 運動ニューロンの働きにより、顕著な時間的加重が Ia 線維- α 運動ニューロン間のシナプスで生じる可能性があり、Ia 線維- α 運動ニューロン間のシナプス入力の数個の少なさと合わせて考えると、咬筋の筋固有感覚が、 α 運動ニューロンに対して、空間的加重よりも、むしろ時間的加重を与えるように特化されている可能性を示唆しており、咀嚼運動制御における γ 運動系の重要性の大きさを示していると言える。

等尺性収縮時には、張力発生開始時から最大張力到達時まで、Ia インパルスはほぼ同じ周波数で維持される。このことは、 γ 活動を一定レベルにプリセットして維持することにより、等尺性収縮力つまり α 運動ニューロンの動員をある一定の割合で一定値まで増加させることができることを示している。このことから、等尺性収縮の要素が大きい咀嚼運動における γ 運動系の重要性が伺える。

こうした特異性により、精緻な咬合力調節が可能となっていると考えられるが、その可能性を実証するためには、 γ 運動ニューロンの興奮性調節機構及び α 運動ニューロンの動員機構における γ 運動ニューロンの役割を解明することが必須である。

2. 研究の目的

咀嚼運動における γ 運動系の特徴を明らか

にし、咀嚼運動制御の神経機構を解明するために、以下の分析を行なう。

- (1) 閉口筋運動ニューロンの電気生理学的及び組織学的分類
- (2) 三叉神経運動核に入る Ia 群神経線維束を連続電気刺激した際の閉口筋運動ニューロン序列動員様式の解析
- (3) 漏洩 K^+ チャンネルのコンダクタンスを両方向性に調節する 8-Br-cGMP を投与した際の閉口筋運動ニューロン序列動員様式の修飾

等尺性収縮時に見られる α 運動ニューロンの rank order recruitment の神経機構は、神経生理学上の大問題として、約半世紀もの間、未解明のままである。等尺性収縮要素が極めて高い咀嚼運動系は、この大問題を解明するのに、最も適した反射回路である可能性が高く、それ故、この大問題が解明される可能性が高い。

3. 研究の方法

- (1) 三叉神経運動核ニューロンの電気生理学的及び組織学的分類

5～12 日齢の Wistar 系ラットから三叉神経運動核を含む厚さ 250 μm の冠状断薄切標本を作成し、三叉神経運動核背外側部のニューロンに対し、whole-cell patch clamp を形成する。パッチ電極には、電気生理学的記録後の組織学的解析のため、biocytin または蛍光色素 lucifer yellow を混入しておく。

- I① 発火特性とそれを担うイオン機序に基づいた分類

電流固定下で直流パルス通電を行ない、単発の活動電位及び長パルス通電時の連続発火を記録する。その際、基線電位レベルの変更や、各種イオンチャンネル遮断薬の投与を行ない、発火特性の基となっているイオン機構を明らかにする。

- ② 組織学的特徴に基づいた分類

ホールセル記録終了後、薄切標本を固定液中に浸漬する。固定標本を通常の顕微鏡或いは共焦点レーザー顕微鏡で観察し、細胞体及び樹状突起等の形態的特徴の解析を行なう。

- ③ ①及び②の結果を踏まえ、三叉神経運動核内のニューロンの電気生理学的・組織学的分類を行なう。それによって、 α 及び γ 運動ニューロン、更に介在ニューロン等の電気生理学的特性を明らかにする。

- (2) 三叉神経運動核に入る Ia 群神経線維束を連続電気刺激した際の閉口筋運動ニューロン序列動員様式の解析

(1) と同様の薄切標本を用いる。三叉神経中脳路核からの入力線維束が通過する三叉神経運動核背内側隣接部にタングステン電極を刺入し、100 Hz 10 発の微小刺激を与えた際の閉口筋運動ニューロンの序列動員の様子を観察する。

① ホールセル電流固定同時記録法

三叉神経運動核背外側部にある大きさの異なる 2 つのニューロンに対し同時に whole-cell patch clamp を形成し、連続電気刺激に対する膜電位変化を観察することで、入力抵抗に依存した動員が行なわれているか否かを確認できる。

② 光学的膜電位測定法

事前に薄切標本を膜電位感受性色素 RH414 溶液に浸漬しておく。a) 同様、連続電気刺激を行ない、その際の閉口筋運動ニューロンプール内の興奮の様子を観察する。

(3) 漏洩 K⁺チャネルのコンダクタンスを両方向性に調節する 8-Br-cGMP を投与した際の閉口筋運動ニューロン序列動員様式の修飾

最近当教室の研究により、前脳基底部コリン作動性ニューロンにおいて、膜興奮性に多大な影響を与える漏洩 K⁺チャネルが、細胞外液 pH や一酸化窒素 (NO)-cGMP-PKG 系によって調節されることが明らかになり、そのチャネルの本体は TASK である可能性が示された。三叉神経運動核には TASK1/3 が発現していることや、同核へ投射する網様体ニューロンには NO 合成酵素を含むものがあることから、閉口筋運動ニューロンの興奮性調節に TASK チャネルが重要な役割を果たしていることが想定される。PKG を活性化し、漏洩 K⁺チャネルの TASK1 様及び TASK3 様コンダクタンスをそれぞれ上方、下方制御する 8-Br-cGMP を投与して、(2) で観察される序列動員様式がどのような修飾を受けるか観察する。

4. 研究成果

(1) 三叉神経運動核内には、A 型 K⁺電流を呈するもの、及び、A 型 K⁺電流と低閾値活性化型 Ca²⁺スパイク (LTS) を呈するもの、LTS のみを示すもの、Ca²⁺依存性陽イオン電流と持続性 Na⁺電流を呈し、長パルスのオフセット後に持続時間の長いパルス後電位や後発火を示すものの 4 種が存在することを見出した。過去の報告から、比較的サイズの大きい前二者が α 運動ニューロン、LTS のみを示すものが GABA 作動性介在ニューロン、最後のひとつが γ 運動ニューロンに対応していることが示唆された。

(2) ①ホールセル電流固定同時記録：連続電気刺激の強度を徐々に上げていくと、外向き電流パルスに対する電位応答の振幅から求めた入力抵抗が大きく、サイズが小さい運動ニューロンから先に発火し始めた。また、活動電位発生の見掛け上の閾膜電位は低く、連続刺激に対する発火頻度もより高かった。このことから、閉口筋ニューロンは、Ia

群線維からの興奮性入力により、入力抵抗に依存して動員されることが示された。

②光学的膜電位測定：連続する電気刺激列の後ろへ行く程、三叉神経運動核背外側部の閉口筋運動ニューロンプールに観察される応答(光学信号)の領域は大きくなり、最終的には同部全体にわたった。このことから、Ia 群線維からの興奮性入力は閉口筋運動ニューロンプール全体を支配し、動員される運動ニューロン群は興奮性入力の頻度に依存することが示唆された。

(3) 8-Br-cGMP の投与によって、入力抵抗が大きくサイズの小さいニューロンでは、膜の過分極及び入力抵抗の低下が生じ、入力抵抗が小さくサイズの大きいニューロンでは、逆方向の変化が生じた。こういった逆方向の変化が同時記録された 2 つのニューロンでも観察することができた。その際、8-Br-cGMP 投与前には両ニューロン間で大きく異なっていた活動電位の発火タイミングが、8-Br-cGMP 投与によって近似してくる現象がみられた。これらのことから、NO 作動性の入力によって、閉口筋運動ニューロンの序列動員様式が修飾を受けることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Saito, M., Toyoda, H., Sato, H., Ishii, H. & Kang, Y. A rapid use-dependent downregulation of GABA_A receptors in rat mesencephalic trigeminal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, in press, 2009.
- ② Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Dempo, Y., Ohashi, A., Hirai, T., Maeda, Y., Kaneko, T. & Kang, Y. cGMP activates a pH-sensitive leak K⁺ current in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *Journal of Neurophysiology*, 99: 2126–2133, 2008.
- ③ Sato, H., Shimanuki, Y., Saito, M., Toyoda, H., Maeda, Y., Nokubi, T., Yamamoto, T. & Kang, Y. Differential columnar processing in local circuits of barrel and insular cortices. *The Journal of Neuroscience*, 28: 3076–3089, 2008.
- ④ Kang, Y., Dempo, Y., Ohashi, A., Saito, M., Toyoda, H., Sato, H., Koshino, H., Maeda, Y. & Hirai, T. Nitric oxide activates leak K⁺ currents in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *Journal of Neurophysiology*, 98: 3397–3410, 2007.
- ⑤ Kang, Y., Saito, M., Sato, H., Toyoda, H., Maeda, Y., Hirai, T. & Bae, Y.C. The

involvement of persistent Na^+ current in spike-initiation in primary sensory neurons of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 97: 2385–2393, 2007.

〔学会発表〕 (計 14 件)

- ① Saito, M., Toyoda, H., Sato, H., Ishii, H. & Kang, Y. PKC- and Ca^{2+} -dependent recovery from use-dependent depression of GABA_A responses in rat mesencephalic trigeminal neurons. *The 6th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies*, July 13, 2008, Palexpo Conference Center, Geneva, Switzerland.
- ② Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Kang, Y. cGMP activates a pH-sensitive leak K^+ current in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *The 6th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies*, July 14, 2008, Palexpo Conference Center, Geneva, Switzerland.
- ③ Sato, H., Saito, M., Toyoda, H., & Kang, Y. Differential columnar processing in local circuits of barrel and insular cortex. *The 6th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies*, July 14, 2008, Palexpo Conference Center, Geneva, Switzerland.
- ④ Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Dempo, Y., Ohashi, A., Hirai, T., Maeda, Y., Kaneko, T. & Kang, Y. Nitric oxide activates TASK1-like leak K^+ channels in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *Society for Neuroscience 37th Annual Meeting*, November 4, 2007, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.
- ⑤ Sato, H., Dempo, Y., Ohashi, A., Saito, M., Toyoda, H., Maeda, Y., Hirai, T. & Kang, Y. Nitric oxide activates leak K^+ currents in the presumed cholinergic neuron of basal forebrain. *Society for Neuroscience 37th Annual Meeting*, November 4, 2007, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.
- ⑥ Hirao, K., Ogawa, T., Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Kanematsu, T., Hirata, M. & Kang, Y. Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) regulates GABA_A responses in the barrel cortex. *Society for Neuroscience 37th Annual Meeting*, November 5, 2007, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.
- ⑦ 齋藤充, 姜英男. 三叉神経中脳路核ニューロンが示す二つの機能モードとその電位依存的スイッチング. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム「口

腔機能と中枢神経系の研究を考える —ニューロンから全身まで—, 9月23日, 2008, TOC 有明コンベンションホール, 東京.

- ⑧ 齋藤充, 佐藤元, 豊田博紀, 姜英男. 三叉神経中脳路核ニューロンにおけるグルタミン酸受容体チャンネルに対する h チャンネルの干渉作用. 第 101 回近畿生理学談話会, 9月13日, 2008, 国立循環器病センター, 吹田.
- ⑨ 豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元, 姜英男. 前脳基底野コリン作動性ニューロンにおける TASK1 類似 K^+ 電流に対する PKG の調節作用. 第 101 回近畿生理学談話会, 9月13日, 2008, 国立循環器病センター, 吹田.
- ⑩ 佐藤元, 豊田博紀, 齋藤充, 姜英男. 大脳皮質興奮性入力のカラム内同期化に関与する GABA_B シナプス前抑制. 第 101 回近畿生理学談話会, 9月13日, 2008, 国立循環器病センター, 吹田.
- ⑪ Saito, M., Sato, H., Toyoda, H. & Kang, Y. Differential involvement of GABA_A IPSPs in inter-columnar communication in the barrel and insular cortices. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会. 9月12日, 2007, パシフィコ横浜, 横浜.
- ⑫ Sato, H., Saito, M., Toyoda, H. & Kang, Y. Interaction between h-channels and glutamate receptor channels in the mesencephalic trigeminal neurons. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会. 9月12日, 2007, パシフィコ横浜, 横浜.
- ⑬ Toyoda, H., Saito, M., Sato, H. & Kang, Y. Roles of phospholipase C-related inactive protein (PRIP) in modulating GABA_A IPSCs. 第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同大会. 9月12日, 2007, パシフィコ横浜, 横浜.
- ⑭ 齋藤充, 豊田博紀, 石井久淑, 佐藤元, 姜英男. ラット三叉神経中脳路核ニューロンに発現する GABA_A 受容体分子の輸送における PKC の関与. 第 48 回歯科基礎医学会, 8月31日, 2007, 北海道大学, 札幌.

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 姜英男, 豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元. 三叉神経中脳路核ニューロンにおけるインパルストラフィッキング; 生命歯科医学のカッティングエッジ(米田俊之編). 大阪大学出版会, 大阪, pp. 157–166, 2008.
- ② 齋藤充, 姜英男. 第 12 章 脳と行動 II 情動; 基礎歯科生理学 第 5 版(森本俊文, 山田好秋編). 医歯薬出版, 東京, pp. 242–249, 2008.

[産業財産権]

なし

[その他]

ウェブページ

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

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

研究者番号：50347770

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし