Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット三叉神経運動ニューロンのスパイク後電位における力ルシウムコンダクタンスの役割
Author(s)	小林, 真之
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128968
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

博士論文

ラット三叉神経運動ニューロンのスパイク後電位におけるカルシウムコンダクタンスの役割

— Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. —

1997年

大阪大学歯学部口腔生理学講座

小林真之

1

博士論文

ラット三叉神経運動ニューロンのスパイク後電位における カルシウムコンダクタンスの役割

— Role of calcium conductances on spike afterpotentials in rat trigeminal motoneurons. —

大阪大学歯学部口腔生理学講座

小林真之

目次

1．要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2

2．緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

3．方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

4．結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7

5．考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

6．謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

7．文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19

8．図の説明 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24

9．図 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28

10．付録（共著論文—英文—）

なお、本論文は巻末に付した Journal of Neurophysiology に投稿した共著論文（英文）を和訳し、一部改変したものである。

要約

ニューロンの活動電位に続く再分極過程およびスパイク後電位は、ニューロンの放電頻度を決定する１つの重要な要素であると考えられている。本研究では、ラット三叉神経運動ニューロンの活動電位の再分極過程およびスパイク後電位に関与する膜のイオン透過機構を明らかにするためにスライス標本を用いて同ニューロンから細胞内記録を行い、以下のような結果が得られた。

1．活動電位の発生に続いて、持続の短い後過分極電位（fAHP）、後脱分極電位（ADP）そして持続が比較的長い後過分極電位（mAHP）が認められた。

2．mAHP　はカルシウム依存性カリウムチャネルの内、ＳＫチャネルのブロッカーであるapamin（1 μM）、無機イオンのカルシウムチャネルブロッカーであるMn^{2+}・Co^{2+}（2　mM）、Ba^{2+}（0.5～5　mM）の灌流投与あるいはEGTAの細胞内注入により抑制された。これらの結果から mAHP はカルシウムイオンの細胞内流入によって活性化されるカリウムコンダクタンスの増大によって生じることが示唆された。

3．apamin で mAHP を抑制した 16 個のニューロンの内 9 例で ADP の増大が認められた。また、mAHP の初期の部分は ADP と重複していることが示唆された。そこで apamin を投与して mAHP を抑制しカルシウムブロッカーの mAHP に対する影響を除いた条件下で、Mn^{2+} あるいは Cd^{2+} を灌流投与すると ADP は抑制された。

4．同じ条件下で細胞外カルシウム濃度を 2 mMから 8 mMへ上昇させた場合、あるいはBa^{2+}（0.5～5　mM）の灌流投与、EGTA の細胞内注入を行うと ADP は増大した。これらの結果から ADP は細胞内のカルシウム依存性の過程の活性化によるのではなくカルシウムイオンの流入そのものによって発生している可能性が考えられた。

5．N タイプカルシウムチャネルのブロッカーである ω-CTx-GVIA（10～30 μM）をスライス上に滴下投与したところ、mAHP は抑制され ADP は増大した。一方、P タイプカルシウムチャネルのブロッカーである ω-Aga-IVA（100 μM）をスライス上に滴下投与すると mAHP はほとんど影響を受けずに ADP のみが抑制された。mAHP の抑制と ADP の増大は脱分極性の細胞内パルス通電に対する連続発火の頻度を著明に上昇させた。

6．T タイプカルシウムチャネルのブロッカーである Ni^{2+} （500 μM）の灌流投与によっては mAHP はほとんど影響を受けず ADP のみが抑制された。細胞内通電によるニューロンの連続発火時においては、最初のスパイクに続く ADP のみが抑制され、以後のスパイクに続く ADP にはほとんど効果を示さなかった。

7．カルシウム依存性カリウムチャネルの内、ＢＫチャネルのブロッカーである

charybdotoxin およびＳＫチャネルのブロッカーである apamin は活動電位の再分極過程にほとんど影響を及ぼさなかったが、主に遅延整流型カリウム電流をブロックするtetraethylammonium（TEA、1～10mM）あるいはA電流のブロッカーである 4-aminopyridine（4-AP、500 μM）は活動電位の再分極過程を延長し fAHP を消失させた。

以上の結果から、スパイク後電位の内、ADP は ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルを経て流入したカルシウムイオンにより形成され、mAHP は ω-CTx-GVIA 感受性のカルシウムチャネルを経て流入したカルシウムイオンがカルシウム依存性カリウム電流を増大させることにより形成されること、またラット三叉神経運動ニューロンにおいて ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルは樹状突起に多く分布し、ω-CTx-GVIA 感受性のカルシウムチャネルは細胞体に多く分布することが示唆された。

緒言

脊髄運動ニューロン、舌下運動ニューロンおよびモルモットの三叉神経運動ニューロンでは活動電位に続いて後脱分極電位（ADP）と中等度の持続時間をもった後過分極電位（mAHP）が認められている（Chandler et al. 1994；Granit et al. 1963；Harada and Takahashi 1983；Vianna et al. 1993b；Walton and Fulton 1986）。ADP が増大するとそのピークから活動電位が生じる（Vianna et al. 1993a）。一方、mAHP は発火頻度を低下させる重要な要素である（Hille 1992）。このように ADP と mAHP のバランスは脊髄・延髄での運動ニューロンの発火パターンの決定に関与し、三叉神経運動ニューロンの場合にも咀嚼筋への出力に重要な影響を及ぼすと考えられる。

一方、ニューロン膜の興奮性レベルの決定にカルシウムイオンは重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、ニューロン膜上に存在する電位依存性カルシウムチャネルは少なくとも5つのタイプ（L、N、P、Q、Tタイプ）に分類されており（Bean 1989；Hess 1990；Llinas et al. 1989；Mintz et al. 1992；Randall and Tsien 1995）、複数のタイプのカルシウムチャネルが単一ニューロン膜に存在する（Bean 1989；Miller 1987）。また、これらのカルシウムチャネルはそのタイプ毎に異なる生理学的な機能を果たしている可能性がある（Christie et al. 1995）。例えば、脊髄および舌下運動ニューロンにおいて ADP の形成に対するカルシウム電流の役割が報告されており（Harada and Takahashi 1983；Umemiya and Berger 1994；Vianna et al. 1993a；Walton and Fulton 1986）、また、モルモット三叉神経運動ニューロンでは、他の運動ニューロン同様、カルシウム依存性カリウム電流が mAHP の形成に関与することが明らかにされている（Barrett and Barrett 1976；Chandler et al. 1994；Nishimura et al. 1989；Sah and McLachlan 1992；Viana et al. 1993b；Walton and Fulton 1986；Zhang and Krnjevic 1987）。したがって、カルシウムイオンの流入は ADP と mAHP を同時に形成している可能性がある。しかし ADP と mAHP の形成に対して、どのタイプのカルシウムチャネルが制御しているかは未だ明らかではない。

本研究では、スライス標本を用いて細胞内記録法を行い、ラット三叉神経運動ニューロンにおける ADP と mAHP の形成機構を調べた。その結果、ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルを経て流入したカルシウムイオンが ADP を形成し、ω-CTx-GVIA 感受性のカルシウムチャネルを経て流入したカルシウムイオンはカルシウム依存性カリウム電流を活性化して mAHP を形成することが明らかになった。これらの結果から三叉神経運動ニューロン膜のカルシウムチャネルはタイプによってそれぞれ特異的な生理学的機能を果たしていることが明らかにされた。

方法

実験動物には、７９匹の 3～6 週齢の S.D.ラットを用いた。細胞内記録したニューロンが三叉神経運動ニューロンであることを組織学的に同定するため、２０匹の動物において蛍光二重染色法（Vianna et al. 1990）を行った。そのため、まず塩酸ケタミン（150mg/kg；筋注）と塩酸クロルプロマジン（12.5mg/kg；筋注）で動物を麻酔し、両側の咬筋神経を剖出し切断した。その切断端の中枢側に少量のdextran-tetramethylrhodamine-lysine（DRL；10,000 MW、Molecular Probes）の結晶を３０分間接触させた後、切断端を生理食塩水で洗浄した。２－５日後、動物を再麻酔し、以下のような方法で三叉神経運動核を含むスライス標本を作製した。

まず、塩酸クロルプロマジンを前投与（12.5 mg/kg；筋注）し、塩酸ケタミン（150 mg/kg；筋注）で麻酔した動物を断頭し、頭蓋骨を除去して脳を取り出し、氷冷した蔗糖置換人工脳脊髄液中で上丘と下丘の間のレベルと閂のレベルの２カ所で脳幹を横切断した。切り出した脳幹のブロックの吻側をシアノアクリレート接着剤でステージに接着し、マイクロスライサーにて厚さ 450 μmのスライス標本を作製した。切り出したスライス標本は標準人工脳脊髄液中で室温下で培養した。

標準人工脳脊髄液の組成は以下の通りである。NaCl 130 mM、KCl 3 mM、$MgCl_2$ 2 mM、NaH_2PO_4 1.25 mM、$NaHCO_3$ 26 mM、$CaCl_2$ 2 mM、D-glucose 10 mM。蔗糖置換人工脳脊髄液は標準人工脳脊髄液中の NaCl を sucrose 260 mM に置換したものである。標準人工脳脊髄液および蔗糖置換人工脳脊髄液には混合ガス（95% O_2 - 5% CO_2）を通気し、pHを 7.35～7.40 に維持した。蔗糖置換人工脳脊髄液をスライス標本作成中に用いることで、活性のよいスライス標本が得られた（Aghajanian and Rasmussen 1989；Chandler et al. 1994）。高濃度の細胞外カルシウムイオンの影響を調べる実験では $CaCl_2$ 濃度を 6～8 mMに上昇させた。Mn^{2+}、Co^{2+}、Ba^{2+}、Cd^{2+} を標準人工脳脊髄液に加える場合、それぞれ $CaCl_2$（2 mM）を $MnCl_2$（2 mM）、$CoCl_2$（2 mM）、$BaCl_2$（0.5～5 mM）あるいは $CdCl_2$（500 μM）に置換し、沈殿を避けるため NaH_2PO_4 を除いた。Cl^- の影響を調べる場合は同濃度の isethionate に置換し、アース電極は agar-KCl bridge を用いた。以下の薬物は、潅流する標準人工脳脊髄液中に溶解させて投与した。tetrodotoxin（TTX、1 μM）（Wako）、tetraethylammonium chloride（TEA、1～10 mM；同濃度の NaCl と置換）、4-aminopyridine（4-AP、0.5 mM）、charybdotoxin（ChTX、10～30 nM）（Peptide）、$NiCl_2$（0.5 mM）、nifedipine（10 μM；無水エタノール中に溶解）。Apamin（10～100 μM）（Peptide）、ω-conotoxin GVIA（ω-

CTx-GVIA、15～20 μM）（Peptide）、ω-agatoxin IVA（ω-Aga-IVA、10～100 μM）（Peptide）は標準人工脳脊髄液に溶解し、マイクロピペットを用いてスライス標本上に滴下して投与した。

記録

培養用チャンバー中で 2～12 時間培養した後、スライス標本をインターフェース型チャンバーに移して記録を行った。インターフェース型チャンバーには流速 1～1.5 ml/分で標準人工脳脊髄液を潅流させ、スライス標本の表面には加湿した混合ガス（95% O_2 - 5% CO_2）を流した。標準人工脳脊髄液は 32 ± 1 ℃に維持した。記録電極はマイクロピペットプラー（Sutter Instruments 社製）を用いて直径 1.2～1.5 mmのガラス管（Sutter Instruments 社製）から作製した。電極内溶液は 1 M KCl に 0.05 M トリス緩衝液を加えたものを pH 7.6 に調整して用いた。予め DRL を咬筋神経に取り込ませた 20 匹の動物のスライス標本では電極内溶液に 2% biocytin（Sigma）を入れて記録細胞の染色を行った。細胞内のカルシウムイオンをキレートする場合、電極内溶液には 0.25 M ethylene glycol-bis（b-aminoethylenether）-N,N,N',N'-tetraacetic acid（EGTA）（Sigma）を 1 M KCl溶液に溶解させたものを用いた。電極の抵抗は 30～130 MΩ であった。増幅器は Axoclamp 2B（Axon Instruments 社製）を用い、bridge もしくは discontinuous current-clamp（DCC）モードで記録した。DCCモードでの記録は、2～5 kHz のサンプルレートで行った。ヘッドステージからの出力はオシロスコープ上でモニターし、capacitance の調整が適切に行われていることを確認した。膜電位と電流はデータ取得用 software（Clampex, Axon Instruments 社製）を用いて A-D converter を介してコンピューターのハードディスクに取り込み、分析を行った。

データは平均±標準誤差で表示し、Student's t-test を用いて有意差検定を行い、$P < 0.05$ のものを有意差があると判定した。

記録後、DRL を咬筋神経に取り込ませた動物から作製したスライス標本は 4 %パラホルムアルデヒドで 12～24 時間固定した後、25 %蔗糖溶液で 12～24 時間脱水した。その後、スライス標本を凍結させクリオスタットで厚さ 25～30 μmの切片を作製した。切片は fluorescein isothiocyanate（FITC）-conjugated streptavidin（1 : 100）（Amersham）で10分間反応させ、蛍光顕微鏡にて記録したニューロンを検索した。さらに biocytin を注入したニューロンが三叉神経運動核内に存在するか否かを確認するため、切片を horseradish peroxidase（HRP）-conjugated streptavidin（1 : 500）（Dako）で 60 分間室温下で培養し、DAB 反応で可視化した後、ニュートラルレッドで対比染色を行った。

結果

三叉神経運動ニューロンの同定

三叉神経運動核は、三叉神経感覚核の内側に存在する楕円形の領域として実体顕微鏡下で確認でき、記録電極をその部位に刺入した。一部の実験では、記録したニューロンが三叉神経運動核に存在することを確認するために、記録ニューロン内に biocytin を注入し細胞内染色を行った（n = 40）。細胞内染色されたニューロンは全て三叉神経運動核内に存在した。三叉神経運動核内に存在するインターニューロンは僅かであることから、三叉神経運動核内に存在するニューロンのほとんどが運動ニューロンであると考えられる（Sessle 1977）。したがって、以後の実験では組織学的なニューロンの同定は行わなかった（n = 108）。また、上記の 40 個のニューロンのうち 15 個のニューロンは DRL にも染色されていたことから（図 1）、咬筋運動ニューロンであることが確認された（方法参照）。

運動ニューロンの基本的性質

静止膜電位が -55 mV （-67.2 ± 0.5 mV；n = 148）以下で安定し、活動電位が静止膜電位から 70 mV 以上の大きさをもつニューロン 148 個について、電気生理学的特性を分析した。入力抵抗の測定は小さい電流強度（-0.2～-0.5 nA）で、持続時間 300 ms の細胞内通電を行い、通電開始 200 ms 以後の定常状態における膜電位応答の大きさと電流強度との関係から算出した（13.4 ± 0.7 MΩ；n = 141）。Rheobase は連続5回以上の持続 300 ms の脱分極性パルス通電に対して常に1発以上の活動電位が発生する最小の電流強度の値とした（1.5 ± 0.1 nA ；n = 94）。記録したニューロンにはいずれも自発性の発火は認められなかった。活動電位は持続 2～3 ms の脱分極性細胞内パルス通電により誘発し、その振幅の平均は94.8 ± 0.8 mV（n = 148）で平均持続時間は0.7 ± 0.01 ms（n = 144；閾値から 10 mV 以上脱分極した電位の持続時間を測定）であった。

148 個中 132 個のニューロンで活動電位の発生に続いて fAHP、ADP、mAHP からなる 3 相性のスパイク後電位が観察された（図 2A）。これらの電位の内、本実験では主として ADP と mAHP について分析した。mAHPの振幅は静止膜電位と最も過分極した時点の電位との差として計測したが、その平均は 4.7 ± 0.2 mV（n = 148）であった（図 2A、empty arrow head）。また、mAHPの平均持続時間は 56.5 ± 1.6 ms（n = 148）であった。ADP の振幅はそのピークと静止膜電位との差として測定し、その平均は 10.6 ± 0.5 mV（n = 132）であった（図 2A、filled arrow head）。活動電位誘発の閾値以下の細胞

内パルス通電に対して ADP 様の脱分極性電位の発生はほとんど認められなかった。残り 16 個のニューロンに関しては明瞭な ADP が認められなかったため、ADP の分析から除外した。

スパイク後電位に対する膜電位の影響

細胞内に直流通電を行い膜電位を変化させると、単一活動電位に続くスパイク後電位の振幅に変化が認められた（図 2B）。スパイク後電位の大きさは 4 つの点線で示す時点で測定した。白丸と黒丸は、静止膜電位（-58 mV）において fAHP と ADP の振幅がピークに達する時点を示している。mAHP の振幅の大きさは静止膜電位において mAHP がピークに達する時点（黒四角）と細胞内パルス通電の開始から 30 ms 後の時点（白四角）で測定した。膜電位に対するこれらの振幅をプロットしたものを図 2C および D に示す。スパイク後電位の反転電位は最小二乗法を用いて算出した。8つのニューロンについて mAHP がピークに達する時点で計測した反転電位と細胞内パルス通電開始 30 ms 後の時点で計測した反転電位はそれぞれ、-80 ± 2 mV（n = 8）と -83 ± 2 mV（n = 8）であった。細胞外カリウムイオンの濃度を 3 mM、細胞内濃度を 80～200 mM（Buhrle and Sonnhof 1983、Galvan et al. 1984）、潅流液の温度を32℃とした場合、Nernst の式から算出したカリウムイオンの平衡電位は -86～-100 mV となり、いずれの mAHP の反転電位もこの値と比べてやや脱分極していた。しかし、fAHPの反転電位（-59 ± 2 mV；n = 8）はカリウムイオンの平衡電位よりはるかに脱分極しており ADP の反転電位（-58 ± 2 mV；n = 7）に近かった。また、fAHP の電位-振幅直線の傾きは ADP の傾きに近似していた（図 2C）。これらのことは fAHP と ADP が互いに影響し合っていることを示唆している。

mAHP形成のイオン機序

mAHPの形成におけるカルシウム依存性を調べるため以下のような順序で実験を行った。第一に、細胞外カルシウムイオン（2 mM）を無機イオンのカルシウムチャネルブロッカーであるMn^{2+}（2 mM）あるいは Co^{2+}（2 mM） で置換した場合、30～60 分後には mAHP の振幅はそれぞれ 64 ± 15%（n = 5） および 67 ± 15%（n = 5）減少した（図 3A）。第二に、EGTA（0.25 M）を含む記録電極を用いて EGTA の細胞内注入を行うと、注入開始から 10～40 分で、mAHP はほぼ完全に抑制された（n = 5；図 3B）。第三に、カルシウムチャネルを通過できる Ba^{2+}（2 mM）で細胞外カルシウムイオン（2 mM）を置換すると、可逆的にmAHPの振幅を 69 ± 7 %（n = 7；図 3Ca）抑制した。これらの結果は mAHP の形成にカルシウムイオンが必要であることを示している。

そこで、次に mAHP の形成にカルシウム依存性カリウムチャネル（ＳＫあるいはＢＫチャネル）が関与するか否かを調べるために、ＳＫチャネルの選択的ブロッカーである apamin（Blatz and Magleby 1986；Pennefather et al. 1985）あるいはＢＫチャネルの選択的ブロッカーである ChTX（Blatz and Magleby 1987；Latorre et al. 1989）の投与効果を調べた。スライス表面上への apamin の滴下投与（10～20 μM、n = 15）あるいは潅流投与（1 μM、n = 1）を行ったところ、全例において mAHP はほぼ完全に抑制された。図 4A に示すように、apamin 投与によって mAHP の振幅は 95 ± 3%（n = 16）減少したが、活動電位の振幅、持続時間および入力抵抗はほとんど影響されなかった。一方、ChTX（10～30 nM）の潅流投与は ADP と mAHP にほとんど影響を与えなかった(n = 8；図 4B）。

ADP形成のイオン機序

apamin による mAHP の抑制によって、16 例中 9 例で ADP の振幅の増大が認められたことから（図 4A）、mAHP の初期の部分は ADP と重複していると考えられる。そこで、apamin によって mAHP を抑制した状態で、ADP に対するMn^{2+}、Cd^{2+} の潅流投与による効果と細胞外カルシウムイオン濃度の上昇による効果を調べた。apamin 存在下でMn^{2+} あるいは Cd^{2+} を潅流投与すると ADP の振幅は 26 ± 6 %（n = 6；図 5A）減少した。活動電位発生に伴う ADP の振幅をより正確に評価するために、細胞内パルス通電に対する活動電位発生の閾値直下の膜電位応答を活動電位のトレースから差し引いて（図 5A 挿入図）、ADP の振幅を ADP のピークとベースラインの値の差として算出したところ、apamin 存在下での無機イオンのカルシウムブロッカーの潅流投与はADPの振幅を 42 ± 9 % 減少させた（n = 6）。一方、apamin 存在下で細胞外カルシウムイオン濃度を 2 mM から 8 mM に上昇させると ADP の振幅は 29 ± 3 % 上昇した（n = 3；図 5B）。これらの結果から ADP の形成には少なくともカルシウム依存性の要素が含まれることが示唆された。

EGTA の細胞内注入によって mAHP はほぼ完全に抑制されるとともに ADP の振幅は 147 ± 55 %（n = 5）増大した（図 3B）。一方、apamin は mAHP をほぼ完全に抑制するとともに、ADP の振幅を 16 例中 9 例で 9 ± 5 % 増大させた（図 4A）。このように EGTA の細胞内注入による ADP の振幅の増大は apamin による ADP の増大より有為に大きかった（t = 3.48、P ＜ 0.01）。さらに細胞外カルシウムイオンを 0.5～5 mM Ba^{2+} に置換すると ADP の振幅の増大が認められた（図 3C および D）。この Ba^{2+} の効果は濃度依存的で可逆的だった。高濃度の Ba^{2+}（2～5 mM）の投与によりADPは著しく増強されバースト状の活動電位発射が誘発された（図 3C および D）。これらの所見から、

ADPはカルシウム依存性の過程が活性化されて形成されるというよりむしろ細胞外カルシウムイオン自体が電荷の担い手としてADPを形成していると考えられた。

選択的カルシウムチャネルブロッカーのADPとmAHPに対する効果

ADPおよびmAHPに対する高閾値型カルシウムチャネルの選択的ブロッカーの効果を調べた。Nタイプカルシウムチャネルのブロッカーである ω-CTx-GVIA のADPおよびmAHPに対する効果はapamin投与による効果と類似していた。ω-CTx-GVIA（10～30 μM）をスライス標本上に滴下投与するとmAHPの振幅は87 ±9 %（n = 5）抑制され、一方ADPの振幅は5例中4例のニューロンで30 ±12 %増加した（図6A）。したがって、ω-CTx-GVIAはapamin同様、mAHPを抑制することにより、間接的にADPの振幅を増大させたものと考えられる。一方、Pタイプカルシウムチャネルのブロッカーであるω-Aga-IVA（100 μM）の滴下投与では、ADPの振幅が37 ±8 %（n = 4）減少したが、mAHPの振幅に著明な変化は認められなかった（図6B）。さらにapamin存在下でω-Aga-IVA（100 μM）を滴下投与すると、ADPの振幅は37 ±11 %（n = 6）減少した（図6C）。なお、Lタイプカルシウムチャネルのブロッカーであるnifedipine（10～20 μM）の潅流投与では、ADPとmAHP共にほとんど影響が認められなかった（n = 3）。

さらに、低閾値型カルシウムチャネルのブロッカーのADPおよびmAHPに対する効果を検討するため、Ni^{2+}投与の効果を調べた。500 μM Ni^{2+}をカルシウムイオン2 mMを含む潅流液中に投与するとADPの振幅は37 ±12 %抑制されたが、mAHPの振幅はほとんど変化しなかった（n = 4；図6D）。次に、apaminによってmAHPを抑制した状態でNi^{2+}のADPに対する効果を調べたところ、Ni^{2+}（500 μM）はADPの振幅を33 ±3 %抑制した（n = 5；図6E）。また図6Fに示すようにapamin存在下でNi^{2+}を投与してADPの振幅の減少を確認した後、ω-Aga-IVAを投与するとさらにADPが抑制されたことから、ω-Aga-IVAおよびNi^{2+}感受性のカルシウム電流がADPの形成に関与すると考えられた。

カルシウムチャネルブロッカーの連続発火時におけるスパイク後電位に対する効果の違い

Ni^{2+}は脊髄運動ニューロンおよび舌下運動ニューロンにおいては低閾値型カルシウムチャネルを阻害する（McCobb et al. 1989；Viana et al. 1993a）が、高閾値型カルシウム電流を抑制するとの報告もある（Randall and Tsien 1995；Zhang et al. 1993）。そこで、Ni^{2+}が低閾値型カルシウムチャネルを阻害していることを確認するため、以下の実験を行った。まず、1秒間の脱分極性細胞内パルス通電によって活動電位を連続発火させると、全ての活動電位の後にADPが観察された（図7～9）。最初のADPの振幅（filled

arrow head）はそれ以後の ADP（empty arrow heads）の振幅より大きく、最初の mAHP の最も過分極している電位はそれ以後の mAHP の電位より脱分極していた（図 7A、8A および 9C）。この結果は、1秒間の脱分極性細胞内パルス通電の初期に脱分極性の電位が発生していると考えられ、低域値型カルシウムチャネルが活性化されている可能性を示唆している。

この点をさらに確認するため、次に、連続発火における ADP に対する ω-Aga-IVA と Ni^{2+} の効果の違いを調べた。図 7 に示すニューロンでは、細胞内通電量に関係なく活動電位の閾値より ADP のピークの電位が脱分極していた（図 7A、左）。しかし、ω-Aga-IVA の投与によって、点線で示すように活動電位の閾値と mAHP のピークの電位はわずかに過分極し、ADP のピークの電位は活動電位の閾値より過分極方向に移動した（図 7A、右）。この結果からω-Aga-IVA 投与中でも1発目の ADP の振幅はそれ以後の ADP の振幅より大きいものの、ω-Aga-IVA は1発目およびそれ以後の ADP の振幅を抑制するといえる。1発目の ADP とそれ以後の ADP に対する ω-Aga-IVA の効果の違いを評価するため、1発目の活動電位に続くスパイク後電位と4発目の活動電位に続くスパイク後電位を、それぞれ対照のトレースから ω-Aga-IVA 投与時のトレースを差し引いて比較した。対照と ω-Aga-IVA 投与時の1発目の活動電位のトレースの重ね合わせと、同様の4発目のトレースの重ね合わせをそれぞれ図 7Ba と Bb に示す。1発目と4発目の活動電位の対照のトレースから Aga-IVA 投与時のトレースを差し引いた成分（図 7Ba および Bb、下段）は ω-Aga-IVA-感受性の成分を同程度に含んでおり、スパイク後電位（fAHP と ADP）のみならず活動電位自体にも ω-Aga-IVA 感受性の成分が含まれていた。1発目と4発目のスパイク後電位における ω-Aga-IVA 感受性成分に大きな違いはなかった。ω-Aga-IVA 感受性成分の大きさを ADP がピークに達する時点（arrow head）で計測すると、1発目に対する4発目の成分は 83 ± 3 %（n = 4）であった。

一方、Ni^{2+} の ADP に対する効果は1発目とそれ以後のものとで異なっていた。Ni^{2+} の投与によって1発目の ADP は抑制されたが、それ以後に続く ADP に対しては著明な抑制効果は認められなかった（図 8A、左と右を比較）。ADP のピーク時点(arrow head)で計測した4発目の ADP の Ni^{2+} 感受性の成分は1発目の ADP に対する効果と比較して 10 ± 4 %（n = 4）しかなかった（図 8Ba および Bb）。このように1発目の ADP にのみ Ni^{2+} 感受性の脱分極性の成分が含まれることは、Ni^{2+} が不活性化の早い脱分極性の成分を抑制していること、すなわち、Ni^{2+}が低域値型カルシウムチャネルを抑制していることを示している。

ω-CTx-GVIA、apamin あるいは Ba^{2+} の投与による mAHP の抑制と ADP の増強効果は1秒間の脱分極性細胞内パルス通電によって誘発した連続発火パターンを著明に変化さ

せた。apamin 投与は他の運動ニューロンで報告されているように rheobase と入力抵抗には影響を及ぼさず発火頻度を増加させた（Chandler et al. 1994；Nishimura et al. 1989；Sah and McLachlan 1992；Viana et al. 1993b）。細胞内通電量に対して定常状態における発火頻度をプロットして求めた SS *f* - *I* 直線の傾きは apamin によって 502 ± 84 %（n = 7）増加し（図 9F）、細胞内通電量を増加させると1発目の ADP のピークから活動電位が発生した。脱分極性細胞内パルス通電の終わりに認められる post burst AHP（図 9Cb、矢印）は、apamin 投与によって消失した。ω-CTx-GVIA 投与では apamin 投与時同様、SS *f* - *I* 直線の傾きが増大した（図 9E）。ω-CTx-GVIA 投与時に細胞内通電量を 1.9 nA 以上にすると 1 発目の ADP から活動電位発射が認められ（図 9Da、filled arrow head）、最初の活動電位間の発火頻度（1st ISI）が著明に増加した（図 9E、矢印）。このような現象は標準人工脳脊髄液を潅流した状態ではほとんど認められなかった。ω-CTx-GVIA は apamin とは異なり post burst AHP を完全に抑制することはなかった（図 9Db）。Ba^{2+} の 1st ISI に対する効果は apamin および ω-CTx-GVIA に比べて著明であり、高濃度の Ba^{2+}（2～5 mM）を投与すると、短い持続時間の細胞内パルス通電（2～3 ms）によってバースト状の発火を引き起こした（図 3C および D）。

活動電位の再分極過程におけるイオン機序

最後に、活動電位の再分極過程に対するカリウム電流のブロッカー（TEA、4-AP）の効果を調べた。1 mM および 10 mM の TEA の潅流投与により、活動電位の持続時間はそれぞれ 118 ± 19 %（n = 6）および 497 ± 66 %（n = 5）延長し、いずれの場合も活動電位の脱分極過程にはほとんど影響が認められなかった（図 10A）。また、1 mM TEA の潅流投与によって mAHP の振幅および持続時間がそれぞれ66 ± 17%（n = 6）および 19 ± 12%（n = 5）増加したのに対し、10 mM TEA の潅流投与では 5 例中 4 例のニューロンで mAHP の振幅が 34 ± 5 %減少し、持続時間が 37 ± 11 %（n = 5）延長した。これらの TEA の効果は可逆的であった。一方、4-AP の活動電位に対する効果は 4 例のニューロンで調べた。500 μM の 4-AP を潅流投与すると活動電位の持続時間は 141 ± 10 %（n = 4）延長し、活動電位の脱分極過程にほとんど影響を与えなかった（図 10B）。また 4-AP の潅流投与は自発性のシナプス入力の増大を引き起こすため、ADP と mAHP の詳細な解析は行わなかった。4-AP の投与による静止膜電位への影響はほとんど認められなかった。また、10～20 μMの apamin のスライス標本上の滴下投与および 10～30 nM の ChTX 潅流投与ともに活動電位の持続時間に影響を与えなかった（図 4A および B、挿入図）。

なお、図 10C に示すように mAHP と ADP の振幅の間には負の相関関係が認められた

（r = -0.56、P < 0.001）。

考察

活動電位の再分極過程におけるカリウム電流の役割

ラット脊髄運動ニューロン（Takahashi 1990）および迷走神経運動ニューロン（Sah and McLachlan 1992）では、カルシウム依存性カリウム電流が活動電位の再分極過程に含まれていることが示唆されている。一方、本研究では、TEA と 4-AP 投与によって活動電位の再分極過程が延長したが、カルシウム依存性カリウムチャネルのブロッカーは活動電位の持続時間に影響を与えなかった。したがって、モルモットの三叉神経運動ニューロン（Chandler et al. 1994；Kim and Chandler 1995）および顔面神経運動ニューロン（Nishimura et al. 1989）で報告されている結果と同様、TEA 感受性で電位依存性の遅延整流型カリウム電流と 4-AP 感受性の電流が主に活動電位の再分極過程を形成しており、カルシウム依存性カリウム電流は活動電位の再分極過程にほとんど関与しないと考えられる。

スパイク後電位（fAHP、ADP、mAHP）の反転電位

fAHPの形成にはカリウム電流が関与することが示唆されたが、fAHP の反転電位はカリウムの平衡電位よりはるかに脱分極していた。この原因として ADP の形成に関与する内向き電流がカリウム電流と同時に発生しているためと考えられる。Cd^{2+} あるいは ω-Aga-IVA によって ADP を減弱させたとき fAHP のピーク電位も過分極に移動し（図 5A と 6B）、逆に apamin 存在下で細胞外カルシウム濃度を上昇させてADPを増大させた場合、fAHP のピーク電位も脱分極にシフトした（図 5B）。さらに fAHP と ADP の電流/電圧直線の傾きと反転電位は近似していることから、fAHP と ADP を形成するコンダクタンスの一部は同時に活性化され、相互に影響し合っていると考えられる。

次に、mAHP の反転電位について、2 つの異なった時点で計測したところ、共にカリウムの平衡電位より脱分極していた。この原因としては、すでに報告されているように、mAHP が h 電流のような内向き電流を活性化した可能性が考えられる（Nishimura et al. 1989；Spain et al. 1987）。しかし mAHP の反転電位はそのピークの時点で計測した値が脱分極性細胞内パルス通電開始 30 ms 後の時点で計測した値よりやや脱分極することから、ADP の形成に関与する内向き電流が mAHP のピークの時点でまだ残存している可能性も否定できない。

mAHPおよびADPの形成に関与するカルシウムコンダクタンス

これまでに行われた運動ニューロンの研究と同様に（Chandler et al.1994；Gueritaud 1988；Haddad et al. 1990；Laursen and Rekling 1989；Nishimura et al. 1989；Sah and McLachlan 1992；Viana et al. 1993b）、ラット三叉神経運動ニューロンにおいてもapamin は mAHP を抑制した。一方、ChTX は mAHP に影響を与えなかったことから mAHP の形成に関与するのはＳＫタイプのカルシウム依存性カリウムチャネル（Blatz and Magleby 1986；Pennefather et al. 1985）と考えられる。Umemiya と Berger（1994）は、幼弱ラットの舌下神経運動ニューロンにおいて、mAHP が ω-CTx-GVIA あるいは ω-Aga-IVA によって抑制され、nimodipine 投与ではほとんど影響を受けなかったと報告した。本研究では、ω-CTx-GVIA がほぼ完全に mAHP を抑制したのに対して、ω-Aga-IVA（100 μM）と nifedipine は mAHP にほとんど影響しなかった。したがって、ラット三叉神経運動ニューロンでは、Nタイプカルシウムチャネルが mAHP を形成するカルシウム依存性カリウムチャネル（ＳＫチャネル）を活性化するものと考えられる。一方、ω-Aga-IVA はほぼ選択的に ADP を抑制し、mAHP に対してほとんど影響を与えないことから、先の報告との結果の違いは ω-Aga-IVA の濃度の違いによるものではなく、日齢差あるいは運動ニューロンの種類の違いによるものであろう。

次に、apamin存在下で無機イオンのカルシウムチャネルブロッカーを投与すると、ADP の振幅は減少した。また、細胞外カルシウム濃度を上昇させると逆に ADP の振幅は増大した。これらの結果から、ADP の形成にカルシウムイオンが関与すると考えられる。この ADP のカルシウム依存性は、他の運動ニューロン（Harada and Takahashi 1983；Viana et al. 1993a；Walton and Fulton 1986）や皮質のニューロン（Connors et al. 1982；Higashi et al. 1993）、視床ニューロン（Bal and McCormick 1993）、あるいは交感神経節前ニューロン（Yoshimura et al. 1987）においても報告されている。しかし、無機イオンのカルシウムチャネルブロッカーが ADP を完全には抑制しないことから、カルシウム非依存性の内向き電流がADPの形成に関与している可能性も否定できない（Alzheimer 1994；Azouz et al. 1996）。

ADPの形成にカルシウム依存性の非選択的カチオン電流の関与（Bal and McCormick 1993；Swandulla and Lux 1985）あるいはカルシウム依存性クロライド電流の関与（Higashi et al. 1993；Sanchez and Gallego 1994）が報告されている。しかし、本研究において細胞外のクロライドイオン濃度を 140 mM から 15～75 mM に下げても ADP に対する効果はほとんど認められなかったことから（n = 4）、三叉神経運動ニューロンにおいてはクロライドイオンがADPに関与する可能性は低いと考えられる。また、以下に述べる２つの理由から、三叉神経運動ニューロンにおいてカルシウムイオンの細胞内流

入そのものが ADP を形成する電流であると推定できる。第一に、細胞外カルシウムイオンを Ba^{2+} に置換すると、ADP が増大し、その濃度を上昇させると ADP の持続時間が延長した。第二に、細胞内カルシウムイオンを EGTA の細胞内注入によってキレートすると ADP の振幅が増大し、その大きさは apamin 投与による増大より大きかった。これは EGTA によるカルシウムイオンのキレートがカルシウム依存性のカルシウム電流の不活性化を取り除いたか、細胞内カルシウムイオン濃度の低下による細胞内外の濃度差の上昇によってカルシウムイオンの流入が促進されたためと考えられる。

そこで次に、どのタイプのカルシウム電流がADPの形成に関与するかを調べた。1秒間の脱分極性細胞内パルス通電を行うことによって連続発火を誘発すると、1発目の ADP はそれ以後の ADP より振幅が大きかったことから、ADP には不活性化する成分が含まれていると考えられる。Ni^{2+} は1発目の ADP を抑制したが、それ以後の ADP にはほとんど抑制効果を示さなかった。これらの結果から、Ni^{2+} 感受性成分は急速に不活性化する電流であり、1発目の ADP にのみ含まれているものと考えられた。これに対して、ω-Aga-IVA（100 μM）は、連続発火において1発目のみならずそれ以後の ADP に対しても同程度の抑制効果を示し、さらに ω-Aga-IVA は apamin および Ni^{2+}投与後においても ADP を抑制した。ω-Aga-IVA を投与する際に用いた濃度（100 μM）は比較的高濃度であったが、mAHP に対する効果がほとんど認められなかったことから、ω-Aga-IVA が非選択的にカルシウムチャネルをブロックしたのではないと考えられる。したがって、主にω-Aga-IVA 感受性の高閾値型カルシウム電流（P-type）が ADP を形成するものと考えられる。しかし、ADP がピークに達する電位は -56 mV 付近で、高閾値型カルシウム電流の閾値（-20 ～ -30 mV）より過分極している（Hille 1992）。この原因として次の2つの可能性が考えられる。第一には、ADP を形成するカルシウム電流が樹状突起上で起こっており、発生した電位が細胞体に伝導する間に減弱される可能性であり、第二は、中間閾値型カルシウム電流（Alonso and Llinas 1992、Kang and Kitai 1993、Onimaru et al. 1996）が ADP の発生に関与している可能性である。本研究では活動電位の発生閾値直下で脱分極性細胞内パルス通電を行った際に ADP 様の脱分極電位がほとんど認められないことから、ADP が樹状突起上で発生している可能性の方が高いと考えられる。

ADPとmAHPの形成に関与するカルシウム電流の異なった役割

ω-CTx-GVIA は mAHP を抑制し、ADP を増大させたのに対して、ω-Aga-IVA は ADP を抑制し mAHP にほとんど影響を与えなかったことから、ADP と mAHP の形成に関与するカルシウム電流は異なっていると考えられる。それでは、何故 ω-Aga-IVA は mAHP を抑制せず、ω-CTx-GVIA は ADP を増大させるのであろうか。

各々のタイプのカルシウムチャネルの分布は、ニューロンの中で異なっていることが報告されており（Christie et al. 1995；Elliott et al. 1995）、本研究では mAHP の反転電位がカリウムの平衡電位に近いことから、mAHP を形成する外向き電流は記録している部位（おそらく細胞体もしくはその近傍の樹状突起）で発生していると考えられる。また、あるタイプのカルシウムチャネルは、カルシウム依存性カリウムチャネルに近接して存在することが報告されているが（Robitaille and Charlton 1992；Westenbroek et al. 1992）、本研究において ω-CTx-GVIA が mAHP を抑制する一方、ω-Aga-IVA は mAHP を抑制しないことから、ω-Aga-IVA 感受性カルシウムチャネルの存在領域よりもＳＫチャネルが ω-CTx-GVIA感受性のカルシウムチャネルに近接して存在すると考えられる。ここで、Lancaster と Pennefather（1987）が報告しているように、2～3 ms の脱分極性細胞内パルス通電で流入したカルシウムイオンが急速に細胞内の緩衝作用を受ける可能性が高ければ ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルを通過して流入したカルシウムイオンはＳＫチャネルを活性化する前に緩衝されてしまうので、ω-Aga-IVA が mAHP を抑制しなかったと考えられる。ところで、図 4 で示したように ADP と mAHP が互いに影響を及ぼしていることから、ω-Aga-IVA 感受性カルシウムチャネルの阻害による ADP の抑制は mAHP の増大を引き起こす可能性がある。しかし実際には、mAHP には変化が認められなかった。これは、ＳＫチャネルを活性化するカルシウムイオンの流入が ω-Aga-IVA 投与によって減少することで、見かけ上 ω-Aga-IVA が mAHP の振幅を変化させなかったと考えられ、ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルを経て細胞内に流入したカルシウムイオンは主に ADP の形成に寄与するが、その一部はＳＫチャネルの活性化に利用されている可能性がある。

ω-Aga-IVA とは逆に、ω-CTx-GVIA は apamin より有意に大きくADPを増大させた。ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルを通って流入したカルシウムイオンの一部がＳＫチャネルを活性化している可能性があるのと同様に、ω-CTx-GVIA 感受性カルシウムチャネルを経て流入したカルシウムイオンの一部は ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルが存在する領域に達している可能性がある。この場合、ω-CTx-GVIA 感受性カルシウムチャネルを阻害するとその領域の細胞内カルシウム濃度の減少をきたすことになる。Ba^{2+} および EGTA が ADP を著明に増大させることから、ω-Aga-IVA 感受性のカルシウムチャネルはカルシウム依存的に不活性化していると考えられる。従って ω-CTx-GVIA の投与により ω-Aga-IVA 感受性カルシウムチャネルのカルシウム依存性の不活性化が減少し、その結果 ADP が増大すると考えられる。

以上のように ω-CTx-GVIA 感受性カルシウムチャネルと ω-Aga-IVA 感受性カルシウ

ムチャネルは、ある程度空間的に離れてはいるが、両者を通って流入してきたカルシウムイオンは互いに完全に隔離されてはいないのであろう。

発火パターンに対するスパイク後電位の役割

カルシウムチャネルブロッカーあるいは apamin による mAHP の抑制によって、三叉神経運動ニューロンの細胞内パルス通電により誘発される連続発火の頻度は著しく上昇した。この結果は、他の運動ニューロン（Chandler et al. 1994；Nishimura et al. 1989；Sah and McLachlan 1992；Viana et al. 1993b；Walton and Fulton 1986）および皮質のニューロン（Schwindt et al. 1988）において報告された結果と一致する。また、Ba^{2+} を潅流投与すると ADP の増大と mAHP の抑制が認められ、高濃度の Ba^{2+}（2～5 mM）投与では、短い持続時間の細胞内パルス通電（2～3 ms）によってバースト状の発火を引き起こした。このように、ADP と mAHP を変化させると、1st ISI は著しく上昇し発火パターンに著明な変化が認められた。Burkeら（1970）は、脊髄運動ニューロンを一定の低頻度で発火させた状態で、さらに1発活動電位を加えて活動電位間隔を短くすると、その運動神経が支配している筋線維に長時間続く著明な収縮が起こることを見出した。この結果は、運動ニューロンの平均活動電位頻度のみならず、発火パターンもまた筋線維の収縮力を変化させる重要な要素であることを示唆している。したがって、三叉神経運動ニューロンにおけるスパイク後電位は、咀嚼筋活動を調節する上で重要な役割を担っていると考えられる。

筋線維は速筋線維と緩筋線維に大別される（Burke et al. 1971；Burke et al. 1973）。遅収縮筋を支配する運動ニューロンは、速筋線維を支配する運動ニューロンと比べて入力抵抗が高く、rheobase が小さく、後過分極電位が大きい（Zengel et al. 1985）。本研究で認められたように三叉神経運動ニューロンにおいても、入力抵抗が高く rheobase の小さいニューロンは mAHP の振幅が大きく ADP の振幅が小さい傾向にあったことは注目に値する。また、mAHP と ADP の間に負の相関があることから、ADP と mAHP のバランスはそれぞれの三叉神経運動ニューロンの機能的な性質によって決定されている可能性がある。セロトニンやノルアドレナリンなど、いくつかの神経修飾物質は mAHP あるいは ADP に影響することが運動ニューロンにおいて知られており（Berger et al. 1992；Parkis et al. 1995；Takahashi and Berger 1990）、これらがスパイク後電位を変化させることは生体における筋張力の1つの制御法なのであろう。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際し終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部口腔生理学講座森本俊文教授に深謝の意を表します。また、本研究について貴重な御教示を賜った大阪大学歯学部口腔生理学講座の井上講師、京都大学医学部第一生理学講座の姜講師に心から感謝致します。さらに組織学的実験を御指導いただいた大阪大学歯学部第一口腔解剖学講座の脇坂助教授ならびに論文の内容の検討をしていただいたカリフォルニア大学ロサンゼルス校のS. H. Chandler 教授に感謝します。本研究にご協力いただいた口腔生理学講座教室員諸兄に厚くお礼申し上げます。

文献

Aghajanian, G. K. and Rasmussen, K. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. Synapse 3: 331-338, 1989.

Alonso, A. and Llinas, R. R. Electrophysiology of the mammillary complex in vitro. II. Medial mammillary neurons. J. Neurophysiol. 68: 1321-1331, 1992.

Alzheimer, C. A novel voltage-dependent cation current in rat neocortical neurones. J. Physiol. Lond. 479: 199-205, 1994.

Azouz, R., Jensen, M. S., and Yaari, Y. Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. J. Physiol. Lond. 492: 211-223, 1996.

Bal, T. and McCormick, D. A. Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. J. Physiol. Lond. 468: 669-691, 1993.

Barrett, E. F. and Barret, J. N. Separation of two voltage-sensitive potassium currents, and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurones. J. Physiol. 255: 737-774, 1976.

Bean, B. P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu. Rev. Physiol. 51: 367-384, 1989.

Berger, A. J., Bayliss, D. A., and Viana, F. Modulation of neonatal rat hypoglossal motoneuron excitability by serotonin. Neurosci. Lett. 143: 164-168, 1992.

Blatz, A. L. and Magleby, K. L. Calcium activated potassium channels. Trends Neurosci. 10: 463-467, 1987.

Blatz, A. L. and Magleby, K. L. Single apamin-blocked Ca-activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. Nature 323: 718-720, 1986.

Buhrle, C. P. and Sonnhof, U. Intracellular ion activities and equilibrium potentials in motoneurones and glia cells of the frog spinal cord. Pflugers. Arch. 396: 144-153, 1983.

Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., and Zajac, F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. J Physiol Lond 234: 723-48, 1973.

Burke, R. E., Levine, D. N., and Zajac, F. E. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. Science 174: 709-12,

1971.

Burke, R. E., Rudomin, P., and Zajac, F. E. Catch property in single mammalian motor units. Science 168: 122-124, 1970.

Chandler, S. H., Hsaio, C. F., Inoue, T., and Goldberg, L. J. Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. J. Neurophysiol. 71: 129-145, 1994.

Christie, B. R., Eliot, L. S., Ito, K., Miyakawa, H., and Johnston, D. Different Ca^{2+} channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca^{2+} influx. J. Neurophysiol. 73: 2553-2557, 1995.

Connors, B. W., Gutnick, M. J., and Prince, D. A. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. J. Neurophysiol. 48: 1302-1320, 1982.

Elliott, E. M., Malouf, A. T., and Catterall, W. A. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons. J. Neurosci. 15: 6433-6444, 1995.

Galvan, M., Dorge, A., Beck, F., and Rick, R. Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. Pflugers. Arch. 400: 274-279, 1984.

Granit, R., Kernell, D., and Smith, R. S. Delayed depolarization and the repetitive response to intracellular stimulation of mammalian motoneurones. J. Physiol. Lond. 168: 890-910, 1963.

Gueritaud, J. P. Electrical activity of rat ocular motoneurons recorded in vitro. Neuroscience 24: 837-852, 1988.

Haddad, G. G., Donnelly, D. F., and Getting, P. A. Biophysical properties of hypoglossal neurons in vitro: intracellular studies in adult and neonatal rats. J. Appl. Physiol. 69: 1509-1517, 1990.

Harada, Y. and Takahashi, T. The calcium component of the action potential in spinal motoneurones of the rat. J. Physiol. Lond. 335: 89-100, 1983.

Hess, P. Calcium channels in vertebrate cells. Annu. Rev. Neurosci. 13: 337-356, 1990.

Higashi, H., Tanaka, E., Inokuchi, H., and Nishi, S. Ionic mechanisms underlying the depolarizing and hyperpolarizing afterpotentials of single spike in guinea-pig cingulate cortical neurons. Neuroscience 55: 129-138, 1993.

Hille, B. Ionic Channels of Excitable membranes. Saunderland, MA: Sinauer, 1992.

Kang, Y., and Kitai, S. T. Calcium spike underlying firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. Neurosci. Res. 18: 195-207, 1993.

Kim, Y. I., and Chandler, S. H. NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. J. Neurophysiol. 74: 334-346, 1995.

Lancaster, B., and Pennefather, P. Potassium currents evoked by brief depolarizations in bull-frog sympathetic ganglion cells. J. Physiol. Lond. 387: 519-548, 1987.

Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., and Alvarez, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. Annu. Rev. Physiol. 51: 385-399, 1989.

Llinas, R. R., Sugimori, M.,and Cherksey, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. Ann. N.Y. Acad. Sci. :103-111, 1989

Laursen, A. M. and Rekling, J. C. Electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons of guinea-pigs studied in vitro. Neuroscience 30: 619-637, 1989.

McCobb, D. P., Best, P. M., and Beam, K. G. Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. Neuron 2: 1633-1643, 1989.

Miller, R. L. Multiple calcium channels and neuronal function. Science 235: 46-235, 1987.

Mintz, I. M., Adams, M. E., and Bean, B. P. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. Neuron 9: 85-95, 1992.

Nishimura, Y., Schwindt, P. C., and Crill, W. E. Electrical properties of facial motoneurons in brainstem slices from guinea pig. Brain Res. 502: 127-142, 1989.

Onimaru, H., Ballanyi, K., and Richter, D. W. Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. J. Physiol. Lond. 491: 677-695, 1996.

Parkis, M. A., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Actions of norepinephrine on rat hypoglossal motoneurons. J. Neurophysiol. 74: 1911-1919, 1995.

Pennefather, P., Lancaster, B., Adams, P. R., and Nicoll, R. A. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3040-3044, 1985.

Randall, A. and Tsien, R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. J. Neurosci. 15: 2995-3012, 1995.

Robitaille, R. and Charlton, M. P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. J. Neurosci. 12: 297-305, 1992.

Sah, P., and McLachlan, E. M. Potassium currents contributing to action potential

repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. J. Neurophysiol. 68: 1834-1841, 1992.

Sanchez-Vives, M.V. and Gallego, R. Calcium-dependent chloride current induced by axotomy in rat sympathetic neurons. J. Physiol. Lond. 475: 391-400, 1994.

Schwindt, P. C., Spain, W. J., Foehring, R. C., Stafstrom, C. E., Chubb, M. C., and Crill, W. E. Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. J. Neurophysiol. 59: 424-449, 1988.

Sessle, B. J. Identification of alpha and Gamma trigeminal motoneurons and effect of stimulation of amygdala, cerebellum, and cerebral cortex. Exp. Neulol. 54: 303-322, 1977.

Spain, W. J., Schwindt, P. C., and Crill, W. E. Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. J. Neurophysiol. 57: 1555-1576, 1987.

Swandulla, D. and Lux, H. D. Activation of a nonspecific cation conductance by intracellular Ca^{2+} elevation in bursting pacemaker neurons of Helix pomatia. J. Neurophysiol. 54: 1430-1443, 1985.

Takahashi, T. Membrane currents in visually identified motoneurones of neonatal rat spinal cord. J. Physiol. Lond. 423: 27-46, 1990.

Takahashi, T. and Berger, A. J. Direct excitation of rat spinal motoneurones by serotonin. J. Physiol. Lond. 423: 63-76, 1990.

Umemiya, M. and Berger, A. J. Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca^{2+} channels in hypoglossal motoneurons. J. Neurosci. 14: 5652-5660, 1994.

Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. J. Neurophysiol. 69: 2137-2149, 1993a.

Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. J. Neurophysiol. 69: 2150-2163, 1993b.

Viana, F., Gibbs, L., and Berger, A. J. Double- and triple-labeling of functionally characterized central neurons projecting to peripheral targets studied in vitro. Neuroscience 38: 829-841, 1990.

Walton, K. and Fulton, B. P. Ionic mechanisms underlying the firing properties of rat neonatal motoneurons studied in vitro. Neuroscience 19: 669-683, 1986.

Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel a1 subunit. Neuron 9: 1099-1115, 1992.

Yoshimura, M., Polosa, C., and Nishi, S. Afterdepolarization mechanism in the in vitro, cesium-loaded, sympathetic preganglionic neuron of the cat. J. Neurophysiol. 57: 1325-1337, 1987.

Zengel, J. E., Reid, S. A., Sypert, G. W., and Munson, J. B. Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. J Neurophysiol 53: 1323-44, 1985.

Zhang, J. F., Randall, A. D., Ellinor, P. T., Horne, W. A., Sather, W. A., Tanabe, T., Schwarz, T. L., and Tsien, R. W. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. Neuropharmac. 32: 1075-1088, 1993.

Zhang, L. and Krnjevic, K. Apamin depresses selectively the after-hyperpolarization of cat spinal motoneurons. Neurosci. Lett. 74: 58-62, 1987.

図の説明

図 1. DRL に逆行性に標識された咬筋運動ニューロン（A）と biocytin を細胞内注入し記録した運動ニューロン（B）の顕微鏡写真。A と B における矢印は二重標識された咬筋運動ニューロンを示す。校正 100 μm。

図 2. ラット三叉神経運動ニューロンにおけるスパイク後電位の分類と膜電位による影響。A：2 ms の脱分極性細胞内パルス通電により静止膜電位（-59 mV）から活動電位を誘発した例。上段に膜電位、下段に通電した電流を示す。活動電位の発生に続いて持続の短い後過分極電位（fAHP）、後脱分極電位（ADP）、中等度の持続時間の後過分極電位（mAHP）を認める。B：2 msの脱分極性細胞内パルス通電により様々な膜電位から誘発された活動電位の重ね合わせを示す。arrow head は静止膜電位（-58 mV）から誘発された活動電位を示す。白丸および黒丸は fAHP と ADP の振幅の大きさを測定した時点を示す。mAHP の振幅の大きさは静止膜電位においてピークに達した時点（黒四角）と細胞内通電開始 30 ms後（白四角）の 2 点で計測した。矢印は細胞内通電の開始時点を示す。C および D：膜電位に対するそれぞれのスパイク後電位の振幅の大きさを B で示した記号を用いてプロットしたもの。

図 3. mAHP と ADP の形成におけるカルシウムイオンの依存性。A：2 mM Mn^{2+}（細胞外 Ca^{2+} と置換）の灌流投与前と投与後の活動電位の重ね合わせを示す。Mn^{2+} 投与により mAHP は抑制された。点線は静止膜電位（-64 mV）を示す。挿入図：ADP の部分をの時間軸を拡大したもの。ADP も Mn^{2+} により抑制された。B：電極内溶液に EGTA を入れて細胞内注入を行うと時間依存性に mAHP の抑制と ADP の増大が認められた（静止膜電位は -68 mV）。Ca：1 mM および 2 mM Ba^{2+} の灌流投与前と投与後の活動電位を重ね合わせたもの。mAHP の抑制と ADP の増大が認められた。2 mM Ba^{2+} の灌流投与後、ADP から活動電位の発射が認められた。点線は静止膜電位（-75 mV）を示す。Cb：Ca に示したニューロンに 5 mM Ba^{2+} を灌流投与して 2 ms の脱分極性細胞内パルス通電を行うと、増大した ADP からバースト状の発火が認められた。静止膜電位は -75 mV であった。

図 4. カルシウム依存性カリウムチャネルのブロッカーのスパイク後電位に対する効果。A：10 μM apamin をスライス上に滴下投与する前と投与後の活動電位を重ね合わせたも

の。apamin は mAHP を完全に抑制した。点線は静止膜電位（-70 mV）を示す。挿入図：時間軸を拡大した活動電位の重ね合わせ。apamin は活動電位の持続時間にほとんど影響を与えなかった。B：30 nM ChTX の灌流投与前と投与後の活動電位を重ね合わせたもの（静止膜電位は -75 mV）。ChTX はスパイク後電位にほとんど影響を及ぼさなかった。挿入図：時間軸を拡大した活動電位の重ね合わせ。ChTX は活動電位の持続時間にほとんど影響を及ぼさなかった。

図 5. ADP に対するカルシウムチャネルの役割。A：apamin 存在下で 500 μM Cd^{2+} を灌流投与すると ADP は抑制され、fAHP のピーク時の電位は過分極方向に移動した。点線は静止膜電位（-68 mV）を示す。挿入図：Aに示した活動電位の閾値下の膜電位応答をそれぞれの活動電位から引き算したものを示す。B：apamin 存在下細胞外カルシウム濃度を 8 mM に上昇させると ADP は増大し、fAHP のピーク時の電位は脱分極した。静止膜電位は -70 mV であった。

図 6. スパイク後電位に対する選択的カルシウムチャネルブロッカーの効果。A：20 μM ω-CTx-GVIA をスライス上に滴下投与する前と投与後の活動電位を重ね合わせたものを示す。活動電位のピーク付近は省略している。点線は静止膜電位（-68 mV）を示す。B：100 μM ω-Aga-IVA をスライス上に滴下投与する前と投与後の活動電位を重ね合わせたものを示す。点線は静止膜電位（-68 mV）を示す。C：apamin を単独で投与した活動電位と、apamin に加えて 100 μM ω-Aga-IVA をスライス上に滴下投与した時の活動電位を重ね合わせたものを示す。点線は静止膜電位（-65 mV）を示す。D：500 μM Ni^{2+} を灌流投与する前と投与後の活動電位を重ね合わせたものを示す。点線は静止膜電位（-68 mV）を示す。E：apamin を単独で投与した活動電位と、apamin に加えて 500 μM Ni^{2+} を灌流投与した時の活動電位を重ね合わせたものを示す。点線は静止膜電位（-77mV）を示す。F：apamin を単独で投与した活動電位と、apamin に加えて 500 μM Ni^{2+} を灌流投与した時の活動電位、さらに 100 μM ω-Aga-IVA をスライス上に滴下投与した時の活動電位を重ね合わせたもの。いずれのトレースも、それぞれ活動電位の閾値直下の膜電位応答を引き算したものを示している。

図 7. 活動電位連続発火中における ADP に対する ω-Aga-IVA の効果。A：持続時間の長い脱分極性細胞内パルス通電によって誘発された連続発火（左）と ω-Aga-IVA を投与したときに同様に連続発火させた場合（右）のトレースを示す。ω-Aga-IVA を投与している間は、細胞内に直流電流を通電して対照における静止膜電位（-68 mV）に膜電位を

保持し、連続発火のISIが対照より短くなるように脱分極性細胞内パルス通電の強度を設定した。filled arrow head と empty arrow head はそれぞれ最初と最初から 4 番目の ADP を示している。上および下の点線は、それぞれ対照における活動電位閾値および mAHP のピーク時の電位を示している。活動電位閾値および mAHP のピーク時の電位は共に ω-Aga-IVA 投与によって僅かに過分極した。一方、fAHP および ADP は対照において共に活動電位閾値より脱分極していたが、ω-Aga-IVA 投与によりこれらは活動電位閾値より過分極方向に移動したことから、ω-Aga-IVA は ADP を抑制したと考えられる。Ba および Bb：A において下線を引いた部分（a および b）を拡大したトレースを、ω-Aga-IVA を投与する前と後とで重ね合わせたものを示す。重ね合わせに際して、時間軸は活動電位のピーク時点が重なるようにした。ω-Aga-IVA の投与によって、ADP のみならず活動電位も抑制されていることに注意。下段のトレースは対照のトレースから ω-Aga-IVA のトレースを引き算したものであり、ω-Aga-IVA の投与によって個々の ADP がおおむね等しく抑制されていることが分かる。

図 8. 活動電位連続発火中における ADP に対する Ni^{2+} の効果。A：持続時間の長い脱分極性細胞内パルス通電によって誘発された連続発火（左）と Ni^{2+} を投与したときに同様に連続発火させた場合（右）のトレースを示す。Ni^{2+} を投与している間は、細胞内に直流電流を通電して対照における静止膜電位（-68 mV）に膜電位を保持し、連続発火の ISI が対照より短くなるように脱分極性細胞内パルス通電の強度を設定した。filled arrow head と empty arrow head はそれぞれ最初と最初から 4 番目の ADP を示している。上および下の点線は、それぞれ対照における活動電位閾値および mAHP のピーク時の電位を示している。活動電位閾値および mAHP のピーク時の電位は共に Ni^{2+} 投与によってほとんど影響を受けなかった。Ba および Bb：A において下線を引いた部分（a および b）を拡大したトレースを、Ni^{2+} を投与する前と後とで重ね合わせたものを示す。重ね合わせに際して、時間軸は活動電位のピーク時点が重なるようにした。Ni^{2+} の投与によって、活動電位が僅かに抑制されていた。下段のトレースは対照のトレースから Ni^{2+} のトレースを引き算したものであり、Ni^{2+} の投与によって最初の ADP のみが抑制され、それ以降の ADP はほとんど影響を受けていないことが分かる。

図 9. 連続発火に対する ω-CTx-GVIA と apamin の効果。A および B：持続 1 秒で 1.7 nA および 2.4 nA の脱分極性細胞内パルス通電により誘発された連続発火をそれぞれ中段および下段に示す（A）。10 μM ω-CTx-GVIA をスライス上に滴下投与した後に、同様

の脱分極性細胞内パルス通電を行って得られたトレースを（B）に示す。Ca および Cb：Aにおいて下線を引いた部分（a および b）を拡大したもの。filled arrow head で示す最初の ADP は empty arrow head で示すそれ以後の ADP より振幅が大きかった。矢印は連続発火後に生じる post burst AHP を示す。点線は静止膜電位（-71 mV）を示す。Da および Db：B において下線を引いた部分（a および b）を拡大したもの。filled arrow head で示した最初の ADP から活動電位発射を認めた。mAHP はかなり抑制されているが、post burst AHP（矢印）に著明な変化はなかった。点線は静止膜電位（-71 mV）を示す。E：上段は、A および B で示したニューロンにおける 1st ISI の *f-I* 直線を示したもので、黒丸は ω-CTx-GVIA 投与前、白丸は投与後を示す。細胞内通電量が 1.9 nA（矢印）を越えると最初の ADP から活動電位発射を認めるため、1st ISI が極度に短くなることが分かる。下段は、A および B で示したニューロンにおける ss ISI の *f-I* 直線を示したもので、黒丸は ω-CTx-GVIA 投与前、白丸は投与後を示す。F：上段は、別のニューロンで apamin 投与前（黒丸）と投与後（白丸）の 1st ISI の *f-I* 直線を示したもの。細胞内通電量が 0.9 nA（矢印）を越えると最初の ADP から活動電位発射を認めた。下段は、上段で示したニューロンにおける ss ISI の *f-I* 直線を示したもので、黒丸は apamin 投与前、白丸は投与後を示す。

図10. A：TEA 投与前と 1 mM および 10 mM TEA 投与後の活動電位の重ね合わせを示す。TEA 投与により活動電位の持続時間は延長し、fAHP は消失した。点線は静止膜電位（-70 mV）を示す。B：500 μM 4-AP の投与前と投与後の活動電位を重ね合わせたもの。活動電位の持続時間の延長が認められる。点線は静止膜電位（-70 mV）を示す。C：静止膜電位において、mAHP の振幅の大きさに対する ADP の振幅の大きさをプロットしたもの。

図 1

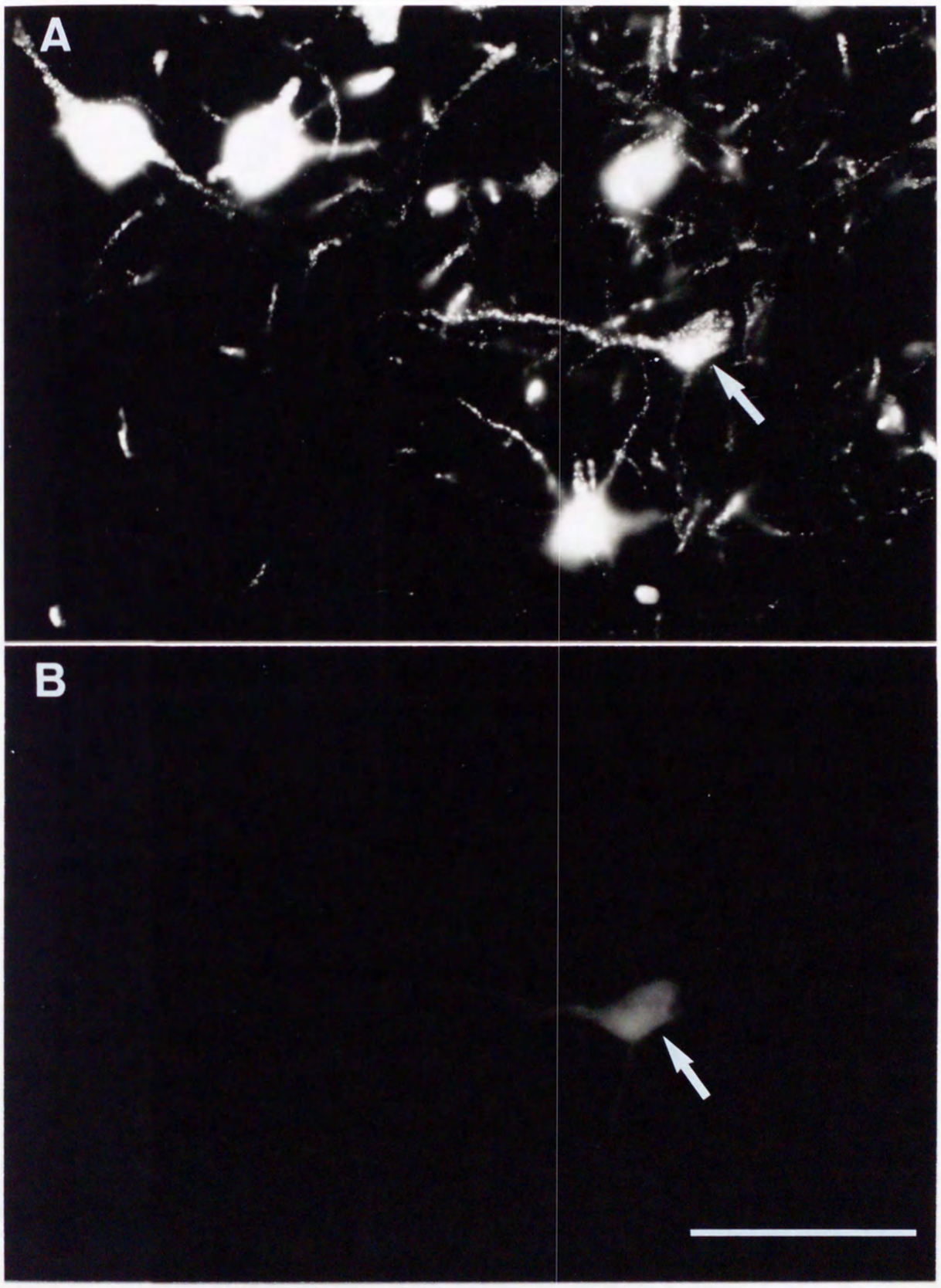


図2

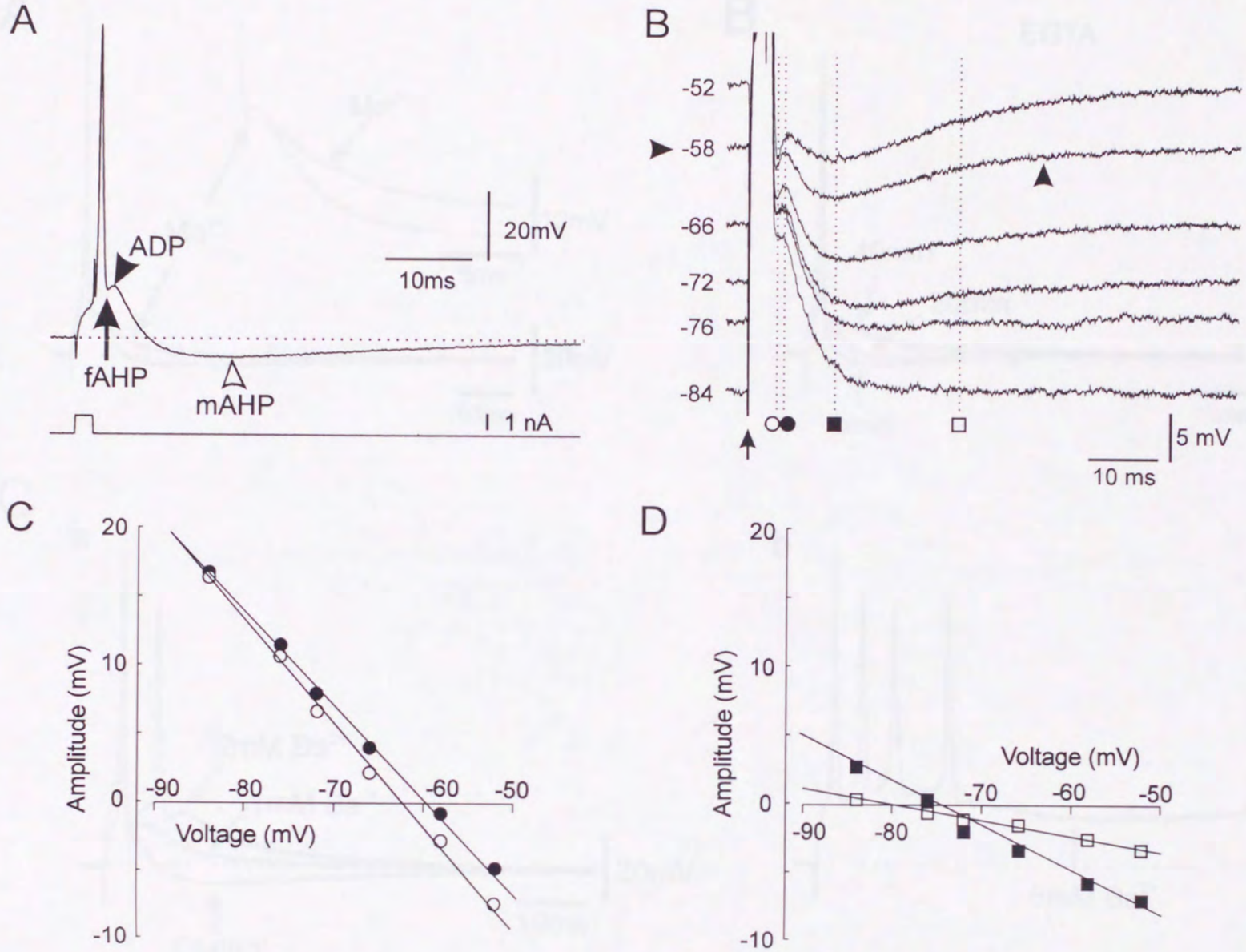

A
ADP
fAHP
mAHP
20mV
10ms
I 1 nA
B
-52
-58
-66
-72
-76
-84
5 mV
10 ms
C
Amplitude (mV)
Voltage (mV)
20
10
0
-10
-90
-80
-70
-60
-50
D
Amplitude (mV)
Voltage (mV)
20
10
0
-10
-90
-80
-70
-60
-50

図3

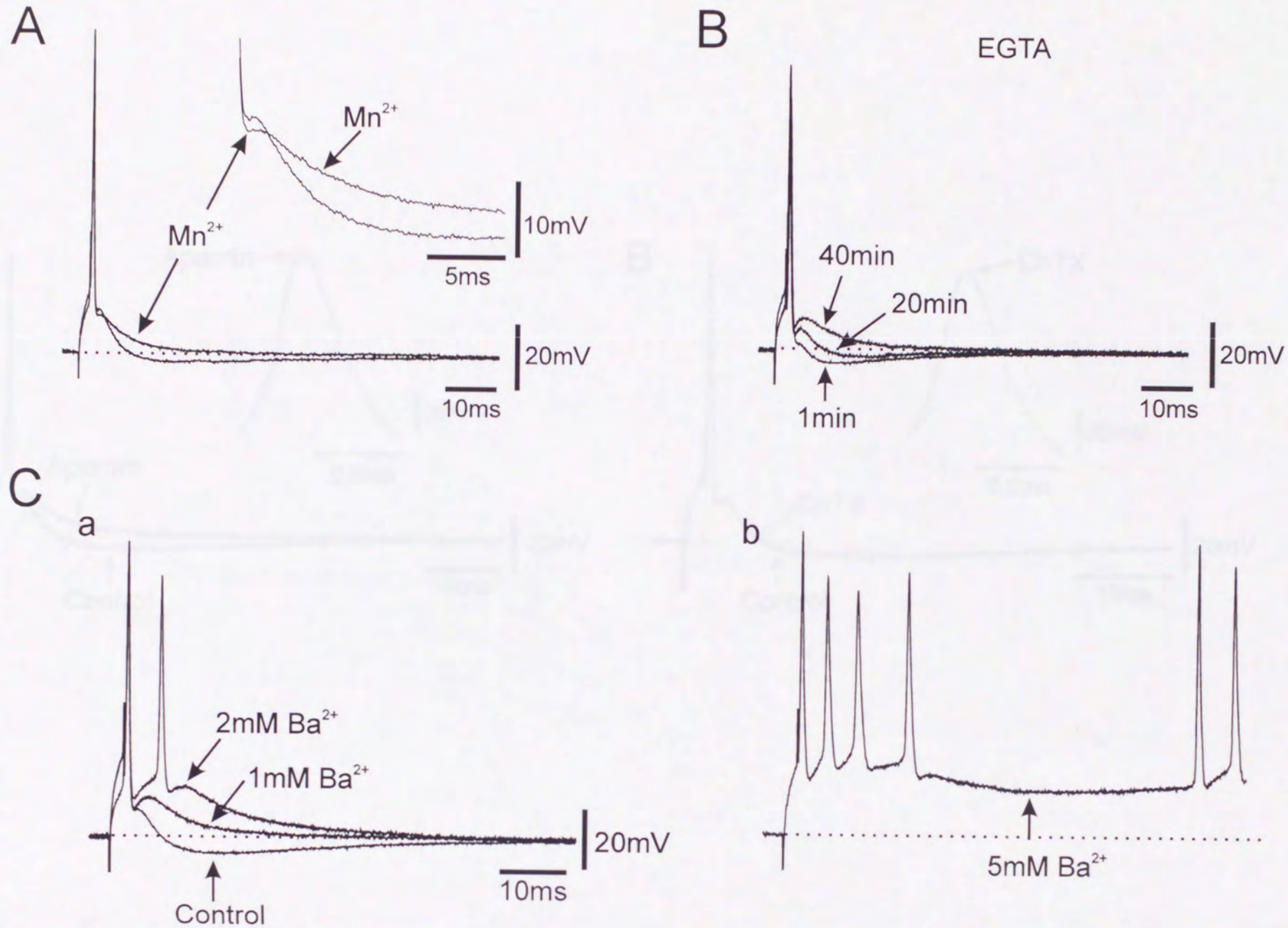

A
Mn2+
Mn2+
10mV
5ms
20mV
10ms
B
EGTA
40min
20min
1min
20mV
10ms
C
a
2mM Ba2+
1mM Ba2+
20mV
10ms
Control
b
5mM Ba2+

図4

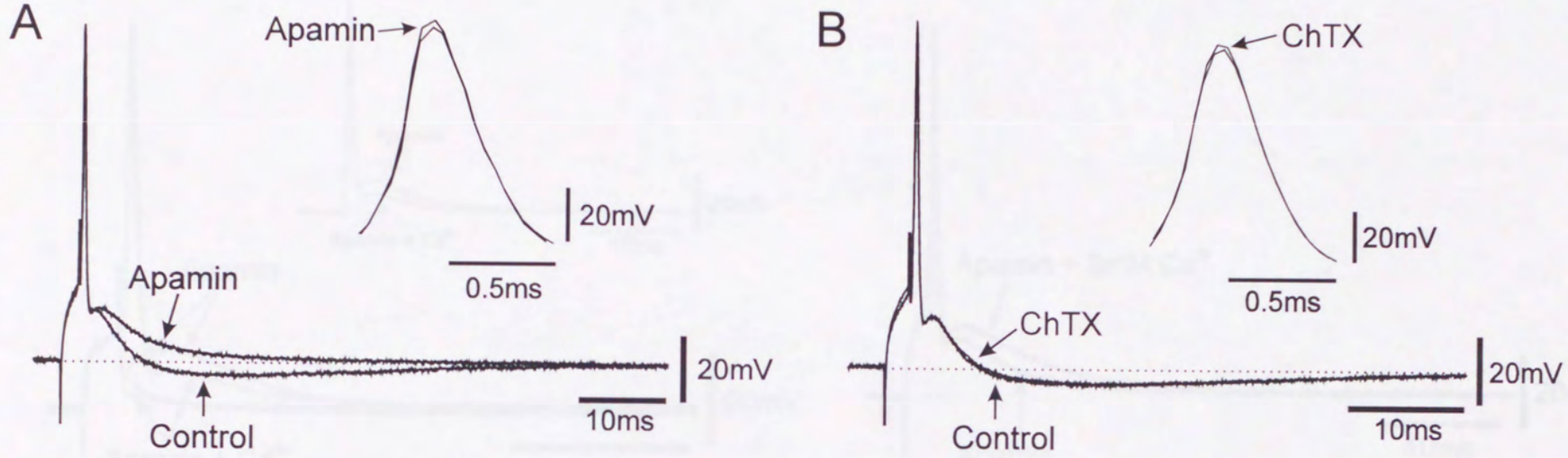

A
Apamin
Apamin
20mV
0.5ms
20mV
10ms
Control
B
ChTX
ChTX
20mV
0.5ms
20mV
10ms
Control

図5

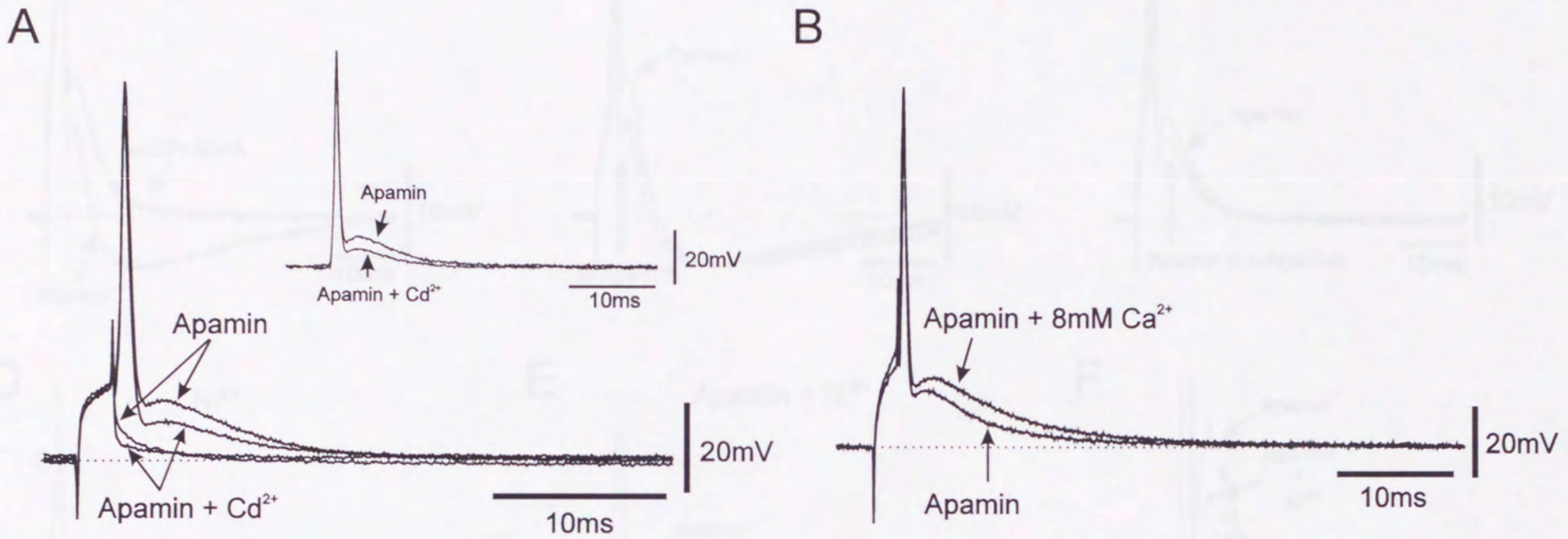

A
Apamin
Apamin + Cd2+
20mV
10ms
Apamin
Apamin + Cd2+
20mV
10ms
B
Apamin + 8mM Ca2+
Apamin
20mV
10ms

図6

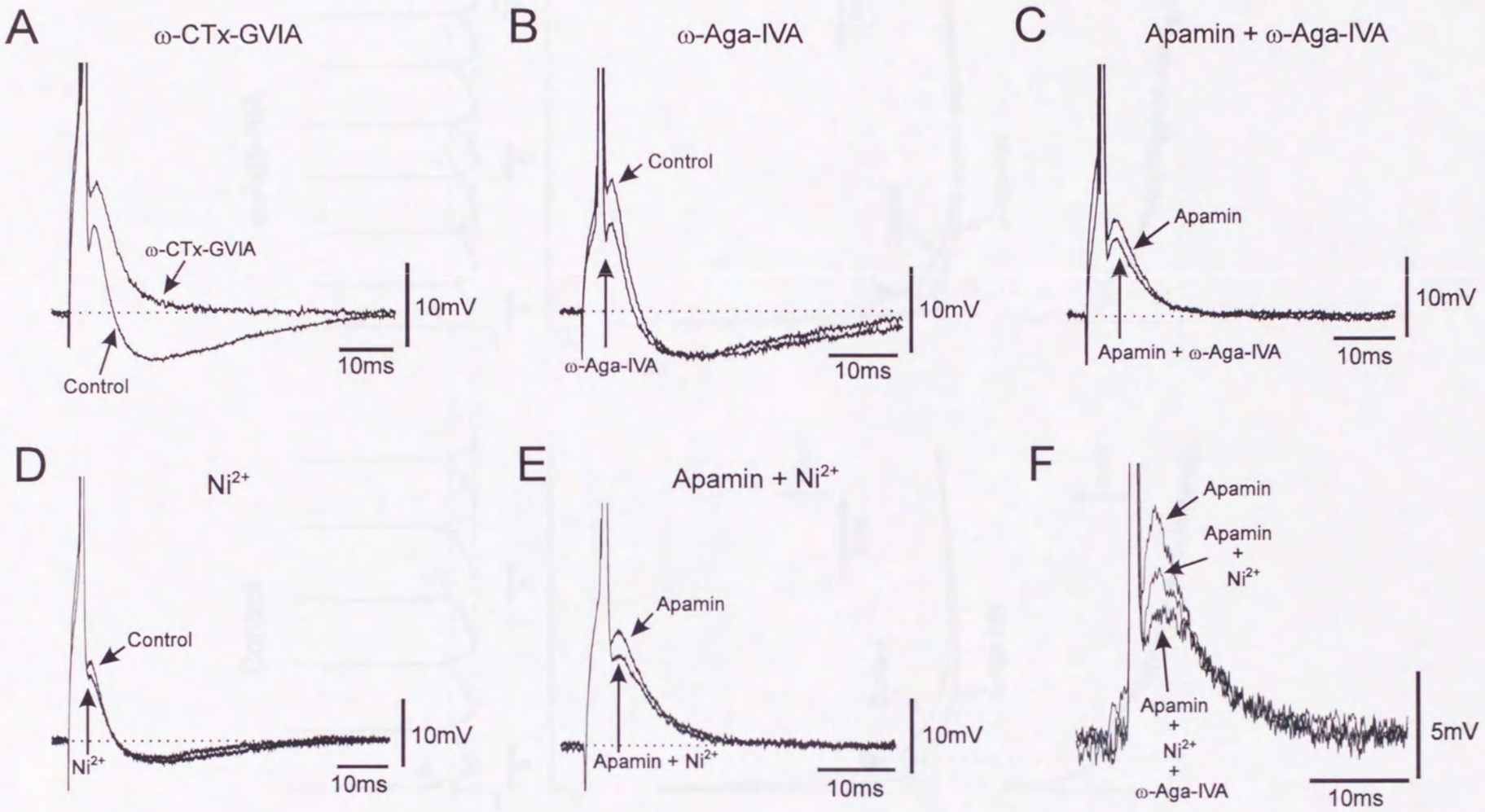

A
ω-CTx-GVIA
ω-CTx-GVIA
Control
10mV
10ms
B
ω-Aga-IVA
Control
ω-Aga-IVA
10mV
10ms
C
Apamin + ω-Aga-IVA
Apamin
Apamin + ω-Aga-IVA
10mV
10ms
D
Ni2+
Control
Ni2+
10mV
10ms
E
Apamin + Ni2+
Apamin
Apamin + Ni2+
10mV
10ms
F
Apamin
Apamin + Ni2+
Apamin + Ni2+ + ω-Aga-IVA
5mV
10ms

図 7

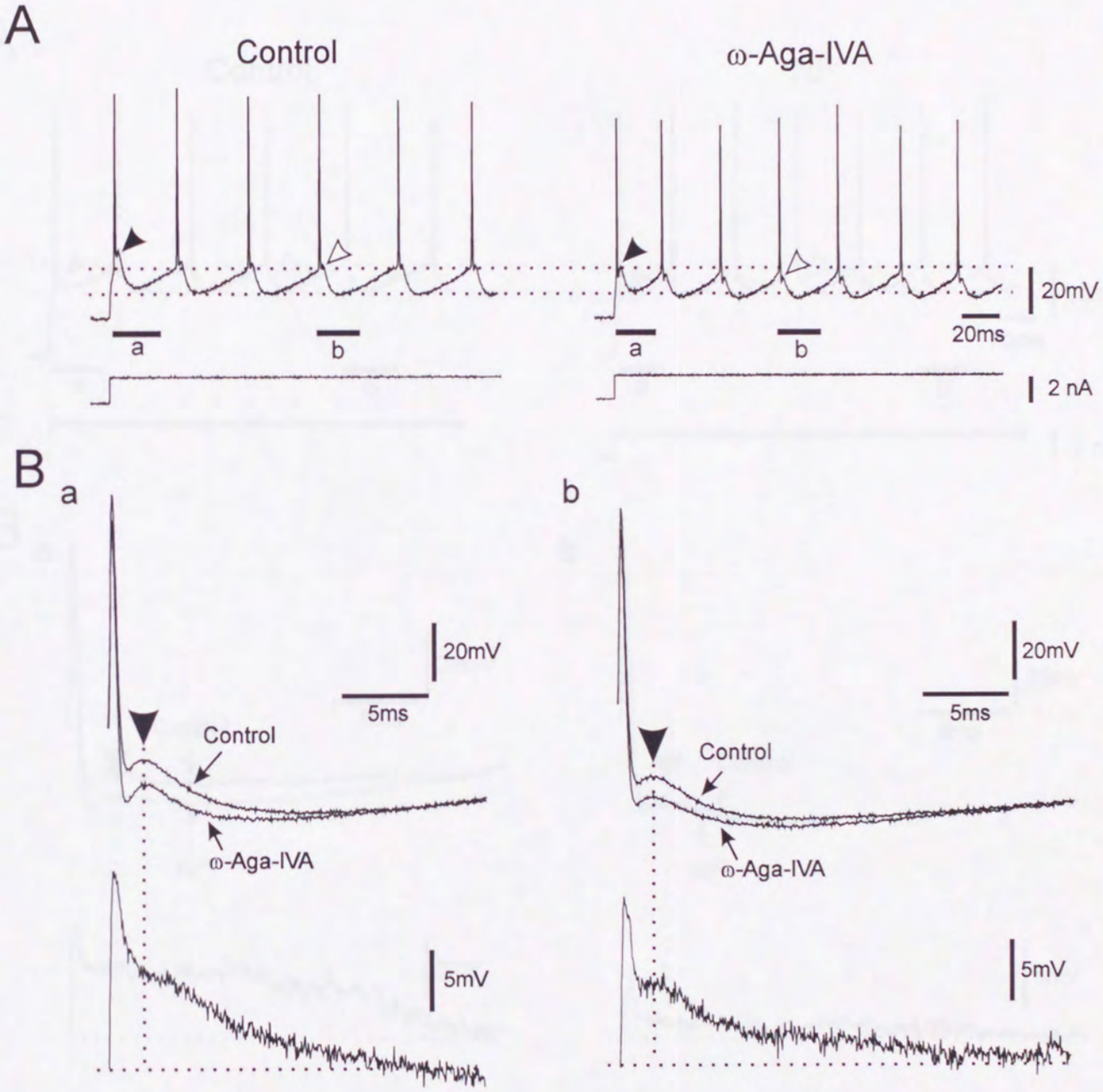

A
Control
ω-Aga-IVA
20mV
20ms
a
b
a
b
2 nA
B
a
b
20mV
5ms
Control
ω-Aga-IVA
5mV
20mV
5ms
Control
ω-Aga-IVA
5mV

図 8

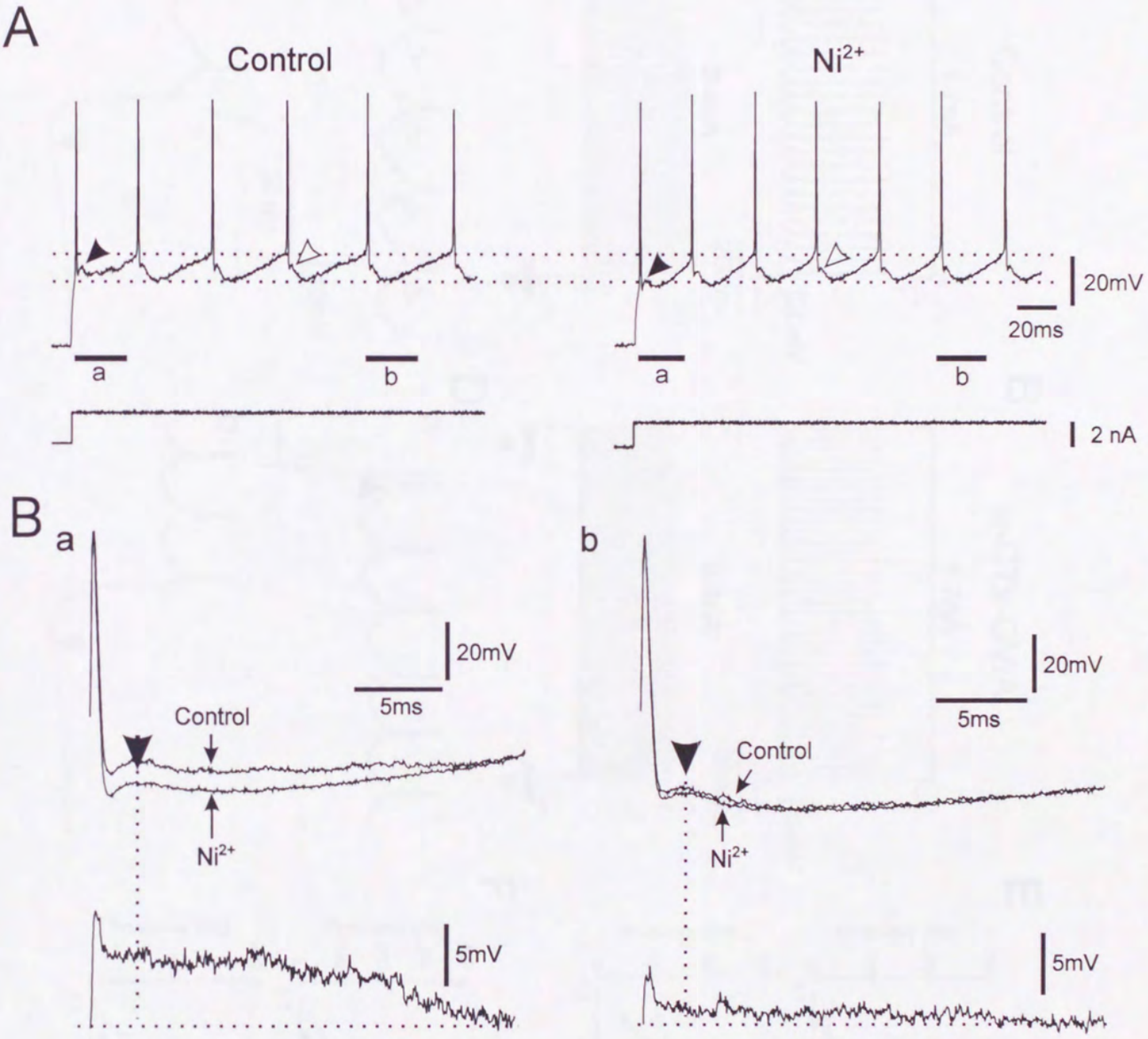

A
Control
Ni2+
20mV
20ms
a
b
a
b
2 nA
B
a
b
20mV
5ms
Control
Ni2+
5mV
20mV
5ms
Control
Ni2+
5mV

図9

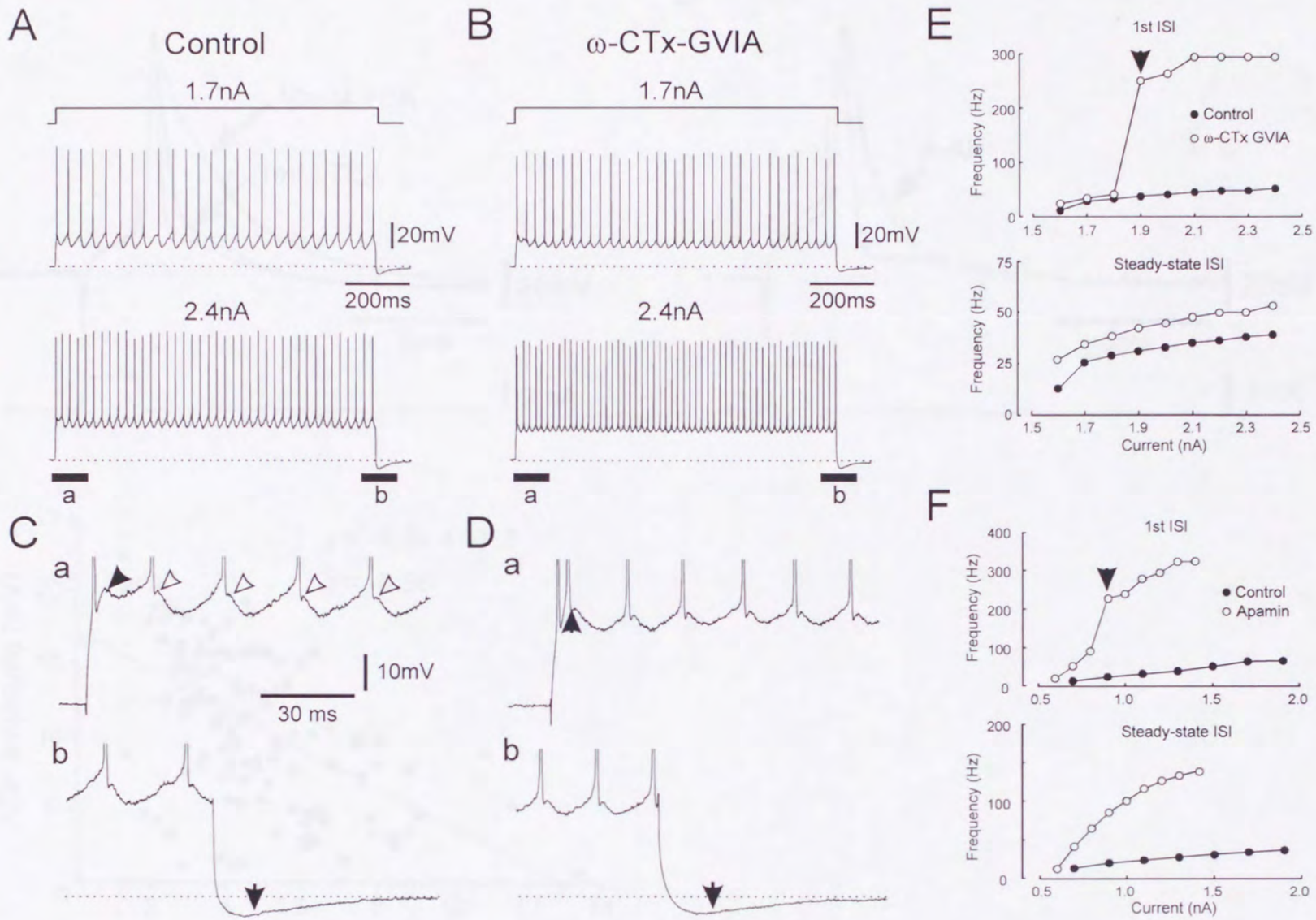
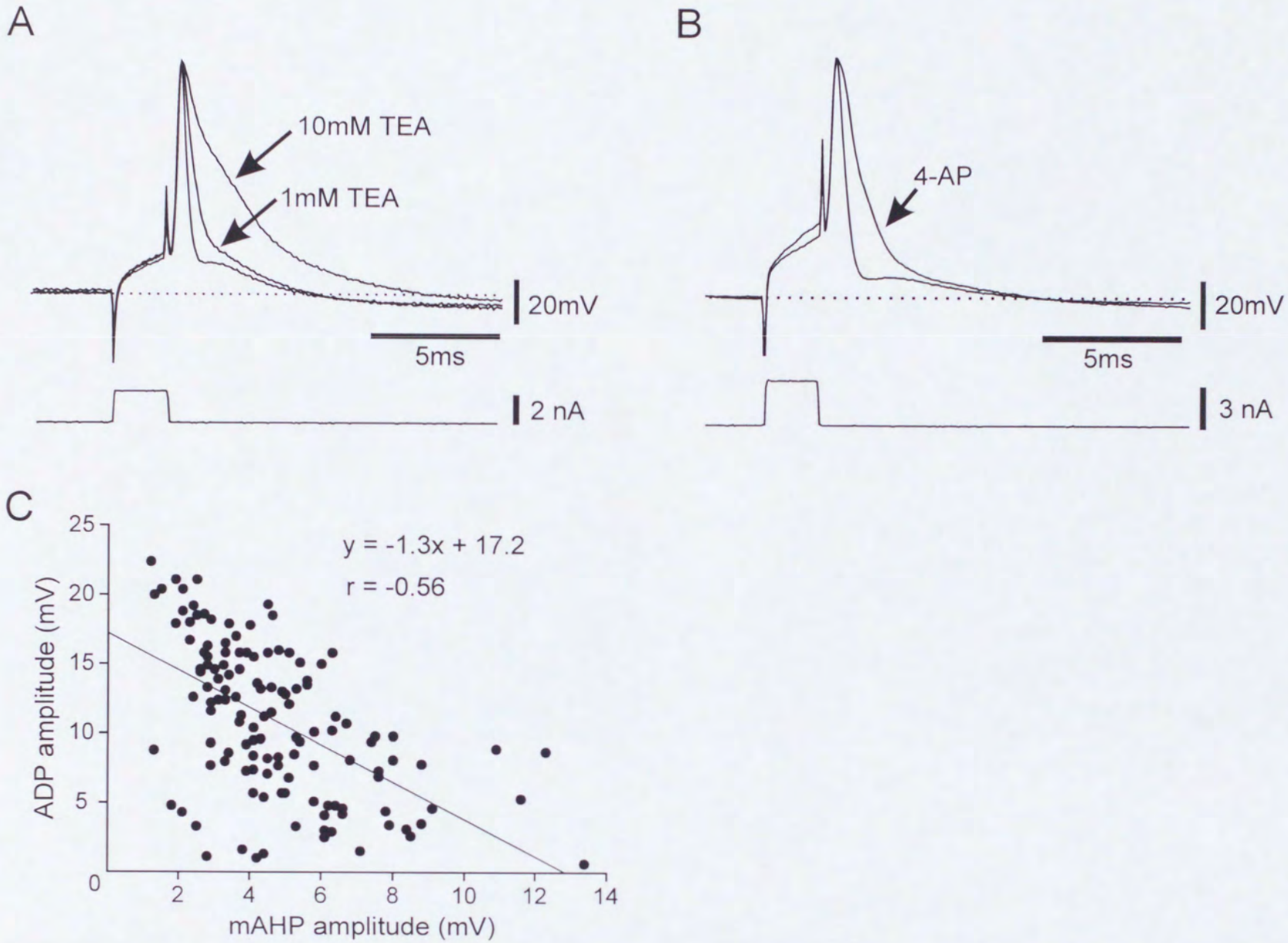

A
Control
1.7nA
20mV
200ms
2.4nA
a
b
B
ω-CTx-GVIA
1.7nA
20mV
200ms
2.4nA
a
b
C
a
10mV
30 ms
b
D
a
b
E
1st ISI
Control
ω-CTx GVIA
Frequency (Hz)
Steady-state ISI
Frequency (Hz)
Current (nA)
F
1st ISI
Control
Apamin
Frequency (Hz)
Steady-state ISI
Frequency (Hz)
Current (nA)

図10


A
10mM TEA
1mM TEA
20mV
5ms
2 nA
B
4-AP
20mV
5ms
3 nA
C
y = -1.3x + 17.2
r = -0.56
ADP amplitude (mV)
mAHP amplitude (mV)
0
5
10
15
20
25
2
4
6
8
10
12
14

付　録

ROLE OF CALCIUM CONDUCTANCES ON SPIKE AFTERPOTENTIALS IN RAT TRIGEMINAL MOTONEURONS

Masayuki Kobayashi, Tomio Inoue, Ryuji Matsuo, Yuji Masuda

Osamu Hidaka, Youngnam Kang* and Toshifumi Morimoto

Department of Oral Physiology, Faculty of Dentistry, Osaka University, Yamadaoka 1–8, Suita, Osaka 565, Japan and Department of Physiology*, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan

Send all correspondence to:

Tomio Inoue, D.D.S., Ph.D.

Department of Oral Physiology

Faculty of Dentistry, Osaka University

Yamadaoka 1–8, Suita

Osaka 565, Japan

Phone: +81-6-879-2882

FAX: +81-6-879-2885

Abbreviated Title: Trigeminal motoneuronal afterpotentials

ABSTRACT

Intracellular recordings were obtained from rat trigeminal motoneurons in slice preparations to investigate the role of calcium conductances in the spike repolarization and afterpotentials. The action potential was followed by a fast and a medium-duration afterhyperpolarization (fAHP and mAHP, respectively) which were usually separated by a transient depolarizing phase called the afterdepolarization (ADP). Neither charybdotoxin nor apamin affected the spike repolarization appreciably, while bath application of tetraethylammonium (1–10 mM) or 4-aminopyridine (500 μM) prolonged the spike repolarization and abolished the fAHP. The mAHP was suppressed by bath application of apamin (1 μM) and inorganic calcium channel blockers (Mn^{2+}, Co^{2+}; 2 mM), and also by substitution of $[Ca^{2+}]_o$ with 2 mM Ba^{2+} or intracellular injection of ethylene glycol-bis (b-aminoethylenether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), suggesting that the potassium conductance generating the mAHP is activated by Ca^{2+} influx. In 9/16 neurons, the suppression of the mAHP resulted in an enhancement of the ADP, indicating that the early phase of the mAHP counteracts the ADP. After abolishing the mAHP with apamin, 2 mM Mn^{2+} or 500 μM Cd^{2+} reduced the ADP while the ADP amplitude was increased by raising $[Ca^{2+}]_o$ from 2 to 8 mM, by bath application of Ba^{2+} (0.5–5 mM) and by intracellular injection of EGTA. This would suggest that the ADP is more likely to be generated by Ca^{2+} influx itself rather than by activation of an intracellular calcium-dependent process. Focal application of ω-conotoxin GVIA (10–30 μM) suppressed the mAHP and enhanced the ADP, whereas focal application of ω-agatoxin IVA (100 μM) reduced the ADP amplitude without apparent effects on the mAHP. Suppression of the mAHP and/or an enhancement of the ADP greatly increased the firing frequency of repetitive firing in response to injection of long depolarizing current pulses.

We conclude that Ca^{2+} influx through ω-agatoxin IVA–sensitive calcium channels is responsible for the generation of the ADP and that Ca^{2+} influx through ω-conotoxin GVIA–sensitive calcium channels contributes to the generation of the mAHP. Because of the

selective suppression of the ADP and mAHP by ω-agatoxin IVA and ω-conotoxin GVIA, respectively, it is suggested that both calcium channels are separated geometrically in rat trigeminal motoneurons. The repetitive firing pattern may be differentially regulated by the activity of ω-agatoxin IVA and ω-conotoxin GVIA–sensitive calcium channels.

INTRODUCTION

The action potential is followed by afterdepolarization (ADP) and medium-duration afterhyperpolarization (mAHP) in spinal (Granit et al. 1963; Harada and Takahashi 1983; Walton and Fulton 1986), hypoglossal (Vianna et al. 1993b) and guinea pig trigeminal (Chandler et al. 1994) motoneurons. Additional spikes can be triggered from the ADP when the ADP is enhanced (Vianna et al. 1993a), whereas the mAHP is an important factor for slowing the rate of firing (Hille 1992). Thus, the potential balance between the ADP and mAHP seems to determine the firing pattern of trigeminal motoneurons (TMNs) and affects the quantitative relationship between the input to TMNs and the final motor output of the muscles.

Voltage-gated calcium channels have been classified into at least five types referred to as L-, N-, P-, Q- and T-type (Bean 1989; Hess 1990; Llinas et al. 1989; Mintz et al. 1992; Randall and Tsien 1995), and multiple types of calcium channels coexist in a single neuron (Bean 1989; Miller 1987). It may be possible that different types of calcium channels participate in distinct physiological functions (Christie et al. 1995). Contribution of calcium currents to generating the ADP has been reported in spinal (Harada and Takahashi 1983; Walton and Fulton 1986) and hypoglossal (Umemiya and Berger 1994; Vianna et al. 1993a) motoneurons. Furthermore, calcium-activated potassium current has been demonstrated to be involved in generating the mAHP in guinea pig trigeminal motoneurons (Chandler et al. 1994) as well as other motoneurons (Barrett and Barrett 1976; Nishimura et al. 1989; Sah and McLachlan 1992; Viana et al. 1993b; Walton and Fulton 1986; Zhang and Krnjevic 1987). Therefore, Ca^{2+} influx may cause both the ADP and mAHP simultaneously. However, it is not clear if the generation of the ADP and the mAHP were differentially regulated by distinct types of calcium channels in single neurons.

In the present study, differential regulations of the ADP and mAHP were investigated in rat TMNs in vitro slice preparations by using intracellular recording method. We

demonstrated that Ca^{2+} influx through ω-agatoxin IVA–sensitive channels is responsible for the generation of the ADP, whereas Ca^{2+} influx through ω-conotoxin GVIA–sensitive calcium channels activates calcium-activated potassium currents responsible for the mAHP. These results suggest that each specific type of calcium conductance may participate in distinct physiological functions in TMNs. Preliminary results of this study were reported previously in abstract form (Kobayashi et al. 1995).

METHODS

Subjects

Seventy-nine Sprague-Dawley rats (3–6 weeks old) were used for slice preparations. To identify the recorded cell as a trigeminal motoneuron histologically, we employed the fluorescence double-labeling technique (cf. Viana et al. 1990) in 20 of 79 animals. The 20 animals were anesthetized with ketamine HCl (150 mg/kg i.m.) and chlorpromazine HCl (12.5 mg/kg i.m.) and both sides of the masseter nerve were dissected. Small amount of dextran-tetramethylrhodamine-lysine (DRL; 10,000 MW, Molecular Probes) in crystal were applied to the central cut ends of the nerve for 30 min, and then the cut ends were rinsed with saline. After 2–5 days the animals were re-anesthetized for slice preparation.

Slice preparation

Animals were anesthetized with ketamine HCl (150 mg/kg i.m.) after an injection of chlorpromazine HCl (12.5 mg/kg i.m.). Following decapitation, the skull was removed and the brain was excised rapidly. The brain was placed in cold modified artificial cerebrospinal fluid (M-ACSF; see below for composition) and sectioned at the inter-collicular level and at the obex. The rostral side of the brainstem was glued onto the stage of a microslicer (DTK-1500, Dosaka) with cyanoacrylate. Transverse slices (450 μm) were cut in cold M-ACSF.

The slices were transferred to a holding chamber containing normal artificial cerebrospinal fluid (N-ACSF; see below for composition) maintained at room temperature.

Solutions

The composition of the N-ACSF was (in mM) 130 NaCl, 3 KCl, 2 $MgCl_2$, 1.25 NaH_2PO_4, 26 $NaHCO_3$, 2 $CaCl_2$, and 10 D-glucose. The M-ACSF was made of N-ACSF by replacing 130 mM NaCl with 260 mM sucrose. The N-ACSF and the M-ACSF were bubbled with a mixture of 95% O_2-5% CO_2, and the pH of these solutions were 7.35–7.40. Viable motoneurons were obtained by using M-ACSF during slice preparation (Aghajanian and Rasmussen 1989; Chandler et al. 1994). In some experiments, the Ca^{2+} concentration was raised to 6–8 mM. When Mn^{2+}, Co^{2+}, Ba^{2+} or Cd^{2+} was added to the ACSF, 2 mM $CaCl_2$ was replaced with 2 mM $MnCl_2$, $CoCl_2$, $BaCl_2$ or 500 μM $CdCl_2$, respectively, and NaH_2PO_4 was omitted to avoid precipitation. For anion substitution experiments, Cl^- was replaced with equimolar amounts of isethionate and the bath was grounded through an agar-KCl bridge. The following drugs were added directly to the perfusate: tetrodotoxin (TTX, 1 μM) (Wako), tetraethylammonium chloride (TEA, 1–10 mM replacing equimolar NaCl), 4-aminopyridine (4-AP, 0.5 mM), charybdotoxin (ChTX, 10–30 nM) (Peptide), $NiCl_2$ (0.5 mM), nifedipine (10 μM dissolved in absolute ethanol). Apamin (10–100 μM) (Peptide) , ω-conotoxin GVIA (ω-CTx-GVIA, 15–20 μM) (Peptide) and ω-agatoxin IVA (ω-Aga-IVA, 10–100 μM) (Peptide) were each dissolved in N-ACSF and applied to the surface of a slice by pressure as microdroplets from a micropipette. All drugs were obtained from Nakarai tesque (Kyoto, Japan) unless otherwise specified.

Recording

After 2–12h incubation in the holding chamber, slices were transferred to an interface-type chamber. The recording chamber was continuously perfused with N-ACSF at a rate of 1–1.5 ml/min, and humidified 95% O_2-5% CO_2 flowed over the slice. All experiments were

performed at 32 ± 1 °C. Intracellular recordings were obtained with glass microelectrodes (1.2–1.5 mm O.D.) (Sutter Instruments). In 20 animals, in which DRL was injected, the microelectrode was filled with biocytin (Sigma) for intracellular staining. Biocytin was prepared as a 1% solution in 1 M KCl and 0.05 M Tris buffer (pH 7.6). In the other experiments, the microelectrode was filled with 1 M KCl and 0.05 M Tris buffer (pH 7.6). For intracellular injection of ethylene glycol-bis (b-aminoethylenether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma), a calcium chelator, microelectrodes were filled with 0.25 M EGTA and 1 M KCl. The DC resistance of the microelectrodes ranged from 30 to 130 MΩ. The amplifier, an Axoclamp 2B (Axon Instruments) was used in either bridge or discontinuous current-clamp (DCC) mode. During DCC recordings, 2–5 kHz sampling rate was employed at a 30% duty cycle. The head stage output was monitored on a separate oscilloscope to ensure proper capacitance adjustment and adequate settling of the microelectrode. Membrane potential and current were digitized and stored on a computer hard disk using software (Clampex, Axon Instruments) through A-D converter.

Data are presented as mean ± SE. Significance was tested using Student's *t*-test with a significance level set at $P < 0.05$.

Histology

After recordings, the slices obtained from the DRL injected animals were fixed in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 12–24 h, and were transferred to 25 % sucrose in 0.02 M phosphate-buffered saline for 12–24h. The slices were frozen, sectioned at 25–30 μm with a cryostat and thaw-mounted onto poly-L-lysine-subbed glass slide. The sections were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated streptavidin (1 : 100) (Amersham) for 10 min, examined with a fluorescein microscope equipped with an appropriate excitation filter (B2 filter for FITC; G filter for DRL) and photographed. To examine whether biocytin-injected neurons were localized in the trigeminal motor nucleus, sections were re-incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated

streptavidin (1 : 500) (Dako) for 60 min at room temperature, and HRP was developed with DAB and 0.003 % H_2O_2 in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) with nickel ammonium sulfate intensification. Sections were counterstained with neutral red.

RESULTS

Identification of the motoneurons

Through the stereomicroscope, we could see the trigeminal motor nucleus as a pale gray area medial to the trigeminal sensory nucleus. We placed the recording electrode in this area. In the first series of the experiments, biocytin was injected into the recorded neurons (n = 40 cells) in order to ascertain that the recorded neurons were located within the trigeminal motor nucleus. All of the recorded neurons were histologically identified to be located within the trigeminal motor nucleus. It is most likely that the neurons within the trigeminal motor nucleus are trigeminal motoneurons because interneurons are very few in the trigeminal motor nucleus (Sessle 1977). Fifteen of the 40 neurons were also labeled by DRL (Fig. 1), indicating that these neurons were masseter motoneurons (see METHODS). Therefore, no histological efforts were made to identify the recorded neurons in the second series of experiments (n = 108 cells).

General properties

The present study was based on the recordings from 148 neurons, which had stable resting potentials more negative than –55 mV (–67.2 ± 0.5 mV; n = 148) and displayed spikes larger than 70 mV (measured from resting membrane potential to the spike peak). Input resistance was 13.4 ± 0.7 MΩ (n = 141), which was calculated from the relationship between injected current intensity (–0.2 to –0.5 nA) and the steady-state (> 200 ms) voltage response. Rheobase was 1.5 ± 0.1 nA (n = 94) measured as the minimum current (300 ms duration) necessary to evoke a single action potential 100% of the time in response to at least five

consecutive stimuli. No neurons fired spontaneously. Single action potentials were elicited by an injection of brief (2–3 ms) depolarizing current pulses. Action potential amplitude was 94.8 ± 0.8 mV (n = 148) and the duration was 0.7 ± 0.01 ms (n = 148; measured 10 mV positive to its threshold).

Action potentials were followed by an biphasic afterhyperpolarization (AHP), consisting of the fAHP and mAHP as shown in Fig. 2A. The mAHP amplitude was 4.7 ± 0.2 mV (n = 148), which was measured from resting potential to the most negative peak (Fig. 2A, empty arrow head). The duration of the mAHP was 56.5 ± 1.6 ms (n = 148). In 132 (89%) of the 148 neurons, these two AHPs were separated by a depolarizing waveform, the afterdepolarization (ADP). The amplitude of the ADP was 10.6 ± 0.5 mV (n = 132), which was measured from the resting potential to its peak (Fig. 2A, filled arrow head). In response to injection of subthreshold depolarizing current pulses, the ADP was rarely observed without generation of action potentials. The remaining 16 neurons did not display a prominent ADP between the fAHP and the mAHP, and were not included in the analysis of the ADP. As shown in Fig. 2B, there is a significant negative correlation between the amplitude of the mAHP and that of the ADP ($r = -0.56$, $P < 0.001$).

Ionic basis for the action potential

Bath application of 1 and 10 mM TEA invariably increased the spike duration by 118 ± 19% (n = 6) and 497 ± 66% (n = 5), respectively, without affecting rising phase of the action potential (Fig. 2C). By contrast, 1 mM TEA increased the amplitude and duration of the mAHP by 66 ± 17% (n = 6) and 19 ± 12% (n = 5), respectively, while 10 mM TEA reduced the mAHP amplitude by 34 ± 5 % in 4/5 neurons tested and prolonged the mAHP duration by 37 ± 11% (n = 5). These effects of TEA were reversible.

The effects of 4-AP on action potential characteristics were also examined in 4 neurons. Bath application of 500 μM 4-AP increased the spike duration in all neurons tested by 141 ± 10 % (n = 4) without affecting rising phase of the action potential (Fig. 2D).

However, we could not analyze the effect of 4-AP on the ADP and mAHP because of a substantial increase in spontaneous synaptic potentials. No consistent effects on the resting membrane potential were observed after 4-AP application.

In order to examine the extent to which calcium-activated potassium currents are involved in spike repolarization, effects of ChTX, a selective blocker for large-conductance calcium-activated potassium channels (BK channels) (reviewed by Blatz and Magleby 1987; Latorre et al. 1989) or apamin, a selective blocker for small-conductance calcium-activated potassium channels (SK channels) (Blatz and Magleby 1986; Pennefather et al. 1985) were examined. Bath application of 10–30 nM ChTX or microdroplet application of 10–20 μM apamin to the surface of the slice had almost no effects on the spike duration (Fig. 3A and B, *inset*).

Effects of varying membrane potentials on the afterpotentials

The amplitude of the afterpotential following a single action potential varied when the membrane potential was changed by direct-current injection (Fig. 4A). The amplitudes of afterpotentials were measured at four different times after spike occurrence indicated by dotted lines. Open and filled circles indicate the peak times of the fAHP and ADP, respectively, evoked from the resting membrane potential of –58 mV. The mAHP was measured at two different times, the peak time of the mAHP evoked from the resting membrane potential (filled square) and 30 ms after the onset of a short depolarizing current pulse (open square). Those amplitudes were plotted against the membrane potential in Fig. 4B and C. The reversal potentials of the afterpotentials were estimated by least squares method. The reversal potentials of the peak mAHP and those measured 30 ms after the onset of a short depolarizing pulse were –80 ± 2 mV (n = 8) and –83 ± 2 mV (n = 8), respectively. These values are slightly positive to the equilibrium potentials of potassium ion (E_Ks) (–86 to –100 mV) calculated using the Nernst equation when $[K^+]_O$ is 3 mM at 32°C and $[K^+]_i$ ranges fom 80 to 200 mM (Buhrle and Sonnhof 1983, Galvan et al., 1984). However, the reversal potential of

the fAHP (–59 ± 2 mV; n = 8) was much more positive than the calculated E_Ks, and was close to that of the ADP (–58 ± 2 mV; n = 7). The slope of voltage-amplitude relationship for the fAHP was similar to that for the ADP (Fig. 4B). This would indicate that the fAHP and ADP were mutually influenced.

Ionic basis for the mAHP

In order to determine the calcium-dependence of the mAHP the following experiments were performed. First, replacement of $[Ca^{2+}]_O$ (2 mM) with inorganic calcium channel blocker, Mn^{2+} (2 mM) and Co^{2+} (2 mM) reduced the mAHP amplitude by 64 ± 15% (n = 5) and 67 ± 15% (n = 5), respectively, 30–60 min after substitution (Fig. 5A). Second, an intracellular injection of EGTA also depressed the mAHP. In 5 neurons tested, the mAHP amplitude was invariably and completely suppressed 10–40 min after impalement of the microelectrode containing 0.25 M EGTA into the neuron (Fig. 5B). Third, substitution of $[Ca^{2+}]_O$ with Ba^{2+} (1–2 mM), which can permeate through calcium channels, reversibly decreased the mAHP amplitude by 69 ± 7% (n = 7; Fig. 5Ca). These results indicate that the mAHP was calcium-dependent.

Apamin or ChTX was applied to examine which type of calcium-activated potassium channels, SK or BK, is involved in the generation of the mAHP. Application of apamin to the surface of the slice (10–20 μM, n = 15) or to the perfusate (1 μM, n = 1) almost completely depressed the mAHP in all the neurons tested. As shown in Fig. 3A, the mAHP amplitude was reduced by 95 ± 3% (n = 16), without any appreciable changes in the height and duration of action potential and input resistance. On the other hand, bath application of ChTX (10–30 nM) had little effect on the ADP and mAHP (n = 8, Fig. 3B).

Ionic basis for the ADP

Since the ADP amplitude increased in 9 of the 16 neurons after attenuation of the mAHP by apamin (Fig. 3A), the early phase of the mAHP appeared to overlap the ADP.

Therefore, effects of Mn^{2+}, Cd^{2+} or high-Ca^{2+} Ringer on the ADP were investigated after suppression of the mAHP by apamin. When Mn^{2+} or Cd^{2+} was applied in the presence of apamin, the ADP amplitude invariably decreased by 26 ± 6% (n = 6; Fig. 6A). In order to quantitatively evaluate the amplitude of the ADP that is generated in association with action potentials, the membrane potential response evoked by a short pulse with an intensity just below the threshold to elicit the action potentials was digitally subtracted from the threshold response with an action potential (Fig. 6A *inset*). The ADP amplitude was measured from the baseline to the peak of the ADP in this digitally calculated waveform. These inorganic calcium blockers invariably reduced the ADP amplitude by 42 ± 9% (n = 6) in the presence of apamin. Raising $[Ca^{2+}]_O$ from 2 to 8 mM invariably increased the ADP amplitude by 29 ± 3% in the presence of apamin (n = 3; Fig. 6B). These results indicate that the currents underlying the ADP are at least in part calcium-dependent.

An intracellular injection of EGTA increased the ADP amplitude by 147 ± 55% (n = 5) while decreasing the mAHP amplitude almost completely (Fig. 5B). Suppression of the mAHP by apamin also resulted in an increase in the ADP amplitude by 9 ± 5% in 9/16 neurons (Fig. 3A). Thus, the increment of the ADP amplitude caused by EGTA was significantly larger ($t = 3.48$, $P < 0.01$) than that caused by apamin. Furthermore, the ADP was similarly enhanced after changing to a perfusing solution containing 0.5–5 mM Ba^{2+} with no added Ca^{2+} (Fig. 5C). This effect of Ba^{2+} was dose-dependent and reversible. Application of a higher dose of Ba^{2+} (2–5 mM) greatly enhanced the ADP and consequently induced a burst of spikes (Fig. 5C). These findings suggest that Ca^{2+} themselves are likely to be the charge carriers generating the ADP, rather than trigger a calcium-dependent process.

Effects of selective calcium channel blockers on the ADP and mAHP

We further examined the effect of selective blockers of high-voltage-activated (HVA) calcium channels on the ADP and mAHP. The effects of ω-CTx-GVIA, N-type calcium channel blocker, on the ADP and mAHP were similar to those of apamin. Microdroplet

application of ω-CTx-GVIA (10–30 μM) strongly decreased the mAHP amplitude by 87 ± 9% (n = 5) and increased the ADP amplitude by 30 ± 12% in 4 out of the 5 neurons (Fig. 7A). It is likely that ω-CTx-GVIA indirectly increased the ADP amplitude by suppressing the mAHP, as was the case with apamin. On the other hand, effects of 100 μM ω-Aga-IVA, a potent blocker of P-type calcium channels, decreased the ADP amplitude by 37 ± 8% (n = 4), but did not alter apparently the peak mAHP amplitude (Fig. 7B). We also applied ω-Aga-IVA in combination with apamin. ω-Aga-IVA (100 μM) reduced the ADP amplitude by 37 ± 11% (n = 6) in the presence of apamin (Fig. 7C). Neither the ADP nor mAHP was apparently affected by nifedipine (10–20 μM), a selective blocker of L-type calcium channels (n = 3; data not shown).

We also examined the effect of blockers of LVA calcium currents on the ADP and mAHP. Ni^{2+} has been reported to block low voltage-activated (LVA) calcium currents in spinal (McCobb et al. 1989) and hypoglossal (Viana et al. 1993a) motoneurons, although Ni^{2+} has been shown to reduce high voltage-activated (HVA) calcium currents as well (Randall and Tsien 1995; Zhang et al. 1993). Addition of 500 μM Ni^{2+} to perfusate containing 2 mM Ca^{2+} decreased the ADP amplitude by 37 ± 12%, while Ni^{2+} did not significantly affect the amplitude of the mAHP (n = 4) (Fig 7D). Next we examined the selective effects of Ni^{2+} on the ADP during blockade of the mAHP by apamin (10–100 μM) in 5 neurons. Ni^{2+} (500 μM) reduced the ADP amplitude in all of the 5 neurons by 33 ± 3% in the presence of apamin (Fig. 7E), Both ω-Aga-IVA–sensitive and Ni^{2+}-sensitive currents were likely involved in the generation of the ADP, because effects of ω-Aga-IVA and Ni^{2+} on the ADP were additive in the presence of apamin (Fig. 7F). However, there was a difference between the effects of Ni^{2+} and ω-Aga-IVA on the ADP when applied during repetitive firing as described in the next section.

Differential effects of calcium channel blockers on the spike afterpotentials during repetitive firing

Trains of spikes were elicited by intracellular injections of long depolarizing current pulses (Figs. 8–10). The ADP was observed following individual action potentials. The amplitude of the 1st ADP (filled arrow head) was usually larger than those of the remaining ADPs (empty arrow heads) which were constant throughout the train of spikes (Figs. 8A, 9A and 10C). Subsequently, the potential level at the peak time of the first mAHP was more positive than those of the remaining mAHPs. Therefore, it was examined if ω-Aga-IVA or Ni^{2+} differentially affects the 1st ADP and the remaining ADPs (Figs. 8 and 9). In the control condition in a TMN, the potential level at the peak time of the ADP was invariably more positive than the spike threshold, regardless of the intensity of injected current pulses (Fig. 8A, left panel). However, an application of ω-Aga-IVA hyperpolarized the peak potential of the ADP to the level more negative than the spike threshold though both the spike threshold and the peak potential of the mAHP were also slightly hyperpolarized as indicated with dotted lines (Fig. 8A, right panel). Regardless of the intensity of injected current pulses, the peak potential of the ADP was invariably more negative than the spike threshold after ω-Aga-IVA application. Therefore, the ADP was considered to be depressed by ω-Aga-IVA, although the 1st ADP was still larger than the remaining ADPs.

In order to evaluate the quantitative difference in the effect of ω-Aga-IVA between the 1st ADP and the remaining ADPs, the afterpotential following the 1st spike and that following the 4th spike obtained after ω-Aga-IVA application were digitally subtracted from those in the control condition, respectively, and were compared. Superimposed traces of the 1st spikes obtained before and after ω-Aga-IVA application and similar superimposed traces of the 4th spikes are shown in Fig. 8Ba and Bb, respectively. After digital subtraction, the difference of each potential following the 1st and the 4th spike (bottom traces in Fig. 8Ba and Bb) should involve the ω-Aga-IVA–sensitive component, respectively, to the same extent. Not only the afterpotentials (the fAHP and the ADP) but also the action potential appeared to involve the ω-Aga-IVA–sensitive component. There was no marked difference in ω-Aga-IVA–sensitive component between the afterpotentials following the 1st and the 4th spike. The amplitude of

ω-Aga-IVA–sensitive component measured at the peak time of the ADP (arrow head) following the 4th spike was 83 ± 3 % (n = 4) of that following the 1st spike.

However, Ni^{2+} differentially affected the 1st ADP and the remaining ADP. Ni^{2+} attenuated the 1st ADP but did not attenuate the remaining ADPs markedly (Fig. 9A, compare left and right panels). The amplitude of Ni^{2+}-sensitive component measured at the peak time of the ADP (arrow head) following the 4th spike was only 10 ± 4 % (n = 4) of that following the 1st spike (Fig. 9Ba and Bb). A Ni^{2+}-sensitive and transiently inactivating depolarization may have been involved only in the 1st ADP. These observations indicate that the ADPs except the 1st one was less sensitive to Ni^{2+} whereas all the ADPs were attenuated by ω-Aga-IVA to the same extent.

Repetitive firing patterns induced by injection of long depolarizing current pulses were strongly altered following suppression of the mAHP and/or enhancement of the ADP by application of ω-CTx-GVIA, apamin or Ba^{2+}. Application of apamin did not change rheobase or input resistance but increased firing frequency, as have been reported in various motoneurons (Chandler et al. 1994; Nishimura et al. 1989; Sah and McLachlan 1992; Viana et al. 1993b). The slope of the SS *f-I* relation (the steady-state spike discharge frequency versus current plot) became steeper by 502 ± 84% (n = 7; Fig. 10F). After apamin application, an additional spike was triggered from the 1st ADP at high current intensities. At the termination of long depolarizing current pulses, a post burst AHP was observed in control of all the neurons tested (Fig. 10Cb, arrow), however, apamin abolished the post burst AHP (data not shown). As observed after apamin application, ω-CTx-GVIA increased firing frequency and the slope of the SS *f-I* relation (Fig. 10E). After ω-CTx-GVIA application, an additional spike was also triggered from the 1st ADP at intensities of higher than 1.9 nA (Fig. 10Da, filled arrow head) and the firing frequency for the 1st interspike interval (1st ISI) was greatly increased (Fig. 10E, arrow), although hardly any spikes were triggered from the 1st ADP even at higher current intensities in controls of all the neurons tested. In contrast to apamin, the post burst AHP was not completely abolished by ω-CTx-GVIA (Fig. 10Db). The effect

of Ba^{2+} on the first ISI was stronger than apamin or ω-CTx-GVIA. When higher dose of Ba^{2+} (2–5 mM) was applied, burst firing was elicited even by a brief (2–3 ms) injected current pulse (Fig. 5C).

DISCUSSION

Action potential repolarization

Extracellular application of TEA or 4-AP increased the duration of action potentials and abolished the fAHP without affecting the rising phase of the action potential in the present study. These results suggest that a TEA-sensitive, voltage dependent, delayed rectifier-type potassium currents and 4-AP-sensitive currents are involved in generating spike repolarization in rat trigeminal motoneurons as reported in trigeminal motoneurons of the guinea pig (Chandler et al. 1994), facial motoneurons (Nishimura et al. 1989) and hypoglossal motoneurons (Viana et al. 1993b). In rat spinal (Takahashi 1990), hypoglossal (Umemiya and Berger 1994) and vagal (Sah and McLachlan 1992) motoneurons calcium-activated potassium channels have been suggested to be involved in the generation of spike repolarization. However, neither charybdotoxin nor apamin altered spike duration in the present study, suggesting that calcium-activated potassium channels are not essential in spike repolarization of trigeminal motoneurons in young adult rats. Similar conclusion has been reached in trigeminal (Chandler et al. 1994; Kim and Chandler 1995) and facial (Nishimura et al. 1989) motoneurons of the guinea pig.

Reversal potentials of the afterpotentials

As discussed above, potassium currents seem to be involved in generating the fAHP, but the reversal potential of the fAHP was much more positive than the calculated E_Ks. This is probably due to contamination of the potassium current with inward currents producing the ADP. In fact, the peak potential of the fAHP was hyperpolarized during attenuation of the

ADP caused by Cd^{2+} or ω-Aga-IVA application (Fig. 6A and 7B) and depolarized during enhancement of the ADP by application of high-Ca^{2+} Ringer in combination with apamin (Fig. 6B). Furthermore, the *I/V* slope and the reversal potential of the fAHP and ADP are similar, suggesting that conductances generating the fAHP and ADP are simultaneously active and counteract mutually.

In agreements with earlier studies in cranial motoneurons (Chandler et al. 1994; Gueritaud 1988; Haddad et al. 1990; Laursen and Rekling 1989; Nishimura et al. 1989; Sah and McLachlan 1992; Viana et al. 1993b), apamin abolished the mAHP in rat trigeminal motoneurons. As ChTX did not affect the mAHP, small-conductance calcium-activated potassium channels (Blatz and Magleby 1986; Pennefather et al. 1985) is likely to be responsible for the generation of the mAHP. The reversal potentials of the mAHP measured at the two different times were more positive than the calculated E_Ks. As has been reported previously, the mAHP may have activated an opposing inward current such as I_h (Nishimura et al. 1989; Spain et al. 1987). However, the reversal potential of the mAHP measured at the peak time was slightly more positive than that measured at the later time. This result suggests that inward currents generating the ADP still remains at the peak time of the mAHP.

Calcium conductances underlying the mAHP and ADP

Umemiya and Berger (1994) reported that the mAHP was attenuated by either ω-CTx-GVIA or ω-Aga-IVA but not by nimodipine in neonatal rat hypoglossal motoneurons. In the present study, ω-CTx-GVIA almost abolished the mAHP and neither ω-Aga-IVA (as high as 100 μM microdroplet application) nor nifedipine affected the mAHP apparently. Therefore, N-type calcium channels are most likely responsible for activating the calcium-activated potassium conductance underlying the mAHP conductance in rat trigeminal motoneurons. Since ω-Aga-IVA reduced the ADP almost selectively without marked effects on the mAHP, the discrepancy of the effects of ω-Aga-IVA on the mAHP between these two studies might

not be due to the difference in the doses of ω-Aga-IVA but might be related to age or origin of the motoneurons.

In the presence of apamin application, inorganic calcium channel blockers reduced the ADP amplitude and high-Ca^{2+} Ringer increased the ADP amplitude in the rat trigeminal motoneurons. These results indicate that the currents underlying the ADP are at least in part calcium-dependent. This calcium-dependency of the ADP is in accord with the results from motoneurons (Harada and Takahashi 1983; Viana et al. 1993a; Walton and Fulton 1986), cortical neurons (Connors et al. 1982; Higashi et al. 1993), thalamic neurons (Bal and McCormick 1993) and sympathetic preganglionic neurons (Yoshimura et al. 1987). However, we could not completely eliminate the possibility that calcium-independent inward currents are also involved in producing the ADP (Alzheimer 1994; Azouz et al. 1996) because inorganic calcium channel blockers failed to abolish the ADP.

It has been also suggested that calcium-dependent non-selective cation currents (Bal and McCormick 1993; Swandulla and Lux 1985) or calcium-dependent chloride currents (Higashi et al. 1993; Sanchez-Vives and Gallego 1994) might be responsible for the ADP. However, Cl^- is less likely to be involved in generating the ADP because reducing extracellular Cl^- concentration from 140 mM to 15–75 mM had little effect on the ADP (n = 4, data not shown). We presume that Ca^{2+} is likely to be the charge carriers of the ADP currents in the rat trigeminal motoneurons for the following reasons: first, substitution of extracellular Ca^{2+} with Ba^{2+} enhanced the ADP and application of high concentration of Ba^{2+} much prolonged the ADP duration. Second, chelation of intracellular free calcium caused by intracellular injection of EGTA increased the ADP amplitude. The increment of the ADP caused by EGTA was larger than that caused by apamin. This is probably due to removing the calcium-dependent inactivation of calcium current or increment of the driving force for Ca^{2+} influx.

We tried to determine which type of specific calcium conductance is responsible for the generation of the ADP. During repetitive firing in response to injection of long (1 s)

depolarizing current pulses, the 1st ADP was larger than the remaining ADPs in the spike train, implying that some components of the ADP might be inactivating. Ni^{2+} suppressed the 1st ADP but had little effect on the remaining ADPs. These results suggest that Ni^{2+}-sensitive rapidly inactivating currents might be involved in the 1st ADP, but did not contribute to the generation of the remaining ADPs. In contrast to the effect of Ni^{2+}, application of 100 μM ω-Aga-IVA reduced not only the 1st ADP but also the remaining ADPs during repetitive firing. Furthermore, ω-Aga-IVA decreased the ADP even after application of apamin and Ni^{2+}. Although this dose (100 μM) was relatively high, the effects of ω-Aga-IVA did not seem to be non-specific because the mAHP was apparently insensitive to ω-Aga-IVA. Therefore, it is likely that ω-Aga-IVA–sensitive HVA calcium currents (P-type) mainly contribute to the generation of the ADP. Nevertheless, the mean peak value of the ADP was around –56 mV, and was lower than the threshold of the HVA currents in other neurons (Hille 1992). There are two possible explanations for this finding. First, the calcium currents responsible for the generation of the ADP might occur in dendritic site and the potential might be attenuated during electrotonic spread from the dendritic site to the soma. Second, the intermediate threshold calcium currents (Alonso and Llinas 1992, Kang and Kitai 1993, Onimaru et al. 1996) might be involved in generation of the ADP. Unlike those studies, subthreshold depolarizing currents rarely evoked the ADP in the present study. Thus, it is more likely that the generation of the ADP may occur in dendrites.

Differential contribution of calcium currents to the ADP and mAHP

ω-CTx-GVIA reduced the mAHP and enhanced the ADP whereas ω-Aga-IVA reduced the ADP without marked effects on the mAHP. Thus, calcium currents contributing to the ADP and mAHP could be different. However, the two important questions now arise: Why didn't ω-Aga-IVA reduce the mAHP? Why did ω-CTx-GVIA enhance the ADP more than apamin did?

It has been reported that distinct types of calcium channels are differentially distributed in neurons (Christie et al. 1995; Elliott et al. 1995). The outward current underlying the mAHP might be generated at the site close to the recording electrode (presumably the soma or proximal dendrites), since the reversal potential of the mAHP was close to the calculated E_Ks in the present study. It has also been suggested that some types of calcium channels and calcium-activated potassium channels are closely located (Robitaille and Charlton 1992; Westenbroek et al. 1992). Since ω-CTx-GVIA reduced the mAHP while ω-Aga-IVA did not reduce the mAHP apparently in the present study, it is likely that SK channels are located more closely to ω-CTx-GVIA–sensitive calcium channels than to ω-Aga-IVA–sensitive ones. Then, Ca^{2+} influx through ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels may have been buffered before activation of SK channels as it has been demonstrated that Ca^{2+} entry caused by a brief depolarization (2–3 ms) was steeply buffered (Lancaster and Pennefather 1987). This may partly explain why ω-Aga-IVA didn't reduce the mAHP. However, the suppression of the ADP due to the blockade of ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels could have led to an enhancement of the mAHP because the ADP and the mAHP were mutually influenced as seen in the effects of varying membrane potentials on the afterpotentials (Fig. 3). Then, after ω-Aga-IVA application, an increase in the mAHP due to the suppression of the ADP may have occurred simultaneously with a decrease in the mAHP due to a suppression of some Ca^{2+} influx that activates SK channels, leaving the apparent peak amplitude of the mAHP unchanged. If this is the case, some fraction of Ca^{2+} influx through ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels may have activated SK channels although the main Ca^{2+} influx contributed to the generation of the ADP.

On the contrary, ω-CTx-GVIA enhanced the ADP more than apamin did. Since some fraction of Ca^{2+} influx through ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels may have reached SK channels, some fraction of Ca^{2+} influx through ω-CTx-GVIA–sensitive calcium channels may also reach the region where ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels are located. If this is the case, blockade of ω-CTx-GVIA–sensitive calcium channels may result in a decrease in $[Ca^{2+}]_i$

in that region. Since Ba^{2+} and EGTA enhanced the ADP markedly, ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels may inactivate calcium-dependently. Then, application of ω-CTx-GVIA may have reduced the calcium-dependent inactivation of ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels, resulted in an enhancement of the ADP. Thus, both ω-CTx-GVIA–sensitive and ω-Aga-IVA–sensitive calcium channels may be geometrically segregated to some extent, but not completely separated.

Role of afterpotentials for firing patterns

The suppression of the mAHP by calcium channel blockers or apamin greatly increased the firing frequency of repetitive firing induced by constant current injection. This is in accord with observation in other cranial motoneurons (Chandler et al. 1994; Nishimura et al. 1989; Sah and McLachlan 1992; Viana et al. 1993b), spinal motoneurons (Walton and Fulton 1986) and cortical neurons (Schwindt et al. 1988). When the ADP was enhanced by Ba^{2+} application or by attenuation of the AHP, additional action potentials could be triggered from the several ADPs in the initial phase of a train of firing in response to long depolarizing current pulses. Thus, 1st ISI was greatly increased and repetitive firing patterns were greatly affected by alterations of the ADP and mAHP. Burke et al. (1970) demonstrated that the insertion of a single extra action potential in a low frequency spike train of a spinal motoneuron can cause marked, long-lasting tension enhancement produced by the muscle fibers which are innervated by the motoneuron. Therefore, not only the average firing rate of a motoneuron but also the pattern of firing seems to alter the amount of force produced by the muscle fibers.

It has been shown that muscle units are roughly divided into fast-twitch (type F) and slow-twitch (type S) (Burke et al. 1971; Burke et al. 1973). Motoneurons which innervate type S have higher input resistance, lower rheobase and greater AHP amplitude than those innervate type F (Zengel et al. 1985). It is worth noting that those TMNs that had higher input resistances and lower rheobases tended to display larger mAHPs and smaller ADPs in

the present study (data not shown). As revealed in the negative correlation between the amplitudes of the mAHP and the ADP, the potential balance between the ADP and mAHP might be determined according to the functional properties of each TMN. It has been also reported that some neuromodulators, such as serotonin and noradrenaline, affect the mAHP and/or the ADP in cranial and spinal motoneurons (Berger et al. 1992; Parkis et al. 1995; Takahashi and Berger 1990). It is likely that those neuromodulators may regulate changes in muscle tension by affecting these spike afterpotentials.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. S. H. Chandler for critical reading of this manuscript. We also acknowledge Dr. S. Wakisaka for useful suggestions on the histological study.

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (nos. 07838018, 07457439 and 07407053) from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture.

REFERENCES

Aghajanian, G. K. and Rasmussen, K. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. *Synapse* 3: 331–338, 1989.

Alonso, A. and Llinas, R. R. Electrophysiology of the mammillary complex in vitro II. Medial mammillary neurons. *J. Neurophysiol.* 68: 1321–1331, 1992.

Alzheimer, C. A novel voltage-dependent cation current in rat neocortical neurones. *J. Physiol. Lond.* 479: 199–205, 1994.

Azouz, R., Jensen, M. S., and Yaari, Y. Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol. Lond.* 492: 211–223, 1996.

Bal, T. and McCormick, D. A. Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *J. Physiol. Lond.* 468: 669–691, 1993.

Barrett, E. F. and Barret, J. N. Separation of two voltage-sensitive potassium currents, and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurones. *J. Physiol. Lond.* 255: 737–774, 1976.

Bean, B. P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 367–384, 1989.

Berger, A. J., Bayliss, D. A., and Viana, F. Modulation of neonatal rat hypoglossal motoneuron excitability by serotonin. *Neurosci. Lett.* 143: 164–168, 1992.

Blatz, A. L. and Magleby, K. L. Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci.* 10: 463–467, 1987.

Blatz, A. L. and Magleby, K. L. Single apamin-blocked Ca-activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature* 323: 718–720, 1986.

Buhrle, Ch. Ph. and Sonnhof, U. Intracellular ion activities and equilibrium potentials in motoneurones and glia cells of the frog spinal cord. *Pflugers. Arch.* 396: 144–153, 1983.

Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., and Zajac, F. E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol. Lond.* 234: 723–748, 1973.

Burke, R. E., Levine, D. N., and Zajac, F. E. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174: 709–12, 1971.

Burke, R. E., Rudomin, P., and Zajac, F. E. Catch property in single mammalian motor units. *Science* 168: 122–124, 1970.

Chandler, S. H., Hsaio, C. F., Inoue, T., and Goldberg, L. J. Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. *J. Neurophysiol.* 71: 129–145, 1994.

Christie, B. R., Eliot, L. S., Ito, K., Miyakawa, H., and Johnston, D. Different Ca^{2+} channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca^{2+} influx. *J. Neurophysiol.* 73: 2553–2557, 1995.

Connors, B. W., Gutnick, M. J., and Prince, D. A. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 48: 1302–1320, 1982.

Elliott, E. M., Malouf, A. T., and Catterall, W. A. Role of calcium channel subtypes in calcium transients in hippocampal CA3 neurons. *J. Neurosci.* 15: 6433–6444, 1995.

Galvan, M., Dorge, A., Beck, F., and Rick, R. Intracellular electrolyte concentrations in rat sympathetic neurones measured with an electron microprobe. *Pflugers. Arch.* 400: 274–279, 1984.

Granit, R., Kernell, D., and Smith, R. S. Delayed depolarization and the repetitive response to intracellular stimulation of mammalian motoneurones. *J. Physiol. Lond.* 168: 890–910, 1963.

Gueritaud, J. P. Electrical activity of rat ocular motoneurons recorded in vitro. *Neuroscience* 24: 837–852, 1988.

Haddad, G. G., Donnelly, D. F., and Getting, P. A. Biophysical properties of hypoglossal neurons in vitro: intracellular studies in adult and neonatal rats. *J. Appl. Physiol.* 69: 1509–1517, 1990.

Harada, Y. and Takahashi, T. The calcium component of the action potential in spinal motoneurones of the rat. *J. Physiol. Lond.* 335: 89–100, 1983.

Hess, P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 337–356, 1990.

Higashi, H., Tanaka, E., Inokuchi, H., and Nishi, S. Ionic mechanisms underlying the depolarizing and hyperpolarizing afterpotentials of single spike in guinea-pig cingulate cortical neurons. *Neuroscience* 55: 129–138, 1993.

Hille, B. *Ionic Channels of Excitable membranes* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

Kang, Y. and Kitai, S. T. Calcium spike underlying rhythmic firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Neurosci. Res.* 18: 195–207, 1993.

Kim, Y. I. and Chandler, S. H. NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 74: 334–346, 1995.

Kobayashi, M., Inoue, T., Matsuo, R., Wakisaka, S., and Morimoto, T. Ionic mechanisms of rat trigeminal motoneurons in vitro. *4th IBRO Abstracts* : 332, 1995

Lancaster, B. and Pennefather, P. Potassium currents evoked by brief depolarizations in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* 387: 519–548, 1987.

Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., and Alvarez, O. Varieties of calcium–activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 385–399, 1989.

Llinas, R. R., Sugimori, M., and Cherksey, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* :103–111, 1989

Laursen, A. M. and Rekling, J. C. Electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons of guinea-pigs studied in vitro. *Neuroscience* 30: 619–637, 1989.

McCobb, D. P., Best, P. M., and Beam, K. G. Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron* 2: 1633–1643, 1989.

Miller, R. J. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235: 46–52, 1987.

Mintz, I. M., Adams, M. E., and Bean, B. P. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9: 85–95, 1992.

Nishimura, Y., Schwindt, P. C., and Crill, W. E. Electrical properties of facial motoneurons in brainstem slices from guinea pig. *Brain Res.* 502: 127–142, 1989.

Onimaru, H., Ballanyi, K., and Richter, D. W. Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. *J. Physiol. Lond.* 491: 677–695, 1996.

Parkis, M. A., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Actions of norepinephrine on rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 74: 1911–1919, 1995.

Pennefather, P., Lancaster, B., Adams, P. R., and Nicoll, R. A. Two distinct Ca-dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3040–3044, 1985.

Randall, A. and Tsien, R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15: 2995–3012, 1995.

Robitaille, R. and Charlton, M. P. Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium–activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12: 297–305, 1992.

Sah, P. and McLachlan, E. M. Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 68: 1834–1841, 1992.

Sanchez-Vives, M. V. and Gallego, R. Calcium-dependent chloride current induced by axotomy in rat sympathetic neurons. *J. Physiol. Lond.* 475: 391–400, 1994.

Schwindt, P. C., Spain, W. J., Foehring, R. C., Stafstrom, C. E., Chubb, M. C., and Crill, W. E. Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 59: 424–449, 1988.

Sessle, B. J. Identification of alpha and Gamma trigeminal motoneurons and effects of stimulation of amygdala, cerebellum, and cerebral cortex. *Exp. Neulol.* 54: 303–322, 1977.

Spain, W. J., Schwindt, P. C., and Crill, W. E. Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *J. Neurophysiol.* 57: 1555–1576, 1987.

Swandulla, D. and Lux, H. D. Activation of a nonspecific cation conductance by intracellular Ca^{2+} elevation in bursting pacemaker neurons of *Helix pomatia. J. Neurophysiol.* 54: 1430–1443, 1985.

Takahashi, T. Membrane currents in visually identified motoneurones of neonatal rat spinal cord. *J. Physiol. Lond.* 423: 27–46, 1990.

Takahashi, T. and Berger, A. J. Direct excitation of rat spinal motoneurones by serotonin. *J. Physiol. Lond.* 423: 63–76, 1990.

Umemiya, M. and Berger, A. J. Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca^{2+} channels in hypoglossal motoneurons. *J. Neurosci.* 14: 5652–5660, 1994.

Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 69: 2137–2149, 1993a.

Viana, F., Bayliss, D. A., and Berger, A. J. Multiple potassium conductances and their role in action potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 69: 2150–2163, 1993b.

Viana, F., Gibbs, L., and Berger, A. J. Double– and triple–labeling of functionally characterized central neurons projecting to peripheral targets studied in vitro. *Neuroscience* 38: 829–841, 1990.

Walton, K. and Fulton, B. P. Ionic mechanisms underlying the firing properties of rat neonatal motoneurons studied in vitro. *Neuroscience* 19: 669–683, 1986.

Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. Biochemical properties and subcellular distribution of an N–type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Neuron* 9: 1099–1115, 1992.

Yoshimura, M., Polosa, C., and Nishi, S. Afterdepolarization mechanism in the in vitro, cesium–loaded, sympathetic preganglionic neuron of the cat. *J. Neurophysiol.* 57: 1325–1337, 1987.

Zengel, J. E., Reid, S. A., Sypert, G. W., and Munson, J. B. Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 53: 1323–1344, 1985.

Zhang, J. -F., Randall, A. D., Ellinor, P. T., Horne, W. A., Sather, W. A., Tanabe, T., Schwarz, T. L., and Tsien, R. W. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmac.* 32: 1075–1088, 1993.

Zhang, L. and Krnjevic, K. Apamin depresses selectively the after-hyperpolarization of cat spinal motoneurons. *Neurosci. Lett.* 74: 58–62, 1987.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Photomicrographs of masseter motoneurons labeled retrogradely with DRL (*A*) and of a motoneuron labeled by intracellular injection of biocytin (*B*). Arrows in *A* and *B* indicate a double-labeled masseter motoneuron. Bar indicates 100 μm.

Figure 2. Properties of action potential and afterpotentials of trigeminal motoneurons of the rat. *A*: An action potential evoked from resting potential (–59 mV) by an injection of 2 ms depolarizing current pulse (lower trace) is followed by a fast afterhyperpolarization (fAHP), an afterdepolarization (ADP), and a medium-duration afterhyperpolarization (mAHP). *B*: plottings of the amplitude of the ADP against the amplitude of the mAHP at the resting membrane potential. *C*: superimposed traces of action potentials before and after bath application of 1 and 10 mM TEA. TEA prolongs action potential duration and blocks the fAHP. Dotted line indicates resting membrane potential (–70 mV). *D*: superimposed traces of action potentials before and after bath application of 500 μM 4-AP. Prolongation of action potential duration is observed. Resting membrane potential is –70 mV (dotted line).

Figure 3. Effects of blockers for calcium-activated potassium channels on afterpotentials. *A*: superimposed traces of action potentials before and after a microdroplet application of 10 μM apamin on the surface of the slice. Apamin blocks the mAHP completely. Dotted line indicates resting membrane potential (–70 mV). *Inset*: duration of the action potential is little affected by apamin. *B*: surperimposed traces before and after bath application of 30 nM ChTX (resting membrane potential is –75 mV). ChTX has little effect on afterpotentials. *Inset*: ChTX has little effect on the duration of the action potential.

Figure 4. Effects of varying membrane potentials on the fAHP, ADP and mAHP. *A*: superimposed records of afterpotentials evoked by intracellular injection of short (2 ms)

depolarizing current pulse at different membrane potentials. Arrow heads show the trace at resting membrane potential (–58 mV). Open and filled circles indicate the times when amplitude measurements of the fAHP and ADP, respectively, are made. The amplitude of the mAHP was measured twice at its peak (filled square) and during the decay time course (open square; 30 ms after the onset of a short depolarizing current pulse). Arrow shows the onset of intracellular injection of short current pulses. *B* and *C*: relationships between the membrane potential and the amplitude of the afterpotentials measured at the respective times indicated with the respective symbols shown in *A*.

Figure 5. Calcium-dependent generation of the mAHP and the ADP. *A*: superimposed traces of action potentials before and after bath application of 2 mM Mn^{2+} (replacing extracellular Ca^{2+} with Mn^{2+}). The mAHP is blocked by application of Mn^{2+}. *Inset*: the ADP is also suppressed by application of Mn^{2+}. Dotted line indicates resting membrane potential (–64 mV). *B*: Progressive suppression of the mAHP and progressive enhancement of the ADP are observed with EGTA-containing electrode. Resting membrane potential is –68 mV (dotted line). *Ca*: superimposed traces of action potentials before and after bath application of 1 and 2 mM Ba^{2+} (zero Ca^{2+}). Suppression of the mAHP and enhancement of the ADP are observed. After application of 2 mM Ba^{2+}, an additional spike was triggered from the ADP. Resting membrane potential, –75 mV (dotted line). *Cb*: an injection of a short (2 ms) depolarizing current pulse induces a burst firing emerging from an enhanced ADP in the same neuron as in *Ca* after bath application of 5 mM Ba^{2+} (zero Ca^{2+}). Resting membrane potential is –75 mV (dotted line). With increasing $[Ba^{2+}]_O$, the ADP progressively augments, leading to a generation of a burst firing.

Figure 6. Contribution of calcium channels to the generation of the ADP. *A*: 500 μM Cd^{2+} suppresses the ADP in the presence of apamin. The potential level at the peak of the fAHP is hyperpolarized. Dotted line indicates resting membrane potential (–68 mV). *Inset*:

each subthreshold response is digitally subtracted from each action potential in *A*. *B*: high-Ca^{2+} (8 mM) Ringer enhances the ADP and depolarizes the peak of the fAHP in the presence of apamin (resting membrane potential is –70 mV).

Figure 7. Effects of selective calcium channel blockers on the afterpotentials. *A*: superimposed traces of action potentials (truncated) before (Control) and after (ω-CTx-GVIA) microdroplet application of ω-CTx-GVIA (20 μM) on the surface of the slice. Dotted line indicates resting membrane potential (–68 mV). *B*: superimposed traces of action potentials before (Control) and after (ω-Aga-IVA) microdroplet application of 100 μM ω-Aga-IVA (resting membrane potential is –68 mV). *C*: superimposed traces of action potentials before (Apamin) and after (Apamin + ω-Aga-IVA) microdroplet application of 100 μM ω-Aga-IVA in the presence of apamin. Resting membrane potential is –65 mV. *D*: superimposed traces of action potentials before (Control) and after (Ni^{2+}) bath application of 500 μM Ni^{2+} (resting membrane potential is –68 mV). *E*: superimposed traces of action potentials before (Apamin) and after (Apamin + Ni^{2+}) bath application of 500 μM Ni^{2+} in the presence of apamin (resting membrane potential is –77 mV). *F*: superimposed traces of action potentials before (Apamin), after bath application of 500 μM Ni^{2+} (Apamin + Ni^{2+}) and after additional application of 100 μM ω-Aga-IVA (Apamin + Ni^{2+} + ω-Aga-IVA) in the presence of apamin. Subthreshold membrane potential was subtracted digitally from action potentials.

Figure 8. Effect of ω-Aga-IVA on the individual ADPs during spike trains. *A*: trains of spikes before (left panel) and after (right panel) application of ω-Aga-IVA, in response to injections of depolarizing current pulses of a long duration. After ω-Aga-IVA application, a depolarizing direct current was injected to keep the original membrane potential (–68 mV), and the intensity of current pulses was set to induce spike trains with ISIs shorter than those in the control condition. Filled and blank arrow heads show the 1st and 4th ADP, respectively. The upper and lower dotted lines indicate the spike threshold level and the peak mAHP level of the

control response, respectively. Both the spike threshold level and the peak mAHP level were slightly hyperpolarized after applying ω-Aga-IVA. Note that both peak levels of the fAHP and the ADP were more positive than the threshold level in the control condition whereas the both levels were more negative than the threshold level after ω-Aga-IVA application, indicating the attenuation of the ADP by ω-Aga-IVA. *Ba* and *Bb*: superimposed traces of parts in A marked by underlines (a and b) before and after ω-Aga-IVA application at an expanded time base. Traces were superimposed by referring to the time when action potentials reached the peak. Note that not only the ADP but also the action potentials were depressed. Bottom traces were obtained by digitally subtracting the membrane potential after ω-Aga-IVA application from that in the control. The individual ADPs during a spike train were almost equally suppressed by ω-Aga-IVA.

Figure 9. Differential effect of Ni^{2+} on the individual ADPs during spike trains. *A*: trains of spikes before (left panel) and after (right panel) application of Ni^{2+}, in response to injections of depolarizing current pulses of a long duration. After Ni^{2+} application, a hyperpolarizing direct current was injected to keep the original membrane potential (–68 mV), and the intensity of current pulses was set to induce spike trains with ISIs shorter than those in the control condition. Filled arrow heads show the 1st ADPs, and blank arrow heads show the 4th ADP. The upper and lower dotted lines indicate the spike threshold level and the peak mAHP level of the control response, respectively. Application of Ni^{2+} had little effect on both the spike threshold level and the peak mAHP level. *Ba* and *Bb*: superimposed traces of parts in *A* marked by underlines (a and b) before and after Ni^{2+} application at an expanded time base. Traces were superimposed by referring to the peak time of action potentials. Action potentials were slightly depressed. Bottom traces were obtained by digitally subtracting the membrane potential after Ni^{2+} application from that in the control. Note that the suppression of the ADP by Ni^{2+} application is observed only in the 1st ADP and Ni^{2+} has little effect on the remaining ADPs during spike trains.

Figure 10. Effects of ω-CTx-GVIA and apamin on repetitive firing. *A* and *B*: repetitive firing evoked by intracellular injection of 1-s current pulses at intensities of 1.7 nA (middle traces) and 2.4 nA (bottom traces) before (*A*) and after (*B*) microdoplet application of 10 μM ω-CTx-GVIA on the surface of the slice. *Ca* and *Cb*: records on expanded scales of time and gain of the parts marked by underlines (a) and (b) in *A*. The 1st ADP (filled arrow head) is larger than the remaining ADPs (blank arrow head). Arrow indicates post burst AHP. Dotted line indicates the resting potential (–71 mV). *Da* and *Db*: similar enlarged records of the parts marked by underlines (a) and (b) in *B*. Action potential emerges from the first ADP (filled arrow head). The mAHP is substantially suppressed, leaving the post burst AHP (arrow) unchanged after application of ω-CTx-GVIA. Dotted line indicates the resting potential (–71 mV). *E*: Upper graph shows *f-I* plots for 1st ISI before (filled circle) and after (open circle) application of ω-CTx-GVIA in the same cell as in *A* and *B*. The 1st ISI is much shorter at intensities of higher than 1.9 nA (arrow) because of an additional spike emerging from the 1st ADP. Lower graph shows *f-I* plots for steady-state interspike interval before (filled circle) and after (open circle) application of ω-CTx-GVIA in the same cell as in *A* and *B*. *F*: Upper graph shows *f-I* plots for 1st ISI obtained from another cell before (filled circle) and after (open circle) application of apamin. An additional spike emerges from the first ADP when intensities of current injection are higher than 0.9 nA (arrow). Lower graph shows *f-I* plots for steady-state interspike interval before (filled circle) and after (open circle) application of apamin in the same cell in upper graph.

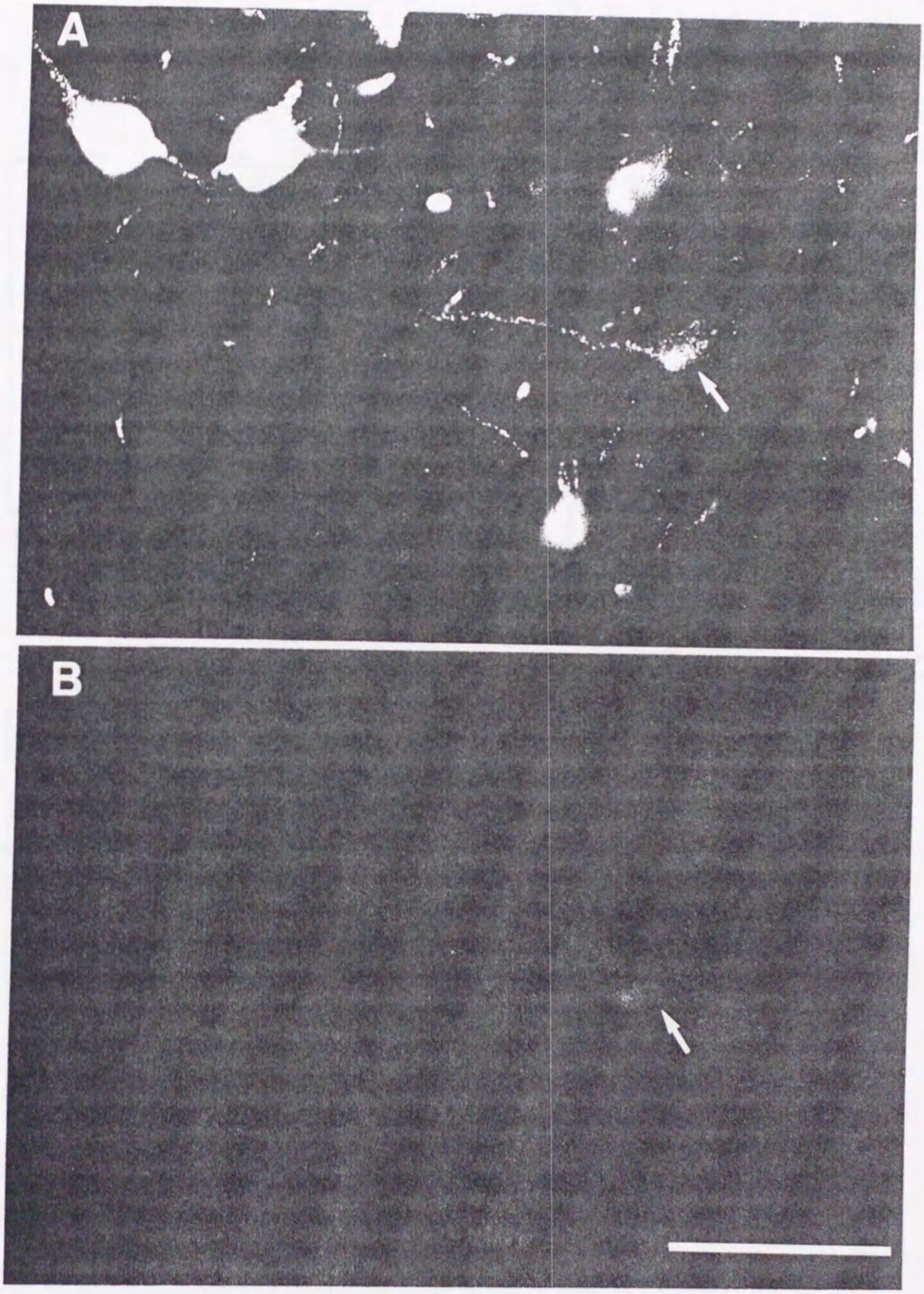


Fig. 1

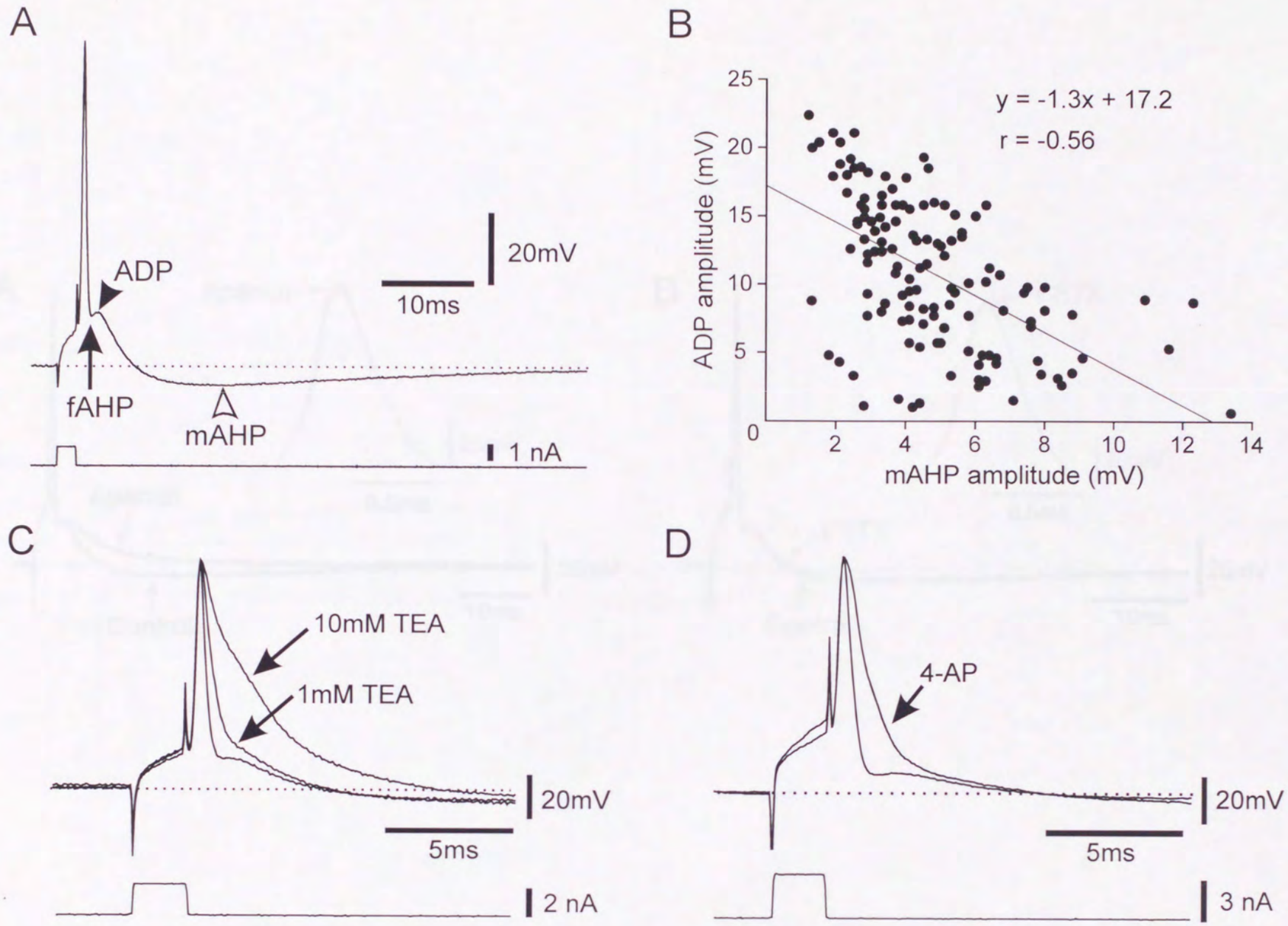

A
ADP
fAHP
mAHP
20mV
10ms
1 nA
B
y = -1.3x + 17.2
r = -0.56
ADP amplitude (mV)
mAHP amplitude (mV)
0
5
10
15
20
25
2
4
6
8
10
12
14
C
10mM TEA
1mM TEA
20mV
5ms
2 nA
D
4-AP
20mV
5ms
3 nA

Fig.2

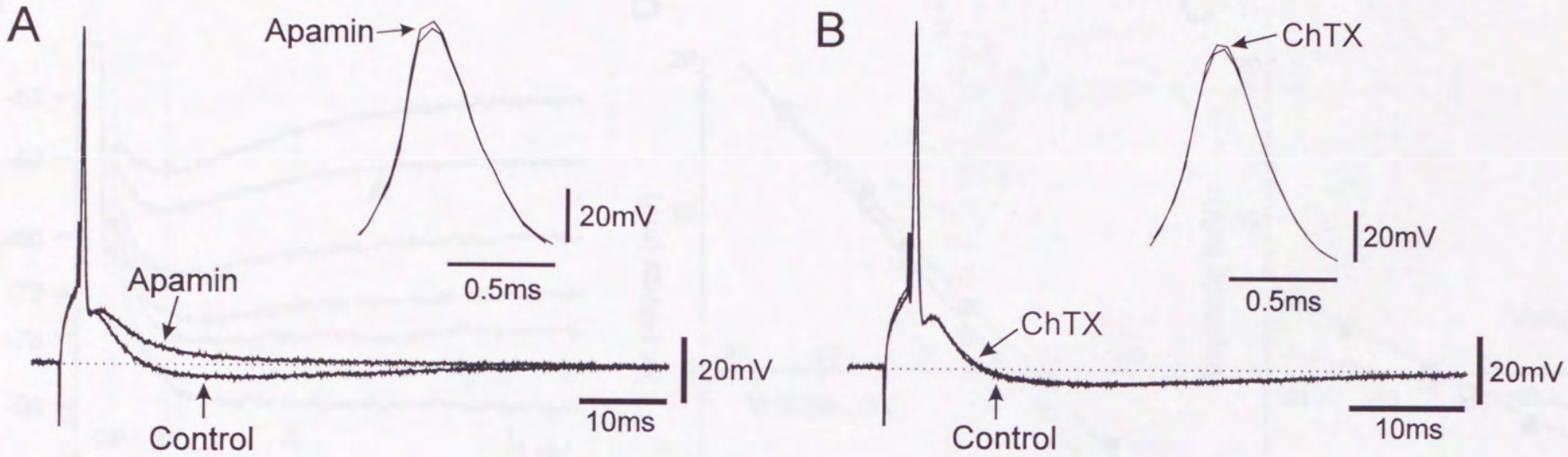

A
Apamin
20mV
0.5ms
Apamin
20mV
10ms
Control
B
ChTX
20mV
0.5ms
ChTX
20mV
10ms
Control

Fig.3

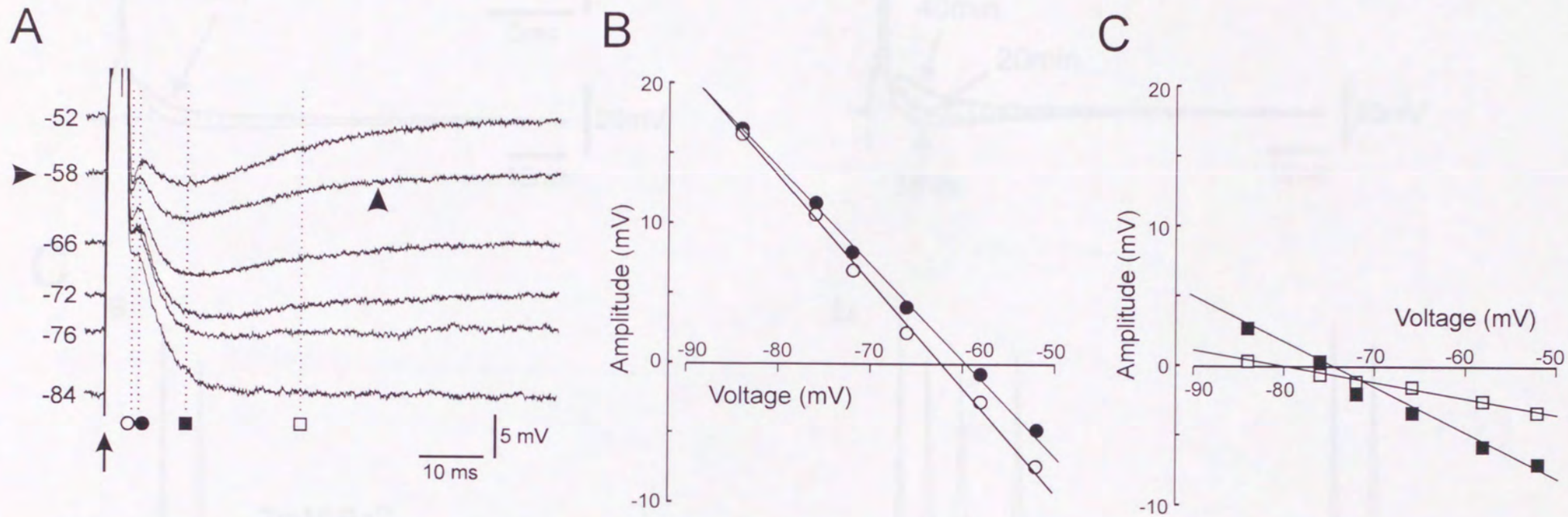

A
-52
-58
-66
-72
-76
-84
5 mV
10 ms
B
Amplitude (mV)
Voltage (mV)
20
10
0
-10
-90
-80
-70
-60
-50
C
Amplitude (mV)
Voltage (mV)
20
10
0
-10
-90
-80
-70
-60
-50

Fig.4

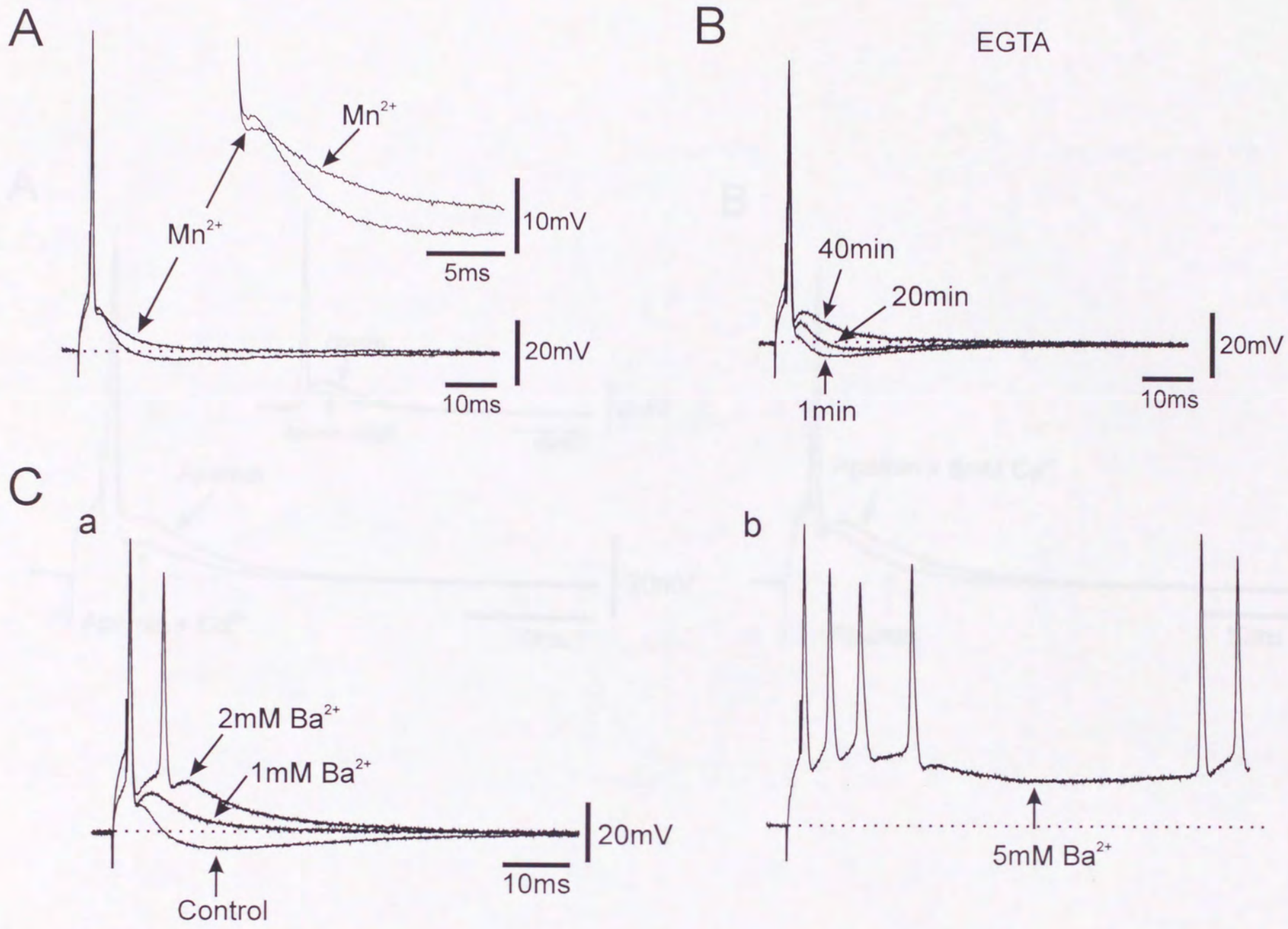

A
Mn2+
Mn2+
10mV
5ms
20mV
10ms
B
EGTA
40min
20min
1min
20mV
10ms
C
a
2mM Ba2+
1mM Ba2+
Control
20mV
10ms
b
5mM Ba2+

Fig.5

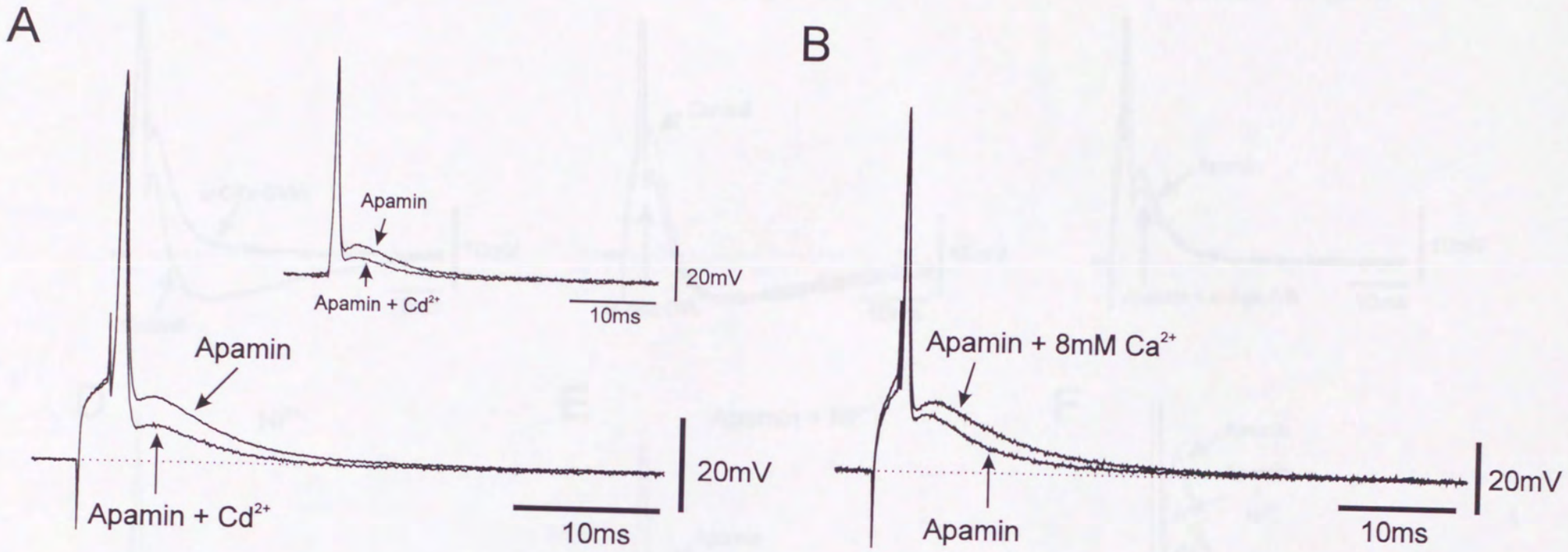

A
Apamin
Apamin + Cd2+
20mV
10ms
Apamin
Apamin + Cd2+
20mV
10ms
B
Apamin + 8mM Ca2+
Apamin
20mV
10ms

Fig.6

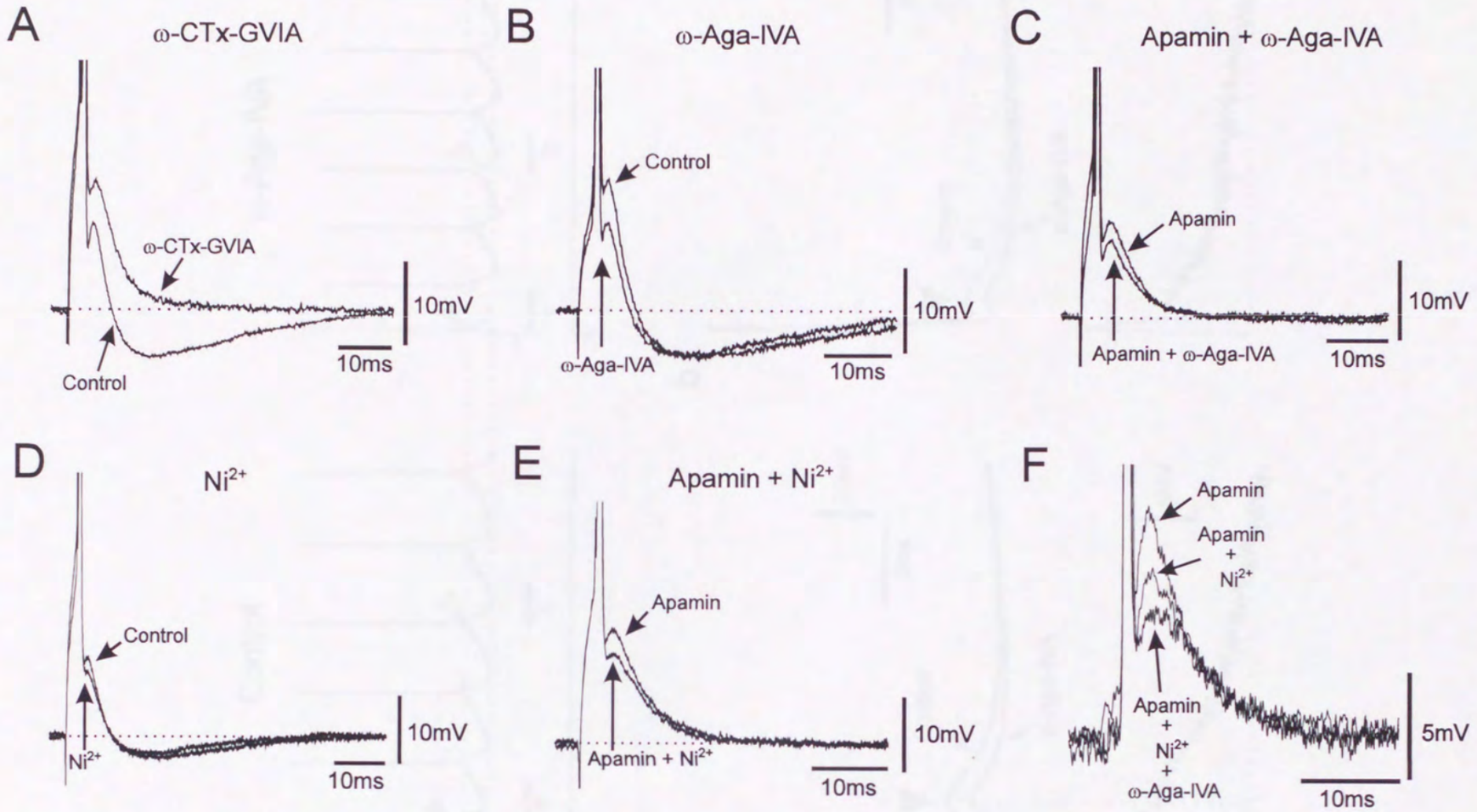

A
ω-CTx-GVIA
ω-CTx-GVIA
Control
10mV
10ms
B
ω-Aga-IVA
Control
ω-Aga-IVA
10mV
10ms
C
Apamin + ω-Aga-IVA
Apamin
Apamin + ω-Aga-IVA
10mV
10ms
D
Ni2+
Control
Ni2+
10mV
10ms
E
Apamin + Ni2+
Apamin
Apamin + Ni2+
10mV
10ms
F
Apamin
Apamin + Ni2+
Apamin + Ni2+ + ω-Aga-IVA
5mV
10ms

Fig.7

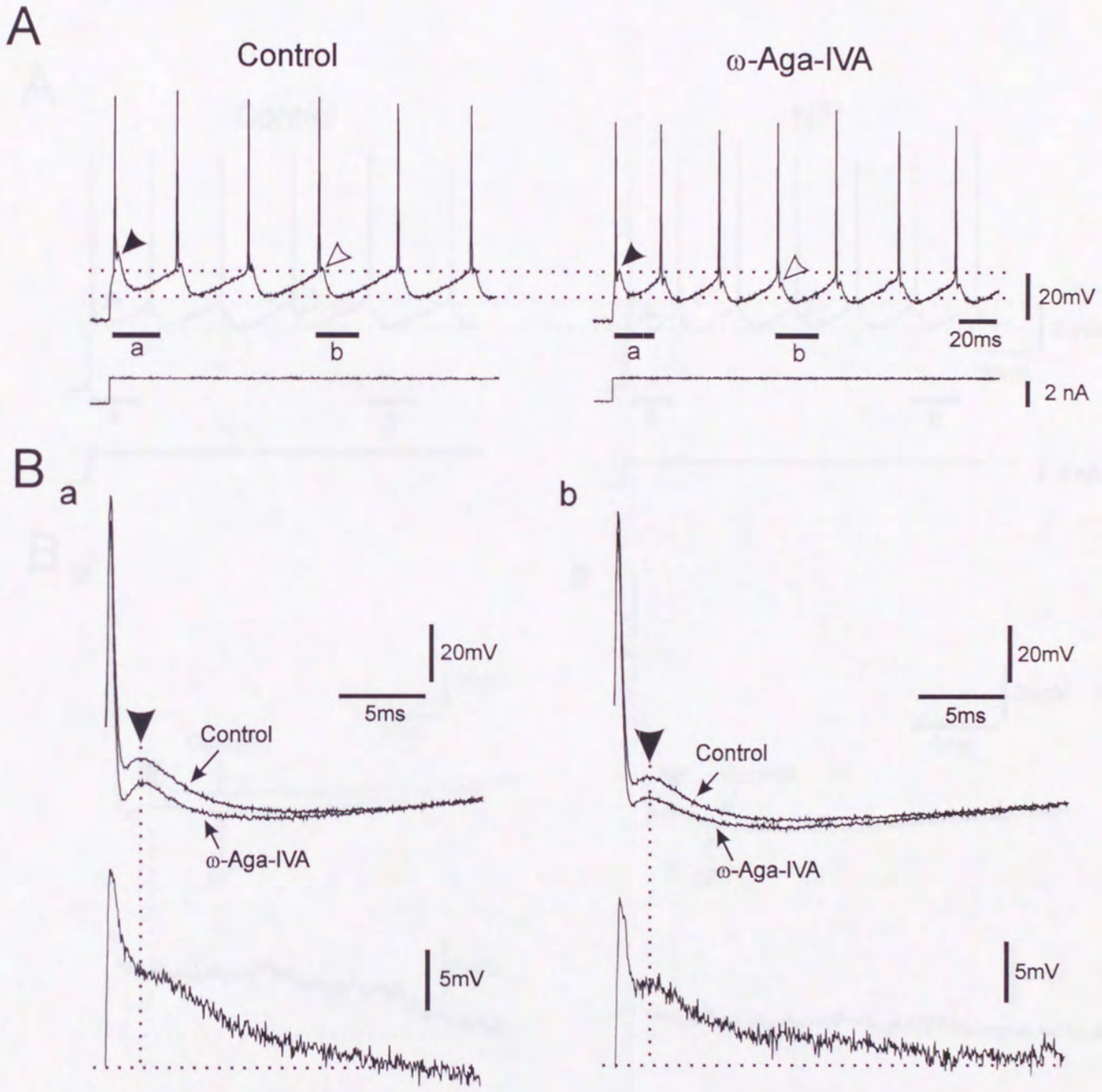

A
Control
ω-Aga-IVA
20mV
20ms
a
b
a
b
2 nA
B
a
b
20mV
5ms
Control
ω-Aga-IVA
5mV
20mV
5ms
Control
ω-Aga-IVA
5mV

Fig.8

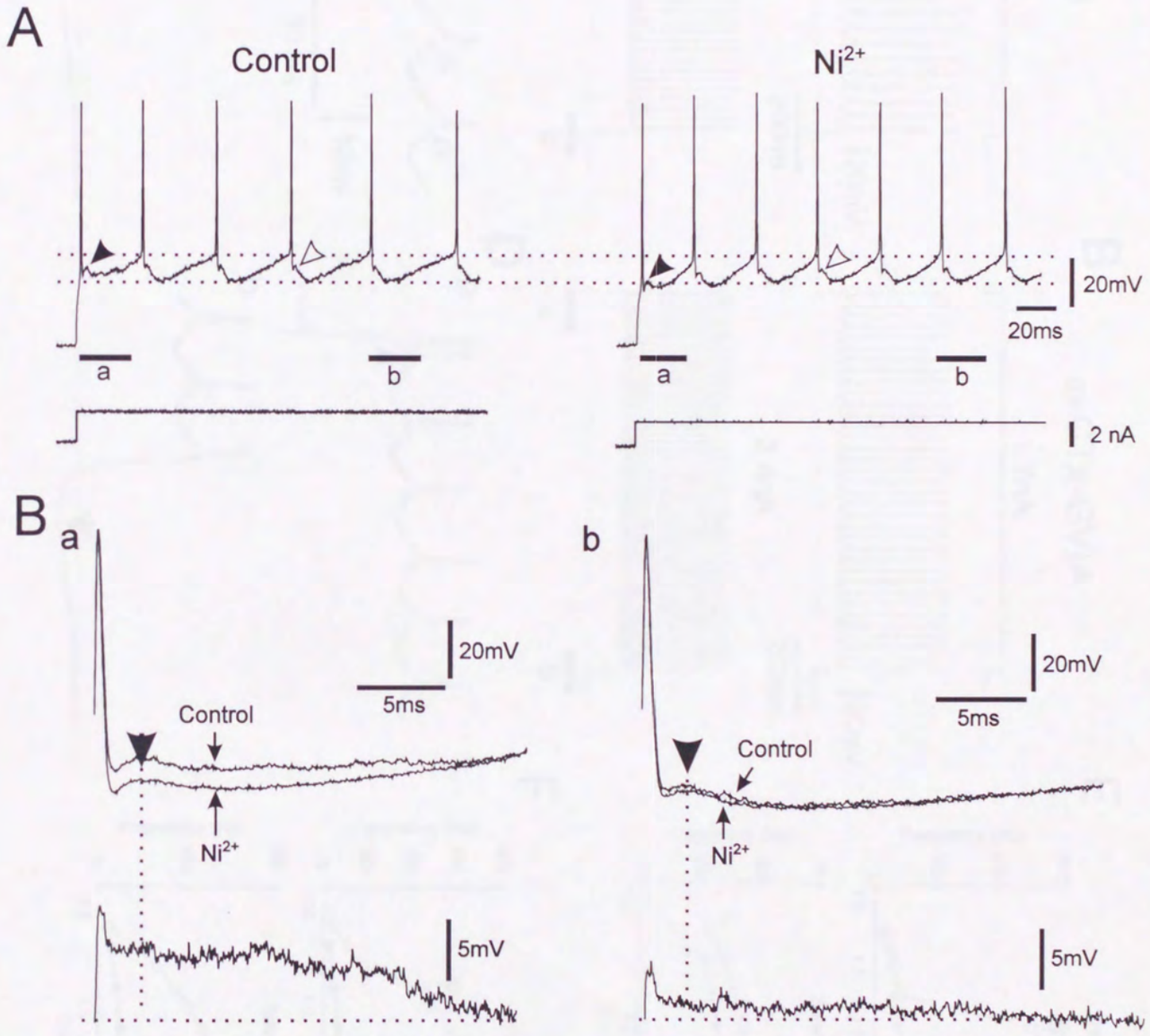

A
Control
Ni2+
20mV
20ms
a
b
a
b
2 nA
B
a
b
20mV
5ms
Control
Ni2+
5mV
20mV
5ms
Control
Ni2+
5mV

Fig.9

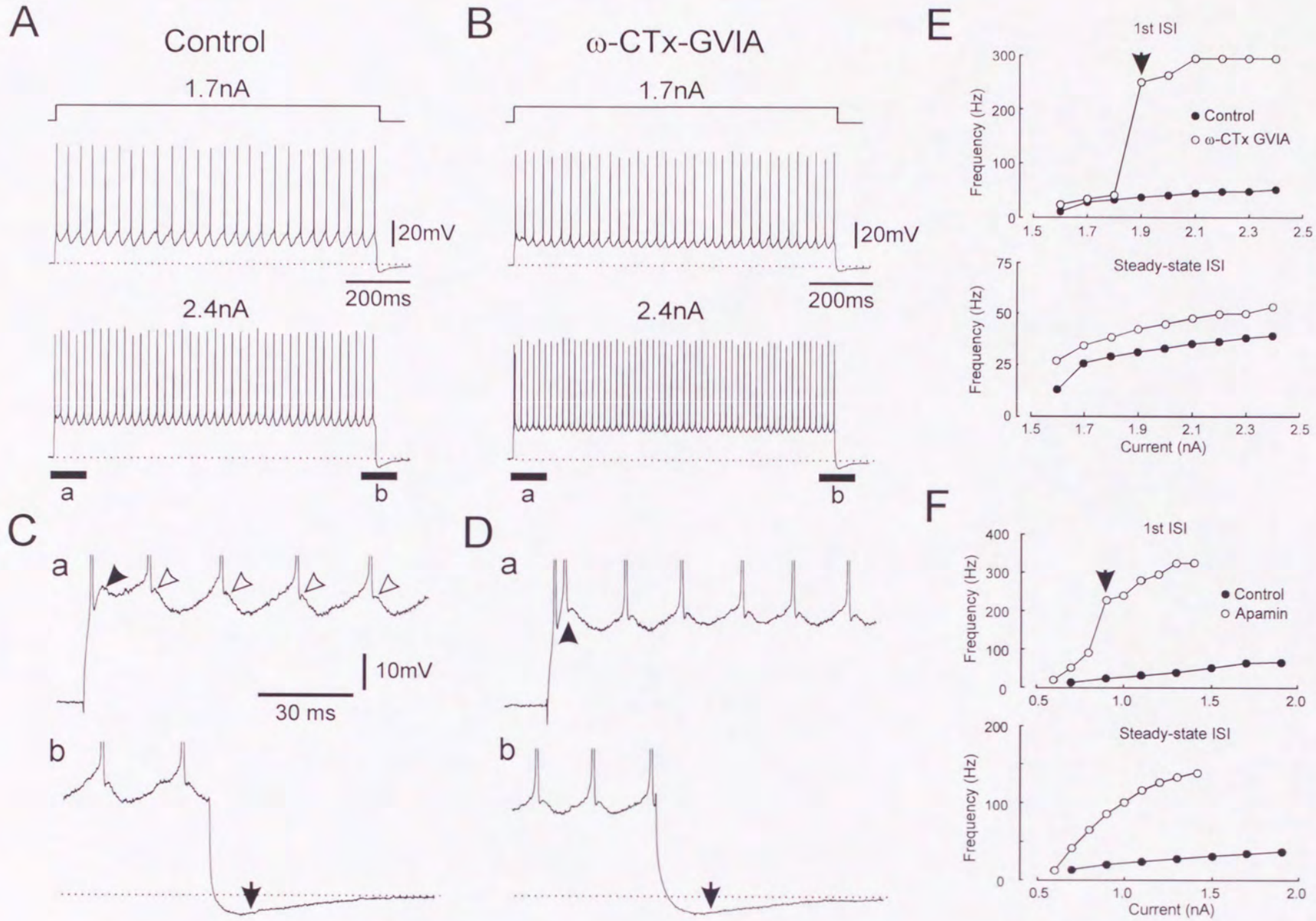

A
Control
1.7nA
20mV
200ms
2.4nA
a
b
B
ω-CTx-GVIA
1.7nA
20mV
200ms
2.4nA
a
b
C
a
10mV
30 ms
b
D
a
b
E
1st ISI
Frequency (Hz)
Control
ω-CTx GVIA
Steady-state ISI
Current (nA)
F
1st ISI
Frequency (Hz)
Control
Apamin
Steady-state ISI
Current (nA)

Fig.10