

Title	cGMPによるラット閉口筋運動ニューロンの興奮性の修飾
Author(s)	深津, 雄己
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59281">https://hdl.handle.net/11094/59281</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【19】

氏名	深津雄己
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第25027号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	cGMPによるラット閉口筋運動ニューロンの興奮性の修飾
論文審査委員	(主査) 教授 前田 芳信 (副査) 教授 姜 英男 講師 瑞森 崇弘 講師 加藤 隆史

## 論文内容の要旨

## 【背景及び目的】

ラット三叉神経運動核(TMN)背外側部の閉口筋運動ニューロンプールには大小様々な運動ニューロン(MN)が存在する。等尺性収縮である噛み締め時に咬合力を増加させていくとき、閉口筋を駆動するMNは、細胞径の小さな細胞から順に動員されると考えられており、これをサイズの原理に基づいた序列動員と言う。これは、細胞径が小さい程入力抵抗は高いと考えられていることから、小さな細胞の方が一定の興奮性シナプス電流に対するシナプス後電位は大きく生じ、活動電位発生の閾膜電位により到達し易いためであると理解されている。MNの入力抵抗は主に、漏洩 $K^+$ チャンネルのひとつであるTASKチャンネルの働きに依存することが知られている。TASKチャンネルには1型と3型が存在し、我々はこれまでに、TASK1チャンネルがNO(一酸化窒素)-cGMP-PKG系によって活性化されることや、細胞の大きさによってTASK1とTASK3の発現割合は異なり、小さい細胞の方がTASK3に対するTASK1の発現比が高くなることを解明した。また、TMNはNO作動性ニューロンからの投射を受けていることが知られており、細胞径によってTASK1発現の比率が異なるMNの入力抵抗は、NO-cGMP-PKG系の活性化により細胞径依存的に修飾され、序列動員様式が変化することが示唆される。

そこで本研究では、MNの興奮性を示す入力抵抗や静止膜電位は細胞の大きさによってどのような違いがあるか、またcGMP膜透過性アナログである8-Br-cGMPの投与によりPKGを活性化した時、それらがどのように修飾されるかをホールセル電流固定記録法により調べた。さらに、TMNにおけるMNの動員が8-Br-cGMPの投与によってどのように修飾されるのかを光学的膜電位測定法を用いて調べた。

## 【方法】

## ホールセル電流固定記録法

4~11日齢のWistar系ラットから、TMNを含む厚さ250 $\mu$ mの冠状断スライス標本作製した。赤外線微分干渉顕微鏡下にてTMN背外側部に存在する大小様々なMNを視

覚的に同定し、ホールセル記録を行った。電流固定下で、 $100\mu\text{M}$  8-Br-cGMP 溶液の投与前後での、パルス通電に対する電位応答を記録した。得られた記録から入力抵抗及び静止膜電位を求め、それらが細胞体の平均径及び 8-Br-cGMP の投与とどのような関連を持つのか調べた。統計学的分析法には、平均値の差の検定として、paired t test または unpaired t test を用いた。各検定の有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 光学的膜電位測定法

13日齢の Wistar 系ラットから、三叉神経中脳路核、運動核および中脳路核の一次感覚ニューロンの軸索が運動核へと延びる線維束を同時に含む厚さ  $350\mu\text{m}$  の冠状断スライス標本を作製した。スライス標本は膜電位感受性色素 RH414 を含む人工脳脊髄液中に 40 分浸漬し、色素を負荷した。TMN 背内側部に単極微小刺激用のタンダステン電極を設置し、Ia 群線維に  $100\text{Hz}$  10 回の連続パルス刺激を与えた。8-Br-cGMP の灌流投与前後における TMN 部の興奮伝播動態を光学的膜電位測定装置で記録した。

#### 【結果】

##### ホールセル電流固定記録法

MN は細胞径が小さい程、入力抵抗は高く、静止膜電位は浅くなる傾向を示した。また、細胞体の平均径が  $15\mu\text{m}$  以上  $19\mu\text{m}$  未満の比較的小きな運動ニューロン群(平均  $17.2 \pm 1.0\mu\text{m}$ ,  $n=7$ )では、8-Br-cGMP の投与により入力抵抗の減少および静止膜電位の過分極方向へのシフトが観察された。一方、細胞体の平均径が  $21\mu\text{m}$  以上の比較的大きな運動ニューロン群(平均  $23.5 \pm 2.3\mu\text{m}$ ,  $n=6$ )では、8-Br-cGMP の投与により入力抵抗の増加および静止膜電位の脱分極方向へのシフトが認められた。細胞径を異にする二群間で、入力抵抗および静止膜電位に有意差が認められたが、8-Br-cGMP の投与によりそうした有意差は消失した。

#### 光学的膜電位測定法

パルス刺激の回数が進むにつれて TMN 部の興奮強度は増加し、MN の動員が引き起こされることが観察された。8-Br-cGMP の灌流投与により、反復パルス刺激の初期では興奮強度が抑制されたが、後期では増強され、MN の動員が増強された。

#### 【考察】

8-Br-cGMP によって、細胞径の小さな MN では、TASK1 チャネル電流が増加し入力抵抗は減少したが、細胞径の大きな MN では入力抵抗は増加した。このことから、大きな細胞でより高密度に発現している TASK3 チャネルは、TASK1 チャネルとは逆に、8-Br-cGMP によって下方制御を受けることが示唆された。このように、細胞径により異なる興奮性を有する閉口筋運動ニューロンは、NO 作動性入力により興奮性の差異を狭小化することがホールセル記録により示唆され、その結果序列動員というよりむしろ、動員の同期化が生じる可能性が示唆された。この可能性は、光学的膜電位測定法において 8-Br-cGMP の投与により、反復刺激の後期で興奮強度の増強が生じ、動員が促進されたことから支持される。

#### 【結論】

ラット三叉神経運動核背外側部に存在する閉口筋運動ニューロンは、細胞径が小さいほど入力抵抗は高く、静止膜電位は浅くなる傾向が示された。また、NO-cGMP-PKG 系の活性化により、細胞径に依存していた MN の興奮性の差異は狭小化され、サイズの原理に基づいた序列動員は同期した動員へと修飾される可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

ラット閉口筋運動ニューロンの興奮性を示す入力抵抗及び静止膜電位と細胞径との関係を調べ、NO-cGMP-PKG 系の活性化がそれらの関係にどのような影響を与えるかを分析した。その結果、細胞径の小さいもの程興奮性が高く、NO-cGMP-PKG 系の活性化は大小細胞間の興奮性の差異を狭小化することが明らかになった。これらの結果は、噛み締め運動において序列動員の細胞基盤が存在すること、また、大きい咬合力を瞬時に発揮する際に NO 入力系が働く可能性を強く示唆する。

以上、本研究は咬合力を調節する神経機構の解明に大きく貢献するものであり、博士(歯学)の学位取得に値するものと認める。