

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_C レセプターの活性化

高 橋 恭 一

(受付 2001年4月24日)

序 文

脊椎動物網膜視細胞は、明所で動作する錐体（光に対する感受性が低い視細胞）と薄明で動作する桿体（光に対する感受性が高い視細胞）に分類される。これらの視細胞で受容された外界の光情報は電位応答に変換され、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にシナプス伝達される。双極細胞では形態視におけるコントラスト強調の初期過程である同心円型中心一周辺拮抗的受容野が、また水平細胞では色覚の初期過程である反対色説応答が形成され、これらの情報はアマクリン細胞や神経節細胞にシナプス伝達される。この伝達過程で、さらに高度な処理が行われる（例えば、運動視など）。

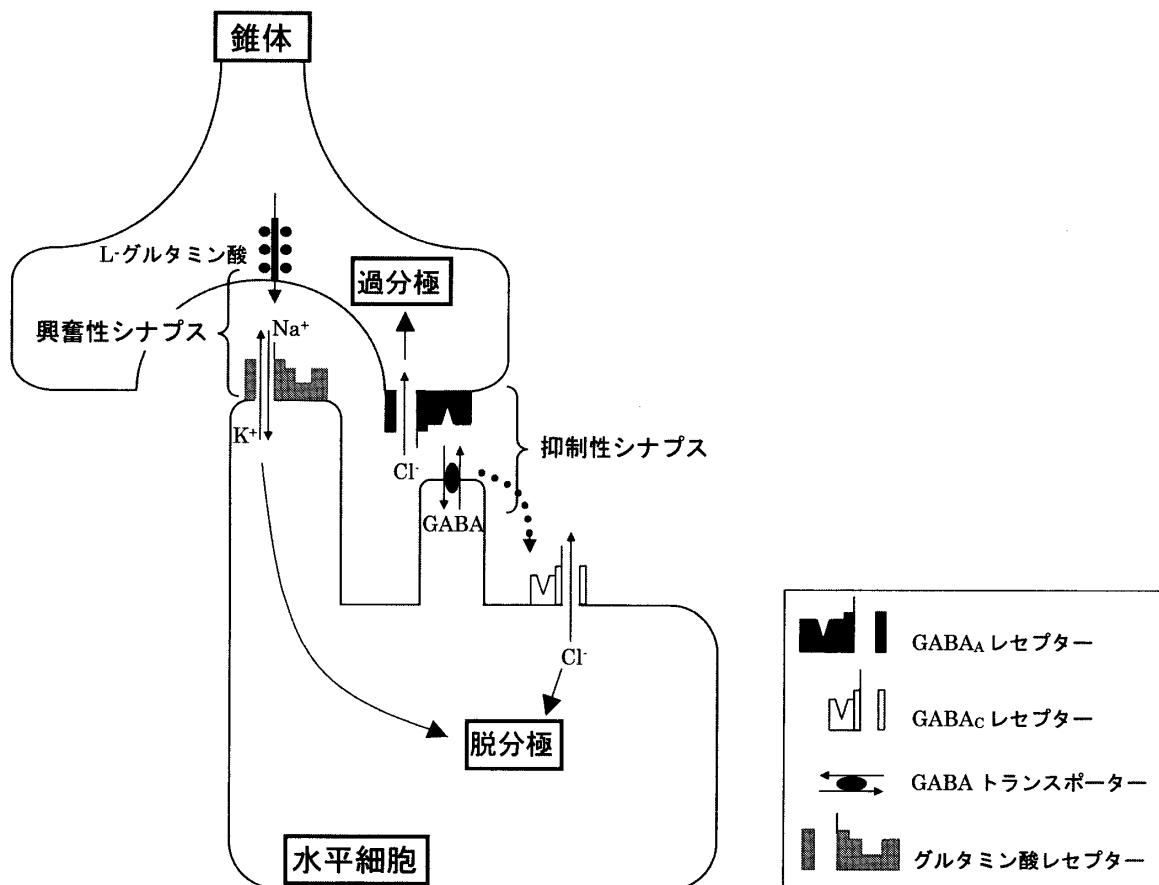
双極細胞は、受容野中心部への光照射によって脱分極性応答そして受容野周辺部への光照射によって過分極性応答を示す ON 中心型双極細胞と、逆の応答パターンを示す OFF 中心型双極細胞に分類される（Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 1973, 1979, 1983; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Saito & Kujiraoka, 1982; Kaneko & Tachibana, 1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987）。ON 中心型双極細胞には 2-Amino-4-phophonobutyric acid (APB) 感受性グルタミン酸レセプター（代謝調節型グルタミン酸レセプター）が、一方 OFF 中心型双極細胞には Kainic acid (KA)/(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸レセプター（イオンチャネル直結型グルタミン酸レセプター）が発現し、それぞれの双極細胞の光応答形成に寄与している（Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995; Sasaki & Kaneko, 1996）。受容野中心部の光応答は視細胞から双極細胞へのシナプス入力により、また受容野周辺部の光応答は水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプスを介する双極細胞へのシナプス入力により形成されることが明らかになっている（Werblin & Dowling, 1969; Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Toyoda & Tonosaki, 1978; Ishida *et al.*, 1980）（説明は後述）。

水平細胞は、錐体からシナプス入力を受け取る錐体水平細胞と桿体からシナプス入力を受

け取る桿体水平細胞に分けられる (MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1965)。色覚を有する下等脊椎動物 (魚類, 両生類と爬虫類) には三種類の錐体 (赤錐体, 緑錐体と青錐体) が存在し, これらはそれぞれ異なるタイプの錐体水平細胞とシナプス連絡している。錐体水平細胞は光応答特性に基づき単相性水平細胞 (赤錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞), 二相性水平細胞 (緑錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞) および三相性水平細胞 (青錐体からシナプス入力を受け取る水平細胞) に分類される。何れのタイプの錐体水平細胞にも, イオンチャネル直結型グルタミン酸レセプターが発現しているため, 基本的に光応答は過分極性となる (Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988)。錐体と錐体水平細胞の間には, 錐体から錐体水平細胞への正のフィードフォワードシナプス (興奮性シナプス) 以外に, 錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックシナプス (抑制性シナプス) が存在する。この負のフィードバックシナプスは錐体終末に発現する GABA_A レセプターを介して錐体の膜電位を調節し, 伝達物質 (L-グルタミン酸) の放出量を制御している。現在, 単相性水平細胞から赤錐体と緑錐体並びに二相性水平細胞から青錐体への負のフィードバックシナプスが, 锐体の三原色説応答を水平細胞の反対色説応答に変換するメカニズムであると考えられている (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995) (第1図参照)。桿体は, 锐体水平細胞とは異なる水平細胞 (桿体水平細胞) とシナプス結合している (Tomita, 1965; Tsukamoto *et al.*, 1987)。同種の水平細胞はギャップ結合 (電気シナプス結合) しているため, 受容野サイズは大きく, 数mmに達する (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Stell & Lightfoot, 1975; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldridge *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993)。この受容野の情報は水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプスを介して双極細胞に伝播され, 同心円型中心一周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成に寄与している (Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978)。

水平細胞から錐体への負のフィードバックシナプスの伝達物質は, γ -アミノ酪酸 (GABA) である (Lam *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 1978; Schwartz, 1982, 1987)。このGABA放出は, Nipecotic acid (NA) (GABAトランスポーター阻害剤) により抑えられること, また細胞内カルシウムイオン濃度上昇が不要であることなどから, GABAトランスポーターの逆転輸送によると考えられている (Schwartz, 1982, 1987; Ayoub & Lam, 1984; Yazulla, 1986)。水平細胞から放出されたGABAはシナプス間隙を拡散し, 锐体終末にあるGABA_A レセプターに到達しこれを活性化する。この結果, 塩素イオン (Cl^-) チャネルが開口し, このチャネルを通じて Cl^- は電気化学的勾配に従い細胞外から内へと移動するため, 锐体は過分極する。これによって, 锐体からのL-グルタミン酸の放出量が減少し, 最終的に水平細胞

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_C レセプターの活性化



第1図 錐体と水平細胞間のシナプス連絡

暗時に、視細胞外節膜に存在する光感受性ナトリウムチャネルは開口し、このチャネルを通じてナトリウムイオン (Na^+) が電気化学的勾配に従って細胞外から外節内に流入するため、視細胞は脱分極した状態にある。明時には光感受性ナトリウムチャネルが閉塞するため、 Na^+ の外節内への流入が減少あるいは停止し、視細胞は過分極する。暗時（脱分極時）に視細胞から放出された L-グルタミン酸はシナプス間隙を拡散し、第二次神経細胞である水平細胞と双極細胞のグルタミン酸レセプターに到達してこれらを活性化する。この結果、それぞれの神経細胞に光応答が発生する。錐体と水平細胞との間には正のフィードフォワードシナプス（錐体から水平細胞へ興奮性シナプス）以外に、負のフィードバックシナプス（水平細胞から錐体への抑制性シナプス）が存在し、反対色説応答形成および中心-周辺拮抗の受容野の周辺部応答形成に寄与している（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Ishida *et al.*, 1980; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995）。この負のフィードバックシナプスでは、GABA トランスポーターの逆転輸送によって γ -アミノ酪酸 (GABA) が水平細胞から放出されている（Schwartz, 1982, 1987; Ayoub & Lam, 1984; Yazulla, 1986）。最近、Qian & Dowling (1993), Dong *et al.* (1994) や Takahashi *et al.* (1995a) は、魚類網膜から単離した水平細胞に GABA_C レセプターが発現していることを見出した。この GABA_C レセプターは水平細胞自身が放出した GABA により活性化する可能性があるが、詳細については未だ明らかになっていない。

は過分極する（第1図参照）。

最近、Qian & Dowling (1993), Dong *et al.* (1994) や Takahashi *et al.* (1995a) は、魚類網膜から単離した水平細胞に GABA_C レセプターが発現していることを見出した。さらに、

Takahashi *et al.* (1995a) は、GABA_C レセプター活性化に伴い発生する膜電位応答の逆転電位 (Cl⁻ の平衡電位) が -30 mV 付近にあり、このレセプターの活性化により水平細胞が脱分極する可能性を示した。ところが、生理的条件下の水平細胞（網膜内で他の神経細胞とシナプス連絡し、光応答を発生することができる水平細胞）において、GABA_C レセプターの活性化がどのような膜電位変化を惹起するのか、さらにこの膜電位変化がどのような生理的意味を持つのかについては全く調べられていない。

そこで、本研究では、生理的条件下の水平細胞に GABA_C レセプターが発現しているのか、また発現しているのであればこのレセプターの活性化によってどのような膜電位変化が生じるのかを、キンギョの剥離網膜標本を用いて調べた。

実験材料と実験方法

実験には、数時間以上暗順応した体長約 8 cm~12 cm のキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。キンギョを 2 時間以上暗順応させた後、低温麻酔し、断頭後、眼球を摘出した。前眼部、水晶体および硝子体を取り除いた後、網膜を剥離し、視細胞側を上にして濾紙に付着させ、剥離網膜標本を作製し実験に用いた。以上の操作は、低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を記録槽内に置き、室温（約 20°C）に保ったリンガー液を 1 ml/分の流速で灌流した。キンギョ網膜用リンガー液の組成は、102.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 28.0 mM 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃), 2.6 mM 塩化カリウム (KCl), 1.0 mM 塩化カルシウム (CaCl₂), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 10.0 mM ぶどう糖 (Glucose), 5.0 mM Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) であった。リンガー液は、1N 塩酸 (HCl) を用いて pH7.8 に調整し灌流した。実験に応じて、γ-アミノ酪酸 (GABA), Nipecotic acid (NA), Bicuculline (BCC), Picrotoxin (PTX), そして塩化コバルト (CoCl₂) を単独あるいは混合してリンガー液に添加し、灌流投与した。

膜電位の導出には、細胞内ガラス管微小電極法を用いた。電極は、Omega dot タイプの borosilicate 性ガラス管 (1B100F-4, World Precision Instruments) を Brown-Flaming 型電極作製機 (P87, Sutter Instrument Co.) を用いて牽引し作製した。電極内には 1M-酢酸カリウム (CH₃COOK) を充填して用いた。電極抵抗は 110~160 MΩ であった。記録槽の底部に輪状にした銀-塩化銀線を置き、これを不関電極とした。水平細胞の電位応答は、微小電極用前置増幅器 (Model 1090, Winston Electronics) を介して、オシロスコープ (R5103N, Tektronix, Inc.) で観察した。同時に、この電位応答は FM データレコーダー (Store 4DS, Racal Recorders, Inc.) により磁気テープに記録した。必要に応じて、磁気テープから再生した信号は 10 KHz でデジタル化 (Labmaster DMA, Scientific Solution) してコンピューター

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_C レセプターの活性化

に取り込み、波形解析ソフトウェア（Origin, OriginLab Co）を用いて解析した。キンギョ網膜には 4 種類の水平細胞（単相性水平細胞、二相性水平細胞、三相性水平細胞そして桿体水平細胞）が存在するが、何れも特徴的な光応答性を示すため識別は容易であった。本実験には、単相性水平細胞を用いた。

等光量子化 (2×10^6 photons/ $\mu\text{m}^2/\text{秒}$) した単色光を網膜全体に照射し、スペクトル応答により水平細胞の種類を確認後、生理学的および薬理学的実験を実施した。必要な場合には、光路に中性濃度フィルターを入れて光強度を調節した。

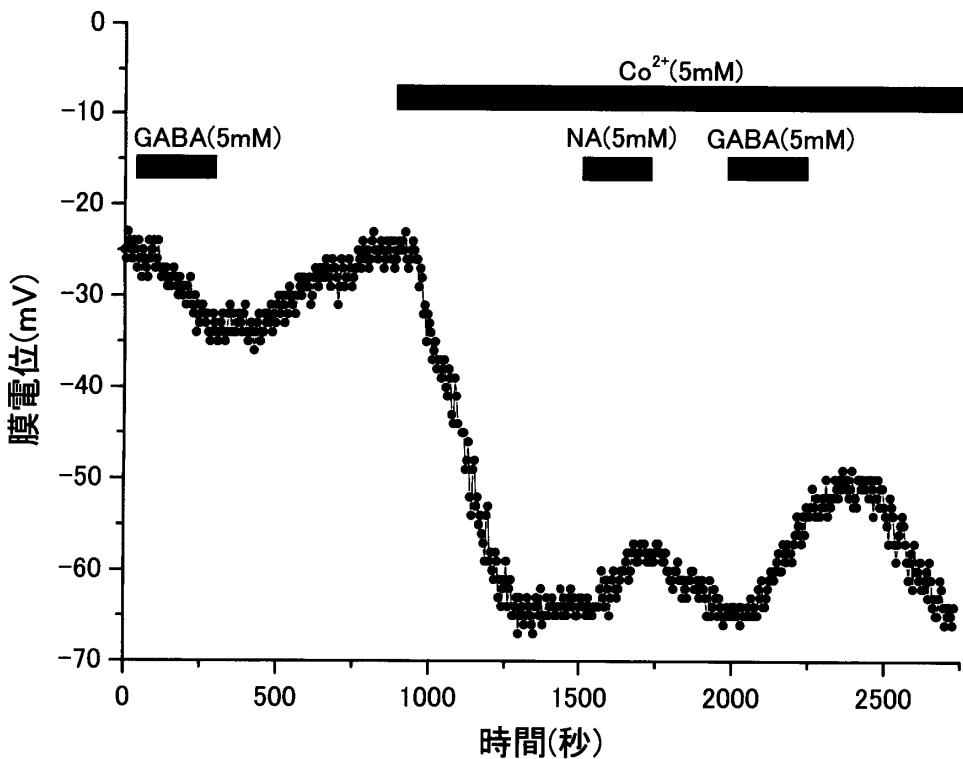
薬品類は、Sigma Chemical Co. から購入した。

実験結果

単相性水平細胞の GABA 応答

リンガー液中で、単相性水平細胞の暗時の膜電位は $-23\text{ mV} \sim -40\text{ mV}$ ($-33.6 \pm 3.4\text{ mV}$, $n=25$) であった。リンガー液に γ -アミノ酪酸 (GABA; 5 mM) を添加し灌流投与すると、単相性水平細胞は $10\text{ mV} \sim 15\text{ mV}$ 過分極し、同時に光応答の振幅も減少した。暗時の膜電位が深い細胞（例えば、 -36 mV より過分極した水平細胞）では、GABA 応答は極めて小さかった。第 2 図に、典型的な GABA 応答を示す例を示した。この単相性水平細胞の暗時の膜電位は、 -24 mV であった。GABA (5 mM) を投与すると、約 10 mV 過分極した。GABA を除去すると、膜電位は元の電位レベルへと回復した。この結果は、従来の報告（すなわち、GABA が赤錐体終末に発現する GABA_A レセプターの活性化 \rightarrow Cl⁻ チャネルが開口し赤錐体の過分極 \rightarrow 赤錐体からの L-グルタミン酸放出量の減少 \rightarrow 単相性水平細胞の過分極）とよく一致していた (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。

これまでの研究から、魚類網膜水平細胞には起電性 GABA トランスポーター並びに GABA_C レセプターが発現していることが明らかになっている（例えば、Schwartz, 1982, 1987; Ayoub & Lam, 1984; Yazulla, 1986; Qian & Dowling, 1993; Dong *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1995a, b）。このトランスポーターとレセプターがキンギョ網膜水平細胞にも発現していれば、GABA 投与によりこれらの活性化に伴う膜電位変化が発生する筈である。この点を明らかにするため、コバルトイオン (Co²⁺) により他の神経細胞とのシナプス連絡を断った単相性水平細胞に対する Nipecotic acid (NA) と GABA の効果を調べた。Co²⁺ (5 mM) をリンガー液に添加し灌流すると、単相性水平細胞は直ちに過分極を始め、約 5 分後には -65 mV 付近に到達した。先に、起電性 GABA トランスポーターの活性化に伴う電位変化が生じるのかどうかを、GABA トランスポーターの輸送基質である NA を灌流投与



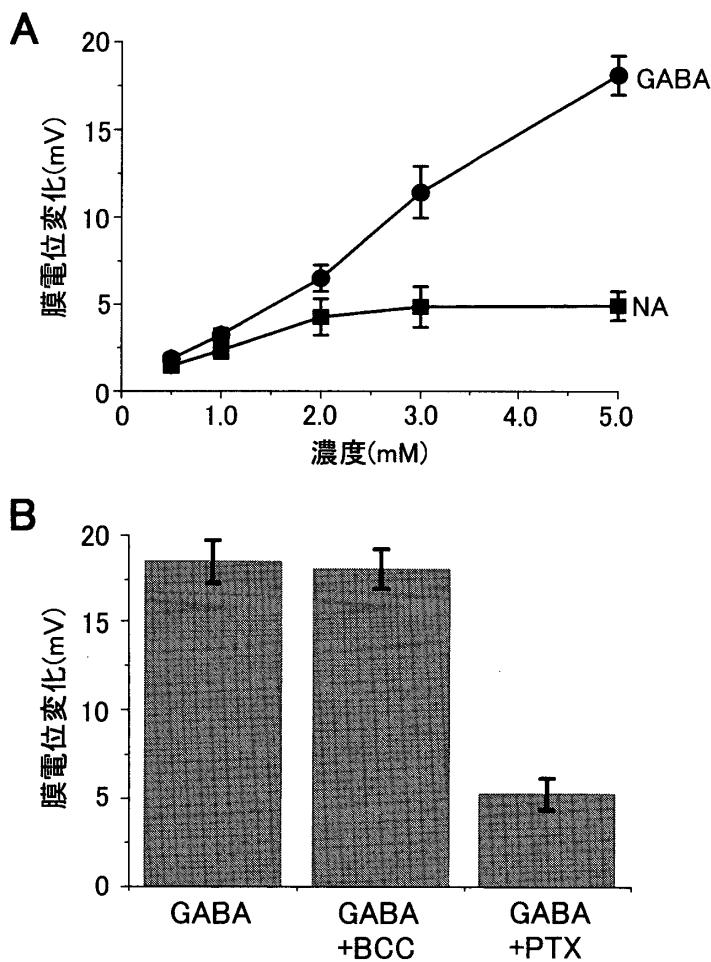
第2図 単相性水平細胞の GABA 応答と Nipecotic acid 応答

リンガー液中で、単相性水平細胞の膜電位は -24 mV であった。本実験では、膜電位を 5 秒毎にサンプルし、これをプロットした。5 mM の γ -アミノ酪酸 (GABA) をリンガー液に溶かして、この細胞に灌流投与すると、膜電位は約 10 mV 過分極した。これを洗い流すと、元の電位レベルに回復した。次に、コバルトイオン (Co^{2+}) を投与し他の神経細胞とのシナプス連絡を遮断した単相性水平細胞に対する Nipecotic acid (NA) と GABA の効果を調べた。5 mM の Co^{2+} をリンガー液に添加し灌流すると、単相性水平細胞は過分極を開始し、約 5 分後に -65 mV に達した。NA (5 mM) を灌流投与すると、約 6 mV 脱分極した。洗い流して、元のレベルに回復した後、GABA (5 mM) を投与した。GABA により、単相性水平細胞は約 15 mV 脱分極した。以上から、キンギョ網膜単相性水平細胞に起電性 GABA トランスポーターが発現し、膜電位発生に寄与していることが明らかとなった。

して調べた（第2図）。NA (5 mM) により単相性水平細胞は約 6 mV 脱分極し、洗い流すと元の膜電位レベルに回復した。続けて、GABA (5 mM) を投与すると、単相性水平細胞は約 20 mV 脱分極し、 -45 mV 付近で定常となった（第2図）。GABA も、洗い流すと元の膜電位レベルに速やかに回復した。以上の結果は、キンギョ網膜単相性水平細胞に起電性 GABA トランスポーターが発現し、膜電位発生に寄与していることを示している。しかし、 GABA_C レセプターが水平細胞に発現しているのかどうかを、第2図の実験により確認することはできなかった。

単相性水平細胞の GABA トランスポーターと GABA_C レセプターの活性化

単相性水平細胞の GABA 応答に、GABA レセプターの活性化に伴う電位成分が含まれて

第3図 単相性水平細胞の GABA トランスポーターと GABA_C レセプターの活性化

A : コバルトイオン (Co^{2+} ; 5 mM) を投与し他の神経細胞とのシナプス連絡を遮断した単相性水平細胞に対する 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 3.0 mM, 5.0 mM の Nipeptic acid (NA) および γ -アミノ酪酸 (GABA) の効果を調べた。この実験を 4 細胞で実施し、それぞれの濃度で得られた電位変化の平均と標準誤差をプロットした。膜電位変化は、0.5 mM NA で 1.45 ± 0.2 mV, 1.0 mM NA で 2.34 ± 0.4 mV, 2.0 mM NA で 4.26 ± 1.0 mV, 3.0 mM NA で 4.85 ± 1.1 mV, 5.0 mM NA で 4.92 ± 0.9 mV、また 0.5 mM GABA で 1.85 ± 0.3 mV, 1.0 mM GABA で 3.24 ± 0.4 mV, 2.0 mM GABA で 6.51 ± 0.7 mV, 3.0 mM GABA で 11.4 ± 1.4 mV, 5.0 mM GABA で 18.1 ± 1.1 mV であった。両応答共に、濃度上昇に伴い応答振幅が増大した。NA 投与の場合、応答振幅は 2 mM で飽和し、これ以上濃度を上げても応答振幅に増大は見られなかった。GABA 投与の場合、濃度上昇とともに応答振幅が増大し、飽和することはなかった。両応答の用量-電位変化曲線の差異は、3 mM 以上の GABA で惹起された電位変化の中に、起電性 GABA トランスポーターの活性化に伴う電位変化以外の成分 (GABA レセプター由来の電位変化) が含まれていることを示唆している。

B : Co^{2+} (5 mM) を投与し他の神経細胞とのシナプス連絡を遮断した単相性水平細胞に対する 5 mM GABA, 5 mM GABA+2 mM Bicuculline (BCC), 5 mM GABA+2 mM Picrotoxin (PTX) の効果を調べた。これらの実験を 4 細胞で実施し、それぞれの濃度で得られた電位変化の平均と標準誤差をプロットした。BCC あるいは PTX を投与する実験では、これらを単独で 5 分間灌流した後、これらに GABA を混合し投与した。それぞれの条件下で発生した膜電位応答は、GABA 単独で 18.5 ± 1.2 mV, GABA+BCC で 18.1 ± 1.1 mV、そして GABA+PTX で 5.24 ± 0.9 mV であった。GABA 応答は BCC による影響を受けなかったが、PTC により約 70% 減少した。この実験は、GABA 投与によって単相性水平細胞に発生した電位応答に、GABA_C レセプターの活性化に伴う電位成分が含まれていることを強く示唆している。

いるのかどうかを調べるために、NA と GABA の用量-電位変化曲線を作成した（第3図A）。この実験も、 Co^{2+} (5 mM) により他の神経細胞とのシナプス連絡を遮断した単相性水平細胞を用いて実施した。先ず、NA の濃度を 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM そして 5 mM と変え、それぞれの濃度で発生する脱分極性応答を記録した。この濃度変化の実験を 4 細胞で実施し、その平均と標準誤差をプロットした。NA 濃度が高いほど、電位変化も大きかった。しかし、NA 応答は 2 mM で飽和（約 5 mV）し、それ以上に濃度を上げても、応答の増大は見られなかった。次に、同様の実験を GABA で実施した。GABA でも、濃度変化の実験を 4 細胞で実施し、その平均と標準誤差をプロットした。GABA による電位変化は飽和せず、濃度上昇につれて増大した。GABA 応答と NA 応答の高濃度（3 mM 以上）での用量-電位変化曲線の差異は、単相性水平細胞の GABA 応答に GABA レセプターの活性化に伴う電位変化が含まれていることを強く示唆していた。

単相性水平細胞にどのタイプの GABA レセプターが発現しているのかを調べるために、GABA レセプターアンタゴニストを投与する実験を行った。この実験も、 Co^{2+} (5 mM) により他の神経細胞とのシナプス連絡を遮断した単相性水平細胞を用いて実施した。 GABA_A レセプターアンタゴニストである Bicuculline (BCC; 2 mM) は GABA 応答に影響しなかった。しかし、 Cl^- チャネル阻害剤である Picrotoxin (PTX; 2 mM) は GABA 応答を約 70% 減少させた。それぞれの実験を 4 細胞で実施し、その平均と標準誤差をプロットした（第3図B）。BCC ではなく、PTX が有効である点を考慮すると、単相性水平細胞には GABA_C レセプターが発現している可能性が高い。

考 察

生理的条件下でキンギョ網膜単相性水平細胞に発生する GABA 応答

暗時に、視細胞外節膜に存在する光感受性ナトリウムチャネルは開口し、このチャネルを通じてナトリウムイオン (Na^+) が電気化学的勾配に従って細胞外から外節内に流入するため、視細胞は脱分極した状態にある。この脱分極は視細胞の L-グルタミン酸放出を促し、水平細胞を脱分極した状態に保つ。脱分極した水平細胞は γ -アミノ酪酸 (GABA) を放出し、この GABA が視細胞終末の GABA_A レセプターを活性化（負のフィードバックシナプスの活性化）するため、視細胞は過分極する。このように、視細胞の暗時の膜電位は、視細胞外節の光感受性ナトリウムチャネルを介する Na^+ の流入による脱分極と視細胞終末の GABA_A レセプターの活性化に伴う塩素イオン (Cl^-) の流入による過分極のバランスによって決まっている。これは、 GABA_A レセプターアンタゴニストである BCC を添加し GABA_A レセプターを阻害（負のフィードバックシナプスの阻害）したとき、水平細胞が脱分極することか

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_C レセプターの活性化

らも明らかである（例えば，Murakami *et al.*, 1982b）。

GABA が、視細胞終末の GABA_A レセプターの活性化（負のフィードバックシナプスの活性化）を介して、最終的に水平細胞を過分極することを確かめるため、生理的条件下の単相性水平細胞（網膜内で他の神経細胞とシナプス連絡し、光応答を発生することができる水平細胞）に対する GABA の効果を調べた（第 2 図）。Murakami *et al.* (1982a, b) の報告通り、GABA は単相性水平細胞を過分極した。水平細胞に起電性 GABA トランスポーターや GABA_C レセプターが発現しているれば、これらの活性化に伴う電位変化が GABA_A レセプターの活性化に伴う過分極に重畠する筈である。GABA 投与実験を 25 回以上繰り返し行ったが、GABA 応答の中に起電性 GABA トランスポーター や GABA_C レセプターの活性化に基団する電位成分を見つけることはできなかった（理由は後述）。

キンギョ網膜単相性水平細胞に発現する GABA_C レセプター

最近、Qian & Dowling (1993), Dong *et al.* (1994) や Takahashi *et al.* (1995a) は、魚類網膜から単離した水平細胞に GABA_C レセプターが発現していることを見出した。キンギョ網膜水平細胞にも GABA_C レセプターが発現しているのかどうかを調べるため、コバルトイオン (Co^{2+}) 投与により他の神経細胞とシナプス連絡（特に、赤錐体からの興奮性シナプス入力）を遮断した単相性水平細胞に対する GABA の効果を調べた。GABA 投与に伴い、単相性水平細胞は脱分極した。この応答は Bicucculline (BCC) ではなく、Picrotoxin (PTX) により抑制された（第 3 図 B）。この結果は、キンギョ網膜単相性水平細胞に Cl^- チャネルとカップルした GABA_C レセプターが発現していることを強く示唆している。

GABA_C レセプター活性化に伴う膜電位変化の逆転電位

生理的条件下の単相性水平細胞（網膜内で他の神経細胞とシナプス連絡し、光応答を発生することができる水平細胞）は、GABA 投与により単純な過分極性応答を示した（第 2 図参照）。この実験を 25 細胞以上で実施したが、暗時の膜電位の深浅（−23 mV～−40 mV）にかかわらず、脱分極性応答を示す水平細胞を見つけることができなかった。また、GABA 投与に伴う過分極性応答に、GABA_C レセプターに基団する電位成分（時間経過の異なる過分極）が重畠する例も見つけることができなかった。これらの観察は、GABA_C レセプターの活性化に伴う電位変化の逆転電位（ Cl^- の平衡電位）が水平細胞の暗時の膜電位付近にあるため、GABA 投与により GABA_C レセプターが活性化しても膜電位変化を惹起しないことを示唆している。

Co^{2+} を投与し他の神経細胞とシナプス連絡を遮断した水平細胞（膜電位が −60 mV～−65 mV）において、GABA は脱分極性応答を誘発し、−45 mV 付近で定常となった（第 2 図参

照)。このGABA応答は、水平細胞に発現するGABAトランスポーター並びにGABA_Cレセプターの活性化に伴う電位変化の総和である。従って、GABA_Cレセプターの活性化に伴う電位成分を単離するには、GABA応答から起電性GABAトランスポーターの活性化に伴う電位成分を除去すればよい。本実験で得られた2つの結果、すなわち①NA応答は2mMで飽和し、その振幅が約5mVであること(第3図A参照)並びに②PTX投与によりGABA_Cレセプターの活性化を抑えた状態で発生したGABA応答が、約5mVであること(第3図B参照)を勘案すると、GABAトランスポーターの活性化に伴い発生する膜電位変化は5mVと推測される。この5mVをGABA応答から差し引くと、GABA_Cレセプターの活性化に伴い発生した膜電位応答となり、その振幅は約15mVである。従って、他の神経細胞とシナプス連絡を遮断した水平細胞(膜電位が-60mV~-65mV)にGABA(5mM)を投与すると、-50mV付近まで脱分極することになる。これは、GABA_Cレセプターの活性化に伴う膜電位応答の逆転電位(Cl⁻の平衡電位)が、-50mVよりも脱分極側にあることを意味している。

以上から、キンギョ網膜单相性水平細胞に発現するGABA_Cレセプターの活性化に伴う膜電位応答の逆転電位は、暗時の膜電位と-50mVの間にあると考えて差し支えがない。この値は、Takahashi *et al.* (1995a)がアメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞で報告した逆転電位(約-30mV)と殆ど同じであった。

GABA_Cレセプター機能の推測

本実験並びにTakahashi *et al.* (1995a)の報告から、GABA_Cレセプター活性化に伴うGABA応答の逆転電位(Cl⁻の平衡電位)は、水平細胞の暗時の膜電位付近あるいはこれより若干過分極側にあると考えられる。この逆転電位の値と水平細胞からのGABA放出は脱分極に伴い増大すること(Schwartz, 1987)とを考え合わせると、GABA_Cレセプターが活性化する状況並びにその機能について推測することが可能である。

暗時にGABA_Cレセプターが活性化すると、水平細胞は脱分極状態(暗時の膜電位)にあるため、水平細胞の膜電位とCl⁻の平衡電位との間に電位差(Cl⁻の電気化学的駆動力)が生じず、水平細胞からのGABA放出量は多いにもかかわらず、顕著な膜電位変化は発生しない。明時にGABA_Cレセプターが活性化すると、水平細胞は過分極しているため、水平細胞の膜電位とCl⁻の平衡電位との間に電位差はあるが、GABAの放出量が少く、大きな膜電位変化の発生には結びつかない。ただし、適当な光強度下では、水平細胞からのGABA放出とGABA_Cレセプター活性化の両方が同時に成立し、水平細胞の膜電位がCl⁻の平衡電位に向かって移動する可能性がある。暗時から明時への移行期には、水平細胞の過分極によりGABA放出が減少するが、水平細胞の膜電位とCl⁻の平衡電位の間の電位差は増大するた

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_C レセプターの活性化

め、特定の膜電位の範囲内で GABA_C レセプターは活性化する。明時から暗時への移行期には、水平細胞の脱分極により水平細胞の膜電位と Cl⁻ の平衡電位の間の電位差は減少するが、GABA 放出は増加するため、特定の膜電位の範囲内で GABA_C レセプターは活性化する。つまり、GABA_C レセプターは、暗時から明時への移行期に水平細胞が過分極するのを遅らせ、そして明時から暗時へ移行期に水平細胞が脱分極するのを速める。おそらく、反対色説応答形成や同心円型中心一周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成に不可欠のメカニズムである負のフィードバックシナプス（水平細胞から錐体への抑制性シナプス）が途切れ無いよう、常に GABA_C レセプターは水平細胞を脱分極した状態に保つ働きをしている。

水平細胞の GABA_C レセプターの機能については、今後さらに詳細な解析を進める必要がある。

引 用 文 献

- Attwell, D. (1986), Ion channels and signal processing in the outer retina, Quart. J. Exp. Physiol., **71**: 497–536.
- Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. and Wilson, M. (1987), Neurotransmitter-induced currents in retinal bipolar cells of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, J. Physiol. (Lond.), **387**: 125–161.
- Ayoub, G. S. and Lam, D. M. K. (1984), The release of γ -aminobutyric acid from horizontal cells of the goldfish (*Carassius auratus*) retina, J. Physiol. (Lond.), **355**: 191–214.
- Baldridge, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, J. Comp. Neurol., **265**: 428–436.
- Baldridge, W. H., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1998), The modulation of intracellular coupling in the retina, Sem. Cell Develop. Biol., **9**: 311–318.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, J. Neurophysiol., **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. and Hassin G. (1978), Influences of cones upon chromatic- and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas, J. Physiol. (Lond.), **281**: 125–137.
- Dong, C.-J., Picayd, S. A. and Werblin, F. S. (1994), GABA transporters and GABA_C-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells, J. Neurosci., **14**: 2648–2658.
- Ishida, A. T., Stell, W. T. and Lightfoot, D. O. (1980), Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina, J. Comp. Neurol., **191**: 315–335.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, J. Physiol. (Lond.), **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the goldfish retina, J. Physiol. (Lond.), **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, J. Physiol. (Lond.), **235**: 133–153.
- Kaneko, A. (1979), Physiology of the retina, Ann. Rev. Neurosci., **2**: 169–191.
- Kaneko, A. (1983), Retinal bipolar cells: their function and morphology, Trends Neurosci., **6**: 219–223.
- Kaneko, A. and Saito, T. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: II. Studies on responses evoked by transretinal current stimulation, J. Gen. Physiol., **81**: 603–612.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976), Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **40**: 537–546.

- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Lam, D. M. K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978), γ -aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 6310–6313.
- MacNichol, E. F. Jr. and Svaetichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalm.*, **46**: 29–46.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABA-ergic pathway in the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–245.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **227**: 899–913.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina, *Vision Res.*, **15**: 456–458.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells, *J. Physiol.*, **223**: 449–460.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990), Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells, *Nature*, **346**: 269–271.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1991), cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter, *Neuron*, **7**: 677–683.
- Qian, H. and Dowling, J. E. (1993), Novel GABA responses from rod-driven horizontal cells, *Nature*, **361**: 162–164.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- Saito, T. (1987), Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina, *Vision Res.*, **27**: 135–142.
- Saito, T. and Kaneko, A. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: I. Studies on responses evoked by light, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 589–601.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1978), Rod and cone signals in the on-center bipolar cells: Their different ionic mechanisms, *Vision Res.*, **18**: 591–595.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979a), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: I. The responses to central illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 73–90.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979b), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: II. The responses to annular illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 569–589.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1982), Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **205**: 161–170.
- Saito, T., Kujiraoka, T. and Toyoda, J. (1984), Electrical and morphological properties of Off-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 200–208.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Schwartz, E. A. (1982), Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **323**: 211–227.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1990), Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **242**: 91–94.

キンギョ網膜水平細胞に発現する GABA_A レセプターの活性化

- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992a), The glutamate-receptor linked cGMP cascade of the retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive, Proc. Roy. Soc. Lond. B, **247**: 17–20.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992b), Properties of the cGMP-activated channel of retinal on-bipolar cells, Proc. Roy. Soc. Lond. B, **247**: 21–25.
- Shiells, R. A., Falk, G. and Naghshineh, S. (1981), Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells, Nature, **294**: 592–594.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, Science, **211**: 182–185.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, J. Comp. Neurol., **159**: 473–502.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, Science, **190**: 989–990.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1995a), GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA_A receptor channels, Jpn. J. Physiol., **45**: 437–456.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995b), Actions of nipecotic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from the catfish retina, Jpn. J. Physiol., **45**: 457–473.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1988), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, Neurosci. Res., **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, Vision Res., **31**: 1159–1165.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **30**: 559–566.
- Toyoda, J.-I. And Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, Nature, **276**: 399–400
- Tsukamoto, Y., Yamada, M. and Kaneko, A. (1987), Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals, J. Comp. Neurol., **255**: 305–316.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, Proc. Roy. Soc. Lond. B, **252**: 93–101.
- Villa, P., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995), L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat, J. Neurosci., **15**: 3571–3582.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, J. Neurophysiol., **32**: 339–355.
- Witkovsky, P., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**: 3556–3560.
- Witkovsky, P., Owen, W. G. and Woodworth, M. (1983), Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina, J. Comp. Neurol., **216**: 359–368.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **30**: 383–392.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB), J. Neurosci., **11**: 2372–2382.
- Yazulla, S. (1986), GABAergic mechanisms in the retina, Prog. Retinal Res., **5**: 1–52.