

魚類網膜水平細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の 調節機序に関する研究

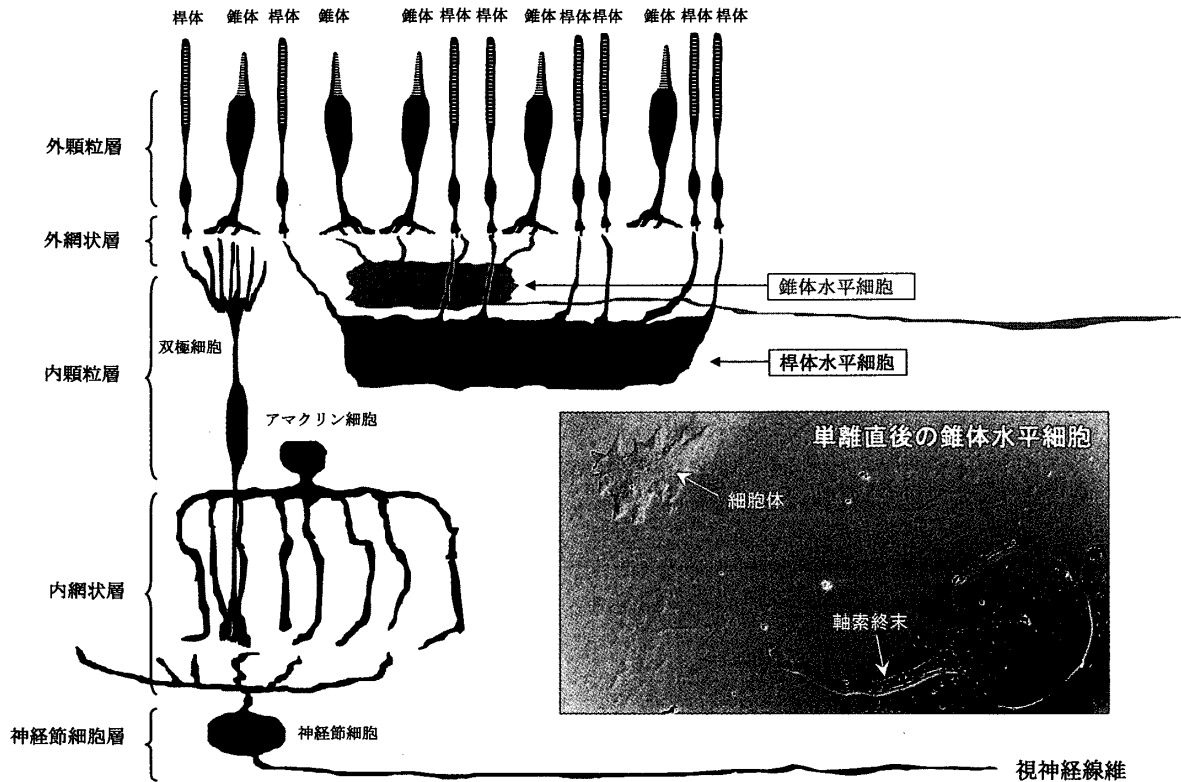
高橋 恭一

(受付 2003年10月1日)

序 論

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）からなる（第1図参照）。この中で、視細胞のみが光感受性を持つ。外界の光環境の変化に対処するため、視細胞は昼間の視覚を担当する錐体と夜間（薄明）の視覚を担当する桿体に分化した。それぞれの視細胞で受容された外界の光環境に関する情報は、電位変化に変換され、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。双極細胞は受容野中心部と周辺部とで光応答極性が反転する同心円型中心-周辺拮抗的受容野を有し、これは形態視におけるコントラスト強調の初期過程を形成している。また、水平細胞では三原色説過程から反対色説過程への変換が見られ、これは色覚の初期過程であると考えられている。これらの細胞からの出力は、アマクリン細胞や神経節細胞にシナプス伝達されるが、この過程でさらに高度な情報処理（例えば、運動視）が行われる。網膜内で処理された視覚情報は、神経節細胞の軸索（視神経線維）を介して脳へと伝播される。

視細胞は、暗時に神経伝達物質としてL-グルタミン酸を放出している。このL-グルタミン酸は双極細胞と水平細胞のグルタミン酸レセプターに結合し、それぞれの細胞に特有の光応答形成に関与している。双極細胞は、ON中心型双極細胞とOFF中心型双極細胞の2種類に分類され、それぞれの双極細胞のシナプス下膜（シナプス部の形質膜）には異なるタイプのグルタミン酸レセプターが発現している。ON中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸レセプターが発現し、このレセプターにL-グルタミン酸が結合すると陽イオンチャネルは閉塞する（Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995）。このため、網膜が光照射されると、ON中心型双極細胞は脱分極する。一方、OFF中心型双極細胞には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、このレセプターにL-グルタミン酸が結合すると陽イオンチャネルは開口する（Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Sasaki & Kaneko, 1996）。このため、網膜が光照射されると、OFF中心型双極細胞は過分極する。水平細胞にも、OFF中心型双極



第1図 魚類網膜における神経細胞構築

脊椎動物網膜は、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞および神経節細胞によって構成されている。視細胞（錐体と桿体）のみが光感受性を有し、他の神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体と低い錐体に分類される。視細胞で受容された明暗情報は電気信号に変換され、縦方向に配置した細胞群（視細胞、双極細胞と神経節細胞）と横方向に配置した細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）による情報処理を経て、脳にシナプス伝達される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、そして双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分を内顆粒層と呼ぶ。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位を外網状層、そして双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス連絡する部位を内網状層と呼ぶ。視覚情報処理は外網状層と内網状層で行われ、神経節細胞の軸索である視神経を経て脳に伝播される。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス結合する錐体水平細胞と桿体とシナプス結合する桿体水平細胞の2種類に分類される。色覚を持つ魚類の網膜には、3種類の錐体（赤錐体、緑錐体と青錐体）のそれぞれと独占的にシナプス結合する髄質水平細胞（単相性水平細胞、二相性水平細胞と三相性水平細胞）がある。因みに、本研究で用いたアメリカカナマズの網膜には赤錐体と桿体の2種類の視細胞しかなく、色覚は無い。赤錐体は錐体水平細胞（単相性水平細胞）と桿体は桿体水平細胞とシナプス連絡している。挿入した顕微鏡写真は、アメリカカナマズ網膜内から単離した直後の錐体水平細胞の細胞体と軸索終末である。

細胞と同様の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、光照射に伴い過分極する (Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988)。

双極細胞の受容野中心部応答は、視細胞からの双極細胞への直接的なシナプス入力により形成される (Ishida *et al.*, 1980)。一方、周辺部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（抑制性シナプス）を經由した双極細胞への間接的なシナプス入力によって形成されると考えられている（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978）。この負のフィードバックシナプスは拮抗的受容野の周辺部応答の形成のみならず三原色説過程から反対色説過程への変換にも関与している。色覚を有する下等脊椎動物（魚類、両生類と爬虫類）には3種類の錐体（赤錐体、緑錐体と青錐体）が存在し、それぞれは別のタイプの水平細胞（3種類の錐体水平細胞）とシナプス結合している（Tomita, 1963, 1965; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995）。これら3種類の錐体水平細胞は光応答特性から、単相性水平細胞（赤錐体から主なシナプス入力を受け取る水平細胞）、二相性水平細胞（緑錐体から主な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（青錐体から主なシナプス入力を受け取る水平細胞）に分類されている（Naka & Rushton, 1967; Gouras, 1972; Daw, 1973）。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、錐体から放出される L-グルタミン酸量を制御している。現在、単相性水平細胞から赤錐体と緑錐体への、そして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、錐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; Witkovsky *et al.*, 1995b）。

Takahashi *et al.* (1993) と Dixon *et al.* (1993) は、視細胞から放出される L-グルタミン酸が神経伝達物質として機能するのみならず、神経修飾物質として水平細胞のイオンチャンネルを修飾することを見出した。具体的には、L-グルタミン酸が水平細胞を酸性化すること、さらにこの酸性化が高閾値型カルシウムチャンネルを抑制することである。カルシウムチャンネルは細胞の膜電位に影響するのみならず、細胞内の諸種の酵素反応に関わるカルシウムイオン (Ca²⁺) の供給経路として機能している。このため、カルシウムチャンネルは数種存在する電位依存性イオンチャンネル（ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネルやクロライドチャンネルなど）の中で、とりわけ重要であると考えられている。

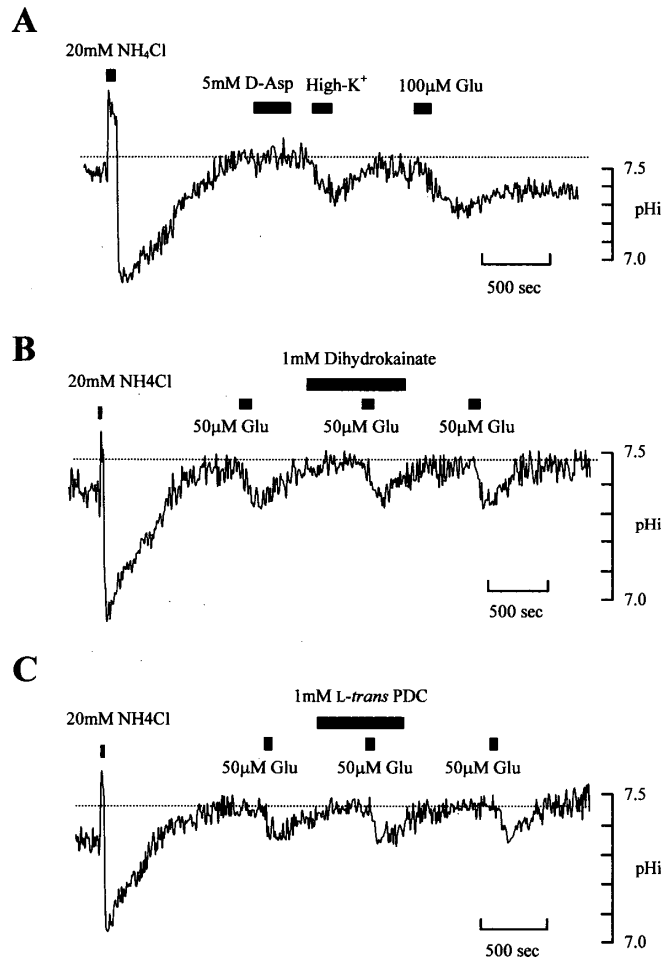
本研究では、アメリカナマズ網膜から単離・培養した水平細胞を用いて、L-グルタミン酸投与によって水平細胞に惹起される酸性化のメカニズム、および細胞内水素イオン (H⁺) 濃度と細胞内 Ca²⁺濃度の連関について調べたので報告する。

実験材料と方法

実験には、体長約 40 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。ナマズを 2 時間以上暗順応させた後、断頭し、眼球を摘出した。この眼球を 70% エタノール中に約 20 秒

間浸し、消毒した。前眼部、水晶体および硝子体は除去し、その後網膜を剥離した。剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、Papain 処理して単離水平細胞を用意した (Tachibana, 1981)。単離水平細胞は、円形 (直径 12 mm) のカバーガラス上で培養した。培養には、魚類用に調整した L-15 (14°C) 培養液を用いた。2 日以上培養した水平細胞を実験に用いた。アメリカナマズ網膜には、2 種類の水平細胞 (錐体水平細胞と桿体水平細胞) が存在する。両者は大きさと形態が異なっており、顕微鏡下で容易に区別できた (高橋, 2000)。また、培養すると、桿体水平細胞は死滅し、錐体水平細胞のみが生き残った。従って、実験には錐体水平細胞の細胞体を用いた。水平細胞の生存するカバーガラスを倒立顕微鏡 (TMD, Nikon) ステージ上に装着した記録槽内に置き、リンガー液を細胞から約 200 μm の距離に置いた Y-tube (直径 150 μm) を用いて灌流し、実験した。

アメリカナマズの正常リンガー液の組成は、125.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 5.0 mM 塩化カリウム (KCl), 2.5 mM 塩化カルシウム (CaCl_2), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2), 16.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。細胞内 pH (水素イオン濃度) を変化させるため、20 mM の塩化アンモニウム (NH_4Cl) をリンガー液に添加し用いた (アンモニウムリンガー液; 図中には NH_4Cl と表示)。リンガー液中の NH_4Cl はアンモニウムイオン (NH_4^+) とクロライドイオン (Cl^-) に解離する。さらに、 NH_4^+ はアンモニア (NH_3) と H^+ に解離する。 NH_4^+ と NH_3 は細胞内に移動し、 NH_3 は H^+ と反応して NH_4^+ を形成する。この結果、細胞内はアルカリ化する。 NH_4Cl を洗い流すと、細胞内形成された NH_4^+ と最初に細胞内に入った NH_4^+ は解離し、 NH_3 と H^+ になる。 NH_4^+ は細胞内で形成された量と最初に細胞内に入った量の和であるから、 H^+ の量はアンモニウムリンガー液灌流前よりも多くなる。この結果、細胞内は酸性化する。また、 NH_3 は細胞外に排出される。このアンモニウムリンガー液の組成は 105.0 mM NaCl, 20.0 mM NH_4Cl , 5.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 16.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。カルシウムイオンを除去する実験では、正常リンガー液から Ca^{2+} を除去して作成し灌流した。その組成は、125.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , 22.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった (無カルシウムリンガー液; 図中には Ca^{2+} -free と表示)。細胞を脱分極させるためにカリウムイオン濃度を上げたリンガー液 (高カリウムリンガー液; 図中には High- K^+ と表示) を灌流する実験では、その組成を 30.0 mM NaCl, 100.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 16.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES に変えた。また、細胞外 (リンガー液) pH を 8.9 にする実験では正常リンガー液の pH 緩衝剤として HEPES ではなく、Tris [hydroxymethyl] aminomethane (TRIZMA) を用いた。何れのリンガー液も、1N-NaOH を用いて pH7.8 に調整し灌流した。また、薬品類は浸透圧を考慮せずに、リンガー液に添加し、Y-tube を用いて灌流・投与した。



第 2 図 L-グルタミン酸投与による酸性化と L-グルタミン酸トランスポーターの関係

A：細胞外液を正常リンガー液からアンモニウムリンガー液に変換し灌流すると、水平細胞はアルカリ化した。正常リンガー液に戻すと直ちに酸性化し、ゆっくりと回復した。回復後、5 mM の D-アスパラギン酸 (L-グルタミン酸トランスポーターにより選択的に取り込まれる物質) (図中には D-Asp と表示) を正常リンガー液に添加し投与したが、水平細胞の細胞内 pH に変化は見られなかった。次に、高カリウムリンガー液 (図中では High-K⁺ と表示) を灌流すると、水平細胞は酸性化した。これを正常リンガー液に戻すと、細胞内 pH も元のレベルに回復した。最後に、正常リンガー液に 100 µM の L-グルタミン酸を添加し投与すると、水平細胞は酸性化した。B：アンモニウムリンガー液の灌流実験終了後、50 µM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、1 mM の Dihydrokainate (グルタミン酸トランスポーターの阻害剤) を含む正常リンガー液中に 50 µM の L-グルタミン酸を添加し投与したが、正常リンガー液中での投与と同様に、水平細胞は酸性化した。正常リンガー液に戻して、再度同濃度の L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞は酸性化した。C：アンモニウムリンガー液の灌流実験終了後、50 µM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、1 mM の L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (グルタミン酸トランスポーターの阻害剤) (図中には L-trans-PDC と表示) を含む正常リンガー液中に 50 µM の L-グルタミン酸を添加し投与したが、正常リンガー液中での投与と同様に、水平細胞は酸性化した。正常リンガー液に戻して、再度同濃度の L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞は酸性化した。

以上の結果は、L-グルタミン酸投与に伴う酸性化にグルタミン酸トランスポーターが関与していないこと、また L-グルタミン酸投与に伴う酸性化が水平細胞の脱分極に基因している可能性を示している。

単離水平細胞の細胞内 pH 測定には、pH 感受性蛍光色素である 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(and 6) carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いた。BCECF-AM (5 μ M) を含むリンガー液中に水平細胞を 5 分間放置し、その後リンガー液で洗い流した。約 40 分後 pH 測定を開始した。pH 測定は水平細胞の中心部分で行った。バンドパスフィルターを用いて 490 nm (Omega Optical, Inc.) と 440 nm (Omega Optical, Inc.) の単色光を 200 msec 間水平細胞に照射し、励起された蛍光から 535 nm (Omega Optical, Inc.) の単色光だけを冷却デジタル CCD カメラ (Photometrics, Inc.) で検出し、解析ソフトウェア (Metafluor; Universal Imaging Co.) を用いて比を求め、細胞内 pH の指標とした。比の増大はアルカリ化、減少は酸性化であった (第 2 図参照)。実験終了後、この比を nigericin 法により細胞内 pH に換算した。データ処理には、Excel 2002 (Microsoft Co.) を用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co. から、BCECF-AM および Nigericin は Molecular Probes, Inc. から、L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (L-trans-PDC) は Tocris Neuramin から、L-15 は Gibco から購入した。

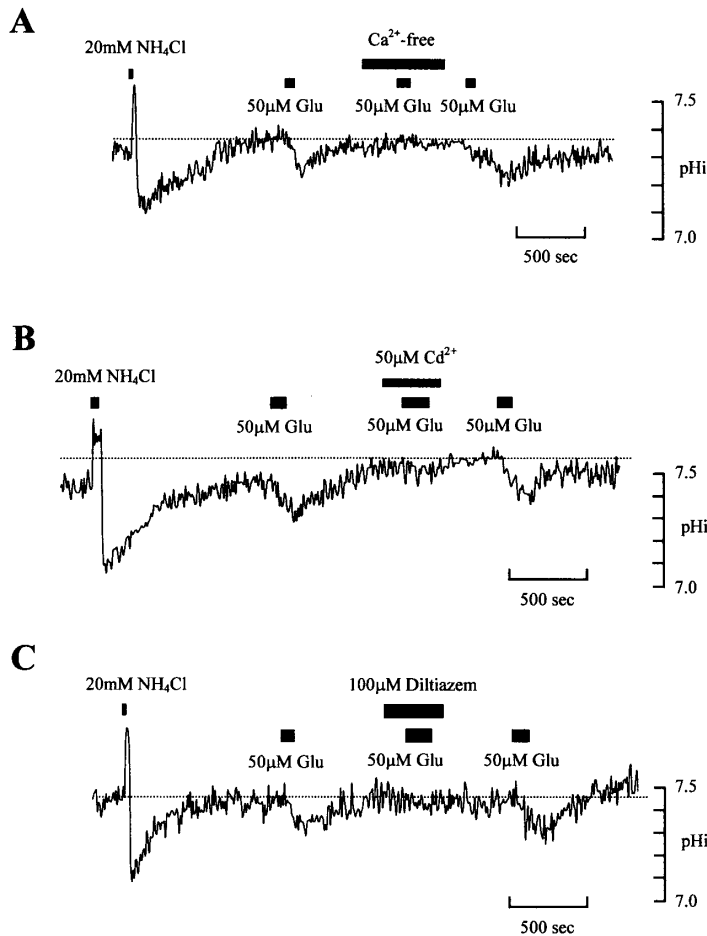
実験結果

アメリカナマズ網膜から単離し、2 日以上培養した水平細胞の細胞内 pH は、正常リンガー液 (pH7.8) 中で 7.40 ± 0.06 (平均 \pm 標準偏差, 細胞数 [n]=18) であった。培養水平細胞をアンモニウムリンガー液に暴露すると、細胞内はアルカリ化した。灌流液を正常リンガー液に戻すと、急速に酸性化し、その後ゆっくりと回復した (第 2 図~第 5 図参照)。これまでの研究により、酸性化からの回復に Na^+/H^+ エクスチェンジャーの活性化が不可欠であることが明らかとなっている (例えば、高橋, 2003)。

実験を実施した水平細胞の約 36% (95 細胞のうち 34 細胞) において、アンモニウムリンガー液を正常リンガー液に戻した後も酸性化からの回復が認められなかった。これらの細胞では、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが正常に機能していないことが予想された。そこで、本研究では pH 測定開始時に必ずアンモニウムリンガー液の灌流実験を行い、酸性化からの回復が認められた細胞 (すなわち、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが正常に機能している細胞) のみを使用した。

L-グルタミン酸による細胞内酸性化とグルタミン酸トランスポーター

視細胞やミュラー細胞には、起電性グルタミン酸トランスポーターが発現している。このトランスポーターは L-グルタミン酸を取り込む際 H^+ を共輸送するため、細胞内が酸性化する



第3図 L-グルタミン酸投与に伴うカルシウムチャンネルの活性化

A: 細胞外液を正常リンガー液からアンモニウムリンガー液 (図中では NH₄Cl と表示) に変換し灌流すると、水平細胞はアルカリ化した。正常リンガー液に戻すと直ちに酸性化し、ゆっくりと回復した。回復後、50 µM の L-グルタミン酸 (図中には Glu と表示) を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、正常リンガー液を無カルシウムリンガー液 (図中には Ca²⁺-free と表示) に変換後、50 µM の L-グルタミン酸を投与したが、細胞内 pH には変化は認められなかった。正常リンガー液に戻して、再度同濃度の L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞は酸性化した。B: アンモニウムリンガー液の灌流実験終了後、50 µM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、50 µM のカドミウムイオン (カルシウムチャンネル阻害剤) (図中には Cd²⁺ と表示) を含む正常リンガー液中に 50 µM の L-グルタミン酸を添加し投与したが、正常リンガー液中での投与と異なり、極めて微弱な酸性化しか見られなかった。正常リンガー液に戻して、再度同濃度の L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞は酸性化した。C: アンモニウムリンガー液の灌流実験終了後、50 µM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、100 µM の Diltiazem (カルシウムチャンネル阻害剤) を含む正常リンガー液中に 50 µM の L-グルタミン酸を添加し投与したが、細胞内 pH に顕著な低下は認められなかった。正常リンガー液に戻して、再度同濃度の L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞は酸性化した。

以上の結果は、L-グルタミン酸投与に伴う酸性化に高閾値型カルシウムチャンネルが関与していることを示唆している。

ることが知られている（例えば, Schwartz & Tachibana, 1990; Szatkowski *et al.*, 1990）。もし水平細胞にグルタミン酸トランスポーターが発現していれば, 当然 L-グルタミン酸により細胞内は酸性化する筈である。そこで, 水平細胞の L-グルタミン酸による酸性化にグルタミン酸トランスポーターが関与しているのか否かを検討した (第 2 図)。グルタミン酸トランスポーターは, L-グルタミン酸と同様に D-アスパラギン酸 (図中には D-Asp と表示) を取り込み, 酸性化することが知られている。正常リンガー液に 5 mM の D-アスパラギン酸を添加し投与したが, 細胞内 pH に顕著な効果は認められなかった (第 2 図 A)。高カリウムリンガー液の灌流ならびに 100 μ M の L-グルタミン酸は, 水平細胞を酸性化した (第 2 図 A)。次に, グルタミン酸トランスポーターの阻害剤である Dihydrokainate (1 mM) と L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (1 mM) (図中には L-trans-PDC と表示) の存在下で L-グルタミン酸を投与した (第 2 図 B と C)。何れの阻害剤も, L-グルタミン酸による酸性化を抑制しなかった (第 2 図 B と C)。

以上の結果は, L-グルタミン酸投与に伴う水平細胞の酸性化に L-グルタミン酸トランスポーターが関与していないことを示唆している。

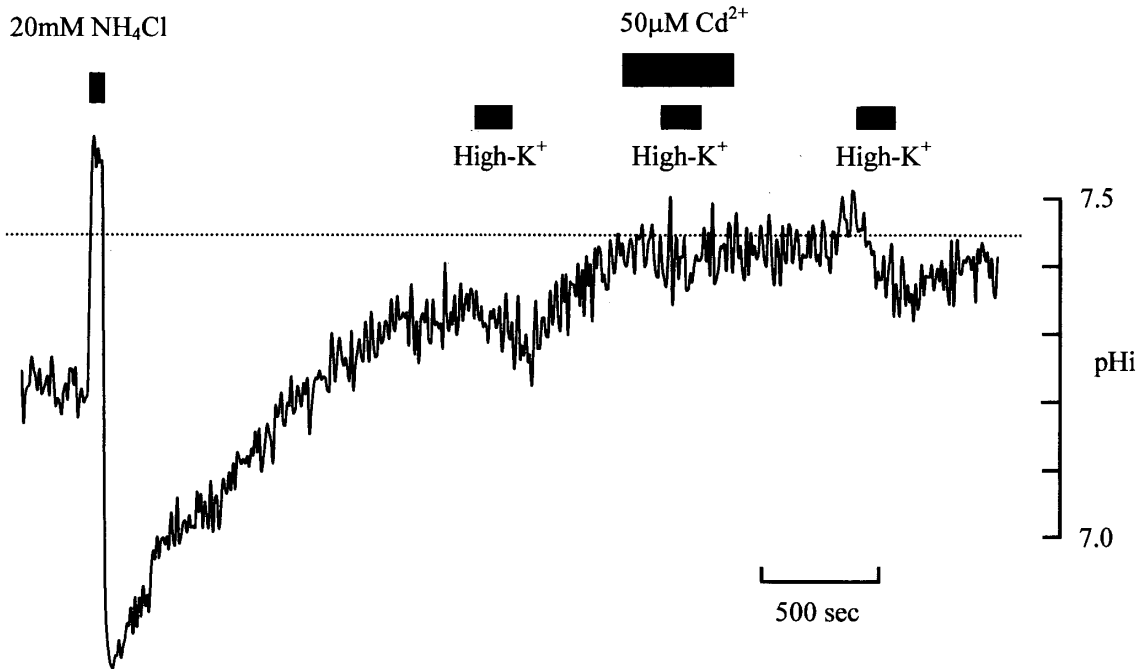
L-グルタミン酸による細胞内酸性化とカルシウムチャンネル

50 μ M の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与すると, 水平細胞は酸性化し, これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した (第 2 図や第 3 図など)。この酸性化に細胞外の Ca^{2+} が関係しているのか否かを調べるため, 無カルシウムリンガー液を灌流した。正常リンガー液を無カルシウムリンガー液に変換し, この無カルシウムリンガー液に 50 μ M の L-グルタミン酸を添加し投与しても, 細胞内 pH に変化は認められなかった (第 3 図 A)。この結果は, L-グルタミン酸投与によって発生する酸性化に細胞外の Ca^{2+} が不可欠であることを示唆している。次に, L-グルタミン酸による酸性化にカルシウムチャンネルが関与しているのか否かを明らかにするため, 正常リンガー液にカルシウムチャンネル阻害剤であるカドミウムイオン (Cd^{2+}) と Diltiazem を添加し, その影響を調べた。正常リンガー液への 50 μ M の Cd^{2+} の添加 (第 3 図 B), および 100 μ M の Diltiazem の添加 (第 3 図 C) は, L-グルタミン酸による酸性化を抑制した。

以上の結果は, L-グルタミン酸による酸性化に高閾値型カルシウムチャンネルの活性化が含まれていることを示している。

水平細胞の脱分極と細胞内酸性化

L-グルタミン酸投与によって水平細胞は, 脱分極する。この脱分極が, 水平細胞内の酸性化に関与しているのか否かを調べるため, 高カリウムリンガー液を灌流した (第 2 図 A と第



第4図 水平細胞の脱分極によって発生する酸性化

細胞外液を正常リンガー液からアンモニウムリンガー液に変換し灌流すると、水平細胞はアルカリ化した。正常リンガー液に戻すと直ちに酸性化し、ゆっくりと回復した。回復後、高カリウムリンガー液を灌流すると、水平細胞は酸性化した。次に、 $50\ \mu\text{M}$ のカドミウムイオン存在下で高カリウムリンガー液を灌流したが、水平細胞に酸性化は見られなかった。再度、カドミウムイオンがない条件下で高カリウムリンガー液を灌流すると、やはり酸性化が観察された。

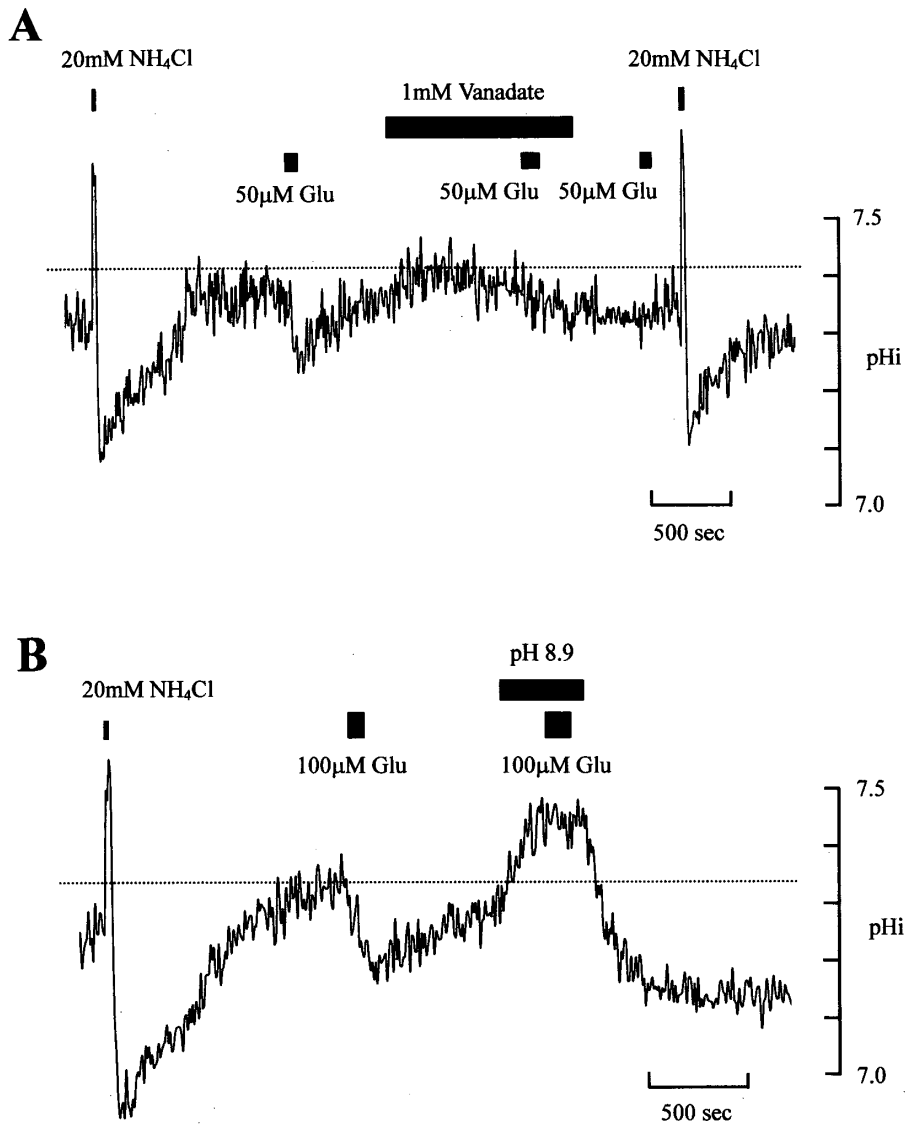
以上の結果は、水平細胞の酸性化は脱分極によって生じること、およびこの酸性化に高閾値型カルシウムチャンネルが関与していることを示している。

4図)。正常リンガー液を高カリウムリンガー液に変換し水平細胞を灌流すると、細胞内は酸性化した。さらに、この酸性化は Cd^{2+} ($50\ \mu\text{M}$) の投与により抑えられた。

以上の結果は、水平細胞の脱分極がカルシウムチャンネルを活性化し、これが細胞内酸性化を惹起したことを示唆している。

L-グルタミン酸による酸性化への $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ の関与

L-グルタミン酸投与によって水平細胞に発生した脱分極は、高閾値型カルシウムチャンネルを活性化し、最終的に細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節するため、水平細胞に $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ (Ca^{2+} 濃度調節機構) が発現していれば、この機構によって水平細胞内の Ca^{2+} が排出される際に H^+ が対向輸送されるため、細胞内が酸性化する筈である。そこで、水平細胞に $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ が発現し、これが水平細胞内の Ca^{2+} 濃度調節に関与しているのか否かを調べるため、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ 阻害剤の投与実験を行った (第5図)。これまでの研究により、細胞外への Vanadate の投与および細胞外 pH の上昇が、細胞膜に



第5図 L-グルタミン酸投与に伴う酸性化の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ATPase 阻害の影響

A: 細胞外液を正常リンガー液からアンモニウムリンガー液に変換し灌流すると、水平細胞はアルカリ化した。正常リンガー液に戻すと直ちに酸性化し、ゆっくりと回復した。回復後、50 μM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、正常リンガー液に 1 mM の Vanadate ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ATPase の阻害剤) を添加し灌流した。約 4 分経過後、水平細胞の pH はゆっくりと低下し始めた。Vanadate 灌流中に L-グルタミン酸を投与したが、L-グルタミン酸投与に起因する酸性化は認められなかった。Vanadate の効果は不可逆的であり、これを洗い流しても細胞内 pH が元のレベルに回復することはなかった。再度、L-グルタミン酸を投与したが、細胞内 pH に変化は認められなかった。B: アンモニウムリンガー液の灌流実験終了後、50 μM の L-グルタミン酸を正常リンガー液に添加し投与した。水平細胞は速やかに酸性化し、これを洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、正常リンガー液の pH を 7.8 から 8.9 へと上昇させた ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ATPase 活性の阻害)。この結果、細胞内 pH は約 0.2 pH unit 上昇した。pH 8.9 のリンガー液を灌流中に 50 μM の L-グルタミン酸を添加し投与したが、細胞内の酸性化は見られなかった。細胞外液の pH を 8.9 から 7.8 へと戻すと、細胞内 pH は元のレベルより低下した。

以上の結果は、水平細胞に $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ATPase が発現し、L-グルタミン酸投与に伴う細胞内酸性化にこの $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ATPase が関与していることを強く示唆している。

発現する $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ の働きを抑えることが報告されている。1 mM の Vanadate を正常リンガー液に添加して投与すると、数分後に細胞内の酸性化を始めた。この酸性化が始まった時点で、50 μM の L-グルタミン酸を投与したが、この投与に起因する pH 変化は認められなかった。Vanadate の効果は不可逆的であり、細胞外から除去しても細胞内 pH が元のレベルに回復することはなかった。再度、L-グルタミン酸を投与したが、細胞内 pH に変化は生じなかった (第 5 図 A)。次に、細胞外 pH を 8.9 にまで上昇させ、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ の活性を抑制した条件下で L-グルタミン酸を投与したが、細胞内 pH に変化は見られなかった (第 5 図 B)。

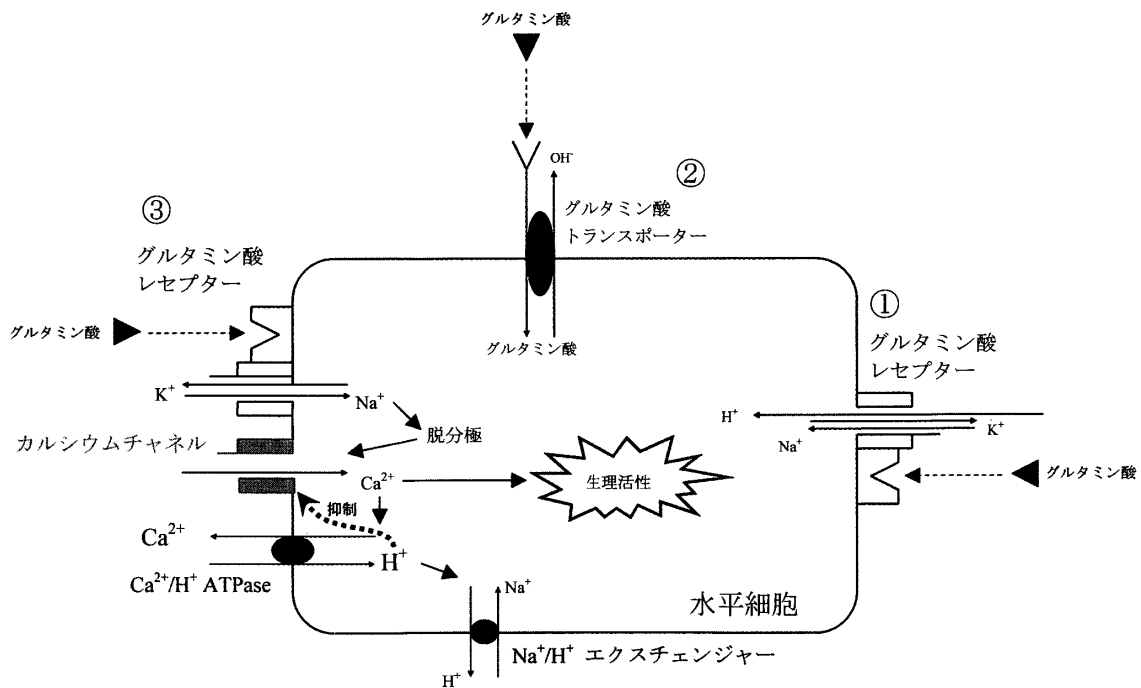
以上の結果は、水平細胞に $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ が発現し、L-グルタミン酸投与に伴う細胞内酸性化にこの $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ の活性化が関与していることを強く示唆している。

考 察

Ca^{2+} の重要性

近年、細胞内の諸種の生理的過程に Ca^{2+} が関与している報告 (例えば、シナプス： Ca^{2+} はカルシウム・カルモデュリン依存性タンパクキナーゼやカルシウム・リン脂質依存性タンパクキナーゼを活性化してグルタミン酸レセプターを調節、 Ca^{2+} は神経伝達物質の放出量を調節、また Ca^{2+} は長期シナプス増強や馴れなどにも関与；視細胞： Ca^{2+} が視細胞内の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate 濃度を調節、など) が相次ぎ、カルシウムチャネルは膜電位の修飾よりむしろ Ca^{2+} の供給経路として地位を確立しつつある。カルシウムチャネルの研究に加え、細胞内の Ca^{2+} 濃度調節に関する研究も増加の一途を辿っており、細胞膜に発現する Ca^{2+} 輸送系のみならず細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリアなど) による Ca^{2+} 調節メカニズムについても多くの知見が集まりつつある。勿論、生理学的研究以外に、脳虚血の際に細胞内 Ca^{2+} 濃度が顕著に増加し、これが細胞死に結びつくというような病理学的研究も行われている (例えば、Choi, 1990)。これまでの多くの研究成果を総合すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度はいくつかのメカニズムを介してかなり正確に制御されていると考えられる。

L-グルタミン酸によって網膜水平細胞の細胞内 pH が低下 (酸性化) することが Takahashi *et al.* (1993) と Dixon *et al.* (1993) によって報告されたが、そのメカニズムについては不明であった。本研究では、このメカニズムの解析を行った。その結果、L-グルタミン酸投与に伴う水平細胞の脱分極がカルシウムチャネルを活性化し、このチャネルを介して細胞内に流入した Ca^{2+} が $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+\text{ATPase}$ によって細胞外に排出される際、 H^+ が細胞内に流入 (対向輸送) するため酸性化する、というプロセスが明らかとなった (第 6 図参照)。本研究は L-



第 6 図 L-グルタミン酸投与に伴う水平細胞の酸性化のメカニズム

L-グルタミン酸は水平細胞に発現するグルタミン酸レセプターに結合し、陽イオンチャンネル（主に、 Na^+ と K^+ などが通過するイオンチャンネル）を開け、この細胞を脱分極する。結果として、カルシウムチャンネルが活性化し、細胞内に大量の Ca^{2+} が流入する。この Ca^{2+} は細胞内セカンドメッセンジャーとして細胞内の諸種の生理機能に関係する。細胞膜に発現する $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase が Ca^{2+} を細胞外に排出（細胞内の Ca^{2+} 濃度低下）する役割を担っている。この際、 H^+ が流入するため、細胞内は酸性化する。これが、本実験結果から推測される L-グルタミン酸投与に伴い酸性化するメカニズムである。この酸性化はカルシウムチャンネルの活性を抑え、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を抑える。勿論、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase の活性化の結果生じた細胞内の酸性化は Na^+/H^+ エクスチェンジャーの働きにより、元の細胞内 pH レベルへと徐々に回復する。

本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、作業仮説として図中の①[グルタミン酸レセプターが陽イオン (Na^+ や K^+ など) と同時に H^+ を細胞内に取り込むため酸性化が生じる]、図中の②[グルタミン酸トランスポーターによる L-グルタミン酸の取り込み時に H^+ を取り込むため酸性化が生じる]と図中の③[グルタミン酸レセプターの活性化が脱分極を招き、カルシウムチャンネルを活性化して細胞内の Ca^{2+} 上昇を誘発する。この結果、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase が活性化して細胞内 Ca^{2+} を排出する際に H^+ を取り込むため酸性化が生じる]を念頭に置き実験を進めた。結局、図中の③を支持する実験結果が得られた。

グルタミン酸による水平細胞内酸性化の解明する過程で、水平細胞内の Ca^{2+} 濃度を調節するメカニズムとして少なくとも 2 つ（第 1 番目： $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase の活性化による細胞外への Ca^{2+} の排出；第 2 番目： $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ATPase の活性化による細胞内への H^+ の取り込み [細胞内酸性化] に基因するカルシウムチャンネルの抑制）あることを明らかにした。

水平細胞の機能とカルシウムチャンネル

暗時に視細胞から放出された L-グルタミン酸は、水平細胞に発現するグルタミン酸レセプ

ターを活性化し、陽イオン（主に、 Na^+ と K^+ ）チャネルを開口して脱分極を生む（Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988）。さらに、このグルタミン酸レセプターを介する膜電位変化は、水平細胞膜に発現する各種の電位依存性イオンチャネル（カルシウムチャネル、遅延性カリウムチャネル、一過性カリウムチャネルや内向き整流性カリウムチャネルなど）の活性を修飾し、新たな膜電位変化を惹起する（Tachibana, 1983; Shingai & Christensen, 1986）。

水平細胞に発現するカルシウムチャネルがどのような役割を果たしているのかについては、未だ十分な解析がなされていないが、これまでに報告されてきた多くの研究成果を通覧すると、その役割として①膜電位の修飾、および②細胞内への Ca^{2+} 供給経路が考えられる。これらの考えを支持する報告は、網膜研究においても得られている。例えば、①に関しては、電位視細胞の放出した L-グルタミン酸によって水平細胞が脱分極すると、カルシウムチャネルが活性化し、水平細胞はさらに脱分極することである。この結果、水平細胞から放出される神経伝達物質（ γ -アミノ酪酸；GABA）の量は増加し、水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプスの強度が増すことが予想される（Schwartz, 1982, 1987）。また、②に関しては、カルシウムチャネルを経由して水平細胞内に流入した Ca^{2+} がグルタミン酸レセプターやギャップ結合を調節していることである（例えば、Murakami *et al.*, 1995）。今後、水平細胞に発現するカルシウムチャネルの役割を解明するため、さらに詳細な研究を進めて行きたい。

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**: 130–161.
- 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.
- Choi, D. (1990), Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, **2**: 105–147.
- Daw, N. W. (1973), Neurophysiology of color vision, *Physiol. Rev.*, **53**: 571–611.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1993), Glutamate suppresses HVA calcium currents in catfish horizontal cells by raising intracellular proton concentration, *Neuron*, **11**: 267–277.
- Gouras, P. (1972), S-potential. Physiology of photo-receptor organ, In *Handbook of sensory physiology Vol. VII/2*, Springer-Verlag, Berlin, pp 513–529.
- 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. 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.
- 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., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Prog. Ret. Eye Res.*, **14**: 197–221.
- 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 Rushton, W. A. H. (1967), The generation and spread of S-potentials in fish (*Cyprinidae*), *J. Physiol. (Lond.)*, **192**: 437–461.
- 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.
- 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.
- 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 g-aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Schwartz, E. and Tachibana, M. (1990), Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **426**: 43–80.
- 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.
- 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.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1986), Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*) retina, *J. Neurophysiol.*, **56**: 32–49.
- 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., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Szatkowski, M., Barbour, B. and Attwell, D. (1990), Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake, *Nature*, **348**: 443–446.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. (1983), Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **345**: 329–351.
- 高橋 恭一 (2000), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の形態変化, *経済科学 研究*, **4**(1): 77–99.
- 高橋 恭一 (2003), 魚類網膜水平細胞の細胞内水素イオン濃度調節と修飾に関する研究, *人間環境学研究*, **2**(1): 1–14.

- 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., Dixon, D. B. and Copenhagen, D. R. (1993), Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina, *J. Gen. Physiol.*, **101**: 695–714.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- 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.
- 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.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.