

トラスンシヨウオ網膜ミュラー細胞の グルタミン輸送に関する研究

高橋 恭一

(受付 2004年5月6日)

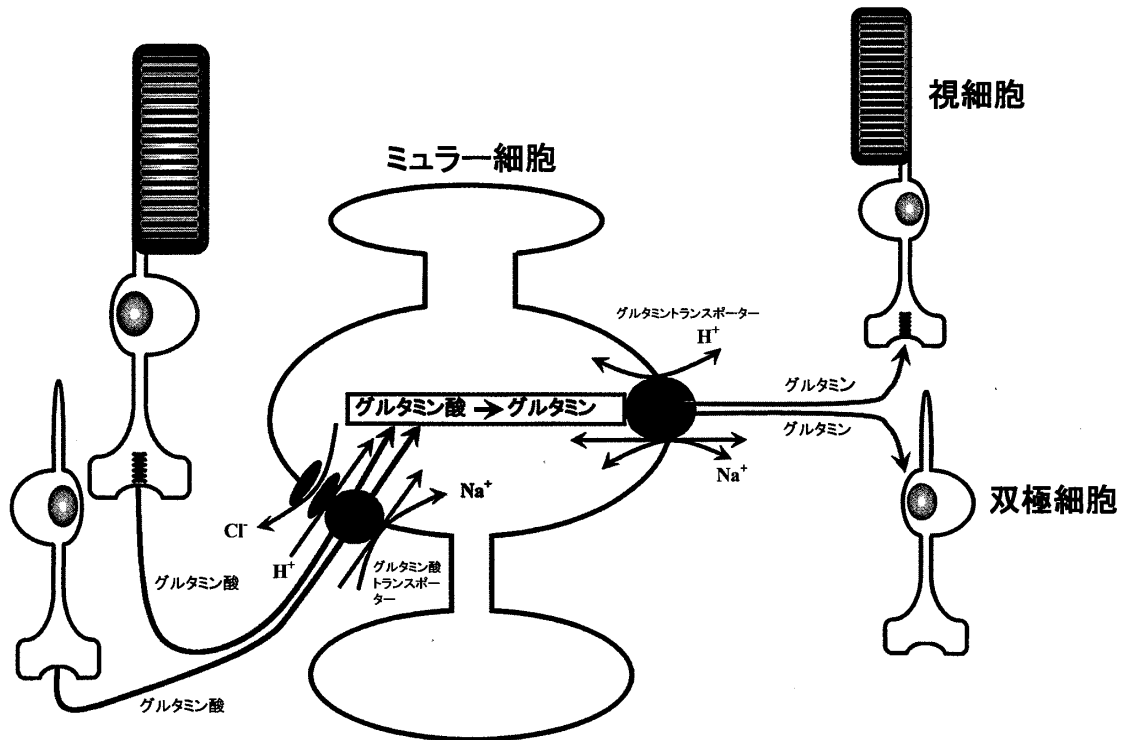
序 論

哺乳動物の脳では、グルタミン酸の再利用過程にグリア細胞が重要な役割を演じていることはよく知られている (Van den Berg & Garfinkel, 1971; Hertz, 1979; Westergaard *et al.*, 1995; Magistretti *et al.*, 1999)。神経細胞の終末部から放出されたグルタミン酸をグリア細胞は細胞内に取り込み、グルタミン合成酵素を利用してグルタミンに変換後、細胞外に輸送する。細胞外のグルタミンはシナプス前神経細胞内に取り込まれ、グルタミン酸合成酵素を利用してグルタミン酸に変換され神経伝達物質として再利用される。このようなグルタミン酸の再利用過程は、グルタミン酸-グルタミンサイクルと呼ばれている。このサイクルによる再利用系以外に、神経細胞の終末部に発現するグルタミン酸トランスポーターによってグルタミン酸が神経細胞内に取り込まれ再放出される経路なども知られている。

グルタミン酸-グルタミンサイクルが正常に機能するには、グルタミン酸を取り込むための輸送経路 (グルタミン酸トランスポーター) がグリア細胞に、またグルタミンを細胞内外に輸送するための経路 (グルタミントランスポーター) がグリア細胞と神経細胞の両細胞に必要である。近年、グルタミン酸トランスポーターに関する生理学的・分子生物学的研究は極めて精力的に行われ、多くの知見が蓄積している (例えば, Robinson & Dowd, 1997; Palacine *et al.*, 1998)。しかし、グルタミン輸送に関する研究は未だ乏しく、十分に解析が行われていない。とはいえ、グルタミン輸送に関し、細胞膜に発現する4つの輸送タンパク質が関与していることが明らかとなっている。これらのメカニズムは、 Na^+ -非依存性の System L ならびに Na^+ -依存性の System ASC, System A および System N に分類されている (Bröer & Brookes, 2001)。これらの輸送体が複合的に機能し、グルタミンを輸送していると考えられている。最近, Chaudhry *et al.* (1999) は System N の性質を示すタンパク質を同定し, SN1 と名付けた。彼らはこの SN1 タンパク質の抗体を作成し, これを用いた免疫染色実験を行い, SN1 が脳, 肝臓ならびに腎臓の髄質に顕著に発現していることを報告した。その後, 脳内の細胞レベルでの発現も検討され, SN1 タンパク質は神経細胞よりもアストロサイト (グリア細胞の一種) に集中的に発現していることが判明した (Boulland *et al.*,

2002)。時を同じくして、Reimer *et al.* (2000) は System A の性質を示す SA1 タンパク質を同定・解析し、このタンパク質が主に神経細胞に発現していることを見出した。これらの研究結果を総合すると、グルタミン酸-グルタミンサイクルにおいて、細胞膜を挟んだアミノ酸輸送には以下のような経路の関与が推察される。神経細胞の終末部から放出されたグルタミン酸は、アストロサイト（グリア細胞の1種）に発現するグルタミン酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、細胞内でグルタミンに変換され System N (SN1) を介して細胞外に輸送される。このグルタミンは神経細胞に発現する System A (SA1) を介して細胞内に取り込まれ、グルタミン酸に変換後、再利用される。

脊椎動物網膜においても、視細胞および双極細胞の一部がグルタミン酸を神経伝達物質として放出している (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983;



第1図 ミュラー細胞を介するグルタミン酸の再利用を示す模式図

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）とミュラー細胞（グリア細胞の1種）からなる。この中で、視細胞と双極細胞は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出していることが知られている。これらの神経細胞の終末部から放出されたグルタミン酸は、放出した細胞自身のみならず近隣のミュラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターにより取り込まれシナプス間隙から除去される。ミュラー細胞に取り込まれたグルタミン酸は、グルタミン合成酵素によりグルタミンに変換されグルタミントランスポーターを介して細胞外に輸送される。このグルタミンはグルタミントランスポーターを介して視細胞や双極細胞の終末部に取り込まれ、グルタミン酸合成酵素によってグルタミン酸に変換され神経伝達物質として再放出される。この経路を、グルタミン酸-グルタミンサイクルと呼ぶ。網膜でも、このサイクルが機能していることを示す断片的証拠が得られている。

Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Takahashi & Murakami, 1991)。網膜内のグリア細胞（ミユラー細胞）にグルタミン酸トランスポーターが発現しグルタミン酸を細胞内に取り込むこと（Brew & Attwell, 1987; Newman, 1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Bringmann *et al.*, 2000), およびミユラー細胞にグルタミン合成酵素が存在すること（Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979）が既に解明されており、これらを勘案すると、グルタミン酸-グルタミンサイクルが機能している可能性は高い。しかし、網膜においても、グルタミン輸送に関する研究は殆ど行われていない。

Boulland *et al.* (2002) は、SN1 タンパク質の発現を脳のみならず網膜でも検討し、ミユラー細胞にその発現が認められることを明らかにした。著者らも、Chaudhry グループから SN1 タンパク質のポリクローン抗体を譲り受け、トラフサンショウウオ網膜ミユラー細胞を用いてその発現を検討した結果、Boulland *et al.* (2002) が報告した温血動物（ラット）と同様に、冷血動物（トラフサンショウウオ）でも SN1 タンパク質が発現していることを見出した（Takahashi *et al.*, 2003）。本論文では、脊椎動物網膜においてグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能していることを明らかにする目的で、ミユラー細胞において System N (SN1 タンパク質) が機能しているのか否かについて生理学的手法を用いて検討した。

実験材料と方法

実験には、体長約 25 cm~35 cm の幼生期のトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜からミユラー細胞を単離した。以下に単離法を概説する。低温麻酔したトラフサンショウウオを断頭し、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した後、両眼球を摘出した。前眼部、水晶体および硝子体を除去した後、網膜を剥離した。剥離網膜を Papain 処理した後、剃刀を用いて約 2 mm 角の細片に切断した。この網膜細片を 100 μ l のピペットマンに装着したイエローチップ内を出し入れすることにより、単離細胞を得た。単離したミユラー細胞を含む懸濁液を Concanavalin A を塗布した円型（直径 12 mm）のカバーグラス上に置き、細胞がカバーグラスに付着したのを確認後、このカバーグラスを倒立顕微鏡（TMD, Nikon）に装着した記録槽内に移動し、実験を開始した。細胞から 200 μ m~300 μ m の距離に置いた Y-tube（直径 150 μ m）を用いて、リンガー液を常時灌流した。

(1) 細胞内 pH 測定

細胞内 pH 測定に際し、トラフサンショウウオの正常リンガー液として 97.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 2.0 mM 塩化カリウム (KCl), 2.0 mM 塩化カルシウム (CaCl₂), 2.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 1.0 mM ビルビン酸ナトリウム, 0.3 mM アスコルビン酸, 0.5 mM グルタチオン, 15.0 mM ブドウ糖, 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) を用いた。リンガー液の pH は, 1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて 7.6 に調整し, 灌流した。薬品類は浸透圧を考慮せずに, リンガー液に添加し Y-tube を用いて投与した。

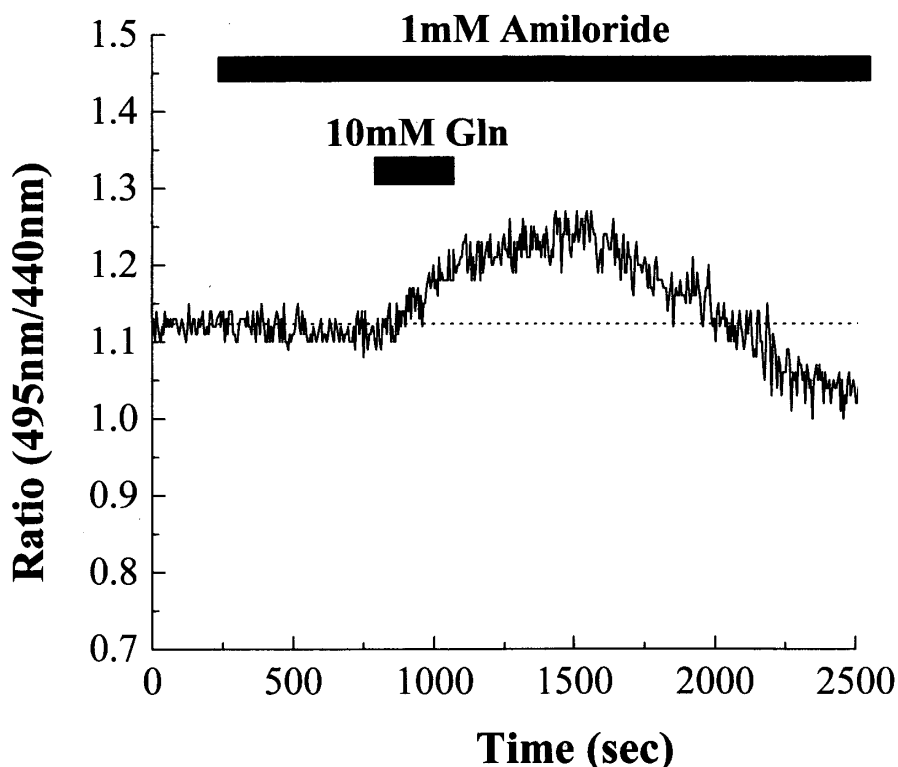
単離したミユラー細胞の細胞内 pH 測定には, pH 感受性蛍光色素である 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and 6)Carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いた。BCECF-AM (5 μM) を含むリンガー液中に水平細胞を 5 分間放置し, その後リンガー液で洗い流した。約 40 分後 pH 測定を開始した。一部の実験を除き, 細胞内 pH 測定はミユラー細胞の細胞体部の中心で行った。バンドパスフィルターを用いて 490 nm (Omega Optical, Inc.) と 440 nm (Omega 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 [Ratio (495 nm/440 nm)] を求め, 細胞内 pH の指標とした。Ratio (495 nm/440 nm) の増大はアルカリ化, 減少は酸性化であった。いくつかの細胞では, 実験終了後, Ratio (495 nm/440 nm) を Nigericin 法により細胞内 pH に換算した。データ処理には, OriginPro Ver7.0 (OriginLab Co.) を用いた。

(2) 膜電流測定

膜電流測定に際し, トラフサンショウウオの正常リンガー液として 100.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 2.0 mM MgCl₂, 20.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES を用いた。多くの実験では, ミユラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターの活性を抑制するため, NaCl は総て塩化リチウム (LiCl) に置換した (LiCl リンガー液)。さらに, 外向き整流性カリウムチャネルの活性を抑えるために Tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl; 30 mM) を, そして内向き整流性カリウムチャネルの活性を抑えるために塩化バリウム (BaCl₂; 10 mM) 加えた。LiCl リンガー液の組成は, 70.0 mM LiCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 10.0 mM BaCl₂, 30.0 mM TEA-Cl, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。正常リンガー液は 1N-NaOH を用いて pH7.6 に調整し灌流した。LiCl リンガー液を灌流する際, System N (グルタミントランスポーター) を活性化するため 1N-水酸化カリウム (KOH) を用いて pH8.0 に調整し灌流した。薬品類は浸透圧を考慮せず, リンガー液に添加し Y-tube を用いて投与した。

パッチ電極には、外向き整流性カリウムチャンネルと内向き整流性カリウムチャンネルを抑えるため、TEA-Cl と塩化セシウム (CsCl) を中心としたパッチ電極内液を充填した。パッチ電極内液の組成は、80.0 mM CsCl, 30.0 mM TEA-Cl, 1.0 mM CaCl₂, 10.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 10.0 mM HEPES であった。パッチ電極内の Na⁺濃度を変化させる実験では、Cs⁺を Na⁺に置換した。パッチ電極内液の pH は、1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH6.2, 7.2, あるいは8.2に調整した。

Whole-cell voltage-clamp 法を用い、ミュラー細胞の膜電流を記録した (Hamil *et al.*, 1981)。細胞体へのギガオームシール達成後、パッチ電極内圧を下げて電極内部の細胞膜を破碎し、膜電流を導出した。パッチ電極 (Borosilicate 性ガラス管, Garner Glass Co.) は、Brown-Fleming 型微小電極製作器 (P97, Sutter Instrument Co.) を用いて作製した。電極抵



第2図 グルタミンによるミュラー細胞内 pH の上昇

Amiloride (Na⁺/H⁺エキスチェンジャー阻害剤) (1 mM) を正常リンガー液に添加し Na⁺/H⁺エキスチェンジャーを阻害した条件下で、ミュラー細胞へのグルタミンの作用を調べた。Amiloride を投与すると、細胞内 pH の低下が認められた。この結果は、ミュラー細胞の静止時の細胞内 pH の調整に Na⁺/H⁺エキスチェンジャーが関与していることを示唆している。Amiloride 存在下で、グルタミン (図中には Gln と表記) (10 mM) を投与すると、ミュラー細胞内 pH は上昇 (アルカリ化) した。洗い流すと、元の pH レベルへと回復した。多くの細胞では、回復直後一時的に酸性化する傾向にあった。

この実験結果は、ミュラー細胞に System N (SN1 タンパク質) が発現していることを強く示唆している。

抗は $5\text{M}\Omega\sim 13\text{M}\Omega$ であった。ミュラー細胞の膜電流変化は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) を介してオシロスコープでモニターした。同時に、この電流変化を増幅器内蔵のフィルター (2 KHz; 4 次ベッセルフィルター) と 12 ビットの A/D コンバーター (Indec Systems) を経由しハードディスクに記録した。刺激波形の作成および電流応答の視覚化には、Pulse (Heka Elektronik) を用いた。オフラインでのデータ解析には、IgorPro Ver4.09J (Wavemetrics Inc.) あるいは OriginPro Ver7.0J (OriginLab 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., DL-threo- β -benzyloxyaspartate (TBOA) は Tocris Cookson, Inc., BCECF-AM と Nigericin は Molecular Probes, Inc. から購入した。

実験結果

グルタミン取り込みに伴うミュラー細胞内水素イオン濃度の上昇

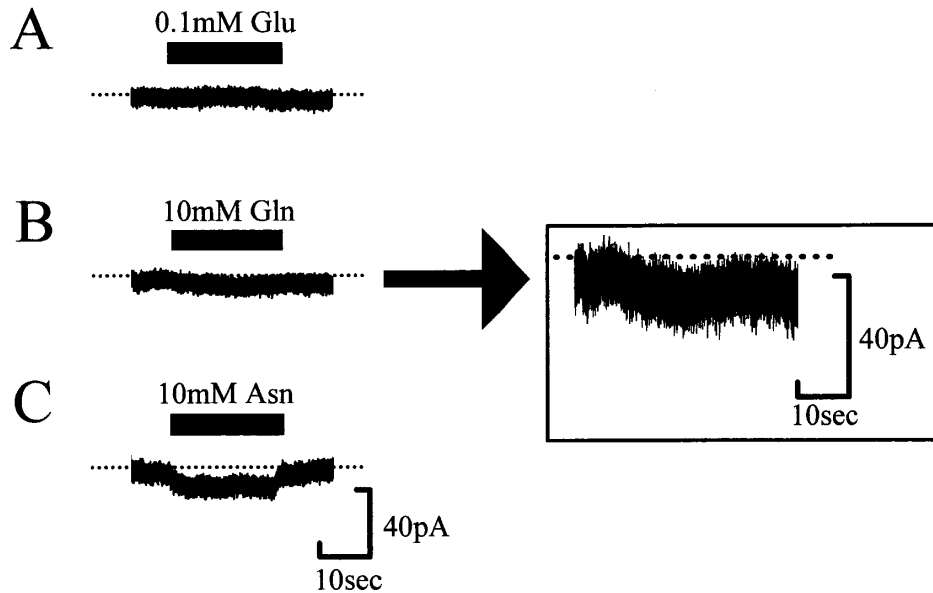
pH 緩衝剤として HEPES を用いたリンガー液中で、トラフサンショウウオ網膜から単離したミュラー細胞の静止時の細胞内 pH は 7.07 ± 0.09 (平均 \pm 標準偏差, 細胞数 [n]=7) であった (高橋, 2003)。これまでの研究から、HEPES を使ったリンガー液中で、ミュラー細胞の細胞内 pH 調節にはナトリウムイオン (Na^+)/ H^+ エクスチェンジャーが中心的役割を果たしていることが明らかとなっている (高橋, 2003)。

System N (SN1 タンパク質) によるグルタミンの取り込みは、細胞外の Na^+ と H^+ に強い依存性を示すことが報告されている (Kilberg *et al.*, 1980; Chaudhry *et al.*, 1999)。また、グルタミンの取り込みに伴い細胞内がアルカリ化することも知られている (Kilberg *et al.*, 1980; Chaudhry *et al.*, 1999)。本実験では、 Na^+ / H^+ エクスチェンジャーを阻害した条件下で、グルタミンのミュラー細胞内 pH への影響を調べた。Amiloride (Na^+ / H^+ エクスチェンジャー阻害剤) (1 mM) を正常リンガー液に添加し灌流すると、細胞内 pH の微かな低下が認められた。Amiloride 存在下で、グルタミン (10 mM) を投与すると、ミュラー細胞はアルカリ化した。また、洗い流すと、元の pH レベルへと回復した。この回復過程で、細胞内が元の pH よりも一時的に酸性化する細胞が多数存在した。

以上の結果は、ミュラー細胞に System N (SN1 タンパク質) が発現していること示唆している。

ミュラー細胞に発生するグルタミン電流とアスパラギン電流

ミュラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターは、グルタミン酸以外の多くのア



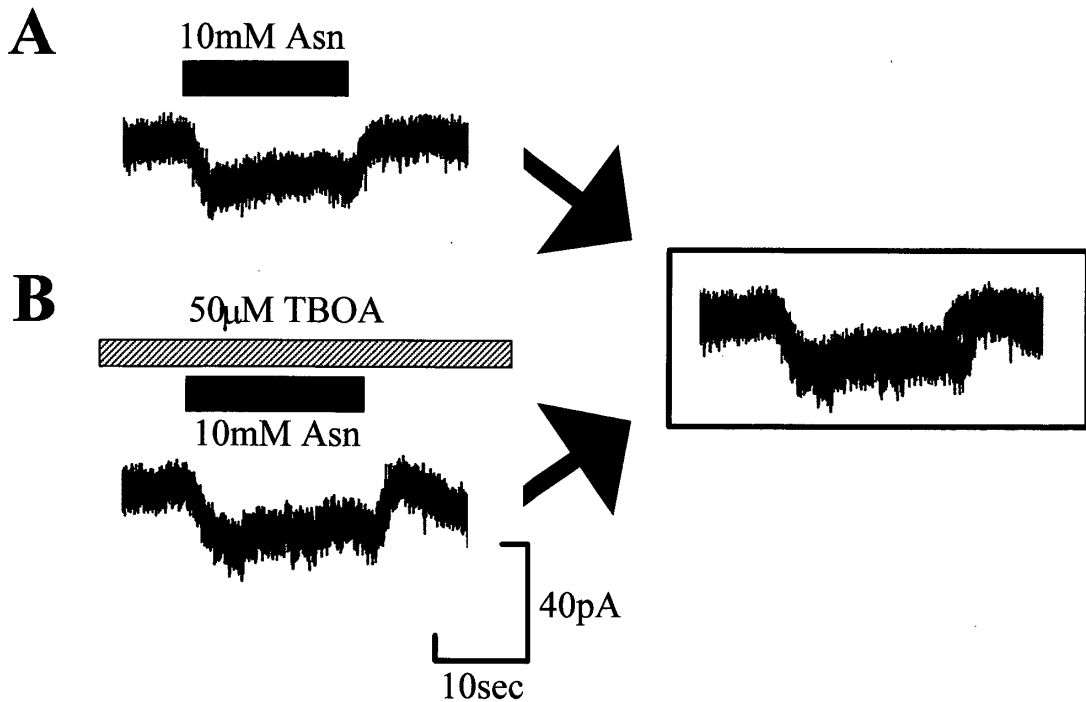
第3図 ミュラー細胞に発生するアミノ酸電流

正常リンガー液中の Na^+ を総て Li^+ に置換 (LiCl リンガー液) しグルタミン酸トランスポーターを阻害した条件下で、ミュラー細胞へのアミノ酸の作用を調べた。System N の活性化を促進する目的で、 LiCl リンガー液の pH を 8.0 に調整し灌流した。この条件下で、ミュラー細胞の膜電位を -70 mV に固定しグルタミン酸 (図中には Glu と表記) (0.1 mM) を投与した。ミュラー細胞に電流発生は認められなかった (A)。この結果は、 LiCl リンガー液中でグルタミン酸トランスポーター活性が抑えられていることを示している。B では、グルタミン (図中には Gln と表記) (10 mM) を投与した。Gln 投与に伴い、僅かな内向き電流が発生した (四角で囲んだ挿入図を参照)。さらに、アスパラギン (図中には Asn と表記) (10 mM) を投与すると、顕著な内向き電流が発生した (C)。

この実験結果は、ミュラー細胞に発生するグルタミン電流とアスパラギン電流が System N (SN1 タンパク質) による取り込みを反映していることを示唆している。

ミノ酸を輸送する (高橋, 2002)。勿論, このグルタミン酸トランスポーターは, System N によって輸送されることが報告されているグルタミン, アスパラギンそしてヒスチジンも輸送する。従って, System N による輸送を解析するには, グルタミン酸トランスポーターによる取り込みを抑える必要がある。本実験では, グルタミン酸トランスポーターの活性化を抑えるため, リンガー液の Na^+ を総てリチウムイオン (Li^+) に置換し灌流した (LiCl リンガー液)。既述したように, System N も細胞外の Na^+ に依存性を示すが, 幸いなことに Na^+ を Li^+ に置換してもその活性が消失することはない (Kilberg *et al.*, 1980; Chaudhry *et al.*, 1999) (第3図)。

System N の活性化を促進するため, LiCl リンガー液の pH を 8.0 に上昇させて, このリンガー液に各種アミノ酸を添加・投与した。第3図 A では, ミュラー細胞の膜電位を -70 mV に固定しグルタミン酸 (0.1 mM) を投与したが, ミュラー細胞に電流発生は認められなかった。



第4図 ミュラー細胞に発生するアスパラギン電流の起源

アスパラギン電流がグルタミン酸トランスポーターを介するこのアミノ酸の取り込みを反映した結果でないことを確認するため、グルタミン酸トランスポーターを特異的に阻害する *DL-threo-β-benzyloxyaspartate* (図中には TBOA と表記) を LiCl リンガー液に添加し、ミュラー細胞に対するアスパラギンの作用を調べた。A は LiCl リンガー液にアスパラギン (図中には Asn と表記) (10 mM) を添加し投与したときの電流応答を、また B は TBOA (50 mM) 存在下でアスパラギン (10 mM) を投与したときの電流応答を示している。両電流応答を比較しても、その振幅と時間経過に有意な変化は認められなかった (四角で囲んだ挿入図を参照)。

この実験結果は、ミュラー細胞に発生するアスパラギン電流がグルタミン酸トランスポーターによる取り込みでなく、System N (SN1 タンパク質) による取り込みを反映していることを示唆している。

これは、グルタミン酸トランスポーターが機能していないことを示している。同じ条件下で、グルタミン (10 mM) を投与すると、僅かな内向き電流が発生した (四角内の挿入図を参照) (第3図 B)。アスパラギン (10 mM) の投与では、顕著な内向き電流が発生した (第3図 C)。

グルタミンならびにアスパラギンによって発生した内向き電流がグルタミン酸トランスポーターを介するこれらアミノ酸の取り込みを反映した結果ではないことを確認するため、グルタミン酸トランスポーターを特異的に阻害する *DL-threo-β-benzyloxyaspartate* (TBOA) を LiCl リンガー液に添加し、ミュラー細胞に対するアスパラギンの作用を調べた (第4図)。第4図 A は、LiCl リンガー液にアスパラギンを添加し投与したときの電流応答を示した。B では、TBOA (50 µM) 存在下でアスパラギン投与実験を実施した。A と B を比較すれば明らかなように、TBOA はアスパラギン電流に顕著な影響を及ぼさなかった (四角内の挿入図を

参照)。

以上の実験から、ミユラー細胞に発生するグルタミン電流とアスパラギン電流はグルタミン酸トランスポーターによるこれらアミノ酸の取り込みを反映した結果ではなく、System N (SN1 タンパク質) による取り込みを反映していることを示唆している。

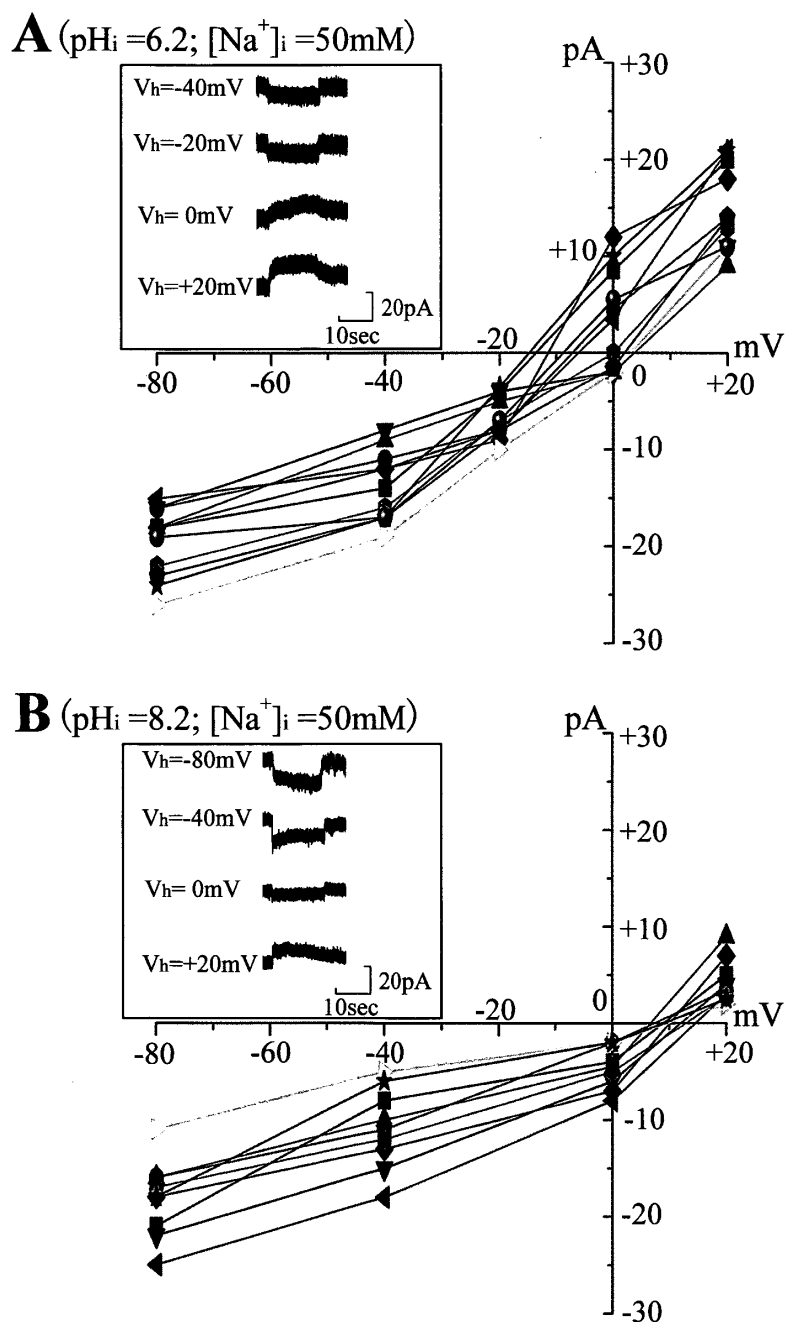
ミユラー細胞に発生するアスパラギン電流の水素イオン依存性

アミノ酸の取り込み電流の発生機序を解明するには、細胞外の各種イオン濃度を変え、それぞれのイオンへの依存性を調べる必要がある。本研究では、ミユラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターを抑え、且つ System N を活性化するため、①リンガー液の Na^+ を Li^+ に置換し、②このリンガー液の pH を 8.0 にまで上昇させて使用しているため、細胞外のイオン濃度を大きく変えることは難しい。そこで、アスパラギン電流の発生機序を調べるため、パッチ電極内のイオン濃度を変化させた (第 5 図)。

第 5 図 A では、パッチ電極内の Na^+ 濃度を 50 mM, pH を 6.2 に固定し、ミユラー細胞の膜電位を -80 mV から $+20 \text{ mV}$ まで変化させ、それぞれの膜電位で発生するアスパラギン電流を記録 (挿入図参照) した。11 のミユラー細胞で行った実験結果から電流-電圧曲線を作成し、これらを重ねて表示した。この実験で得られたアスパラギン電流の逆転電位は、 -4.5 ± 7.02 (平均 \pm 標準偏差, 細胞数 [n]=11) mV であった。別の 9 のミユラー細胞を使って、パッチ電極内の Na^+ 濃度を 50 mM, pH を 8.2 に固定し、同様の実験を行い、電流-電圧曲線を作成した。pH 8.2 のときのアスパラギン電流の逆転電位は、 $+11 \pm 2.60$ (n=9) mV であった。第 5 図 A と B の電流-電圧関係を比較すると、アスパラギン電流の逆転電位は pH 8.2 の方が 6.2 よりも脱分極側にあり、これは H^+ に関しネルンストの式から予想される結果であった。

さらに、パッチ電極内の pH を 6.2 に固定し、 Na^+ 濃度を変化させる実験を行った (図は示さず)。 Na^+ 濃度が 50 mM のとき -4.5 ± 7.02 (n=11) mV であるのに対し、 Na^+ 濃度が 5 mM のとき $+9.4 \pm 11.01$ (n=10) mV であった。このアスパラギン電流の逆転電位の移動は、 Na^+ に関しネルンストの式から予想される結果であった。

以上の結果は、アスパラギン電流の発生に Na^+ と H^+ が関与しており、SN1 タンパク質を強制発現した細胞を用いた電気生理学的報告 (Chaudhry *et al.*, 1999, 2001; Fei *et al.*, 2000) とも概ね一致していた。従って、本実験で得られたグルタミン電流とアスパラギン電流は System N (SN1 タンパク質) を介するこれらアミノ酸の取り込みを反映していると考えられる。



第5図 ミュラー細胞に発生するアスパラギン電流の細胞内水素イオンへの依存

System N (SN1 タンパク質) によるアミノ酸の取り込みに伴う電流発生のメカニズムを調べる目的で、パッチ電極内のイオン濃度を変化させた。A では、パッチ電極内の Na^+ 濃度を 50 mM に、そして pH を 6.2 に固定し、ミュラー細胞の膜電位を -80 mV から $+20\text{ mV}$ まで変化させたときに発生するアスパラギン電流を記録（四角で囲んだ挿入図を参照）し、この結果から電流-電圧曲線を作成した。11 のミュラー細胞で行った実験結果を重ねて表示した。この実験で得られたアスパラギン電流の逆転電位は、 $-15\text{ mV} \sim +5\text{ mV}$ であった。B では、別の 9 のミュラー細胞を使って、パッチ電極内の Na^+ 濃度を 50 mM に、pH を 8.2 に固定したときの電流-電圧曲線を作成した。この実験で得られたアスパラギン電流の逆転電位は、 $+8\text{ mV} \sim +16\text{ mV}$ であった。A と B の電流-電圧曲線を比較すると、アスパラギン電流の逆転電位は pH 8.2 の方が 6.2 よりも脱分極側にあった。

この実験結果は、アスパラギン電流の発生に水素イオン (H^+) が関与していることを示しており、これまでに SN1 タンパク質を強制発現させた細胞で得られた報告と一致していた。

考 察

System N 発現の可能性

System N はグルタミン、アスパラギンそしてヒスチジンを取り込むこと、この取り込みは細胞外の Na^+ と H^+ に依存すること、アミノ酸の取り込みに伴い細胞内がアルカリ化することなどがこれまでの研究から明らかとなっている (Kilberg *et al.*, 1980)。最近, Chaudhry *et al.* (1999) は, この System N と同様の性質を示すタンパク質を同定し, SN1 と名付けた。この SN1 タンパク質の DNA 配列が決定され, このタンパク質のアミノ酸配列が明らかにされて以降, SN1 タンパク質を *Xenopus* 卵や培養細胞に発現させて生理学的性質を調べることが可能となった (Bröer *et al.*, 2002)。

最近, SN1 タンパク質を強制発現させた細胞において, 上記アミノ酸の取り込みに電流発生が伴うことが明らかとなった (Chaudhry *et al.*, 2001; Fei *et al.*, 2000)。この SN1 タンパク質 (System N) による取り込み電流の発生に関し, 2つのメカニズムが提唱されている (Chaudhry *et al.*, 2001; Fei *et al.*, 2000)。Chaudhry *et al.* (2001) は, SN1 タンパク質によるアミノ酸輸送に電流発生を伴わないことを報告している (SN1 タンパク質によるアミノ酸輸送の電気的中性説)。ところが, この SN1 タンパク質に水素イオン (H^+) コンダクタンスが連動しているため, アミノ酸輸送に伴い H^+ が移動し, この結果電流が発生することを見出した (Chaudhry *et al.*, 2001)。Fei *et al.* (2000) は SN1 タンパク質によるアミノ酸輸送が起電性であり, アミノ酸の取り込みに際し Na^+ と H^+ が 2対1 の割合で交換輸送されるために電流が発生することを報告した (SN1 タンパク質によるアミノ酸輸送の起電性説)。両報告共に, SN1 によるアミノ酸の取り込みに伴い電流を発生する点で一致しているが, 電流の発生機序には大きな差異が見られる。

第2図の実験では, 静止膜電位 (-80 mV) 付近でグルタミンを投与した場合, ミユラー細胞はアルカリ化した。静止時の細胞内 pH が約7.1, 細胞外 pH が約7.6であることを考慮すると, 静止膜電位付近における H^+ の電気化学的勾配に基づく輸送は細胞外から細胞内であり, これはミユラー細胞を酸性化する。従って, グルタミンの取り込みがミユラー細胞内をアルカリ化するには, 電気化学的勾配に従わない H^+ の移動が必要となる。Fei *et al.* (2000) が報告しているように, Na^+ と H^+ が交換輸送される際, H^+ が Na^+ の電気化学的エネルギーに依存して受動的に運ばれるのであれば, H^+ は細胞内から細胞外へと移動し, ミユラー細胞がアルカリ化すると考えられる。一方, 第5図の実験から, アスパラギン電流の逆転電位は H^+ に依存して変化すること, すなわち H^+ に関しネルンストの式に従う移動があることも明らかである (電気化学的勾配に従う H^+ の移動)。これは, Chaudhry *et al.* (2001) により報

告されている H^+ コンダクタンスの機能を反映しているのかもしれない。以上を勘案すると、ミュラー細胞に発現する System N が活性化すると、(1) Na^+ と交換輸送される際に受動的に運ばれる H^+ (Fei *et al.*, 2000) と (2) H^+ コンダクタンスを介して電気化学的勾配に従って運ばれる H^+ (Chaudhry *et al.*, 2001) の移動が同時に惹起される可能性がある。両メカニズムで運ばれる H^+ の方向は全く逆であるが、グルタミン輸送において (1) Na^+ と交換輸送される際に受動的に運ばれる H^+ が (2) H^+ コンダクタンスを介して電気化学的勾配に従って運ばれる H^+ を凌駕するためミュラー細胞はアルカリ化すると考えられる。詳細に関しては、さらなる解析が必要である。

System N は両方向性にアミノ酸を輸送できるのか？

Bröer *et al.* (2002) は、放射線でラベルしたグルタミンを利用し、SN1 タンパク質が細胞内から細胞外にグルタミンを輸送することを報告した。グルタミンが細胞内から細胞外へ輸送されるための条件として、細胞外の酸性化 (pH7.0 以下) および細胞外 pH が十分に高いとき (例えば, 8.0) に細胞内 Na^+ 濃度が上昇 (35 mM 以上) することを挙げている。このような状況が生理的条件下で生じることは考えにくく、*in vivo* の条件において System N を介するグルタミンの細胞内から細胞外へ輸送されるメカニズムについてはさらに詳細な研究が必要である。

網膜におけるグルタミン酸—グルタミンサイクルの可能性とミュラー細胞の役割

グルタミン酸は、脊椎動物網膜の代表的な興奮性神経伝達物質である。視細胞と一部の双極細胞は、このグルタミン酸を伝達物質として放出している (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Takahashi & Murakami, 1991)。これらの神経細胞から放出されたグルタミン酸は、ミュラー細胞ならびに放出した神経細胞によって細胞内に取り込まれ、シナプス間隙から除去される (Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Grant & Dowling, 1995, 1996; Newman & Reichenbach, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b)。ミュラー細胞に取り込まれたグルタミン酸は、細胞内に存在するグルタミン合成酵素によりグルタミンに変換され (Riepe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979)、本研究から推測されるように System N によって細胞外に輸送される。このグルタミンは、おそらく System A によって神経細胞に取り込まれ、細胞内でグルタミン酸合成酵素によりグルタミン酸に変換されて再利用されると推測される (例えば, Chaudhry *et al.*, 2002)。しかし、視細胞や双極細胞に System A が発現している

か否かに関する研究は全く行われていない。

Winkler *et al.* (1996) は、グルタミン合成酵素活性を Methionine sulfoximine によって阻害しても、ERG (網膜電図) の b-波 (第2次神経細胞以降の光応答の総和) が有意に減少しないことから、網膜ではグルタミン酸-グルタミンサイクルよりも神経細胞の終末部から取り込まれるプロセスがグルタミン酸の再利用経路として重要であることを報告した。しかし、最近、同じグルタミン合成酵素阻害剤 (Methionine sulfoximine) を投与する実験で、b-波が顕著に減少するという報告がなされた (Barnett *et al.*, 2000)。この報告は、脳同様に、網膜でもグルタミン酸-グルタミンサイクルが重要であることを示唆している。両報告のグルタミン合成酵素阻害剤の作用は大きく異なっており、何れが真実であるのかを今後明らかにして行く必要がある。

引用文献

- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 10**: 47-57.
- Barnett, N. L., Pow, D. V. and Robinson, S. R. (2000), Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light, *Glia*, **30**: 64-73.
- Boulland, J.-L., Osen, K. K., Levy, L. M., Danbolt, N. C., Edwards, R. H., Strom-Mathisen, J. and Chaudhry, F. A. (2002), Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle, *Eur. J. Neurosci.*, **15**: 1615-1631.
- Brew, H. and Attwell, D. (1987), Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells, *Nature*, **327**: 6722-6731.
- Bringmann, A., Schopf, S. and Reichenbach, A. (2000), Developmental regulation of calcium channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurophysiol.*, **84**: 2975-2983.
- Bröer, S. and Brookes N. (2001), Transfer of glutamine between astrocytes and neurons, *J. Neurochem.*, **77**: 705-719.
- Bröer, A., Albers, A., Setiawan, I., Edwards, R. H., Chaudhry, F. A., Lang, F., Wagner, C. A. and Bröer, S. (2002), Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions, *J. Physiol.*, **539**: 1: 3-14.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., and Edwards, R. H. (2002), The glutamine commute: take the N line and transfer to the A, *J. Cell Biol.*, **157**: 1-8.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Strom-Mathisen, J., Copenhagen, D. R., and Edwards, R. H. (1999), Molecular analysis of System N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission, *Neuron*, **99**: 769-780.
- Chaudhry, F. A., Krizaj, D., Larsson, P., Reimer, R. J., Wreden, C., Strom-Mathisen, J., Copenhagen, D. R., Kavanaugh, M. and Edwards, R. H. (2001), Coupled and uncoupled proton movement by amino acid transport System N, *EMBO J.*, **20**: 7041-7051.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536-539.
- Eliasof, S. & Werblin, F. (1993), Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander, *J. Neurosci.*, **13**: 402-411.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1998a), Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: Identification, localization, and function, *J. Neurosci.*, **18**: 698-712.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1998b), Localization and func-

- tion of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443–1454.
- Fei, Y. J., Sugawara, M., Nakanishi, T., Huang, W., Wang, H., Prasad, P. D., Leibach, F. H. and Ganapathy, V. (2000), Primary structure, genome organization, and functional and electrogenic characteristics of human system N1, a Na⁺- and H⁺- coupled glutamine transporter, *J. Biol. Chem.*, **275**: 23707–23717.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1995), A glutamate-activated chloride current in cone-driven ON bipolar cells of the white perch retina, *J. Neurosci.*, **15**: 3852–3862.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1996), ON bipolar cell responses in the teleost retina are generated by two distinct mechanisms, *J. Neurophysiol.*, **76**: 3842–3849.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Hertz, L. (1979), Functional interactions between neurons and astrocytes, I. Turnover and metabolism of putative amino acid transporters, *Prog. Neurobiol.*, **33**: 277–323.
- Kilberg, M. S., Handlogten, M. E., and Christensen, H. N. (1980), Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4011–4019.
- Linser, P. and Moscona, A. A. (1979), Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Müller fibers and dependence on cell interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 6476–6480.
- Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L. and Shulman, R. G. (1999), Energy on demand, *Science*, **283**: 496–497.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **334**: 325–349.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinae by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol. (Lond.)*, **419**: 213–224.
- 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. and Takahashi, K.-I. (1987), Calcium action potential and its use for measurement of reversal potentials of horizontal cell responses in carp retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **386**: 165–180.
- Newman, E. (1987), Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study, *J. Neurosci.*, **7**: 2423–2432.
- Newman, E. (1991), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander, *J. Neurosci.*, **11**: 3972–3983.
- Newman, E. (1994), A physiological measure of carbonic anhydrase in muller cells, *Glia*, **11**: 291–299.
- Newman, E. (1995), Glial cell regulation and Extracellular potassium, In *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. and Ransom, B. R.), pp717–731, Oxford Press.
- Newman, E. (1996), Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium-bicarbonate cotransport, *J. Neurosci.*, **16**: 159–168.
- Newman, E. (1999), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat, *Glia*, **26**: 302–308.
- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996), The Müller cell: a functional element of the retina, *TINS*, **19**: 307–312.
- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J. and Zorzano, A. (1998), Molecular biology of mammalian plasma membrane aminoacid transporters, *Physiol. Rev.*, **78**: 969–1054.
- Reimer R. J., Chaudhry, F. A. Gray, A. T. and Edwards, R. H. (2000), Amino acid transport System A resembles System N in sequence but differs in mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**: 7715–7720.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1977), Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina, *Nature*, **268**: 654–655.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1978), Glutamine synthetase in the developing rat retina: An immunohistochemical study, *Expt. Eye Res.*, **27**: 435–444.
- Robinson, M. B. and Dowd, L. A. (1997), Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system, *Adv. Pharmacol.*, **37**: 69–115

- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- 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.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. (1988), L-Glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process that may contribute to the interaction between photoreceptors *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5315–5319.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 高橋恭一 (2002), トラフサンショウウオ網膜錐体の細胞内 pH 調節, *経済科学研究*, **6**(1): 205–215.
- 高橋恭一 (2003), Na^+/H^+ エクスチェンジャーによるトラフサンショウウオ網膜ミュラー細胞の細胞内 pH 調節. *人間環境学研究*, **2**(1): 1–13.
- 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.
- Takahashi, K.-I., Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (2003), SN1 catalyzes transport of glutamine across Müller cells in retina, In *The neural basis of early vision*, ed. A. Kaneko, Springer Verlag, pp46–47.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- Van del Berg, C. J. and Garfinkel, D. (1971), A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain, *Biochem. J.*, **123**: 211–218.
- Westergaard, N., Sonnewald, U. and Schousboe, A. (1995), Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited, *Dev. Neurosci.*, **17**: 203–211.
- Winkler, B. S., Kapousta-Bruneau, N., Arnold, M. J. and Green, D. G. (1999), Effects of inhibiting glutamine synthetase and blocking glutamate uptake on b-wave generation in the isolated rat retina, *Visual Neurosci.*, **16**: 345–353.