

ラット網膜双極細胞に対する ATP の作用

高橋 恭一

(受付 2004 年 10 月 4 日)

序 論

半世紀前, Holton & Holton (1954) および Holton (1959) は感覚神経を電気刺激することによって ATP (Adenosine 5'-triphosphate; アデノシン三リン酸) が放出されることを見出した。これらの報告は, ATP が情報伝達物質 (例えば, 神経伝達物質あるいは神経修飾物質) として神経終末から放出されている可能性を強く示していた。爾来, 神経細胞による ATP の放出に関する研究が精力的に行われ, 今では ATP が単独で, あるいはアセチルコリンやアドレナリンなどと一緒に神経終末から放出されていることが明らかとなっている (例えば, Fyffe & Perl, 1984; Burnstock, 1986)。ATP 放出の研究に加え, ATP 受容のメカニズムも解析され, 1970年台後半 ATP 受容体としてプリン体受容体が存在することが報告された (Burnstock, 1978)。現在, ATP 受容体はイオンチャネル直結型 (P2X 型 ATP 受容体) と G タンパク質連結型 (P2Y 型 ATP 受容体) の 2 種類に分類されている (例えば, O'Connor *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; North & Barnard, 1997; North, 2002)。1980年代に入ると ATP の機能解析が本格化し, Jahr & Jessell (1983) は細胞外液に添加した ATP が脊髄後角の神経細胞に興奮性作用を及ぼすことを明らかにした。続いて, Edwards *et al.* (1992) は中枢神経系において, そして Evans *et al.* (1992) は末梢神経系において, 神経終末より放出された ATP がシナプス後細胞に電流応答を惹起するのを見出し, ATP がグルタミン酸やアセチルコリンなどと同様に神経伝達物質 (あるいは神経修飾物質) として機能していることが広く認められるようになった。最近では, ①中枢および末梢の両神経系において, 神経終末から放出された ATP が神経伝達物質あるいは神経修飾物質としてシナプス後細胞に作用することに加え, ②神経細胞のみならずグリア細胞に ATP 受容体が発現し, これが情報伝達に関与していること, および③シナプス前細胞終末に ATP 受容体が発現し, 神経伝達物質 (例えば, アドレナリン, グリシンやグルタミン酸など) の放出を制御していることなども明らかとなっている (例えば, Burnstock, 1997; Rhee *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Boehm & Kubista, 2002; North, 2002)。

Blazynski & Perez (1991) は, ウサギ網膜においてアマクリン細胞ならびに神経節細胞の一部がアデノシンを放出している可能性を示した。同時期に, ⑦網膜内にはアデノシンを

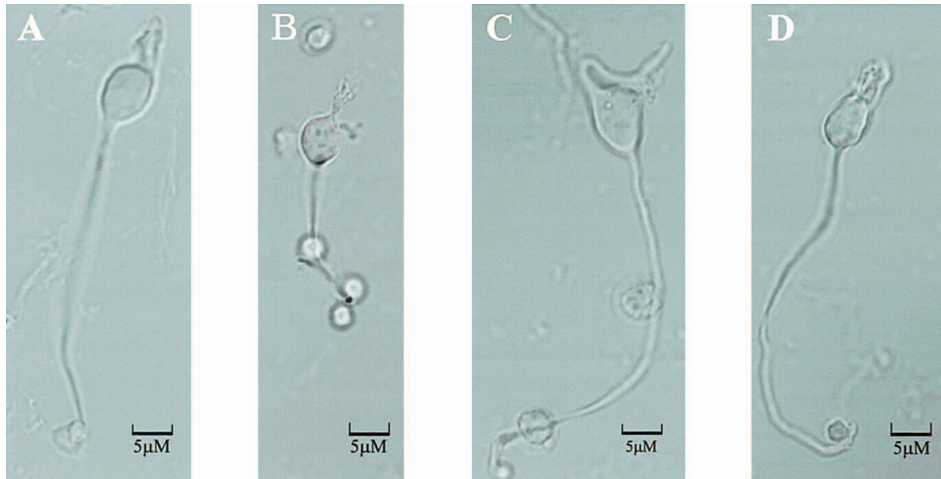
ATP に変換するメカニズムが存在すること、および④網膜内にはアデノシンとアセチルコリンが共存する細胞が存在することなども報告された (Perez et al., 1986; Blazynski, 1989)。これらの断片的な知見を繋ぎ合わせると、網膜内にはアデノシンから合成された ATP を単独で、あるいはアセチルコリンと共に細胞外に放出する細胞が存在することが推察された。実際、Neal & Cunningham (1994) は、ウサギ網膜において ATP がアセチルコリン放出を修飾 (抑制) すること、さらに ATP とアセチルコリンが同時に放出されている可能性があることを報告している。これらの一連の研究は、脊椎動物網膜においても ATP が情報伝達物質 (例えば、神経伝達物質あるいは神経修飾物質) として神経終末より放出されていることを強く示唆している。近年、ラット網膜において P2X 型 ATP 受容体サブユニットタンパク質の mRNA の発現が調査され、双極細胞などにその発現が認められることが報告されている (Greenwood et al., 1997; Wheeler-Schilling et al., 2000)。また、ラット網膜から単離した神経節細胞に発現する P2X 型 ATP 受容体の生理学的研究も行われている (Taschenberger et al., 1999)。これらに加え、ミュラー細胞 (網膜内のグリア細胞) から ATP が放出され、この ATP が神経活動を修飾 (抑制) していることも明らかとなっている (Newman, 2003)。このように、網膜での ATP 研究も漸く本格化してきたが、依然他の組織 (脳や脊髄など) に比べて立ち遅れた状態にあるため、ここ数年 ATP の機能解明が網膜生理学における重要課題の一つになっている。

今回、ATP が網膜における視覚情報処理にどのように関与しているのかを明らかにする目的で、ラット網膜から単離した双極細胞に対する ATP の作用について電気生理学的手法を用いて調べた。

実験材料と方法

生後 4 週間以上経過した Long-Evans 系ラット (*Rattus norvegicus*) を実験に用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、ラット網膜から双極細胞を単離した。以下に単離法を概説する。二酸化炭素で麻酔したラットを断頭し、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。単離した双極細胞を含む懸濁液を Concanavalin A を塗布した円型 (直径 12 mm) のカバーガラス上に置き、細胞がカバーガラスに付着したのを確認後、このカバーガラスを倒立顕微鏡 (TMD, Nikon) に装着した記録槽内に移動し、実験を開始した。単離後も、双極細胞はその特徴的な形態から他の神経細胞と容易に区別ができた (第 1 図)。細胞から 200 μ m ~ 300 μ m

ラット網膜双極細胞に対する ATP の作用



第 1 図 ラット網膜から単離した双極細胞

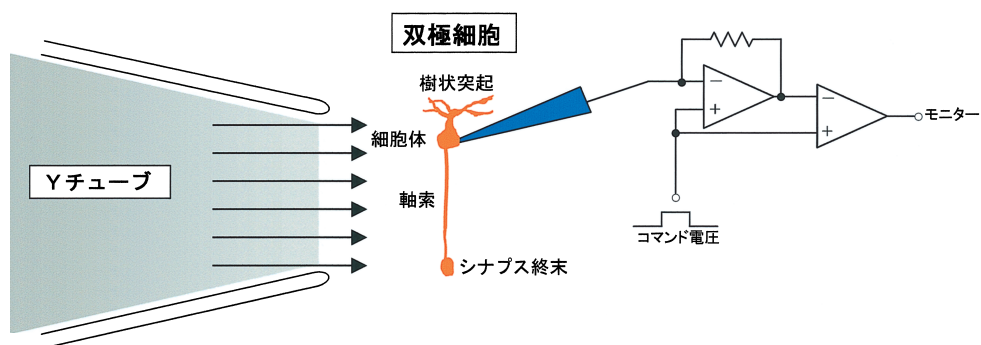
生後 4 週間以上経過した Long Evans 系ラットの網膜をパバイン処理し、得られた細胞懸濁液を Con A でコートしたカバーガラスの上に置き、20~30分後に細胞が不動化したのを確認後、ノマルスキー型顕微鏡で観察した。双極細胞はその特異的な形態から、単離後も他の神経細胞と容易に区別ができた。

の距離に置いた Y-tube (直径 150 μm) を用いて、以下に示す細胞外液を常時灌流した。

細胞外液のイオン組成は、105.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl) , 10.0 mM 塩化セシウム (CsCl) , 20.0 mM Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) , 5.0 mM 塩化カリウム (KCl) , 10.0 mM 塩化カルシウム (CaCl_2) , 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2) , 10.0 mM ブドウ糖, 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。CsCl と TEA-Cl はカリウムチャネルの活性化を抑制するために、細胞外液に添加した。細胞外液の pH は、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて 7.4 に調整し灌流した。薬品類は浸透圧を考慮せずに、細胞外液に添加し投与した (第 2 図)。

パッチ電極にもカリウムチャネルの活性を抑えるため、CsCl と TEA-Cl を中心とした内液を充填した。パッチ電極内液のイオン組成は、125.0 mM CsCl, 25.0 mM TEA-Cl, 0.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM CaCl_2 , 5.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 10.0 mM HEPES であった。パッチ電極内液の pH は 1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて 7.2 に調整し、実験に用いた。

双極細胞の膜電流は、Whole-cell voltage-clamp法を用いて記録した (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先端部の細胞膜を破碎し、膜電流を導出した (第 2 図)。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 単離双極細胞から膜電流を記録する方法

ラット網膜から単離した双極細胞の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先端部の細胞膜を破砕し、膜電流を導出した。カリウムチャネル活性を抑えるため、パッチ電極には CsCl と TEA-Cl を中心にした溶液（パッチ電極内液）を充填し、電流記録に用いた。また、細胞外液にもカリウムチャネル活性を抑えるために CsCl と TEA-Cl を加えた溶液を作成し、常時 Y-チューブ(直径:150 μm)を用いて灌流した。得られたデータは、IgorPro 4J あるいは OriginPro 7J を用いて解析した。試薬は細胞外液に溶かし、単離細胞から 200 μm ~ 300 μm の距離に置いた Y-チューブを介して投与した。

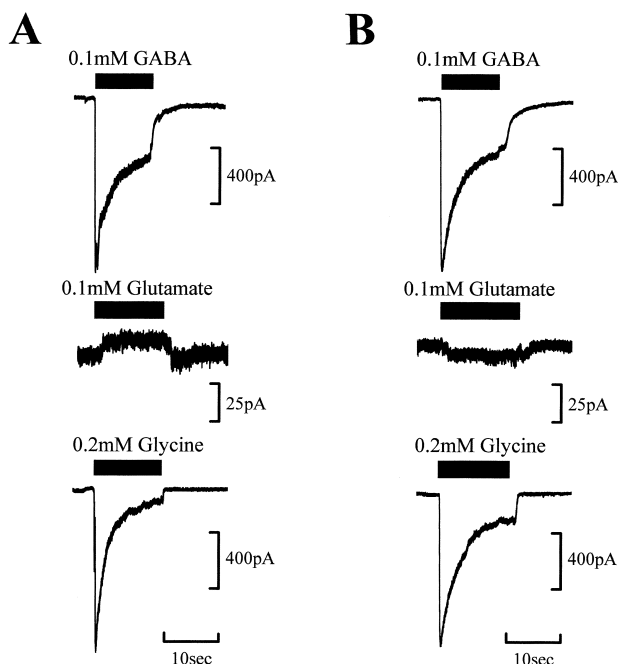
抗は 5M Ω ~13M Ω であった。ミュラー細胞の膜電流変化は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) を介してオシロスコープでモニターした。同時に、この電流変化を増幅器内蔵のフィルター (2 KHz; 4 次ベッセルフィルター) と 12 ビットの A/D コンバーター (Indec Systems) を経由しハードディスクに記録した。刺激波形の作成および電流応答の視覚化には、Pulse (Heka Elektronik) を用いた。オフラインでのデータ解析には、IgorPro Ver4J (Wavemetrics Inc.) あるいは OriginPro Ver7J (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. から購入した。

実験結果

ラット網膜双極細胞に発現するシナプス受容体

これまでの研究から、齧歯類網膜双極細胞にはグルタミン酸受容体、GABA 受容体およびグリシン受容体が発現していることが明らかとなっている (例えば, Suzuki *et al.*, 1990; Yamashita & Wässle, 1991; Pan & Lipton, 1995)。これらの受容体が Long-Evans 系ラット網膜双極細胞にも発現していることを確認するため、3 種類のアミノ酸を投与し膜電流の発生の有無を調べた (第3図)。-50 mV に膜電位固定した双極細胞 (第3図 A [細胞A] と B [細胞B]) に GABA (100 μM) (上段の記録) を投与すると、何れの細胞にも脱感作を伴う



第 3 図 単離双極細胞に発生するアミノ酸電流

−50 mV に膜電位固定した双極細胞に 3 種類のアミノ酸を投与し、電流変化を記録した。A (細胞 A) に GABA (100 μ M) あるいはグリシン (200 μ M) 投与すると、脱感作を伴う大きな内向き電流が発生した。グルタミン酸 (100 μ M) を投与すると、微弱な外向き電流が発生した。細胞 A に対する実験と同じ実験を B (細胞 B) にも実施した。GABA とグリシン投与によって惹起される電流応答に、細胞 A との顕著な差異は認められなかった。しかし、グルタミン酸投与に対する電流応答の極性は全く逆であり、内向きであった。GABA とグリシン電流は、実験を行った総ての細胞で惹起された。しかし、グルタミン酸電流は、実験を行った細胞のうち僅か 23% にしか観察されなかった (第 6 図参照)。外向きのグルタミン酸電流は細胞 A でしか観察されなかった。

この実験は、Long-Evans 系ラット網膜双極細胞に少なくとも 3 種類のアミノ酸に対する受容体が発現していることを示している。

大きな内向き電流が発生した。グリシン (200 μ M) (下段の記録) の投与でも、GABA 投与の場合と同様に、両細胞に脱感作を伴う内向き電流が発生した。しかし、グルタミン酸 (100 μ M) (中段の記録) を投与したとき、細胞 A と細胞 B とでは応答極性が全く異なる電流が惹起された (すなわち、細胞 A では外向きの、細胞 B では内向きのグルタミン酸電流)。これらのグルタミン酸電流は GABA 電流やグリシン電流に比べて微弱 (電流スケールの違いに気づけ) であり、顕著な脱感作を示さなかった。細胞 B に惹起されたグルタミン酸電流 (内向き電流) とは異なり、細胞 A に惹起されたグルタミン酸電流 (外向き電流) は細胞膜を破砕して 2 分程経過すると惹起されなくなった (図は省略)。

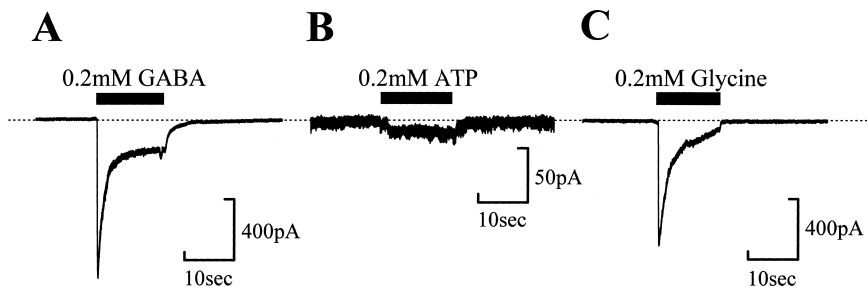
GABA 電流とグリシン電流は、実験を行った総ての双極細胞で観察された。しかし、グル

タミン酸電流は実験を行った双極細胞の僅か23%でしか記録されなかった（第6図参照）。また、外向きのグルタミン酸電流を発生した細胞はたった1例であった（第3図のA [細胞A]のみ）。グルタミン酸電流の発生率が低い理由は、双極細胞の樹状突起（視細胞からシナプス入力を受け取る部位）が単離操作によって消失したためと考えられる（第1図参照）。これに加え、外向きのグルタミン酸電流（Gタンパク質連結型グルタミン酸受容体の活性化に伴い発生する電流）の場合、本実験で用いたパッチ電極内液（ATPやGuanosine 5'-triphosphate [GTP]のみならず、cyclic Guanosine 3',5'-monophosphate [cGMP]もcyclic Adenosine 3',5'-monophosphate [cAMP]も含まない内液）ではグルタミン酸受容体とイオンチャネルの間を繋ぐ細胞内セカンドメッセンジャー（cGMP）が洗い流され、その濃度が急速に低下するため、電流発生率が内向きのグルタミン酸電流よりもさらに低くなったと推測される。

以上の実験結果は、Long-Evans系ラット網膜双極細胞にグルタミン酸受容体、GABA受容体、およびグリシン受容体が発現していることを示している。また、本実験条件（ATPやGTPのみならず、cGMPもcAMPなどの細胞内セカンドメッセンジャーを含まないパッチ電極内液の使用）では、代謝調節型受容体を介する電流応答を長時間記録することが困難であることが明らかとなった。

ATP投与により惹起される膜電流

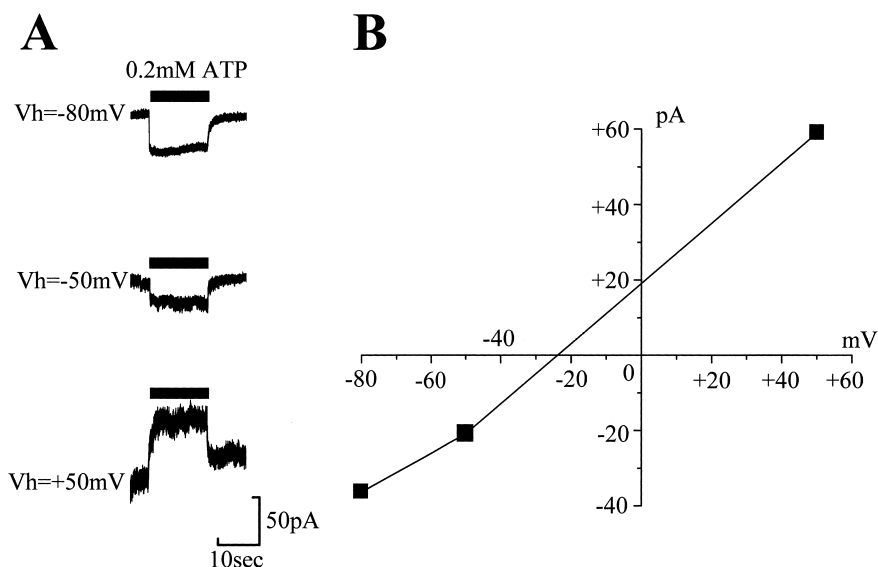
双極細胞にATP受容体が発現しているのか否かを明らかにするため、ATPを投与し膜電流発生の有無を調べた（第4図）。-50 mVに膜電位固定した双極細胞にGABA（200 μ M）あるいはグリシン（200 μ M）を投与すると、第3図の実験と同様に、脱感作を伴う大きな内向き電流が発生した（第4図AとC）。ATP（200 μ M）を投与すると、微弱な内向き電流



第4図 単離双極細胞に発生するATP電流

-50 mVに膜電位固定した双極細胞にGABA（200 μ M）、ATP（200 μ M）、そしてグリシン（200 μ M）を投与し、電流変化を記録した。GABAとグリシン投与では、脱感作を伴う大きな内向き電流が発生した（AとC）。ATP（200 μ M）の投与でも、小さいながら内向き電流が発生した。GABA電流やグリシン電流と異なり、ATP電流に顕著な脱感作は認められなかった。ATP電流は実験を行った細胞の約17%に観察された（第6図参照）。

この実験は、双極細胞にATP受容体が発現していることを示唆している。



第 5 図 単離双極細胞に発生する ATP 電流の電圧-電流関係

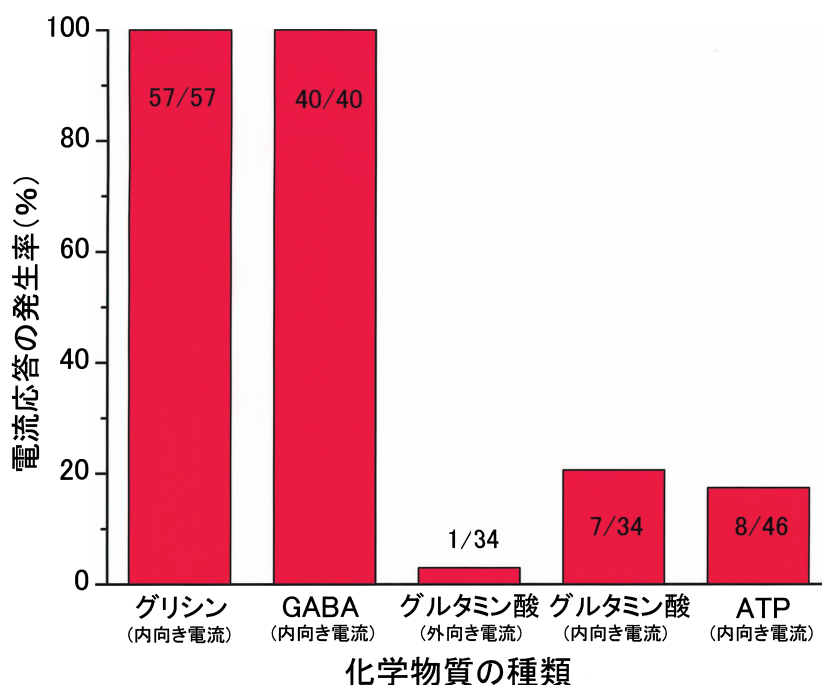
A: -80 mV および -50 mV に膜電位固定した双極細胞において, ATP ($200 \mu\text{M}$) を投与すると内向き電流が発生した。膜電位を $+50$ mV まで上昇させると, ATP 電流は外向きに転じた。B: これらのデータから電流-電圧関係を調べると, 概ね直線的であった。ATP 電流の逆転電位は, -25 mV 付近にあった。

この結果は, ATP 電流が陽イオンに対する透過性の増加によることを示唆している。

が発生した (電流スケールの違いに気づけ)。この ATP 電流は, 細胞膜が破碎され電流導出を開始して10分以上経過しても記録が可能であった (図は省略)。GABA 電流やグリシン電流と異なり, ATP 電流は顕著な脱感作を示さなかった。ATP 電流は, 実験を行った双極細胞の約17%に観察された (第 6 図参照)。

双極細胞に発生する ATP 電流のイオン機序を調べるため, 異なる膜電位レベルで固定した双極細胞に ATP ($200 \mu\text{M}$) を投与し, 電流変化を記録・比較した (第 5 図)。 -80 mV および -50 mV で膜電位固定した双極細胞では, ATP 投与によって内向き電流が発生した。しかし, 膜電位を $+50$ mV にまで上昇させると, ATP 電流は外向きに転じた (第 5 図 A)。これらのデータに基づき電流-電圧関係を調べると, 概ね直線的であった (第 5 図 B)。この ATP 電流の逆転電位は, -25 mV 付近にあった。この逆転電位は, 陽イオンに対する透過性の上昇を示唆している。

以上の実験結果は, ラット網膜双極細胞のある集団 (約17%) に ATP 受容体 (おそらく, P2X 型 ATP 受容体) が発現しており, この受容体の活性化に伴い陽イオンの透過性が上昇することを示唆している。



第6図 双極細胞に惹起された各種電流応答の発生率

本研究で得られた実験結果 (-50 mV で膜電位固定した細胞の結果) を纏め、それぞれの化学物質投与で惹起される電流応答の発生率をグラフ化した。グリシンと GABA については、実験を実施した総ての双極細胞で内向き電流を発生した。グルタミン酸電流は実験を行った細胞の僅か23%でしか発生しなかった。外向きのグルタミン酸電流を発生した細胞は、たった1例であった。また、ATP は実験を行った双極細胞の約17%に内向き電流を発生した。

グルタミン酸電流の発生率の低さは、単離操作時に双極細胞の樹状突起の多くが消失するためと考えられた。特に、外向きのグルタミン酸電流の低発生率は、樹状突起の消失に加え、パッチ電極内液に ATP, GTP, cAMP や cGMP などを加えていないため、細胞内のセカンドメッセンジャー系が賦活されないことが原因であろうと考えられた。

考 察

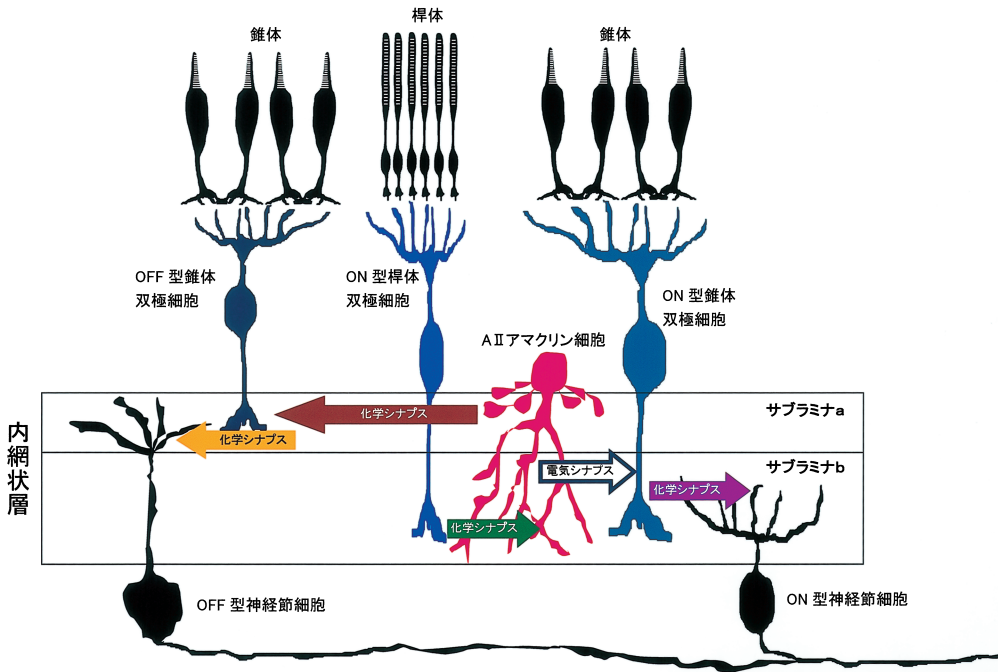
哺乳動物網膜双極細胞の機能と神経接続

脊椎動物網膜視細胞には、明所で動作する錐体と暗所で動作する桿体とがある。これらの視細胞で受容された外界の光情報は電位信号に変換され、第2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、①受容野中心部への光照射によって脱分極応答を示し、周辺部への光照射によって過分極応答を示す ON 中心型細胞と、②逆の応答パターンを示す OFF 中心型細胞の2種類に分類される (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)。これまでの研究から、脊椎動物視細胞は伝達物質としてグルタミン酸を放出していることが明らかとなっている (Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Takahashi & Murakami, 1991)。従って、ON 中心型および OFF 中心型双極細胞の何れにもグルタミン酸受容体が発現している。OFF 中心型双極細胞には AMPA ((RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid)/ KA (Kainic acid) 型グルタミン酸受容体 (イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の一種類) が、また ON 中心型双極細胞には 2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) 感受性グルタミン酸受容体 (G タンパク質連結型グルタミン酸受容体) が発現し、受容野中心部への光照射に伴う電位応答発生に関与している (Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; 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)。

哺乳動物網膜における各神経細胞間の接続は、下等脊椎動物 (魚類, 両生類, および爬虫類) 網膜とは若干異なっている (第 7 図参照)。錐体からシナプス入力を受け取る双極細胞 (ON 中心型錐体双極細胞と OFF 中心型錐体双極細胞) は、下等脊椎動物と同様に神経節細胞にその出力を送っている。しかし、桿体からシナプス入力を受け取る双極細胞 (桿体双極細胞) は神経節細胞と直接的なシナプス連絡をしていない。ON 中心型の桿体双極細胞は内網状層のサブラミナ b において A II アマクリン細胞と化学シナプス結合 (第 7 図; 緑色の矢印) (Kolb & Famiglietti, 1974; Famiglietti & Kolb, 1975) し、また A II アマクリン細胞は ON 中心型の錐体双極細胞と電気シナプス結合 (第 7 図; 青色の空白矢印) (Mills & Massey, 2000; Feigenspan *et al.*, 2001) している。結果として、ON 中心型桿体双極細胞の出力は、A II アマクリン細胞を介して ON 中心型桿体双極細胞に伝播され、最終的に神経節細胞 (第 7 図; 紫色の矢印) へと送られる (第 7 図参照)。不思議なことに、哺乳動物網膜には OFF 中心型桿体双極細胞は存在しない。ON 中心型の桿体双極細胞は A II アマクリン細胞と化学シナプス結合 (第 7 図; 緑色の矢印) しているが、このアマクリン細胞は抑制性出力 (グリシンを伝達物質として放出) を OFF 中心型錐体双極細胞と神経節細胞 (第 7 図; 茶色と橙色の矢印) に送っている (Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Grünert & Wässle, 1996)。この抑制性出力とは ON 中心型双極細胞が発生する電位応答の逆転を意味し、これは OFF 中心型双極細胞の電位応答と等価と考えられる。

ラット網膜双極細胞には、グルタミン酸受容体以外に GABA 受容体とグリシン受容体が発現している (例えば, Suzuki *et al.*, 1990; Pan & Lipton, 1995)。これらの受容体の発現は、樹状突起部とシナプス終末部に多い (Suzuki *et al.*, 1990)。哺乳動物網膜の外網状層内で樹



第7図 哺乳動物網膜双極細胞の特異な神経接続

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。ON中心型双極細胞には、APB感受性代謝調節型グルタミン酸受容体が発現している（Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995）。一方、OFF中心型双極細胞にはAMPA（(RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid）/KA（Kainic acid）型グルタミン酸受容体が発現している。ON中心型およびOFF中心型双極細胞は、視細胞が放出したグルタミン酸を受容し電流応答を発生するが、両双極細胞に発現する受容体が異なるため、応答極性が逆となる（例えば、Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Attwell, 1986）。

哺乳動物網膜における神経接続は、下等脊椎動物（魚類、両生類、爬虫類）網膜での場合と若干異なっている。錐体からシナプス入力を受け取る双極細胞（ON中心型錐体双極細胞とOFF中心型錐体双極細胞）は、下等脊椎動物と同様に神経節細胞にその出力を送っている。しかし、桿体からシナプス入力を受け取る双極細胞（桿体双極細胞）は神経節細胞と直接シナプス結合していない。ON中心型の桿体双極細胞（図中には、ON型桿体双極細胞と記載）は内網状層内のサブラミナbにおいてAIIアマクリン細胞と化学シナプス結合（緑色の矢印）し、またこのAIIアマクリン細胞はON中心型の錐体双極細胞（図中には、ON型錐体双極細胞と記載）と電気シナプス結合（青色の空白矢印）している。この結果、ON中心型桿体双極細胞からの出力は、AIIアマクリン細胞を介してON中心型桿体双極細胞に伝播され、最終的に神経節細胞（紫色の矢印）へと送られる。不思議なことに、哺乳動物網膜にはOFF中心型桿体双極細胞は存在しない。ON中心型の桿体双極細胞はAIIアマクリン細胞と化学シナプス結合（緑色の矢印）しているが、このアマクリン細胞は抑制性出力（グリシンを伝達物質として放出）をOFF中心型錐体双極細胞（図中には、OFF型錐体双極細胞と記載）と神経節細胞（茶色とオレンジ色の矢印）に送っている（Sassoé-Pognetto *et al.*, 1994; Grünert & Wässle, 1996）。この抑制性出力とはON中心型双極細胞が発生する電位応答の逆転を意味し、これはOFF中心型双極細胞の電位応答と等価と考えられる。

状突起を伸ばしている水平細胞，および内網状層内で広範に樹状突起を伸ばしているある種のアマクリン細胞は伝達物質として GABA あるいはグリシンを放出していることが知られている。これらの神経伝達物質（GABA あるいはグリシン）が拡散によって双極細胞の樹状突起部あるいはシナプス終末部に到達し，当該の受容体を活性化することは十分に考えられる。哺乳動物網膜においてそのメカニズムは解明されていないが，これらの GABA 受容体やグリシン受容体の活性化が双極細胞の中心一周辺拮抗的受容野の周辺部応答形成に関与している可能性は充分ある。

哺乳動物網膜双極細胞の ATP 受容体の種類

ATP 受容体は，イオンチャネル直結型（P2X 型 ATP 受容体）と G タンパク質連結型（P2Y 型 ATP 受容体）の 2 種類に分類されている（例えば，O'Connor *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; North & Barnard, 1997; North, 2002）。P2X 型 ATP 受容体を構成するサブユニット（タンパク質）には 7 種類（P2X₁~P2X₇）存在することが知られており，組織によってこれらのサブユニットの発現パターンが異なっている。この発現パターンの相違は，ATP 受容体の性質（イオン機序，脱感作の有無や強弱，アゴニストやアンタゴニストを含む薬理学的特性など）の差異を形成している（North, 2002）。P2Y 型 ATP 受容体を構成するサブユニットには 6 種類（P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂）存在することが知られている。これらのサブユニットから構成される P2Y 型 ATP 受容体の活性化によっても，G タンパク質を介して電流応答が惹起されることが報告されている（Burnstock, 1997; Nakamura *et al.*, 1996）。

本実験で使用したパッチ電極内液には ATP, GTP, cAMP や cGMP のみならずセカンドメッセンジャーとして報告されている化学物質を添加していないため，細胞膜破碎後パッチ電極内液が細胞内に浸入し始めると，細胞内液がパッチ電極内液に置換され，細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能している物質の濃度が急速に減少すると推測される。このため，もし ATP 電流が P2Y 型 ATP 受容体（G タンパク質連結型 ATP 受容体）を介して発生しているのであれば，外向きのグルタミン酸電流（G タンパク質連結型グルタミン酸受容体；細胞内セカンドメッセンジャーとして cGMP が機能）の場合と同じように細胞膜破碎後の時間に依存して電流振幅が減少し，やがて消失する筈である。しかし，本実験で惹起された ATP 電流は 10 分以上に亘って記録（図は省略）されており，この点を考慮すると，P2Y 型 ATP 受容体というよりも，むしろ P2X 型 ATP 受容体の活性化を介して電流発生したと考える方が妥当である。最近，ラット網膜を用いて P2X 型 ATP 受容体サブユニットタンパク質の mRNA の発現が調べられ，双極細胞には P2X₂（Greenwood *et al.*, 1997），あるいは P2X₃, P2X₄, および P2X₅（Wheeler-Schilling *et al.*, 2000）が発現していることが報告され

ている。P2X 型 ATP 受容体サブユニットタンパク質のいくつかが集合してできた受容体は、何れも陽イオン（特に、 Ca^{2+} ）に対する透過性上昇を伴うという共通の性質を有しており、このためイオン透過性を基準に双極細胞に発現する ATP 受容体を構成するサブユニットタンパク質を推測するのは不可能である。*Xenopus* 卵に単一種類の P2X 型 ATP 受容体サブユニットタンパク質を強制発現させ形成した ATP 受容体の性質を解析したところ、電流応答の脱感作に顕著な差異があることが判明した (North, 2002)。ラット網膜双極細胞の ATP 受容体を構成するサブユニットタンパク質の種類 (Greenwood *et al.*, 1997; Wheeler-Schilling *et al.*, 2000), ならびに単一サブユニットタンパク質により形成された ATP 受容体が示す電流応答の脱感作 (North, 2002) を勘案すると、本研究で得られた ATP 電流 (第 4 図 B) は P2X₂ と P2X₄ のいずれかあるいは両方のサブユニットを含む ATP 受容体の活性化に伴い発生したと推察される。勿論、これを明らかにするには、電気生理学的手法と免疫組織学的手法を組み合わせた実験が必要である。

哺乳動物網膜内で ATP を放出する細胞とは？

Neal & Cunningham (1994) は、ウサギ網膜において ATP がアセチルコリン放出を修飾 (抑制) すること、さらに ATP とアセチルコリンが同時に放出されている可能性があることを報告している。網膜内でアセチルコリンを放出する細胞として Starburst 型アマクリン細胞がよく知られており、おそらくこのアマクリン細胞が ATP も放出していると推測される。この Starburst 型アマクリン細胞は内網状層内に広範に樹状突起を伸ばしており、双極細胞や神経節細胞とシナプス結合していると考えられている。おそらく、Starburst 型アマクリン細胞からアセチルコリンと一緒に放出された ATP は、このアマクリン細胞に発現する ATP 受容体 (自己受容器) に作用してアセチルコリンの放出量を調節する (Neal & Cunningham, 1994) と同時に、拡散によって近隣の双極細胞や神経節細胞にまで到達し ATP 受容体 (P2X 型 ATP 受容体) を活性化すると推察される。この ATP が神経伝達物質として単独で機能するのか、あるいは神経修飾物質として GABA 受容体やグリシン受容体などの機能を修飾するのかについては、今後より詳細な解析が必要である。

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.)*, **87**: 125–161.
- 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.

- Blazynski, C. (1989), Displaced cholinergic GABAergic amacrine cells in the rabbit retina also contain adenosine, *Vis. Neurosci.*, **3**: 425–431.
- Blazynski, C. and Perez, M. T. R. (1991), Adenosine in vertebrate retina: localization, receptor characterization and function, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **11**: 463–484.
- Boehm, S. and Kubista, H. (2002), Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors, *Pharmacol. Rev.*, **54**: 43–99.
- Burnstock, G. (1978), A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, Eds. R. W. Straub and L. Bolis, pp 107–118, Raven Press, New York.
- Burnstock, G. (1986), Purines as cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons, In *Coexistence of neuronal messengers: A New Principle in Chemical Transmission*, Prog. Brain Res., Eds. T. Hökfelt, K. Fuxe and B. Pernow, Vol. 68, pp 193–203, Elsevier, Amsterdam
- Burnstock, G. (1997), The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules, *Neuropharmacol.*, **36**: 1127–1139.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Silvilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J. N. (1995), A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons, *Nature*, **377**: 428–431.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992), Atp receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system, *Nature*, **359**: 144–147.
- Evans, R. J., Derkach, V. and Surprenant, A. (1992), ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons, *Nature*, **357**: 503–505.
- Famiglietti, E. V. and Kolb, H. (1975), A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina, *Brain Res.*, **84**: 293–300.
- Feigenspan, A., Teubner, B., Willecke, K. and Weiler, R. (2001), Expression of neuronal connexin 36 in AII amacrine cells of the mammalian retina, *J. Neurosci.*, **21**: 230–239.
- Fyffe, R. E. and Perl, E. R. (1984), Is ATP a central synaptic mediator for certain primary afferent fibers from mammalian skin ?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 6890–6893.
- Greenwood, D., Yao, W. P. and Housley, G. D. (1997), Expression of the P2X₂ receptors subunit of the ATP-gated ion channel in the retina, *Neuroreport*, **8**: 108301088.
- Grünert, U. and Wässle, H. (1996), Glycine receptors in the rod pathway of the macaque monkey retina, *Vis. Neurosci.*, **13**: 101–115.
- 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.
- Holton, P. (1959), The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves, *J. Physiol. (Lond.)*, **145**: 494–504.
- Holton, F. A. and Holton, P. (1954), The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings, liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves, *J. Physiol. (Lond.)*, **126**: 124–140.
- Jahr, C. E. and Jessell, T. M. (1983), ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurons, *Nature*, **304**: 730–733.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **207**: 623–633.
- 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.
- Kolb, H. and Famiglietti, E. V. (1974), Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of the cat retina, *Science*, **186**: 17–25.
- 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.
- Mills, S. L. and Massey, S. C. (2000), A series of biotinylated tracers distinguishes three types of gap junction in the retina, *J. Neurosci.*, **20**: 8629–8636.
- 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. 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.
- Nakamura, F. and Strittmatter, S. M. (1996), P2Y₁ purinergic receptors in sensory neurons: Contribution to touch-induced impulse generation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 10465–10470.
- 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.
- Neal, M. J. and Cunningham, J. R. (1994), Modulation of endogenous ATP of the light-evoked release of Ach from retinal cholinergic neurones, *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1085–1087.
- Newman, E. A. (2003), Glial cell inhibition of neurons by release of ATP, *J. Neurosci.*, **23**: 1659–1666.
- North, R. A., (2002), Molecular physiology of P2X receptors, *Physiol. Rev.*, **82**: 103–1067.
- North, R. A. and Barnard, E. A., (1997), Nucleotide receptors, *Cur. Opin. Neurobiol.*, **7**: 346–357.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A. and Leff, P. (1991), Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies, *Trends, Pharmacol. Sci.*, **12**: 137–141.
- Pan, Z.-E. and Lipton, S. A. (1995), Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals, *J. Neurosci.*, **15**: 2668–2679.
- Perez, M. T. R., Ehinger, B., Linstrom, K. and Fredholm, B. B. (1986), Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina, *Brain Res.*, **398**: 106–112.
- Rhee, J. S., Wang, Z. M., Nabekura, J., Inoue, K and Akaike, N. (2000), ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses, *J. Physiol. (Lond.)*, **524.2**: 471–483.
- 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.

- Sassaoè-Pognetto, M., Wässle, H. and Grünert, U. (1994), Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the $\alpha 1$ subunit of the glycine receptor, *J. Neurosci.*, **14**: 5131–5146.
- 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.
- 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.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Suzuki, S., Tachibana, M. and Kaneko, A. (1990), Effects of glycine and GABA on isolated bipolar cells of the mouse retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **421**: 645–662.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- 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.
- Taschenberger, H., Jüttner, R. and Grantyn, R. (1999), Ca^{2+} -permeable P2X receptor channels in cultured rat retinal ganglion cells, *J. Neurosci.*, **19**: 3353–3366.
- 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.
- Wang, Z., Haydon, P. G. and Yeung, E. S. (2000), Direct observation of calcium-independent intracellular ATP signaling in astrocytes, *Anal. Chem.*, **72**: 2001–2007.
- 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.
- Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., Jabs, R. and Guenther, E. (2000), Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina, *Mol. Brain Res.*, **76**: 415–418.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphnobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.