

ラット網膜双極細胞に発現する抑制性 アミノ酸受容体の再検討

高橋 恭一

(受付 2005年5月9日)

序 論

グリシンあるいは γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid: GABA) は、脊椎動物の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質である。シナプス前神経細胞の終末から放出されたこれらの抑制性アミノ酸はシナプス後細胞に発現するそれぞれの受容体に結合し、イオンチャネルを直接的 (イオンチャネル直結型受容体) あるいはセカンドメッセンジャーを介してイオンチャネルを間接的 (代謝調節型受容体) に開口し、シナプス後細胞の膜電位を過分極させる。これまでの研究から、グリシン受容体、GABA_A 受容体ならびに GABA_C 受容体はイオンチャネル直結型受容体、そして GABA_B 受容体は G タンパク質と連結した代謝調節型受容体であることが明らかになっている (Johnston *et al.*, 1975; Drew *et al.*, 1984; Bormann *et al.*, 1987; Bormann, 1988; Bowery, 1989; MacDonald & Olsen, 1994; Semyanov, 2002)。また、GABA_A 受容体ではベンゾジアゼピンやバルビツール酸が、また GABA_C 受容体ではカルシウムイオン (Ca^{2+}) や亜鉛イオン (Zn^{2+}) が、それぞれの受容体で機能修飾因子として働くことも知られている (Pritchett *et al.*, 1989; Schonrock & Bormann, 1993; Dong & Werblin, 1995; Johnston, 1996; Kaneda *et al.*, 1997)。両受容体については生理学および薬理学的研究に加え、分子生物学的研究も盛んに行われ、その結果として受容体を構成するタンパク質の種類 (サブユニットの種類) およびこれらタンパク質を構成するアミノ酸組成やその配列などが解明されている。例えば、グリシン受容体は $\alpha_1 \sim \alpha_4$ と β のサブユニットにより、GABA_A 受容体では $\alpha_1 \sim \alpha_6$, $\beta_1 \sim \beta_3$, $\gamma_1 \sim \gamma_3$, δ_1 , ϵ_1 , π , θ のサブユニットにより、GABA_B 受容体では GB1 と GB2 のサブユニットにより、また GABA_C 受容体では $\rho_1 \sim \rho_3$ サブユニットにより構成されていること、などが挙げられる (例えば、Jentsch *et al.*, 2001; Legendre *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002; Semyanov, 2002)。生体内ではこれらのサブユニットが組み合わせさり、機能発現に最適のシナプス効率を有する受容体が形成されていると推測される。当然、サブユニットの組み合わせ如何によっては、受容体の生理学および薬理的性質 (脱感作の程度、アゴニストやアンタゴニストに対する感受性など) に差が現れることも予想される。

脊椎動物網膜でも、グリシンや GABA は抑制性神経伝達物質として機能している。GABA は水平細胞やアマクリン細胞の、またグリシンはアマクリン細胞と一部の双極細胞（サルおよびヒトの双極細胞の一部か？）の神経伝達物質であることが報じられている（例えば、Yazulla, 1986; Massey & Redburn, 1987; Schwartz, 1987; Marc, 1989; Poucho & Goebel, 1990; Davanger *et al.*, 1991; Crooks & Kolb, 1992; Enz *et al.*, 1996; Kalloniatis & Tomisich, 1998)。最近では、各受容体を構成するサブユニットの抗体を利用した免疫組織学的研究が盛んに行われ、GABA 受容体は網膜内の総ての神経細胞に、またグリシン受容体は双極細胞、アマクリン細胞ならびに神経節細胞に発現していることが明らかになってきた（Grünert & Wässle, 1993; Greferath *et al.*, 1994; Sassoè-Pognetto *et al.*, 1994; Kalloniatis & Tomisich, 1998)。これらの抑制性シナプスは視覚情報の時間的・空間的处理に重要な役割を果たしていると考えられているが、依然不明な点が多く、機能解明にはさらなる生理学的研究が必要である。

最近、著者は双極細胞に発現するシナプス受容体の性質ならびにその機能を解明する目的で、ラット網膜から単離した双極細胞を用い、各種神経伝達物質候補の生理作用を再検討することを始めた。この過程で、興奮性神経伝達物質と異なり、抑制性神経伝達物質（GABA とグリシン）は実験を行った総ての双極細胞に電流変化を惹起することを見出した（高橋, 2005）。両抑制性アミノ投与に伴い発生する電流応答を比較すると、特に脱感作の程度に顕著な差異が認められた。すなわち、グリシン電流では脱感作が顕著であるのに対し、GABA 電流では脱感作が殆ど認められない細胞も見られた。これまでに報告された研究成果（例えば、Feigenspan *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1997; Vaquero & Villa, 1999）から、双極細胞に GABA_A 受容体と GABA_C 受容体が発現していることは明らかであるが、これら受容体の活性化が GABA 電流の振幅や脱感作にどの程度貢献しているのか、また数種類以上ある双極細胞にこれらの受容体がどのような割合で発現しているのか、などについては未だ十分な調査は行われていない。そこで、本研究では双極細胞の GABA 電流の脱感作などに着目し、GABA 受容体活性化と GABA 電流発生との関係について検討を加えた。

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（約10分後）、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）。ただし、これらの双極細胞が桿体由来かあるいは錐体由来か、加えて ON 型かあるいは OFF 型かを判定することはできなかった。細胞から 200 μm ~ 300 μm 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。神経伝達物質候補である γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid: GABA) とグリシンはそれぞれ 100 μM と 200 μM の濃度で細胞外液に添加し、特に断らない限り実験では10秒~30秒の範囲内でこれらの物質を投与した（第1図参照）。これらの濃度で、GABA とグリシンは双極細胞に最大電流応答が惹起された。

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。パッチ電極内には、セカンドメッセンジャー候補 (cAMP や cGMP など) を添加していないため、代謝調節型の受容体 (GABA_B 受容体) が活性化する可能性は低い。

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。電極抵抗は 5 M Ω ~ 13 M Ω であった。双極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 (2KHz; 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

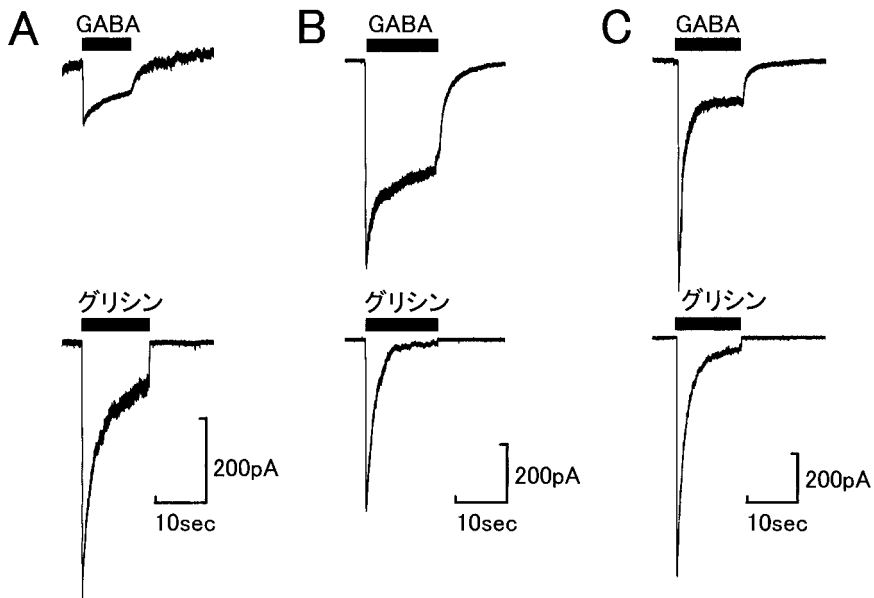
電流応答の視覚化には、Pulse (Heka Elektronik) を用いた。オフラインでのデータ解析には、IgorPro Ver4J (Wavemetrics Inc.) あるいは OriginPro Ver7J (OriginLab Co.) を用いた。

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惹起される抑制性アミノ酸電流

齧歯類網膜双極細胞には、グルタミン酸受容体 (興奮性シナプス受容体) のみならず GABA 受容体 (抑制性シナプス受容体) およびグリシン受容体 (抑制性シナプス受容体) が発現している (例えば, Suzuki *et al.*, 1990; Yamashita & Wässle, 1991; Pan & Lipton, 1995)。GABA あるいはグリシンの何れを双極細胞に投与した場合でも、クロライドチャンネルが開き、最終的に脱感作を伴う電流応答が惹起されることが報告されている (Suzuki *et al.*, 1990; Han & Yang, 1999; Vaquero & Villa, 1999)。Long-Evans 系ラット網膜から単離した双極

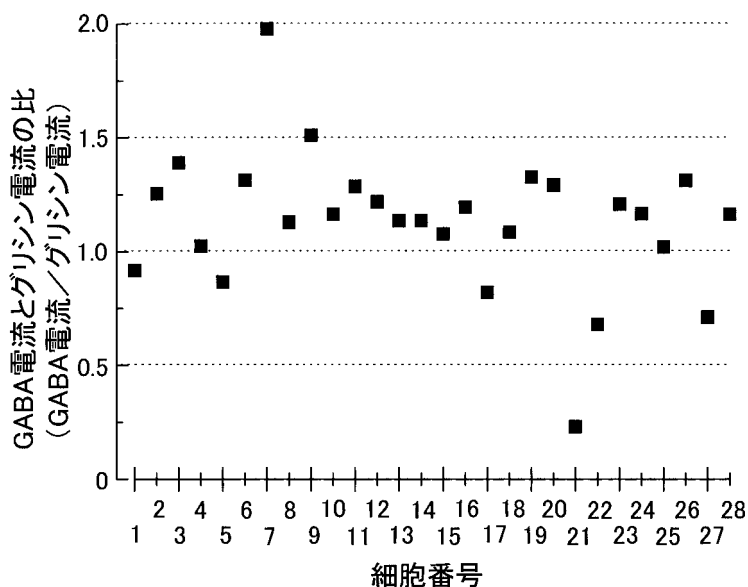


第 1 図 ラット網膜から単離した双極細胞の GABA 電流とグリシン電流

-50 mV に膜電位固定した 3 つの双極細胞に GABA (100 μ M) (A) とグリシン (200 μ M) (B) を投与し、電流応答 (内向き電流) を記録した。何れの細胞でも、グリシン投与において顕著な脱感作を示す電流応答が記録された。一方、GABA 投与により惹起された電流応答は、3 細胞間で振幅のみならず脱感作に大きな違いが観察された。

細胞でも、これら抑制性アミノ酸が電流応答を惹起するの否かを確かめるため、高濃度の GABA (100 μM) とグリシン (200 μM) を投与した。−50 mV に膜電位固定した双極細胞に対してこれらの抑制性アミノ酸を投与したところ、実験を行った総て (39細胞) において内向き電流が発生した。この中で、アミノ酸投与実験開始時に記録された電流応答 (電流振幅と応答波形) (Whole-cell voltage-clamp モードにより膜電流記録が可能となった時点から約 4 分後) と一連の実験終了後 (約 20 分後) に記録した電流応答に大きな変化が生じなかった 28 細胞をデータ解析に用いた。

GABA 電流とグリシン電流を比較するため、28細胞の中で特徴的な電流応答を示す 3 つの双極細胞を選び、示した (第 1 図)。この 3 細胞では、特に GABA 電流 (電流振幅と脱感作) に大きな差異が認められた。先ず、これらのアミノ酸投与に伴い双極細胞に惹起される電流応答の振幅に違いがあるの否かを調べるため、全細胞 (28細胞) を対象に最大値、最小値および平均値 (±標準偏差) を求め、比較した。GABA 電流の最大値は 1141 pA, 最小値は 121 pA そして平均値は 742.7 ± 289.4 pA, またグリシン電流の最大値は 1118 pA, 最小値は 233 pA そして平均値は 655.6 ± 237.0 pA であった。今回の実験条件 (両アミノ酸共に双極細胞に最大電流変化を惹起する濃度 ; GABA [100 μM] とグリシン [200 μM]) では、両



第 2 図 GABA 電流とグリシン電流の最大電流振幅の比較

−50 mV に膜電位固定した双極細胞に GABA (100 μM) あるいはグリシン (200 μM) を投与し、電流応答 (内向き電流) を記録した。それぞれの細胞において、GABA 電流とグリシン電流の最大電流振幅の比 (GABA電流/グリシン電流) を求め、グラフ化した (横軸に示した細胞番号については、第 3 図の説明を参照)。約 80% (28細胞のうち 22細胞) の双極細胞において、若干ではあるが、GABA 電流がグリシン電流を凌駕した。

アミノ酸電流の最大値，最小値および平均値に有意な差を見出すことができなかった。次に，両アミノ酸電流の振幅を個々の双極細胞において比較するため，それぞれの双極細胞に惹起されるグリシン電流と GABA 電流の最大値の比を求め，グラフ化した（第 2 図）（細胞番号については，第 3 図の説明を参照）。約 80%（28 例中 22 例）の双極細胞では，GABA 電流がグリシン電流を凌駕していた。

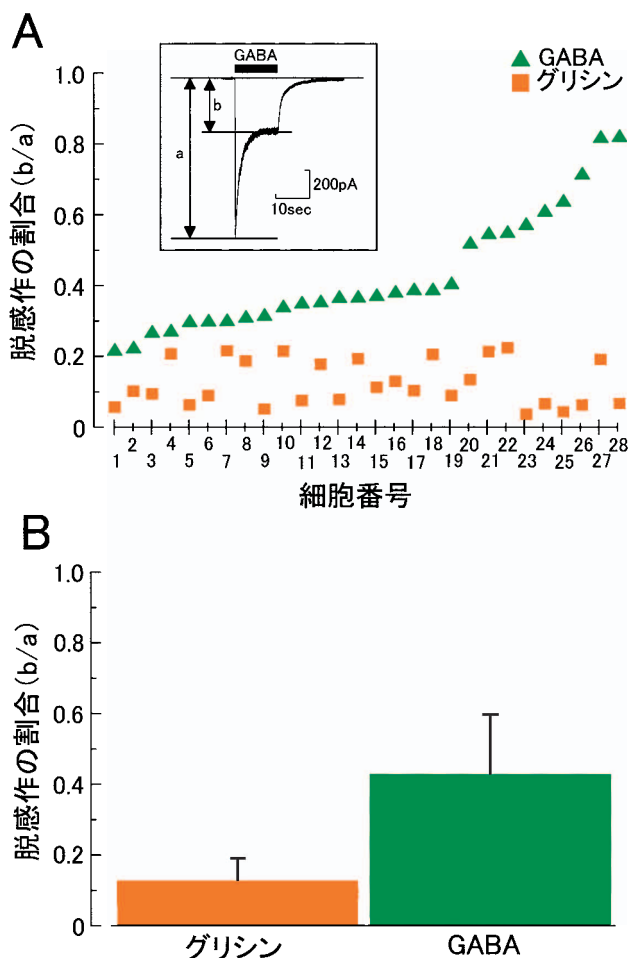
以上の結果は，Long-Evans 系ラット網膜双極細胞に GABA 受容体およびグリシン受容体が発現していること，そして GABA 電流発生に複数の GABA 受容体が関与している可能性があることを示している。

ラット網膜双極細胞の抑制性アミノ酸電流発生に関与する受容体

双極細胞には，二種類の GABA 受容体（GABA_A 受容体と GABA_C 受容体）が発現していることが報告されている（Feigenspan *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1997; Vaquero & Villa, 1999）。一般的に，GABA_A 受容体の活性化に伴い発生した電流応答は GABA_C 受容体の活性化に伴い発生した電流応答に比べて，⑦立ち上がりが早く，⑧脱感作が顕著であり，さらに⑨細胞外液から GABA を除去した際の電流回復も速いことが知られている（Han & Yang, 1999; Vaquero & Villa, 1999）。

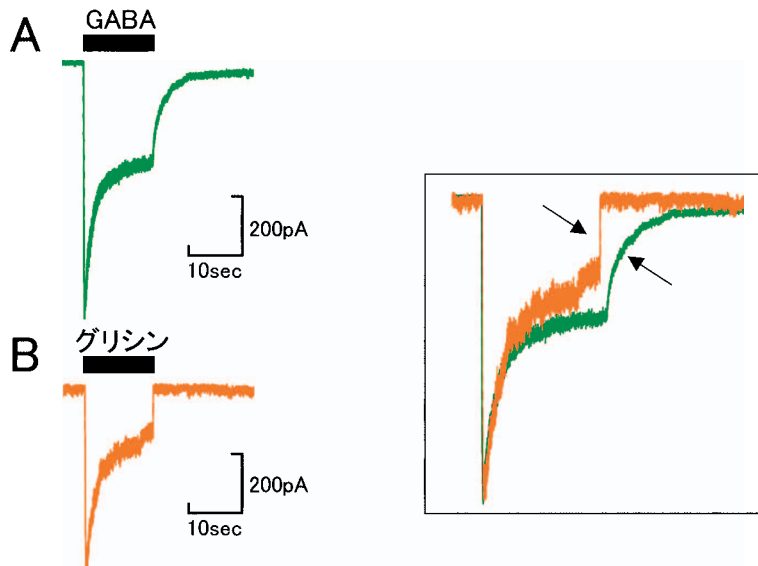
まず，Long-Evans 系ラット網膜から単離した双極細胞を用いて，GABA 電流およびグリシン電流の脱感作の程度（第 3 図）を調べた。GABA 電流およびグリシン電流共に，各アミノ酸投与直後に見られる最大電流値と投与 10 秒後の平坦部分の電流値の比を求め，グラフ化した（第 3 図）。緑色の▲は GABA 電流を，また橙色の■はグリシン電流の比を表している。第 3 図 A は，脱感作の最も顕著な GABA 電流を発生する細胞（すなわち，最大値と最小値の比が小さな細胞）を細胞番号 1 とし，脱感作の顕著でない細胞が大きな細胞番号になるように並べた。このグラフから明らかなように，グリシン電流では脱感作の程度が比較的一定であるのに対し，GABA 電流では脱感作の程度に大きな差が認められた。第 3 図 B には，GABA 電流とグリシン電流の脱感作の割合の平均値（±標準偏差）を示した（GABA 電流：0.428±0.170；グリシン電流：0.126±0.06）。

次に，細胞外液からアミノ酸を除去したときに観察される電流応答の回復過程を GABA とグリシンで比較した（第 4 図）。この実験では，GABA とグリシンの両アミノ酸投与で概ね同じ電流振幅と脱感作の様子を示す双極細胞を選定し，用いた。第 4 図 A（GABA 電流：緑色）と B（グリシン電流：橙色）の電流振幅が同じになるように調整（第 4 図の四角内の電流応答）し，各アミノ酸除去時の電流回復過程を比較した。GABA 電流の回復過程は，グリシン電流の回復過程に比べて著しく緩慢であった。第 1 図の 3 細胞の両アミノ酸電流を比較しても，GABA 電流の回復がグリシン電流に比べて緩やかであった。これまでに報告されて



第3図 GABA 電流とグリシン電流の脱感作の比較

A: -50 mV に膜電位固定した双極細胞に GABA ($100 \mu\text{M}$) あるいはグリシン ($200 \mu\text{M}$) を投与し、電流応答 (内向き電流) を記録した。アミノ酸投与直後の電流値 (最大値) (a) と電流発生開始10秒後の電流値 (b) の比を求め、この値を脱感作の割合としてプロットした。四角内には、GABA 電流応答における電流値の比 (すなわち、脱感作の割合) を求めるためのパラメーターを示した。電流値の比が小さいほど、脱感作が顕著であることを示している。この解析に用いた28細胞の GABA 電流の中で、脱感作の最も顕著な双極細胞 (すなわち、最大値と最小値の比が小さな細胞) を細胞番号1とし、脱感作の顕著でない細胞が大きな細胞番号になるように並べた。グリシン電流 (橙色の■) の脱感作が比較的一定であるのに対し、GABA 電流 (緑色の▲) の脱感作には大きな差が認められた。B: GABA 電流とグリシン電流の電流値の比 (b/a) の平均値 (±標準偏差) をプロットした (GABA電流: 0.428 ± 0.170 ; グリシン電流: 0.126 ± 0.06)。



第4図 GABA 電流とグリシン電流の応答特性

−50 mV に膜電位固定した双極細胞に GABA (100 μ M) あるいはグリシン (200 μ M) を投与し、電流応答 (内向き電流) を記録した。GABA 電流 (A) (緑色) とグリシン電流 (B) (オレンジ色) に対する電流応答が概ね同じ双極細胞を選定し、それぞれの電流応答波形を比較した。四角内には、GABA 電流とグリシン電流の最大値が一致するように調整し、両電流変化を重ねて表示した。両アミノ酸共に高濃度で投与したため、立ち上がりには有意な差は観察されなかった。内向き電流が最大電流応答から徐々に減少して行く過程 (脱感作過程) を見ると、両アミノ酸共に投与直後から約 4 秒間は比較的よく一致していた。それぞれのアミノ酸を細胞外液から除去した後の回復過程には明らかな相違が観察された。グリシン電流はグリシン除去後急速に回復したが、GABA 電流の場合の回復は緩徐であった。

いる研究成果を考慮すると、緩徐な GABA 電流の回復過程は GABA_A 受容体よりも GABA_C 受容体の不活性化過程を反映している可能性が高い。

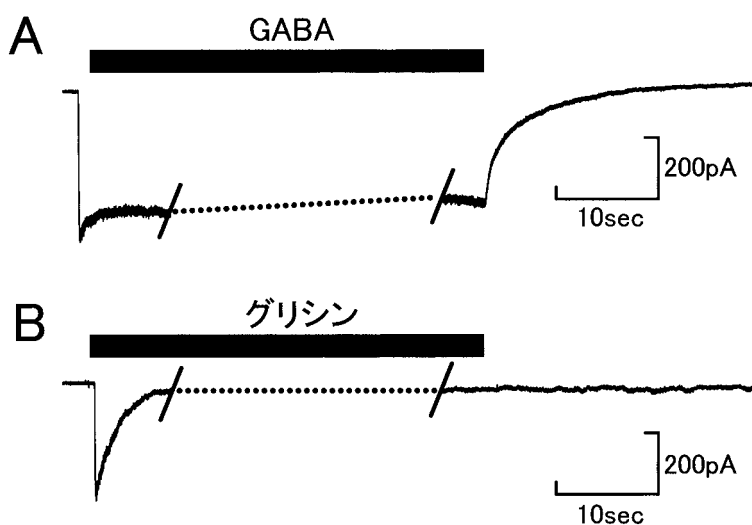
両アミノ酸共に高濃度で投与したため、各アミノ酸投与直後に惹起される電流応答の立ち上がり部に差を見出すことはできなかった。

以上の結果 (GABA 電流に見られる緩やかな脱感作および GABA 電流の緩やかな回復) は、GABA 電流発生に GABA_A 受容体のみならず GABA_C 受容体の活性化が含まれていることを示唆している。GABA_A 受容体が主に活性化すると細胞番号 1 から細胞番号 19 までに見られるような脱感作の顕著な電流応答が、また GABA_C 受容体が主に活性化すると細胞番号 20 以降に観察されるような脱感作のあまり見られない電流応答が発生すると推測される。

ラット網膜双極細胞に惹起される GABA 電流の起源

双極細胞の GABA 電流発生に GABA_C 受容体が関与している可能性を検討するため、長時間の GABA 投与実験を行った。GABA 電流の脱感作が顕著でない双極細胞を選定し、約 1 分間の GABA とグリシンの投与実験を実施した (第 5 図)。グリシン電流 (第 5 図 B) は投与後直ぐに脱感作し、電流変化が殆ど観察されなくなった。一方、GABA 電流 (第 5 図 A) は 1 分にも及ぶ投与にもかかわらず、投与直後と概ね同じ振幅の電流応答が維持された。

以上の結果は、双極細胞の GABA 電流発生に GABA_C 受容体が関与していることを強く示唆している。



第 5 図 GABA とグリシンの長期間投与に対する電流応答

−50 mV に膜電位固定した双極細胞に GABA (100 μM) あるいはグリシン (200 μM) を投与し、電流応答 (内向き電流) を記録した。短時間の GABA 投与で脱感作が殆ど認められない双極細胞を選定し、長時間 (約 1 分間) のアミノ酸投与を行った。グリシン電流の場合、脱感作のため約 1 分後に殆ど観察されなくなった (B)。しかし、GABA 電流の場合、1 分後でさえ投与開始直後と同程度の振幅の電流応答が維持された。GABA 投与を中断すると、緩やかに回復した (A)。

考 察

哺乳動物網膜双極細胞の光応答発生に必要な神経接続および神経回路

脊椎動物網膜の第二次神経細胞である双極細胞には、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、逆の応答パターンを示す OFF 中心型細胞がある (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)。視細胞（錐体と桿体）は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出しているため、双極細胞には ON 中心型および OFF 中心型の何れにも、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、ON 型と OFF 型とは全く異なるメカニズムを介して電位変化が発生していることが明らかになっている（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神経接続は下等脊椎動物（魚類、両生類および爬虫類）とは若干異なっている。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が、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ない。ON 中心型桿体双極細胞は、内網状層のサブラミナ b で A II 型アマクリン細胞と化学シナプスを介して結合している（Kolb & Famiglietti, 1974; Famiglietti & Kolb, 1975）。この A II 型アマクリン細胞は ON 中心型錐体双極細胞と電気シナプス結合（Mills & Massey, 2000; Feigenspan *et al.*, 2001）しているため、ON 中心型桿体双極細胞の出力は A II 型アマクリン細胞を経由して ON 中心型錐体双極細胞に伝播される。つまり、ON 中心型錐体双極細胞は錐体のみならず桿体の ON 中心型出力を神経節細胞に送っている。さらに、この A II 型アマクリン細胞は化学シナプス結合を介して抑制性出力（A II 型アマクリン細胞はグリシンを神経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に送っている（Sassoè-Pognetto *et al.*, 1994; Grünert & Wässle, 1996）。哺乳動物には OFF 中心型桿体双極細胞は存在しないが、A II 型アマクリン細胞からの抑制性出力が ON 中心型桿体双極細胞の電位応答の反転であるため、結果として OFF 中心型桿体双極細胞の応答が形成されたことになる。つまり、OFF 中心型錐体双極細胞は錐体のみならず桿体からシナプス伝達された OFF 中心型出力（ON 中心型出力の反転）を神経節細胞に送っている。

哺乳動物網膜双極細胞の GABA 受容体の種類

マウス網膜双極細胞のグリシンおよび GABA 感受性を調べる研究から、両アミノ酸の受容体が軸索終末部（神経節細胞やアマクリン細胞とのシナプス連絡部位）のみならず樹状突起

第1表 イオンチャンネル直結型 GABA 受容体の性質

生理学的, 薬理的および分子生物学的特長	GABA _A 受容体	GABA _C 受容体
GABA 受容体への GABA 結合能	低い	高い
開口するイオンチャンネル	クロライドチャンネル	クロライドチャンネル
応答の時間経過	一過性 (顕著な脱感作)	持続性
応答開始および終了の速度	速い	遅い
バルビツール酸およびベンゾジアゼピン感受性 (増強効果)	ある	なし
ピクロトキシン感受性 (抑制効果)	ある	ある
ピキュキュリン感受性 (抑制効果)	ある	なし
亜鉛イオン感受性 (抑制効果)	なし	ある
GABA 応答が発生する網膜内神経細胞の種類	視細胞, 双極細胞, アマクリン細胞	水平細胞, 双極細胞, アマクリン細胞, 神経節細胞
GABA 受容体を構成するタンパク質のサブユニット	$\alpha_1 \sim \alpha_6, \beta_1 \sim \beta_3, \gamma_1 \sim \gamma_3, \delta_1, \epsilon_1, \pi, \theta$	$\rho_1 \sim \rho_3$

部 (視細胞あるいは水平細胞 [?] とのシナプス結合部位), 細胞体および軸索部分に発現・分布していることが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 1990; Lukasiewicz *et al.*, 1994)。

双極細胞には二種類の GABA 受容体 (GABA_A 受容体と GABA_C 受容体) が発現していることが知られている (Feigenspan *et al.*, 1993; Han *et al.*, 1997; Vaquero & Villa, 1999)。これまでに報告された研究成果を総合すると, 二種類のイオンチャンネル直結型 GABA 受容体の諸性質は第1表のように纏められる。この表から, それぞれの GABA 受容体は分子生物学的, 生理学的および薬理的性質に大きな相違があることが読み取れる。双極細胞に惹起される GABA 電流が何れの受容体の活性化によるのかを知るには, 勿論この表にある項目を総て調査する必要があるが, 生理学的差異 (すなわち, 電流応答の時間経過 [開始時および終了時の電流] および脱感作の程度など) を比較するだけでも, GABA 電流が GABA_A 受容体あるいは GABA_C 受容体の何れの活性化に起因しているのかを推測することは可能である。この生理学的基準を用いれば, 第3図 A の脱感作が顕著な GABA 電流 (細胞番号 1 ~ 細胞番号19) は GABA_C よりも GABA_A 受容体の活性化を, また脱感作が小さいかあるいは殆ど認められない GABA 電流 (細胞番号20~細胞番号28) は GABA_A よりむしろ GABA_C 受容体の活性化を反映していると推測される。ただし, 双極細胞におけるこれら受容体の分布を明らかにするには, さらに緻密な解析が必要である。

双極細胞におけるクロライドイオンの平衡電位は, 「ON 中心型」と「OFF 中心型」とで異なっていることが報告されている (Satoh *et al.*, 2001)。この報告は, 抑制性アミノ酸の活性

化が必ずしも双極細胞を過分極させるとは限らないことを示唆している。さらに、細胞内のクロライドイオン濃度が細胞体部（樹状突起を含む）と軸索終末部とで異なる可能性、さらには細胞外イオン環境の変化に依存して異なる可能性も報告されている（Billups & Attwell, 2002）。両アミノ酸（グリシンと GABA）が双極細胞に何れの極性の応答を発生するのかを解明するには、さらに詳細な研究が必要である。

双極細胞の GABA 受容体とグリシン受容体の役割とは？

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（Yamashita & Wässle, 1991; Pan & Lipton, 1995）。これらの受容体の発現は、マウス網膜双極細胞と同様に、樹状突起部（外網状層）と軸索終末部（内網状層）に多いことが予想される（例えば、Suzuki *et al.*, 1990）。これまでに報告された研究成果から、哺乳動物網膜外網状層内にある水平細胞、および内網状層内にあるアマクリン細胞の一部は神経伝達物質として 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（Yazulla, 1986; Massey & Redburn, 1987; Marc, 1989; Poucho & Goebel, 1990; Kalloniatis & Tomisich, 1998）。内網状層内でアマクリン細胞と双極細胞が直接シナプス結合していること（例えば、AII アマクリン細胞と OFF 中心型錐体双極細胞）は広く認められているが、外網状層内で水平細胞と双極細胞がシナプス連絡しているか否かについては未だ明確な結論は得られていない。とはいえ、水平細胞やアマクリン細胞は樹上突起を外・内網状層内に広範に伸展していることから、これらの細胞と双極細胞とのシナプス連絡は主に受容野形成に関与していると考えられている。今後、双極細胞に発現する抑制性アミノ酸受容体（グリシン受容体、GABA_A 受容体および GABA_C 受容体）の機能を解明するため、①外網状層内でグリシンあるいは GABA を放出する神経細胞を特定すること、②水平細胞と双極細胞の間に化学シナプスがあるのか否かを明らかにすること、③アマクリン細胞の神経伝達物質を特定すること、④アマクリン細胞と双極細胞との間の化学シナプスを明らかにすること、などの解析を進める必要がある。

化学シナプス結合が無い場合でも、水平細胞やアマクリン細胞から広範に伸びた神経突起から放出された GABA やグリシンが拡散によって双極細胞の樹状突起部や軸索終末部などに到達し、それぞれの受容体を活性化する可能性がある。実際、水平細胞の GABA 放出については GABA トランスポーターの逆転によることが知られており、このため GABA は細胞全体から滲み出るように放出されると考えられている（Schwartz, 1982, 1987）。グリシンについても同様のメカニズムで細胞外に放出されるのであれば、拡散で双極細胞に到達し、電位変化を惹起することが予想される。これまでに、GABA やグリシン受容体の感受性が比較的高いこと、および双極細胞の細胞体や軸索にもこれらアミノ酸に対する感受性が認められる

ことなどが報告されており、これらを考慮すると、外網状層内ではシナプス部以外でもこれらの抑制性アミノ酸が機能している可能性が高い。今後、この点についても、さらに詳細な研究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.)*, **87**: 125–161.
- Billups, D. and Attwell, D. (2002), Control of intracellular chloride concentration and GABA response polarity in rat retinal ON bipolar cells, *J. Physiol.*, **545**: 183–198.
- Bormann, J. (1988), Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes, *Trends Neurosci.*, **11**: 112–116.
- Bormann, J., Hamill, O. P. and Sakmann, B. (1987), Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones, *J. Physiol. (Lond.)*, **385**: 243–286.
- Bowery, N. (1989), GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 401–407.
- Crooks, J. and Kolb, H. (1992), Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina, *J. Comp. Neurol.*, **315**: 287–302.
- Davanger, S., Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1991), Glutamate, GABA and glycine in the human retina: An immunocytochemical investigation, *J. Comp. Neurol.*, **311**: 483–494.
- Dong, C.-J. and Werblin, F. S. (1995), Zinc downmodulates the GABA_C receptor current in cone horizontal cells acutely isolated from the catfish retina, *J. Neurophysiol.*, **71**: 916–919.
- Drew, C. A., Johnston, G. A. R. and Weatherby, R. P. (1984), Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (–)-baclofen to rat cerebellar membranes, *Neurosci. Lett.*, **52**: 317–321.
- Du, J.-L. and Yang, X.-L. (2000), Subcellular localization and complements of GABA_A and GABA_C receptors on bullfrog retinal bipolar cells, *J. Neurophysiol.*, **84**: 666–676.
- Enz, R., Brandstätter, H., Wässle, H. and Bormann, J. (1996), Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina, *J. Neurosci.*, **16**: 4479–4490.
- 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., Wässle, H. and Bormann, J. (1993), Pharmacology of GABA receptor Cl[–] channels in rat retinal bipolar cells, *Nature*, **361**: 159–162.
- 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.
- Greferath, U., Brandstätter, J. H., Wässle, H., Kirsch, J., Kuhse, J. and Grünert, U. (1994), Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: A study using immunocytochemistry and *in situ* hybridization, *Vis. Neurosci.*, **11**: 721–729.
- Grünert, U. and Wässle, H. (1993), Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina, *J. Comp. Neurol.*, **335**: 523–537.
- 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.
- Han, M.-H. and Yang, X.-L. (1999), Zn²⁺ differentially modulates kinetics of GABA_C VS GABA_A receptors in carp retinal bipolar cells, *NeuroRep.*, **10**: 2593–2597.
- Han, M.-H., Li, Y. and Yang, X.-L. (1997), Desensitizing GABA_C receptors on carp retinal bipolar cells,

- NeuroRep., **8**: 1331–1335.
- Jentsch, T. J., Stein, V. Weinreich, F. and Adebik, A. A. (2001), Molecular structure and physiological function of chloride channels, *Physiol. Rev.*, **82**: 503–568.
- Johnston, G. A. (1996), GABA_A receptor pharmacology, *Pharmacol. Ther.*, **69**: 173–198.
- Johnston, G. A. R., Curtis, D. R., Beart, P. M., Game, C. J. A., McCulloch, R. M. and Twitchin, B. (1975), Cis- and *trans*-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation, *J. Neurochem.*, **24**: 157–160.
- Kaneda, M., Mochizuki, M., Aoki, K. and Kaneko, A. (1997), Modulation of GABA_C response by Ca²⁺ and other divalent cations in horizontal cells of the catfish retina, *J. Gen. Physiol.*, **110**: 741–747.
- 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.
- Kollonitsis, M. and Tomisich, G. (1998), Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina, *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**: 811–866.
- Legendre, P., Muller, E., Badiu, C. I., Meier, J., Vannier, C. and Triller, A. (2002), Desensitization of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor increases with receptor density, *Mol. Pharmacol.*, **62**: 817–827.
- Lewis, T. M., Schofield, P. R. and McClellan, M. L. (2002), Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor, *J. Physiol.*, **549**: 361–374.
- Lukasiewicz, P. D., Maple, B. R. and Werblin, F. S. (1994), A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina, *J. Neurosci.*, **14**: 1202–1212.
- MacDonald, R. I. and Olsen, R. W. (1994), GABA_A receptor channels, *Ann. Rev. Neurosci.*, **17**: 569–602.
- Marc, R. E. (1989), The role of glycine in the mammalian retina, *Prog. Retin. Res.*, **8**: 67–107.
- Massey, S. C. and Redburn, D. A. (1987), Transmitter circuits in the vertebrate retina, *Prog. Neurobiol.*, **28**: 55–96.
- 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.
- 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.
- 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.
- Poucho, R. G. and Goebel, D. J. (1990), Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina, In *Glycine Neurotransmission*, ed. Ottersen O. P. & Strom-Marhisen, J., pp 355–389, Wiley, Chichester.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shiver, D. B., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. and Seeburg, P. H.

- (1989), Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology, *Nature*, **338**: 582–586.
- 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.
- Sassaø-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.
- Satoh, H., Kaneda, M. and Kaneko, A. (2001), Intracellular chloride concentration is higher in rod bipolar cells than in cone bipolar cells of the mouse retina, *Neurosci. Lett.*, **310**: 161–164.
- Schonrock, B. and Bormann, J. (1993), Functional heterogeneity of hippocampal GABA_A receptors, *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 1042–1049.
- 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.
- Semyanov, A. V. (2002), GABA-ergic inhibition in the CNS: Types of GABA receptors and mechanisms of tonic GABA-mediated inhibitory action, *Neurophysiol.*, **34**: 71–80.
- 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.
- 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.
- 高橋恭一 (2005), ラット網膜双極細胞に対する ATP の作用, *人間環境学研究*, **3**: 1–15.
- Vaquero, C. F. and Villa, P. (1999), Localization of the GABA_C receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina, *Neurosci. Res.*, **35**: 1–7.
- 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.
- 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.
- Yazzula, S., (1986), GABAergic mechanism in the retina, *Prog. Retn. Res.*, **5**: 1–52.