

# トランプサンショウウオ網膜視細胞に発現するカルシウム チャネルの細胞内水素イオンによる修飾

高橋 恭一  
(受付 2005 年 9 月 28 日)

## 序 論

脊椎動物網膜視細胞は、錐体と桿体の二種類に分類される。錐体は光感受性が低く昼光視（昼間の視覚 [色覚を含む]）に、また桿体は光感受性が高く薄明視（夕方及び夜間の視覚）に関与している。錐体では外節の細胞膜が内側に折り畳まれ層状構造をなし、この層状構造部に錐体視物質が存在している。一方、桿体では外節内に二重膜円盤が多数重なり層状構造を形成し、この円盤膜上に桿体視物質（ロドプシン）が存在している。

視細胞での光感受のメカニズムは、桿体でよく調べられている。光が桿体円盤膜上にあるロドプシンにヒットすると、光化学反応（フォトロドプシン→バソロドプシン→ルミロドプシン→メタロドプシンⅠ→メタロドプシンⅡ）が進行する。これら中間体の中でメタロドプシンⅡは、円盤膜上にあるトランスデューシン（Guanosine 5'-triphosphate[GTP] 結合タンパク質）を活性化する。活性化したトランスデューシンは、次にホスホジエステラーゼを活性化し、外節内に存在する cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) を Guanosine 5'-monophosphate (5'GMP) に分解する（例えば, Kawamura, 1993, 1994）。桿体の外節膜には、細胞内 cGMP 濃度の増減に伴い開閉するナトリウムチャネル（cGMP 依存性イオンチャネルあるいは光感受性イオンチャネルとも呼ばれる）が存在する。暗時には外節内に多量の cGMP が存在するためチャネルが開口状態にあり、ナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) が電気化学的勾配に従い細胞外から内に流入するため、桿体は脱分極している。光受容に伴い外節内の cGMP が分解され、その濃度が低下するため、このチャネルは閉塞し、 $\text{Na}^+$  の流入が減少あるいは消失する。このため、桿体は過分極する（例えば, Pugh & Lamb, 1990, 1993; Kawamura, 1993, 1994）。錐体でも、桿体と同様のメカニズムで光信号が電気信号に変換されると考えられている（Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994）。

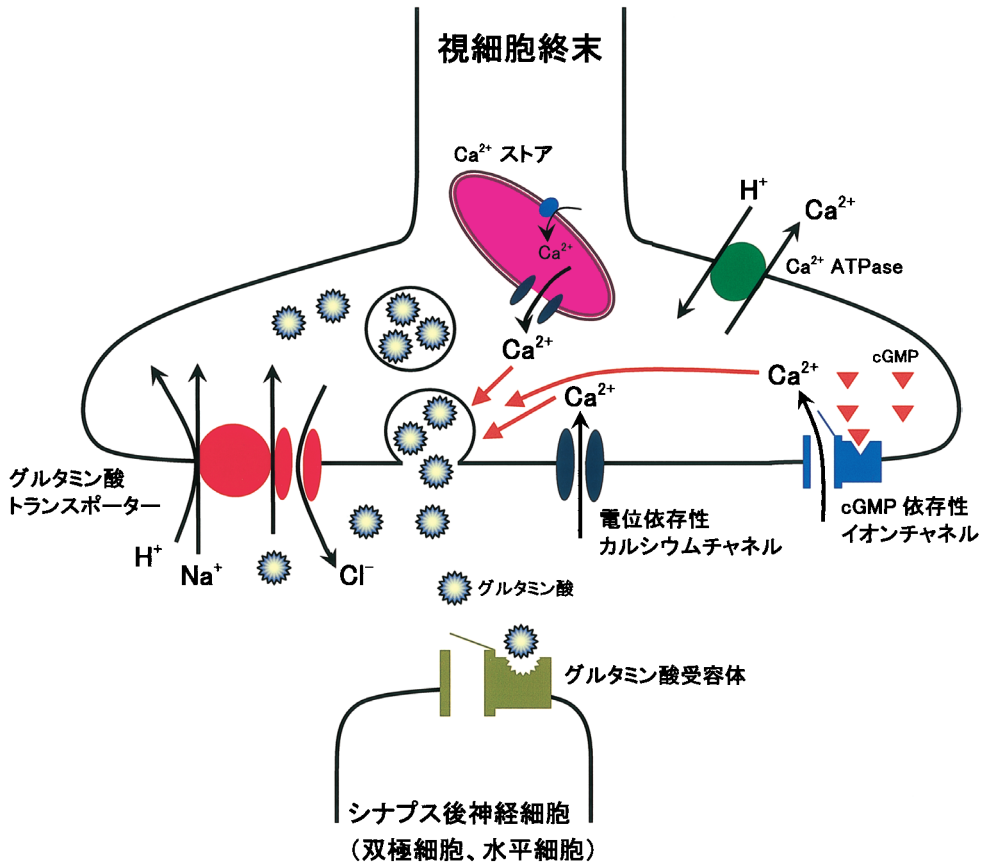
明暗に伴い視細胞外節部で惹起された電位変化は、内節に存在するカルシウムチャネル、h（内向き整流性）チャネル、カルシウム依存性カリウムチャネルやカルシウム依存性クロライドチャネルによって修飾（Bader *et al.*, 1979; Attwell & Wilson, 1980; Fain *et al.*, 1978a,

1978b, 1980a, 1980b; Takahashi, 1986; Barnes, 1994) され、シナプス終末に到達する。この電位変化が、シナプス終末から放出されるグルタミン酸量の増減に影響する (Trifonov, 1968; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995)。

視細胞から放出されるグルタミン酸量は脱分極 (暗時) で増加, そして過分極 (明時) で減少する (例えば, Copenhagen & Jahr, 1989)。明暗条件の変化に伴って生じる視細胞の膜電位変化が細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の濃度変化を惹起し, この変化が視細胞終末から放出されるグルタミン酸量に反映される。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる仕組みとして, 電位依存性カルシウムチャネルが有力である。暗時の脱分極が視細胞終末部のカルシウムチャネルを活性化 (開口) し, このチャネルを通じて流入する  $\text{Ca}^{2+}$  がグルタミン酸放出を促すと考えられている。また, 視細胞内節に発現する cGMP 依存性イオンチャネルも細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を供給する経路として機能していることが報告されている (Rieke & Schwartz, 1996)。これらに加え, 最近, 視細胞 (内節) 内に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  ストア (小胞体やミトコンドリア) ならびに視細胞内節の細胞膜に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase が, 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に重要な役割を演じていることも明らかになってきた (Krizaj & Copenhagen, 1998; Krizaj *et al.*, 1999; 2003)。これらの知見を総合すると, 電位依存性カルシウムチャネル, cGMP 依存性イオンチャネル, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアそして  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase が協同して細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を制御し, 視細胞終末から放出される伝達物質量を調整している可能性が高い (第 1 図参照)。

視細胞から放出されたグルタミン酸は細胞間隙を拡散し, 第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にあるシナプス受容体 (水平細胞と OFF 中心型双極細胞ではイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体; ON 中心型双極細胞では代謝調節型グルタミン酸受容体) に到達・結合し, これらの神経細胞に電位応答を惹起する (Murakami *et al.*, 1972; Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Murakami & Takahashi, 1987, 1991; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995; Sasaki & Kaneko, 1996)。視細胞から放出されたグルタミン酸は, 視細胞と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細胞内に取り込まれ, シナプス間隙 (細胞外) から除去される (Marc & Lam, 1981; Barbour *et al.*, 1991; Tachibana & Kaneko, 1988; Sarantis *et al.*, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof & Jahr, 1996; Picaud *et al.*, 1996a, 1996b; Schultz & Stell, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, 1998b)。視細胞とミュラー細胞に取り込まれたグルタミン酸は, 再利用されると考えられている。

本研究では, 視細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の供給経路の一つであるカルシウムチャネルの



第1図 脊椎動物網膜視細胞の終末内カルシウムイオン濃度の調節に関するメカニズム

視細胞終末には、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に関与する四種類のメカニズム（電位依存性カルシウムチャネル、cGMP-依存性イオンチャネル細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストア、細胞膜に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase）が備わっている。これらのメカニズムは協調して働き、細胞内（細胞質）の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節していると推測される（Krizaj *et al.*, 1999; 2003）。

視細胞終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に伴い放出されたグルタミン酸は双極細胞と水平細胞に発現するグルタミン酸受容体に結合し、電位応答を惹起する。同時に、視細胞あるいは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って速やかに回収され、細胞外から除去される。視細胞やミュラー細胞に取り込まれたグルタミン酸は、再利用される。

活性調節について検討した。その結果、トランプサンショウウオ網膜視細胞（桿体と錐体）に発現する高閾値型カルシウムチャネルは、①細胞内水素イオン濃度（pH）変化による影響を受けること、また②視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸を取り込む際生じる細胞内酸性化によって抑制されること、が示唆された。

## 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。トラフサンショウウオを約 2 時間暗順応した後、断頭し、眼球を摘出した。前眼部、水晶体及び硝子体を除去した後、網膜を剥離した。剥離網膜作成後、操作は室内燈による照明下で行った。この条件下で、視細胞外節の光感受性イオンチャネル (cGMP 依存性イオンチャネル) は完全に閉塞していると考えられる。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  $\mu$ 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、単離視細胞を得た (Tachibana, 1981)。視細胞を含む懸濁液 (浮遊液) 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して、実験を開始した。

トラフサンショウウオ網膜の視細胞は、形態学的に桿体二種類と錐体四種類に分類されている (Mariani, 1986)。細胞の大きさや形態の特長から、網膜から単離した視細胞の分類は容易であった。本実験では、桿体 (Red rod) とサイズの大きな錐体 (Large single cone) を使用した。視細胞の付着した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、標準リンガー液を細胞から約 200  $\mu$ m の距離に置いた Y-tube (直径 150  $\mu$ m) を用いて常時灌流した。

### (1) 膜電流導出法

電流導出時の標準リンガー液組成は、70.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 2.5 mM 塩化カリウム (KCl), 10.0 mM 塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ), 2.0 mM 塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ), 30.0 mM Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 10.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。外向き整流性カリウムチャネルを抑制するため、 $\text{TEA}^+$  を加えた。第 5 図の実験では、高閾値型カルシウム電流を増強するため、標準リンガー液のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) をバリウムイオン ( $\text{Ba}^{2+}$ ) (バリウムリンガー液) に置換し、視細胞を灌流した。バリウムリンガー液の組成は、70.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10.0 mM 塩化バリウム ( $\text{BaCl}_2$ ), 30.0 mM TEA-Cl, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。細胞内 pH を変えるため、アンモニウムパルス法を用いた。この方法を実施するため、20 mM の塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) をリンガー液に添加し視細胞を灌流した (アンモニウムリンガー液)。アンモニウムリンガー液中の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  はアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) とクロライドイオン ( $\text{Cl}^-$ ) に解離する。さらに、 $\text{NH}_4^+$  はアンモニア ( $\text{NH}_3$ ) と水素イオン ( $\text{H}^+$ ) に解離する。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_3$

は細胞内に移動し、細胞内で  $\text{NH}_3$  は  $\text{H}^+$  と反応して  $\text{NH}_4^+$  を形成する。このため、アンモニウムリンガー液灌流中は  $\text{H}^+$  が減少し、細胞内はアルカリ化する。 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を洗い流す（アンモニウムリンガー液から標準リンガー液に戻す）と、細胞内で  $\text{NH}_4^+$  は解離し、 $\text{NH}_3$  と  $\text{H}^+$  になる。最初に細胞内に移動した  $\text{NH}_4^+$  のみならず細胞内で形成された  $\text{NH}_4^+$  も解離するため、 $\text{H}^+$  の生成量はアンモニウムリンガー液灌流前よりも多くなり、結果として細胞内は酸性化する。残った  $\text{NH}_3$  は細胞外に排出される。アンモニウムリンガー液の組成は 50.0 mM NaCl, 20.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.5 mM KCl, 10.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30.0 mM TEA-Cl, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。カルシウム電流を抑制するため、標準リンガー液あるいはバリウムリンガー液にカドミウムイオン ( $\text{Cd}^{2+}$ ; 0.1 mM) を加えた。何れのリンガー液も、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH7.6 に調整した。薬品類は浸透圧を考慮せずに、リンガー液に添加し、Y-tube で投与した。

パッチ電極内液の組成は、85.0 mM 塩化セシウム ( $\text{CsCl}$ ), 30.0 mM TEA-Cl, 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10.0 mM Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 0.5 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 1.0 mM HEPES であった。h チャネル活性及び外向き整流性カリウムチャネル活性を抑えるため、パッチ電極内液にセシウムイオン ( $\text{Cs}^+$ ) と  $\text{TEA}^+$  を加えた。細胞内水素イオン濃度（細胞内 pH）の変化を容易にするため、パッチ溶液の HEPES は低濃度に抑えた。パッチ電極内液の pH は、1N-水酸化セシウム ( $\text{CsOH}$ ) を用いて pH7.2 に調整した。

Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、視細胞を膜電位固定し電流記録を行った (Hamil *et al.*, 1981)。パッチ電極は縦型微小電極製作器 (PP83, Narishige Scientific Instrument Lab.) を用いて、Borosilicate 性ガラス管 (02-668-68, Fisher Scientific) から作製した。電極抵抗は 5 M $\Omega$ ~10 M $\Omega$  であった。視細胞の膜電流は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) を使い、2 KHz (4 次ベッセルフィルター) のフィルターを介してオシロスコープで観察した。同時に 10 KHz でデジタル化 (Labmaster DMA, Scientific Solution) してコンピューターに記録した。電流解析には、Origin V5.0 (Microcal Software Inc.) を用いた。

## (2) 細胞内 pH 導出法

細胞内 pH 記録における標準リンガー液の組成は、100.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。細胞内 pH を変化させるため、アンモニウムパルス法を用いた。(1) 電流導出法で示したように、20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  をリンガー液に添加し視細胞を灌流した (アンモニウムリンガー液)。アンモニウムリンガー液の組成は 80.0 mM NaCl, 20.0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.0 mM KCl, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ ,

2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。何れのリンガー液も, 1N-NaOH により pH7.6 に調整し用いた。薬品類はリンガー液の浸透圧を考慮せずに, リンガー液に添加し, Y-tube で投与した。

単離した視細胞 (桿体および錐体) 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) を含む標準リンガー液中に視細胞を 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。測定は視細胞内節の中心部分の直径 30 μm の円形部で行った。バンドパスフィルターを用いて 440 nm (Omega Optical, Inc.) と 490 nm (Omega Optical, Inc.) の波長光を 200 msec 間視細胞に照射し, 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.) で積算・検出し, 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。本実験では, nigericin 法を用いてこの比を細胞内 pH に換算しなかった。データ処理は, Excel 2003 (Microsoft Co.) で行った。

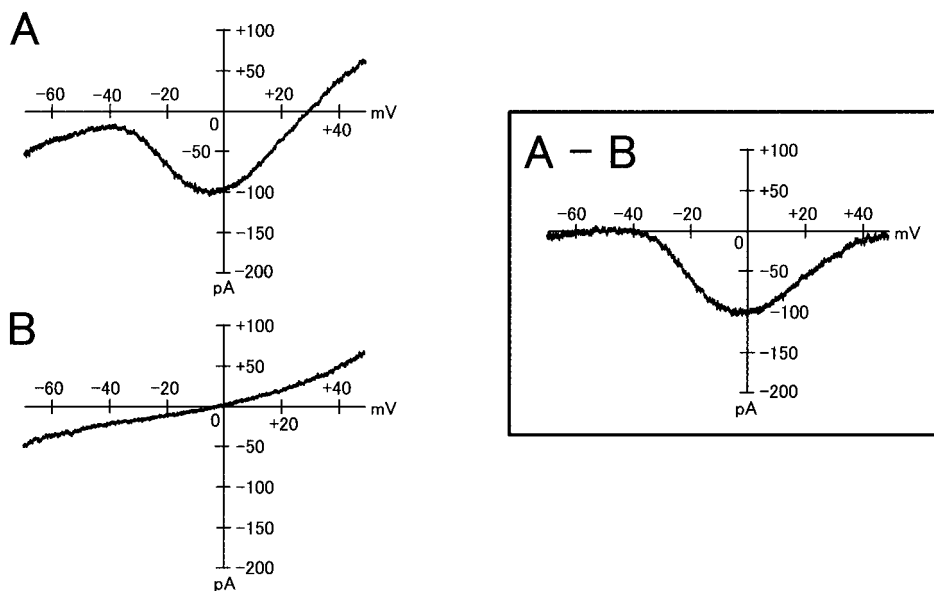
薬品類の多くは, Sigma Chemical Co. から購入した。また, 視細胞単離に利用した Papain は Worthington Biochemical Co. から購入した。

## 実 験 結 果

### 視細胞のカルシウムチャネル

視細胞には高閾値型カルシウムチャネルが発現していることが知られている (例えば, Maricq & Korenbrot, 1988; Barnes & Hills, 1989; Lasater & Witkovsky, 1991; Taylor & Morgans, 1998)。先ず, トラフサンショウウオ網膜から単離した視細胞にカルシウムチャネルが発現しているのか否か, さらにこのカルシウムチャネルがどのような生理学的性質 (活性化電位や電流値など) を有しているのか, について調べた。標準リンガー液灌流下で, -90 mV に膜電位固定した桿体に鋸刃状の電位変化 (-70 mV ~ +50 mV ; 70 mV/sec の速さ) を与え, このときに発生する電流変化を記録した (第 2 図)。-35 mV 付近で活性化し, -5 mV 付近にピークを持つ内向き電流 (ピーク電流値: 約100 pA) が惹起された (第 2 図 A)。この電流がカルシウムチャネルの活性化の結果発生したことを確かめるため, カドミウムイオン (Cd<sup>2+</sup>: カルシウムチャネル阻害剤) (0.1 mM) を標準リンガー液に添加し桿体に投与した。-70 mV から +50 mV までの鋸刃状電位変化を桿体に与えても, 内向き電流は観察されなかった (第 2 図 B)。すなわち, Cd<sup>2+</sup> 存在下で内向き電流は抑制され, リーク電流のみが認められた。標準リンガー液で惹起された内向き電流から Cd<sup>2+</sup> 存在下で惹起されたリー

トランプサンショウウオ網膜視細胞に発現するカルシウムチャネルの細胞内水素イオンによる修飾



第 2 図 桿体に惹起されるカルシウム電流

A：標準リンガー液灌流下で、 $-90\text{ mV}$  に膜電位固定した桿体に鋸刃状の電位変化 ( $-70\text{ mV} \sim +50\text{ mV}$ ;  $70\text{ mV/sec}$  の速さ) を与え、このときに発生する電流変化を記録した。 $-35\text{ mV}$  付近で活性化し、 $-5\text{ mV}$  付近にピークを持つ内向き電流が惹起された。B：惹起された電流がカルシウムチャネルの活性化によることを確かめるため、カドミウムイオン ( $\text{Cd}^{2+}$ ：カルシウムチャネル阻害剤) ( $0.1\text{ mM}$ ) を標準リンガー液に添加し投与した。 $-70\text{ mV}$  から  $+50\text{ mV}$  までの鋸刃状電位変化を桿体を与えても、内向き電流は惹起されず、リーク電流のみが観察された。標準リンガー液で惹起された電流応答から  $\text{Cd}^{2+}$  存在下で惹起されたリーク電流を差し引き、桿体に発生する正味のカルシウム電流を求めた (四角で囲まれた挿入図)。ピーク電流値は、約  $100\text{ pA}$  であった。

以上の結果は、高閾値型カルシウムチャネルが視細胞膜に発現していることを示している。

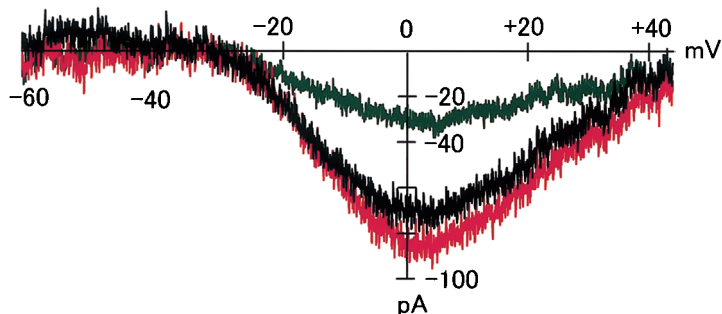
ク電流を差し引き、桿体に発生する正味のカルシウム電流を求め、観察した (第 2 図の四角で囲まれた挿入図)。桿体と同様に、錐体でも  $\text{Cd}^{2+}$  で抑制される内向き電流 (カルシウム電流) が惹起された。桿体と錐体に発生する内向き電流を比較しても、活性化電位やピーク電流値などに顕著な差異は認められなかった。32細胞 (桿体21と錐体11) の実験結果から活性化電位、ピーク電流値およびピーク電流値を示す電位の平均 ( $\pm$ 標準偏差) を求めると、それぞれ  $-38.96 \pm 5.13\text{ mV}$ 、 $56.91 \pm 18.40\text{ pA}$ 、そして  $-4.78 \pm 4.11\text{ mV}$  であった。

以上の結果は、高閾値型カルシウムチャネルが視細胞膜に発現していることを示している。

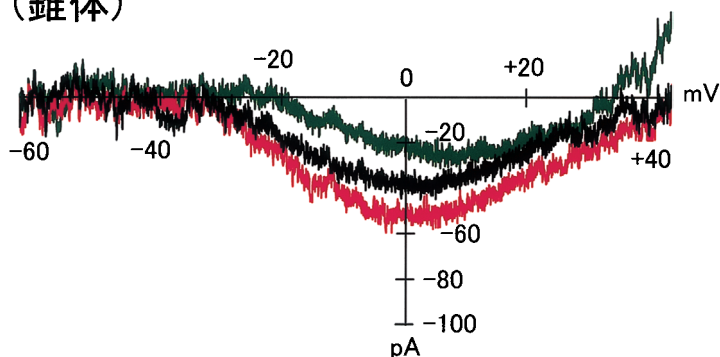
### カルシウムチャネルの細胞内 pH 依存性

網膜内神経細胞に発現する高閾値型カルシウムチャネルは、細胞内および細胞外の水素イオン濃度 (pH) 変化によってその活性が修飾されることが報告されている (例えば, Barnes

## A (桿体)



## B (錐体)



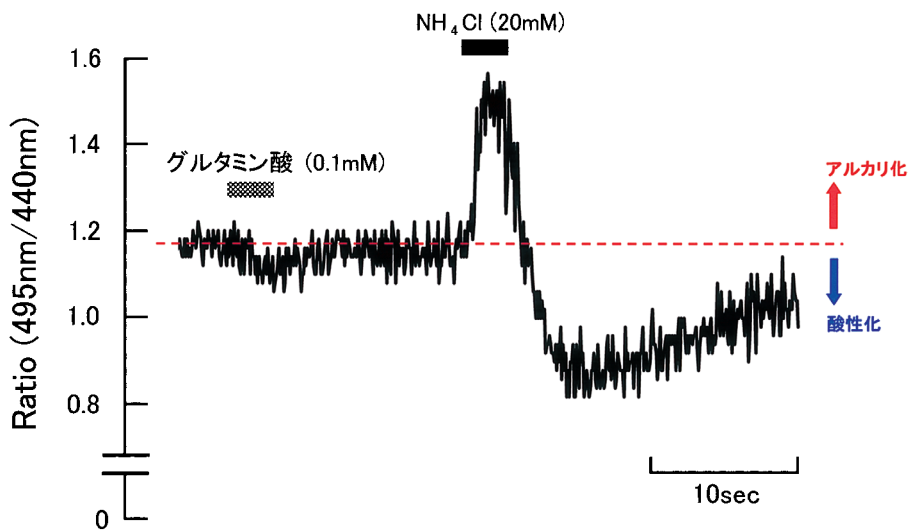
第3図 視細胞に惹起されるカルシウム電流の細胞内 pH 依存性

A: 視細胞内の水素イオン濃度 (pH) を変化させるため、アンモニウムパルス法を用いた (第4図参照)。標準リンガー液中あるいはアンモニウムリンガー液中で惹起された電流応答から  $\text{Cd}^{2+}$  (0.1 mM) 添加後に惹起されるリーク電流を差し引いて得られる正味のカルシウム電流を求め、比較に利用した。標準リンガー液の灌流中、カルシウム電流のピーク電流値 (0 mV 付近) は 75 mV であった (黒色の電流記録)。標準リンガー液をアンモニウムリンガー液に置換して2分後に、電流変化を記録した。ピーク電流は 90 mV にまで増加していた (赤色の電流記録)。アンモニウムリンガー液を標準リンガー液に戻すと、ピーク電流値は 35 mV にまで減少した (緑色の電流記録)。B: A と同様の実験を錐体で実施した。標準リンガー液灌流中、ピーク電流値 (+5 mV 付近) は 40 mV であった (黒色の電流記録)。標準リンガー液をアンモニウムリンガー液に置換して2分後に記録したピーク電流は、55 mV に増加していた (赤色の電流記録)。アンモニウムリンガー液を標準リンガー液に戻すと、ピーク電流値は 25 mV にまで減少した (緑色の電流記録)。アンモニウムリンガー液の灌流によって細胞内がアルカリ化し、これを除去することによって細胞内が酸性化すること (第4図参照) を考慮すると、視細胞 (桿体と錐体) の高閾値型カルシウム電流はアルカリ化で増強、酸性化で減弱したことを示唆している。

以上の結果は、視細胞の高閾値型カルシウムチャンネルが細胞内 pH 依存性を示すことを示している。



& Bui, 1991; Takahashi *et al.*, 1993; Hirasawa & Kaneko, 2003)。本実験では、視細胞（桿体および錐体）に発現する高閾値型カルシウムチャネルが細胞内 pH 変化の影響を受けるのか否かを検討した（第 3 図）。視細胞内 pH を変化させるため、視細胞にアンモニウムパルス法を適用した（第 4 図参照）。第 2 図に示したように、本実験では標準リンガー液中あるいはアンモニウムリンガー液中で惹起された電流応答から  $\text{Cd}^{2+}$  (0.1 mM) 添加後に見られるリーク電流を差し引いて得られる正味のカルシウム電流を求め、比較した。先ず、桿体のカルシウムチャネルの細胞内 pH に対する依存性を調べた（第 3 図 A）。標準リンガー液灌流中、カルシウム電流のピーク電流値（0 mV 付近の内向き電流値）は 75 mV であった（第 3 図 A；黒色の電流記録）。アンモニウムリンガー液を灌流して 2 分後、電流変化を記録したところ、ピーク電流は 90 mV に増加していた（第 3 図 A；赤色の電流記録）。アンモニウムリンガー液から標準リンガー液に戻すと、ピーク電流値は 35 mV にまで減少した（第 3 図 A；緑色の電流記録）。アンモニウムリンガー液灌流によって細胞内がアルカリ化し、またこの除去によって細胞内が酸性化すること（第 4 図参照）を考慮すると、桿体の高閾値型カルシウム電



第 4 図 グルタミン酸投与に伴う桿体の酸性化

標準リンガー液にグルタミン酸 (0.1 mM) を添加し桿体に投与すると、細胞内が酸性化した。グルタミン酸を洗い流すと、元の pH レベルまで回復した。この桿体の細胞内 pH 調節機構が正常に機能していることを確かめる目的で、アンモニウムパルス法を用い細胞内 pH 変化の推移を調べた。アンモニウムリンガー液を灌流するとアルカリ化が、またこれを洗い流すと酸性化が生じた。部分的にはあるが、酸性化からの回復も観察された。アンモニウムパルス法を用いた実験結果は、この桿体の細胞内 pH 調節機構が正常に機能していることを示している。従って、グルタミン酸による細胞内酸性化は生理的応答であると考えられる。

以上の結果は、桿体のグルタミン酸トランスポーターを介してグルタミン酸を取り込む際、細胞内が酸性化することを示している。

流はアルカリ化で増強、酸性化で減弱したと考えられる。同様の実験を錐体でも実施した（第3図B）。桿体と同様に、カルシウム電流はアルカリ化で増強（第3図B；赤色の電流記録）、そして酸性化で減弱（第3図B；緑色の電流記録）した。これらの実験は、桿体で4例、そして錐体で1例成功した。何れの細胞でも電流振幅に程度の差が認められたものの、カルシウム電流がアルカリ化で増強、酸性化で減弱する点は一致していた。本実験では、細胞内pH変化がカルシウム電流の活性化電位に影響することは無かった。

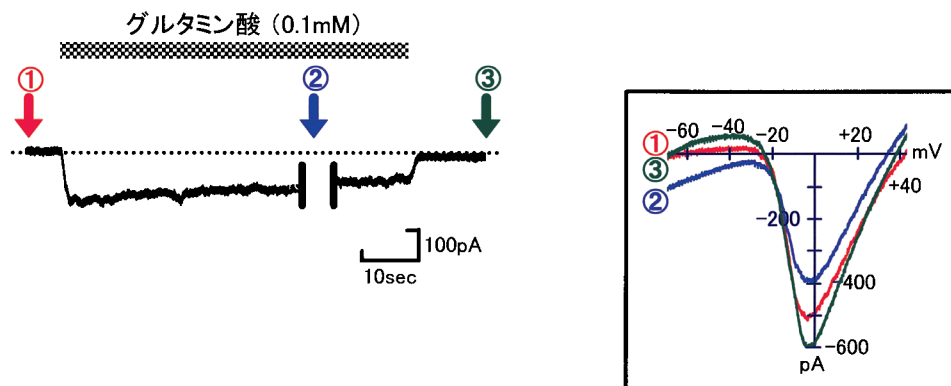
以上の結果は、視細胞の高閾値型カルシウムチャンネルが細胞内pH依存性を示すことを示している。

#### 視細胞によるグルタミン酸の回収とカルシウムチャンネルの関係

視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターは、放出されたグルタミン酸を速やかに細胞内に取り込み（回収）、細胞外のグルタミン酸濃度を低下させる（例えば、Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993）。このトランスポーターはグルタミン酸を取り込むために、細胞内外の $\text{Na}^+$ のエネルギー（濃度）勾配を利用している。グルタミン酸の取り込みの際 $\text{Na}^+$ が共輸送されるため、内向き電流が発生する。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の場合、グルタミン酸を取り込む際 $\text{Na}^+$ に加え $\text{H}^+$ も共輸送されるため、細胞内が酸性化することが知られている（Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; 高橋, 2003）。

まず、視細胞のグルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸を取り込む際、視細胞内pH変化を伴うのか否かを調べた（第4図）。標準リンガー液にグルタミン酸（0.1 mM）を添加し桿体に投与すると、僅かではあるが細胞内が酸性化した。グルタミン酸を洗い流すと、元のpHレベルに回復した。この桿体の細胞内pH調節機構が正常に機能していることを確かめる目的で、アンモニウムパルス法を用い細胞内pH変化の推移を調べた。標準リンガー液をアンモニウムリンガー液に換えるとアルカリ化が、アンモニウムリンガー液を標準リンガー液に戻すと酸性化が見られた。また、完全ではないが、酸性化からの回復も観察された。従って、この桿体の細胞内pH調節機構は正常であり、グルタミン酸投与で生じた酸性化ならびにこれを洗い流すことによって観察された回復は生理的応答であると考えられる。グルタミン酸の投与実験は15細胞で実施し、この中の4例に微弱な酸性化（錐体2例、桿体1例）が認められた。

次に、グルタミン酸の取り込みに伴い発生する視細胞の酸性化が、カルシウムチャンネルの活性に影響を与えるのか否かを検討した（第5図）。バリウムリンガー液灌流下で、 $-90\text{ mV}$ に膜電位固定した桿体にグルタミン酸（0.1 mM）を長時間投与（約3分）すると、内向き電流が発生した。これは、グルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の取り込み電流



第 5 図 グルタミン酸投与に伴うカルシウム電流の抑制

バリウムリンガー液灌流下で、 $-90\text{ mV}$  に膜電位固定した桿体にグルタミン酸 ( $0.1\text{ mM}$ ) を投与 (約 3 分間) すると、内向き電流が発生した。グルタミン酸を投与する直前 (赤色の①), 投与中 (グルタミン酸を投与して約 2 分後) (青色の②) そしてグルタミン酸を洗い流して 5 分後 (緑色の③) に、 $-70\text{ mV}$  から  $+50\text{ mV}$  まで鋸刃状電位変化 ( $70\text{ mV/sec}$  の速さ) を与え、この時に発生する電流応答を記録した (四角内の挿入図)。三電流を比較すれば明らかなように、グルタミン酸投与中に発生したカルシウム電流のピーク電流値は投与前 (赤色の①) に比して著しく減弱していた (青色の②)。グルタミン酸を洗い流すと、カルシウム電流は回復した (緑色の③)。また、グルタミン酸投与中、カルシウム電流の活性化電位に変化は認められなかった。

以上の結果は、視細胞のグルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸を取り込む際発生する細胞内酸性化がカルシウムチャネルに対し抑制的に働くことを示唆している。

と考えられた。グルタミン酸を投与する直前 (赤色の①), 投与中 (グルタミン酸を投与して約 2 分後) (青色の②) そしてグルタミン酸を洗い流して 5 分後 (緑色の③) に、 $-70\text{ mV}$  から  $+50\text{ mV}$  まで鋸刃状電位変化 ( $70\text{ mV/sec}$  の速さ) を与え、この時に発生する電流応答を記録した (第 5 図四角内の挿入図)。本実験では、 $\text{Cd}^{2+}$  投与実験により正味のカルシウム電流 (本実験では、バリウム電流) を求めることが困難であったため、得られた電流応答を単純比較した。三電流を比較すれば明らかなように、グルタミン酸投与中に発生したカルシウム電流のピーク電流値は投与前と投与後に比して著しく減少していた。しかし、グルタミン酸投与中、カルシウム電流の活性化電位に変化は認められなかった。同様の実験を桿体で 5 例、そして錐体で 3 例行った。桿体では 2 例、また錐体では 1 例において、グルタミン酸投与に伴いカルシウム電流の微かな減少が認められた。

以上の結果は、視細胞のグルタミン酸トランスポーターの活性化に伴い発生する細胞内酸性化がカルシウムチャネルを抑制する可能性があることを示している。

## 考 察

### 視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーター

視細胞終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に伴い放出されたグルタミン酸は双極細胞と水平細胞に発現するグルタミン酸受容体と結合し、電位応答を惹起する。同時に、視細胞あるいは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を介して細胞内に取り込まれ、細胞外から速やかに除去される。視細胞に取り込まれたグルタミン酸はそのまま再利用され、また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-グルタミン酸サイクルを経て視細胞内でグルタミン酸に変換され再利用されると考えられている。

哺乳動物のグルタミン酸トランスポーターは五種類のサブタイプに分類され、EAAT1 (Excitatory Amino acid Transporter 1 の略)、EAAT2、EAAT3、EAAT4 そして EAAT5 と命名されている (Kanai & Hediger, 1992; Arriza *et al.*, 1993, 1994; Fairman *et al.*, 1995)。トラフサンショウウオ網膜ではグルタミン酸トランスポーターの体系的な研究が行われ、サブタイプの種類と発現部位 (EAAT1 は主にミュラー細胞に発現、EAAT2 はミュラー細胞、視細胞、双極細胞とアマクリン細胞に発現、そして EAAT5 はミュラー細胞、視細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞に発現)、及び生理学的性質 (アミノ酸電流の電位依存性、阻害剤の効果やクロライドチャンネルとのカップリングなど) が解明されている (Eliasof & Werblin, 1993; Arriza *et al.*, 1997; Eliasof *et al.*, 1998a, b)。

これまでの研究によって、グルタミン酸トランスポーターは細胞内外の  $\text{Na}^+$  のエネルギー (濃度) 勾配を利用してグルタミン酸を輸送することが明らかとなっている。ミュラー細胞のグルタミン酸トランスポーターは、グルタミン酸を取り込む際  $\text{Na}^+$  のみならず  $\text{H}^+$  を共輸送するため、細胞が脱分極すると同時に細胞内が酸性化することが知られている (Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; 高橋, 2003)。本研究 (第4図) でも、視細胞のグルタミン酸トランスポーターの活性化によって細胞内が酸性化することが判明した。既述したように、視細胞とミュラー細胞には共通したグルタミン酸トランスポーターサブタイプが発現しており、細胞内酸性化は同じサブタイプの活性化が原因していると考えられる。

グルタミン酸トランスポーターの活性化に伴う視細胞内の酸性化は、トランスポーターが発現している細胞膜付近で顕著であると推測される。本研究で用いた細胞内 pH 測定法は微小部分で生じた小さく且つ速い pH 変化を記録するのが難しく、このため実験を行った15細胞のうち4細胞にしか pH 変化が記録できなかったと考えられる。細胞内 pH 測定法が改良されれば、総ての細胞においてグルタミン酸トランスポーターの活性化に伴って生じる細胞内酸性化が記録できる筈である。

### 細胞内水素イオンによるカルシウムチャネルの修飾

カルシウムチャネルは、細胞内外の水素イオン濃度 (pH) 変化によってその活性が修飾されることが知られている (Umbach, 1982; Moody, 1984; Katzka & Morad, 1989; Mironov & Lux, 1991)。脊椎動物網膜でも、水平細胞に発現するカルシウムチャネルが細胞内 pH 変化の影響を、また視細胞に発現するカルシウムチャネルが細胞外 pH 変化の影響を受けることが報告されている (Barnes & Bui, 1991; Dixon *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993; Hirasawa & Kaneko, 2003)。本研究 (第 3 図) では、視細胞 (桿体と錐体) の高閾値型カルシウムチャネルが細胞内の pH 変化によって修飾されることが判明した。従って、視細胞の場合、細胞内外何れの pH が変化してもカルシウムチャネルはその影響を受ける。

細胞膜に発現する pH 調節機構 (例えば、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger や  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchanger など) と細胞内の pH 緩衝作用により、細胞内 pH は比較的安定に保たれ、生理的条件下では殆ど変化しないと考えられてきた。しかし、近年、神経系においてシナプス伝達に伴い細胞内外の pH が変化することが明らかとなってきた (Kaila & Voipio, 1987; Chesler, 1990; Chesler & Kaila, 1992)。このような細胞内外の pH 変化が各種イオンチャネル、シナプス受容体あるいは細胞内生理機能の修飾を引き起こすことは十分に考えられる。実際、本研究 (第 5 図) では、電位依存性カルシウムチャネルがグルタミン酸トランスポーターの活性化に伴う細胞内酸性化によって抑制されることが明らかとなった。同様の研究結果は、魚類網膜水平細胞の高閾値型カルシウムチャネルでも報告されている (Dixon *et al.*, 1993)。また、Hirasawa & Kaneko (2003) は細胞外 pH 変化が双極細胞の受容野形成 (中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成) に密接に関与していることを報告している。

本研究 (第 5 図) では、グルタミン酸によるカルシウム電流の抑制効果が 30% 程度にしか認められなかった。この原因については不明であるが、グルタミン酸取り込みに伴う酸性化がグルタミン酸トランスポーターの発現する微小な細胞内部分に限局しており、細胞内全体にこの pH 変化が伝播しなかったため、カルシウム電流の変化として現れなかったと推測される。今後、グルタミン酸トランスポーター、カルシウムチャネル、ならびに  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase などの視細胞内節膜上での分布を明らかにし、これらの発現部位を把握した上でグルタミン酸トランスポーターに近接するカルシウムチャネルからの単一チャネル電流記録を行い、グルタミン酸の取り込みに伴う酸性化の影響を調べることが必要である。

### 視細胞終末のカルシウムチャネルと神経伝達物質放出

視細胞のグルタミン酸放出には、終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が不可欠である。現在、視細胞に発現する電位依存性カルシウムチャネルは、細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を供給するための重要な経路であると考えられている (カルシウムチャネルの開口により細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が、視細胞終

末からのグルタミン酸の放出を促進する)。この理由として、⑦カルシウムチャネル阻害剤(コバルトイオン)によって視細胞から水平細胞へのシナプス伝達が抑制されること(例えば, Hankins & Ruddock, 1984), および⑧視細胞に発現する高閾値型カルシウムチャネルが暗時の膜電位(-30 mV 付近)で活性化すること(第2図), などの知見が挙げられる。光環境が暗から明に転ずると, 光強度にも依るが, 膜電位は-30 mV (暗時) から-75 mV (明時) 付近まで移動(過分極)する。視細胞の膜電位が暗時よりも10 mV 以上過分極すると, 高閾値型カルシウムチャネルの活性化は生じず, 従って細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節するために別の  $\text{Ca}^{2+}$  供給システムが作動する必要がある。哺乳動物網膜視細胞には-60 mV 付近で活性化するカルシウムチャネルが知られており, このチャネルがより過分極した膜電位(-45 mV ~ -60 mV) での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に関与している可能性がある(Yagi & Macleish, 1994; Taylor & Morgans, 1998)。カルシウムチャネル以外に, cGMP 依存性イオンチャネルや細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節に関わっていることが予想される(Rieke & Schwartz, 1996; Krizaj *et al.*, 2003)。今後, 視細胞の膜電位と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度調節の関係について, さらに詳細な解析が必要である。

#### 視細胞内酸性化に伴うカルシウムチャネル抑制と視細胞のグルタミン酸放出との関係

暗時に視細胞終末部では, (1)高閾値型カルシウムチャネルの活性化によって細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入が惹起されると同時に, おそらく(2)細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアから細胞内(細胞質)への  $\text{Ca}^{2+}$  放出が促進されるため, 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高く維持されている(Krizaj *et al.*, 1998, 2003)。この高  $\text{Ca}^{2+}$  は, 視細胞終末からグルタミン酸の放出を促進する。既述したように, 放出されたグルタミン酸は第二次神経細胞へのシナプス伝達のために利用され, その後視細胞や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って細胞内に取り込まれ, 再利用される。視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターがグルタミン酸を取り込むと, 細胞内は酸性化する(第4図参照)。この酸性化はカルシウムチャネルを抑制し, 細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を減少させる(第5図参照)。Krizaj *et al.* (2003) が提唱しているように, 視細胞に  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) 機構が存在し機能すれば, カルシウムチャネルの抑制(細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の減少)は  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を減少させ, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の低下を加速する。ところが, 同時に, グルタミン酸トランスポーターの活性化に伴う酸性化は  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 活性も抑制するため(Hao *et al.*, 1994), 細胞内から細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  排出速度が低下し, 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に急速な低下は生じないと考えられる。つまり, 暗時には視細胞終末内  $\text{Ca}^{2+}$  の増加抑制(酸性化によるカルシウムチャネルと  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの抑制)と減少抑制(酸性化による  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase の抑制)が同時に生じるため, 結果として細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は比較的高濃度のまま一定に保たれることが予想される。このため, 単位時

間当たり視細胞から放出されるグルタミン酸量は一定となり、やがてグルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の取り込みとの間に平衡が生じ、暗条件が持続すればシナプス間隙（細胞外スペース）に留まるグルタミン酸量が一定となる。これは、グルタミン酸が第二次神経細胞（双極細胞と水平細胞）のシナプス受容体に結合する確率を一定に保ち、暗時の膜電位を安定化させるために役立つと考えられる。光環境が暗から明に転ずると、視細胞は過分極（光強度に応じて $-45\text{ mV}$  から $-75\text{ mV}$  まで電位が変化する）し、これに伴って終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下するためグルタミン酸放出は減少あるいは停止する。放出されたグルタミン酸はグルタミン酸トランスポーターによって細胞内に回収されるが、明時に放出されるグルタミン酸量が少ないため、視細胞内 pH の低下は微弱になると予想される。明時に視細胞は過分極しているため、この微弱な pH 低下（酸性化）が高閾値型カルシウムチャネルに影響することはない。ただし、より過分極した膜電位（ $-60\text{ mV}$ ）で活性化するカルシウムチャネル（Yagi & Macleish, 1994; Taylor & Morgans, 1998）が細胞内  $\text{H}^+$  に対して感受性を有している場合には、酸性化がこのチャネルを通じた  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制する可能性がある。同時に、この微弱な酸性化は  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 活性に影響し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の低下を遅らせる可能性がある。とはいえ、細胞内酸性化の影響は暗時ほど顕著ではない筈である。細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  供給経路として注目されている cGMP 依存性イオンチャネルや細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの細胞内  $\text{H}^+$  への依存については現在不明であり、今後解析を進める必要がある。

## 引用文献

- Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y.-N., Murdoch, G. H., North, R. A. and Amara, S. G. (1993), Cloning and expression of a human neural amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family, *J. Biol. Chem.*, **268**: 15329–15332.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1994), Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex, *J. Neurosci.*, **14**: 5559–5569.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1997), EAAT5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 4155–4160.
- Attwell, D. (1986), Ion channels and signal processing in the outer retina, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **71**: 497–536.
- Attwell, D., and Wilson, M. (1980), Behaviour of the rod network in the tiger salamander mediated by membrane properties of individual rods, *J. Physiol.*, **309**: 287–315.
- 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.*, **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.
- Bader, C. R., Macleish, P. R. and Schwartz, E. A. (1979), A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander, *J. Physiol.*, **296**: 1–26.
- Barbour, B., Brew, H. and Attwell, D. (1991), Electrogenic uptake of glutamate and aspartate in glial cells isolated from the salamander retina, *J. Physiol.*, **436**: 169–193.

- Barnes, S (1994), After transduction: Response shaping and control of transmission by ion channels of the photoreceptors inner segment, *Neuroscience*, **3**: 447–459.
- Barnes, S. and Bui, Q. (1991), Modulation of calcium-activated chloride current via pH-induced changes of calcium channel properties in cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **11**: 4015–4023.
- Barnes, S. and Hille, B. (1989), Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, **94**: 719–743.
- 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.
- Chesler, M. (1990), The regulation and modulation of pH in the nervous system, *Prog. Neurobiol.*, **34**: 401–427.
- Chesler, M. and Kaila, K. (1992), Modulation of pH by neuronal activity, *Trends Neurosci.*, **15**: 396–402.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- 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.
- Eliasof, S. and Jahr, C. (1996), The retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an anionic conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 4153–4158.
- Eliasof, S. and 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 function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443–1454.
- Fain, G. L., Gerschenfeld, H. M. and Quandt, F. N. (1980a), Calcium spikes in the toad rods, *J. Physiol.*, **303**: 495–513.
- Fain, G. L. and Quandt, F. N. (1980b), The effects of tetraethylammonium and cobalt ions on responses to extrinsic current in the toad rods, *J. Physiol.*, **303**: 515–533.
- Fain, G. L., Quandt, F. N., Bastian, B. L. and Gerschenfeld, H. M. (1978a), Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoreceptors, *Nature*, **272**: 467–469.
- Fain, G. L., Quandt, F. N. and Gerschenfeld, H. M. (1978b), Calcium-dependent regenerative responses in rods, *Nature*, **269**: 707–710.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1995), An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel, *Nature*, **75**: 599–603.
- 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.
- Hankins, M.W. and Ruddock, K. H. (1984), Electrophysiological effects of GABA on fish retinal horizontal cells are blocked by bicuculline but not by picrotoxin, *Neurosci. Lett.*, **44**: 1–6.
- Hao, L., Rigaud, J.-L. and Inesi, G. (1994),  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids, *J. Biol. Chem.*, **269**: 14268–14275.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Kaila, K. and Voipio, J. (1987), Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance, *Nature*, **330**: 163–165.
- Kawamura, S. (1993), Molecular aspects of photoreceptor adaptation in vertebrate retina, *Int. Rev. Neurobiol.*, **35**: 43–86.
- Kawamura, S. (1994), Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction, *Neurosci. Res.*, **20**: 293–298.



- Kanai, Y. and Hediger, M. A. (1992), Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter, *Nature*, **360**: 467–471.
- Katzka, D. A. and Morad, M. (1989), Properties of calcium channels in guinea-pig gastric myocyte, *J. Physiol.*, **413**: 175–197.
- Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (1998), Compartmentalization of calcium extrusion mechanisms in the outer and inner segments of photoreceptors, *Neuron*, **21**: 249–256.
- Krizaj, D., Lai, F. A., and Copenhagen, D. R. (2003), Ryanodine stores and calcium regulation in the inner segments of salamander rods and cones, *J. Physiol.*, **547.3**: 761–774.
- Krizaj, D., Bao, J.-X., Schmitz, Y., Witkovsky, P. and Copenhagen, D. R. (1999), Caffeine-sensitive calcium stores regulate synaptic transmission from retinal rod photoreceptors, *J. Neurosci.*, **19**: 7249–7261.
- Lasater, E. M. and Witkovsky, P. (1991), The Calcium current of turtle cone photoreceptor axon terminals, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 15**: 165–173.
- Marc, R. E. and Lam, D. M. K. (1981), Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7185–7189.
- Maricq, A. V. and Korenbrot, J. I. (1988), Calcium and calcium dependent chloride currents generate action potentials in solitary cone photoreceptors, *Neuron*, **1**: 503–515.
- Mariani, A. P. (1986), Photoreceptors of the larval tiger salamander retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **227**: 483–492.
- Mironov, S. L. and Lux, H. D. (1991), Cytoplasmic alkalization increases high-threshold calcium current in chick dorsal root ganglion neurones, *Pflügers Arch.*, **419**: 138–143.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol.*, **334**: 325–349.
- Moody, W. (1984), Effects of intracellular H<sup>+</sup> on the electrical properties of excitable cells, *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**: 257–278.
- 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.*, **386**: 165–180.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1988), Calcium action potentials in retinal cells of the carp, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 8**: 137–149.
- 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., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol.*, **227**: 899–913.
- 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.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Grant, G. B. and Werblin, F. S. (1996a), Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander, *J. Neurophysiol.*, **74**: 1760–1771.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Wellis, D. P., Lecar, H. and Werblin, F. S. (1996b), Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 9417–9421.
- Picones, A. and Korenbrot, J. I. (1994), Analysis of fluctuations in the cGMP-dependent currents of cone photoreceptor outer segments, *Biophys. J.*, **66**: 360–365.
- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1990), Cyclic GMP and calcium: The internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors, *Vision Res.*, **30**: 1923–1948.
- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1993), Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction, *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**: 111–149.
- Rieke, F. and Schwartz, E. A. (1996), Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse, *J. Physiol.*, **493.1**: 1–8.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output syn-

- apse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Schultz, K. and Stell, W. K. (1996), Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species, *Neurosci. Lett.*, **211**: 191–194.
- Schwartz, E. and Tachibana, M. (1990), Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina, *J. Physiol.*, **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.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **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. USA*, **85**: 5315–5319.
- 高橋 恭一 (2003) :  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  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**: 1–13.
- Takahashi, K.-I. (1986), Ion channels in *in situ* rod of the frog retina as revealed by intracellular current injection, *Keio J. Med.*, **35**: 162–179.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1987), Reversal potentials of rod horizontal cells in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 6**: 165–174.
- 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., 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.
- Taylor, W. R. and Morgans, C. (1998), Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*, *Visual Neurosci.*, **15**: 541–552.
- 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.
- Umbach, J. A. (1982), Changes in intracellular pH affect calcium currents in *Paramecium caudatum*, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **216**: 209–224.
- 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.
- Watanabe, S.-I. and Murakami, M. (1991), Similar properties of cGMP-activated channels between cones and rods in the carp retina, *Vis. Neurosci.*, **6**: 563–568.
- Yagi, T. and Macleish, P. R. (1994), Ionic conductances of monkey solitary cone inner segments, *J. Neurophysiol.*, **71**: 656–665.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.