

コイ網膜外網状層内の神経連絡に関する研究

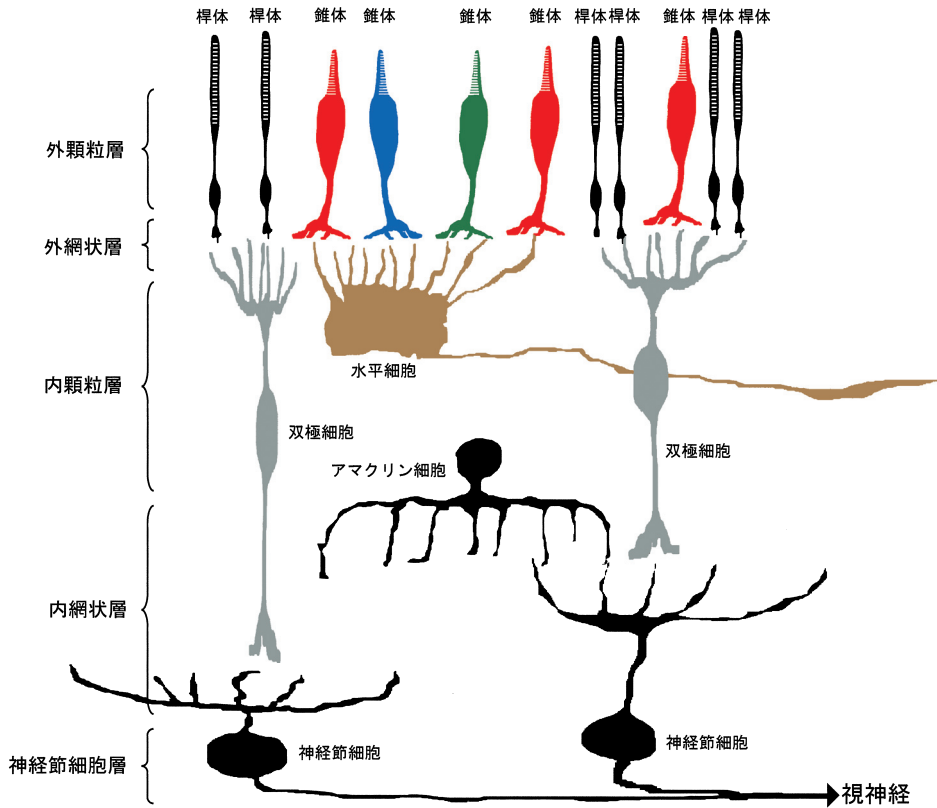
高橋 恭一

(受付 2006年10月11日)

序 文

脊椎動物網膜には、機能的・形態的に異なる二種類の視細胞（錐体と桿体）が存在する。錐体は光に対する感受性が低いため昼間の視覚に、また桿体は感受性が高いため薄明（夕方及び夜間）の視覚に役立っている（第1図参照）。錐体では、外節の形質膜が内側に折り畳まれ層状構造を形成し、この層状構造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。これらの視細胞で受容された光情報は電位応答に変換され、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にシナプス伝達される（第1図参照）。双極細胞では形態視の初期過程である同心円型中心-周辺拮抗的受容野（コントラスト強調）が、また水平細胞では色覚の初期過程である反対色応答が形成され、これらの情報はアマクリン細胞や神経節細胞へとシナプス伝達される。

水平細胞は、錐体からシナプス入力を受け取る錐体水平細胞と桿体からシナプス入力を受け取る桿体水平細胞に分類される（MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1965; Tsukamoto *et al.*, 1987）。色覚を有する下等脊椎動物（魚類、両生類と爬虫類）の場合、網膜には三種類の錐体（赤色錐体、緑色錐体と青色錐体）が存在し、それぞれは異なる錐体水平細胞とシナプス結合している（赤色錐体から主入力を受け取る単相性水平細胞、緑色錐体から主入力を受け取る二相性水平細胞および青色錐体から主入力を受け取る三相性水平細胞）。何れの錐体水平細胞にもイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現しているため、光応答は基本的に過分極性である（Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1987, 1988, 1991）。ところが、錐体と錐体水平細胞の間には錐体から錐体水平細胞への興奮性シナプス（正のフィードフォワードシナプス）以外に、錐体水平細胞から錐体への抑制性シナプス（負のフィードバックシナプス）が存在するため、二相性水平細胞および三相性水平細胞のスペクトル応答（単色光に対する電位応答）は単相性水平細胞に比べて複雑且つ特徴的となる（第2図参照）（Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995）。三種類存在する錐体水平細胞の中で、少なくとも単相性水平細胞は γ -アミノ

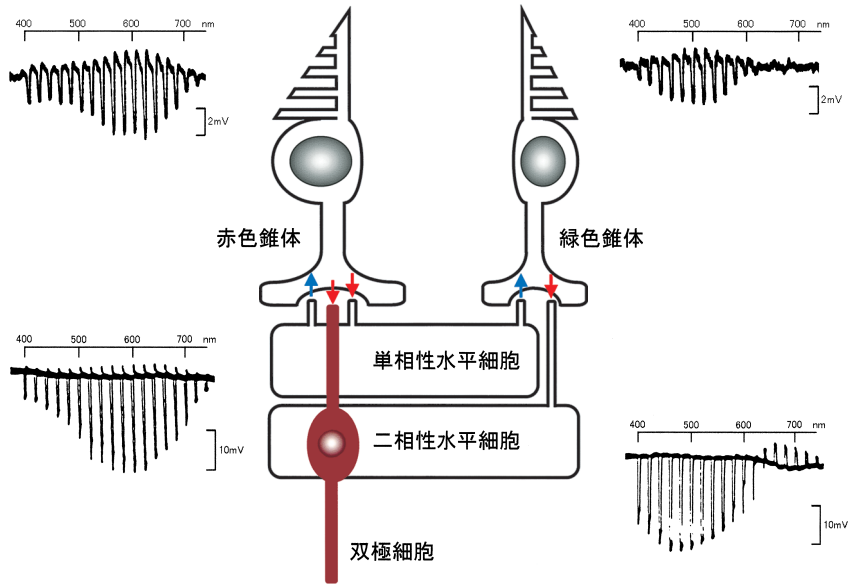


第1図 下等脊椎動物網膜の神経構築

脊椎動物の網膜は、五種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）からなる。網膜を構成する神経細胞の中で、視細胞のみが光感受性を有し、残りの神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体（黒色）と低い錐体（青色、緑色と赤色）に分類される。視細胞で受容された明暗情報は電気信号に変換され、網膜の縦方向に配置した細胞群（視細胞、双極細胞と神経節細胞）と横方向に配置した細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）による情報処理（特徴抽出）を経て、脳にまで伝達される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、および双極細胞（灰色）、水平細胞（茶色）とアマクリン細胞（黒色）の細胞体が存在する部分の内顆粒層と呼ぶ。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位を外網状層、および双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞（黒色）がシナプス連絡する部位を内網状層と呼ぶ。視覚情報処理は、外網状層と内網状層で行われる。

酪酸 (γ -Aminobutyric acid; GABA) を神経伝達物質として放出していることが明らかとなっている (Lam & Steinman, 1971; Lam, 1975; Lam *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Schwartz, 1982, 1987)。

同種の水平細胞は電気シナプス結合（ギャップ結合）しているため、受容野は極めて大きく、数 mm となる (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Stell & Lightfoot, 1975; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldrige *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993)。この受容野情報は、水平細胞から錐体への抑制性シナプス（負のフィードバックシナプス）を介して双極細胞に伝



第2図 錐体-水平細胞間のシナプス連絡とそれぞれの細胞が示す光応答

色覚を有する下等脊椎動物（魚類、両生類と爬虫類）の網膜には、三種類の錐体（赤色錐体、緑色錐体と青色錐体）が存在し、これらはそれぞれ異なる錐体水平細胞とシナプス結合している。本図では、赤色錐体、緑色錐体、単相性水平細胞そして二相性水平細胞のシナプス連絡を示した。単相性水平細胞は赤色錐体から興奮性シナプス入力（赤矢印）を受け取り、赤色錐体と緑色錐体に抑制性シナプス出力（青矢印）を送っている。二相性水平細胞は緑色錐体から興奮性シナプス入力（赤矢印）を受け取り、青色錐体に抑制性シナプス出力（青矢印）を送っていることが報じられている（例えば、Stell *et al.*, 1975）。錐体は暗時に脱分極した状態にあり、光照射に伴い過分極応答（下向きの振れ）を示す。赤色錐体は長波長の単色光（赤色）に、また緑色錐体は中波長の単色光（緑色）に最大の感度を示す。単相性水平細胞は総ての可視光に対し過分極性応答を、二相性水平細胞では短波長と中波長の単色光で過分極性応答そして長波長の単色光では脱分極応答を発生する。図中には、赤色錐体、緑色錐体、単相性水平細胞そして二相性水平細胞は発生するスペクトル応答（単色光に対する膜電位応答）を、それぞれの細胞の横に示した。これらのスペクトル応答は、等光量子化した400 nm から740 nm までの単色光を、20 nm 刻みでコイ網膜に照射し、得られた電位応答である。スペクトル応答記録は Tomita *et al.* (1965) と Tomita (1970) から引用した。

達されることが報告されている（Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978）。つまり、双極細胞の同心円型中心-周辺拮抗的受容野の受容野中心部応答（受容野中心部への光照射に伴い発生する電位応答）は錐体から双極細胞への直接的なシナプス伝達（錐体 → 双極細胞）によって、また受容野周辺部応答（受容野周辺部への光照射に伴い発生する電位応答）は水平細胞から双極細胞への間接的なシナプス伝達（水平細胞 → 錐体 → 双極細胞）によって形成されることが考えられている。これらの研究成果を総合すると、水平細胞から錐体への抑制性シナプスは水平細胞における三原色過程から反対色過程への変換のみならず双極細胞における同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形

成にも関与していることが明らかである。

水平細胞の細胞膜には GABA トランスポーターが発現し、GABA の輸送機能を担っている (Lam & Steinman, 1971; Schwartz, 1982, 1987, 2002)。この GABA トランスポーターは、GABA を細胞外から細胞内へ輸送 (取り込み) するのみならず細胞内から外へ輸送 (放出) することが報告されている (Schwartz, 1982, 1987, 2002)。GABA トランスポーターを介する GABA 放出は通常のシナプスでの神経伝達物質の放出と異なり、カルシウムイオン (Ca^{2+}) を必要とせず、膜電位 (脱分極) にのみ依存することが明らかとなっている。暗時に水平細胞は脱分極した状態にあるため、(i) 細胞内の GABA は GABA トランスポーターを介して細胞外に輸送 (放出) され、シナプス間隙を拡散して錐体終末に到達し、(ii) この GABA は錐体終末部に発現する GABA_A 受容体を活性化してクロライドチャネル (クロライドイオン [Cl^-] の平衡電位は暗時膜電位よりも過分極側 [-60 mV 付近] にある) を開口するため、錐体に過分極を生む、(iii) この過分極は錐体終末部に発現する電位依存性カルシウムチャネルの活性を低下させ、錐体が放出する L-グルタミン酸量を減少させる (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Kaneko & Tachibana, 1986)。この一連のメカニズムを通じて、水平細胞での反対色過程ならびに双極細胞での周辺受容野が形成されると考えられている (抑制性シナプス説)。

ところが、近年、GABA アゴニストや GABA アンタゴニストが錐体の受容野周辺部応答の発生に影響しないという報告 (Thoreson & Burkhardt, 1990; Burkhardt, 1993; Verweij *et al.*, 1996, 2003) が相次ぎ、水平細胞から錐体への抑制信号の伝播に抑制性シナプス説以外のしくみが機能している可能性が高まってきた。実際、抑制性シナプス説以外に二つの異なる説 (細胞外電流説と細胞外 pH 説) が報告されている (Byzov & Shura-Bura, 1986; Kamermans *et al.*, 2001; Hirasawa & Kaneko, 2003)。細胞外電流説は Byzov & Shura-Bura (1986) によって提唱され、Kamermans *et al.* (2001) によって生理学的知見が付加された説である。Kamermans *et al.* (2001) は、㊦水平細胞膜に発現するヘミギャップ結合チャネルを介して細胞外に漏れ出た電流が細胞間隙に電位差 (シナプス間隙の電気抵抗が高いという仮定に基づく) を生み、㊧この電位差が錐体終末に発現するカルシウムチャネルの電位依存性をシフトさせて、㊨錐体内に流入する Ca^{2+} 量を調節するため、結果として㊩錐体から放出される L-グルタミン酸量が増減することを報告した (細胞外電流説)。しかし、Dmitriev & Mangel (2006) は細胞外電流説についてコンピュータを用いたシミュレーション解析を行い、錐体のカルシウムチャネルの電位依存性をシフトさせるほど十分な電位差が細胞外 (錐体と水平細胞のシナプス間隙) に生じないことを示した。これに加えて、Cadetti & Thoreson (2006) は、Carbenoxolone (ギャップ結合チャネル阻害剤) が錐体のカルシウムチャネル活性に影響しないことを見出した。これら二つの論文は、細胞外電流説が水平細胞から錐体へ

の抑制信号の伝播に参与している可能性が低いことを示している。最近、Hirasawa & Kaneko (2003) は、①水平細胞の膜電位変化が視細胞-水平細胞間のシナプス間隙の水素イオン濃度 (pH) に影響し、②この pH 変化が錐体終末部に発現するカルシウムチャネルの活性と電位依存性を変え、③錐体内に流入する Ca^{2+} 量を修飾するため、結果として④錐体から放出される L-グルタミン酸量が増減するという説を発表した (細胞外 pH 説)。Cadetti & Thoreson (2006) は、受容野周辺部への光照射に伴う錐体のカルシウムチャネルの電位依存性シフトとカルシウム電流振幅の変化が細胞外 pH 変化を阻害すると消失することを見出し、Hirasawa & Kaneko (2003) が発表した細胞外 pH 説の妥当性を強調した。とはいえ、細胞外 pH 変化と水平細胞の膜電位変化の関係については未だ十分に解明されていない。

ここ25年間の研究成果 (下等脊椎動物網膜の研究成果) を通覧しても、同心円型中心-周辺拮抗的受容野形成ならびに三原色過程から反対色過程への変換に水平細胞から錐体への抑制信号が重要な役割を果たしていることに異論を唱える研究報告はない。しかし、水平細胞から錐体への抑制信号伝播のメカニズムについては不明が多く、詳細については今後の研究を待たざるを得ない。現在、この伝播に関し抑制性シナプス説に加え、細胞外電流説および細胞外 pH 説が提唱されている。細胞外電流説は十分な確証が得られないのに対し、細胞外 pH 説についてはこれを支持する実験結果が報告され、有力候補となりつつある。

本研究では、細胞外 pH の変化が起こり難いリンガー液でコイ網膜を灌流し、このような条件でさえ水平細胞から錐体への抑制信号が伝播されることから、水平細胞から錐体への抑制信号の伝播に抑制性シナプスが依然重要な役割を果たしていることを報告する。

実験材料と実験方法

実験には、体長30 cm 前後のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。コイを2時間以上暗順応させた後、冷凍麻酔し、断頭後、眼球を摘出した。前眼部、水晶体および硝子体は除去し、その後網膜を剥離した。視細胞側を上にして濾紙上に付着させ、実験に用いた。以上の操作は低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を記録槽内に置き、リンガー液を1 ml/分の流量で灌流した。液温は、恒温装置で約20°C に保った。コイの正常リンガー液の組成は、102.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 28.0 mM 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3), 2.6 mM 塩化カリウム (KCl), 1.0 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 (Glucose), 5.0 mM Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) であった。網膜を構成する神経細胞にカルシウム活動電位を発生させるため、リンガー液 (修飾リンガー液) 組成を、76.0 mM NaCl, 5.0 mM 塩化バリウム (BaCl_2), 20.0 mM Tetraethylammonium Chloride (TEA-Cl), 10.0

mM 4-Aminopyridine (4-AP), 10.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 2.6 mM KCl, 10.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM Glucose, 5.0 mM Tris に変えた。この修飾リンガー液の灌流により、網膜神経細胞に発現する電位依存性カリウムチャンネル (遅延 [外向き] 整流性カリウムチャンネル, 内向き整流性カリウムチャンネル, 一過性外向きカリウムチャンネルなど) およびカルシウム依存性カリウムチャンネルは完全あるいは部分的に阻害されると推測される。何れのリンガー液も、1N 塩酸 (HCl) を用いて pH を 7.8 に調整し、灌流した。L-グルタミン酸 (Glu) はリンガー液に添加し、灌流投与した。

電位応答記録には、細胞内ガラス管微小電極法を用いた。ガラス管微小電極は電極作製器 (PN-3, 成茂科学) を使って、Omega dot タイプの borosilicate 性ガラス管から作製した。電極内には 4M-酢酸カリウム (CH₃COOK) を充填して用いた。電極抵抗は 40~80 MΩ であった。記録槽の底部に銀-塩化銀板を置き、これを不関電極とした。二つの水平細胞から同時に電位記録を行う場合、1.5 mm 離れた記録電極を独立に水平細胞に刺入した。電位応答は、微小電極用前置増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) を介してオシロスコープ (VC-10, 日本光電) で観察した。この信号は、FM データレコーダー (A-45, Sony-Magnescape) により磁気テープに記録した。必要に応じて、電位応答をデータレコーダーから再生し、ペンレコーダー (RJG-4100, 日本光電) に記録した。

コイ網膜には三種類の錐体、またこれらの錐体から主シナプス入力を受け取る三種類の錐体水平細胞が存在し、それぞれは特徴的なスペクトル応答を示す。この特徴的なスペクトル応答および刺入するガラス管微小電極の深さを指標にすれば、電位記録を実施している細胞の同定は容易であった (第 2 図参照) (Tomita, 1965; Tomita *et al.*, 1967)。

光源には 150W キセノン放電管 (ウシオ電機) を用い、回折格子により単色光を得た (Tomita *et al.*, 1967)。光刺激装置は二チャンネルからなり、それぞれを 620 nm と 480 nm の単色光の照射に用いた。光照射時間は、何れも 800 ミリ秒であった。スペクトル応答を調べるとき、400 nm から 740 nm までの等量子化 (8.2×10^5 photons/ μm^2 /秒) した単色光を 20 nm 刻みで網膜全体に照射した。光強度は光路に中性濃度フィルターを入れて調節した。

薬品類の多くは、関東化学株式会社とナカライテスク株式会社から購入した。4-AP は Sigma Chemical Co. から購入した。

実 験 結 果

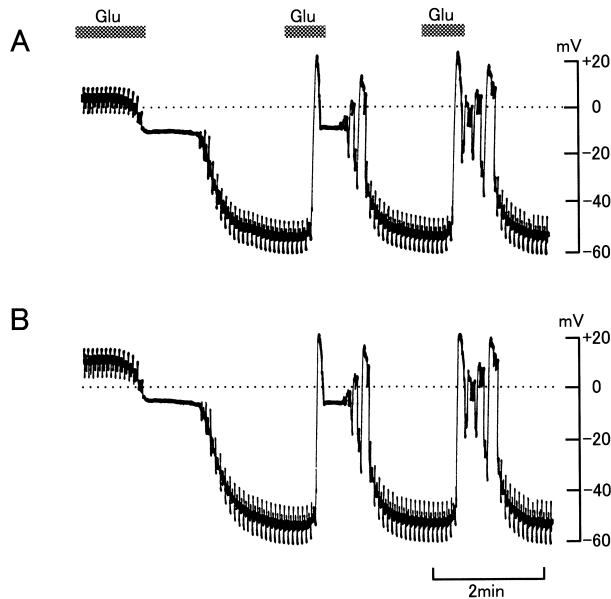
水平細胞の膜電位と光応答

正常リンガー液の灌流中、コイ網膜水平細胞の暗時の膜電位は -28 mV から -45 mV であった。単相性水平細胞は何れの波長の単色光を照射しても過分極応答を発生し、この応答

振幅は長波長光（赤色光）で最大を示した（第2図参照）。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換し網膜を灌流すると、暗時の膜電位は過分極を始め、数分から十数分後 $-50\text{ mV} \sim -65\text{ mV}$ に到した。このとき、光応答の振幅も減少し、数 mV となった。第5図に示す実験から、修飾リンガー液の灌流に伴い水平細胞に生じた膜電位変化（暗時の膜電位の過分極、光応答波形および光応答の減少）は、錐体に生じた膜電位変化を反映していることが推測される。修飾リンガー液の灌流中、水平細胞に脱分極刺激（例えば、細胞外パルス通電や興奮性アミノ酸の投与など）を与えると、悉無律に従うカルシウム活動電位（持続時間は数秒）を発生した（Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1988, 1991）。活動電位の発生後数秒経過しても再分極せず、膜電位がプラトー電位レベル（ $+20\text{ mV}$ 付近）に数十秒から数十分間保持される水平細胞が多数認められた（第4図参照）。

水平細胞のグルタミン酸応答と光応答の逆転電位と錐体の伝達物質

同種の水平細胞は電気シナプスを介して結合（ギャップ結合）しているため、ある水平細



第3図 二つの単相性水平細胞からの同時記録

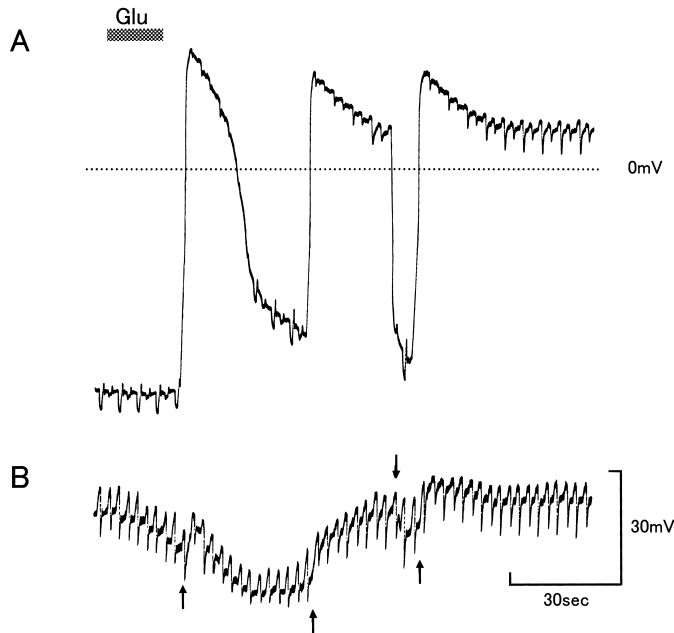
1.5 mm 離れた二つの単相性水平細胞（A と B）に記録電極を刺入し、膜電位を同時記録した。両細胞共に、暗時の膜電位は -54 mV であった。水平細胞の膜電位が活動電位のプラトー電位に保持されているとき、L-グルタミン酸（Glu； 5 mM ）を投与すると、膜電位は負方向に移動し、 -10 mV 付近に到達し安定した。このとき、光応答は発生しなかった。L-グルタミン酸を洗い流すと、膜電位は徐々に暗時の膜電位に向かって変移（再分極）した。再分極時および暗時の膜電位で発生する光応答は、プラトー電位で発生する光応答と極性が逆であった。その後、L-グルタミン酸を二度投与したが、両細胞の膜電位変化はよく一致していた。

胞に発生した膜電位変化は瞬時に近隣の同種水平細胞にまで伝播する。とはいえ、この伝播は電気緊張的であるため、生理的条件下で遠く離れた水平細胞に電位変化が到達することはない。本研究のように、水平細胞がカルシウム活動電位を発生するような条件では、活動電位が近隣の水平細胞を次々と閾値以上にまで脱分極させるため、総ての同種水平細胞にほぼ同時に活動電位が発生することが予想される。第3図に示す実験では、修飾リンガー液の灌流時、同種水平細胞に活動電位が同期して発生するの否かを調べた。このため、1.5 mm 離れた二つの単相性水平細胞に記録電極を刺入し、膜電位変化を同時記録した。両細胞共（第3図AとB）に、暗時の膜電位は -54 mV であり、480 nm（緑色）よりも620 nm（赤色）の単色光照射に対し大きな過分極応答を発生した。水平細胞の膜電位がプラトー電位（ $+20$ mV 付近）に保持されているとき、光応答の極性は暗時の膜電位で発生する応答と反対であった（第3図参照）。膜電位がプラトー電位に保持されている間に、L-グルタミン酸（5 mM）を投与すると、膜電位は負方向に移動（0 mV に向かって移動）し、 -10 mV 付近に到達した。リンガー液中にL-グルタミン酸が存在する限り、水平細胞の膜電位は -10 mV 付近に保持された。このとき、光応答は発生しなかった。L-グルタミン酸を洗い流すと、膜電位は徐々に暗時の膜電位に向かって移動（再分極）した。その後、L-グルタミン酸を二度投与したが、両細胞の膜電位変化はよく一致していた。五ペアの単相性水平細胞から同時記録を行い、第3図と同様の結果を得た。

以上の結果から、修飾リンガー液の灌流中、比較的離れた単相性水平細胞間に同期して活動電位が発生すること、また近隣の同種水平細胞間で膜電位が概ね一致して変化していることが明らかとなった。L-グルタミン酸を投与する実験では、光応答のみならずグルタミン酸応答も -10 mV 付近でその極性を反転することが明らかとなった。この結果は、赤色錐体の神経伝達物質がL-グルタミン酸であることを強く示唆している（Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1991）。

単相性水平細胞と二相性水平細胞の繋がり

錐体と水平細胞の間には、錐体から水平細胞への興奮性シナプス（正のフィードフォワードシナプス）に加えて、水平細胞から錐体への抑制性シナプス（負のフィードバックシナプス）が存在する。コイ網膜の単相性水平細胞は、赤色錐体から興奮性シナプス（神経伝達物質；L-グルタミン酸）入力を受け取り、赤色錐体と緑色錐体に対し抑制性シナプス（神経伝達物質；GABA）出力を送っている（第2図参照）（例えば、Stell *et al.*, 1975; Murakami *et al.*, 1982a, b）。第4図に示す実験では、単相性水平細胞の膜電位変化が二相性水平細胞の膜電位に影響するの否かを調べた。このため、単相性水平細胞と二相性水平細胞に記録電極



第4図 単相性水平細胞と二相性水平細胞からの同時記録

単相性水平細胞 (A) と二相性水平細胞 (B) に記録電極を刺入し、両細胞の膜電位を同時記録した。修飾リンガー液の灌流中、単相性水平細胞の暗時の膜電位は約 -60 mV 付近にあり、 480 nm (緑色) よりも 620 nm (赤色) の単色光に対し大きな過分極性光応答を発生した。二相性水平細胞の膜電位は、カルシウム活動電位のプラトー電位 ($+20$ mV 付近) に保持されており、両単色光の照射によって概ね同じ振幅の応答を発生した。L-グルタミン酸 (Glu; 2 mM) を投与すると、単相性水平細胞は微かに脱分極し、カルシウム活動電位を発生した。一方、膜電位がプラトー電位に保持されている二相性水平細胞では、L-グルタミン酸投与により膜電位は負の方向 (グルタミン酸応答の逆転電位) に向かって変移した。L-グルタミン酸の濃度が低く且つ投与時間が短かったため、何れの水平細胞でも膜電位はグルタミン酸応答の逆転電位 (-10 mV 付近) には到達せず、光応答が消失することもなかった。単相性水平細胞に活動電位が発生したとき、二相性水平細胞の膜電位は正方向 (上向き矢印) へ、また単相性水平細胞の活動電位が再分極したとき、二相性水平細胞の膜電位は負の方向へと移動した。第1番目の活動電位の再分極は緩やかであったが、このとき二相性水平細胞の膜電位の負方向への変移も緩やかであった。第2番目の活動電位では再分極が突然生じたため、二相性水平細胞の膜電位の負方向への移動も急であった (下向き矢印)。

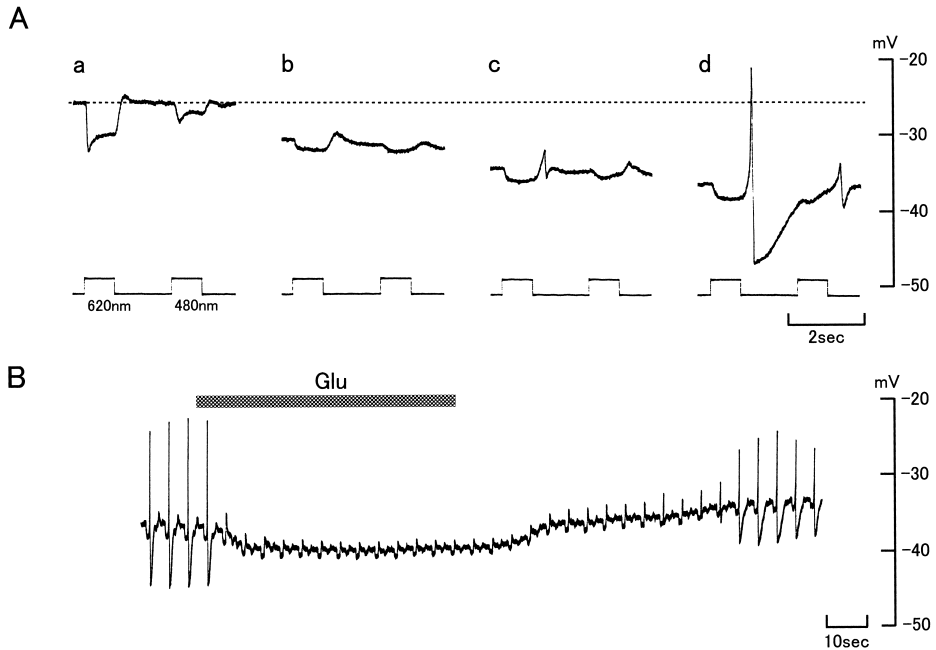
を刺入し、両細胞の膜電位変化を同時記録した (第4図)。修飾リンガー液の灌流中、単相性水平細胞の暗時の膜電位は約 -60 mV 付近にあり、 480 nm よりも 620 nm の単色光照射に対し大きな過分極応答を発生した (第4図 A)。二相性水平細胞の膜電位はカルシウム活動電位のプラトー電位 (約 $+20$ mV) に保持されており、 480 nm と 620 nm の単色光照射に対し概ね同じ振幅の光応答を発生した (第4図 B)。二相性水平細胞の光応答の極性は、暗時の膜電位で惹起される光応答と反対であった。L-グルタミン酸 (2 mM) を投与すると、単

相性水平細胞は微かに脱分極し、カルシウム活動電位を発生した（第4図A）。膜電位がプラトー電位に保持されている二相性水平細胞では、L-グルタミン酸の投与によって膜電位は負の方向（グルタミン酸応答の逆転電位）に移動した（第4図B）。L-グルタミン酸の濃度が低く且つ投与時間が短かったため、何れの水平細胞でも膜電位がグルタミン酸応答の逆転電位（ -10 mV 付近）に到達することはなく、また光応答が完全に消失することもなかった。单相性水平細胞に活動電位が発生したとき、二相性水平細胞の膜電位は正方向（第4図Bの上向き矢印）へ、また单相性水平細胞の活動電位が再分極したとき、二相性水平細胞の膜電位は負の方向へと移動した。单相性水平細胞に発生した第1番目の活動電位の再分極は緩やかであったが、このとき二相性水平細胞の膜電位の変移（負方向への変移）も緩やかであった。第2番目の活動電位では再分極が突然生じたが、このとき二相性水平細胞の膜電位の負方向への変移も急であった（第4図Bの下向き矢印）。单相性水平細胞と二相性水平細胞からの同時記録を四ペアで行ったが、何れも同様の結果であった。また、二相性水平細胞に発生した活動電位が单相性水平細胞の膜電位に影響することはなかった（図は省略）。

以上の結果は、本実験で用いたリンガー液が Tris（ 5 mM ）を含んでいることを考慮すれば、水平細胞から錐体への抑制信号伝播が細胞外 pH 説ではなく、抑制性シナプス説による可能性が高いことを示している（つまり、单相性水平細胞 → 緑色錐体 → 二相性水平細胞）。本実験（第4図）では、二相性水平細胞の膜電位が活動電位のプラトー電位レベルにあったため、单相性水平細胞の脱分極が二相性水平細胞の膜電位を正方向に変移させたが、もし二相性水平細胞の膜電位が暗時の膜電位レベルにあれば、单相性水平細胞の脱分極は二相性水平細胞を過分極させたに違いない。

錐体のグルタミン酸応答

水平細胞から錐体への抑制信号の伝播に関し、抑制性シナプス説以外に、細胞外電流説や細胞外 pH 説が提唱されている。何れの説においても、錐体に抑制信号を形成するために水平細胞の膜電位変化（脱分極）は不可欠である。第5図に示す実験では、水平細胞に対し脱分極効果（第3図参照）を示す L-グルタミン酸が赤色錐体の膜電位にどのような影響を及ぼすのかを調べた。正常リンガー液の灌流中、赤色錐体の暗時の膜電位は -26 mV であった。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換すると、暗時の膜電位は徐々に過分極し、約8分後に -36 mV に達した（第5図Aa ~ Ad）。 620 nm と 480 nm の単色光に対する電位応答は、修飾リンガー液の灌流時間が長くなるにつれて減少する傾向にあった。修飾リンガー液の灌流に伴うこれらの変化（過分極と光応答の減少）は、高濃度の Ca^{2+} の影響であると推測された（例えば、Bertrand, *et al.*, 1978; Piccolino & Gerschenfeld, 1980）。修飾リンガー液を灌流して数分経過すると、光応答終了時に時間経過の緩やかな後過分極を伴う一過性脱分極



第5図 赤色錐体に対するL-グルタミン酸の効果

正常リンガー液で網膜を灌流しているとき、赤色錐体の暗時の膜電位は -26 mVであった(A)。正常リンガー液を修飾リンガー液に置換し灌流すると、暗時の膜電位は徐々に過分極し、 -36 mVに達した(Aa ~ Ad; 2分毎に表示)。620 nmと480 nmの単色光に対する電位応答は、修飾リンガー液の灌流時間が長くなるにつれて減少した。このとき、光応答の終了時に一過性の脱分極応答が発生するようになった。この活動電位は、時間経過の緩やかな後過分極を伴っていた。修飾リンガー液には各種カリウムチャンネル阻害剤が含まれていることを考慮すると、後過分極応答の発生にはカルシウム依存性クロライドチャンネルの活性化が関与している可能性が高い。L-グルタミン酸(Glu; 5 mM)を投与すると、赤色錐体の膜電位は過分極し、同時に光応答振幅も著しく減少した(B)。L-グルタミン酸投与に伴い錐体が過分極している間は、一過性のカルシウム活動電位の発生も抑えられた。

が出現するようになった。この一過性脱分極はテトロドトキシン(TTX)投与では抑制されず、コバルトイオン(Co^{2+})投与で抑制された(図は省略)。従って、一過性脱分極はカルシウム活動電位と考えられた。修飾リンガー液に各種のカリウムチャンネル阻害剤が含まれていることを考慮すれば、活動電位に引き続いて発生した後過分極応答はカルシウム依存性クロライドチャンネルの活性化が主因であろうと推測された。L-グルタミン酸(5 mM)を投与すると、赤色錐体は過分極し、同時に光応答振幅も減少した。L-グルタミン酸投与に伴い赤色膜電位が過分極状態に保持されている間は、カルシウム活動電位の発生も抑えられた。同様の実験を正常リンガー液の灌流中に実施したが、赤色錐体の膜電位に顕著な変化は認められなかった。ただし、微かな膜電位変化(1~2 mV以下の電位変化; 脱分極のときもあれば、過分極のときもあった)を示す錐体が少数存在した。

Cl^- の平衡電位が暗時の膜電位よりも過分極側にある可能性（第5図の実験）を考慮すれば、以上の結果は、L-グルタミン酸の投与に伴い単相性水平細胞に発生した活動電位がGABA放出を促進し、赤色錐体の終末部に発現するGABA_A受容体を活性化（クロライドチャンネルの活性化〔開口〕）することによって、赤色錐体を過分極したことを示唆している。つまり、水平細胞から錐体への抑制信号伝播のメカニズムとして、コイ網膜では抑制性シナプスが主に機能していることを示唆している。

考 察

水平細胞から錐体への抑制性シナプス

水平細胞にはGABAトランスポーターが発現し、このトランスポーターを介してGABAが細胞内から細胞外に輸送（放出）されると考えられている（Lam & Steinman, 1971; Lam, 1975; Lam *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 1978; Schwartz, 1982, 1987, 2002）。放出されたGABAはシナプス間隙を拡散し、錐体終末部に発現するGABA_A受容体に到達する筈である。Kaneko & Tachibana（1986）は、カメ網膜から単離した錐体のシナプス終末部にGABA_A受容体が発現し、この受容体の活性化によって錐体に過分極が生じる可能性があることを報告している。また、Murakami *et al.*（1982a, b）はコイ網膜の単相性水平細胞の膜電位ならびに光応答がGABA_A受容体のアゴニストやアンタゴニストにより修飾されること、さらに赤色錐体の膜電位ならびに電気刺激によって発生する抑制性シナプス電位（IPSP）がリンガー液に添加したGABAの影響を受けることを報告している。これらの研究成果と錐体における Cl^- の平衡電位が暗時の膜電位よりも過分極側にあること（第5図の実験）を考慮すれば、水平細胞の放出したGABAが錐体終末部に発現するGABA_A受容体（抑制性シナプス受容体）を活性化して錐体に過分極を生み、この結果生じる電位依存性カルシウムチャンネル活性の低下が錐体からのL-グルタミン酸の放出量を減少させる経路（抑制性シナプス説）がコイ網膜で機能している可能性は高い。

L-グルタミン酸投与に伴う錐体の過分極

錐体終末部には、代謝調節型グルタミン酸受容体が発現していることが知られている（Koulen *et al.*, 1999; Hosoi *et al.*, 2005）。この受容体にL-グルタミン酸が結合すると、①細胞内のGタンパク質系を介したカルシウムチャンネル活性の抑制、あるいは②細胞内のcAMP系を介したカリウムチャンネルの活性化 → 細胞の過分極 → カルシウムチャンネル活性の低下、の何れかが生じると考えられている（Takahashi, *et al.*, 1996; Dolphin, 1998; Cartmell & Schoepp, 2000）。Hirasawa *et al.*（2002）は、コイ網膜錐体に発現する代謝調節型グルタ

ミン酸受容体の性質を調べ、上記①でなく、②の可能性が高いことを見出した。②に関係するカリウムチャンネルの活性は、低濃度の 4-AP で抑えられることが知られている (Cartmell & Schoepp, 2000)。本研究で用いた修飾リンガー液は高濃度の 4-AP (10 mM) を含んでいるため、上記②に関与するカリウムチャンネルが活性化することはない。従って、L-グルタミン酸投与に伴う赤色錐体の過分極 (第 5 図) が代謝調節型グルタミン酸受容体の活性化に伴い発生している可能性は少ない。ただし、正常リンガー液の灌流中、少数の錐体で観察された微かな過分極 (2 mV 以下) が代謝調節型グルタミン酸受容体の活性化に伴い発生している可能性は否定できない。

錐体終末部には、起電性グルタミン酸トランスポーターが発現していることが知られている (Eliasof *et al.*, 1988a, b; Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993)。このトランスポーターが L-グルタミン酸を取り込む際、主にナトリウムイオン (Na^+) 由来の内向き電流が発生する。また、このトランスポーターにはクロライドチャンネルがカップルしていることが知られており、このクロライドチャンネル電流もトランスポーターによる取り込み電流の発生に寄与していると考えられている (Eliasof & Jahr, 1996)。単離したカメ網膜錐体では L-グルタミン酸の取り込みに際しトランスポーター電流が発生し、しかもこの電流は総ての膜電位に亘って内向きであることが報じられている (Tachibana & Kaneko, 1988)。これらの研究成果を勘案すると、グルタミン酸トランスポーターを介して L-グルタミン酸が錐体内に取り込まれるとき、錐体は脱分極すると推測される。しかし、本実験で赤色錐体に観察されたグルタミン酸電流は過分極性であり、グルタミン酸トランスポーターが関与している可能性はない。ただし、正常リンガー液の灌流中、少数の錐体で観察された微かな脱分極 (2 mV 以下) がこのトランスポーターの活性に伴い発生している可能性は否定できない。

Hirasawa & Kaneko (2003) が発表した細胞外 pH 説では、水平細胞の膜電位変化が錐体と水平細胞間のシナプス間隙の pH を変え、この変化が錐体のカルシウムチャンネルの電位依存性ならびに活性に影響し、最終的に錐体が放出する L-グルタミン酸量の増減を生む。この説に従えば、リンガー液に L-グルタミン酸を添加し網膜に投与したとき、水平細胞は脱分極 (本実験では、カルシウム活動電位の発生) し、この脱分極がシナプス間隙を酸性化することによって錐体終末部のカルシウムチャンネル活性を低下させる筈である。この結果、カルシウム電流の減少が生じ、錐体は過分極すると考えられる。しかし、本研究で用いたリンガー液は Tris (5 mM) を含んでいるため、シナプス間隙の pH 変化が大きく変わることは考え難く、従って L-グルタミン酸投与に伴う錐体の過分極 (第 5 図) を細胞外 pH 説だけで説明するのは難しい。5 mM の Tris が細胞外の pH 変化を十分に抑える濃度であるのか否かについては、今後さらに検討する必要がある。

細胞外電流説を否定する報告 (Dmitriev & Mangel, 2006; Cadetti & Thoreson, 2006) なら

びに細胞外 pH 説に否定的な本研究結果を考慮すると、水平細胞から錐体への抑制信号の伝播に関し、コイ網膜では依然抑制性シナプス説が有力であると考えられる。

引用文献

- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **265**: 428–436.
- Baldrige, W. H., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1998), The modulation of intracellular coupling in the retina, *Sem. Cell Develop. Biol.*, **9**: 311–318.
- Bertrand, D., Fourtes, M. G. F. and Pochobradsky, J. (1978), Actions of EGTA and high calcium in the cones of the turtle retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **275**: 419–437.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. (1993), Synaptic feedback, depolarization, and color opponency in cone photoreceptors, *Visual Neurosci.*, **10**: 981–989.
- Burkhardt, D. A. and Hassin G. (1978), Influences of cones upon chromatic- and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas, *J. Physiol. (Lond.)*, **281**: 125–137.
- Byzov, A. L. and Shura-Bura, T. M. (1986), Electrical feedback mechanism in the processing of signals in the outer plexiform layer of the retina, *Vision Res.*, **26**: 33–44.
- Cadetti, L. and Thoreson, W. B. (2006), Feedback effects of horizontal cell membrane potential on cone calcium currents studied with simultaneous recordings, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1992–1995.
- Carmell, J. and Schoepp, D. D. (2000), Regulation of neurotransmitter release by Metabotropic glutamate receptors, *J. Neurochem.*, **75**: 889–907.
- Dmitriev, A. V. and Mangel, A. C. (2006), Electrical feedback in the cone pedicle: A Computational analysis, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1419–1427.
- Dolphin, A. C. (1998), Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G-protein, *J. Physiol.*, **506**: 3–11.
- Eliasof, S. & Jahr, C. E. (1996), Retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an Anionic conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 4153–4158.
- Eliasof, S. and Werblin, F. (1993), Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander, *J. Neurosci.*, **113**: 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.
- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca^{2+} channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Hirasawa, H., Shiells, R. and Yamada, M. (2002), A metabotropic glutamate receptor regulates transmitter release from cone presynaptic terminals in carp retinal slices, *J. Gen. Physiol.*, **119**: 55–68.
- Hosoi, N., Arai, I. and Tachibana, M. (2005), Group III metabotropic glutamate receptors and exocytosed protons inhibit L-type calcium currents in cones but not in rods, *J. Neurosci.*, **25**: 4062–4072.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Blenhold, U., Sjoerdsma, T. and Weiler, R. (2001), Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina, *Science*, **292**: 1178–1180.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1986), Effects of γ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **373**: 443–461.
- Koulen, P., Kuhn, R., Wässle, H. and Brandstätter, J. H., (1999), Modulation of the intracellular calcium con-

- centration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**: 9909–9914.
- Lam, D. M. K. (1975), Biosynthesis of γ -aminobutyric acid by isolated axons of cone horizontal cells in the goldfish retina, *Nature*, **254**: 345–347.
- Lam, D. M. K., and Steinman, L. (1971), The uptake of [γ - 3 H]aminobutyric acid in the goldfish retina, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**: 2777–2781.
- Lam, D. M. K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978), γ -aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 6310–6313.
- MacNichol., E. F. Jr. and Svaetichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalm.*, **46**: 29–46.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABA-ergic pathway in the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–245.
- 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.
- 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.
- 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., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **223**: 449–460.
- Piccolino, M. and Gerschenfeld, H. M. (1980), Characteristics and ionic processes involved in feedback spikes of turtle cones, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **206**: 439–463.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- 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.
- Schwartz, E. A. (2002), Transport-mediated synapses in the retina, *Physiol. Rev.*, **82**: 875–891.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 473–502.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- 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. U.S.A.*, **85**: 5315–5319.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1987), Reversal potentials of rod horizontal cell responses in the carp retina, *Neurosci. Res., Suppl.* **6**: 165–174.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1988), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, *Neurosci. Res.*, **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.

- Takahashi, T., Forsythe, I. D., Tsujimoto, M., Barnes-Davies, M. and Onodera, K., (1996), Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor, *Science*, **274**: 594–597.
- Thoreson, W. B. and Burkhardt, D. A. (1990), Effects of synaptic clamping agents on the depolarizing responses of turtle cones evoked by surround illumination, *Visual Neurosci.*, **5**: 571–583
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single cones in the carp, *Vision Res.*, **2**: 519–531.
- Toyoda, J.-I. And Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400
- Tsukamoto, Y., Yamada, M. and Kaneko, A. (1987), Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals, *J. Comp. Neurol.*, **255**: 305–316.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93–101.
- Verweij, J., Kamermans, M. and Sperkrijse, H. (1996), Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium-current activation range, *Vision Res.*, **36**: 3943–3953.
- Verweij, J., Hornstein, E. P. and Schnapf, J. L. (2003), Surround antagonism in macaque cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **23**: 10249–10257.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Witkovsky, P., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 3556–3560.
- Witkovsky, P., Owen, W. G. and Woodworth, M. (1983), Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina, *J. Comp. Neurol.*, **216**: 359–368.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinæ, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.