

アメリカナマズ網膜水平細胞に発現するヘミギャップ結合 チャンネルの cAMP 系による開閉制御

高橋 恭一

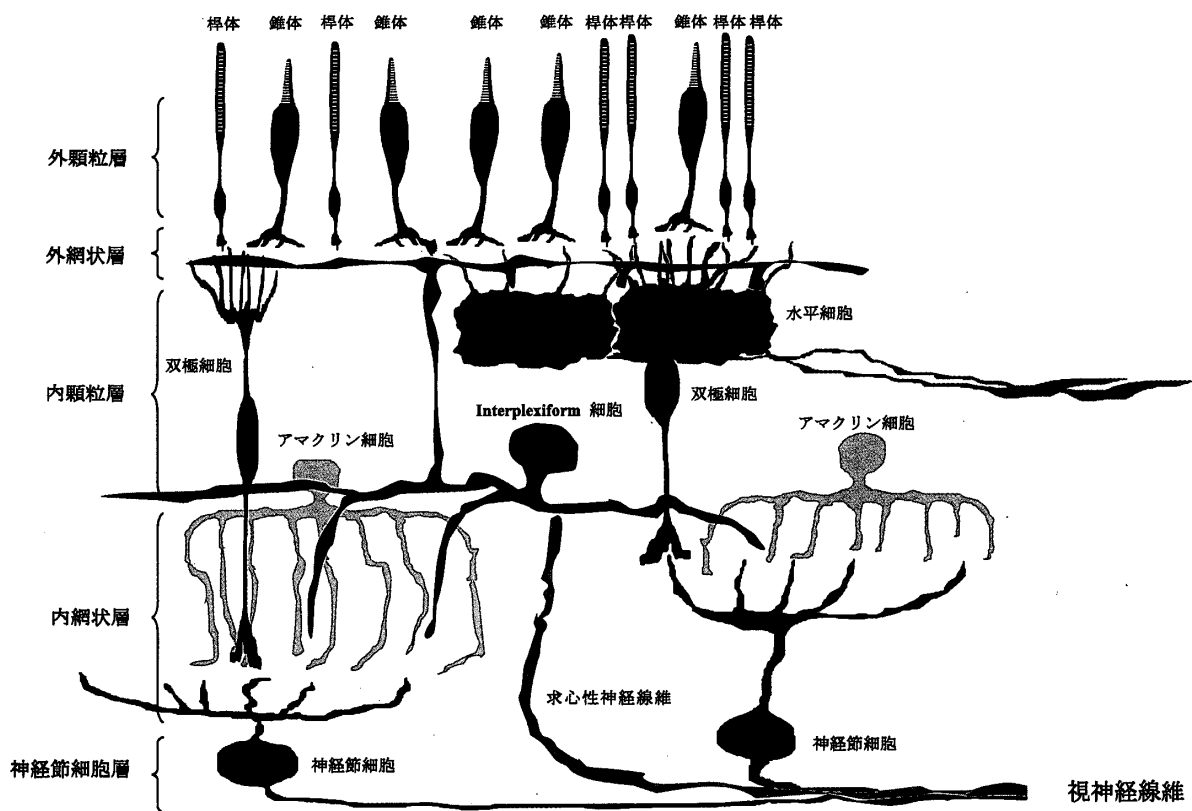
(受付 1999年5月6日)

序 論

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞、神経節細胞）からなる（第1図）。この中で、光感受性を有するのは視細胞のみで、残りの神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞でキャッチされた光情報は電気信号に変換され、網膜縦方向に配置した細胞群（視細胞、双極細胞および神経節細胞）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）による特徴抽出過程（例えば、明暗視、形態視や色覚の初期過程）を経て、脳へと伝達される。脳内ではさらに高度な情報処理が行われ、明暗視、形態視や色覚以外に、立体視や運動視といった視覚機能が付け加わる。

視細胞は、錐体と桿体に分類される。錐体は光感受性が低く昼光視（昼間の視覚）に、また桿体は光感受性が高く薄明視（夕方および夜間の視覚）に関与している。視細胞（錐体および桿体）は暗時にナトリウムイオン (Na^+) の透過性が高く、脱分極した状態にある (Penn & Hagins, 1969; Toyoda *et al.*, 1969; Hagins *et al.*, 1970)。光受容に伴い、視細胞の Na^+ 透過性は低下し、過分極する (Timita, 1965)。この明暗による視細胞の膜電位変化は、視細胞終末から放出される伝達物質 (L-グルタミン酸) 量に影響する (Trifonov, 1968; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989)。すなわち、暗時（視細胞の脱分極時）に伝達物質放出は多く、明時（視細胞の過分極）には減少あるいは停止する。視細胞から放出された伝達物質は細胞間隙を拡散し、第二神経細胞である双極細胞と水平細胞のシナプス受容体に結合 (Stell, 1967; Werblin & Dowling, 1969; Witkovsky & Dowling, 1969) し、これらの神経細胞に電位応答を惹起する。

双極細胞は、ON 中心型双極細胞と OFF 中心型双極細胞に分類される (Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 1973)。ON 中心型双極細胞は受容野中心部（双極細胞の樹状突起の広がりに対応する部分）への光照射により脱分極、また受容野周辺部（双極細胞の樹状突起の広がりよりも遥かに大きな部分）への光照射により過分極する。一方、OFF 中心型双極細胞は、ON 中心型双極細胞と逆極性の光応答を発生する。受容野中心部の光応答は、



第1図 脊椎動物網膜の細胞構築と Interplexiform 細胞のシナプス連絡

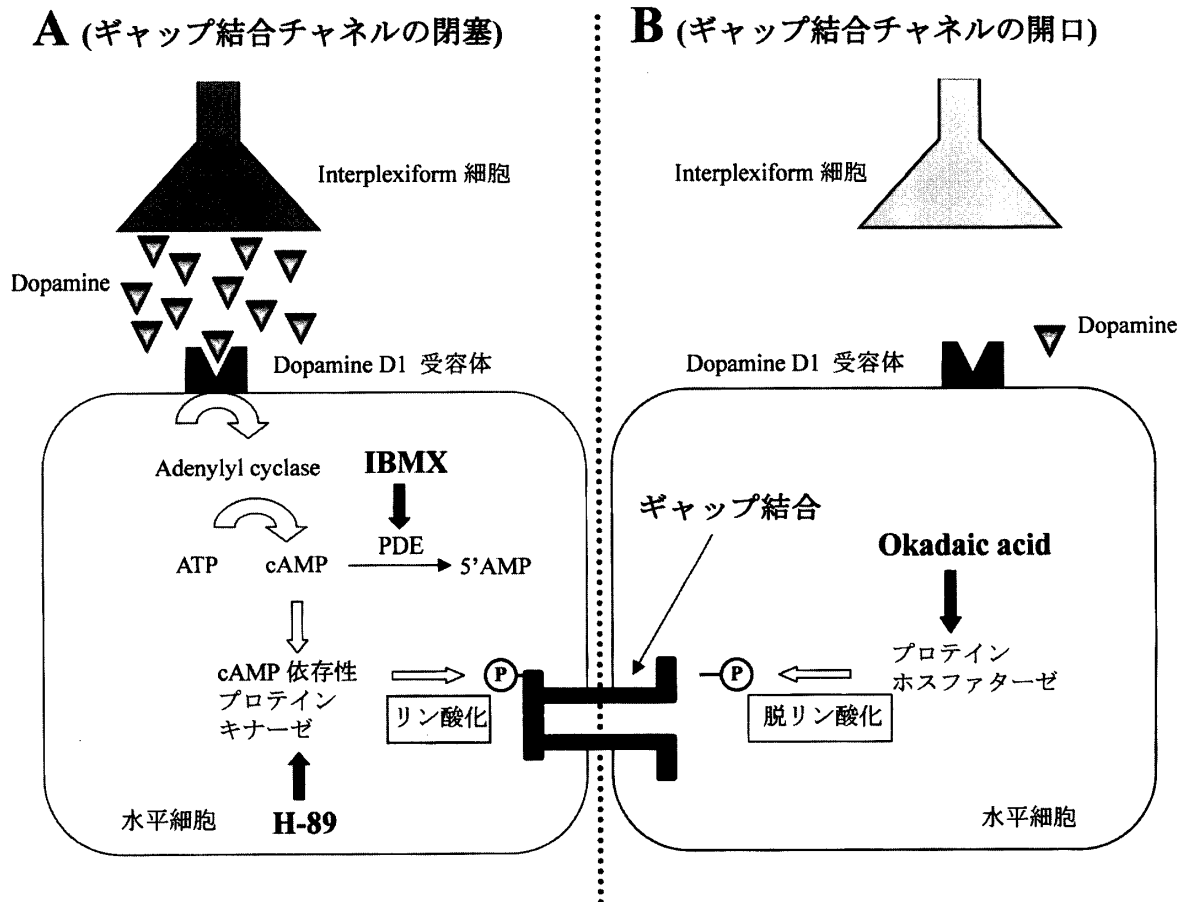
脊椎動物網膜は、基本的に5種類の神経細胞(視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞)からなる。光感受性を有するのは視細胞だけであり、残りの神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体(薄明視)と低い錐体(昼光視)に分類される。視細胞で受容された光情報は電気信号に変換され、網膜の縦方向に配置した細胞群(視細胞、双極細胞と神経節細胞)と横方向に配置した細胞群(水平細胞およびアマクリン細胞)による情報処理(特徴抽出)を経て、脳にまで伝達される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、および双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分を内顆粒層と呼ぶ。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。神経節細胞の軸索は視神経となって網膜を出て、外側膝状体(脳)に連絡する。Dowling & Ehinger (1975) は内網状層と外網状層を繋ぐ第6番目の神経細胞が存在することを見出し、Interplexiform 細胞(図中赤色)と名付けた。現在、形態学および組織化学的手法により、このInterplexiform 細胞はDopamine 作動性細胞とグリシン作動性細胞の2種類に分類される。Dopamine 作動性 Interplexiform 細胞は遠心性(脳から網膜への情報伝達を介在する神経細胞)(Dowling & Ehinger, 1975, 1978; Dowling, 1990)、一方グリシン作動性 Interplexiform 細胞は求心性(網膜から脳への情報伝達を介在する神経細胞)(Marc & Liu, 1984; Kalloniatis & Marc, 1989, 1990)であると考えられている。Dopamine 作動性 Interplexiform 細胞は、脳からの遠心性神経線維(図中橙色)およびアマクリン細胞(図中薄緑色)からシナプス入力を受け、水平細胞(図中薄青色)や双極細胞(図中青色)にシナプス出力している。外網状層で放出されたDopamineは、水平細胞や双極細胞のDopamine 受容体の活性化を介し、電気シナプス(ギャップ結合)を調節していることが明らかとなっている(Hedden & Dowling, 1978; Teranishi *et al.*, 1983, 1984; Dowling, 1986; Mangel & Dowling, 1987; Hankins, 1996)。グリシン作動性 Interplexiform 細胞の機能は、未だ明らかになっていない。

双極細胞と直接シナプス結合する視細胞からの入力を反映している。現在、ON 中心型双極細胞には 2-Amino-4-phosphobutyric acid (APB) 感受性グルタミン酸受容体 (代謝調節型グルタミン酸受容体) が、また OFF 中心型双極細胞には Kainic acid (KA)/(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 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) が存在し、それぞれの受容野中心部光応答を形成していることが明らかとなっている (Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Shiells *et al.*, 1981; Slaughter & Miller, 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)。一方、受容野周辺部の光応答は、水平細胞からの間接的な入力 (水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプス) により形成されと考えられている。(Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978)。双極細胞の出力は第三次神経細胞であるアマクリン細胞と神経節細胞に収斂し、最終的に視神経 (神経節細胞の軸索) を介して ON 経路 (たぶん、明情報の伝達経路) と OFF 経路 (たぶん、暗情報の伝達経路) として脳に伝達される。

下等脊椎動物の水平細胞は、明暗情報処理型 (Luminosity type) 水平細胞と色情報処理型 (Chromaticity type) 水平細胞に分類される (MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1965)。明暗情報処理型水平細胞は可視域波長の総てに対し過分極性応答を示すが、色情報処理型水平細胞では波長に依存して応答極性が変わる。明暗情報型水平細胞の過分極性光応答は、OFF 中心型双極細胞の受容野中心部光応答と同様に、この細胞と直接シナプス結合する視細胞からの入力 (興奮性シナプス入力) を反映している。また、色情報処理型水平細胞の光応答は、この細胞と直接シナプス結合 (興奮性シナプス) する視細胞からの入力と、水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプス (抑制性シナプス) を介する入力により形成される (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。何れの型の水平細胞も、視細胞からの直接的なシナプス入力は KA/AMPA 型グルタミン酸受容体を介している (Lasater & Dowling, 1982; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Lasater *et al.*, 1984; Ishida & Neyton, 1985; Takahashi & Murakami, 1988; Lasater, 1990; Laufer *et al.*, 1996)。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、電位変化は電気緊張的に周辺に伝播する (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Stell & Lightfoot, 1975; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldrige *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993)。このため、水平細胞の受容野は樹状突起の広がりよりも遥かに大きい。水平細胞のギャップ結合は、細胞体間、軸索終末間のみならず軸索間にも見られる (Yamada & Ishikawa, 1965; Witkovsky & Dowling, 1969; Stell & Lightfoot, 1975; Kouyama & Watanabe, 1989)。このギャップ結合は、細胞外の Dopamine ならびに細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+})、水素イ

オン (H^+), cyclic Adenine 3', 5'-monophosphate (cAMP), cAMP 依存性プロテインキナーゼ, cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP), cGMP 依存性プロテインキナーゼ, アラキドン酸などにより調節されていることが知られている (Mangel & Dowling, 1985, 1987; Lasater, 1987; Shigematsu & Yamada, 1988; Laufer *et al.*, 1989; DeVries & Schwartz, 1989, 1992; Miyachi & Murakami, 1989, 1991; Miyachi *et al.*, 1990, 1991, 1994; McMahon, 1994; Dixon *et al.*, 1996; 高橋, 1999)。

Dowling & Ehinger (1975, 1978) は, 細胞体が内顆粒層 (アマクリン細胞の細胞体の付近) に存在し, この樹状突起が外網状層内および内網状層内でシナプスを形成している第 6 番目の神経細胞をキンギョ網膜内に見出し, これを Interplexiform 細胞と名付けた (第 1 図参照)。魚類の Interplexiform 細胞は組織化学的に Dopamine 作動性 (Dowling & Ehinger, 1975, 1978) とグリシン作動性 (Marc & Liu, 1984; Müller & Marc, 1990) の 2 種類に分類される。Dopamine 作動性 Interplexiform 細胞は求心性神経細胞として, グリシン作動性細胞は遠心性神経細胞として機能している (Zucker & Dowling, 1987; Marc & Liu, 1984; Kalloniatis & Marc, 1990)。Dopamine 作動性 Interplexiform 細胞はアマクリン細胞ならびに脳の求心性神経細胞からシナプス入力を受け取り, 水平細胞と双極細胞に出力している (第 1 図参照) (Zucker & Dowling, 1987; Yazulla & Zucker, 1988)。特に, 水平細胞に対する Dopamine の作用はよく調べられている (Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1979a, b, c; Laufer, 1982; Teranishi *et al.*, 1983, 1984; Piccolino *et al.*, 1984; Shigematsu & Yamada, 1988; Tornqvist, *et al.*, 1988)。Dopamine が水平細胞の Dopamine D1 受容体に結合すると, 促進性 GTP 結合タンパク質の活性化を介して, Adenyl cyclase (細胞膜結合型酵素) を活性化する (Dowling & Watling, 1981; Watling & Dowling, 1981; Piccolino *et al.*, 1987)。この酵素は Adenosine 5'-triphosphate (ATP) を基質として, cAMP を合成する。cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化 (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989) し, 細胞内タンパク質をリン酸化する。この結果, ギャップ結合チャンネルは閉塞する (第 2 図) (Van Buskirk & Dowling, 1981; Lasater & Dowling, 1985b; Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。現在, リン酸化されるタンパク質候補として, ギャップ結合チャンネルタンパク質が有力である (Lasater, 1987; Janssen *et al.*, 1993; McMahon *et al.*, 1994)。Interplexiform 細胞からの Dopamine 放出は長時間暗順応すると増加することが報告 (Mangel & Dowling, 1985, 1987; Tornqvist, 1988; Yang *et al.*, 1988a, b) され, 多くの研究者はこの結果を支持している。しかし, 明順応後に増加するという報告 (Shigematsu & Yamada, 1988; Baldrige & Ball, 1991; Dong & McReynolds, 1991; Umino *et al.*, 1991; Weiler & Akopian, 1992; Hankins, 1996) もあり, Dopamine 放出のタイミングを確定するにはもう暫く時間がかかりそうである。



第2図 Dopamine D1 受容体を介するギャップ結合チャンネルの制御

A: Interplexiform 細胞から放出された Dopamine が水平細胞の Dopamine D1 受容体に結合すると、促進性 GTP 結合タンパク質の活性化を介して Adenylyl cyclase (細胞膜結合型酵素) 活性が上昇する (Watling & Dowling, 1981; Dowling & Watling, 1981; Piccolino *et al.*, 1987)。この酵素は、ATP を基質として cAMP を合成する。cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化 (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989) し、細胞内タンパク質をリン酸化する (Van Buskirk & Dowling, 1981; Lasater & Dowling, 1985b; Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。このリン酸化は、ギャップ結合チャンネルを閉塞する。現在、プロテインキナーゼによりリン酸化される細胞内タンパク質候補として、ギャップ結合チャンネルタンパク質が有力である (Lasater, 1987; Janssen *et al.*, 1993; McMahon *et al.*, 1994)。B: 細胞外の Dopamine 量が減少すれば、水平細胞内の cAMP 合成は減少あるいは停止し、細胞内タンパク質のリン酸化は減少あるいは停止する。この結果、ギャップ結合チャンネルの閉塞は止まる。閉塞したギャップ結合チャンネルを開くには、リン酸化したタンパク質を脱リン酸化する必要があると考えられている。この脱リン酸化に、プロテインホスファターゼが関与している。ギャップ結合チャンネルの開閉が、Dopamine D1 受容体系を介した細胞内タンパク質のリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸化によることを確かめるため、阻害剤を用いた薬理学的研究は極めて有効である。今回、IBMX (PDE 阻害剤) (第5図 B)、H-89 (cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤) (第6図) ならびに Okadaic acid (プロテインホスファターゼ阻害剤) (第7図) の効果を調べた。何れの阻害剤も、ヘミギャップ結合チャンネル電流に影響した。

水平細胞間ギャップ結合チャネルの閉塞に、Dopamine→Adenylyl cyclase→cAMP→cAMP依存性プロテインキナーゼ系による細胞内タンパク質（たぶん、ギャップ結合チャネルタンパク質）のリン酸化が関与していることは間違いない。このチャネルを開口するため、リン酸化したタンパク質の脱リン酸化が不可欠であると考えられているが、未だ証拠は得られていない。今回、ギャップ結合チャネルの開口に細胞内タンパク質の脱リン酸化が関与しているのか否かを、アメリカナマズ網膜から単離・培養した水平細胞に発現しているヘミギャップ結合チャネルを用いて調べた。

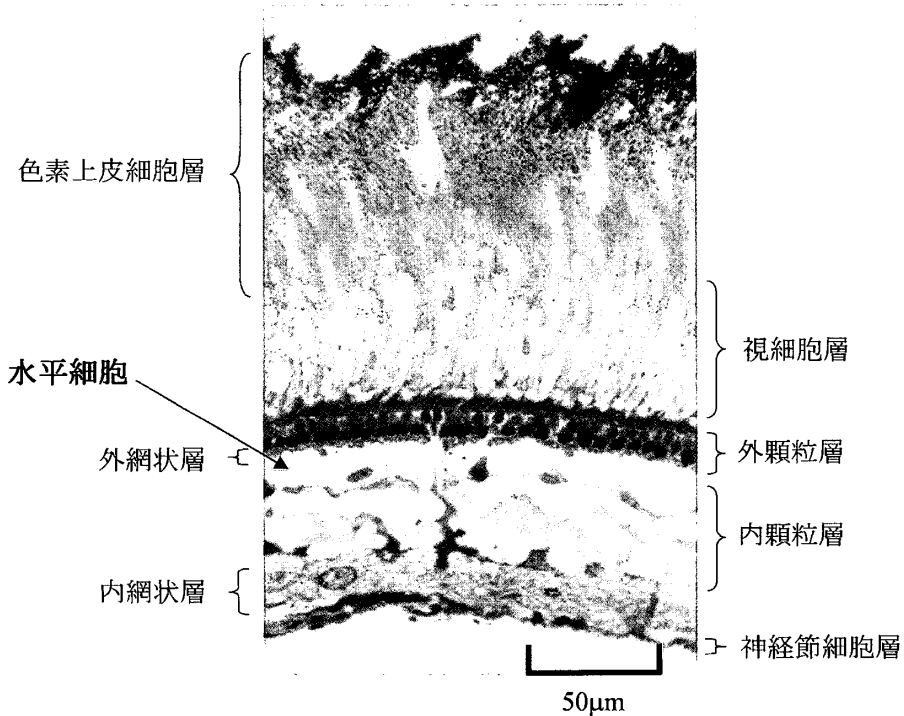
実験材料と方法

実験には、体長約 40 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。ナマズを数時間暗順応させた後、断頭し、眼球を摘出した。この眼球を70%エタノール中に約20秒間浸し、消毒した。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（第3図A参照）。剥離網膜を2 mm幅に切断し、Papain処理し水平細胞を単離した（Tachibana, 1981）。単離水平細胞は円形（直径12 mm）のカバーグラス上で培養し、実験には2日以上培養した細胞を用いた（第3図B参照）。培養液として、淡水魚類用に調整したL-15（14°C）液を用いた。アメリカナマズ網膜には、細胞体サイズ並びに形態が著しく異なる2種類の水平細胞（錐体水平細胞と桿体水平細胞）が存在する。培養下で、桿体水平細胞は死滅し、錐体水平細胞のみが生き残ったため、実験には錐体水平細胞を用いた。単離錐体水平細胞の付着したカバーグラスを倒立顕微鏡（TMD, Nikon）に装着した記録槽内に置き、リンガー液を細胞から200 μm ~300 μm の距離に置いたY-tube（直径150 μm ）を用いて灌流した。

アメリカナマズの正常リンガー液の組成は、125.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 2.6 mM 塩化カリウム (KCl), 5.0 mM 塩化カルシウム (CaCl_2), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2), 15.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。ヘミギャップ結合チャネルを活性化するために、無 Ca^{2+} リンガー液を灌流した。無 Ca^{2+} リンガー液の組成は、100.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 15.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 15.0 mM Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 20.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。電位依存性カリウムイオンチャネルの活性を抑えるため、CsClとTEA-Clをリンガー液に添加した。何れのリンガー液も、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いてpH7.8（実験によっては、pH7.5）に調整し灌流した。薬品類は浸透圧を考慮せずに、リンガー液に添加し、Y-tubeで投与した。Dopamineを含むリンガー液は、直ちに酸化する。これを防ぐため、予めAscorbic acid (1 mM) を添加したリンガー液にDopamineを加え用いた。

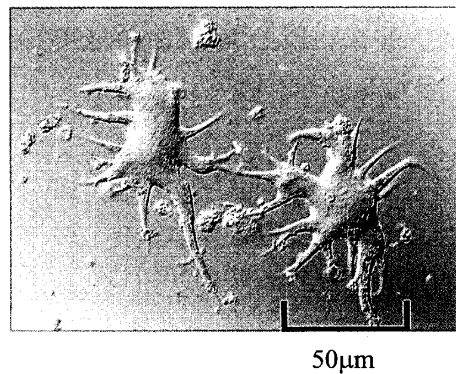
A

アメリカナマズ網膜の断面像



B

単離水平細胞



第3図 アメリカナマズ網膜の縦断切片 (A) および単離水平細胞 (B) の光学顕微鏡写真

A: 約5時間暗順応した体長約15cmのアメリカナマズから眼球を摘出し、4% Paraformaldehyde/0.1M-Phosphate buffer (pH7.4) を用いて4°Cで3時間固定し、0.1M-Phosphate buffer (pH7.4) で眼球を洗浄した後、20% Sucrose/0.1M-Phosphate buffer (pH7.4) 中に8時間保存した。眼球から網膜を剥離し、これを OCT 包埋剤 (Tissue Tek, Miles, Inc.) 中で凍結して、クリオスタットを用いて厚さ10mmの切片(網膜を光の入射方向に沿って切断)にした。切片をトルイジンブルーで染色し、顕微鏡観察した。この切片像から、網膜を構成する総ての神経細胞の形態を把握することは困難であるが、神経細胞の凡その配置ならびに外網状層や内網状層などの層構造を識別することは可能である。細胞体の大きい水平細胞は、他の神経細胞から容易に区別することができた(矢印)。B: 約8時間暗順応した体長約40cmのアメリカナマズから眼球を摘出し、網膜を剥離し、Tachibana (1981) の方法を用いて水平細胞を単離した(本文の材料と方法を参照)。単離後2日目の錐体水平細胞を、ノマルスキー型顕微鏡を用いて観察した。錐体水平細胞は長い軸索と太い軸索終末を有するが、単離操作の途中でこれらは消失し、細胞体と樹上突起のみが観察される。

標準パッチ電極内液の組成は 115.0 mM グルコン酸カリウム (K-gluconate), 15.0 mM CsCl, 15.0 mM TEA-Cl, 2.0 mM MgCl₂, 1.0 mM Ethylene glycol-bis (b-aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 1.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 10 mM HEPES であった。電位依存性カリウムチャネルの活性を抑えるため, CsCl と TEA-Cl をパッチ電極内液にも添加した。

Whole-cell voltage-clamp 法を適用し, 水平細胞を電圧固定し電流記録を行った (Hamil *et al.*, 1981)。パッチ電極は Brown-Flaming 型微小電極製作器 (P87, Sutter Instrument Co.) を使って, Borosilicate 性ガラス管 (SF2714R, Garner Glass) から作製した。電極抵抗は 5 MΩ~10 MΩ であった。水平細胞の膜電流は, 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, この信号は, FM データレコーダー (Store 4DS, Racal Recorders, Inc.) により磁気テープに, 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。必要に応じて, 電流応答を再生し, 解析した。電流解析には, IGOR (Wavemetrics Inc.) を用いた。

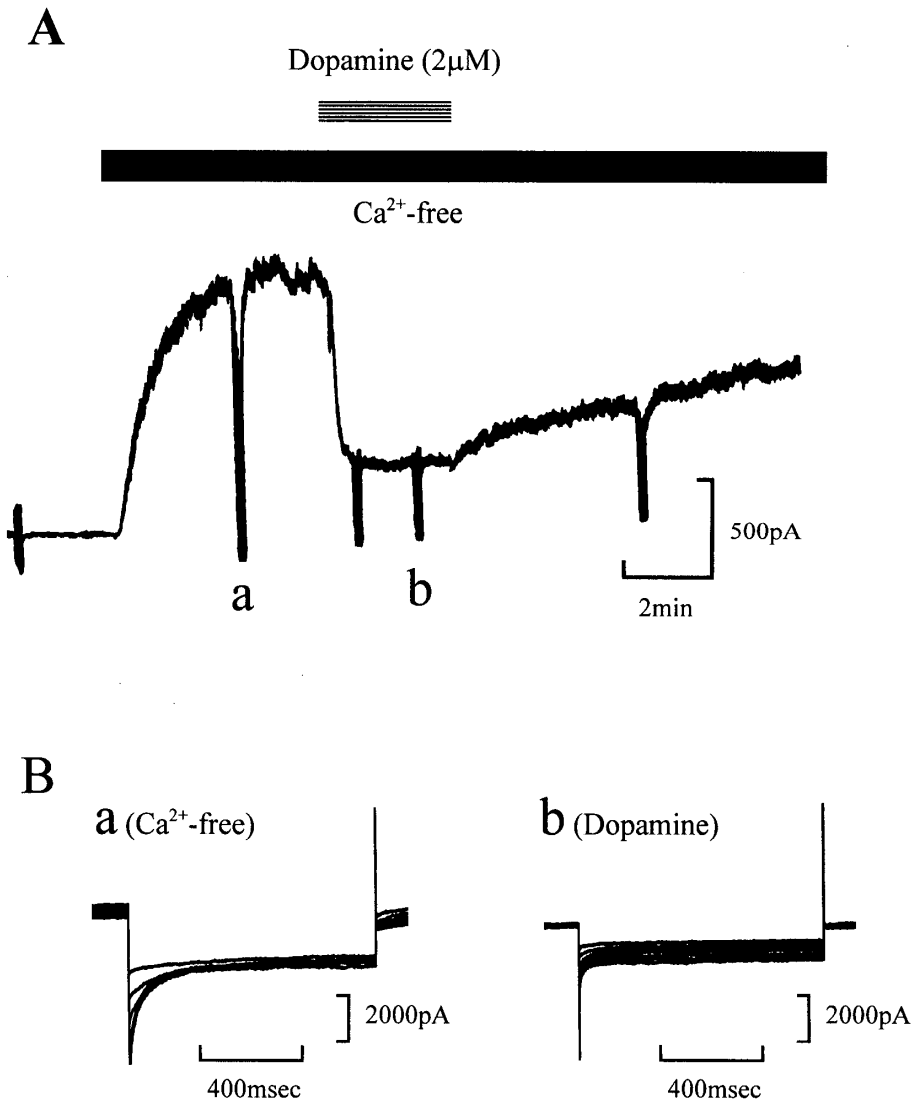
薬品類の多くは, Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co., N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide · 2HCl (H-89) は Biomol Research Labs Inc., Dopamine · HCl は Research Biochemical International, L-15, Okadaic acid および Thr-Thr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile NH₂(PKI(6-22)amide) は Gibco から購入した。

実験結果

ヘミギャップ結合チャネルの活性化

水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し, 膜電流を記録した。細胞外液の Ca²⁺を除去する(無 Ca²⁺リンガー液の灌流)と, 時間経過の緩やかな外向き電流が発生し, 数分後に定常状態に達した(第4図A)。また, 外向き電流発生に伴い, 膜電流ノイズが増加した。Dopamine (2 μM) (水平細胞のギャップ結合阻害剤) を無 Ca²⁺リンガー液に添加し水平細胞に投与すると, この外向き電流ならびに電流ノイズは著しく減少した(第4図A)。この電流は, Halothane (飽和濃度) (一般的なギャップ結合阻害剤) および 1-Octanol (4 mM) (一般的なギャップ結合阻害剤) によっても抑制された(高橋, 1999)。この結果から, 細胞外液の Ca²⁺除去により惹起された外向き電流は, ヘミギャップ結合チャネルの活性化によることが示唆された。

無 Ca²⁺リンガー液および Dopamine を添加した無 Ca²⁺リンガー液中で, +20 mV に固



第4図 Dopamine によるヘミギャップ結合チャネル電流の抑制

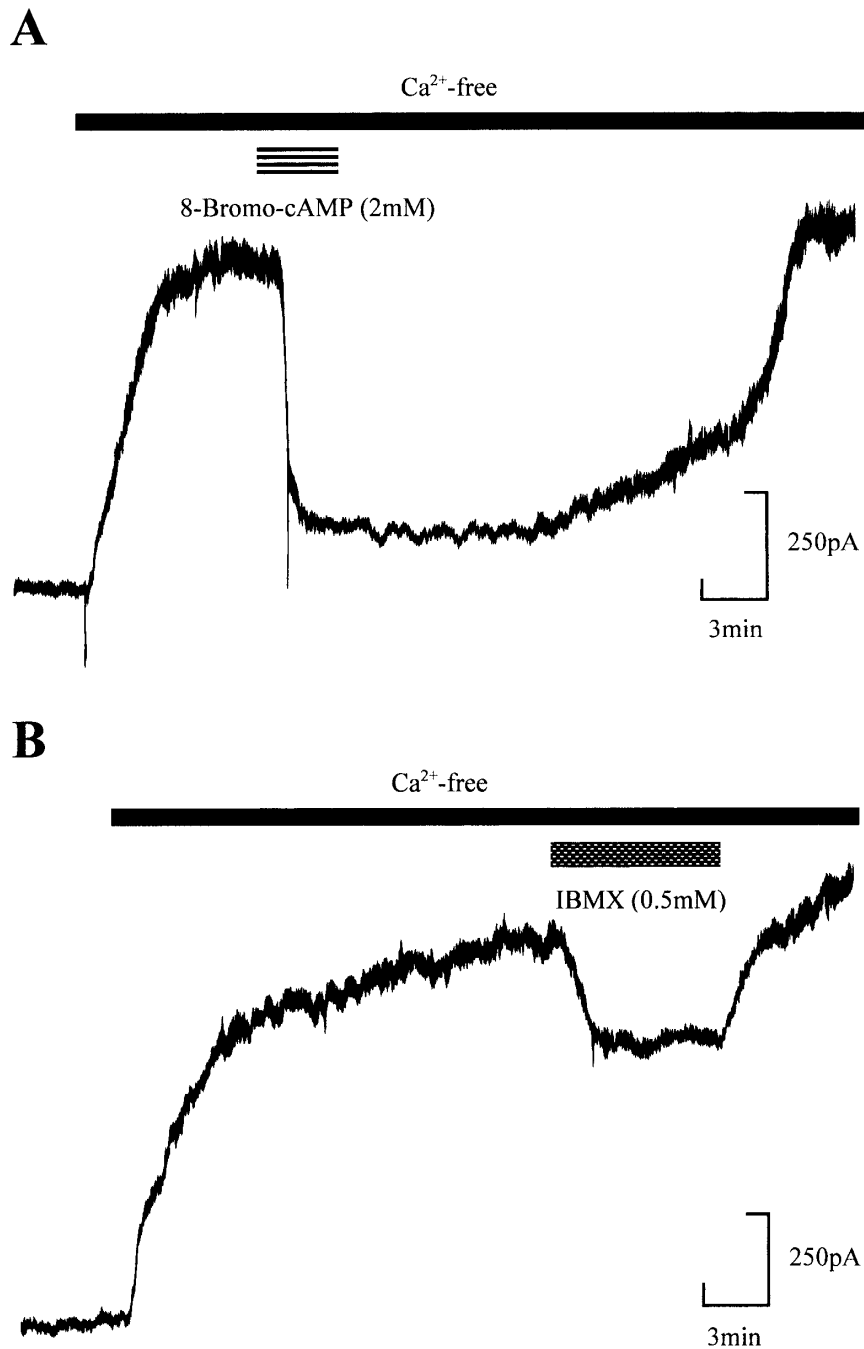
A: 水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。正常リンガー液を無 Ca²⁺リンガー液に置換すると、時間経過の極めて緩やかな外向き電流が発生し、数分後一定となった。このとき、膜電流ノイズも増加した。Dopamine (2 μ M) (水平細胞のギャップ結合阻害剤) を無 Ca²⁺リンガー液に添加し水平細胞に投与すると、この外向き電流ならびに電流ノイズは著しく減少した。B: 正常リンガー液中 (データを示してない)、無 Ca²⁺リンガー液中 (a)、Dopamine 存在下 (b) で、+20 mV に固定した膜電位を、-10 mV から -60 mV まで 10 mV 間隔で 1 秒間過分極させ、このとき発生する電流変化を記録した (A の記録で下向きに振れている部分)。正常リンガー液灌流中には、矩形波状の膜電位変化に対し大きな電流変化は発生しなかった (データを示してない)。無 Ca²⁺リンガー液を灌流すると、内向き電流が発生し、その後速やかに減少し定常状態に達した (a)。Dopamine 存在下で、この電流応答は著しく減少した (b)。以上から、細胞外 Ca²⁺ 除去に伴い水平細胞に発生する外向き電流はヘミギャップ結合チャネルの活性化によること、およびこのヘミギャップ結合チャネルは過分極電位で時間依存性の不活性化を示すことが明らかとなった。

定した電圧を、 -10 mV から -60 mV まで 10 mV 間隔で 1 秒間矩形波状に変化させ、その時に発生する膜電流変化を記録した (第 4 図 B)。正常リンガー液灌流中、矩形波状の膜電位変化に対し大きな電流変化は惹起されなかった (データは示してない)。無 Ca^{2+} リンガー液を灌流 (すなわち、ヘミギャップ結合チャネルの活性化中) すると、矩形波状の電圧変化に対し内向き電流 (一過性内向き成分) が発生し、その後速やかに減少し定常状態 (持続性成分) に達した (第 4 図 Ba)。この一過性内向き成分は、膜電位が過分極するほど増大した。しかし、持続性成分は膜電位を過分極しても増大せず、一定か寧ろ低下する傾向にあった。Dopamine を投与すると、一過性内向き成分ならびに持続性成分共に減少した (第 4 図 Bb)。おそらく、過分極に伴い発生した内向き電流はヘミギャップ結合チャネルの時間依存性の不活性化過程 (外向き電流の減少) を反映していると考えられる。

cAMP によるヘミギャップ結合チャネルの閉塞

Dopamine による水平細胞ギャップ結合チャネルの閉塞には、細胞内の cAMP 濃度増加が関与している (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989; McMahon *et al.*, 1989; 高橋, 1999) (第 2 図参照)。これを確かめるため、ヘミギャップ結合チャネル電流に対する 8-Bromoadenosine-3', 5'-cyclic monophosphate (8-Bromo-cAMP) (膜透過型非水解性 cAMP アナログ) の作用を調べた (第 5 図 A)。水平細胞の膜電位を $+20\text{ mV}$ に固定し、膜電流を記録した。細胞外液の Ca^{2+} を除去する (無 Ca^{2+} リンガー液の灌流) と、時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、数分後に定常状態に達した。8-Bromo-cAMP (2 mM) を無 Ca^{2+} リンガー液に添加し水平細胞に投与すると、Dopamine 投与の場合と同様に、外向き電流ならびに電流ノイズが減少した。8-Bromo-cAMP を細胞外液から除去すると、電流は元のレベルにまで回復した。回復に要する時間は、Dopamine 投与実験に比べて長かった。これは、細胞内に侵入した 8-Bromo-cAMP が細胞外に排出されるために時間を要したためと考えられる。同様の実験を 6 細胞で実施した結果、その総てにおいて 8-Bromo-cAMP は有効であった。この結果は、Dopamine によるヘミギャップ結合チャネルの閉塞に、Dopamine \rightarrow Adenyl cyclase \rightarrow cAMP 経路が関与しているという報告 (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989; McMahon *et al.*, 1989; 高橋, 1999) を支持している。

細胞内の cAMP は、Phosphodiesterase (PDE) により Adenosine 5'-monophosphate ($5'$ AMP) にまで加水分解される (第 2 図参照)。従って、PDE 活性を抑制すると cAMP 量が増加し、その結果ギャップ結合チャネルが閉塞することが予想される。これを確かめるため、ヘミギャップ結合チャネルに対する 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (PDE 阻害剤) の影響を調べた (第 5 図 B)。第 5 図 A の細胞とは別の水平細胞に、無 Ca^{2+} リンガー液に IBMX (0.5 mM) を添加し投与すると、外向き電流は約 30% 減少した。このとき、電流

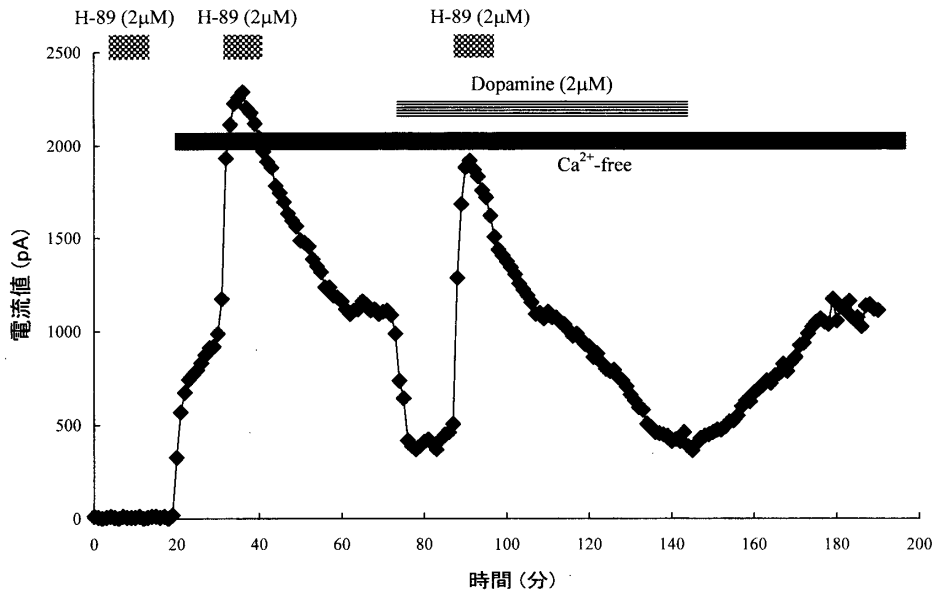


第5図 ヘミギャップ結合チャンネル電流に対する 8-Bromo-cAMP (A) と IBMX (B) の効果
水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。正常リンガー液を無 Ca²⁺リンガー液に置換すると、時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、数分後一定となった。A：無 Ca²⁺リンガー液に 8-Bromo-cAMP (膜透過型非水解性 cAMP アナログ) (2 mM) を添加し水平細胞に投与すると、Dopamine 投与の場合と同様、外向き電流は著しく減少した。これは、8-Bromo-cAMP が細胞内に入り、cAMP と同じ作用をした結果であると考えられた。B：A の細胞とは別の水平細胞において、IBMX (PDE 阻害剤) の効果を調べた。無 Ca²⁺リンガー液に IBMX (0.5 mM) を添加し水平細胞に投与すると、外向き電流は減少した。これは、IBMX により PDE 活性が抑えられた結果、細胞内の cAMP 濃度減少が抑えられたためであると考えられた。以上から、ギャップ結合チャンネルの閉塞に、cAMP が関与していることが示された。

ノイズも減少した。IBMX を細胞外液から除去すると、電流および電流ノイズは速やかに元のレベルにまで回復した。IBMX 投与実験を 6 細胞において実施したが、4 細胞で同様の抑制効果が観察された。しかし、残り 2 細胞で、IBMX は無効であった。この結果は、水平細胞内 cAMP 量が Dopamine→Adenylyl cyclase 系による合成と PDE による分解によって調節されていることを示唆している。

cAMP 依存性プロテインキナーゼによるヘミギャップ結合チャンネルの閉塞

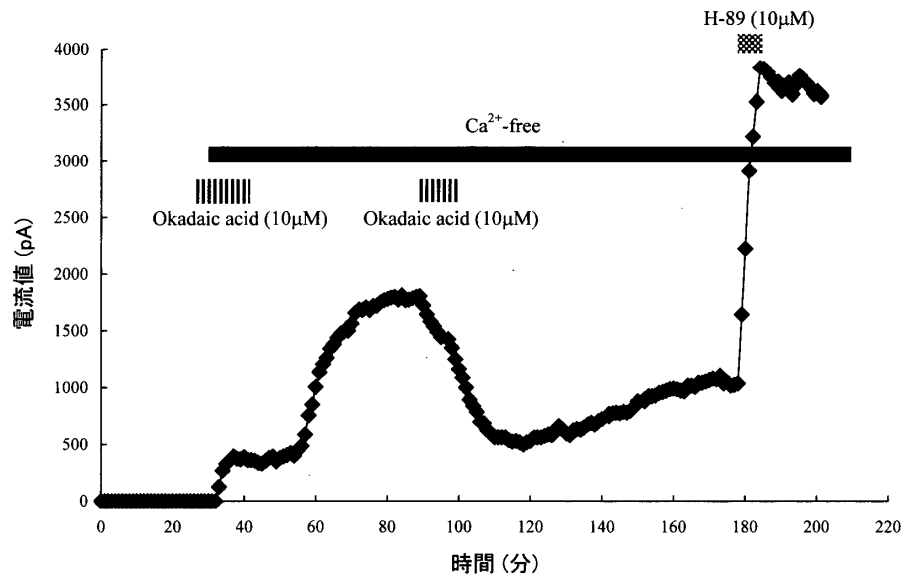
細胞内の cAMP は、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化を介してギャップ結合チャンネルを閉塞すると考えられている (第 2 図参照) (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。これを確かめるため、N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89) (cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤) を水平細胞に投与し、ヘミギャップ結合チャンネル電流への影響を調べた (第 6 図)。水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。H-89 (2 μ M) を正常リンガー液中に添加し水平細胞に投与したとき、膜電流に変化は見られなかった。細胞外液の Ca^{2+} を除去する (無 Ca^{2+} リンガー液の灌流) と、時間経過の緩やかな外向き電流 (約 1100 pA) が発生した。このとき H-89 を無 Ca^{2+} リンガー液に添加し水平細胞に灌流投与すると、外向き電流は約 2 倍 (約 2200 pA) に増加した。H-89 を細胞外液から除去すると、約 28 分後に外向き電流は正常レベル (約 1200 pA) にまで回復した。この結果は、Dopamine が細胞外に存在しないときでさえ、水平細胞内にギャップ結合チャンネルを閉塞するに足る量の cAMP が存在することを示している。次に、Dopamine (2 μ M) を灌流投与すると、外向き電流は約 400 pA にまで減少した。Dopamine 投与中に H-89 を与えると、この電流は約 5 倍 (1950 pA) にまで増加した。勿論、H-89 を細胞外液から除去すると、外向き電流は約 400 pA 付近 (Dopamine 存在時の電流レベル) まで回復した。さらに、Dopamine を細胞外液から除去すると、電流は元のレベル (無 Ca^{2+} リンガー液灌流で惹起される電流レベル) にまで回復した。同じ実験を 3 細胞で実施し、何れの細胞でも H-89 は同様の効果を示した。Dopamine 投与時でさえ H-89 がヘミギャップ結合チャンネル電流を増加することを考慮すると、cAMP は単独で作用するのではなく、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性化を介してこのチャンネルを閉塞することを示唆している。また、異なるタイプの cAMP 依存性プロテインキナーゼの特異的阻害剤である Thr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-Ala-Ser-Gly-Arg-Thr-Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile NH_2 (PKI(6-22)amide) (5 μ M) も H-89 と殆ど同様の効果を示した。以上の結果から、ギャップ結合チャンネルの閉塞に cAMP 依存性プロテインキナーゼによる細胞内タンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。



第 6 図 ヘミギャップ結合チャンネル電流に対する H-89 の効果
 水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。本図では、Whole-cell voltage-clamp 記録を開始した時点の電流値（正常リンガー液中で膜電位を +20 mV に固定したときの電流値）を基準（0 mV）として、以後の電流値を 1 分毎に測定・表示した。正常リンガー液に H-89（cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤）（2 mM）を添加し水平細胞に投与しても、電流応答に変化は見られなかった。正常リンガー液を無 Ca²⁺リンガー液に置換すると、時間経過の緩やかな外向き電流が発生した。このとき、無 Ca²⁺リンガー液に H-89（2 mM）を添加し水平細胞に投与すると、電流値は約 2 倍に増加し、2200 pA となった。H-89 を洗い流すと、電流は徐々に減少し、1100 pA 付近で一定となった。次に、Dopamine（2 mM）を投与すると、この外向き電流は 65% 減少し、約 400 pA となった。Dopamine と同時に H-89（2 mM）を投与すると、外向き電流は約 5 倍の 1900 pA にまで増加した。この電流は、H-89 を洗い流すと Dopamine 投与時の電流レベルにまで減少し、さらに Dopamine を洗い流すとゆっくりと無 Ca²⁺リンガー液で発生した元の電流レベルにまで回復した。以上から、ヘミギャップ結合チャンネルの閉塞に、cAMP 依存性プロテインキナーゼを介した細胞内タンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。

プロテインホスファターゼによるヘミギャップ結合チャンネルの開口

ギャップ結合チャンネルの閉塞に、細胞内タンパク質のリン酸化が関係していることは本研究（第 6 図）および Lasater（1987）や DeVries & Schwartz（1989）の報告から明らかである。次に、細胞内タンパク質の脱リン酸化がギャップ結合チャンネルの開口に関与しているのか否かを検討するため、ヘミギャップ結合チャンネル電流に対する Okadaic acid（プロテインホスファターゼ阻害剤）の影響を調べた（第 7 図）。Okadaic acid（10 μM）を正常リンガー液中に添加し水平細胞に投与したとき、膜電流に変化は見られなかった。Okadaic acid 投与中、細胞外液の Ca²⁺を除去（無 Ca²⁺リンガー液の灌流）すると、時間経過の緩やかな外向き電流（約 500 pA）が発生した。しかし、この外向き電流は Okadaic acid 非存在下で発



第7図 ヘミギャップ結合チャンネル電流に対する **Okadaic acid** の効果
 水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。本図では、Whole-cell voltage-clamp 記録を開始した時点の電流値（正常リンガー液中で膜電位を +20 mV に固定したときの電流値）を基準（0 mV）として、以後の電流値を1分毎に測定・表示した。正常リンガー液に **Okadaic acid**（プロテインホスファターゼ阻害剤）（10 mM）を添加し水平細胞に投与しても、電流応答に変 cAMP が化は見られなかった。**Okadaic acid**（10 mM）の投与中、正常リンガー液を無 Ca^{2+} リンガー液に置換すると、時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、約 400 pA に達し安定した。**Okadaic acid** を無 Ca^{2+} リンガー液から除去すると、外向き電流は徐々に増加し、約20分後には約4倍の 1800 pA となった。この増加は、**Okadaic acid** により外向き電流（ヘミギャップ結合チャンネル電流）が抑えられていたためと考えられる。再度、**Okadaic acid**（10 mM）を投与すると、外向き電流は 500 pA にまで減少した。**Okadaic acid** を除去すると、電流は徐々に回復に向かった。回復途中で、**H-89**（10 mM）を投与すると、外向き電流は急速に増加し、3800 pA に達した。以上から、ヘミギャップ結合チャンネルの開口に、プロテインホスファターゼによる細胞内タンパク質の脱リン酸化が関与していることが示唆された。

生する電流に比べ著しく小さかった。実際、**Okadaic acid** を除去すると、外向き電流は約4倍（1800 pA）に増加した。再び、**Okadaic acid** を投与すると、電流振幅は約 500 pA にまで減少した。**Okadaic acid** からの回復途中、**H-89**（cAMP 依存性プロテインキナーゼの特異的阻害剤）（10 μM ）を灌流投与すると、外向き電流振幅は約4倍に増加した。同様な実験を5細胞において実施し、総ての細胞でヘミギャップ結合チャンネル電流が **Okadaic acid** により抑制されることを確認した。以上の結果から、ギャップ結合チャンネルの開口にプロテインホスファターゼによる細胞内タンパク質の脱リン酸化が関与していることが示唆された。

考 察

脊椎動物網膜細胞ギャップ結合の性質

脊椎動物網膜を構成する総ての神経細胞 (Interplexiform 細胞を除く) で, 電氣的結合, 色素の拡散 (Dye coupling), 電子顕微鏡観察などの方法で電気シナプスの存在が確認されている (例えば, 視細胞: Copenhagen & Owen, 1976; 水平細胞: Yamada & Ishikawa, 1965; 双極細胞: Kujiraoka & Saito, 1986; アマクリン細胞: Naka & Christensen, 1981; 神経節細胞: Hitchcock, 1993)。電気シナプスは, ギャップ結合と呼ばれる特殊な密着構造からなる。この密着部では, 相対する細胞膜のそれぞれに存在する Connexon (膜貫通タンパク質複合体) がお互い連結し, 無機イオンのみならず分子量 1 KD 以下の物質の輸送路 (チャネル) として機能している。Connexon は 6 つの Connexin (サブユニットタンパク質) からなること, および Connexin には数種類の亜種が存在することが明らかとなっている (Beyer *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 1991; Beyer, 1993; Dermietzel & Spray, 1993; Bruzzone *et al.*, 1996; Veenstra, 1996)。最近, 網膜でも, ギャップ結合の分子生物学的研究が行われるようになってきた (Connexin 32: Finch & Paul, 1989; Vardi *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1992, Connexin 34.7: O'Brien *et al.*, 1998, Connexin 35: O'Brien *et al.*, 1996, Connexin 43: Kadle *et al.*, 1991; Edgerton & McMahon, 1994, 1995; Giblin & Christensen, 1997, Wagner *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 1998)。しかし, 水平細胞のギャップ結合チャネルが, どの Connexin で構成されているのかは未だ明らかにはなっていない。

脊椎動物網膜のギャップ結合に関する生理学的研究は, 水平細胞で最も進んでいる。理由として, 他の網膜内神経細胞に比べ, 細胞が著しく大きいことがあげられる。しかし, 2 つの水平細胞から膜電位あるいは膜電流を導出するのは容易でなく, ギャップ結合の詳細については依然不明な点が多い。DeVries & Schwartz (1992) および Malchow *et al.* (1993, 1994) は, 網膜内から単離した水平細胞にヘミギャップ結合チャネルが発現しているのを見出し, これを用いてチャネル電流を解析する方法を確立した。このヘミギャップ結合チャネルは細胞外の Ca^{2+} 濃度を細胞内レベル (μM 以下の濃度) にまで低下させると活性化し, またギャップ結合阻害剤と Dopamine (*in situ* 水平細胞間ギャップ結合を修飾する物質) で抑えられた (DeVries & Schwartz, 1992; Malchow *et al.*, 1993, 1994; Dixon *et al.*, 1996; 高橋, 1999) (第 4 図参照)。ヘミギャップ結合チャネル電流は比較的容易に導出できるため, ギャップ結合解析に好個の標本である。本研究でも, ギャップ結合の解析にアメリカナマズ網膜から単離・培養した水平細胞のヘミギャップ結合チャネルを用いた。

Dopamine D1 受容体を介する水平細胞のギャップ結合の調節

脊椎動物網膜第 6 番目の神経細胞である Interplexiform 細胞は、Dopamine 作動性とグリシン作動性の 2 種類に分類される (第 1 図参照) (Dowling & Ehinger, 1975, 1978; Marc & Liu, 1984)。グリシン作動性 Interplexiform 細胞の機能は不明であるが、Dopamine 作動性 Interplexiform 細胞は明暗順応に伴う網膜神経細胞の生理学的及び形態学的変化に関与していることが報告されている。たとえば、水平細胞の樹状突起の形態的变化 (Weiler *et al.*, 1988a, b) や双極細胞ならびに水平細胞のギャップ結合強度が Dopamine D1 受容体 (Van Buskirk & Dowling, 1981; Piccolino *et al.*, 1984; Lasater & Dowling, 1985a, b; Dowling, 1986; Mangel & Dowling, 1987; Yamada & Saito, 1988) を介して、また色素上皮細胞 (網膜神経細胞ではない) と視細胞の網膜運動 (Retinomotor movement) が Dopamine D2 受容体 (Deary & Burnside, 1985, 1986a, b) を介して調節されることがあげられる。Dopamine D1 受容体と D2 受容体とは細胞内セカンドメッセンジャー系に大きな相違があり、D1 受容体の活性化により細胞内 cAMP 量は増加、一方 D2 受容体の活性化により細胞内 cAMP 量の減少あるいは変化しないことが知られている (Kebabian & Calne, 1979)。Dowling & Ehinger (1978) の組織学的研究から Interplexiform 細胞が双極細胞と水平細胞にシナプス出力していることは明らかであり、従ってこれら両細胞の Dopamine D1 受容体の活性化に Interplexiform 細胞が放出した Dopamine が関与していることは間違いない。しかし、この Dopamine が、Interplexiform 細胞と直接シナプス結合しない視細胞や色素上皮細胞の Dopamine D2 受容体の活性化に関与しているのか否かは不明である。

Interplexiform 細胞により放出された Dopamine は、水平細胞の Dopamine D1 受容体に結合し、促進性 GTP 結合タンパク質を介して Adenylyl cyclase 活性を上昇させ、ATP から cAMP を合成する。この cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化し、最終的に細胞内タンパク質 (おそらく、ギャップ結合チャネルタンパク質) をリン酸化する。このリン酸化によりギャップ結合チャネルは閉塞する (Lasater, 1987)。Interplexiform 細胞からの Dopamine 放出が減少すると、Adenylyl cyclase 活性は低下し、cAMP 合成は減少あるいは停止する。このとき、細胞内 cAMP は PDE により 5'AMP にまで分解されるため、結果として cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性は低下する。本実験 (第 5 図 B) で、IBMX により PDE 活性を抑える (つまり、細胞内 cAMP 量の減少を阻害すること) と、ヘミギャップ結合チャネル電流は減少した。この結果は、細胞内の cAMP 合成 (Adenylyl cyclase による合成) と分解 (PDE による分解) が平衡状態にあり、PDE 活性の阻害により cAMP 分解が阻害されたため、cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性が上昇し、ヘミギャップ結合チャネルが閉塞したと考えられる。次に、cAMP 自身がギャップ結合チャネルを閉塞するのか、それとも cAMP 依存性プロテインキナーゼを介してギャップ結合チャネルを閉塞するのかを

検討するため、cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性を阻害する実験を行った (第 6 図)。H-89 (cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤) は、ヘミギャップ結合チャネル電流を著しく増大させた。この結果は、ギャップ結合チャネル閉塞に cAMP 依存性プロテインキナーゼが必須であることを示唆している。同様の研究結果は、これまでも報告されている (Lasater & Dowling, 1985a; DeVries & Schwartz, 1989, 1992)。最後に、脱リン酸化がギャップ結合チャネルの開閉に関与しているのか否かを検討するため、プロテインホスファターゼ活性を阻害する実験を行った (第 7 図)。Okadaic acid (プロテインホスファターゼ阻害剤) は、ヘミギャップ結合チャネル電流を抑制した。この結果は、ギャップ結合チャネル開閉に脱リン酸化が関与していることを示唆している。本実験結果および他の実験結果 (例えば, Lasater & Dowling, 1985a; DeVries & Schwartz, 1989, 1992) から、ギャップ結合チャネルの開閉はギャップ結合チャネルタンパク質のリン酸化および脱リン酸化に伴うコンフォメーション (立体構造) 変化によると推測される。

IBMX の実験 (第 5 図 B) のみならず、H-89 および Okadaic acid の実験 (第 6 図と第 7 図) から、細胞外に Dopamine が存在しないときでさえ、単離・培養した水平細胞内にはギャップ結合チャネルの開閉に影響するに足る量の cAMP が存在することが明らかとなった。cAMP はギャップ結合チャネルの開閉以外に、他の細胞内情報伝達系にもセカンドメッセンジャーとして動作している可能性があり、このため細胞内 cAMP 濃度は Dopamine 系を含む複数系による複雑な調節を受けているのかもしれない。

ギャップ結合チャネルとセカンドメッセンジャー

下等脊椎動物網膜水平細胞のギャップ結合は、Dopamine→Adenylyl cyclase→cAMP→cAMP 依存性プロテインキナーゼという経路以外に、いくつかの細胞内セカンドメッセンジャー (Ca^{2+} : カルシウムチャネルを介した Ca^{2+} 流入あるいは細胞内小器官からの Ca^{2+} 流出に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化, H^+ : イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の活性化に伴う細胞内 H^+ 濃度変化, cGMP と cGMP 依存性プロテインキナーゼ: 代謝調節型グルタミン酸受容体活性化に伴う細胞内 cGMP 濃度変化) を介して調節されていることが知られている (DeVries & Schwartz, 1989, 1992; Miyachi & Murakami, 1989, 1991; Miyachi *et al.*, 1990, 1991, 1994; Cook & Becker, 1995; Dixon *et al.*, 1996; Vaney, 1996; Weiler, 1996; 高橋, 1999)。しかし、「各セカンドメッセンジャーが、どのような生理的条件下でギャップ結合チャネルの活性調節に関与するのか?」、また「各セカンドメッセンジャーが、ギャップ結合チャネルの開閉調節にどの程度貢献するのか?」などについては、依然不明である。今後、これらを解明するため、生理的条件下での各セカンドメッセンジャーの動態を詳細に調べる必要がある。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費補助金（基盤研究(C):09680823）と第28回内藤記念科学奨励金（研究助成）によった。

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.)*, **387**: 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.
- Baldrige, W. H. and Ball, A. K. (1991), Background illumination reduces horizontal cell receptive-field size in both normal and 6-hydroxydopamine-lesioned goldfish retina, *Vis. Neurosci.*, **7**: 441–450.
- 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.
- Bennett, M. V. L., Barrio, L. C., Bargiello, T. A., Spray, D. C., Hertzberg, E. and Saez, J. C. (1991), Gap junctions: New tools, new answers, new questions, *Neuron* **6**: 305–320.
- Beyer, E. C. (1993), Gap junctions, *Int. Rev. Cytol.*, **137**: 1–37.
- Beyer, E. C., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. (1990), Connexin family of gap junction proteins, *J. Memb. Biol.*, **116**: 187–194.
- Bruzzone, R., White, T. W. and Paul, D. L. (1996), Connections with connexins: The molecular basis of direct intracellular signalling, *Eur. J. Biochem.*, **238**: 1–27.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- 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.
- Cook, J. E. and Becker, D. L. (1995), Gap junctions in the vertebrate retina, *Microsc. Res. Tech.*, **31**: 408–419.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Copenhagen, D. R. and Owen W. G. (1976), Coupling between rod photoreceptors in a vertebrate retina, *Nature*, **260**: 57–59.
- Dearry, A. and Burnside, B. (1985), Dopamine inhibits forskolin- and 3-isobutyl-1-methylxanthine-induced dark-adaptive retinomotor movements in isolated teleost retinas, *J. Neurochem.*, **44**: 1753–1763.
- Dearry, A. and Burnside, B. (1986a), Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas: I. Induction of cone contraction is mediated by D₂ receptors, *J. Neurochem.*, **46**: 1006–1021.
- Dearry, A. and Burnside, B. (1986b), Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas: II. Modulation by g-aminobutyric acid and serotonin, *J. Neurochem.*, **46**: 1022–1031.
- Dermietzel, R. and Spray, D. C. (1993), Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why ?, *TINS*, **16**: 186–193.

- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1989), Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers, *J. Physiol. (Lond.)*, **414**: 351–375.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1992), Hemi-gap junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **445**: 201–230.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I., Bieda, M. and Copenhagen, D. R. (1996), Quinine, intracellular pH and modulation of hemi-gap junctions in catfish horizontal cells, *Vision Res.*, **36**: 3925–3931.
- Dong, C.-J. and McReynolds, J. S. (1991), The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **440**: 291–309.
- Dowling, J. E. (1986), Dopamine: A retinal neurotransmitter?, *TINS*, **9**: 236–240.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1975), Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and *Cebus* monkey retina, *Science*, **188**: 270–273.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1978), The interplexiform cell system: I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **201**: 7–26.
- Dowling, J. E. and Watling, K. J. (1981), Dopaminergic mechanisms in the teleost retina: II. Factors affecting the accumulation of cyclic AMP in pieces of intact carp retina, *J Neurochem.*, **36**: 569–579.
- Edgeron, T. L. and McMahon, D. C. (1994), Partial sequence of connexin gene homolog in giant danio, *Soc Neurosci.*, Abstr. **20**: 560.
- Edgeron, T. L. and McMahon, D. C. (1995), Partial sequence of a gap junction channel gene from the giant danio retina, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**: S929.
- Finch, E. A. and Paul, D. L. (1989), Expression and localization of different gap junction proteins in retina and other regions of the CNS, *Soc. Neurosci. Abstr.*, **15**: 127.
- Giblin, L. J. and Christensen, B. N. (1997), Connexin43 immunoreactivity in the catfish retina, *Brain Res.*, **755**: 146–150.
- Hagins, W. A., Penn, R. D. and Yoshikami, S. (1970), Dark current and photocurrent in retinal rods, *Biophys. J.*, **10**: 380–412.
- 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. (1996), Horizontal cell coupling and its regulation, In: *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina* (eds. Djamgoz, M. B. A., Archer, S. N. and Vallergera, S.), London, Chapman and Hall, pp 195–220.
- Hedden, W. L. and Dowling J. E. (1978), The interplexiform cell system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **201**: 27–55.
- Hitchcock, P. F. (1993), Neurobiotin coupling between developing ganglion cells in the retina of the goldfish, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**: 878.
- Ishida, A. T. and Neyton, J. (1985), Quisqualate and L-glutamate inhibit retinal horizontal-cell responses to kainate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1837–1841.
- Janssen-Bienhold, U., Nagel, H. and Weiler, R. (1993), In vitro phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: Effects of the skate of light adaptation, *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 584–593.
- Janssen-Bienhold, U., Dermietzel, R. and Weiler, R. (1998), Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates, *J. Comp. Neurol.*, **396**: 310–321.
- Jones, C. R., Becker, D. L. and Cook, J. E. (1992), Gap junctions in the rat retina: Immunoreactivity with antisera raised to oligopeptides of connexins Cx32 and Cx43, *Neurosci. Lett.* **42 (Suppl.)**: S34.
- Kadle, R., Zhang, J. T. and Nicholson, B. J. (1991), Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43, *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 363–369.
- Kalloniatis, M. and Marc R. E. (1990), Interplexiform cells of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **297**: 340–358.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*,

213: 95–105.

- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **235**: 133–153.
- 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.
- Kebabian, J. and Calne, D. (1979), Multiple receptors for dopamine, *Nature*, **277**: 93–96.
- Kouyama, N. and Watanabe, K. (1986), Gap-junctional contacts of luminosity-type horizontal cells in the carp retina: A novel pathway of signal conduction from the cell body to the axon terminal, *J. Comp. Neurol.*, **249**: 404–410.
- Kujiraoka, T. and Saito, T. (1986), Electrical coupling between bipolar cells in carp retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4063–4066.
- Lasater, E. M. (1987), Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7319–7323.
- Lasater, E. M. (1990), Properties of non-NMDA excitatory amino acid-activated channels in isolated retinal horizontal cells, *J. Neurosci.*, **10**: 1654–1663.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1982), Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 936–940.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1985a), Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 3025–3029.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1985b), Electrical coupling between pairs of isolated fish horizontal cells is modulated by dopamine and cAMP, In: *Gap junction* (eds. Bennet M. V. L. & Spray, D. C.), New York, Cold Spring Harbor Laboratory, pp 393–404.
- Lasater, E. M., Dowling, J. E. and Ripps, H. (1984), Pharmacological properties of isolated horizontal and bipolar cells from the skate retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1066–1084.
- Laufer, M. (1982), Electrophysiological studies of drug actions on horizontal cells, In: *The S-potentials* (eds. Drujan, B. D. & Laufer, M.), New York, Alan R. Liss, pp 257–279.
- Laufer, M., Salas, R., Medina, R. and Drujan, B. (1989), Cyclic adenosine monophosphate as a second messenger in horizontal cell uncoupling in the teleost retina, *J. Neurosci. Res.*, **24**: 299–310.
- Laufer, M., Negishi, K. and Salas, R. (1996), Effects of glutamic acid related agents on horizontal cells in a marine teleost retina, *J. Neurosci. Res.*, **44**: 568–576.
- MacNichol, E. F. Jr. and Svætichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes. *Am. J. Ophthalm.*, **46**: 29–46.
- Malchow, R. P., Qian, H. and Ripps, H. (1993), Evidence for hemi-gap junctional channels in isolated horizontal cells of the skate retina, *J. Neurosci. Res.*, **35**: 237–245.
- Malchow, R. P., Qian, H. and Ripps, H. (1994), A novel action of quinine and quinidine on the membrane conductance of neurons from the vertebrate retina, *J. Gen. Physiol.*, **104**: 1039–1055.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1985), Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells reduced by prolonged darkness and dopamine, *Science*, **229**: 1107–1109.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1987), The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **231**: 91–121.
- Marc, R. E. and Liu, W.-L. S. (1981), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **311**: 266–269.
- McMahon, D. G. (1994), Modulation of electrical synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells, *J. Neurosci.*, **14**: 1722–1734.
- McMahon, D. G., Knapp, A. G. and Dowling, J. E. (1989), Horizontal cell gap junctions: Single-channel conductance and modulation by dopamine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 7634–7639.
- McMahon, D. G., Rischert, J. C. and Dowling, J. E. (1994), Protein content and cAMP-dependent phosphorylation of fractionated white perch retina, *Brain Res.*, **659**: 110–116.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **334**: 325–349.

- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinae by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol. (Lond.)*, **419**: 213–224.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1991), Synaptic inputs to turtle horizontal cells analyzed after blocking gap junctions by intracellular injection of cyclic nucleotide, *Vision Res.*, **31**: 631–635.
- Miyachi, E.-I., Kato, C. and Nakaki, T. (1994), Arachidonic acid blocks gap junctions between retinal horizontal cells, *Neuroreport*, **5**: 485–488.
- Miyachi, E.-I., Miyakawa, A. and Murakami, M. (1991), Modulation of electrical coupling between retinal horizontal cells by intracellular messengers, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 15**: 41–49.
- Miyachi, E.-I., Murakami, M. and Nakaki, T. (1990), Arginine blocks gap junctions between retinal horizontal cells, *Neuroreport*, **1**: 107–110.
- Müller, J. F. and Marc, R. E. (1990), GABA-ergic glycinergic pathways in the inner plexiform layer of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **291**: 281–304.
- 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., 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.
- 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.
- Naka, K.-I. and Christensen, B. (1981), Direct electrical connections between transient amacrine cells in the catfish retina, *Science*, **214**: 462–464.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells. *J. Physiol.*, **223**: 449–460.
- 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.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979a), Reciprocal changes in center and surrounding S potentials of fish retina in response to dopamine, *Neurochem. Res.*, **4**: 313–318.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979b), Effects of catecholamines and related compounds on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 311–334.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979c), Similarities in effects of catecholamine and dopamine on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 335–349.
- O'Brien, J., Al-Ubaidi, M. R. and Ripps, H. (1996), Connexin 35: A gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina, *Mol. Biol. Cell*, **7**: 233–243.
- O'Brien, J., Bruzzone, R., White, T. W., Al-Ubaidi, M. R. and Ripps, H. (1998), Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family, *J. Neurosci.*, **18**: 7625–7637.
- Penn, R. D. and Hagins, W. A. (1969), Signal transmission along the retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave, *Nature*, **223**: 201–205.
- Piccolino, M., Neyton, J. and Gerschenfeld, C. (1984), Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina, *J. Neurosci.*, **4**: 2477–2488.
- Piccolino, M., Witkovsky, P. and Trimarchi, C. (1987), Dopaminergic mechanisms underlying the reduction of electrical coupling between horizontal cells of the turtle retina induced by *d*-amphetamine, bicuculline, and veratridine, *J. Neurosci.*, **7**: 2273–2284.
- 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.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-Glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787-795.
- 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.
- Shigematsu, Y. and Yamada, M. (1988), Effects of dopamine on spatial properties of horizontal cell responses in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 8**: 69-80.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182-185.
- Stell, W. K. (1967), The structure and relationship of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina, *Am. J. Anat.*, **121**: 401-424.
- 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. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141-161.
- 高橋恭一 (1999), アメリカナマズ網膜水平細胞のヘミギャップ結合チャネルの開閉機構に関する研究—水素イオンによる開閉調節—, *経済科学研究*, **2**: 57-74.
- 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.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1983), Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina, *Nature*, **301**: 243-246.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1984), Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in carp retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1271-1280.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559-566.
- Tornqvist, K., Yang, X.-L. and Dowling, J. E. (1988), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina: III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells. *J. Neurosci.*, **8**: 2279-2288.
- Toyoda, J.-I., Nosaki, H. and Tomita, T. (1969), Light induced resistance changes in single photoreceptors of *Necturus* and *Gekko*, *Vision Res.*, **9**: 453-463.
- 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
- 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.
- Umino, O., Lee, Y. and Dowling, J. E. (1991), Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina, *Vis. Neurosci.*, **7**: 451-458.
- Van Buskirk, R. and Dowling, J. E. (1981), Isolated horizontal cells from carp retina demonstrate dopamine dependent accumulation of cyclic AMP, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7825-7829.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93-101.
- Vaney, D. I. (1996), Cell coupling in the retina, In: *Gap junctions in the nervous system* (eds. Spray, D. C. and Dermietzel, R.), Texas, R. G. Landes Company, pp 79-102.

- Vardi, N., Hertzberg, E. and Sterling, P. (1990), Gap junction distribution in cat and monkey retina visualized with monoclonal antibody to connexin 32, Soc. Neurosci. Abstr. **16**: 1076.
- Veenstra, R. D. (1996), Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins, J. Bioenerg. Biomemb, **28**: 327–337.
- 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.
- Wagner, T. L. E., Beyer, E. C. and McMahon, D. G. (1998), Cloning and Functional expression of a novel gap junction channel from the retina of *Danio aequipinnatus*, Vis. Neurosci., **15**: 1137–1144.
- Watling, K. J. and Dowling, J. E. (1981), Dopaminergic mechanisms in the teleost retina: I. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in homogenates of carp retina: Effects of agonists, antagonists and ergots, J Neurochem., **36**: 559–568.
- Weiler, R. (1996), The modulation of gap junction permeability in the retina, In: Gap junctions in the nervous system (eds. Spray, D. C. and Dermietzel, R.), Texas, R. G. Landes Company, pp 105–121.
- Weiler, R. and Akopian, A. (1992), Effects of background illuminations on the receptive field size of horizontal cells in the turtle retina are mediated by dopamine, Neurosci. Lett., **140**: 121–124.
- Weiler, R., Kohler, K., Kirsch, M. and Wagner, H.-J. (1988a), Glutamate and dopamine modulate synaptic plasticity in horizontal cell dendrites of fish retina, Neurosci. Lett., **87**: 205–209.
- Weiler, R., Kohler, K., Kolbinger, W., Wolburg, H., Kurz-Isler, G. and Wagner, H.-J. (1988b), Dopaminergic neuromodulation in the retinas of lower vertebrates, Neurosci. Res., **Suppl. 8**: 183–196.
- 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.
- Witkovsky, P. and Dowling J. E. (1969), Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina, Z. Zellforsch.mikrosk. Anat., **100**: 60–82.
- 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.
- 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. USA, **92**: 3556–3560.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae, Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **30**: 383–392.
- Yamada, M. and Saito, T. (1988), Effects of dopamine on bipolar cells in the carp retina, Biomed. Res. **Suppl. 9**: 125–130.
- 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.
- Yang, X.-L., Tornqvist, K. and Dowling, J. E. (1988a), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina: I. Effects of prolonged darkness and background illumination on light responsiveness, J. Neurosci., **8**: 2259–2268.
- Yang, X.-L., Tornqvist, K. and Dowling, J. E. (1988b), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina: II. Role of interplexiform cells and dopamine in regulating light responsiveness, J. Neurosci., **8**: 2269–2278.
- Yazulla, S. and Zucker, C. L. (1988), Synaptic organization of dopaminergic interplexiform cells in the goldfish retina, Vis. Neurosci., **1**: 13–29.
- Zucker, C. L. and Dowling, J. E. (1987), Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina, Nature, **330**: 166–168.