

トランプサンショウウオ網膜桿体に発現する高閾値型 カルシウムチャネルの Dopamine D2 受容体を介する修飾

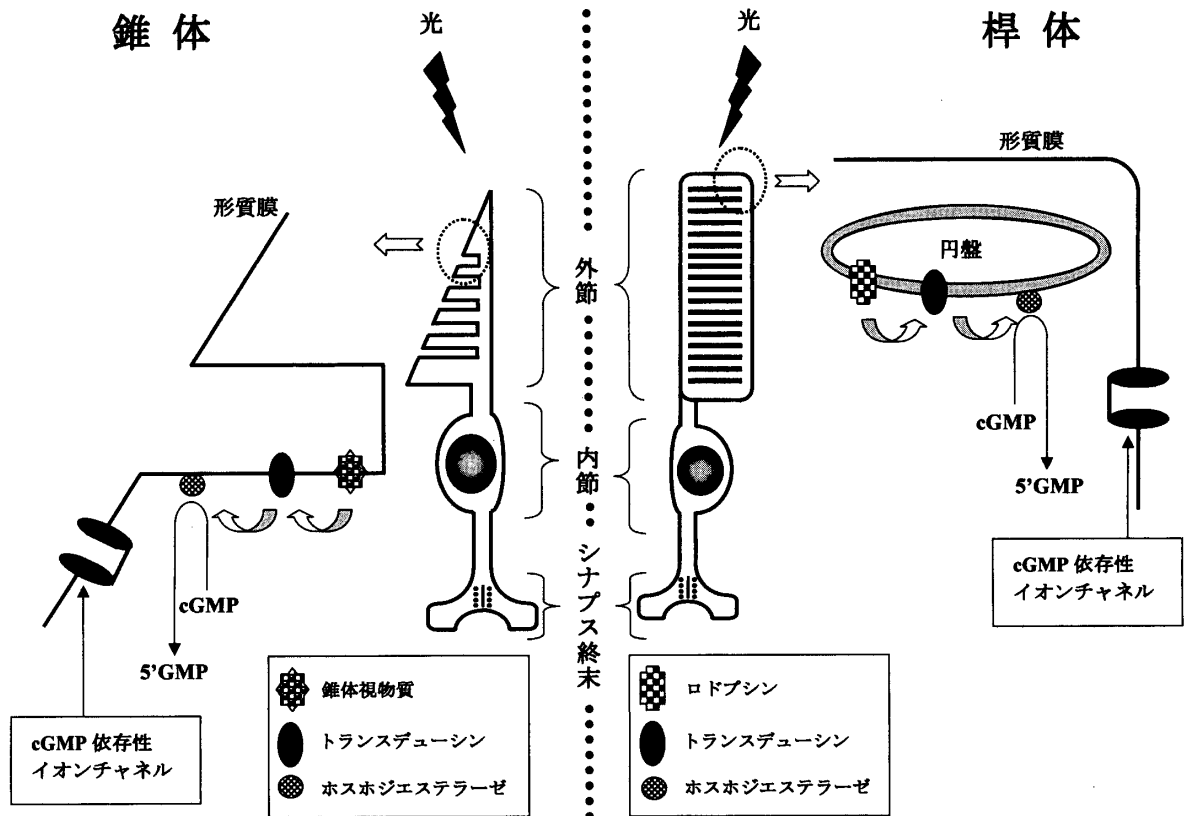
高橋 恭一

(受付 1999年9月20日)

序 論

脊椎動物網膜視細胞は、桿体と錐体の2種に分類される(第1図参照)。これらの視細胞は外節形態の相違のみならず、機能的にも大きく異なり、錐体が昼光視(光感受性が低い)に、また桿体が薄明視(光感受性が高い)に関与していることが明らかとなっている。錐体では、外節の形質膜が内側に折り畳まれ層状構造をなし、この層状の膜構造体(形質膜)に錐体視物質が存在している。一方、桿体では、外節内部に二重膜円盤が数百枚以上重なり層状構造を形成し、この円盤膜(形質膜との物理的な繋がりはない)上に桿体視物質(ロドプシン)が存在している。

視物質が光を受容するメカニズムは、桿体でよく調べられている。桿体が光をキャッチすると、円盤膜上に存在するロドプシンは、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という中間体を経て、オールトランス型レチナールとオプシンに分解される。この一連の光化学反応により生成される中間体の中で、メタロドプシンIIはトランスデューシン(Guanosine 5'-triphosphate [GTP] 結合タンパク質)との結合能を有し、この物質を活性化状態にする。次に、このトランスデューシンはホスホジエステラーゼを活性化し、外節内の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) を Guanosine 5'-monophosphate (5'GMP) に分解する(第1図参照)(例えば, Kawamura, 1993, 1994)。桿体外節の形質膜には、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呼ばれる)が存在する。暗時(外節内に cGMP が多量に存在する状態)にはこの cGMP 依存性チャネルが開口し、ナトリウムイオン(Na^+)が電気化学勾配に従い細胞外から外節内に流入するため、桿体は脱分極している。一方、光受容に伴い細胞内の cGMP 濃度が減少すると、このチャネルは閉塞し、 Na^+ の流入が減少あるいは消失するため、桿体は過分極する(例えば, Pugh & Lamb, 1990, 1993; Kawamura, 1993, 1994)。錐体でも、視物質がロドプシンでないことを除けば、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(第1図参照)



第1図 脊椎動物網膜視細胞の光-電気変換機構

脊椎動物網膜視細胞は、錐体と桿体の2種に分類される。光感受性の低い錐体は昼光視（昼間の視覚）に、また光感受性の高い桿体は薄明視（夕方及び夜間の視覚）に関与している。何れの視細胞も、外節、内節及びシナプス終末の3つの部位からなる。光受容装置として機能するのは、外節のみである。錐体外節では形質膜が内側に折り畳まれ、層状構造を形成している。この層状の膜構造体（形質膜）に、錐体視物質が存在する。桿体外節では細胞内に非常に薄い二重膜円盤が浮かんでおり、これが数百枚以上積み重なり層状構造を形成している。この円盤膜（形質膜との物理的な繋がりはない）に、ロドプシン（桿体視物質）が存在する。桿体の場合、ロドプシンに光が当たると、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という中間体を経て、オールトランス型レチナール+オプシンにまで分解される。メタロドプシンⅡはトランスデューシン（GTP結合タンパク質）を活性化し、次にこのトランスデューシンはホスホジエステラーゼを活性化する。ホスホジエステラーゼは、細胞内のcGMPを5'GMPに分解する。この明暗に伴う外節内cGMP濃度変化は、外節形質膜に存在するcGMP依存性イオンチャンネルの開閉に影響する。外節内cGMP濃度が高い場合（暗時）、cGMP依存性チャンネルは開口し、このチャンネルを通じて外節内に流入したNa⁺により視細胞は脱分極している。一方、cGMP濃度が低下（明時）するるとこのチャンネルは閉塞し、Na⁺の流入が減少するため視細胞は過分極する。錐体でも、視物質がロドプシンではないことを除けば、桿体と同様のメカニズムで光-電気信号変換が行われていると考えられている。

(Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994)。

明暗に伴い外節で発生した膜電位変化は、内節でカルシウムチャンネル、h（内向き整流性）チャンネル、カルシウム依存性カリウムチャンネル、カルシウム依存性クロライドチャンネルによる修飾を受け、シナプス終末に伝播される (Bader *et al.*, 1979; Attwell & Wilson, 1980; Fain *et al.*, 1978a, 1978b, 1980a, 1980b; Takahashi, 1986; Barnes, 1994)。シナプス終末では、こ

の膜電位変化がシナプス終末から放出される伝達物質 (L-グルタミン酸) 量の増減に変換される (Trifonov, 1968; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995)。視細胞からの伝達物質放出は、中枢神経系シナプスでの放出機構と同じであり、脱分極で増加し、過分極で減少する (例えば, Copenhagen & Jahr, 1989)。従って、視細胞シナプス終末からの L-グルタミン酸放出は暗時 (脱分極時) に多く、明時 (過分極時) に減少あるいは停止する。

視細胞のシナプス終末部は錐体と桿体とで異なり、錐体では円錐形を、また桿体で小膨大を呈する。双極細胞と水平細胞の樹状突起先端は、これら視細胞のシナプス終末部に深く嵌入し、シナプス結合する。視細胞のシナプス終末部にはシナプスリボンと呼ばれる特別な構造 (Sjöstrand, 1953, 1958) があり、このシナプスリボンの正面に双極細胞の突起が、その周辺に水平細胞の突起が位置し、トライアッド (Triad) を形成している (Stell, 1967; Werblin & Dowling, 1969; Witkovsky & Dowling, 1969)。また、樹状突起の先端が視細胞シナプス終末部に嵌入せず、シナプス終末端で単純接続している双極細胞も存在することが明らかとなっている (Stell *et al.*, 1977)。視細胞から放出された伝達物質 (L-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のシナプス受容体 (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。暗時 (視細胞の脱分極時) に視細胞が放出した L-グルタミン酸は、明時にシナプス間隙から速やかに除去されねばならない。この除去機能を担っているのが、視細胞とミュラー細胞である。これらの細胞にはグルタミン酸トランスポーターが存在し、シナプス間隙 (細胞外空間) の L-グルタミン酸を積極的に除去することが知られている (Marc & Kam, 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.*, 1998)。

視細胞からの伝達物質 (L-グルタミン酸) 放出は、細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) により調節されている。暗時に視細胞が脱分極している状態では、カルシウムチャネルが開き、このチャネルを通じて流入した Ca^{2+} が伝達物質放出を促進する (Rieke & Schwartz, 1996)。従って、視細胞シナプス終末部のカルシウムチャネル活性が変化すれば、伝達物質放出に影響する筈である。網膜も含め中枢神経系で、Dopamine は神経伝達物質のみならず神経修飾因子として機能し、各種電位依存性イオンチャネルの活性調節に関与していることが知られている (例えば, Dowling, 1986)。カルシウムチャネルについても、カテコールアミンによる修飾が既に報告されている (例えば, Stack & Surprenant, 1991; Chen & Schofield, 1993;

Elmslie *et al.*, 1993)。両生類網膜視細胞には、2種類の Dopamine 受容体 (D2 及び D4 受容体) が存在することが報告 (Cohen *et al.*, 1992; Krizaj & Witkovsky, 1993; Muresen & Besharse, 1993) されているが、この受容体による電位依存性イオンチャネル活性の修飾について十分な研究は未だ行われていない。

本研究では、トラフサンショウウオ網膜桿体の高閾値型カルシウムチャネルに着目し、このチャネルが Dopamine D2 受容体を介する修飾を受けているのか否かを検討した。

実験材料と方法

実験には、体長約 20 cm~30 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。剥離網膜は剃刀を用いて 1 mm 角の細片に切り分け、注射針 (30ゲージ) を用いて網膜細片の視細胞側を軽く削ることにより視細胞を機械的に単離した。Concanavalin A を塗布した円型 (直径 12 mm) のカバーガラス上に視細胞の浮遊したリンガー液を置き、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2種類と錐体4種類に分類されている (Mariani, 1986)。本実験では、赤桿体のみを使用した。赤桿体と緑桿体とでは内節の形態が大きく異なり、両者の区別は容易であった。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、リンガー液を細胞から約 200 μm の距離に置いた Y-tube (直径 150 μm) を用いて灌流し、実験した。

トラフサンショウウオの正常リンガー液の組成は、105.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 2.5 mM 塩化カリウム (KCl), 3.0 mM 塩化カルシウム (CaCl_2), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2), 8.0mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。高閾値型カルシウムチャネル電流を増強するために、正常リンガー液のカルシウムイオン (Ca^{2+}) をバリウムイオン (Ba^{2+}) (Ba^{2+} リンガー液) に置換し、桿体を灌流した。 Ba^{2+} リンガー液の組成は、80.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , 15.0 mM 塩化バリウム (BaCl_2), 8.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。カルシウム依存性カリウムチャネル活性及びカルシウム依存性クロライドチャネル活性を抑えるため、リンガー液に Niflumic acid (200 μM) を添加し灌流した。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

トラフサンショウウオ網膜桿体に発現する高閾値型カルシウムチャネルの Dopamine D2 受容体を介する修飾

したリンガー液に Dopamine を加え灌流した。(±)-2-(N-phenethyl-N-propyl) amino-5-hydroxytetralin (PPHT) は Methanol に溶かし、最終濃度が 1~10 μM になるように、また Nifedipine は Ethanol に溶かし、最終濃度が 100 μM になるようにリンガー液に添加し灌流した。薬品類は浸透圧を考慮せずリンガー液に添加し、Y-tube を用いて投与した。何れのリンガー液も、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.6 に調整し、灌流した。

標準パッチ電極内液の組成は 75.0 mM メタンスルホン酸セシウム (Cs-methansulfonate), 20.0 mM Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 2.0 mM MgCl_2 , 10.0 mM Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 0.5 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 20.0 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、標準パッチ電極内液にセシウムイオン (Cs^+) と TEA^+ を加えた。パッチ電極内液の pH は、1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH 7.3 に調整した。高閾値型カルシウムチャネル活性は、細胞内外の水素イオン濃度の上昇により抑制されることが知られている (例えば, Takahashi *et al.*, 1993)。本研究では、このカルシウムチャネル活性の低下を防ぐため、電極内 pH を 7.3 にして用いた。

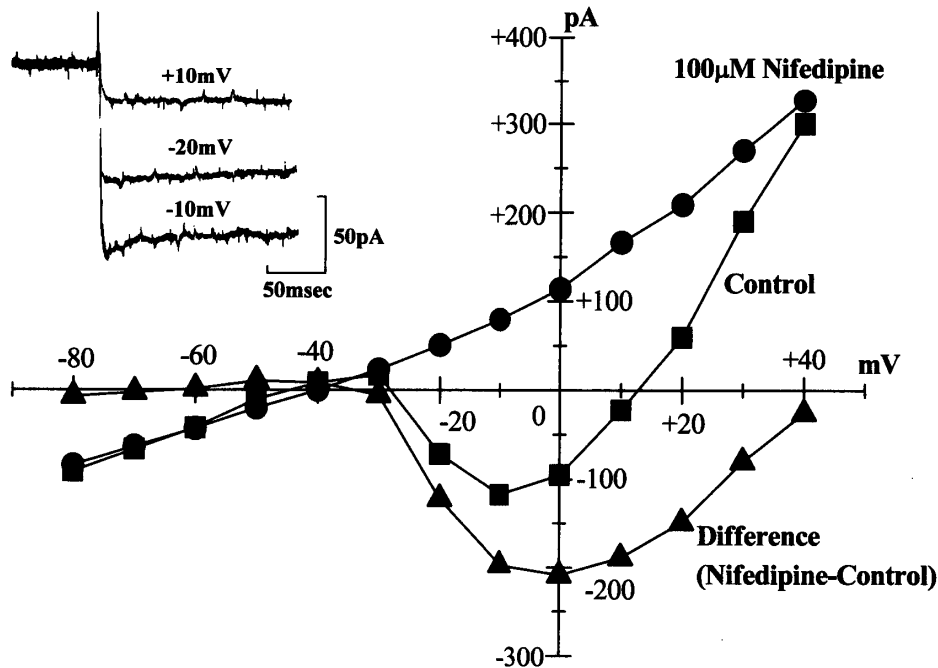
Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、視細胞を膜電位固定し電流記録を行った (Hamil *et al.*, 1981)。パッチ電極は縦型微小電極製作器 (PP83, Narishige Scientific Instrument Lab.) を用いて、Borosilicate 性ガラス管 (02-668-68, Fisher Scientific) から作製した。電極抵抗は 5 $\text{M}\Omega$ ~10 $\text{M}\Omega$ であった。視細胞の膜電流は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon 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 Ver 5.0 (Microcal Software Inc.) を用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Dopamine hydrochloride と PPHT hydrochloride は Research Biochemical Inc. から購入した。

実験結果

桿体に発現する高閾値型カルシウムチャネル

桿体膜電位を -90 mV に固定し、-80 mV から +40 mV まで 10 mV 間隔で 200 ミリ秒間分極させ、このとき発生する電流を記録した。-30 mV 付近で活性化し、-10 mV にピークを持つ内向き電流が記録された (第 2 図挿入図)。この電流が高閾値型カルシウムチャネル活性を反映しているのか否かを調べるため、Nifedipine (高閾値型カルシウムチャネルの特異的

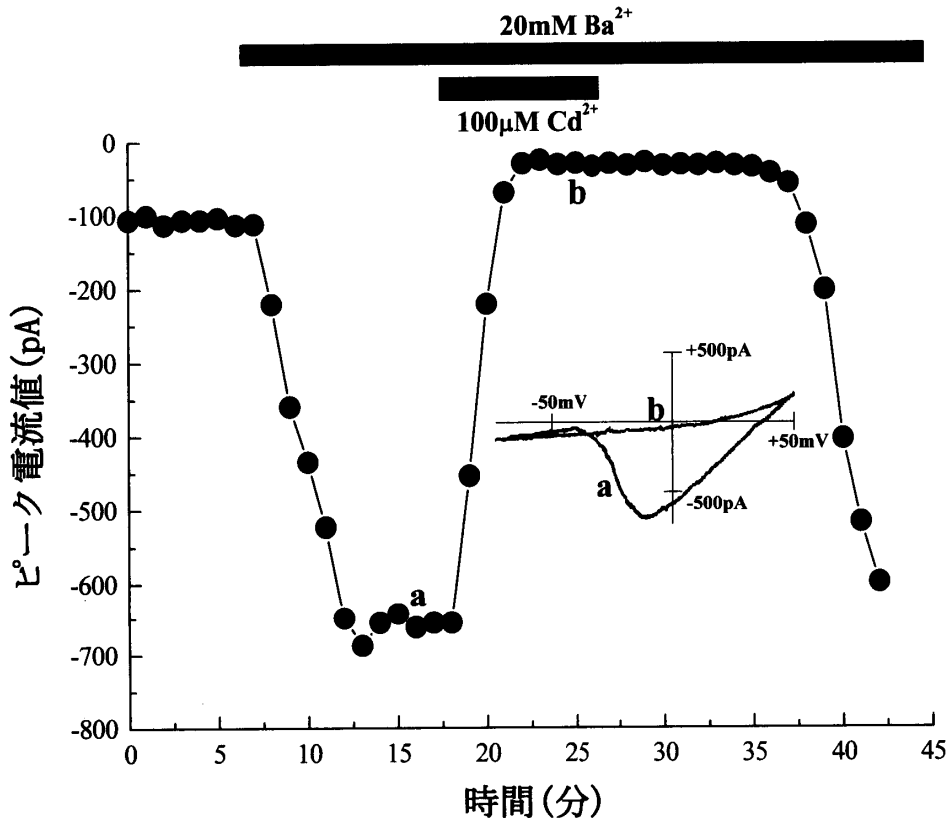


第2図 桿体の高閾値型カルシウムチャンネル電流

桿体膜電位を -90 mV に保持し、 -80 mV から $+40$ mV まで 10 mV 間隔で 200 ミリ秒間分極させ、このとき発生する電流を記録した。正常リンガー液中で、膜電位を -30 mV よりも正にすると、内向き電流が発生した。正常リンガー液に Nifedipine (100 μ M) (高閾値型カルシウムチャンネルの特異的阻害剤) を添加し桿体に投与すると、内向き電流は消失した。正常リンガー液及び Nifedipine 投与時の発生電流を、各電位に対しプロットした。また、この差分 (Difference) を求めると、 -30 mV で活性化し、 0 mV にピークを持つ典型的な高閾値型カルシウムチャンネル電流の電流-電圧関係となった。挿入図には、正常リンガー液灌流中、 -90 mV の保持電位から -20 mV、 -10 mV 及び $+10$ mV に分極させたときの電流応答を示した。この結果は、桿体が高閾値型カルシウムチャンネルが発現していることを示唆している。

阻害剤) (100 μ M) をリンガー液に添加し桿体に投与し、同じ実験を繰り返した。Nifedipine 投与により、内向き電流は完全に抑制された (第2図)。正常リンガー液中での電流応答から Nifedipine 存在下での電流応答を差し引いて得られた電流-電圧曲線 (第2図) は、典型的な高閾値型カルシウムチャンネルの電流-電圧関係を示した。

バリウムイオン (Ba^{2+}) は、高閾値型カルシウムチャンネルを通過するイオンとして Ca^{2+} より大きな効果を持つことが知られている (例えば, Takahashi *et al.*, 1993)。桿体膜電位を -90 mV に固定し、1分毎に膜電位を -70 mV から $+50$ mV まで鋸波状 (70 mV/秒の速さ) に変化させ、このとき発生する電流 (第3図挿入図) のピーク電流値 (-14 mV での電流) をプロットした (第3図)。正常リンガー液中で、ピーク電流値は約 100 pA であった。正常リンガー液を Ba^{2+} リンガー液に置換すると、ピーク電流値は約 7 倍の 686 pA にまで増大した (第3図)。この後、カドミウムイオン (Cd^{2+}) (カルシウムチャンネル阻害剤) (100 μ M) を Ba^{2+} リンガー液に添加して桿体に投与すると、内向き電流は抑制された。



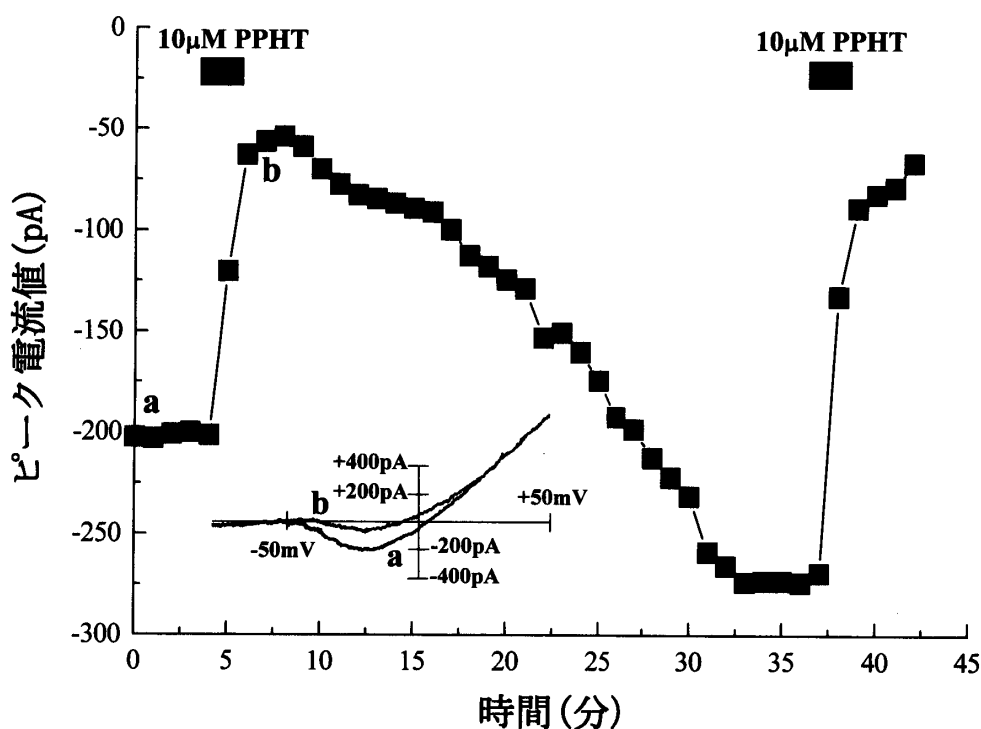
第3図 桿体の高閾値型カルシウムチャンネル電流の Ba^{2+} による増強と Cd^{2+} による抑制
 桿体膜電位を -90 mV に保持し、鋸波状の電位変化 (-90 mV から $+50\text{ mV}$, 70 mV/秒 の速さ) を与え、このとき発生する電流を記録した。この細胞の高閾値型カルシウムチャンネル電流は、 -40 mV で活性化し、 -14 mV にピーク (約 100 pA) を持っていた。本図では、電流記録を開始した時点からのカルシウムチャンネル電流値 (膜電位が -14 mV のときのピーク電流値) を1分毎に測定・表示した。正常リンガー液から Ba^{2+} (高閾値型カルシウムチャンネルを通過するイオンであり、 Ca^{2+} よりも大きな電流を運ぶ) リンガー液に置換すると、ピーク電流は約7倍の 686 pA にまで増大した。 Ba^{2+} リンガー液に Cd^{2+} ($100\text{ }\mu\text{M}$) (カルシウムチャンネル阻害剤) を添加して桿体に投与すると、カルシウムチャンネル電流は完全に抑制された。挿入図には、 Ba^{2+} リンガー液を灌流し始めて10分後 (a) と Cd^{2+} を添加して8分後 (b) の膜電流を示した。第2図の実験のみならずこの結果は、桿体に高閾値型カルシウムチャンネルが発現していること強く示唆している。

以上の結果は、桿体に高閾値型カルシウムチャンネルが存在することを示している。

PPHT による高閾値型カルシウムチャンネル活性の阻害

桿体の高閾値型カルシウムチャンネル活性が Dopamine によって修飾されるのか否かを検討するため、Dopamine ($5\text{ }\mu\text{M}$) を正常リンガー液あるいは Ba^{2+} リンガー液に添加し桿体に灌流投与した。Dopamine 投与により、カルシウムチャンネル電流は減少した (図省略)。Dopamine 投与実験は6桿体で実施し、総ての桿体に電流減少 (抑制効果) が観察された ($37\% \pm 19\%$: 平均 \pm 標準偏差)。

次に、Dopamine によるカルシウムチャンネル電流抑制が Dopamine D2 受容体を介することを証明するため、この受容体の特異的アゴニストである (±)-2-(N-phenethyl-N-propyl) amino-5-hydroxytetralin (PPHT) の効果を調べた。1 μM の PPHT はカルシウムチャンネル電流に影響しなかったが (3 桿体), PPHT 濃度を 5 μM にすると 5 桿体のうち 4 桿体にカルシウムチャンネル電流の減少が惹起された。PPHT 濃度を 10 μM にまで上昇させると、総ての桿体 (14例) において比較的大きなカルシウムチャンネル電流の減少が観察された (56% \pm 33% : 平均 \pm 標準偏差)。そこで、実験には 10 μM の PPHT を用いた。桿体膜電位を -90 mV に固定し、1 分毎に膜電位を -70 mV から +50 mV まで鋸波状 (70 mV/秒の速さ) に変化させ、このとき発生する電流 (第 4 図挿入図) のピーク電流値 (-19 mV での電流) をプロットした (第 4 図)。正常リンガー液中で、ピーク電流値は約 200 pA であった。PPHT を



第 4 図 桿体の高閾値型カルシウムチャンネル電流の PPHT による抑制
 桿体膜電位を -90 mV に保持し、鋸波状の電位変化 (-90 mV から +50 mV, 70 mV/秒の速さ) を与え、このとき発生する電流を記録した。この細胞の高閾値型カルシウムチャンネル電流は、-40 mV で活性化し、-19 mV にピーク (約 200 pA) を持っていた。本図では、電流記録を開始した時点からのカルシウムチャンネル電流値 (膜電位が -19 mV のときのピーク電流値) を 1 分毎に測定・表示した。PPHT (10 μM) (Dopamine D2 受容体の特異的アゴニスト) を正常リンガー液に添加して桿体に投与すると、カルシウムチャンネル電流は約 75% 減少した。これを洗い流すと、電流はゆっくりと回復に向かい、約 25 分後には PPHT 投与前の電流値を凌駕して一定となった。再度 PPHT を投与すると、カルシウムチャンネル電流は前回と殆ど同じ時間経過で減少した。挿入図には、電流記録開始 1 分後 (a) と PPHT を添加して 4 分後 (b) の膜電流を示した。この結果は、高閾値型カルシウムチャンネルは Dopamine D2 受容体を介して抑制されることを示唆している。

正常リンガー液に添加し桿体に投与すると、ピーク電流値は速やかに約75%減少した。PPHTを洗い流すと、電流はゆっくりと回復に向かい、約25分後にはPPHT投与前の電流値を凌駕して一定となった。再度、PPHTを投与した結果、前回と同様な時間経過でカルシウムチャネル電流の減少が惹起された。14桿体でPPHT投与実験を実施し、この中で5桿体でカルシウムチャネル電流の回復がみられた。残り9桿体では、回復は極めて不完全であった。カルシウムチャネル電流は、PPHT投与により減少するのみならず、活性化電位が正方向に移動する傾向にあった(14例中6例)。

以上の結果は、桿体の高閾値型カルシウムチャネルがDopamine D2受容体の活性化により抑制されることを強く示唆している。

考 察

Interplexiform 細胞による Dopamine 放出と桿体の Dopamine D2 受容体活性化の関係
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(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 細胞は網膜内神経細胞の生理的及び形態的变化に関与していることが報告されている(Dopamine D1 受容体: Van Buskirk & Dowling, 1981; Piccolino *et al.*, 1984; Lasater & Dowling, 1985a, b; Dowling, 1986; Mangel & Dowling, 1987; Weiler *et al.*, 1988a, b; Yamada & Saito, 1988; Dopamine D2受容体: Dearry & Burnside, 1985, 1986a, b)。Dowling & Ehinger (1978) による組織学的研究から、双極細胞と水平細胞は Interplexiform 細胞からシナプス入力を受け取っていることが明らかであり、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ていない視細胞の Dopamine D2 受容体活性化に関与しているのか否かは不明である。

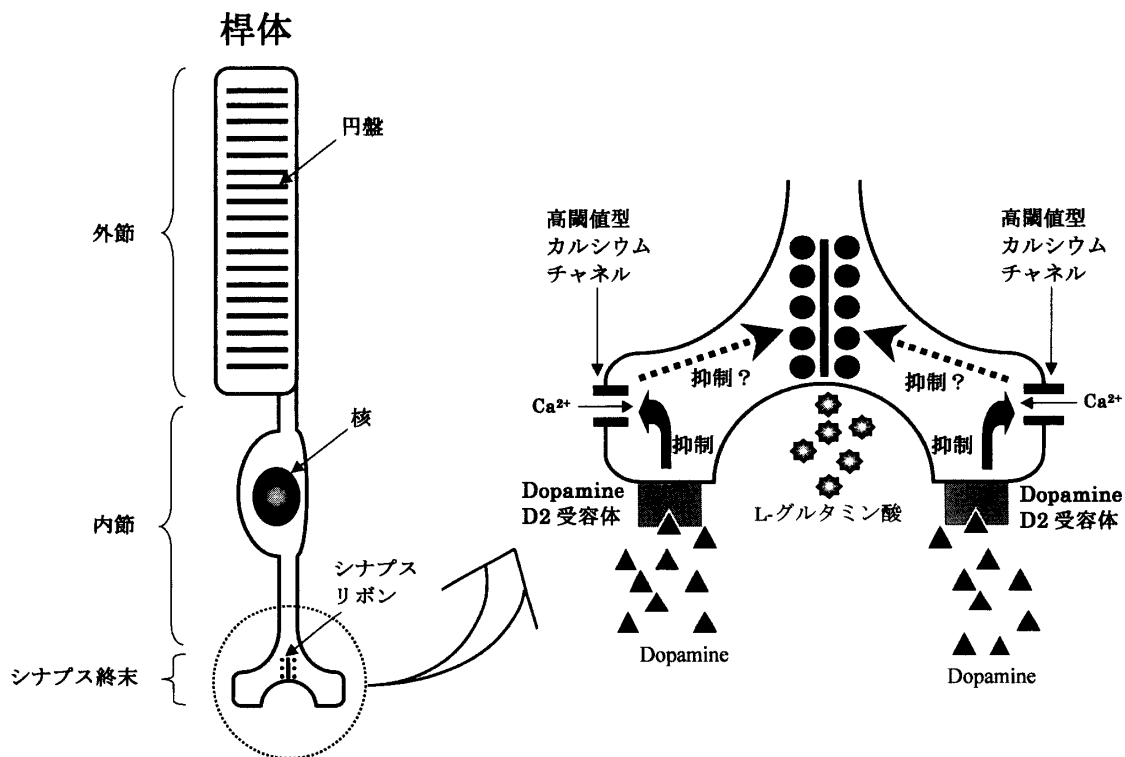
中枢神経系では、細胞外に放出された Dopamine を除去する機構として Dopamine トランスポーターが知られている(Giros & Caron, 1993; Reith *et al.*, 1997)。しかし、網膜において、このトランスポーターの研究は未だ行われていない。網膜での Dopamine 作用が極めて長時間継続することを考慮すると、網膜内神経細胞には Dopamine トランスポーターが発現していないか、あるいは発現していてもその数が少ないことが予想される。もし網膜に Dopamine 除去機構が存在しないかあるいは除去機能が不十分であれば、Interplexiform 細胞から放出された Dopamine は細胞間隙を拡散し、この細胞と直接シナプス結合しない桿体に影響することも考えられる(Rusakov *et al.*, 1999)。

Dopamine の神経修飾作用

Akopian & Witkovsky (1996) はアフリカツメガエル網膜桿体の h (内向き整流性) チャネル電流が Quinpirole (Dopamine D2 受容体のアゴニスト) により抑制されることを, また本研究はトラフサンショウウオ網膜桿体の高閾値型カルシウムチャネル電流が PPHT (Dopamine D2 受容体のアゴニスト) により抑制されることを見出した。これらの結果は, 桿体に Dopamine D2 受容体が存在し, 細胞内セカンドメッセンジャー系を介して電位依存性イオンチャネル活性を抑制することを強く示唆している。一方, 錐体のカルシウムチャネル, カルシウム依存性クロライドチャネル及び h チャネルは Dopamine による修飾を受けないことが報告されている (Barnes & Hille, 1989)。ところが, 最近, 錐体間のギャップ結合が Dopamine D2 受容体を介して調節されていることが示唆された (Krizaj *et al.*, 1998)。錐体に Dopamine D2 受容体が存在するの否か, 及びこの Dopamine D2 受容体を介して錐体の電位依存性イオンチャネルが修飾されるの否かについては, 再検討が必要である。

Dopamine は網膜内修飾因子であり, 水平細胞及び双極細胞がこの影響を受けることはよく知られている (例えば, Mangel & Dowling, 1987; Yamada & Saito, 1988)。Akopian & Witkovsky (1996) の研究及び本研究は, 水平細胞や双極細胞のみならず, 桿体も Dopamine による修飾の対象となることを示唆している。カルシウムチャネルは, 視細胞シナプス終末からの伝達物質 (L-グルタミン酸) 放出に必要な Ca^{2+} を供給する重要な経路である。この経路が Dopamine D2 受容体を介して抑制されることは, 桿体シナプス終末から放出される伝達物質の減少に繋がる (第 5 図参照)。もし視細胞周辺の Dopamine 量が暗黒ではなく薄明時に上昇するのであれば, 少ない光量でさえ大きな過分極を惹起することが可能となる。これは, 薄明時の桿体の感度を上げ, またダイナミックレンジを広げるために有効かもしれない。これを証明するには, 先ず視細胞シナプス終末周辺の Dopamine 量上昇が明暗何れのタイミングで生ずるのかを明らかにする必要がある。

Dopamine D1 受容体の活性化と異なり, D2 受容体の活性化により細胞内 cAMP 量は減少あるいは変化しないことが報告されている (Kebabian & Calne, 1979)。実際, Akopian & Witkovsky (1996) は, アフリカツメガエル網膜桿体の Dopamine D2 受容体を介する h チャネルの抑制に細胞内の GTP 結合タンパク質と Ca^{2+} が関与するが, 細胞内 cAMP は関係しないことを示唆した。本研究で明らかにした Dopamine D2 受容体を介するカルシウムチャネルの抑制にも, h チャネルと同じ系が使われている可能性は充分考えられる。今後, Dopamine D2 受容体を介して活性化されるセカンドメッセンジャーは何なのか, このメッセンジャーがどのようにカルシウムチャネルを抑制するのか, またこの抑制にはどのような生物学的意味があるのかを明らかにしてゆく必要がある。



第 5 図 Dopamine D2 受容体と高閾値型カルシウムチャネルの関係

桿体外節内には多数の二重膜円盤が浮かんでおり、この円盤膜上にロドプシン（桿体視物質）が存在する。この物質に光が当たると、複雑な光化学反応過程を経て、オールトランス型レチナール+オプシンにまで分解される。この光化学反応の途中で生成されるメタロドプシン II は、トランスデューシンを活性化する。トランスデューシンはホスホジエステラーゼを活性化し、細胞内の cGMP を 5'GMP に分解する。この明暗に伴う外節内 cGMP 濃度変化は、外節形質膜に存在する cGMP 依存性イオンチャネルの開閉に影響する。外節内 cGMP 濃度が高い場合（暗時）、cGMP 依存性チャネルは開口し、このチャネルを通じて外節内に流入した Na^+ により視細胞は脱分極している。一方、cGMP 濃度が低下（明時）するとこのチャネルは閉塞し、 Na^+ の流入が減少するため視細胞は過分極する。この電位変化は、内節の形質膜に発現する電位依存性イオンチャネルにより修飾され、最終的にシナプス終末からの伝達物質（L-グルタミン酸）放出量に変換される。視細胞からの伝達物質放出は、細胞内 Ca^{2+} により調節されている。中枢神経系でのシナプス同様、細胞内 Ca^{2+} 上昇は伝達物質放出を促進する。この Ca^{2+} の供給路として、シナプス終末部のカルシウムチャネルが重要な役割を果たしている。本実験結果から、桿体のカルシウムチャネルは Dopamine D2 受容体の活性化により抑制されることが示唆された。カルシウムチャネル活性の抑制は、細胞内への Ca^{2+} 上昇を抑えるため、桿体から放出される伝達物質（L-グルタミン酸）量を減少させることが予想される。

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

- Akopian, A. and Witkovsky, P. (1996), D2 Dopamine receptor-mediated inhibition of a hyperpolarization-activated current in rod photoreceptors, *J. Neurophysiol.*, **76**: 1828–1835.
- Attwell, D., and Wilson, M. (1980), Behaviour of the rod network in the tiger salamander mediated by membrane properties of individual rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **309**: 287–315.
- 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. (Lond.)*, **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. (Lond.)*, **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 Hille, B. (1989), Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, **94**: 719–743.
- Chen, C. and Schofield, G. G. (1993), Differential neuromodulation of calcium currents by norepinephrine in rat sympathetic neurons, *J. Neurophysiol.*, **70**: 1440–1450.
- Cohen, A. I., Todd, R. D., Harmon, S., and O'Malley, K. L. (1992), photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 12093–12097.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- 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 γ -aminobutyric acid and serotonin, *J. Neurochem.*, **46**: 1022–1031.
- Dowling, J. E. (1986), Dopamine: a retinal neurotransmitter?, *Trends Neurosci.*, **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.
- 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., Arruza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1998), Excitatory amino acid transporter of the tiger salamander retina: identification, localization, and function, *J. Neurosci.*, **18**: 698–712.
- Elmslie, K. S., Werz, M. A., Overholt, J. L. and Jones, S. W. (1993), Intracellular ATP and GTP are both required to preserve modulation of N-type calcium channel current by norepinephrine, *Pflüger Arch.*, **423**: 472–479.
- Fain, G. L., Gerschenfeld, H. M. and Quandt, F. N. (1980a), Calcium spikes in the toad rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **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. (Lond.)*, **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.
- Giros, B. and Caron, M. G. (1993), Molecular characterization of the dopamine transporter, *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**: 43-49.
- 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, *Pflüger Arch.*, **391**: 85-100.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61-64.
- 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.
- Kebabian, J. and Calne, D. (1979), Multiple receptors for dopamine, *Nature*, **277**: 93-96.
- Krizaj, D., Gabriel, R., Owen, W. G. and Witkovsky, P. (1998), Dopamine D2 receptor-mediated modulation of rod-cone coupling in the *Xenopus* retina, *J. Comp. Neurol.*, **398**: 529-538.
- Krizaj, D. and Witkovsky, P. (1993), Effects of submicromolar concentrations dopamine on photoreceptor to horizontal cell communication, *Brain Res.*, **627**: 122-128.
- 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.
- 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 Lam, D. M. K. (1981), Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7185-7189.
- Marc, R. E. and Liu, W.-L. S. (1981), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **311**: 266-269.
- Mariani, A. P. (1986), Photoreceptors of the larval tiger salamander retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **227**: 483-492.
- 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. 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. 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.
- Muresan, Z. and Besharse, J. C. (1993), D2-like Dopamine receptors in amphibian retina: localization with fluorescent ligands, *J. Comp. Neurol.*, **331**: 149-160.
- 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.
- Picolino, 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.

- 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.
- Reith, M. E., Xu, C. and Chen, N. H. (1997), Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter, *Eur. J. Pharmacol.*, **324**: 1–10.
- Rieke, F. and Schwartz, E. A. (1996), Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse, *J. Physiol. (Lond.)*, **493.1**: 1–8.
- Rusakov, D. A., Kullmann, D. M. and Stewart, M. G. (1999), Hippocampal synapses: do they talk to their neighbors?, *Trends Neurosci.*, **22**: 382–388.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of Glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- 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. (Lond.)*, **426**: 43–80.
- Sjöstrand, F. S. (1953), Ultrastructure of the outer segment of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope, *Cell. Comp. Physiol.*, **42**: 15–44.
- Sjöstrand, F. S. (1958), Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from sections, *J. Ultrastruct. Res.*, **2**: 122–170.
- Stack, J. and Surprenant, A. (1991), Dopamine actions on calcium currents, potassium currents and hormone release in rat melanotrophs, *J. Physiol. (Lond.)*, **439**: 37–58.
- 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., Ishida, A. T. and Lightfoot, D. O. (1977), Structural basis for on- and off-center responses in the retina of the goldfish, *Science*, **198**: 1269–1271.
- 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.
- Takahashi, K.-I. (1986), Ion channels in *in situ* rod of the frog retina as revealed by intracellular current injection, *Keio Journal of Medicine*, **35**: 162–179.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 mudpuppy, *Necturus maculosus*. II.

トラスサンショウウオ網膜桿体に発現する高閾値型カルシウムチャンネルの Dopamine D2 受容体を介する修飾

Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.

Wikovsky, P. and Dowling, J. E. (1969), Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **100**: 60–82.

Yamada, M. and Saito, T. (1988), Effects of dopamine on bipolar cells in the carp retina, *Biomed. Res. Suppl.* **9**: 125–130.