

キンギョ網膜双極細胞内カルシウムイオン濃度の GABA による調節

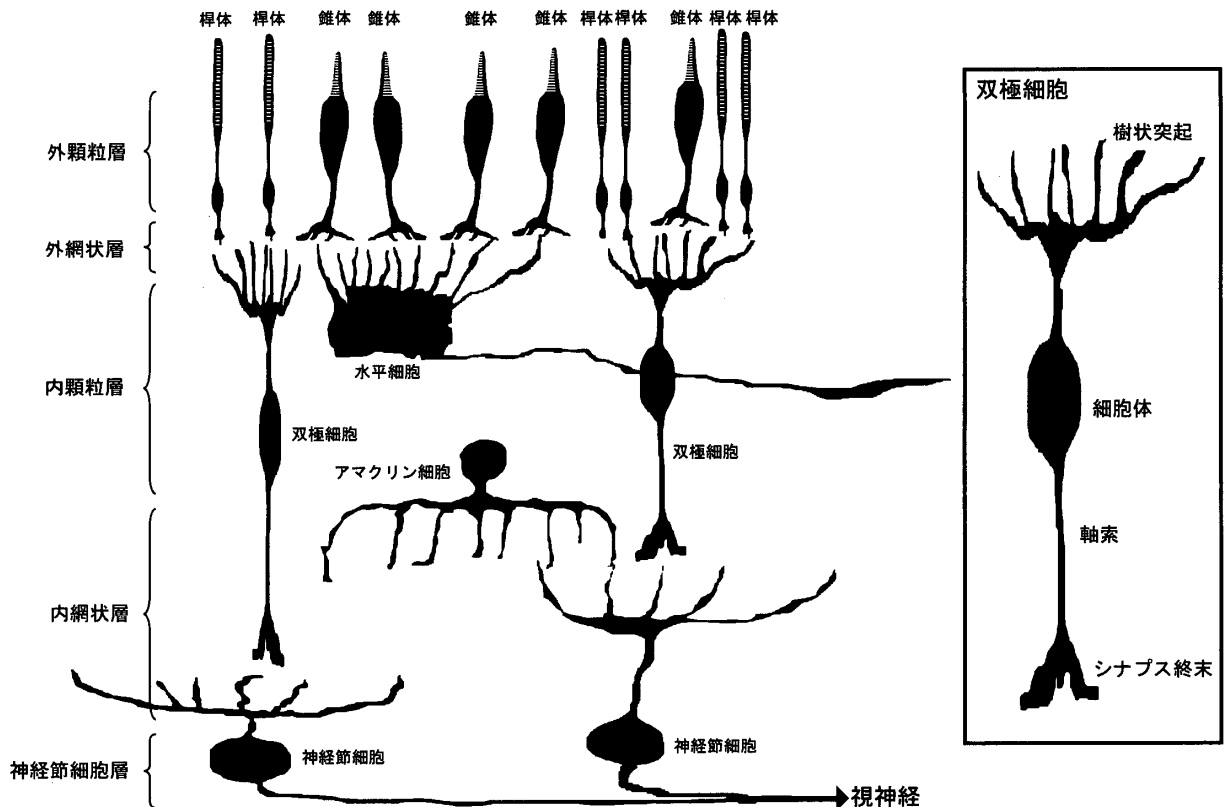
高 橋 恭 一

(受付 2000 年 9 月 29 日)

序 文

脊椎動物の視細胞は、昼間視（色覚）を司る錐体と薄明視を司る桿体に分類される（第 1 図参照）。それぞれは、外節、内節及びシナプス終末部からなる。桿体の場合、光量子は外節内円盤膜上に存在する視物質（光感受性色素）に衝突し、一連の光化学反応を経て、最終的に外節内の cGMP (cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate) を減少させる。この結果、外節の細胞膜に発現する光感受性ナトリウムチャネル（cGMP 依存性ナトリウムチャネル）は閉塞し、このチャネルを通じて細胞内に流入していたナトリウムイオン (Na^+) が減少あるいは停止するため、視細胞外節は過分極する。一方、暗時（視細胞外節内に cGMP が多量に存在する状態）には光感受性ナトリウムチャネルが開口しているため、 Na^+ は濃度勾配に従って細胞外から細胞内に流入し、視細胞外節は脱分極した状態となる。明暗変化に伴う視細胞外節での電位変化は、内節に存在する数種の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放出される伝達物質の量的変化に変換される。現在、伝達物質として興奮性アミノ酸（L-グルタミン酸）が放出されていると考えられている（Cervetto & McNichol, 1972; Murakami, *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Takahashi & Murakami, 1991）。錐体の場合、外節の構造、視物質の局在あるいは光感受性などに桿体との相違はあるものの、光信号が電気信号に変換されるメカニズムについては桿体と同じであると考えられている（Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994）。視細胞から放出された伝達物質は水平細胞並びに双極細胞の受容体に結合し、これらの細胞に電位変化を生む。

双極細胞は、受容野中心部への光照射によって脱分極応答を示し、周辺部への光照射によって過分極応答を示す ON 中心型双極細胞と、また全く逆の応答パターンを示す OFF 中心型細胞の 2 種類に分けられる（Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 1973, 1979, 1983; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Kaneko & Tachibana, 1982; Saito & Kujiraoka, 1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987）。受容野中心部光照射により惹起される電位応答は、視細胞からのシナプス入力を反映している（Ishida *et*



第1図 魚類網膜の細胞構築と双極細胞の形態

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）からなる。視細胞（錐体と桿体）のみが光感受性を有し、他の神経細胞は視覚情報処理（特徴抽出）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明暗情報（光環境の変化）は電気信号に変換され、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）による情報処理を経て、脳にまで伝播される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、そして双極細胞、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、そして双極細胞、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、その結果が視神経（神経節細胞の軸索）を経て脳に達する。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス結合する錐体水平細胞（緑色）と桿体とシナプス結合する桿体水平細胞（赤色）に分類される。色覚を有する魚類網膜には、3種類の錐体（青錐体、緑錐体と赤錐体）のそれぞれと独占的にシナプス結合する水平細胞（3種類の錐体水平細胞）が存在する。双極細胞は光応答性の相違から、ON 中心型（脱分極型）双極細胞と OFF 中心型（過分極型）双極細胞の2種に分類される。ON 中心型（脱分極型）双極細胞の受容野中心部の光応答形成には APB (2-Amino-4-phosphonobutyric acid) 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（過分極型）双極細胞の受容野中心部の光応答形成には KA (Kainic acid)/AMPA ((RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid) 型グルタミン酸受容体（イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体）が関与している。また、何れの双極細胞においても、受容野周辺部の光応答形成に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）が関与していると考えられている。それぞれの双極細胞は専用の経路（すなわち、ON 中心型双極細胞は内網状層の深部（神経節細胞により近い部位）で神経節細胞とシナプス結合、また OFF 中心型双極細胞は内網状層の浅部（アマクリン細胞により近い部分）で神経節細胞とシナプス結合）を形成している (Famiglietti *et al.*, 1976)。四角内に、双極細胞の各部の名称を示した。

al., 1980)。ON 中心型双極細胞の受容野中心部の光応答形成には APB (2-Amino-4-phosphonobutyric acid) 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 中心型双極細胞の受容野中心部の光応答形成には KA (Kainic acid)/AMPA ((RS)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid) 型グルタミン酸受容体 (イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体) の関与が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形成に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) が関与している証拠はいくつか得られているが、詳細については不明な点も多い (Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978)。受容野中心部と周辺部での光応答の極性逆転はコントラスト強調 (形態視の基礎過程) に必須のメカニズムと考えられているため、この解明は古くから視覚研究の主要課題の一つとなっている。

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けられる (MacNichol & Svaetichin, 1958; Tomita, 1965)。何れの水平細胞にも、OFF 中心型双極細胞と同じ KA/AMPA 型グルタミン酸受容体が発現している (Lasater & Dowling, 1982; Rowe & Raddock, 1982a, b; Kaneko & Tachibana, 1985; Takahashi & Murakami, 1988; Laufer *et al.*, 1996)。色覚を有する魚類網膜において、錐体水平細胞は赤錐体からシナプス入力を受け取る単相性水平細胞、緑錐体からシナプス入力を受け取る二相性水平細胞視細胞、及び青錐体からシナプス入力を受け取る三相性水平細胞に分類される。二相性及び三相性水平細胞の光応答極性は波長に依存して異なるが、これに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) が関係していることが明らかとなっている (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。一方、桿体水平細胞は桿体のみからシナプス入力を受け取っており、錐体とのシナプス結合はない (Tsukamoto *et al.*, 1987)。水平細胞は電気シナプス (ギャップ結合) を介して結合しているため、水平細胞に惹起された電位応答は電気緊張的に近隣の細胞にまで瞬時に伝播する (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Witkovsky *et al.*, 1983; Kouyama & Watanabe, 1986; Baldrige *et al.*, 1987; Vaney, 1993; Murakami *et al.*, 1995)。従って、水平細胞の受容野は樹状突起の拡がりよりも相当大きく、これは双極細胞の同心円型中心一周辺拮抗的受容野の周辺部応答形成に非常に都合が良い。

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) では、 γ -アミノ酪酸 (GABA) が伝達物質として使われている (Lam *et al.*, 1978; Marc *et al.*, 1978; Schwartz,

1982, 1987)。この GABA 放出は、①Nipecotic acid (GABA トランスポーターの阻害剤) により抑えられること、また②細胞内カルシウムイオン濃度上昇が不要であることなどから、GABA トランスポーターの輸送逆転によると考えられている (Ayoub & Lam, 1984; Yazulla, 1986; Schwartz, 1982, 1987)。水平細胞から放出された GABA は、視細胞のシナプス終末にある GABA_A 受容体を活性化し、塩素イオン (Cl⁻) に対する透過性を増大させて視細胞を過分極する (Tachibana & Kaneko, 1987)。この過分極が、三原色過程から反対色過程への色覚変換並びに双極細胞の受容野周辺部応答形成に関与している (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b)。放出された GABA は GABA トランスポーターにより水平細胞自身に取り込まれ、細胞外から除去される (Malchow & Ripps, 1990; Takahashi *et al.*, 1995b)。つまり、水平細胞周辺 (双極細胞の細胞体と樹状突起及び視細胞のシナプス終末も含む) の GABA 濃度は、この GABA トランスポーターにより調節されている。Takahashi *et al.* (1995b) の概算によると、暗時に 9.5 μ M, 明時に 1.6 μ M の GABA が水平細胞の近隣に残存する。水平細胞並びに近隣の神経細胞 (例えば、視細胞や双極細胞など) が GABA 受容体を有していれば、これらの細胞は残存する GABA の影響を受ける筈である。実際、Takahashi *et al.* (1995a) は、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に発現する GABA_C 受容体がこの残存 GABA 濃度で充分活性化し得ることを示した。網膜内では、双極細胞の細胞体並びに樹状突起が水平細胞と並置しているため、残存する GABA の影響を受け易い。

今回、水平細胞の周辺に残存する GABA が、双極細胞の生理機能に影響を与えるのか否かを、双極細胞の細胞体に発現するカルシウムチャンネルに着目して解析した。

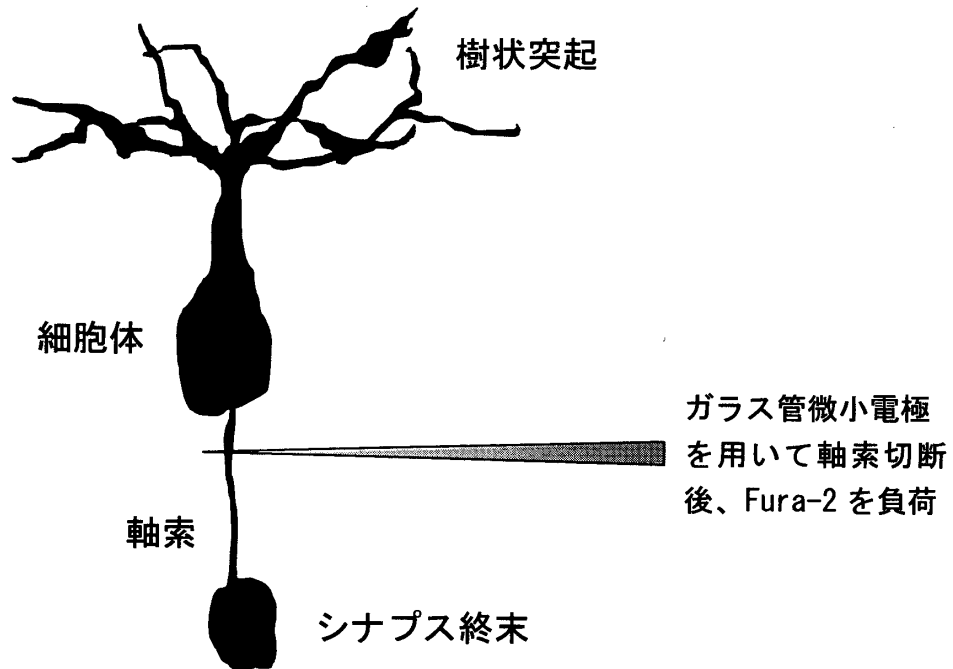
実験材料と実験方法

実験には、数時間以上暗順応した体長約 8 cm~12 cm のキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜から双極細胞を単離した。以下に単離法を概説する。低温麻酔したキンギョを断頭し、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した後、両眼球を摘出した。雑菌の混入を防ぐため、以降の操作はクリーンベンチ (滅菌箱) 内で行った。摘出眼球を 70% エタノールに 20 秒間浸し、滅菌した。この眼球を pH 7.6 に調整した単離操作液 (125.0 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 1.0 mM リン酸ナトリウム [Na₂HPO₄], 2.6 mM 塩化カリウム [KCl], 2.5 mM 塩化カルシウム [CaCl₂], 0.5 mM 塩化マグネシウム [MgCl₂], 0.5 mM 硫酸マグネシウム [MgSO₄], 10.0 mM ブドウ糖 [Glucose], 10.0 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid [HEPES], 0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン [BSA]) で数回洗浄し、前眼部、水晶体および硝子体を除去後、網膜を剥離した。2

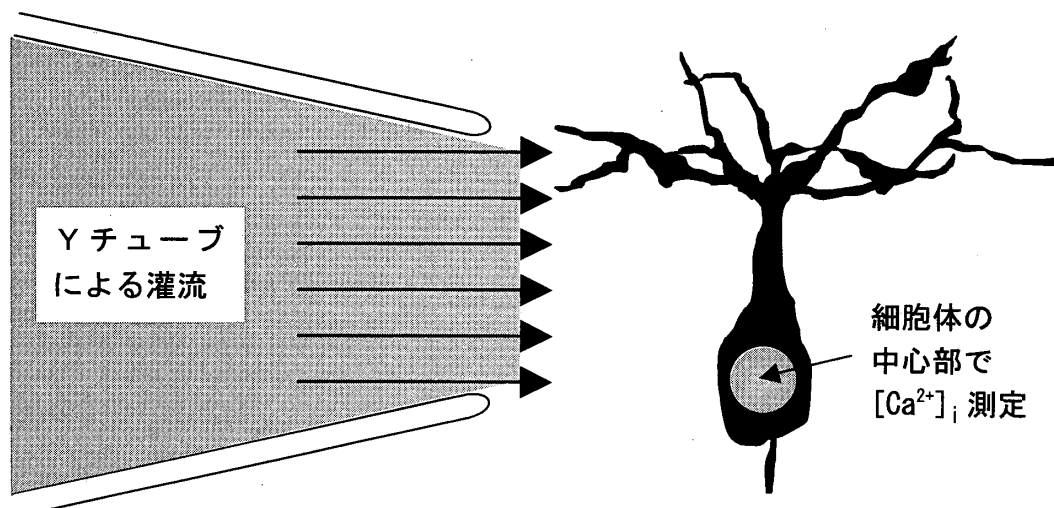
mm 幅に切断した剥離網膜細片を、pH 7.0 に調整した Papain 溶液 (15U/ml Papain [タンパク質分解酵素], 125.0 mM NaCl, 1.0 mM Na_2HPO_4 , 2.6 mM KCl, 10.0 mM Glucose, 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 5.0 mM L-システイン, 5.0 mM Ethylene glycol-bis(β -aminomethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid[EGTA], 10.0 mM HEPES, 0.1 mg/ml BSA) に移し、28°C で40分間振盪した。この後、網膜細片をプラスチック製遠心管 (容量15 ml; Becton Dickinson) に移し、1.5 ml の単離操作液を加え、先端口径を約 1.0 mm にファイアポリッシュしたパスツールピペット (Becton Dickinson) を用いて網膜細片を7回出し入れた (ピペッティング)。比較的大きな網膜細片が沈殿するのを待ち、上澄み (細胞浮遊液; 約 1 ml) をガラス製試験管 (容量 6 ml; Fisher Scientific Co.) に移し、4°C で保存した。再び、網膜細片が存在する遠心管に単離操作液を 1.0 ml 補充し、パスツールピペットによるピペッティングを7回行い、細胞浮遊液を試験管に移し、4°C で保存した。この操作を、網膜細片がなくなるまで継続した。この結果、16~20本の細胞浮遊液を含む試験管を得た。それぞれの試験管から 20 μl の細胞浮遊液を採取しスライドガラスに置き、顕微鏡観察し、双極細胞を含む細胞浮遊液が入った試験管を実験に使用した。網膜を構成する神経細胞の形態学的特徴は、細胞内染色法を用いて詳細に調べられており、網膜内から神経細胞を単離した後も形態的特徴はよく保存されているため、識別は極めて容易であった (例えば, Kaneko, 1970, 1971; Naka & Otsuka, 1974; Copenhagen & Owen, 1976; Murakami & Shimoda, 1977; Famiglietti *et al.*, 1977; Otsuka, 1978; Tauchi *et al.*, 1990; Shimoda *et al.*, 1992)。双極細胞にはサブタイプが数種類存在するが、本研究には巨大なシナプス終末を持つ ON 中心型双極細胞を用いた (Stell, 1967; Ishida *et al.*, 1980; Saito & Kujiraoka, 1982; Kaneko & Tachibana, 1985; Yazulla *et al.*, 1987; Heidelberger & Matthews, 1992; Sherry & Yazulla, 1993)。Concanavalin A (Con A) を塗布したカバーグラス上に細胞浮遊液を分注し、数分経過後細胞内 Ca^{2+} 測定実験を開始した。Con A を塗布したカバーグラスは、マイクロディスペンサーを用いて Con A (0.4 mg/ml) をカバーグラス上に薄く塗り、これを紫外線ランプ (滅菌用ランプ) の下で乾燥させ、使用した。細胞内誘導用のガラス管微小電極 (電極のテーパー部分よりも先端の細い部分) を軸索 (細胞体とシナプス終末の中間部) にマイクロマニピュレーター (MP-85, Sutter Instrument Co.) を用いて押し当て、数十秒後ゆっくりとガラス管を軸索から離すと、細胞体のみが残り、シナプス終末が破壊される場合があることを見出した (第2図 A 参照)。細胞体と樹状突起のみの双極細胞標本を作製するため、この方法を用いた。この操作を163の単離双極細胞で実施し、19細胞においてシナプス終末除去に成功した。

単離双極細胞の細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 測定には、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素である 1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(amino-5-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic, pentaacetoxymethyl ester (Fura 2-AM) を用いた。Fura 2-AM

A



B



第2図 単離双極細胞からシナプス終末を除去する方法と細胞内 Ca^{2+} 測定法の概略

A: 細胞内誘導用のガラス管微小電極（電極のテーパー部分よりも先端の部分を使用）をキンギョ網膜から単離した双極細胞の軸索（細胞体とシナプス終末の中間部）にマイクロマニピュレーターを用いて押し当て、数十秒後ゆっくりとガラス管を軸索から離すと、シナプス終末は破壊され、細胞体のみが残った。B: シナプス終末を除去した双極細胞に、Fura 2 を負荷し、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 変化を導出した。双極細胞から約 $150\ \mu\text{m}$ の距離に置いた Y-tube（直径：約 $120\ \mu\text{m}$ ）を用いて薬剤を投与した。

(5 μ M) を含む正常リンガー液 (125.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 16.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA, pH 7.8) 中に双極細胞を 7 分間放置し、その後正常リンガー液で洗い流した。約 40 分後、細胞内 Ca^{2+} 測定を開始した。水銀ランプと顕微鏡のステージの間に単色光フィルター交換装置 (Lambda 10, Sutter Instrument, Co.) を置き、340 nm (Omega Optical, Inc.) と 380 nm (Omega Optical, Inc.) の紫外光を交互に 200 ミリ秒間双極細胞に照射し、それぞれの紫外光により励起された蛍光 (500 nm, Omega Optical, Inc.) は CCD カメラ (Hamamatsu Photonics) を介してコンピュータ連動型測定システム (Universal Imaging) を用いて記録し、その Ratio [340 nm/380 nm] (340 nm の紫外線照射により励起される蛍光の強度/380 nm の紫外線照射により励起される蛍光の強度) を計測した。測定は、12 秒毎に双極細胞の細胞体あるいはシナプス終末 (直径 10 μ m の円形部) で行った。

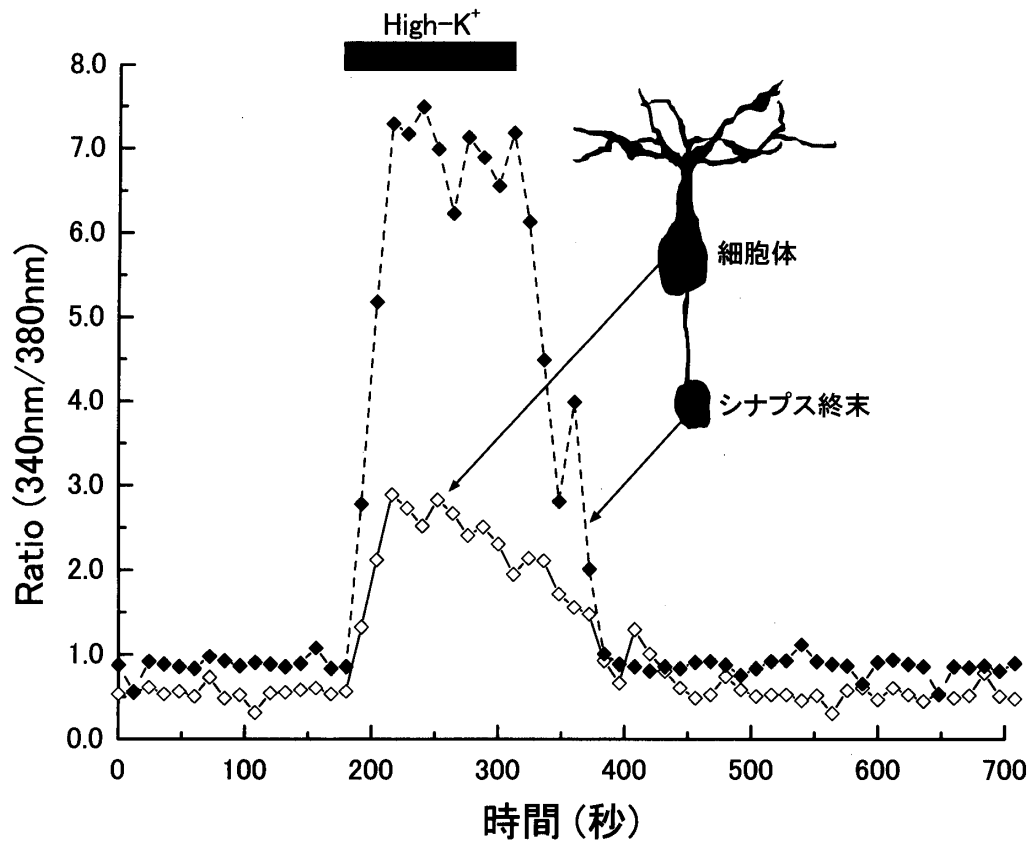
網膜から単離した双極細胞の静止膜電位をパッチ電極法 (電極抵抗: 5~10 $\text{M}\Omega$; 電極内液: 130.0 mM KCl, 4.0 mM NaCl, 2.0 mM MgCl_2 , 1.0 mM CaCl_2 , 10.0 mM EGTA, 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate[ATP], 0.5 mM Guanosine 5'-triphosphate[GTP], 10 mM HEPES, pH 7.4) を用いて測定すると、-57~-68 mV ($n=5$) であった (ホールセル達成後数秒以内に電圧固定モード (保持電位: -70 mV) から電流固定モードに切り替え、細胞内液がパッチ電極内液により置換される以前に膜電位を測定)。細胞外 K^+ 濃度を 10 倍変化させたとき、膜電位は -38~-49 mV 脱分極した。この測定に基づき、本実験では双極細胞を脱分極させるため、カリウムイオン (K^+) を高濃度に含むリンガー液 (高 K^+ リンガー液: 80.0 mM NaCl, 50.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 16.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA) を作製し、灌流した。各種薬剤は、浸透圧を考慮せず、これらのリンガー液に加え、Y-チューブを用いて灌流した (第 2 図 B 参照)。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co. そして Fura 2-AM は Molecular Probes, Inc. から購入した。

実 験 結 果

脱分極刺激により誘発される双極細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇

キンギョ網膜から単離した双極細胞の細胞体とシナプス終末の細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度 (Ratio [340 nm/380 nm]) を、同時記録した (第 3 図)。正常リンガー液灌流中、Ratio [340 nm/380 nm] は細胞体で約 0.6、シナプス終末で約 1.0 であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると、Ratio [340 nm/380 nm] は細胞体で 3.0 付近、またシナプス終末で 7.5 付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと、何れの部位の Ratio [340



第3図 単離双極細胞の細胞体とシナプス終末の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

キンギョ網膜から単離した双極細胞の細胞体(◇)とシナプス終末(◆)の細胞内 Ca^{2+} 濃度(Ratio [340 nm/380 nm])変化を同時記録した。正常リンガー液灌流中のRatio [340 nm/380 nm]はシナプス終末のほうが細胞体よりも若干高く、細胞体で約0.6, シナプス終末で約1.0であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると、Ratio [340 nm/380 nm]は細胞体で3.0付近、またシナプス終末で7.5付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと、Ratio [340 nm/380 nm]は速やかに元のレベルへと回復した。両部でのRatio [340 nm/380 nm]の立ち上がり時間に、大きな差異は認められなかった。以上は、双極細胞の細胞体とシナプス終末の何れにもカルシウムチャンネルが存在し、高 K^+ リンガー液の灌流(脱分極刺激)に伴いこのチャンネルが活性化し、細胞外から流入した Ca^{2+} によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が生じたことを示唆している。

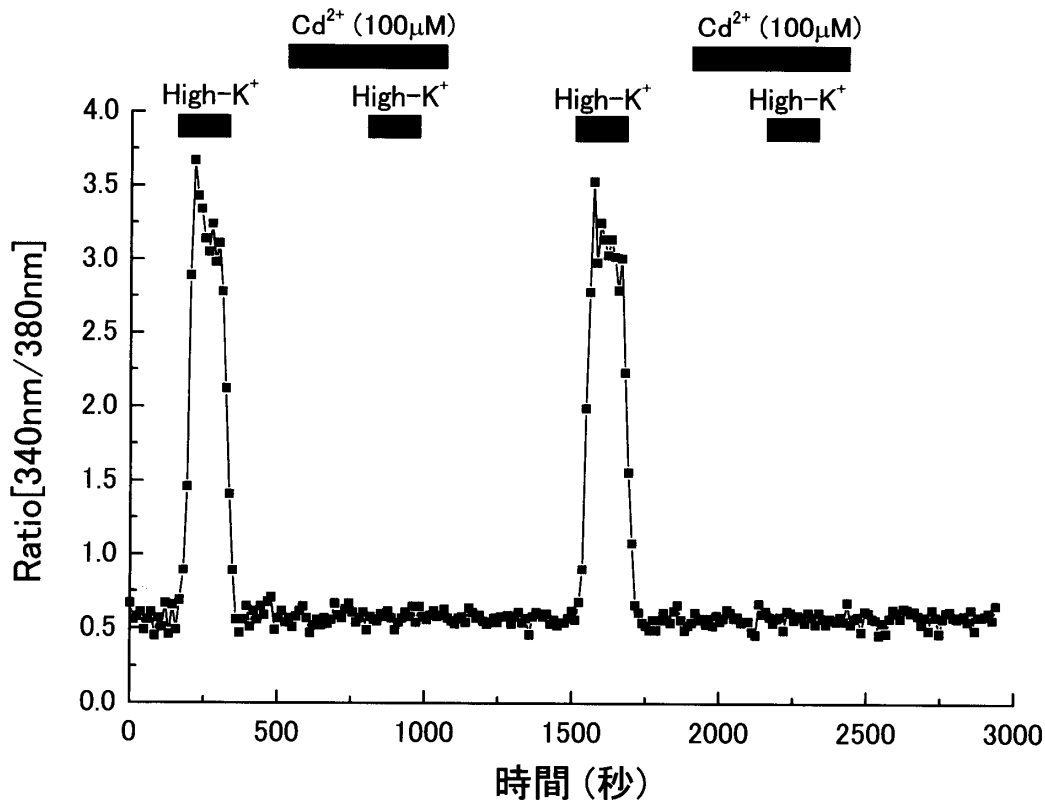
nm/380 nm]も直ちに元のレベルへと回復した。細胞体とシナプス終末とではRatio [340 nm/380 nm]変化に2倍以上の差が認められたが、Ratio [340 nm/380 nm]上昇速度に顕著な差は見られなかった。同じ実験を4細胞で実施し、何れにおいても同様の結果を得た。

以上は、双極細胞の細胞体とシナプス終末の両方にカルシウムチャンネルが存在し、高 K^+ 刺激(脱分極刺激)によりこれらが活性化することにより細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が生じたことを強く示唆している。

双極細胞細胞体の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とカルシウムチャンネルの関係

これまでの研究から、双極細胞(特に、シナプス終末)に電位依存性カルシウムチャンネル

が発現していることは明らかである (Kaneko & Tachibana, 1985; Tachibana & Okada, 1991; Heidelberg & Matthews, 1992; Tachibana *et al.*, 1993)。しかし、双極細胞の細胞体にカルシウムチャンネルが発現しているのか否かについては、未だ十分な解析が行われていない。ここでは、双極細胞の細胞体にカルシウムチャンネルが発現しているのか否かを検討した。シナプス終末を細胞体から切り離した標本 (第 2 図 A 参照) を作製し、細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ratio [340 nm/380 nm]) を記録した (第 4 図)。正常リンガー液の灌流中、Ratio [340 nm/380 nm] は約 0.5 であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると、Ratio [340 nm/380 nm] は 3.5 付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと、Ratio [340 nm/380 nm] は直ちに元のレベルへと回復した。次に、カルシウムチャンネルの阻害剤であるカドミウムイオン (Cd^{2+} ; 100 mM) を正常リンガー液に添加し灌流した。 Cd^{2+} 存在時に、高 K^+ リンガー液



第 4 図 Cd^{2+} による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制

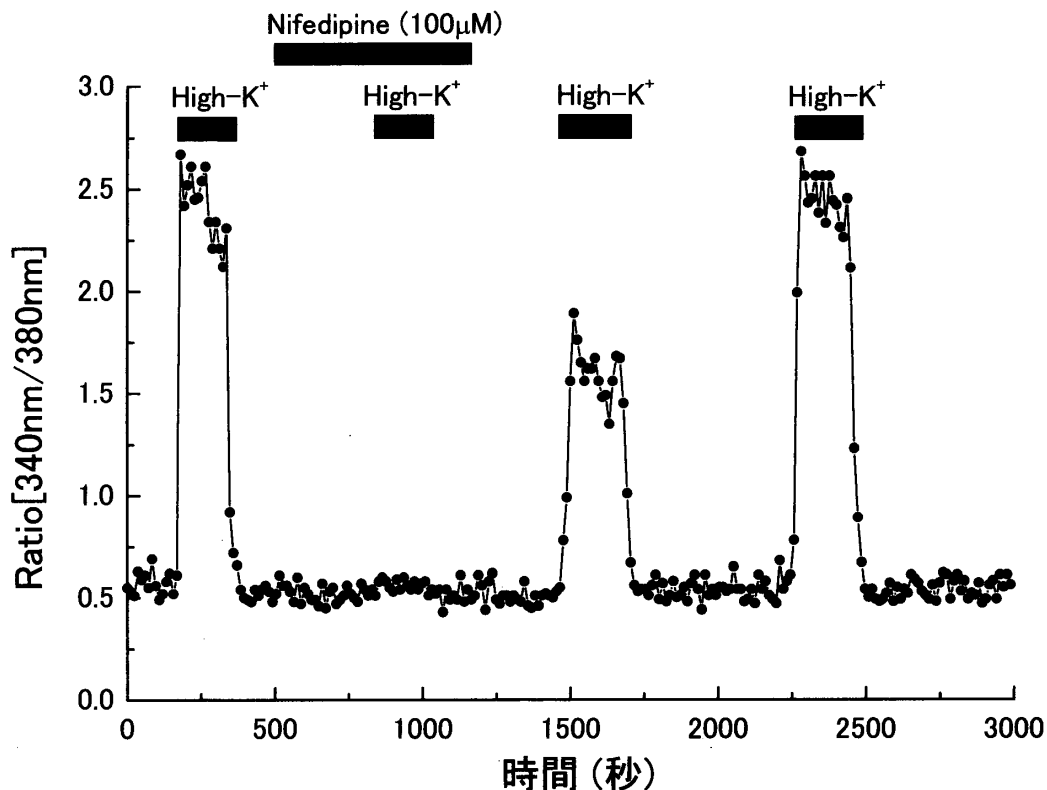
シナプス終末を除去した双極細胞細胞体の細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ratio [340 nm/380 nm]) 変化を記録した。正常リンガー液灌流中、Ratio [340 nm/380 nm] は約 0.5 であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると、Ratio [340 nm/380 nm] は 3.5 付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと、Ratio [340 nm/380 nm] は速やかに元のレベルへと回復した。次に、正常リンガー液にカドミウムイオン (Cd^{2+} ; 100 μM) を添加し灌流したが、Ratio [340 nm/380 nm] に有意な変化は認められなかった。 Cd^{2+} 存在時に高 K^+ リンガー液を灌流しても、Ratio [340 nm/380 nm] 上昇は起こらなかった。同じ実験をもう一度繰り返し、 Cd^{2+} が Ratio [340 nm/380 nm] 上昇を抑えることを確認した。以上は、双極細胞の細胞体に電位依存性カルシウムチャンネルが存在し、この活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことを示唆している。

を灌流しても、Ratio [340 nm/380 nm] 上昇は生じなかった。 Cd^{2+} を洗い流した後、高 K^+ リンガー液を灌流すると、Ratio [340 nm/380 nm] は3.5付近にまで上昇した。 Cd^{2+} の添加実験を繰り返し実施したが、結果は同じであった。同じ実験を3細胞で実施し、何れにおいても同様の結果を得た。

以上は、双極細胞の細胞体に電位依存性カルシウムチャネルが発現し、このチャネルの活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が生じたことを示唆している。

双極細胞細胞体に発現する高閾値型カルシウムチャネル

双極細胞の細胞体に発現するカルシウムチャネルの種類を同定するため、シナプス終末を細胞体から切り離した標本（第2図A参照）を用いて、Nifedipine（高閾値型カルシウムチャ



第5図 Nifedipine による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制

シナプス終末を除去した双極細胞細胞体の細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ratio [340 nm/380 nm]) 変化を記録した。正常リンガー液灌流中、Ratio [340 nm/380 nm] は約0.5であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると、Ratio [340 nm/380 nm] は2.6付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと、Ratio [340 nm/380 nm] は速やかに元のレベルへと回復した。次に、正常リンガー液にNifedipine (100 μM) を添加し灌流したが、Ratio [340 nm/380 nm] に有意な変化は認められなかった。また、Nifedipine 存在時に高 K^+ リンガー液を灌流しても、Ratio [340 nm/380 nm] の上昇は起こらなかった。Nifedipine を洗い流して4分後、高 K^+ リンガー液を灌流すると、Ratio [340 nm/380 nm] は約1.5まで上昇した。Nifedipine の抑制効果は、これを洗い流して約16分後には完全に消失した。以上は、双極細胞の細胞体に高閾値型カルシウムチャネルが発現していることを示唆している。

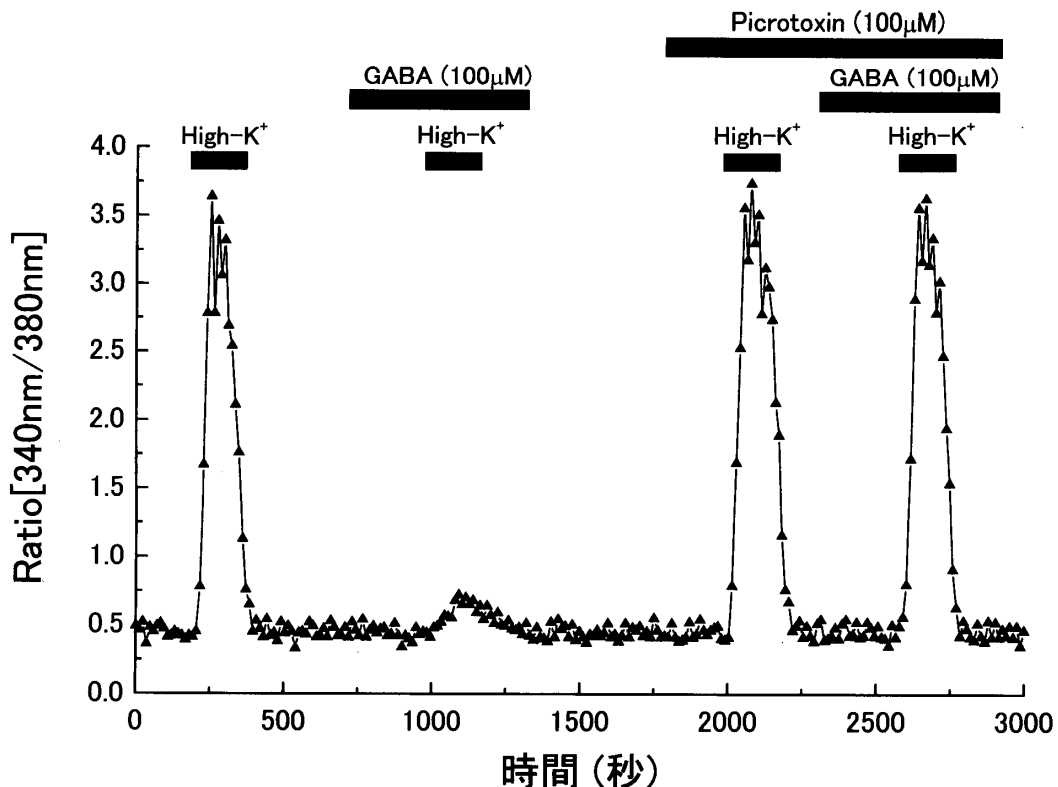
ネル阻害剤)の効果を調べた(第5図)。正常リンガー液灌流中, Ratio [340 nm/380 nm] は約0.5であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると, Ratio [340 nm/380 nm] は2.8付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと, Ratio [340 nm/380 nm] は直ちに元のレベルへと回復した。ここで, Nifedipine (100 μM) を正常リンガー液に添加した。Nifedipine 存在時には, 高 K^+ リンガー液を灌流しても, Ratio [340 nm/380 nm] に変化は認められなかった。Nifedipine を洗い流して4分後, 高 K^+ リンガー液を灌流すると, Ratio [340 nm/380 nm] は約1.5へと上昇した。さらに8分間待って, 高 K^+ リンガー液を灌流すると, Ratio [340 nm/380 nm] は Nifedipine 投与前と同じレベル(約2.7)にまで上昇した。同じ実験を3細胞で実施し, 何れにおいても同様の結果を得た。

以上は, 双極細胞の細胞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を示唆している。

双極細胞細胞体の細胞内 Ca^{2+} 濃度の GABA による調節

双極細胞のシナプス終末に発現する高閾値型カルシウムチャンネルは, 代謝調節型 GABA 受容体 ($GABA_B$ 受容体のサブタイプ) とイオンチャンネル直結型 GABA 受容体 ($GABA_C$ 受容体) による調節を受けていることが報告されている (Matthews *et al.*, 1994)。ここでは, 先ず双極細胞の細胞体に発現する高閾値型カルシウムチャンネルが GABA による影響を受けるのか否かを, シナプス終末を細胞体から切り離した標本(第2図A参照)を用いて調べた(第6図)。正常リンガー液灌流中, Ratio [340 nm/380 nm] は約0.7であった。正常リンガー液を高 K^+ リンガー液に置換すると, 細胞体の Ratio [340 nm/380 nm] は3.3付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと, Ratio [340 nm/380 nm] は元のレベルへと回復した。GABA (100 μM) を正常リンガー液に添加し灌流したが, Ratio [340 nm/380 nm] に変化は観察されなかった。GABA 存在時に, 高 K^+ リンガー液を灌流しても, Ratio [340 nm/380 nm] の上昇は僅かであった(0.5から0.75へと上昇)。次に, 正常リンガー液に Picrotoxin (塩素イオンチャンネル阻害剤) (100 μM) を添加し灌流したが, Ratio [340 nm/380 nm] に変化は認められなかった。Picrotoxin 存在時に, 高 K^+ リンガー液を灌流すると, Ratio [340 nm/380 nm] は Picrotoxin 非存在時とほぼ同じレベルにまで上昇した(すなわち, Picrotoxin は細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響を与えない)。さらに, 正常リンガー液に Picrotoxin と GABA の両方を添加し, この条件下で高 K^+ リンガー液を灌流したが, GABA の存在にもかかわらず Ratio [340 nm/380 nm] は3.5付近まで上昇した。すなわち, Picrotoxin は GABA による抑制効果を阻害したことを示している。

以上は, 双極細胞の細胞体に塩素イオンチャンネルと連動した GABA 受容体 ($GABA_A$ あるいは $GABA_C$ 受容体) が発現し, この受容体の活性化により脱分極刺激に伴う細胞内 Ca^{2+}



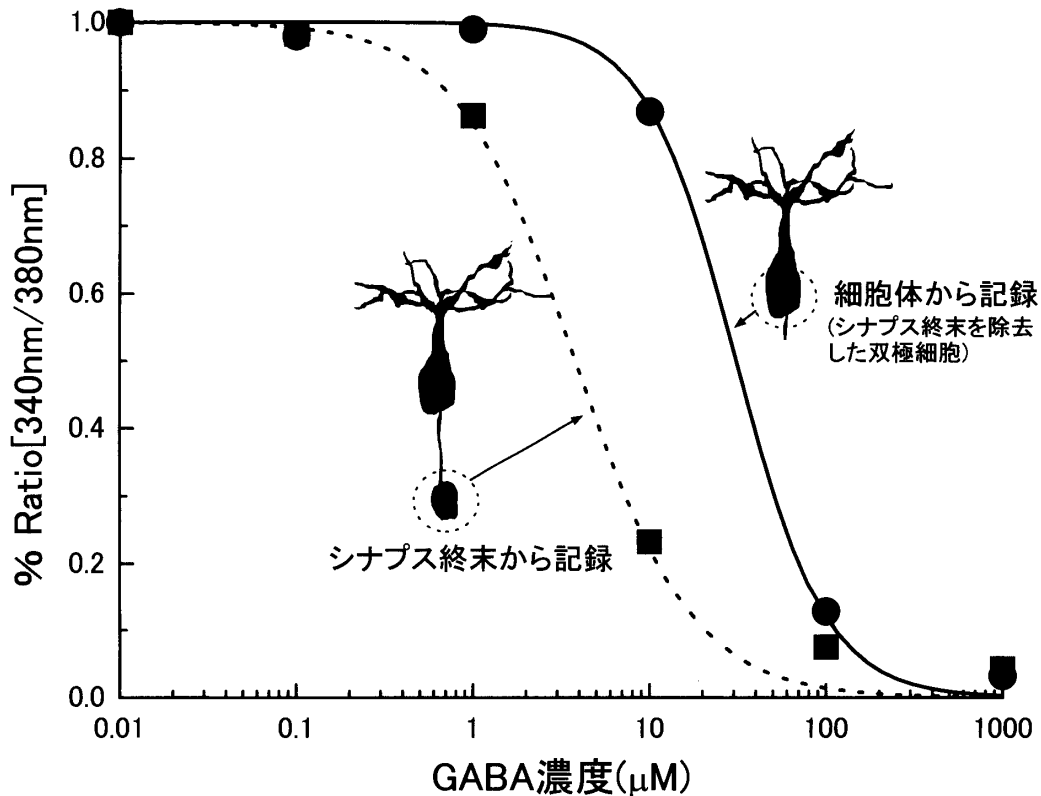
第6図 GABAによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制と Picrotoxin による抑制解除

シナプス終末を除去した双極細胞細胞体の細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ratio [340 nm/380 nm]) 変化を記録した。正常リンガー液灌流中, Ratio [340 nm/380 nm] は約0.5であった。正常リンガー液を高 K^{+} リンガー液に置換すると, Ratio [340 nm/380 nm] は3.5付近まで上昇した。正常リンガー液に戻すと, Ratio [340 nm/380 nm] は速やかに元のレベルへと回復した。次に, GABA (100 μM) を正常リンガー液に添加し灌流した。GABA 投与による Ratio [340 nm/380 nm] 変化は認められなかった。GABA 存在時に高 K^{+} リンガー液を灌流しても, Ratio [340 nm/380 nm] 上昇は殆ど起こらず, GABA 非存在時の10%程度に留まった。GABA の投与実験終了後, Picrotoxin (100 μM) を正常リンガー液に添加し灌流した。Picrotoxin 投与による Ratio [340 nm/380 nm] 変化は認められなかった。また, Picrotoxin は高 K^{+} リンガー液灌流による Ratio [340 nm/380 nm] 上昇にも影響しなかった。しかし, Picrotoxin 存在時に, GABA は高 K^{+} リンガー液灌流による Ratio [340 nm/380 nm] 上昇を抑えなかった。以上は, 双極細胞の細胞体に塩素イオンチャネルと連動した GABA 受容体 (GABA_A あるいは GABA_C 受容体) が発現し, この受容体の活性化により脱分極刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑えられたことを示唆している。

濃度上昇が抑えられたことを示唆している。

双極細胞の細胞体とシナプス終末に発現する GABA 受容体の相違

双極細胞の細胞体で観察された細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の GABA 抑制が GABA_A 受容体を介しているのかあるいは GABA_C 受容体を介しているのかを明らかにする目的で, 高 K^{+} リンガー液灌流に伴う Ratio [340 nm/380 nm] 上昇と GABA 濃度の関係を調べた (第7図)。シナプス終末を有する双極細胞のシナプス終末から Ratio [340 nm/380 nm] を導出



第 7 図 双極細胞の細胞体とシナプス終末での細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と GABA の関係

シナプス終末を有する双極細胞（シナプス終末で測定；■）とシナプス終末を除去した双極細胞（細胞体で測定；●）の細胞内 Ca^{2+} 濃度（Ratio [340 nm/380 nm]）変化を記録し、高 K^{+} リンガー液灌流により惹起される Ratio [340 nm/380 nm] 上昇が GABA によってどの程度抑えられるのかを調べた。グラフは、GABA 投与前と各種濃度の GABA 投与時に高 K^{+} リンガー液灌流により惹起された Ratio [340 nm/380 nm] の比をプロットした。シナプス終末での細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の GABA による減少は、 IC_{50} が $3.8 \mu\text{M}$ そして Hill 係数が 1.30、一方、細胞体では IC_{50} が $31.6 \mu\text{M}$ そして Hill 係数が 1.71 の Hill の式で近似できた。以上は、シナプス終末と細胞体とは異なる GABA 受容体が発現していることを示唆している。これまでの研究成果を考慮すると、シナプス終末には GABA_C 受容体が、細胞体或いは樹状突起樹には GABA_A 受容体が発現している可能性が高い。

し、GABA 非存在時に高 K^{+} リンガー液灌流により惹起される Ratio [340 nm/380 nm] 上昇と $0.01 \mu\text{M}$ から $1000 \mu\text{M}$ までの濃度の GABA 存在時に高 K^{+} リンガー液灌流により惹起される Ratio [340 nm/380 nm] 上昇の比を求め、プロットした。 $0.01 \mu\text{M}$ 及び $0.1 \mu\text{M}$ の GABA は、高 K^{+} リンガー液灌流による Ratio [340 nm/380 nm] 上昇に影響しなかった。これ以上の濃度では、GABA 濃度を上げるにつれて、Ratio [340 nm/380 nm] 上昇は濃度依存性に減少した。シナプス終末で得られた GABA 濃度と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係は、 n (Hill 係数) が 1.30 と IC_{50} が $3.8 \mu\text{M}$ を用いて、以下に示す Hill の式で近似することができた。

$$\frac{R}{R_0} = 1 - \frac{[I]^n}{[I] + IC_{50}^n}$$

R_0 : GABA 非存在時に高 K^+ リンガー液灌流（脱分極刺激）により惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値

R : 0.01, 0.1, 1, 10, 100 及び 1000 μM の GABA 存在時に高 K^+ リンガー液灌流（脱分極刺激）により惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値

I : GABA 濃度

IC_{50} : GABA 非存在時に高 K^+ リンガー液灌流（脱分極刺激）により惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のピーク値の半分応答を惹起するために必要な GABA 濃度

n : Hill 係数

次に、シナプス終末を除去した双極細胞の細胞体から Ratio [340 nm/380 nm] 変化を導出し、シナプス終末で実施したのと同じ実験を行った。高 K^+ リンガー液灌流により惹起される Ratio [340 nm/380 nm] 上昇を抑えるには、シナプス終末でよりも細胞体の方が高濃度の GABA を必要とした。細胞体で得られた GABA 濃度と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係は、 n (Hill 係数) が 1.71 と IC_{50} が 31.6 μM を用いて、Hill の式で近似することができた。シナプス終末と細胞体とで IC_{50} が約 8 倍異なるが、これは $GABA_A$ 受容体と $GABA_C$ 受容体の相違を反映している可能性がある。

以上並びに Picrotoxin の実験結果（第 6 図）から、細胞体には $GABA_A$ 受容体が発現し、この受容体の活性化による過分極が高 K^+ リンガー液灌流による脱分極を抑えたため高閾値型カルシウムチャネルが開口せず、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が見られなかったと考えられた。

考 察

双極細胞細胞体に発現するカルシウムチャネル

脊椎動物網膜内には受容野中心部の光照射に伴い脱分極する双極細胞（ON 中心型双極細胞）と過分極する双極細胞（OFF 中心型双極細胞）が存在し、それぞれは ON 経路と OFF 経路を形成している。何れのタイプの双極細胞も、光応答性や形態的特徴に基づき数種類に分類されている。本実験で用いた ON 中心型双極細胞はシナプス終末が他に比べ著しく大きく、区別が非常に容易であることから、多くの実験で用いられている（Mb1 と命名されている双極細胞）（Ishida *et al.*, 1980; Yazulla *et al.*, 1987）。この細胞は網膜内に存在するとき、赤錐体と桿体からシナプス入力を受け取っている ON 中心型（脱分極型）双極細胞である（Saito & Kujiraoka, 1982）。

視細胞から放出された L-グルタミン酸は双極細胞のグルタミン酸受容体に結合し、電位変化を惹起する。この応答は、双極細胞に発現する各種イオンチャネル（カルシウムチャネル、持続性外向き整流性カリウムチャネル、一過性外向き整流性カリウムチャネル [A チャネル]、カルシウムイオン依存性カリウムチャネル及び内向き整流性陽イオンチャネル [H チャネル]）により修飾されると考えられている（Kaneko & Tachibana, 1985; Lasater, 1988）。しかし、これらのイオンチャネルの生理機能に関する解析は、未だ充分行われていない。唯一、双極細胞シナプス終末の高閾値型カルシウムチャネルは伝達物質放出に必要な細胞内 Ca^{2+} を供給する経路として機能していることが明らかとなっている（Tachibana & Okada, 1991; Heidelberg & Matthews, 1992; Tachibana *et al.*, 1993）。

双極細胞細胞体に発現する GABA 受容体とカルシウムチャネル

キンギョ網膜から単離した双極細胞のシナプス終末には高閾値型カルシウムチャネルが発現し、これを通じて細胞内に流入する Ca^{2+} が伝達物質放出に必須であることが報告されている（Tachibana & Okada, 1991; Heidelberg & Matthews, 1992; Tachibana *et al.*, 1993）。これまでの研究から、シナプス終末には GABA_A 受容体、 GABA_B 受容体、 GABA_B 様受容体そして GABA_C 受容体が発現し、これらが双極細胞の膜電位変化を介してあるいはカルシウムチャネルの開閉調節に関わるセカンドメッセンジャー系を介してカルシウムチャネル活性を制御し、伝達物質放出量を調節していると考えられている（Maguire *et al.*, 1989; Heidelberger & Matthews, 1991; Matthews *et al.*, 1994; Vaquero & Villa, 1999）。

本研究により、双極細胞細胞体に発現する高閾値型カルシウムチャネル活性は GABA によって抑制されることが判明した。Picrotoxin 投与でこの抑制効果が消失することから、細胞体には代謝調節型 GABA 受容体（例えば、 GABA_B 受容体）ではなく、イオンチャネル直結型 GABA 受容体が発現していると考えられた。従来の多くの知見と IC_{50} の比較（第 7 図）から、本研究では双極細胞の細胞体には GABA_A 受容体が発現していると結論した。

おそらく、 GABA_A 受容体の活性化に伴い双極細胞は過分極し、高 K^+ リンガー液を灌流したときでさえ膜電位は高閾値型カルシウムチャネルを活性化するに足る電位まで脱分極しえず、このため細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が生じなかったと考えられる。GABA によるカルシウムチャネルの抑制に、細胞内セカンドメッセンジャー系が関与している可能性もあるので、今後パッチ電極法を用いて解析を進める必要がある。

双極細胞細胞体に発現する GABA 受容体の役割

ON 中心型双極細胞は、受容野中心部分を光照射すると脱分極し、受容野周辺部をドーナツ状に光照射すると過分極する。受容野中心部の脱分極応答は、視細胞と双極細胞のシナプ

ス結合により形成される。双極細胞同士はギャップ結合 (Kujiraoka & Saito, 1986; Saito & Kujiraoka, 1988) しているため、脱分極応答を示す受容野は双極細胞の樹状突起よりも僅かに広い。一方、受容野周辺部の過分極応答は、水平細胞から抑制性信号を受け取ることにより発生すると考えられている。実際、Toyoda & Tonosaki (1978) は、水平細胞への脱分極性の電流注入が双極細胞を過分極させることを観察し、双極細胞の周辺部応答形成に水平細胞から双極細胞への抑制性信号が重要であることを報告した。現在、水平細胞から双極細胞への抑制性信号は視細胞を介して伝達される説が有力であるが、これ以外に水平細胞の放出した GABA が双極細胞に直接作用する可能性も充分考えられる。

Takahashi *et al.* (1995b) の概算によると、暗時に約 $10 \mu\text{M}$ そして明時に約 $2 \mu\text{M}$ の GABA が水平細胞の周辺に残存する。この GABA は、水平細胞近隣の双極細胞の細胞体や樹状突起近くへと拡散する。もし双極細胞の細胞体や樹状突起が GABA 感受性を有すれば、双極細胞の膜電位は変化する筈である。しかし、本研究は、双極細胞細胞体に発現する GABA 受容体の感受性は比較的強く、水平細胞周辺に残存・拡散した GABA がこの受容体 (GABA_A 受容体) を活性化する可能性の低いことを示している。

謝 辞

平成12年3月末に広島修道大学をご退職された井上仙吉教授（化学の研究と教育）と中川和子教授（英語学の研究と教育）に深甚なる感謝の意を表したい。本研究は、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. and Lam, D. M. K. (1984), The release of γ -aminobutyric acid from horizontal cells of the goldfish (*Carassius auratus*) retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **355**: 191–214.
- 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., 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.
- 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.
- Cervetto, I. and McNichol, E. F. Jr. (1972), Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and

- aspartate, *Science*, **178**: 767–768.
- 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.
- Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of On and Off pathways to ganglion cells in carp retina, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Heidelberger, R. and Matthews, G. (1992), Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons, *J. Physiol. (Lond.)*, **447**: 235–256.
- Ishida, A. T., Stell, W. T. and Lightfoot, D. O. (1980), Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **191**: 315–335.
- 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. (1979), Physiology of the retina, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**: 169–191.
- Kaneko, A. (1983), Retinal bipolar cells: their function and morphology, *Trends Neurosci.*, **6**: 219–223.
- Kaneko, A. and Saito, T. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: II. Studies on responses evoked by transretinal current stimulation, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 603–612.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976), Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **40**: 537–546.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1985), A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*, *J. Physiol. (Lond.)*, **358**: 131–152.
- 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.
- 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. USA*, **75**: 6310–6313.
- Lasater, E. M. (1988), Membrane currents of retinal bipolar cells in culture, *J. Neurophysiol.*, **60**: 1460–1480.
- 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.
- 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 Svaetichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalm.*, **46**: 29–46.
- Maguire, G., Maple, B., Lukasiewicz, P. and Werblin, F. (1989), γ -aminobutyrate type B receptor modulation of L-type calcium channel current at bipolar cell terminals in the retina of the tiger salamander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 10144–10147.
- Malchow, R. P. and Ripps, H. (1990), Effects of γ -aminobutyric acid on skate retinal horizontal cells: Evidence for an electrogenic uptake mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 8945–8949.
- 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.
- Matthews, G., Ayoub, G. S. and Heidelberger, R. (1994), Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology, *J. Neurosci.*, **14**: 1079–1090.
- 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 Shimoda, Y. (1977), Identification of amacrine and ganglion cells in the carp retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **264**: 801–818.
- 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., 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., 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., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Progress in Retinal and Eye Research*, **14**: 197–221.
- 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 Otsuka, T. (1974), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. II. Morphological identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 72–91.
- 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.
- Otsuka, T. (1978), Combination of oil droplets with different types of photoreceptor in a freshwater turtle, *Geoclemys reevesii*, *Sensory Process*, **2**: 321–325.
- 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.
- 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.
- Saito, T. (1987), Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina, *Vision Res.*, **27**: 135–142.
- Saito, T. and Kaneko, A. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: I. Studies on responses evoked by light, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 589–601.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1982), Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **205**: 161–170.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1988), Characteristics of bipolar-bipolar coupling in the carp retina, *J. Gen. Physiol.*, **91**: 275–287.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1978), Rod and cone signals in the on-center bipolar cells: Their different ionic mechanisms, *Vision Res.*, **18**: 591–595.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979a), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: I. The responses to central illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 73–90.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979b), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: II. The responses to annular illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 569–589.
- Saito, T., Kujiraoka, T. and Toyoda, J. (1984), Electrical and morphological properties of Off-center bipolar

- cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 200–208.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- 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.
- 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.
- Sherry, D. M. and Yazzula, S. (1993), Goldfish bipolar cells and axon terminal patterns: a Golgi study, *J. Comp. Neurol.*, **329**: 188–200.
- Shimoda, Y., Hidaka, S., Maehara, M. Lu. Y. and Hashimoto, Y. (1992), Hyperpolarizing interplexiform cell of the dace retina identified physiologically and morphologically, *Vis. Neurosci.*, **8**: 193–199.
- 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., 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.
- Tachibana, M., and Okada, T., (1991), Release of endogeneous excitatory amino acid from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- Tachibana, M., Okada, T., Arimura, T., Kobayashi, K., and Piccolino, M. (1993), Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **13**: 2898–2909.
- 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 (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, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1995a), GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA_A receptor channels, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 437–456.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995b), Actions of nipecotic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from the catfish retina, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 457–473.
- Tauchi, M., Madigan, N. M. and Masland, R. H. (1990), Shapes and distributions of the catecholamine-accumulating neurons in the rabbit retina, *J. Comp Neurol.*, **293**: 178–189.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- 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.
- Vaquero, C. F. and Villa, P. (1999), Localization of the GABAC receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina, *Neurosci. Res.*, **35**: 1–7.
- Villa, P., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995), L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat, *J. Neurosci.*, **15**: 3571–3582.
- 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.
- 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., 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 retinæ, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphnbutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.
- Yazulla, S. (1986), GABAergic mechanisms in the retina, *Prog. Retinal Res.*, **5**: 1–52.
- Yazulla, S., Studholme, K. M. and Wu, J.-Y. (1987), GABAergic input to the synaptic terminals of Mb-1 bipolar cells in the goldfish retina, *Brain Res.*, **411**: 400–405.