

# トランプサンショウウオ網膜ミュラー細胞の アミノ酸電流の発生機序

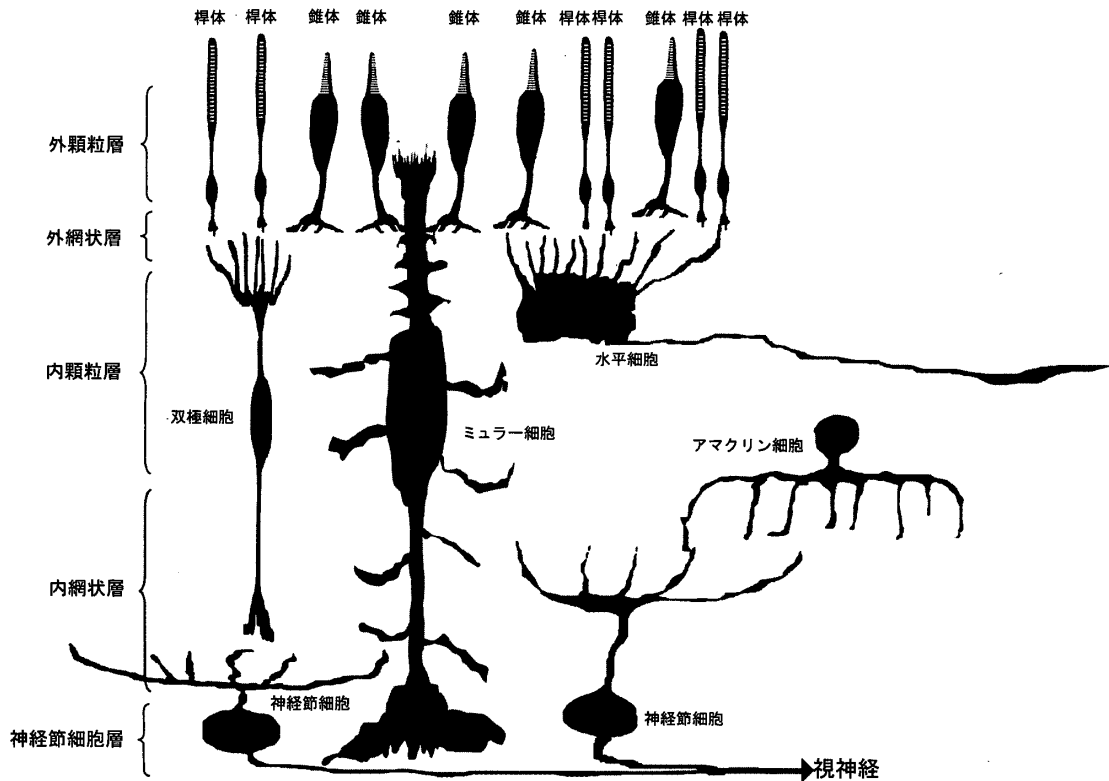
高橋 恭一

(受付 2001年10月5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、アマクリン細胞と神経節細胞）と1種類のグリア細胞（ミュラー細胞）からなる（第1図参照）。神経細胞は光受容と視覚情報処理（例えば、色覚、形態視や運動視などの基礎過程形成）に、またミュラー細胞は神経細胞の機能維持に必要な細胞外環境の整備及び神経細胞への栄養補給に当たる（例えば、Newman & Reichenbach, 1996）。

網膜内には、多種のイオン（ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩化物イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、水素イオンなど）、及び多種の化学物質（L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、 $\gamma$ -アミノ酪酸、アセチルコリン、セロトニン、ドーパミン、エンケファリン、コレシストキニン、サブスタンス P、ソマトスタチンなど）が存在している。これらの網膜内分布は、神経細胞やシナプスの活動により大きく変動する。例えば、外界の光環境変化（明暗変化、色調変化や物体移動など）は視細胞を始め多くの神経細胞を活性化し、シナプス間隙のL-グルタミン酸濃度や $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）濃度の上昇、及び細胞外のカリウムイオン（ $K^+$ ）濃度や水素イオン（ $H^+$ ）濃度の変化を惹起する（Newman, 1995）。しかし、これらの細胞外物質の増減が持続すれば、神経細胞の興奮性に影響し、時々刻々推移する光環境変化を正確に捉えることが不可能となる。このため、神経活動が終了すると、細胞外物質の増減はミュラー細胞によって直ちに除去される。つまり、ミュラー細胞は神経細胞やシナプスの機能を正常に維持するため、細胞外環境を整備する機能を有している。この整備には、ミュラー細胞の細胞膜に発現するナトリウムイオン（ $Na^+$ ）-重炭酸イオン（ $HCO_3^-$ ）共輸送体や $Na^+$ - $H^+$ 対向輸送体（細胞内外の水素イオン濃度調節）、グルタミン酸トランスポーターやGABAトランスポーター（細胞外に放出された神経伝達物質の除去）、各種電位依存性イオンチャネル（カルシウムチャネルやカリウムチャネルなど）やリガンド依存性レセプター（グルタミン酸レセプターやGABAレセプター）（ミュラー細胞の膜電位調整）、及びミュラー細胞の細胞内に存在する炭酸脱水素酵素、グルタミン合成酵素やcAMP系などが関与している（Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979;

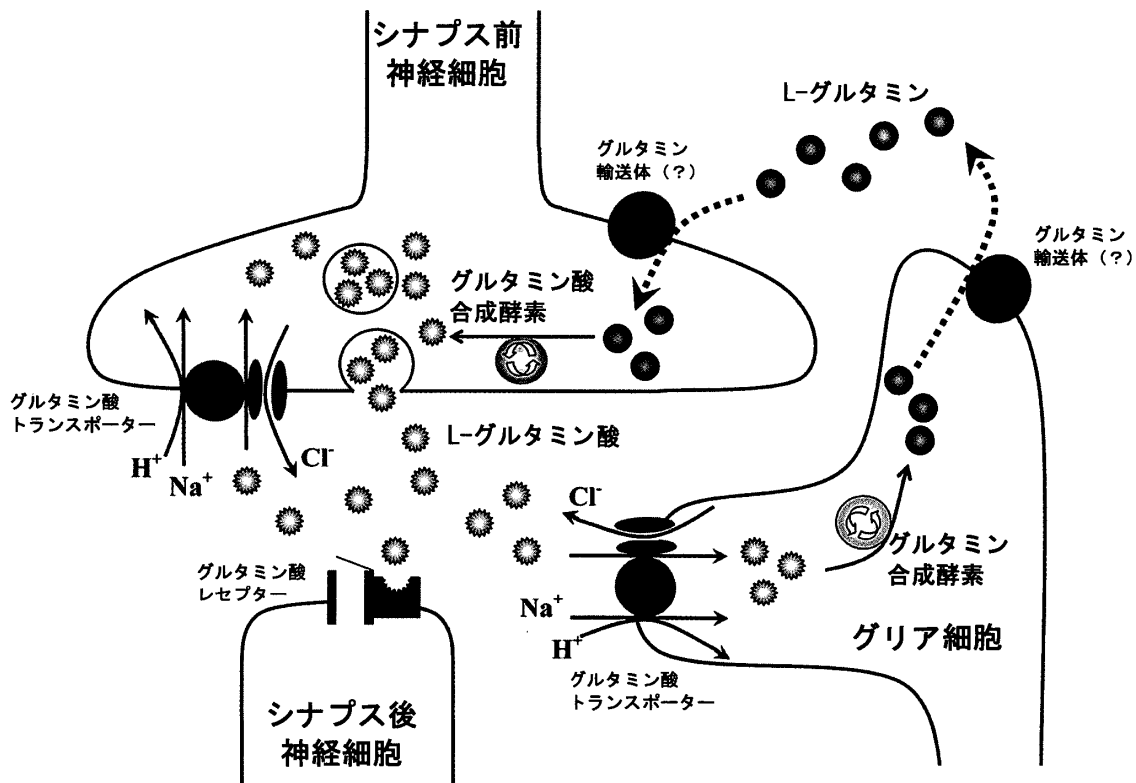


第1図 脊椎動物網膜の細胞構築とミュラー細胞の配置

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）と1種類のグリア細胞（ミュラー細胞）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。ミュラー細胞は、神経活動やシナプス活動（光受容や視覚情報処理）の維持と神経細胞への栄養補給に当たる。

Newman, 1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999; Schwartz, 1993; Brecha & Weigmann, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Bringmann *et al.*, 2000; Pannicke *et al.*, 2000).

哺乳動物の脳では、グリア細胞がL-グルタミン酸の再利用に重要な役割を演じている（グルタミン酸-グルタミンサイクル）（Hertz, 1979; Shank & Aprison, 1981）（第2図参照）。このサイクルでは、①神経終末から放出されたL-グルタミン酸がグルタミン酸トランスポーターを介してグリア細胞内に取り込まれ、②グルタミン合成酵素によってL-グルタミンに変換され細胞外に輸送される、③このL-グルタミンはシナプス前神経細胞内に取り込まれ、④グルタミン酸合成酵素によってL-グルタミン酸に変換され、⑤神経伝達物質として放出される。脊椎動物網膜においても、視細胞や双極細胞の一部がL-グルタミン酸を神経伝達物質



第2図 グルタミン酸-グルタミンサイクルの模式図

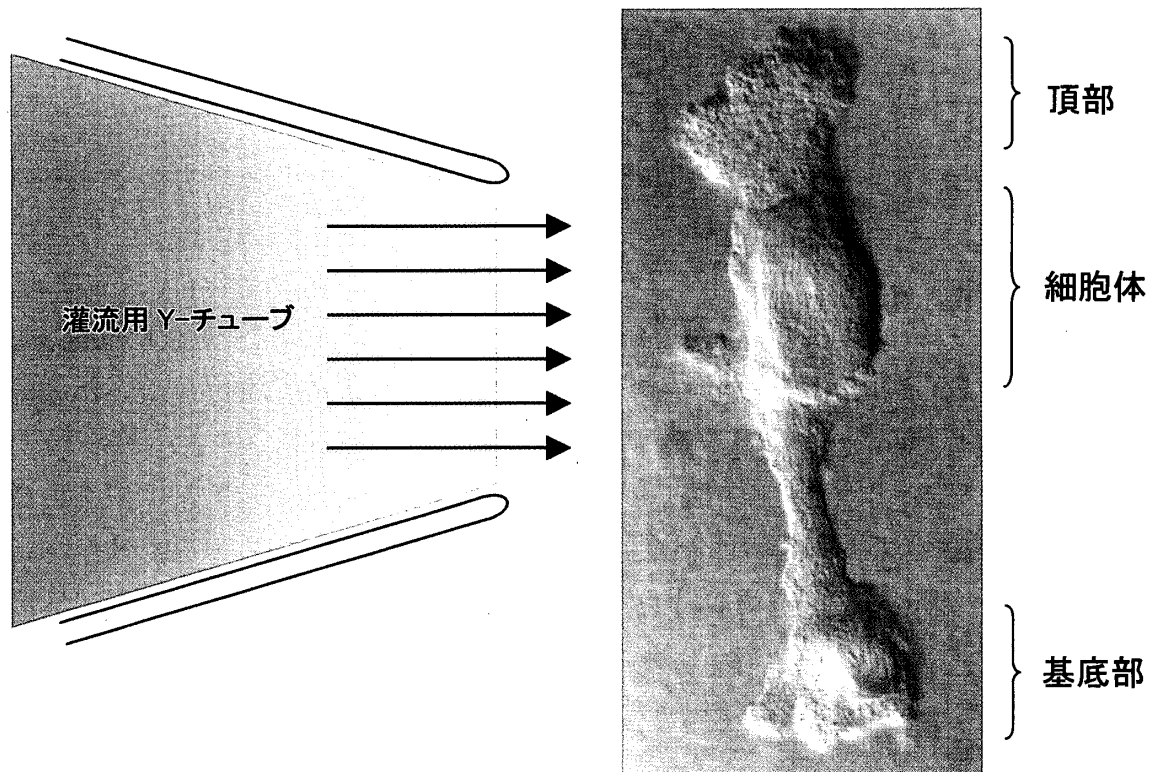
シナプス前神経細胞の終末から放出された L-グルタミン酸は、放出した細胞自身及び近隣のグリア細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターにより取り込まれシナプス間隙から除去される。グリア細胞に取り込まれた L-グルタミン酸は、グルタミン合成酵素により L-グルタミンに変換され細胞外に輸送される。この L-グルタミンはシナプス前神経細胞に取り込まれ、グルタミン酸合成酵素により L-グルタミン酸に変換されて神経伝達物質として再利用される。この経路を、グルタミン酸-グルタミンサイクルと呼ぶ。網膜でも、このサイクルが機能していることを示す断片的証拠はある。

として放出していること (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Takahashi & Murakami, 1991), 網膜内グリア細胞 (ミュラー細胞) にグルタミン酸トランスポーターが発現し L-グルタミン酸を取り込むこと (Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b), そしてミュラー細胞にグルタミン合成酵素が存在すること (Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979) が報告されており、グルタミン酸-グルタミンサイクルが機能している可能性は高い。しかし、グルタミン合成酵素により変換された L-グルタミンがどのようなメカニズムによってミュラー細胞内から細胞外に輸送されるのか、あるいはこの L-グルタミンがどのようなメカニズムによってシナプス前神経細胞 (視細胞や双極細胞) 内に取り込まれるのかなど、不明な点も多い。

本論文では、脊椎動物網膜においてグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能していることを証明する目的で、ミュラー細胞のL-グルタミンを含むアミノ酸輸送について検討したので、この結果を報告する。

### 実験材料と方法

実験には、体長約 25 cm~35 cm の幼生期のトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜からミュラー細胞を単離した。以下に単離法を概説する。低温麻酔したトラフサンショウウオを断頭し、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。前眼部、水晶体及び硝子体を除去した後、網膜を剥離した。剥離網膜を Papain 処理した後、剃刀を用いて約 2 mm 角の細片に切断した。この網膜細片を 100  $\mu$ l のピペットマンに装着したイエローチップ内を出し入れすることにより、単離細胞を得た。単離したミュラー細胞を含む懸濁液を Concanavalin A を塗布した円型 (直径 12mm) のカバーガラス上に置き、細胞がカバーガラスに付着したのを確認後、このカバーグ



第 3 図 トラフサンショウウオ網膜から単離したミュラー細胞へのアミノ酸投与法  
Papain 処理と機械的処理を併用して得られた単離ミュラー細胞に Whole-cell Voltage-clamp 法を適用し、膜電位固定下で電流応答を導出した。ミュラー細胞から 200  $\mu$ m~300  $\mu$ m の距離に置いた Y-tube (直径 150  $\mu$ m) を用いて各種アミノ酸を灌流投与し、電流変化を調べた。

ラスを倒立顕微鏡 (IM35, Carl Zeiss, Inc.) に装着した記録槽内に移動し、実験を開始した。細胞から 200  $\mu\text{m}$ ~300  $\mu\text{m}$  の距離に置いた Y-tube (直径 150  $\mu\text{m}$ ) を用いて、リンガー液を常時灌流した (第 3 図参照)。

トラフサンショウウオの正常リンガー液の組成は、98.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 5.0 mM 塩化カリウム (KCl), 2.0 mM 塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ), 2.0 mM 塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ), 15.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。多くの実験では、内向き整流性カリウムチャンネル活性を抑えるため、KCl の代わりに塩化セシウム (CsCl) を加えた (CsCl リンガー液)。CsCl リンガー液の組成は、98.0 mM NaCl, 10.0 mM CsCl, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。正常リンガー液は 1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて、また CsCl リンガー液は 1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH7.6 に調整し灌流した。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 (第 3 図参照)。

Whole-cell voltage-clamp 法を用い、ミユラー細胞の膜電流を記録した (Hamil *et al.*, 1981)。細胞体へのギガオームシール達成後、パッチ電極内圧を下げて電極内部の細胞膜を破碎し、膜電流を導出した。パッチ電極 (Borosilicate 性ガラス管, Garner Glass Co.) は、Brown-Fleming 型微小電極製作器 (P97, Sutter Instrument Co.) を用いて作製した。電極抵抗は 5 M $\Omega$ ~13 M $\Omega$  であった。ミユラー細胞の膜電流変化は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) を介してオシロスコープでモニターした。同時に、この電流変化を増幅器内蔵のフィルター (2 KHz ; 4 次ベッセルフィルター) と 12ビットの A/D コンバーター (Indec Systems) を経由しハードディスクに記録した。刺激波形の作成並びに電流変化の視覚化には、Pulse (Heka Elektronik) を用いた。オフラインでのデータ解析には、IgorPro Ver 4.03J (Wavemetrics Inc.) と Origin Ver6.1J (OriginLab Co.) を用いた。

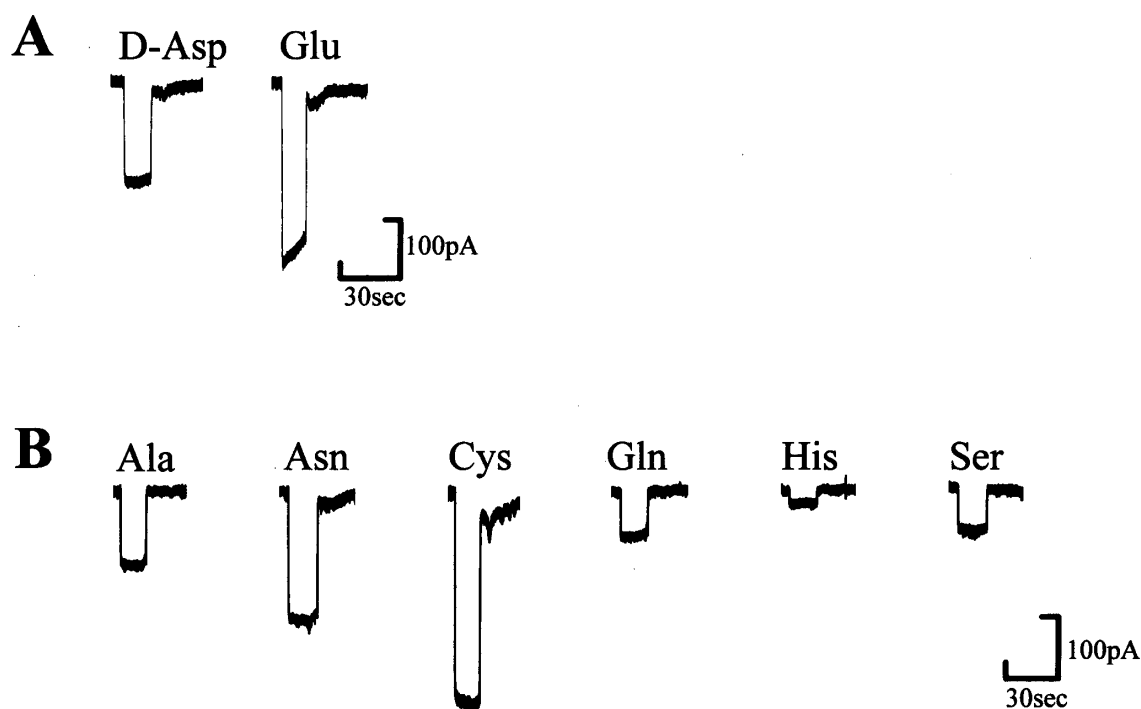
パッチ電極内液の組成は、80.0 mM CsCl, 20.0 mM NaCl, 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10.0 mM Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminomethyl ether) *N*, *N*, *N'*, *N'*-tetraacetic acid (EGTA), 10.0 mM HEPES であった。内向き整流性カリウムチャンネル活性を抑えるため、標準パッチ電極内液に CsCl を加えた。パッチ電極内液の pH は、1N-CsOH により pH7.2 に調整し用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co., DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) と L-Trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid は Tocris Cookson Ltd. から購入した。

## 実験結果

## ミューラー細胞のアミノ酸電流

ミューラー細胞の膜電位を $-80\text{mV}$ に保持し、電流変化を記録した。D-アスパラギン酸 (D-Asp;  $200\ \mu\text{M}$ ) あるいはL-グルタミン酸 (Glu;  $100\ \mu\text{M}$ ) を投与すると、立ち上がりの比較的緩やかな内向き電流が発生した (第4図A)。アミノ酸電流発生時、電流ノイズの増加は観察されなかった。また、長時間のアミノ酸投与にもかかわらず、電流応答の顕著な減少は認められなかった。本実験で得られたアミノ酸応答の特性並びにこれまでの研究報告を考え合わせると、D-アスパラギン酸電流及びL-グルタミン酸電流はグルタミン酸トランスポーターによるこれらアミノ酸の取り込みの結果発生したと考えられる (Brew & Attwell, 1987;



第4図 ミューラー細胞に惹起されるアミノ酸電流

トランプサンショウウオ網膜から単離したミューラー細胞の膜電位を $-80\ \text{mV}$ に保持し、電流変化を記録した。A: D-アスパラギン酸 (D-Asp;  $200\ \mu\text{M}$ ) とL-グルタミン酸 (Glu;  $100\ \mu\text{M}$ ) をCsClリンガー液に添加し投与した。何れのアミノ酸に対しても、内向き電流が発生した。B:  $10\ \text{mM}$ のL-アラニン (Ala), L-アスパラギン (Asn), L-システイン (Cys), L-グルタミン (Gln), L-ヒスチジン (His) とL-セリン (Ser) を, CsClリンガー液に添加し投与した。何れのアミノ酸に対しても、内向き電流が発生した。アミノ酸電流の立ち上がりが緩やかなこと、アミノ酸電流発生時にノイズ増加が認められないこと、そしてアミノ酸投与時に電流振幅の減少が見られないことを考慮すると、D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸投与によって発生した電流もグルタミン酸トランスポーターによるアミノ酸の取り込みを反映している可能性が高い。

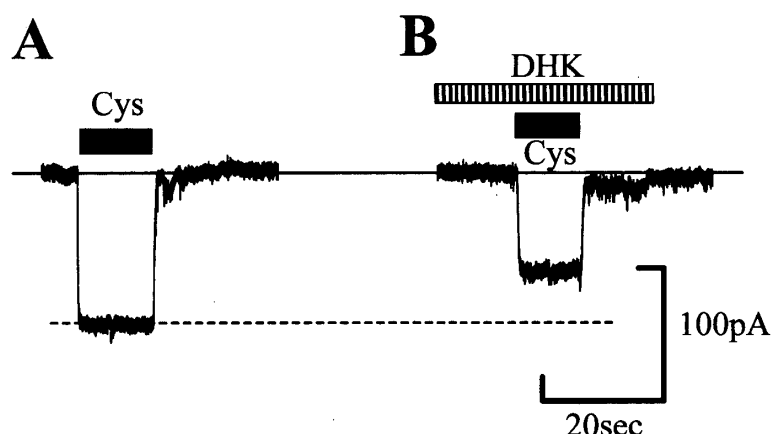
Sarantis *et al.*, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b)。次に、D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸の効果を調べた。10 mMに濃度固定したL-アラニン (Ala), L-アスパラギン (Asn), L-システイン (Cys), L-グルタミン (Gln), L-ヒスチジン (His), 及びL-セリン (Ser) を, ミュラー細胞に投与した。何れのアミノ酸も, 立ち上がりの緩やかな内向き電流を発生した (第4図B)。D-アスパラギン酸並びにL-グルタミン酸投与時に発生した電流と同じく, アミノ酸電流発生中のノイズ増加並びに長時間のアミノ酸投与に伴う電流減少は見られなかった。これらのアミノ酸以外に, L-アルギニン, L-アスパラギン酸, L-ロイシン, L-メチオニン, L-プロリン, 及びL-トレオニンを投与し, 同様の特性を有する内向き電流が発生することを確認した (図は省略)。10mMのアミノ酸投与により発生した電流応答の振幅を大きい順番から並べると, L-グルタミン酸 > L-システイン > L-アスパラギン酸 > L-アスパラギン > L-アラニン > L-グルタミン > L-トレオニン > L-セリン > L-ヒスチジン > L-プロリン > L-メチオニン > L-ロイシン > L-アルギニンであった。

アミノ酸電流の立ち上がりが緩徐なこと, アミノ酸電流発生時にノイズ増加が認められないこと, そしてアミノ酸投与時に電流応答の減少が見られないことを考慮すると, D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸電流も, グルタミン酸トランスポーターの活性化による可能性が高い。

#### ミュラー細胞のアミノ酸電流の発生機序

D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸投与により発生した電流がグルタミン酸トランスポーターの活性化によることを証明するため, アミノ酸電流に対するグルタミン酸トランスポーター阻害剤の効果を調べた (第5図)。ミュラー細胞の膜電位を  $-80$  mV に保持し, 電流変化を記録した。CsCl リンガー液にL-システイン (1 mM) を添加し投与すると, 内向き電流 (116 pA) が発生した (第5図A)。Dihydrokainic acid (1 mM; DHK) (グルタミン酸トランスポーター阻害剤) 存在時に, L-システイン (1 mM) を投与すると電流振幅 (75 pA) は減少した (第5図B)。Dihydrokainic acid の代わりに L-Trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (1 mM) (グルタミン酸トランスポーター阻害剤) を用いた場合にも, システイン電流は顕著に減少した (図は省略)。DHK の効果を6細胞で調べた結果, 何れの細胞でもシステイン電流に減少が見られ, 減少の平均は  $44.6 \pm 8.43\%$  (平均  $\pm$  標準誤差) であった。L-システイン以外に, L-グルタミン, L-トレオニン, L-アスパラギンでも同様の結果を得た。

以上は, 本実験で検討したアミノ酸に対する電流変化がグルタミン酸トランスポーターを介するアミノ酸の取り込みを反映していることを強く示唆している。



第5図 システイン電流に対するグルタミン酸トランスポーター阻害剤の効果  
 トラフサンショウウオ網膜から単離したミュラー細胞の膜電位を $-80\text{ mV}$ に保持し、電流変化を記録した。L-システイン (Cys;  $1\text{ mM}$ ) をCsClリンガー液に添加し投与すると、ミュラー細胞には内向き電流が発生した。この電流変化は、Dihydrokainic acid (DHK;  $1\text{ mM}$ ) により約35%減少した。以上は、システイン電流がグルタミン酸トランスポーターによるL-システインの取り込みを反映していることを強く示唆している。

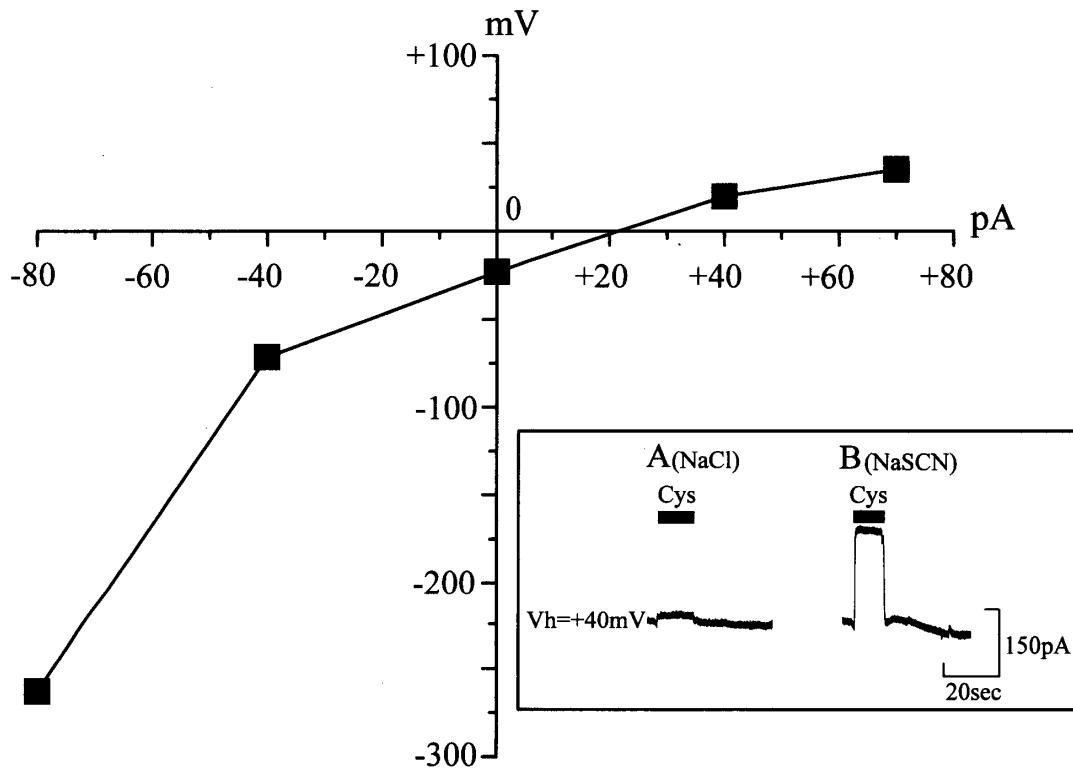
#### グルタミン酸トランスポーターによるアミノ酸の取り込み

グルタミン酸トランスポーターは、塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) チャンネルとカップルしていることが知られている (Billups *et al.*, 1996; Eliasof & Jahr, 1996; Arriza *et al.*, 1997)。D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸電流がグルタミン酸トランスポーターの活性化を介して発生しているのであれば、この電流変化に  $\text{Cl}^-$  チャンネル由来の電流成分が含まれる筈である。まず、アミノ酸電流の膜電位への依存性を調べた。膜電位を $-80\text{ mV}$ 、 $-40\text{ mV}$ 、 $0\text{ mV}$ 、 $+40\text{ mV}$  及び  $+70\text{ mV}$  に保持し、L-システイン ( $1\text{ mM}$ ) 投与に伴う電流変化を記録し、その振幅をグラフ化した (第6図)。 $+20\text{ mV}$  付近でシステイン電流は、内向きから外向きへと転じた。CsClリンガー液とパッチ電極内液のナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) 濃度を変化させると、逆転電位の移動が観察された。しかし、これらの移動はネルンストの式から予想されるほど大きくなかった (図は省略)。この結果は、電流発生に  $\text{Na}^+$  以外のイオンが関与していることを示唆している。

アミノ酸電流発生に  $\text{Cl}^-$  が関与していることを確かめるため、リンガー液の  $\text{Cl}^-$  をチオシアン酸イオン ( $\text{SCN}^-$ ) に置換し、アミノ酸電流を比較した。 $+40\text{ mV}$  に膜電位を保持したミュラー細胞のシステイン電流は、 $\text{Cl}^-$  を  $\text{SCN}^-$  に置換すると約20倍に増加した (第6図四角内)。同じ実験を4細胞で実施し、14倍から25倍の増加が見られた。この結果は、システイン電流に  $\text{Cl}^-$  チャンネル電流が含まれていることを示している。L-システイン以外に、L-グルタミン、L-トレオニン、そしてL-アスパラギンでも同様の結果を得た。

以上は、D-アスパラギン酸とL-グルタミン酸以外のアミノ酸投与により発生する電流もグ





第 6 図 システイン電流の膜電位依存性と塩化物イオンの関与

トラフサンショウウオ網膜から単離したミユラー細胞の膜電位を  $-80$  mV,  $-40$  mV,  $0$  mV,  $+40$  mV 及び  $+70$  mV の膜電位に保持し, L-システイン (Cys;  $1$  mM) に対する電流応答を記録した。それぞれの膜電位で発生したシステイン電流の振幅を測定し, グラフ化した。この電位は,  $+20$  mV 付近で逆転した。CsCl リンガー液の塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) をチオシアン酸イオン ( $\text{SCN}^-$ ) に置換すると,  $+40$  mV で発生した外向き電流は著しく増大した (四角内)。以上は, システイン電流に  $\text{Cl}^-$  チャネル由来の電流成分が含まれていることを示している。従って, システイン電流はグルタミン酸トランスポーターによる L-システインの取り込みを反映している。

ルタミン酸トランスポーターによるこれらアミノ酸の取り込みを反映していることを示している。

## 考 察

### 脊椎動物網膜のグルタミン酸トランスポーター

cDNA クローニングとそれに続く機能解析により, 哺乳動物のグルタミン酸トランスポーターは 5 種のサブタイプに分類され, EAAT1 (Excitatory Amino acid Transporter 1 の略), EAAT2, EAAT3, EAAT4 そして EAAT5 と命名された (Kanai & Hediger, 1992; Arriza *et al.*, 1993, 1994; Fairman *et al.*, 1995)。最近では, これらの解析に免疫組織学的手法や遺伝子発現法が導入され, 神経組織に発現するサブタイプの種類やサブタイプの生理特性が詳細に調べられている (Rauen & Kanner, 1994; Rothstein *et al.*, 1994; Lehre *et al.*, 1995, 1997;

Schults & Stell, 1996)。脊椎動物網膜でも同様の研究法が適用され、成果を挙げている。特に、トラフサンショウウオ網膜において体系的な研究が実施され、グルタミン酸トランスポーターサブタイプの種類と発現部位 (EAAT1 は主にミュラー細胞に発現, EAAT2 はミュラー細胞, 視細胞, 双極細胞とアマクリン細胞に発現, そしてEAAT5 はミュラー細胞, 視細胞, 双極細胞, アマクリン細胞と神経節細胞に発現), 及び生理学的性質 (アミノ酸電流の電位依存性, 阻害剤の効果や  $\text{Cl}^-$  チャネルとのカップリングなど) が解明された (Eliasof *et al.*, 1998a, b)。

本実験において, 著者はトラフサンショウウオ網膜のミュラー細胞が D-アスパラギン酸と L-グルタミン酸以外に L-システインを積極的に取り込むことを見出した。これまでの研究から, L-システインを効率よく取り込むサブタイプは EAAT3 であることが判明している (Arriza *et al.*, 1993, 1994; Rothstein *et al.*, 1994; Zerangue & Kavanaugh, 1996)。従って, 本実験結果は, Eliasof *et al.* (1998a, b) によりトラフサンショウウオ網膜ミュラー細胞に発現していることが既に報告されている EAAT1 に加え, さらに EAAT3 も発現していることを示唆している。

L-グルタミン酸と同様に, L-システインは興奮毒性を示すことが知られている (Olney & Ho, 1970; Olney *et al.*, 1972, 1990; Lehmann *et al.*, 1993)。従って, ミュラー細胞のグルタミン酸トランスポーターによる L-システインの取り込みは, 網膜内の神経細胞の細胞死を防ぐために有効である。

#### グルタミン酸トランスポーターと L-グルタミン輸送

L-グルタミン酸は, 脊椎動物網膜の代表的な興奮性神経伝達物質である。視細胞と一部の双極細胞は, この L-グルタミン酸を伝達物質として放出している (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Takahashi & Murakami, 1991)。作用を終えた L-グルタミン酸は, 主にミュラー細胞によって取り込まれシナプス間隙から除去される (Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Grant & Dowling, 1995, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b)。ミュラー細胞に取り込まれた L-グルタミン酸は, 細胞内に存在するグルタミン合成酵素により L-グルタミンに変換される (Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979)。この L-グルタミンがその後どのように処理されるのかについては明らかになっていないが, これまでに得られた断片的な知見を繋ぎ合わせると, 網膜でもグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能している可能性が高い。今後, グルタミン酸-グルタミンサイクルを証明するため, ミュラー細胞からの L-グルタミ

ン放出のメカニズムやシナプス前神経細胞内への L-グルタミン取り込みのメカニズムについて集中的に解析する必要がある。

本実験において、著者はミユラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターが D-アスパラギン酸と L-グルタミン酸以外にも多くのアミノ酸を輸送することを見出した。このアミノ酸の中に、L-グルタミンも含まれている。これまでの研究から、グルタミン酸トランスポーターは特殊な条件（例えば、虚血により細胞外の  $K^+$  濃度が顕著に増加したとき）下で輸送を逆転し、L-グルタミン酸を細胞外輸送（放出）することが報告されている（Szatkowski *et al.*, 1990）。生理的条件下でミユラー細胞のグルタミン酸トランスポーターに輸送逆転が起これば、細胞内で合成された L-グルタミンがグルタミン酸トランスポーターを介して細胞外に輸送されることになる（第 2 図参照）。

#### 引用文献

- 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.
- Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y.-N., Murdoch, G. H., North, R. A. and Amara, S. G. (1993), Cloning and expression of a human neural amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family, *J. Biol. Chem.*, **268**: 15329-15332.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1994), Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex, *J. Neurosci.*, **14**: 5559-5569.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1997), EAAT5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 4155-4160.
- Billups, B., Rossi, D. and Attwell, D. (1996), Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells, *J. Neurosci.*, **16**: 6722-6731.
- Brecha, N. C. and Weigmann, C. (1996), Expression of GAT-1, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **345**: 602-611.
- Brew, H. and Attwell, D. (1987), Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells, *Nature*, **327**: 6722-6731.
- Bringmann, A., Schopf, S. and Reichenbach, A. (2000), Developmental regulation of calcium channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurophysiol.*, **84**: 2975-2983.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536-539.
- Eliasof, S. & Jahr, C. E. (1996), Retinal glial cell glutamate transporter is coupled to an anionic conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 4153-4158.
- Eliasof, S. & Werblin, F. (1993), Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander, *J. Neurosci.*, **113**: 402-411.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1998a), Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: Identification, localization, and function, *J. Neurosci.*, **18**: 698-712.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1998b), Localization and function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443-1454.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1995), An excitatory amino acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel, *Nature*, **75**: 599-603.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-

- resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1995), A glutamate-activated chloride current in cone-driven ON bipolar cells of the white perch retina, *J. Neurosci.*, **15**: 3852–3862.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1996), ON bipolar cell responses in the teleost retina are generated by two distinct mechanisms, *J. Neurophysiol.*, **76**: 3842–3849.
- Hertz, L. (1979), Functional interactions between neurons and astrocytes, I. Turnover and metabolism of putative amino acid transporters, *Prog. Neurobiol.*, **33**: 277–323.
- Johnson, J., Chen, T. K., Rickman, D. W., Evans, C. and Brecha, N. C. (1996), Multiple gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **375**: 212–224.
- Kanai, Y. and Hediger, M. A. (1992), Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter, *Nature*, **360**: 467–471.
- Lehmann, A., Hagberg, H., Orwar, O. and Sandberg, M. (1993), Cysteine sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain?, *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 1398–1412.
- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Danbolt, N. C. (1995), Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations, *J. Neurosci.*, **15**: 1835–1853.
- Linsler, P. and Moscona, A. A. (1979), Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Müller fibers and dependence on cell interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 6476–6480.
- 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 retinæ by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol. (Lond.)*, **419**: 213–224.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **227**: 899–913.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1987), Calcium action potential and its use for measurement of reversal potentials of horizontal cell responses in carp retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **386**: 165–180.
- Newman, E. (1987), Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study, *J. Neurosci.*, **7**: 2423–2432.
- Newman, E. (1991), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander, *J. Neurosci.*, **11**: 3972–3983.
- Newman, E. (1994), A physiological measure of carbonic anhydrase in muller cells, *Glia*, **11**: 291–299.
- Newman, E. (1995), Glial cell regulation and Extracellular potassium, In *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. and Ransom, B. R.), pp717–731, Oxford Press.
- Newman, E. (1996), Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium-bicarbonate cotransport, *J. Neurosci.*, **16**: 159–168.
- Newman, E. (1999), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat, *Glia*, **26**: 302–308.
- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996), The Müller cell: a functional element of the retina, *TINS*, **19**: 307–312.
- Olney, J. W. and Ho, O. L. (1970), Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate, or cysteine, *Nature*, **227**: 609–611.
- Olney, J. W., Ho, O. L., Rhee, V. and Schainker, B. (1972), Cysteine-induced brain damage in infant and fetal rodents, *Brain Res.*, **45**: 309–313.
- Olney, J. W., Zorumski, C., Price, M. T. and Labruyere, J. (1990), L-Cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin, *Science*, **248**: 596–599.
- Pannicke, T., Faude, F., Reichenbach, A. and Reichelt, W. (2000), A function of delayed rectifier potassium channels in glial cells: maintenance of an auxiliary membrane potential under pathological conditions, *Brain Res.*, **862**: 187–193.
- Reipe, R. E. and Norenberg, M. D. (1977), Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina,

- Nature, **268**: 654–655.
- Reipe, R. E. and Norenberg, M. D. (1978), Glutamine synthetase in the developing rat retina: An immunohistochemical study, *Expt. Eye Res.*, **27**: 435–444.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R. W. (1994), Localization of neuronal and glial glutamate transporters, *Neuron*, **13**: 713–725.
- 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. (1993), L-Glutamate conditionally modulates the  $K^+$  current of Müller glial cells, *Neuron*, **10**: 1141–1149.
- 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.
- Shank, R. P. and Aprison, M. H. (1981), Present status and significance of the glutamine cycle in neural tissues, *Life Sci.*, **28**: 837–842.
- Szatkowski, M., Barbour, B. and Attwell, D. (1990), Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake, *Nature*, **348**: 443–446.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. (1988), L-Glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process that may contribute to the interaction between photoreceptors *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5315–5319.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 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.
- Zerangue, N. and Kavanaugh, M. P. (1996), Interaction of L-Cysteine with a human excitatory amino acid transporter, *J. Physiol. (Lond.)*, **493**: 419–423.