

アメリカナマズ網膜水平細胞のヘミギャップ結合 チャン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——

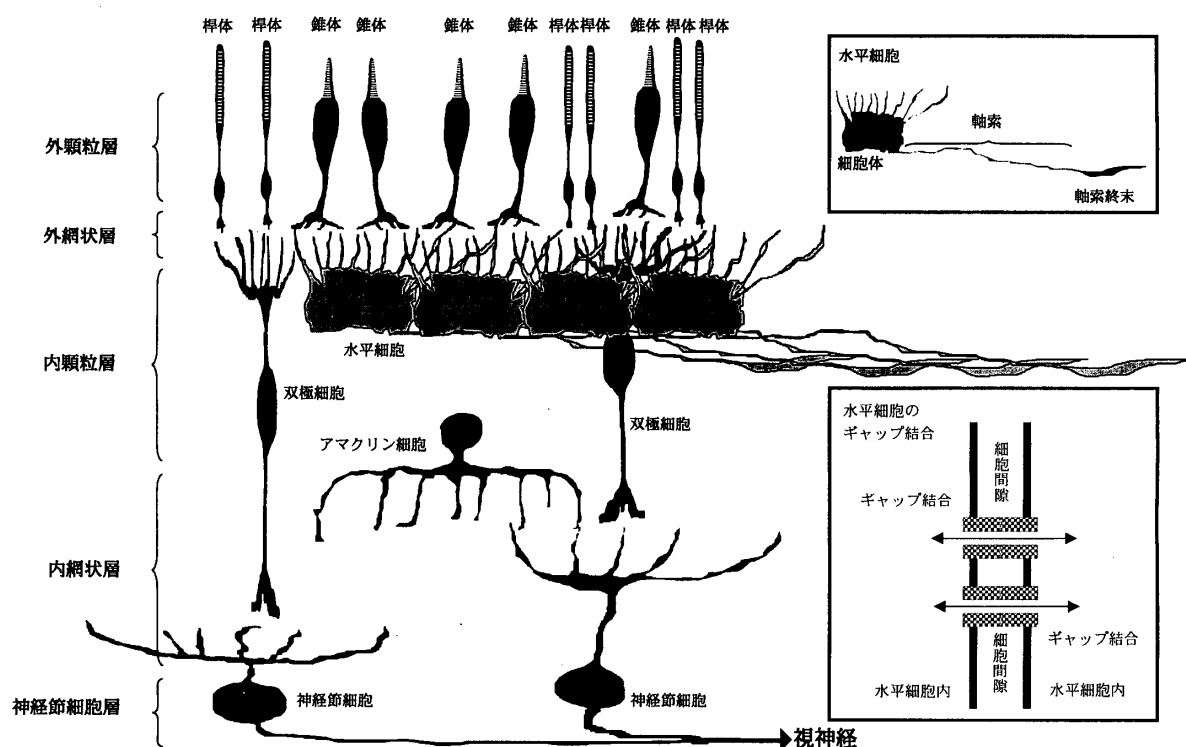
高 橋 恭 一

(受付 1998 年 10 月 26 日)

序 論

脊椎動物網膜には、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）が存在する（第1図）。この中で、視細胞のみが光感受性を有する。外界の光環境の極端な変化（太陽光下と月光下とでは、光強度に1億倍以上の差がある）に対処するため、視細胞は昼間の視覚を担当する錐体（光感受性の低い視細胞）と夜間の視覚を担当する桿体（光感受性の高い視細胞）に分化した。それぞれの視細胞で受容された明暗情報（外界の光強度変化）は電位変化に変換され、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にシナプス伝達される。双極細胞は受容野中心部と周辺部とで光応答極性が反転する同心円型中心—周辺拮抗的受容野を有し、これは形態視におけるコントラスト強調の初期過程であると考えられている。また、水平細胞では三原色過程から反対色過程への変換が生じ、これは色覚の初期過程であると考えられている。これらの細胞の出力は、アマクリン細胞や神経節細胞にシナプス伝達されるが、この過程でさらに高度な情報処理（例えば、運動視の初期過程形成）が行われる。

双極細胞の受容野中心部応答は視細胞からのシナプス入力（Ishida *et al.*, 1980）により、また周辺部応答は水平細胞（第1図の挿入図上）からのシナプス入力（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978）により形成されることが考えられている。水平細胞同士は電気シナプス（ギャップ結合）を介して結合（Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Witkovsky *et al.*, 1983; Kouyama & Watanabe, 1986; Baldrige *et al.*, 1987; Vaney, 1993）（第1図の挿入図下）し、機能的合胞体を形成しているため、受容野は水平細胞の樹状突起の広がりよりも広く、この受容野は双極細胞の周辺受容野と良く一致している。実際、Toyoda & Tonosaki（1978）は、水平細胞への電流注入が双極細胞に逆極性の膜電位変化を惹起することから、双極細胞の受容野周辺部応答が水平細胞の出力により形成されることを証明した。しかし、受容野周辺部応答形成が、水平細胞から双極細胞への直接的なシナプス入力による



第1図 下等脊椎動物網膜の神経構築

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、神経節細胞）からなる。網膜内では視細胞のみが光感受性を有し、残りの神経細胞は視覚情報処理（例えば、色覚、形態視や運動視の形成）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。それぞれの視細胞で受容された光は電位応答に変換され、情報伝達の最短経路を構成する細胞群（視細胞→双極細胞→神経節細胞）とこの最短経路を横に連絡する細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）を経て、脳（視覚中枢）に伝達される。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。挿入図上：水平細胞の形態。水平細胞は細胞体、軸索および軸索終末からなる。これら何れの部位にも電気シナプス結合（ギャップ結合）が観察された（Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Witkovsky *et al.*, 1983; Kouyama & Watanabe, 1986; Baldrige *et al.*, 1987; Vaney, 1993）。挿入図下：水平細胞間に存在するギャップ結合。ギャップ結合部では、相対する水平細胞膜のそれぞれに埋め込まれた Connexon（膜貫通タンパク質）がお互い連結し、無機イオンや分子量 1 KD 以下の物質の輸送通路を形成している。Connexon は 6 つのサブユニットタンパク質である Connexin により構成されている。水平細胞を網膜から単離すると、ギャップ結合は分断され、ヘミギャップ結合として細胞膜に存在する。

のか、あるいは水平細胞から視細胞への負のフィードバックシナプスを介する間接的なシナプス入力によるのかは、未だ明らかになっていない。

水平細胞のギャップ結合強度は、Interplexiform 細胞が放出する Dopamine により調節されている（Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1978; Teranishi *et al.*, 1983, 1984; Dowling, 1986; Mangel & Dowling, 1987）。Interplexiform 細胞からの Dopamine 放出量は明暗条件に依存して増減するため、水平細胞のギャップ結合強度もこの影響を受ける（例え

ば, Rogawski, 1987; Kolbinger *et al.*, 1990; Kohler *et al.*, 1990; Umino *et al.*, 1991)。このため, 双極細胞の周辺受容野のサイズは, 明暗条件の相違によりダイナミックに変化する (Shigematsu & Yamada, 1988; Balgrige & Ball, 1991; Umino *et al.*, 1991; Kurtz-Isler *et al.*, 1992)。Dopamine が水平細胞の Dopamine D1 受容体に結合すると, 細胞内の Adenylyl cyclase が活性化し, cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) を産生する。この cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化し, ギャップ結合チャンネルをリン酸化する。この結果, ギャップ結合は閉じる。最近では, Dopamine D1 受容体→cAMP→cAMP 依存性プロテインキナーゼを介する系 (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989) 以外に, 細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}), 水素イオン (H^+), 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, Protein kinase C (PKC) などもギャップ結合の調節因子として働いていることが報告されている (Miyachi & Murakami, 1989, 1991; Miyachi *et al.*, 1990, 1991, 1994; Laufer *et al.*, 1989; Lasater, 1987)。ギャップ結合を解析するには 2 細胞から電位応答 (あるいは電流応答) を同時に導出することが必須となるが, これは技術的に極めて難しく, 調節因子の作用機序およびその生理機能の詳細については依然不明な点が多い。

水平細胞を網膜から単離すると, ギャップ結合は分断され, それぞれの水平細胞膜にヘミギャップ結合として存在する。最近, DeVries & Schwartz (1992), Malchow *et al.* (1993, 1994) と Dixon *et al.* (1996) は, このヘミギャップ結合チャンネルが細胞外 Ca^{2+} の除去あるいは細胞外へのキニンかあるいはキニジンの添加により活性化することを報告した。ヘミギャップ結合チャンネル電流の導出は比較的容易であるため, ギャップ結合の開閉ならびにその調節機構の解析に威力を発揮すると考えられる。

今回, アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞のヘミギャップ結合チャンネル電流を導出し, この電流に対する水素イオン (H^+) の影響, 特に細胞外 H^+ の影響を調べた。

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 2 時間以上暗順応させた後, 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。剥離網膜を 2 mm 幅に切断し, Papain 処理して単離水平細胞を用意した (Tachibana, 1981)。単離水平細胞は, 円形 (直径 12 mm) のカバーガラス上で培養した。培養には, 魚類用に調整した L-15 (14°C) 培養液を用いた。2 日以上培養した水平細胞を実験に用いた。アメリカナマズ網膜には, 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。両者は大きさと

形態が異なっており、顕微鏡下で容易に区別できた。また、培養すると、桿体水平細胞は死滅し、錐体水平細胞のみが生き残った。従って、実験には錐体水平細胞の細胞体を用いた。水平細胞の生存するカバーガラスを倒立顕微鏡 (model IM-35, Carl Zeiss, Inc.) に装着した記録槽内に置き、リンガー液を細胞から $200\ \mu\text{m}$ ~ $400\ \mu\text{m}$ の距離に置いた Y-tube (直径 $150\ \mu\text{m}$) により灌流した。

アメリカナマズの正常リンガー液の組成は、 $125.0\ \text{mM}$ 塩化ナトリウム (NaCl), $2.6\ \text{mM}$ 塩化カリウム (KCl), $5.0\ \text{mM}$ 塩化カルシウム (CaCl_2), $1.0\ \text{mM}$ 塩化マグネシウム (MgCl_2), $15.0\ \text{mM}$ ブドウ糖 (Glucose), $10.0\ \text{mM}$ *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。ヘミギャップ結合チャン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、 $100.0\ \text{mM}$ NaCl, $5.0\ \text{mM}$ KCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $15.0\ \text{mM}$ 塩化セシウム (CsCl), $15.0\ \text{mM}$ Tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), $20.0\ \text{mM}$ Glucose, $10.0\ \text{mM}$ HEPES であった。電位依存性カリウムチャン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。細胞外 (リンガー液) pH (水素イオン濃度) を変える実験では、リンガー液の pH に応じて、pH 緩衝剤を変えた。7.0 以下の pH では Piperazine-N, *N'*-bis-2-ethanesulfonic acid (PIPES) を、7.0 から 8.0 の pH では HEPES を、8.0 以上では Tris-hydroxymethyl-aminomethane (TRIZMA) を用い、1N-塩酸 (HCl) あるいは 1N-水酸化ナトリウム (NaOH) によりリンガー液の pH を調整し灌流した。また、細胞内 pH を変化させるため、アンモニウム無 Ca^{2+} リンガー液を用いた。アンモニウム無 Ca^{2+} リンガー液の組成は $80.0\ \text{mM}$ NaCl, $20.0\ \text{mM}$ 塩化アンモニウム (NH_4Cl), $5.0\ \text{mM}$ KCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $15.0\ \text{mM}$ CsCl, $15.0\ \text{mM}$ TEA-Cl, $20.0\ \text{mM}$ Glucose, $10.0\ \text{mM}$ HEPES であった。何れのリンガー液も、1N-NaOH を用いて pH7.8 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 ($1\ \text{mM}$) を添加したリンガー液に Dopamine を加え用いた。

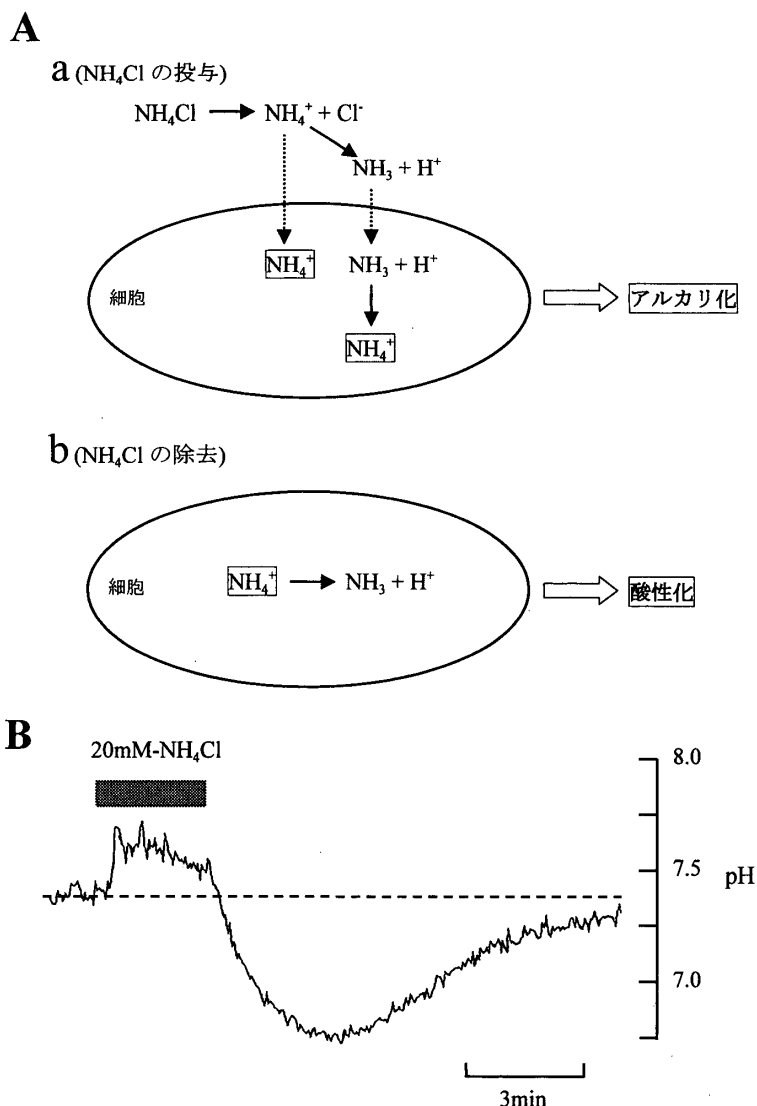
標準パッチ電極内液の組成は $115.0\ \text{mM}$ グルコン酸カリウム (K-gluconate), $15.0\ \text{mM}$ CsCl, $15.0\ \text{mM}$ TEA-Cl, $2.0\ \text{mM}$ MgCl_2 , $1.0\ \text{mM}$ Ethylene glycol-bis (β -aminomethyl ether) N, N, *N'*, *N'*-tetraacetic acid (EGTA), $1.0\ \text{mM}$ Adenosine 5'-triphosphate (ATP), $1.0\ \text{mM}$ Guanosine 5'-triphosphate (GTP), $10\ \text{mM}$ HEPES であった。電位依存性カリウムチャン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。アンモニウムリンガー液を灌流する実験では、パッチ電極内液から HEPES (pH 緩衝剤) を除去した (このとき、K-gluconate を $120.0\ \text{mM}$ にした) (アンモニウムパッチ電極内液)。アンモニウムパッチ電極内液の pH は不安定であるため、実験直前に 1N-水酸化カリウム (KOH) を用いて 7.4 に調整して使用した。この条件下で、パッチ電極内液は、少なくとも 2 時間は安

定であった。

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.) あるいは垂直型微小電極製作器 (PP-83, 成茂科学) 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 M Ω ~10 M Ω 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、10 KHz でデジタル化 (Labmaster DMA, Scientific Solution) してコンピュータに取り込んだ。必要に応じて、電流応答を再生し、解析した。電流解析には、カレイダグラフ (Synergy Software) を用いた。

単離水平細胞の細胞内 pH 測定には、pH 感受性蛍光色素である 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(and 6)carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いた。BCECF-AM (5 μ M) を含むリンガー液中に水平細胞を 5 分間放置し、その後リンガー液で洗い流した。約40分後、pH 測定を開始した。測定は水平細胞の中心部分 (直径 10 μ m の円形部) で行った。440 nm (Omega Optical, Inc.) と 490 nm (Omega Optical, Inc.) の単色光を交互に200ミリ秒間水平細胞に照射し、それぞれの単色光により励起された蛍光 (535 nm, Omega Optical, Inc.) を Zonax Fluorescence/Photometer system (Carl Zeiss, Inc.) を用いて記録し、その比を計測した。実験終了後、Nigericin 法を用いて、この比を細胞内 pH に換算した。細胞内 pH (水素イオン濃度) を変化させるためにアンモニウムプリパルス法を用いた (第 2 図 A) (Boron & DeWeer, 1976; Boron *et al.*, 1981; Thomas, 1977, 1984; Moody, 1980, 1984)。塩化アンモニウム (NH₄Cl) をリンガー液 (アンモニウムリンガー液) に添加して、細胞を灌流する方法である。NH₄Cl はリンガー液中でアンモニウムイオン (NH₄⁺) と水素イオン (H⁺) と塩素イオン (Cl⁻) に解離する。さらに、NH₄⁺ はアンモニア (NH₃) と H⁺ に解離する。NH₄⁺ と NH₃ は細胞内に移動し、NH₃ は H⁺ と反応して NH₄⁺ を形成する。このため、細胞内はアルカリ化する。NH₄Cl を洗い流すと、細胞内に流入した NH₄⁺ と細胞内で形成された NH₄⁺ は解離し、NH₃ と H⁺ になる。NH₄⁺ は細胞内で形成された量と細胞内に流入した量の総和であるから、NH₄Cl を洗い流したあとの細胞内 H⁺ の量はアンモニウムリンガー液灌流前よりも多くなる。このため、細胞内は酸性化する。NH₃ は細胞外に排出される。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co. から、BCECF-AM および Nigericin は Molecular Probes, Inc. から、Dopamine hydrochloride は Research Biochemical International, Halothane は Halocarbon Laboratories, L-15 は Gibco から購入した。



第2図 アンモニウムプリパルス法を用いた水平細胞内 pH 変化

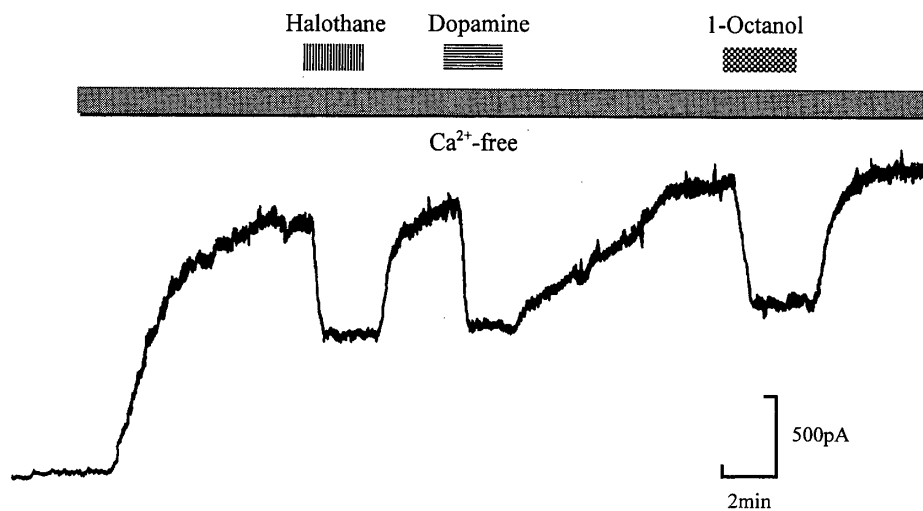
A: 塩化アンモニウム (NH_4Cl) をリンガー液に添加し、水平細胞に灌流投与すると、 NH_4Cl はリンガー液中でアンモニウムイオン (NH_4^+) と水素イオン (H^+) と塩素イオン (Cl^-) に解離する。さらに、 NH_4^+ はアンモニア (NH_3) と H^+ に解離する。 NH_4^+ と NH_3 は細胞内に移動し、 NH_3 は H^+ と反応して NH_4^+ を形成する。このため、細胞内はアルカリ化する (a)。 NH_4Cl を洗い流すと、細胞内に流入した NH_4^+ と細胞内で形成された NH_4^+ は解離し、 NH_3 と H^+ になる。 NH_4^+ は細胞内で形成された量と細胞内に流入した量の総和であるから、 NH_4Cl を洗い流したあとの細胞内 H^+ の量はアンモニウムリンガー液灌流前よりも多くなる。このため、細胞内は酸性化する (b)。 NH_3 は細胞外に排出される。B: 水平細胞に BCECF-AM (pH 感受性色素) を負荷し、細胞内 pH を記録した。正常リンガー液 (pH 7.8) 中での水平細胞の細胞内 pH は、約 7.4 であった。20 mM- NH_4Cl を添加したリンガー液の灌流により、水平細胞はアルカリ化し、またこれを洗い流すと酸性化した。この酸性化は、約10分後回復した。

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 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、数分後にピークに達した (第3図)。この時、膜電流ノイズも増加した。第3図の細胞では 1000 pA を凌駕する外向き電流が発生したが、電流振幅は実験に用いた細胞によってかなり異なっていた。細胞培養の期間が長くなるにつれ、電流振幅は減少する傾向にあった。第3図に示すように、この外向き電流は、Halothane (飽和濃度) (一般的なギャップ結合阻害剤)、1-Octanol (4 mM) (一般的なギャップ結合阻害剤) 並びに Dopamine (2 μM) (水平細胞のギャップ結合阻害剤) によって抑えられ、また膜電流ノイズも減少した。7 細胞中 2 細胞において、100 nM-Dopamine が有効であった。

以上は、細胞外液からの Ca^{2+} 除去により惹起される外向き電流は、ヘミギャップ結合チャネルの活性化によることを強く示唆している。



第3図 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 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、数分後にピークに達した。このとき、膜電流ノイズも増加した。Halothane (飽和濃度) (一般的なギャップ結合阻害剤) を無 Ca^{2+} リンガー液に添加し投与すると、外向き電流と共に膜電流ノイズも減少した。Halothane と同じように、1-Octanol (4 mM) (一般的なギャップ結合阻害剤) ならびに Dopamine (2 μM) (水平細胞のギャップ結合阻害剤) も、外向き電流を抑えた。以上は、無 Ca^{2+} リンガー液の灌流により発生した外向き電流が、ヘミギャップ結合チャネルの活性化によることを示唆している。

細胞内 pH によるヘミギャップ結合チャネルの修飾

ヘミギャップ結合チャネル電流の振幅は、細胞内の pH 変化によって増減した。細胞内 pH を変えるために、アンモニウムプリパルス法を用いた。pH 7.8 の正常リンガー液中で、細胞内 pH は概ね 7.4 であった。第 2 図 B に示すように、20 mM-NH₄Cl (塩化アンモニウム) をリンガー液に添加し灌流すると、細胞内 pH は 7.4 から 7.7 に上昇 (アルカリ化) し、NH₄Cl を洗い流すと pH 6.8 に減少 (酸性化) した。洗い流して十数分後に、pH は元のレベルにまで回復した。

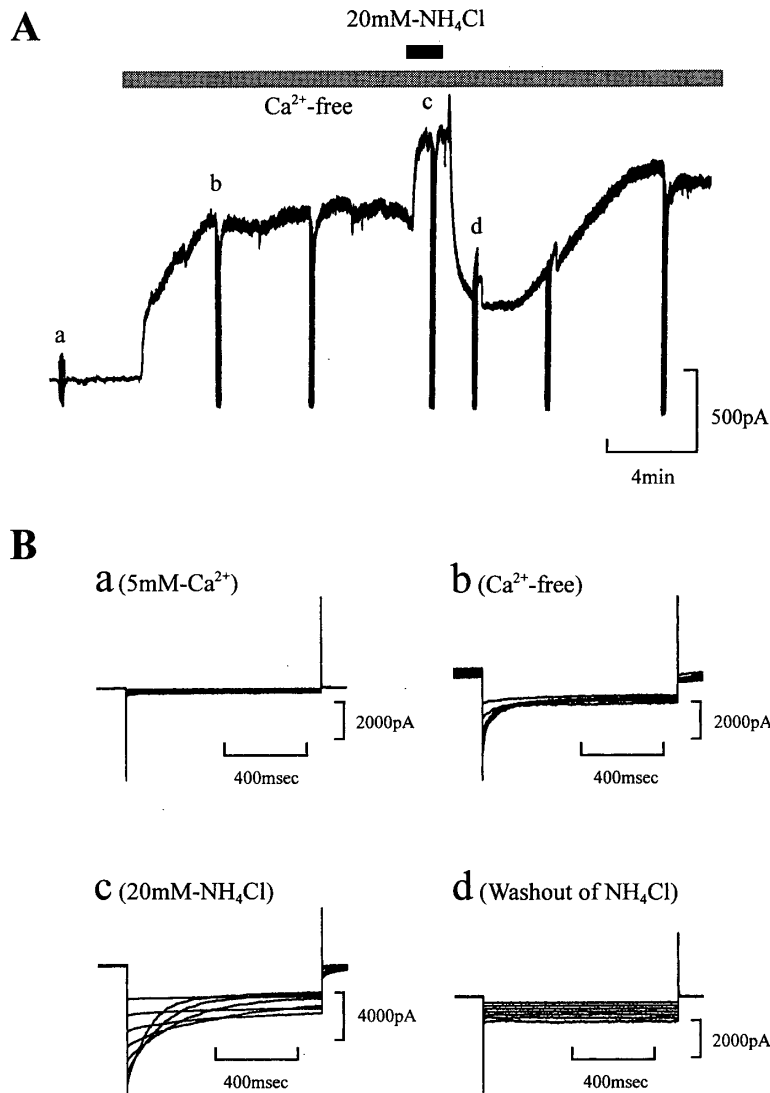
このアンモニウムプリパルス法を用いて、水平細胞内の pH を変え、ヘミギャップ結合チャネル電流に対する影響を調べた (第 4 図)。NH₄Cl 灌流中 (細胞内アルカリ化)、外向き電流は増加し、また NH₄Cl を洗い流す (細胞内酸性化) とこの電流は抑えられた。外向き電流振幅の増減に対応して、膜電流ノイズも増減した。16細胞で同じ実験を実施し、総ての細胞で同様の結果を得た。

正常リンガー液、無 Ca²⁺リンガー液およびアンモニウム無 Ca²⁺リンガー液中で、+20 mV に固定した電圧を、-10 mV から -60 mV まで 10 mV 刻みで 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に与えた電圧変化は、水平細胞に顕著な膜電流変化を引き起こさなかった (第 4 図 Ba)。無 Ca²⁺リンガー液灌流中 (すなわち、ヘミギャップ結合チャネルの活性化) には、一過性の内向き電流に引き続き持続的な電流が発生した (第 4 図 Bb)。一過性内向き電流は、過分極が大きいほど増大した。一方、持続性応答は -30 mV よりさらに過分極させると、却って減少した (これは、アンモニウム無 Ca²⁺リンガー液中 (第 4 図 Bc) で顕著であった)。この一過性電流変化の成因は、ヘミギャップ結合チャネルの不活性化によると考えられる。さらに、アンモニウム無 Ca²⁺リンガー液灌流時 (細胞内アルカリ化) には、この一過性内向き電流の振幅が数倍に増加した (第 4 図 Bc)。これを洗い流す (細胞内酸性化) と、電流変化は殆ど消失した (第 4 図 Bd)。同様の結果が、11細胞で観察された。3 細胞において、+20 mV に固定した電圧を、+10 mV から -60 mV まで 10 mV 刻みで 1 秒間矩形波状に変化させ、その時の膜電流を記録した。電流極性は、0 mV を境に反転した。この結果は、ヘミギャップ結合チャネル電流の逆転電位が 0 mV 付近にあること示している。

以上は、ヘミギャップ結合チャネルが細胞内 pH により修飾されることを示している。また、逆転電位測定から、この外向き電流は非選択的なイオン透過性の増大によることが示唆された。

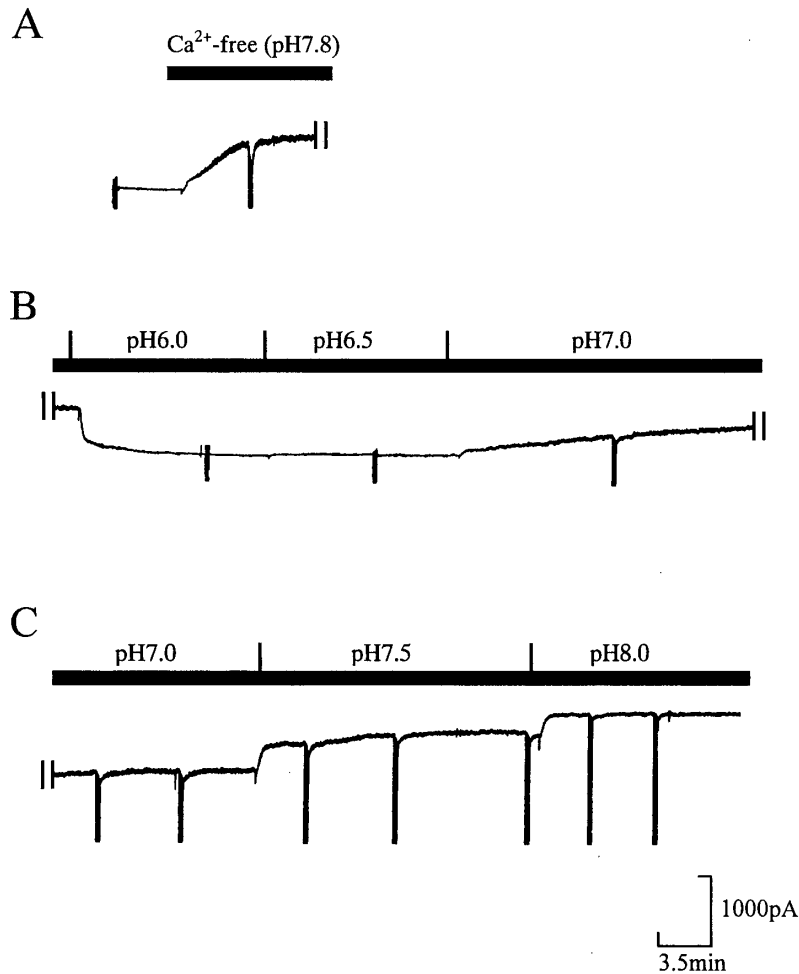
細胞外 pH によるヘミギャップ結合チャネルの修飾

ヘミギャップ結合チャネル活性は、細胞外の pH 変化によっても修飾された。第 5 図に示



第4図 細胞内 pH 変化に伴うヘミギャップ結合チャンネル電流の増減

A: 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 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、数分後にピークに達した。20 mM- NH_4Cl を添加した無 Ca^{2+} リンガー液（アンモニウム無 Ca^{2+} リンガー液）を灌流（細胞内アルカリ化）すると、この外向き電流は増大し、 NH_4Cl を洗い流す（細胞内酸性化）と電流振幅は減少した。十数分後には、外向き電流は元のレベルにまで回復した。この電流の回復過程は、細胞内 pH の回復と概ね一致していた（第2図 B 参照）。B: 正常リンガー液 (a)、無 Ca^{2+} リンガー液 (b と d)、およびアンモニウム無 Ca^{2+} リンガー液 (c) の灌流中、+20 mV に固定した膜電位を、-10 mV から -60 mV まで 10 mV 刻みで 1 秒間矩形波状に変化させ、このとき発生する電流応答を記録した。正常リンガー液灌流中に与えた電位変化は、水平細胞に顕著な電流変化を引き起こさなかった (a)。無 Ca^{2+} リンガー液中では、一過性の内向き電流が発生し、その後定常状態（持続性内向き電流）に移行した (b)。一過性電流は過分極が大きくなるにつれ増大したが、持続性電流は -30 mV よりさらに過分極させると却って減少した。アンモニウム無 Ca^{2+} リンガー液を灌流すると、一過性ならびに持続性内向き電流は著しく増大した (c)。このときにも、持続性電流成分は -30 mV より過分極側で減少した。しかし、 NH_4Cl を洗い流すと、この一過性電流は消失し、持続性成分のみが残った。以上は、ヘミギャップ結合チャンネル電流が細胞内アルカリ化で増加、酸性化で減少することを示している。



第5図 細胞外 pH 変化に伴うヘミギャップ結合チャンネル電流の増減

A: 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 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、数分後にピークに達した。B と C: 正常リンガー液の pH を 6.0 から 8.0 まで 0.5 pH ユニット刻みで上昇させ、外向き電流の変化を記録した。細胞内 pH の場合と同様に、細胞外アルカリ化で外向き電流は増大し、酸性化で減少した。以上は、細胞内 pH のみならず細胞外 pH によってもヘミギャップ結合チャンネル活性が修飾されることを示している。A, B と C は連続記録である。記録中の下向きの振れは、過分極通電 (第4図 B 参照) により発生した電流応答を示す。ただし、電流応答の詳細は省略した。

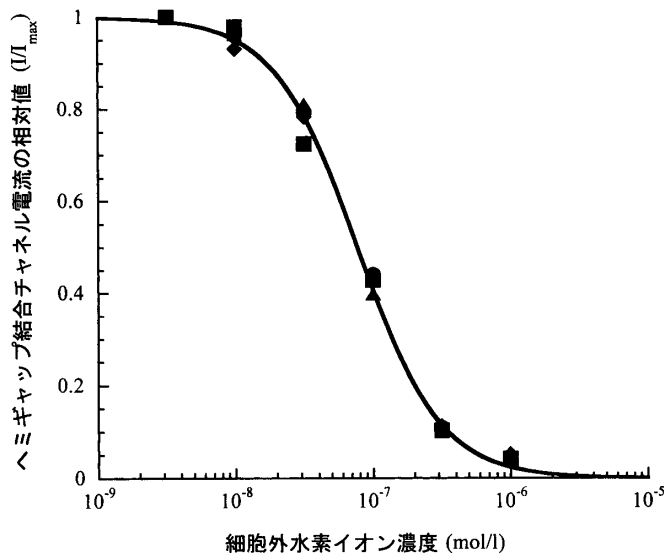
すように、膜電位を +20 mV に固定し、細胞外液の Ca^{2+} を除去する (無 Ca^{2+} リンガー液の灌流) と、時間経過の緩やかな外向き電流が発生した。細胞外液の pH を変え、外向き電流への影響を調べた。細胞外 pH を低下 (酸性化) させると、この外向き電流は抑えられ、膜電流ノイズが減少した。細胞外を pH 6.0 にすると、外向き電流は殆ど消失した。一方、細胞外液をアルカリ化すると、この電流振幅は増大した。同じ実験を 4 細胞で実施し、何れの細胞においても同様の結果を得た。2 細胞において、pH 8.9 のリンガー液灌流中の外向き電流

値を測定したが、pH 8.5 のリンガー液灌流中に得られた値と同じであった。

細胞外液を pH 6.0 から 8.5 まで、0.5 pH ユニット刻みで変化させ、外向き電流（ヘミギャップ結合チャンネル電流）を記録し、電流の相対値を細胞外水素イオン濃度に対してプロットした（第 6 図）。電流相対値と細胞外水素イオン濃度の関係は、以下に示す Hill の式によって近似することができた。

$$\frac{I}{I_{\max}} = 1 - \frac{[H^+]^n}{[H^+]^n + IC_{50}^n}$$

- I_{\max} : 最大外向き電流値（pH 8.5 に調整した正常リンガー液を灌流したときの外向き電流の値）
- I : pH 8.0, 7.5, 7.0, 6.5 あるいは 6.0 に調整した正常リンガー液を灌流したときの外向き電流の値
- $[H^+]$: 水素イオン濃度
- IC_{50} : 最大外向き電流値の半分の応答を惹起するために必要な水素イオン濃度
- n : Hill 係数



第 6 図 ヘミギャップ結合チャンネル電流と細胞外水素イオン濃度の関係

正常リンガー液の pH を 6.0 から 8.5 まで 0.5 pH ユニット刻みで上昇させ、外向き電流を記録した。pH 8.5 に調整した正常リンガー液中での外向き電流値を最大電流 (I_{\max}) とみなし、他の pH での電流値 (I) を相対値として表し、プロットした。記録に成功した 4 細胞の結果は、良く一致していた。また、この細胞外水素イオンとヘミギャップ結合チャンネル電流相対値の関係は、Hill の式 ($I/I_{\max} = 1 - \{[H^+]^n / ([H^+]^n + IC_{50}^n)\}$) を用いて近似できた。Hill 係数 (n) が 1.45, IC_{50} が 7.7×10^{-8} (この値を pH に換算すると、7.11 である) であった。

Hill 係数は 1.45, IC_{50} は 7.7×10^{-8} mol/l (この値を pH に換算すると, 7.11 である) であった。

膜電位を +20 mV に固定した水平細胞において, 正常リンガー液の pH を変化 (6.0~8.5) させても, 膜電流に変化は見られなかった。

以上から, ヘミギャップ結合チャネルは細胞内のみならず細胞外の水素イオンによっても修飾されることが明らかとなった。

考 察

細胞外 Ca^{2+} 濃度減少に伴うヘミギャップ結合チャネルの活性化

下等脊椎動物網膜水平細胞の電気シナプス (ギャップ結合) が, Dopamine D1 受容体を介して修飾されることは良く知られている (Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1978; Teranishi *et al.*, 1983, 1984; Dowling, 1986; Mangel & Dowling, 1987)。従って, 細胞外液からの Ca^{2+} 除去によって発生した外向き電流が Halothane (一般的なギャップ結合阻害剤) と 1-Octanol (一般的なギャップ結合阻害剤) のみならず Dopamine により抑制されるという本実験結果 (第 3 図) は, この外向き電流がヘミギャップ結合チャネルの活性化に伴い発生したことを強く示唆している。同様の結果は, DeVries & Schwartz (1992) や Dixon *et al.* (1996) によって報告されている。

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埋め込まれた Connexon (膜貫通タンパク質複合体) がお互い連結し, 無機イオンや分子量 1 KD 以下の物質の輸送通路を形成している。分子生物学的研究から, Connexon は 6 つの Connexin (サブユニットタンパク質) により構成されていること, さらに Connexin には数種類の亜種が存在することなどが判明している (Beyer *et al.*, 1990)。最近, 網膜のギャップ結合研究にも漸く分子生物学的手法が取り入れられ, その解析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 35: O'Brien *et al.*, 1996, Connexin 43: Kadle *et al.*, 1991; Edgerton & McMahon, 1994, 1995; Giblin & Christensen, 1997)。しかし, 網膜水平細胞の Connexin に関する研究は殆どない。

水平細胞が網膜内に存在するとき, 水平細胞膜に発現しているヘミギャップ結合チャネルは密着し, 1 つのギャップ結合チャネルを形成する (第 1 図挿入図下)。このため, ヘミギャップ結合の細胞外側部 (細胞間隙部) 以外は細胞内液に接している。水平細胞を網膜内から単離すると, ギャップ結合は分断され, ヘミギャップ結合として細胞膜に存在する。このとき, ヘミギャップ結合の細胞外側部 (切断端) は, 突然細胞外液に曝される。つまり, ヘミギャッ

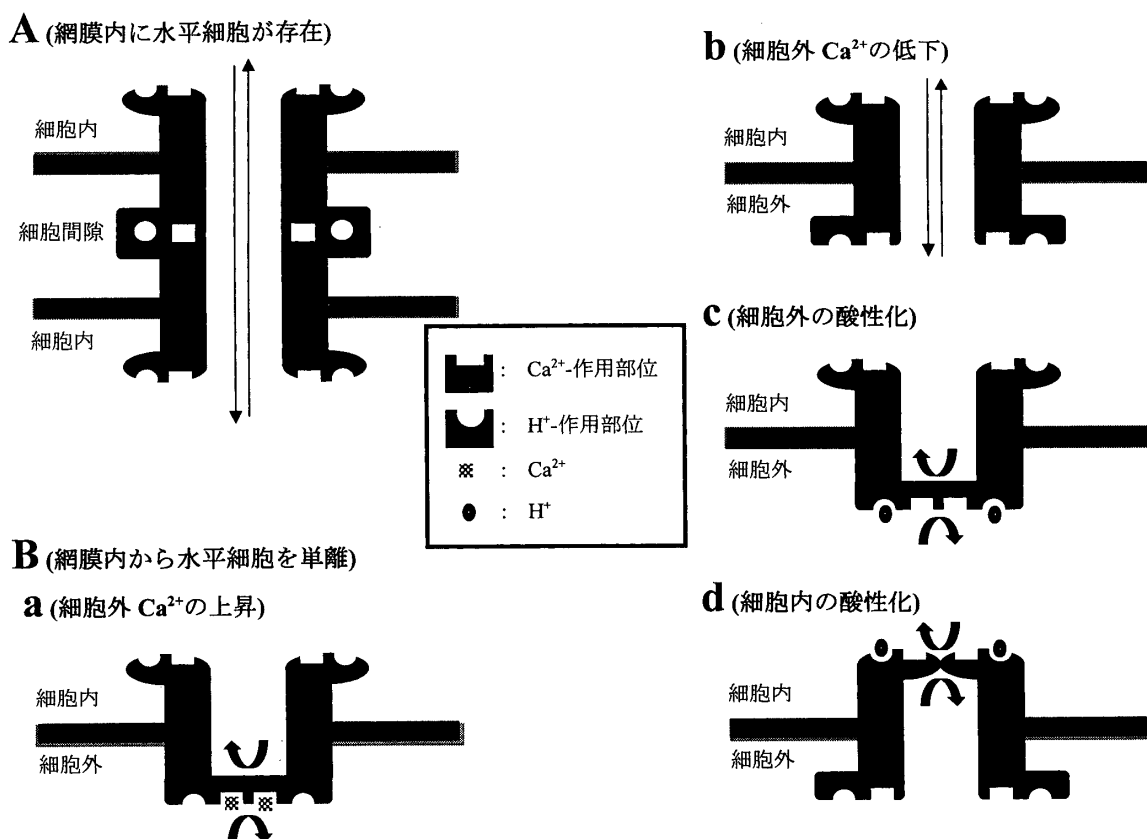
ブ結合の細胞外切断端のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度は、nM オーダー (細胞内濃度) から mM オーダー (細胞外濃度) に変化する。本実験および他の実験 (DeVries & Schwartz, 1989; Malchow *et al.*, 1993; Dixon *et al.*, 1996) は、高濃度の Ca^{2+} 存在 (正常リンガー液の灌流) 下でヘミギャップ結合チャネルは閉塞しているが、リンガー液中の Ca^{2+} 濃度を減少 (無 Ca^{2+} リンガー液の灌流) させると、ヘミギャップ結合チャネルは開くことを示している (第 3 図)。現在、Connexon の負電荷が Ca^{2+} により打ち消されたため、ギャップ結合チャネルが閉塞すると考えられている。

ヘミギャップ結合チャネルの水素イオンによる修飾

Heisler (1979) は、コイの血液 pH が約 7.8 であることを報告した。この結果に基づき、本実験ではリンガー液の pH を 7.8 に調整し灌流した。この pH 7.8 の正常リンガー液中で、アメリカナマズから単離した水平細胞の細胞内 pH は、 7.40 ± 0.06 ($n = 18$) であった (Takahashi *et al.*, 1993) (第 2 図 B 参照)。従って、本実験ではパッチ電極内液 pH を 7.4 にして使用した。第 4 図の実験から明らかなように、細胞内 pH が 7.4 から何れの方向に移動しても、ヘミギャップ結合チャネル活性は変化 (すなわち、チャネル活性は細胞内アルカリ化で増強そして酸性化で減少) した。この変化は、ヘミギャップ結合チャネルのみならず電位依存性イオンチャネル (カルシウムチャネル、内向き整流性カリウムチャネルやナトリウムチャネルなど) で報告されている結果とも一致していた (例えば、Moody, 1984; DeVries & Schwartz, 1992; Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi & Copenhagen, 1995)。

本実験では、細胞内 pH のみならず細胞外 pH のヘミギャップ結合チャネルへの作用を検討し、同様の結果を得た。すなわち、ヘミギャップ結合チャネル電流は細胞外液のアルカリ化で増強そして酸性化で抑制された。正常リンガー液をアルカリ化 (pH 8.5) しても、ヘミギャップ結合チャネル活性が上昇しなかったことを勘案すると、 H^+ はこのチャネルの開閉を直接制御する因子としてではなく、開口状態を修飾する因子として動作すると考えられる。本実験で得られた IC_{50} 値 (7.11: 解離定数と同じと考えて差し支えない) を考慮すると、細胞外 H^+ のターゲットはヘミギャップ結合チャネルタンパク質 (Connexin) を構成するヒスチジン残基 (生理的 pH の範囲内に解離定数を持つ唯一のアミノ酸) である可能性が高い。

本実験結果ならびに他の研究者の成果 (例えば、DeVries & Schwartz, 1989) から、 Ca^{2+} と H^+ によるギャップ結合チャネルの開閉制御および調節をモデル化した (第 7 図)。ギャップ結合チャネルの開閉は、基本的に Dopamine 受容体 \rightarrow cAMP \rightarrow cAMP 依存性プロテインキナーゼ系を介して制御されている (Lasater 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。現在では、 Ca^{2+} や H^+ もギャップ結合を調節する細胞内因子として働いていることが明らかとなっている。従って、ヘミギャップ結合チャネルの細胞内側部には、 Ca^{2+} と H^+ の作用部位が存在す



第7図 Ca²⁺とH⁺によるギャップ結合チャネルの開閉制御および調節のモデル

本実験結果ならびに他の研究者の成果 (例えば, DeVries & Schwartz, 1989) から, Ca²⁺とH⁺によるギャップ結合チャネルの開閉制御および調節をモデル化した。このモデルの特徴は, ヘミギャップ結合チャネルの細胞内側部と外側部の両方にCa²⁺-とH⁺-作用部位が存在し, 細胞内外でそれぞれは独立してチャネルの開閉を制御・調節していることである。A: 水平細胞が網膜内に存在するとき, ギャップ結合チャネルの開閉はDopamine受容体→cAMP→cAMP依存性プロテインキナーゼ系を介して制御されている (Dowling, 1986; Rogowski, 1987; Lasater 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。現在, この系以外にも, 多くの細胞内因子が調節に関与していることが知られている (Miyachi & Murakami, 1989, 1991; Miyachi *et al.*, 1990, 1991, 1994; Laufer *et al.*, 1989; Lasater, 1987)。Ca²⁺やH⁺も細胞内調節因子と考えられている。このモデルでは, Ca²⁺とH⁺以外の細胞内調節因子は考慮していない。B: 水平細胞を網膜内から単離すると, ギャップ結合は分断され, ヘミギャップ結合チャネルの細胞外側部 (切断端) にCa²⁺-作用部位とH⁺-作用部位が露出する。このCa²⁺-作用部位にCa²⁺が作用すると, ヘミギャップ結合チャネルは閉じる (aとb)。また, このチャネル活性は細胞内あるいは細胞外に存在するH⁺-作用部位にH⁺が作用すると, 抑えられる (cとd)。

る (第7図 A と Bd)。網膜内から水平細胞を単離すると, ギャップ結合は分断され, ヘミギャップ結合チャネルとして細胞膜に存在する。このとき, ヘミギャップ結合チャネルの細胞外側部 (切断端) には, Ca²⁺-作用部位とH⁺-作用部位が露出する (ギャップ結合を形成しているとき, この部分は細胞外液には曝されていない)。正常リンガー液を灌流すると, 露出したCa²⁺-作用部位にCa²⁺が作用するため, ヘミギャップ結合チャネルは閉じる (Ba)。ところが, 無Ca²⁺リンガー液を灌流して, 細胞外のCa²⁺を除去すると, このチャネルは開

く (Bb)。これは、ヘミギャップ結合チャネルの開閉が細胞外の Ca^{2+} により直接制御されていることを示している。さらに、このチャネル活性は細胞外 H^+ により調節される (c)。ただし、細胞外に Ca^{2+} が多量に存在するとき、 H^+ はチャネル活性に影響しない。このモデルの特徴は、ヘミギャップ結合チャネルの細胞外側部と細胞内側部には別の Ca^{2+} および H^+ 作用部位がそれぞれ存在し、細胞内外でこれらは独立してチャネル開閉を制御・調節する点にある。このモデルの真偽を確かめるため、ヘミギャップ結合チャネルに対する Ca^{2+} や H^+ の作用をさらに詳細に調べる必要がある。

ギャップ結合の機能

神経細胞間の情報伝達は、シナプスを介して行われる。このシナプスは、化学シナプスと電気シナプスに分類される。化学シナプスでは、シナプス前神経細胞から神経伝達物質が放出され、これがシナプス後神経細胞の受容体に結合し、シナプス伝達が完了する。一方、電気シナプスでは、シナプス前神経細胞ならびにシナプス後神経細胞に発現している Connexon が密着し、細胞間通路（イオンと物質の通路）を形成するため、細胞間の電気抵抗は細胞内液同様に低く、電気信号が直接伝播する。従って、電気シナプス伝達にはシナプス遅延がなく、シナプス前神経細胞の興奮が即座にシナプス後神経細胞に伝達されるという利点がある。

ギャップ結合は神経細胞間のみならず、心筋間や平滑筋間の接合部でも観察される（例えば、Spray *et al.*, 1985; Spray & Bennett, 1985）。神経細胞の場合と同様に、これらの接合部では電氣的抵抗が極めて低く、興奮が細胞集団間をまるで単一細胞のように遅延なく伝導する。つまり、これらの筋組織では、多くの筋線維がいつせいに収縮することが可能となる。今では、神経細胞や筋細胞といった興奮性細胞以外に、唾液腺細胞間、消化管の粘膜上皮細胞間、肝臓や膵臓の分泌細胞間、眼の水晶体細胞間といったところにギャップ結合が存在することが判明している（例えば、Stewart *et al.*, 1988; Perez-Armendariz *et al.*, 1991）。非興奮性細胞間のギャップ結合は、細胞間のイオンの移動のみならず、1 KD 以下の物質移動にも関与していると考えられている。

脊椎動物網膜では、異なる細胞間の情報伝達は化学シナプスにより、同種の細胞間の情報伝達は電気シナプス（ギャップ結合）により行われることが明らかとなっている（例えば、Copenhagen & Owen, 1976; Kujiraoka & Saito, 1986; Hidaka *et al.*, 1993）。水平細胞の電気シナプスは拮抗的受容野の周辺部応答形成 (Toyoda & Tonosaki, 1978) に、また視細胞や双極細胞の電気シナプスは S/N 比の改善 (Yasui, 1992; Umino *et al.*, 1994) に寄与していることが報告されているが、アマクリン細胞や神経節細胞の電気シナプスの機能については未だ明らかになっていない。

ヘミギャップ結合チャネルはギャップ結合を研究するため、極めて有用な標本である。今

後、この標本を用いて、ギャップ結合チャネルの『開閉制御機構（活性化と不活性化機構）』や『開閉調節機構（細胞内調節機構）』の生理学的、生物物理学のおよび薬理的解析が進めば、網膜でのギャップ結合の機能が完全に解明される日もそう遠くない。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（一般研究(C): 04640670, 一般研究(C): 07680899, 基盤研究(C): 09680823), 日本学術振興会日米科学協力事業共同研究, 第8回金原一郎記念医学医療振興財団基礎医学医療研究助成金, 第28回内藤記念科学奨励金（研究助成）によった。

引用文献

- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **265**: 428–436.
- Beyer, E. C., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. (1990), Connexin family of gap junction proteins, *L. membrane Biol.*, **116**: 187–194.
- Boron, W. F. and DeWeer, P. (1976), Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃ and metabolic inhibitors, *J. Gen. Physiol.*, **67**: 91–112.
- Boron, W. F. McCormick, W. C. and Ross, A. (1981), pH regulation in barnacle muscle fibers: dependence on extracellular sodium and bicarbonate, *Am. J. Physiol.*, **240** (*Cell Physiol.* 9): C80–C89.
- Copenhagen, D. R. and Owen W. G. (1976), Coupling between rod photoreceptors in a vertebrate retina, *Nature*, **260**: 57–59.
- 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.
- Dowling, J. E. (1986), Dopamine: a retinal neurotransmitter ?, *TINS*, **9**: 236–240.
- Edgerton, T. L. and McMahon, D. C. (1994), Partial sequence of connexin gene homolog in giant danio, *Soc Neurosci.*, Abstr. **20**: 560.
- Edgerton, 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.
- 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, *Pflugers Arch.*, **391**: 85–100.
- 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.
- Heisler, N. (1979), Regulation of the acid-base balance in fishes, In *Environmental Physiology of Fishes*, ed. by M. A. Ali, New York, Plenum, pp 122–162.

- Hidaka, S., Maehara, M., Umino, O, Lu, Y. and Hashimoto, Y. (1993), Lateral gap junction connections between retinal amacrine cells summing sustained responses, *Neuroreport*, **5**: 29–32.
- 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.
- 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.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **213**: 95–105.
- Kohler, K., Kolbinger, W., Kurz-Isler, G. and Weiler, R. (1990), Endogenous dopamine and cyclic events in the fish retina II. Correlation of retinomoter movement, spinule formation, and connexon density of gap junctions with dopamine activity during light/dark cycles, *Visual Neurosci.*, **5**: 417–428.
- Kolbinger, W., Kohler, K., Oetting, H. and Weiler, R. (1990), Endogenous dopamine and cyclic events in the fish retina I. HPLC assay of total content, release, and metabolic turnover during different light/dark cycles, *Visual Neurosci.*, **5**: 143–159.
- 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.
- Kurz-Isler, G., Voigt, T. and Wolburg, H. (1992), Modulation of connexon densities in gap junctions horizontal cell perikarya and axon terminals in fish retina: Effects of light/dark cycles, interruption of the optic nerve and application of dopamine, *Cell Tis. Res.*, **268**: 267–275.
- 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.
- 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.
- 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. (1987), The interplexiform-horizontal cells system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **231**: 91–121.
- 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.
- 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.
- Moody, W. Jr. (1980), Appearance of calcium action potentials in crayfish slow muscle fibers under conditions of low intracellular pH, *J. Physiol. (Lond.)*, **302**: 335–356.
- Moody, W. Jr. (1984), Effects of intracellular H⁺ on the electrical properties on excitable cells, *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**: 257–278.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1978), Effects of catecholamines on the horizontal cell membrane potential in the fish retina, *Sensory Processes*, **2**: 388–395.

- 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.
- Perez-Armendariz, M., Roy, C., Spray, D. C. and Bennett, M. V. (1991), Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells, *Biophys. J.*, **59**: 76–92.
- Rogawski, M. A. (1987), New directions in neurotransmitter action: Dopamine provides some important clues, *TINS*, **10**: 200–205.
- 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.
- Spray, D. C., White, R. L., Mazet, F. and Bennett, M. V. (1985), Regulation of gap junctional conductance, *Am. J. Physiol.*, **248**: H753–H764.
- Spray, D. C. and Bennett, M. V. (1985), Physiology and Pharmacology of gap junctions, *Ann. Rev. Physiol.*, **47**: 281–303.
- Stewart, S., Duncan, G., Marcantonio, J. M. and Prescott, A. R. (1988), Membrane and communication properties of tissue cultured human lens epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **29**: 1713–1725.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1995), Intracellular alkalization enhances inward K^+ current in retinal horizontal cells of catfish, *Zool. Sci.*, **12**: 29–34.
- 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.
- 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.
- Thomas, R. C. (1977), The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurons, *J. Physiol. (Lond.)*, **273**: 317–338.
- Thomas, R. C. (1984), Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery, *J. Physiol. (Lond.)*, **354**: 3P–22P.
- 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.
- 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, *Visual Neurosci.*, **7**: 451–458.
- Umino, O., Maehara, M., Hidaka, S., Kita, S. and Hashimoto, Y. (1994), The Network properties of bipolar-bipolar cell coupling in the retina of teleost fishes, *Visual Neurosci.*, **11**: 533–548.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93–101.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yasui, S. (1992), On the square root intensity coding at the level of cone photoreceptors, *Vision Res.*, **32**: 199–202.