

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に 対するグリシンの効果

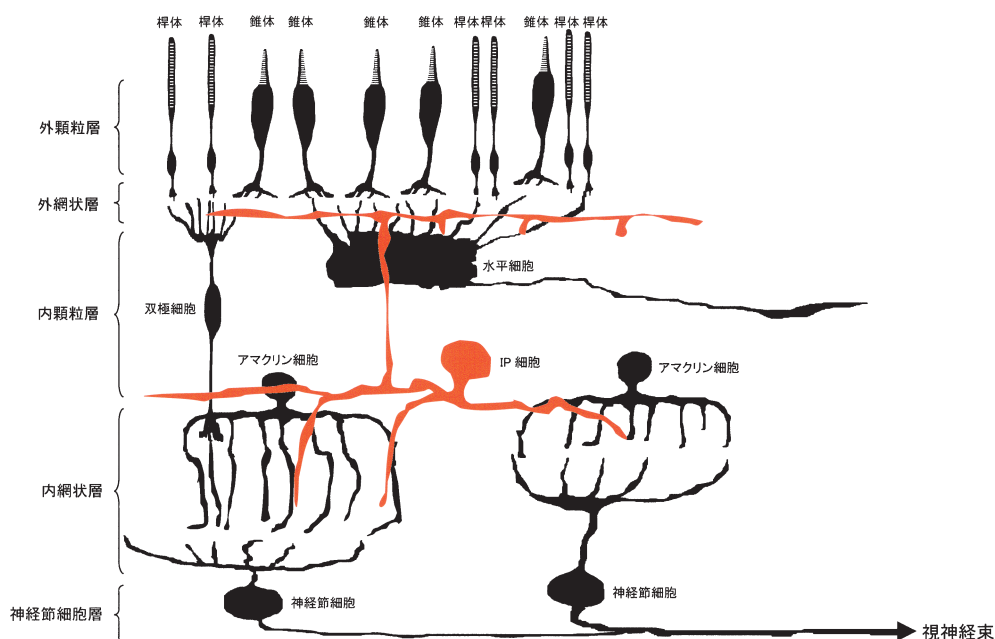
高 橋 恭 一

(受付 2011 年 10 月 21 日)

序 論

脊椎動物網膜視細胞は、明所で動作する錐体（光感受性が低い視細胞；昼光視〔色覚〕に
関与）と暗所で動作する桿体（光感受性が高い視細胞；薄明視に関与）の2種類に分類され
る。外界から眼球内に入射した光が視細胞の外節に到達すると、視物質（錐体：錐体視物質；
桿体：ロドプシン）が活性化し、外節内部の cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP)
濃度を減少させる（例えば、Kawamura, 1993, 1994）。この結果、外節形質膜に発現する
cGMP 依存性陽イオンチャネル（光感受性陽イオンチャネルとも呼ばれる；ナトリウムイ
オン $[Na^+]$ やカルシウムイオン $[Ca^{2+}]$ などを通す陽イオンチャネル）は閉塞し、視細胞に
過分極応答が生じる（例えば、Haynes & Yaw, 1985; Pugh & Lamb, 1990, 1993; Watanabe
& Murakami, 1991; Kawamura, 1993, 1994; Picones & Korenbrot, 1994）。このため、視細
胞終末から放出される L-グルタミン酸（神経伝達物質）量は減少する（Trifonov, 1968; Miller
& Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1991;
Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995）。一方、暗時、外節
内には多量の cGMP が存在するため、cGMP 依存性陽イオンチャネルは開口し、視細胞は脱
分極状態となる。このため、視細胞終末からの L-グルタミン酸放出は維持される。視細胞で
惹起された膜電位変化は、縦方向に配置された細胞群（視細胞、双極細胞と神経節細胞）と
横方向に配置された細胞群（水平細胞とアマクリン細胞）にシナプス伝達される（第 1 図参
照）。網膜内で処理された視覚情報は、出力細胞である神経節細胞の軸索（視神経束）を経て
脳に伝播される。

第二次神経細胞である双極細胞（縦方向に配置された神経細胞）は、同心円型中心-周辺
拮抗的受容野を有している。この細胞は微小点光を用いた受容野中心部への光照射によって
脱分極応答そして環状光（中心部を照射しないドーナツ状の光刺激）を用いた受容野周辺
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、逆の膜電位応答パターンを
示す OFF 中心型双極細胞の2種類に分類される（Werblin & Dowling, 1969; Kaneko, 1970,
1973, 1979, 1983; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Saito & Kujiraoka, 1982; Kaneko & Tachibana,



第1図：魚類網膜の細胞構築

魚類網膜は、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。これらの神経細胞は網膜内で層状構造を形成している。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、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、そして神経節細胞の細胞体が存在する部分を神経節細胞層と呼ぶ。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。視細胞は、光に対する感受性が高い桿体（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変化は電位応答に変換され、縦方向に配置された細胞群（視細胞、双極細胞と神経節細胞）と横方向に配置された細胞群（水平細胞とアマクリン細胞）にシナプス伝達される。網膜内で処理された視覚情報は、出力細胞である神経節細胞の軸索（視神経束）を経て脳へと伝播される。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス連絡する錐体水平細胞および桿体とシナプス連絡する桿体水平細胞に分類される。第6番目の網膜内神経細胞として、Interplexiform細胞（IP細胞あるいは間網状細胞と呼ばれている）（オレンジ色）が知られている。IP細胞は細胞体が内顆粒層にあり、神経突起を内網状層のみならず外網状層にまで伸ばしており、視覚情報処理に重要な役割を演じていると考えられている。残念ながら、IP細胞の機能解析は未だ充分ではない。

1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987)。両タイプの双極細胞に惹起される光応答の極性が逆になるのは、これらの細胞に発現するグルタミン酸受容体が異なるためである。ON 中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体、そしてOFF 中心型双極細胞にはイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現していることが明らかとなっている（Murakami *et al.*, 1975; Shiells *et al.*, 1981; Slaughter & Miller, 1981; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Falk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995; Sasaki & Kaneko, 1996)。これまでの研究により、受容野中心部への光照射に伴い惹起される膜電位応答は視細胞から双極細胞への直接的なシナプス連絡、そして受

容野周辺部への光照射に伴い惹起される膜電位応答は水平細胞から双極細胞への間接的なシナプス連絡（水平細胞から視細胞を経由して双極細胞にシナプス伝達される受容野周辺部に関する情報）によって形成され则认为られている（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978; Ishida *et al.*, 1980）。

もう一つの第二次神経細胞である水平細胞（横方向に配置された神経細胞）は細胞同士が電気シナプス（ギャップ結合を介する電氣的なシナプス伝達）によって結合しているため、広範且つ均一な受容野を有している。水平細胞は OFF 中心型双極細胞と同じグルタミン酸受容体を発現し、暗時に視細胞が放出する L-グルタミン酸によって脱分極した状態にある（Murakami *et al.*, 1975; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Murakami & Takahashi, 1987）。錐体水平細胞は錐体に抑制性シナプスを形成し、錐体水平細胞の受容野情報を錐体にフィードバックしている（Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995）。この抑制性シナプスは暗時（脱分極時）に錐体水平細胞が放出する γ -アミノ酪酸（ γ -Aminobutyric acid: GABA）によって活性化し、錐体を過分極させることが知られている（Murakami *et al.*, 1982a, b; Kaneko & Tachibana, 1986）。錐体水平細胞から錐体への GABA 作動性（抑制性）シナプスは、双極細胞の受容野周辺部の光応答形成に重要な役割を演じている（Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978; Ishida *et al.*, 1980）。錐体水平細胞には GABA_C 受容体が発現し、自己受容体としてこの細胞が放出する GABA 量を調整していると考えられている（Qian & Dowling, 1993; Dong *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1995a）。さらに、水平細胞にはドーパミン受容体が発現している（Lasater & Dowling, 1985）。この受容体が活性化すると、水平細胞間のギャップ結合の電気抵抗が増大し、結果として受容野サイズが減少することが知られている（Mangel & Dowling, 1985, 1987）。

脊椎動物網膜内には、Interplexiform 細胞（IP 細胞あるいは間網状細胞）と呼ばれる第 6 番目の神経細胞が存在する（第 1 図）。IP 細胞は細胞体が内顆粒層にあり、神経突起を内網状層のみならず外網状層にまで伸ばしている。この IP 細胞は、魚類から哺乳類までの多くの脊椎動物種（コイ、キンギョ、トラフサンショウウオ、アフリカツメガエル、トカゲ、カメ、マウス、ラット、サルそしてヒトなど）で確認されている（例えば、Gallego, 1971; Dowling & Ehinger, 1975; Hashimoto & Inokuchi, 1980）。キンギョ（*Carassius auratus*）網膜で行われた免疫組織学研究によって、IP 細胞のなかにドーパミンを放出するタイプとグリシンを放出するタイプが存在することが明らかとなっている（Marc & Liu, 1984; Kalloniatis & Marc, 1990）。ドーパミン作動性 IP 細胞は脳（嗅球）が発する遠心性神経細胞からシナプス入力を受け取り、この情報を水平細胞に伝達している（Zucker & Dowling, 1987）。既述したように、IP 細胞が放出したドーパミンは水平細胞のギャップ結合の電気抵抗を増し、水平

細胞の受容野サイズを減少させると考えられている。近年、ウグイ (*Tribolodon hakonensis*) 網膜において、ドーパミン作動性 IP 細胞から膜電位変化を導出することに成功し、この IP 細胞は光照射に連動した膜電位応答を惹起することが示された (Shimoda *et al.*, 1992)。一方、グリシン作動性 IP 細胞は求心性であり、水平細胞からシナプス入力を受け取り、アマクリン細胞にシナプス出力していると推測されている (Marc & Liu, 1984; Kalloniatis & Marc, 1990)。魚類網膜の IP 細胞のうち、ドーパミン作動性 IP 細胞については多数の研究が行われ、その機能について概ね解明されている。しかし、ドーパミン作動性以外の IP 細胞については、グリシン作動性 IP 細胞も含め、殆ど解析されていないのが現状である。従って、IP 細胞が第 6 番目の網膜内神経細胞としての地位を確立するには、さらに詳細な研究が必要である。

下等脊椎動物網膜の水平細胞はグリシン感受性を持つことが古くから知られている。Stone & Witkovsky (1984) は、グリシン投与がアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 網膜の水平細胞に脱分極応答を惹起し、光応答を減弱させることを報告した。その後、Witkovsky & Susan (1987) は同じアフリカツメガエル網膜を用い、水平細胞が錐体と桿体の両視細胞からシナプス入力を受け取っていること、そしてグリシンが錐体から水平細胞へのシナプス入力を選択的に減弱させることを明らかにした。また、Borges & Wilson (1991) はトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜を用いて、コバルトイオン (Co^{2+} ; シナプス伝達遮断剤) を投与して網膜内のシナプス伝達を遮断した状態で、さらにグリシンを投与すると水平細胞が脱分極することを見つけた。Gilbertson *et al.* (1991) は、同じトラフサンショウウオ網膜から単離した水平細胞にグリシンを投与すると膜電流応答が惹起されること、そしてこの応答がストリキニン (グリシン受容体アンタゴニスト) 投与によって抑制されることを明らかにした。これら両研究は、トラフサンショウウオ網膜の水平細胞にグリシン受容体が発現していることを示している。トラフサンショウウオ網膜のアマクリン細胞ならびに IP 細胞にグリシンが蓄積していることを明らかにした免疫組織学的研究を踏まえると、水平細胞のグリシン受容体はグリシン作動性 IP 細胞が放出するグリシンによって活性化されると推測される (Wu & Maple, 1998)。最近、トラフサンショウウオ網膜水平細胞に対するグリシンの作用が再調査され、この細胞に発現するグリシン受容体が細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度調節を介してグルタミン酸受容体の活性に影響することが報じられた (Shen, 2005)。これらの研究を総合すると、両生類網膜の外網状層において、グリシンは神経伝達物質あるいは神経修飾物質として機能していると考えられる。

Murakami *et al.* (1972) は、グリシン投与がコイ (*Cyprinus carpio*) 網膜の錐体水平細胞に過分極応答を惹起し、光応答を減弱させることを報告した。また、Negishi & Drujan (1979) はシマクロサギ (スズキ目の淡水魚; *Eugerres plumieri*) 網膜において、グリシン

投与が錐体水平細胞に脱分極応答そして桿体水平細胞に過分極応答を惹起することを見出した。これら以外に、魚類網膜水平細胞に対するグリシンの作用を調べた研究は殆どない。従って、錐体水平細胞に対するグリシンの作用が脱分極性であるのか過分極性であるのか、また桿体水平細胞にグリシン感受性があるのか否かなどについて結論は得られていない。近年、魚類網膜水平細胞にグリシン受容体が発現しているのか否かを調べる目的で、単離・培養した水平細胞を用いた研究が実施された。アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離・培養した錐体水平細胞は、グリシン感受性を示さなかった (Tachibana & Okada, 1991)。一方、ホワイトバス (スズキ目の淡水魚; *Roccus americana*) 網膜から単離した錐体水平細胞の中に、グリシン感受性を持つ細胞が存在することが見つかった (Zhou *et al.*, 1993)。残念ながら、これらの単離・培養水平細胞を用いた研究以降、魚類網膜の水平細胞に対するグリシンの作用は調べられておらず、グリシンが魚類網膜外網状層において神経伝達物質や神経修飾物質として機能しているのか否かについては不明のままである。

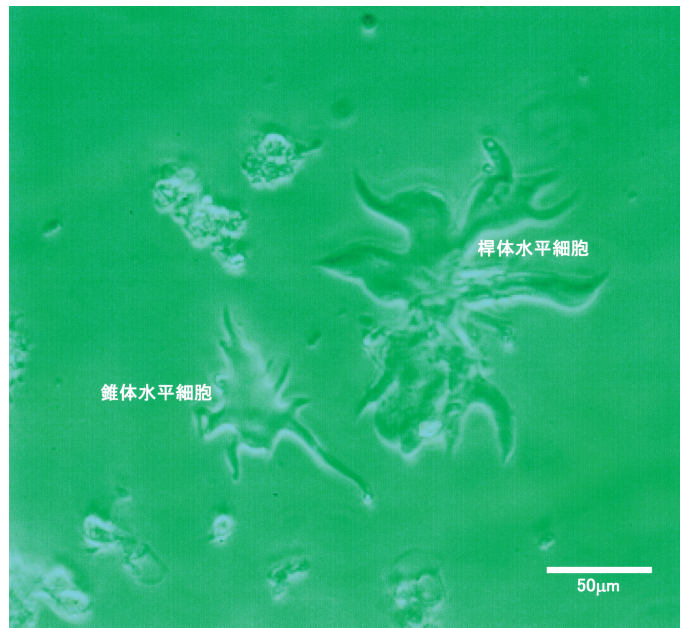
今回、魚類網膜水平細胞に対するグリシンの作用を再検討する目的で、アメリカナマズ網膜から水平細胞を単離し、この細胞に対するグリシンの作用を調べた。この結果、錐体水平細胞にグリシン感受性があることが判明した。

実験材料と方法

実験には、体長約 35~45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜から水平細胞を単離し、培養した。本研究で用いた単離法を以下に概説する。氷を用いて低温麻酔したアメリカナマズを約60分間暗順応し、ギロチンを用いて断頭後、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した。雑菌の混入を防ぐため、頭部をクリーンベンチ (滅菌箱) 内に移し、眼球を摘出した。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], 2.5 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。この剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、pH 7.0 に調整した Papain 溶液 (10 U/ml Papain [タンパク質分解酵素], 125.0 mM NaCl, 1.0 mM Na₂HPO₄, 2.5 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, 0.01 mg/ml BSA) に移し、28°C で20分間振盪した。この後、

Papain 溶液を除去し、網膜片を4°Cの単離操作液にて5回洗浄した。これらの網膜片をプラスチック製試験管（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 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5回出し入れした（機械的単離操作）。比較的大きな網膜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、網膜片が存在する試験管に単離操作液を 1.5 ml補充し、パスツールピペットによる出し入れ（ピペッティング）を5回行い、網膜片の沈殿後に細胞浮遊液を試験管に移し、4°Cで保存した。この操作を、網膜片がなくなるまで続けた。この結果、30～35本の細胞浮遊液を含む試験管を得ることができた。それぞれの試験管から 20 μ l の細胞浮遊液を採取しスライドガラスに置き、倒立型位相差顕微鏡（TMS-F, Nikon）で観察し、水平細胞が多数認められる試験管の細胞浮遊液を実験に使用した。網膜内から単離した直後の神経細胞の多くは樹状突起と軸索を有しており、その形態は網膜内に存在するときに近い状態であった。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、単離後の神経細胞の識別は容易であった（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）。錐体水平細胞と桿体水平細胞は、細胞体の大きさと特徴的な形態を指標にして識別することが可能であった（第2図）。Concanavalin A（Con A）で被覆した円型カバーガラス（直径 12 mm; Fisher Scientific Inc.）上に細胞浮遊液を15分間静置し、水平細胞の接着を確認後、記録槽に移行した。このカバーガラスは 1N-塩酸（HCl）に24時間浸し、その後蒸留水で洗浄後、100%エタノール中にて保存した。使用に際して、クリーンベンチ内でカバーガラスをガスの炎に曝し、乾燥・滅菌した。Con A ストック液（1 ml の蒸留水に 0.1～0.5 mg を溶かした液）を滅菌したカバーガラスに薄く塗布し、これを紫外線ランプ（滅菌用ランプ）の下で乾燥させた。

単離水平細胞が接着した Con A 被覆カバーガラスを記録槽（容量; 455 μ l）に置き、標準リンガー液を約30分灌流し実験を開始した。先端口径が小さな Y-tube（直径: 約 120 μ m）を水平細胞から 150～250 μ m の距離に置いて灌流した。Y-tube による溶液の灌流速度は 260 μ l/分であった。単離水平細胞に Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、膜電流を記録した（Hamil *et al.*, 1981）。膜電流記録用電極は Brown-Flaming 型微小電極製作器（Model-P97, Sutter Instrument Co.）を使い、Borosilicate 性ガラス管（Garner Glass Co.）から作製した。電極抵抗は 5～8 M Ω であった。不関電極として、150 mM NaCl, 1.5%寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化銀電極を用いた。膜電流記録用電極と不関電極の液間電位を測定すると、記録用電極が 4～6 mV 負となった。本実験ではこの液間電位を考慮し、膜電位を -5 mV 補正して表示した。膜電流記録は室温（20～23°C）で実施した。水平細胞から導出した



第2図：アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後、約3時間経過して撮影した2種類の水平細胞の位相差顕微鏡写真である。錐体水平細胞と桿体水平細胞は細胞体の形と大きさの違いから、容易に識別できる。スケールは50 μmである。

膜電流は Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) に内蔵した4次ベッセルフィルター (2 KHz) を経由後 A/D コンバーター (ITC-16, HEKA Instruments Inc.) 介して 10 KHz でデジタル化し、マッキントッシュコンピューター (MacOS X [10.2]) 内臓のハードディスクに保存した。水平細胞の膜電位の制御 (膜電位固定ならびに鋸波状膜電位変化) ならびにデータ獲得・分析には、Patchmaster (HEKA Instruments Inc.) を使用した。各種薬剤投与前の電流-電圧関係を調べるため、単離水平細胞に鋸波状の膜電位変化 ($-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒) を与え、惹起された膜電流変化を記録・保存した。水平細胞を $+35$ mV あるいは -45 mV に膜電位固定し、各種のアミノ酸の投与によって惹起される膜電流変化を記録・保存した。また、GABA 電流およびグリシン電流の電流-電圧関係を調べるため、水平細胞を -75 mV あるいは -65 mV から $+55$ mV までの間の複数の膜電位に固定し、それぞれの膜電位で惹起される膜電流を膜電位に対してプロットした。保存した膜電流の解析には、Igor Ver. 5.0 (Wavemetrics Inc.) を用いた。

本実験では水平細胞に発現するカリウムチャネルの活性を抑えるため、NaCl の代わりに 10 mM 塩化セシウム (CsCl) と 10 mM 塩化テトラエチルアンモニウム (Tetraethylanmonium-Cl; TEA-Cl) を加えた標準リンガー液を作製し、Y-tube を通じて灌流した。アメリカ

ナマズの標準リンガー液の組成は、100.0 mM NaCl, 10 mM CsCl, 10 mM TEA-Cl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。この標準リンガー液はカリウムチャネル阻害剤を含むので、カリウム電流は概ね抑制されるが、これ以外のイオンチャネルを介する電流は健在であった（例えば、L 型カルシウムチャネル）。L-グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid: GABA) そしてグリシンは浸透圧変化を考慮せず、リンガー液に単純に添加し Y-tube で投与した。何れのリンガー液にも 0.1 mg/ml BSA を加え、そして 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。

本実験ではカリウムイオンチャネルの活性化を抑制するため、電流記録電極に充填する電極内液の KCl を CsCl に置換し用いた。電極内液の組成は 120.0 mM CsCl, 1.0 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM EGTA, 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate (ATP), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate (GTP), 10 mM HEPES であった。この電極内液は、1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH 7.2 に調整し用いた。

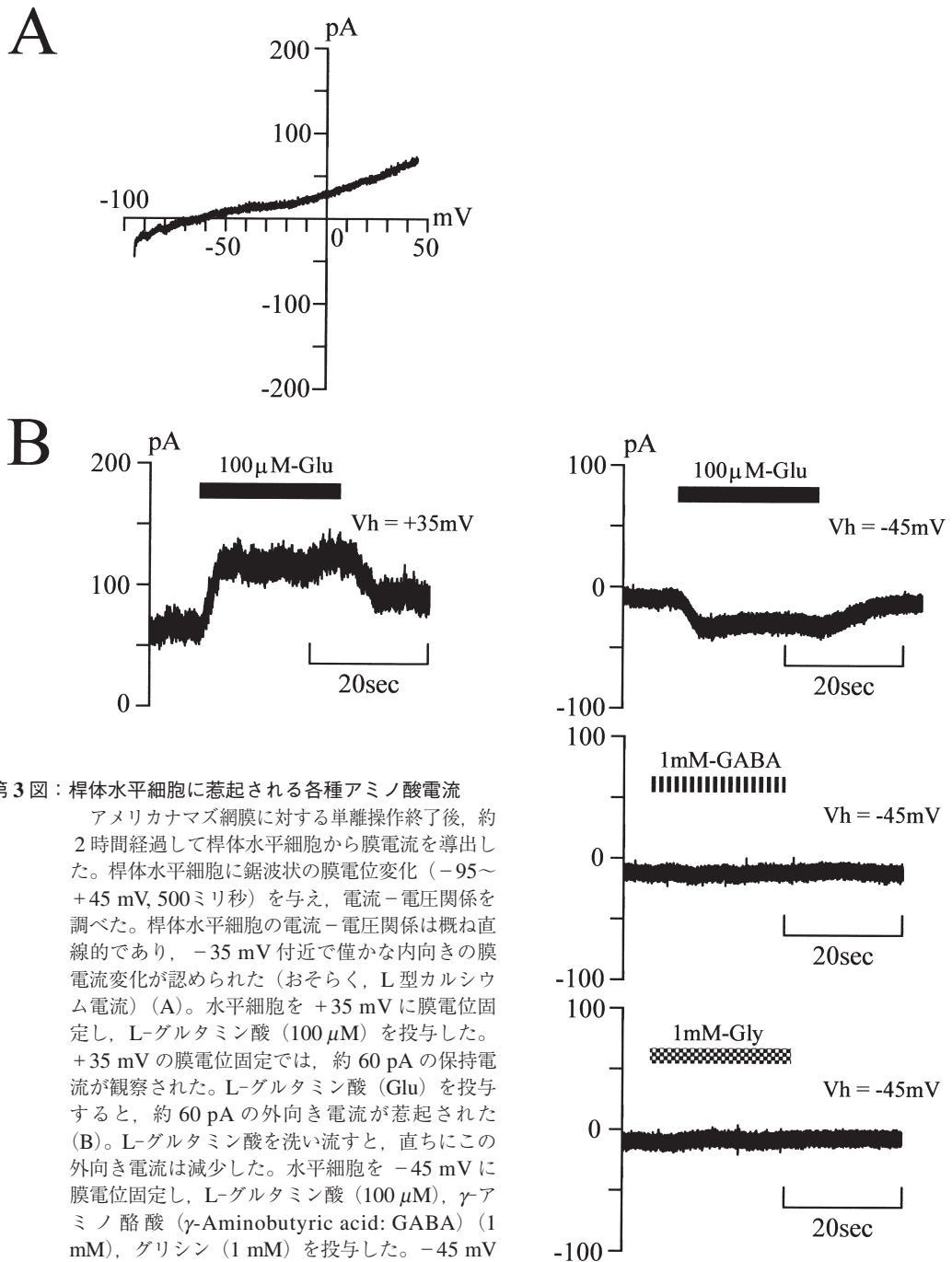
薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。また、Papain は Worthington Biochemical Co., 2,5-Dimethyl-4-[2-(phenylmethyl)benzoyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid methyl ester (FPL64176) は Tocris Bioscience から購入した。

実験結果

各種アミノ酸に対する桿体水平細胞の膜電流応答

アメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了し約 2 時間経過後、桿体水平細胞から膜電流を導出した。桿体水平細胞に鋸波状の膜電位変化 ($-95 \sim +45$ mV, 500 ミリ秒) を与えると、概ね直線的な電流-電圧関係が観察された (第 3 図 A)。ただし、 -35 mV 付近で僅かな内向きの膜電流変化が認められた (おそらく、L 型カルシウム電流)。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定し、L-グルタミン酸 (Glu) ($100 \mu\text{M}$) を投与した。 $+35$ mV の膜電位固定では、約 60 pA の保持電流が観察された。L-グルタミン酸の投与に伴い約 60 pA の外向き電流が惹起された (第 3 図 B 左図)。L-グルタミン酸を洗い流すと、直ぐに外向き電流は消失した。次に、水平細胞を -45 mV に膜電位固定し、L-グルタミン酸 ($100 \mu\text{M}$)、 γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid: GABA) (1 mM) そしてグリシン (Gly) (1 mM) を投与した。 -45 mV に膜電位固定すると、約 -10 pA の保持電流が観察された。L-グルタミン酸投与に伴い約 30 pA の内向き電流が惹起されたが、高濃度の GABA とグリシンの投与では膜電流に変化は見られなかった (第 3 図 B 右図)。

単離後約 2 時間以内に 7 個の桿体水平細胞から膜電流を導出し、上記と同様のアミノ酸投



第3図：桿体水平細胞に惹起される各種アミノ酸電流

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後、約2時間経過して桿体水平細胞から膜電流を導出した。桿体水平細胞に鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を与え、電流-電圧関係を調べた。桿体水平細胞の電流-電圧関係は概ね直線的であり、 -35 mV 付近で僅かな内向きの膜電流変化が認められた（おそらく、L型カルシウム電流）（A）。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定し、L-グルタミン酸（ 100μ M）を投与した。 $+35$ mV の膜電位固定では、約 60 pA の保持電流が観察された。L-グルタミン酸（Glu）を投与すると、約 60 pA の外向き電流が惹起された（B）。L-グルタミン酸を洗い流すと、直ちにこの外向き電流は減少した。水平細胞を -45 mV に膜電位固定し、L-グルタミン酸（ 100μ M）、 γ -アミノ酪酸（ γ -Aminobutyric acid: GABA）（ 1 mM）、グリシン（ 1 mM）を投与した。 -45 mV に膜電位を固定すると、約 -10 pA の保持電流が観察された。L-グルタミン酸投与は約 30 pA の内向き電流を惹起したが、GABA およびグリシン投与は膜電流変化を惹起しなかった（B）。

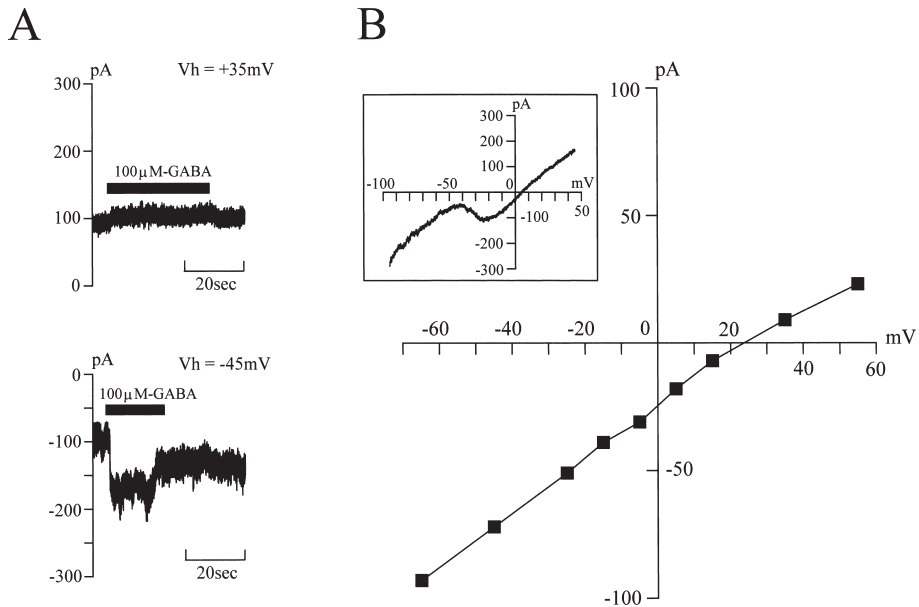
と実験を実施した。しかし、水平細胞を何れの膜電位 (-45 mV あるいは $+35\text{ mV}$) に固定しても、L-グルタミン酸以外のアミノ酸 (GABA とグリシン) が膜電流変化を惹起することとはなかった。

以上の結果は、桿体水平細胞にグルタミン酸受容体は発現しているが、GABA およびグリシン受容体は発現していないことを示唆している。

GABA に対する錐体水平細胞の膜電流応答

アメリカナマズ網膜の錐体水平細胞には、GABA_C 受容体そして起電性 GABA トランスポーターが発現している (Qian & Dowling, 1993; Dong *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1995a, b)。これまでの研究によって、GABA_C 受容体の活性化によって塩化物イオン (Cl^-) チャネルが開くこと、そして起電性 GABA トランスポーターの活性化によってナトリウムイオン (Na^+) と Cl^- が細胞膜を挟んで移動すること、さらに起電性 GABA トランスポーター由来の膜電流は逆転しないことが明らかとなっている (Takahashi *et al.*, 1995a, b)。

アメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了し約 2 時間経過後、錐体水平細胞から膜電流を導出した。錐体水平細胞に鋸波状の膜電位変化 ($-95 \sim +45\text{ mV}$, 500 ミリ秒) を与えると、 -40 mV 付近で活性化し、そして -20 mV 付近でピークを持つ内向き電流が出現した (第 4 図 B 挿入)。この電流は L 型カルシウムチャネル阻害剤であるコバルトイオン (Co^{2+} ; $500\text{ }\mu\text{M}$) と Nifedipine ($10\text{ }\mu\text{M}$) により抑制され、そして L 型カルシウムチャネル活性化剤である 2,5-Dimethyl-4-[2-(phenylmethyl)benzoyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid methyl ester (FPL64176; $2\text{ }\mu\text{M}$) により増加した (図は省略)。阻害剤ならびに活性化剤の投与実験は、錐体水平細胞に L 型カルシウムチャネルが発現し、本実験条件下でこのチャネルの活性化に伴う膜電流が惹起されたことを示している。錐体水平細胞を $+35\text{ mV}$ に膜電位固定し、GABA ($100\text{ }\mu\text{M}$) を投与した。 $+35\text{ mV}$ の膜電位固定では、 100 pA 程度の保持電流が観察された。GABA 投与に伴い約 10 pA の微弱な外向き電流が惹起された (第 4 図 A)。次に、錐体水平細胞の膜電位を -45 mV に固定し、GABA ($100\text{ }\mu\text{M}$) を投与した。膜電位を -45 mV に固定すると、 -100 pA 程度の保持電流が観察された。GABA を投与すると、約 70 pA の内向き電流が惹起された。GABA 電流は GABA 投与中僅かに減衰し、GABA を洗い流すと速やかに回復した。錐体水平細胞を -65 mV から $+55\text{ mV}$ までの間の複数の膜電位に固定し、それぞれの膜電位で惹起される GABA 電流を膜電位に対してプロットし、電流-電圧関係を調べた (第 4 図 B)。GABA 電流は概ね直線的な電流-電圧関係を示し、 $+25\text{ mV}$ 付近で逆転した (第 4 図 B)。ただし、逆転電位よりも正側の膜電位において、GABA 電流は直線関係から外れ僅かに減少した。本実験で用いた細胞内液と細胞外液の Cl^- 濃度から計算される平衡電位 (E_{Cl}) は -1.5 mV であり、第 4 図 B の実験で得られた GABA 電流の逆転



第4図：錐体水平細胞に惹起される GABA 電流

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後、約2時間経過して錐体水平細胞から膜電流を導出した。錐体水平細胞に鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を与えると、 -40 mV 付近で活性化し、そして -20 mV 付近でピークとなる L 型カルシウム電流が出現した（挿入図）。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定し、 γ -アミノ酪酸（ γ -Aminobutyric acid: GABA）（ $100 \mu\text{M}$ ）を投与した。 $+35$ mV の膜電位固定では、 100 pA 程度の保持電流が観察された。GABA 投与に伴い約 10 pA の微かな外向き電流が惹起された（A 上図）。GABA を洗い流すと、元のレベルに回復した。次に、水平細胞を -45 mV に膜電位固定し、同濃度の GABA を投与した。膜電位を -45 mV に固定すると、 -100 pA 程度の保持電流が観察された。GABA を投与すると、約 70 pA の内向き電流が惹起された（A 下図）。GABA を除去すると、速やかに元の膜電流レベルに回復した。錐体水平細胞を -65 mV から $+55$ mV までの間の複数の電位レベルに膜電位固定し、それぞれの膜電位で惹起された GABA 電流を膜電位に対してプロットした（B）。GABA 電流は概ね直線的な電流-電圧関係を示し、 $+25$ mV 付近で逆転した。逆転電位よりも正側の膜電位において、GABA 電流は直線関係から外れ、若干減少した。

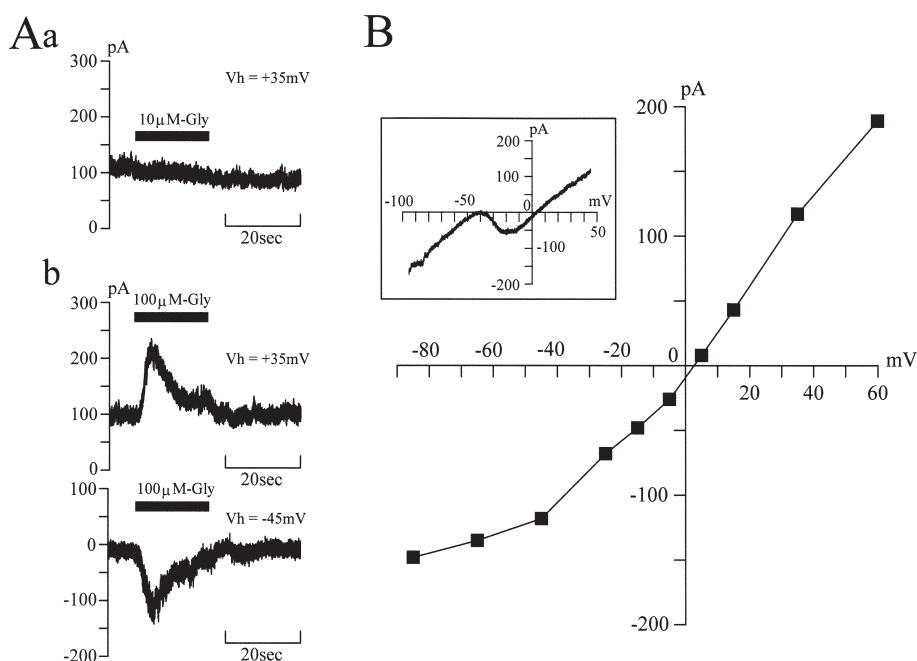
電位は E_{Cl} よりもかなり正側にあった。おそらく、GABA 投与に伴い GABA_C 受容体に加えて起電性 GABA トランスポーターが活性化したため、このトランスポーター電流（ Na^+ と Cl^- が関与）によって GABA 電流の逆転電位が E_{Cl} より正側に牽引されたと推測される。

単離後2時間以内に13個の錐体水平細胞から膜電流を導出し、GABA 電流発生の有無を調べた結果、総ての水平細胞に GABA 感受性が認められた。また、4 個の錐体水平細胞において GABA 電流の逆転電位を測定したところ、何れも E_{Cl} より相当正側にあった。

以上の結果は、錐体水平細胞に GABA 受容体と GABA トランスポーターが発現していることを報じたこれまでの研究を支持している。

グリシンに対する錐体水平細胞の膜電流応答

アメリカナマズ網膜に対する単離操作が終了し約2時間経過後、錐体水平細胞から膜電流を導出した。錐体水平細胞に鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を与えると、 -40 mV 付近で活性化し、 -20 mV 付近にピークを持つL型カルシウム電流が出現した（第5図B挿入）。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定し、グリシン（ $10 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ ）を投与した（第5図Aa と Ab）。膜電位を $+35$ mV に固定すると、 110 pA 程の保持電流が



第5図：錐体水平細胞に惹起されるグリシン電流

アメリカナマズ網膜に対する単離操作終了後、約2時間経過して錐体水平細胞から膜電流を導出した。錐体水平細胞に鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を与えると、 -40 mV 付近で活性化し、そして -20 mV 付近でピークとなるL型カルシウム電流が出現した（挿入図）。水平細胞を $+35$ mV に膜電位固定し、グリシン（ $10 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ ）を投与した。 $+35$ mV の膜電位固定では、 100 pA 程度の保持電流が観察された。錐体水平細胞に $10 \mu\text{M}$ のグリシンを投与したが、膜電流に変化は認められなかった（Aa）。10倍濃度のグリシン（ $100 \mu\text{M}$ ）を投与すると、一過性の外向き電流が惹起された（Ab 上図）。次に、水平細胞を -45 mV の膜電位固定し、同濃度のグリシン投与の影響を調べた。膜電位を -45 mV に固定すると、 -10 pA 程度の保持電流が観察された。グリシン（ $100 \mu\text{M}$ ）投与は、錐体水平細胞に一過性の内向き電流を惹起した（Ab 下図）。水平細胞を $+35$ mV と -45 mV の何れの膜電位に固定しても、水平細胞に発生するグリシン電流は一過性であった。ただし、グリシン投与中、一過性膜電流の減衰後、定常的で微弱な膜電流が残存した。錐体水平細胞を -75 mV から $+55$ mV までの間の複数の電位レベルに膜電位固定し、それぞれの膜電位で惹起されたグリシン電流を膜電位に対してプロットした（B）。グリシン電流の電流-電圧関係は概ね直線的であったが、 -40 mV より負の膜電位で膜電流が減少した。グリシン電流の逆転電位は、 $+3$ mV 付近にあった。

観察された。10 μM のグリシンを投与したが、膜電流に変化は認められなかった（第 5 図 Aa）。グリシン濃度を10倍にして投与すると、一過性の外向き電流が惹起された（第 5 図 Ab 上段）。次に、水平細胞の膜電位を -45 mV に変更して固定すると、 -10 pA 程度の保持電流が観察された。グリシン（100 μM ）を投与すると、一過性の内向き電流が惹起された（第 5 図 Ab 下段）。何れの膜電位で発生したグリシン電流も、グリシン投与後10秒程で速やかに減弱し、微弱で定常的な応答へと移行した。錐体水平細胞を -75 mV から $+55\text{ mV}$ までの間の複数の電位レベルに膜電位固定し、それぞれの膜電位で惹起されるグリシン電流（一過性膜電流応答のピーク値）を膜電位に対してプロットし、電流-電圧関係を調べた（第 5 図 B）。グリシン電流の電流-電圧関係は概ね直線的であるが、 -40 mV より負の電位において膜電流は減少した。グリシン電流の逆転電位は $+3\text{ mV}$ にあり、 Cl^- の平衡電位 ($E_{\text{Cl}} = -1.5\text{ mV}$) に極めて近かった。

単離後 2 時間以内に11個の錐体水平細胞から膜電流を導出し、グリシン（100 μM ）電流発生の有無を調べた結果、6 個の細胞に一過性グリシン電流が惹起された。何れの細胞もグリシン電流の逆転電位は $0\sim 5\text{ mV}$ にあった。また、10 μM のグリシン投与で膜電流変化は全く認められなかった。

以上の結果は、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞にグリシン受容体が発現していることを強く示唆している。

考 察

脊椎動物中枢神経系の抑制性神経伝達物質：グリシン

γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid: GABA) とグリシンは、脊椎動物の中枢神経系における代表的な抑制性神経伝達物質である。シナプス前神経細胞の終末から放出されたこれらのアミノ酸はシナプス後神経細胞に発現するそれぞれの受容体に結合し、イオンチャネルを直接的（イオンチャネル直結型受容体の活性化）あるいはセカンドメッセンジャーを介してイオンチャネルを間接的（代謝調節型受容体の活性化）に開口し、シナプス後神経細胞に膜電位変化を惹起する。これまでの研究により、グリシン受容体、 GABA_A 受容体ならびに GABA_C 受容体はイオンチャネル直結型受容体、そして GABA_B 受容体は G タンパク質と連結した代謝調節型受容体であることが明らかとなっている (Johnston *et al.*, 1975; Drew *et al.*, 1984; Bormann *et al.*, 1987; Bormann, 1988; Bowery, 1989; MacDonald & Olsen, 1994; Semyanov, 2002)。 GABA_A 受容体ではベンゾジアゼピンやバルビツール酸が、また GABA_C 受容体ではカルシウムイオン (Ca^{2+}) や亜鉛イオン (Zn^{2+}) が、それぞれの受容体で機能修飾因子として働くことが知られている (Pritchett *et al.*, 1989; Schonrock & Bormann, 1993;

Dong & Werblin, 1995; Johnston, 1996; Kaneda *et al.*, 1997)。これらの抑制性アミノ酸受容体については生理学および薬理学的研究に加え、分子生物学的研究が盛んに行われ、受容体を構成するタンパク質の種類（サブユニットの種類）およびこれらタンパク質を構成するアミノ酸組成やその配列などが解明されている。例えば、グリシン受容体は $\alpha_1 \sim \alpha_4$ と β のサブユニットにより、GABA_A受容体では $\alpha_1 \sim \alpha_6$, $\beta_1 \sim \beta_4$, $\gamma_1 \sim \gamma_3$, δ_1 , ϵ_1 , π , θ のサブユニットにより、GABA_B受容体ではGABA_{B1(a)} \sim GABA_{B1(g)}とGABA_{B2}のサブユニットにより、またGABA_C受容体では $\rho_1 \sim \rho_3$ サブユニットにより構成されている（例えば、Jentsch *et al.*, 2001; Legendre *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002; Semyanov, 2002）。中枢神経系では効率の良いシナプス伝達を実現するため、最適なサブユニットの組み合わせで各受容体が構成されていると推測される。当然、サブユニットの組み合わせ如何によっては、受容体の生理学および薬理学的性質（脱感作の程度、アゴニストやアンタゴニストに対する感受性など）に差が現れることが予想される。

脊椎動物網膜において、GABAは水平細胞やアマクリン細胞から、またグリシンはアマクリン細胞、IP細胞ならびに双極細胞（サルおよびヒト網膜の双極細胞の一部）から放出されていることが明らかとなっている（Yazulla, 1986; Massey & Redburn, 1987; Schwartz, 1987; Marc, 1989; Poucho & Goebel, 1990; Davanger *et al.*, 1991; Crooks & Kolb, 1992; Grünert & Wässle, 1993; Greferath *et al.*, 1994; Sassoè-Pognetto *et al.*, 1994; Enz *et al.*, 1996; Kalloniatis & Tomisich, 1998）。脳と同様に、網膜でもこれらのアミノ酸は抑制性神経伝達物質として機能し、それぞれの受容体の活性化が視覚情報の時間的・空間的処理に深く関与していることが知られている（例えば、Yazulla, 1986; Massey & Redburn, 1987; Marc, 1989; Poucho & Goebel, 1990）。ただし、水平細胞では細胞内のCl⁻濃度が高いため、グリシンやGABAはこの細胞を過分極（抑制性膜電位応答）するのではなく、むしろ脱分極（興奮性膜電位応答）する可能性が高く、抑制性神経伝達物質としての機能を有していないと考えられている（Miller & Dacheux, 1983; Takahashi *et al.*, 1995a）。

魚類網膜水平細胞に対するグリシンの作用

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞にグリシンを投与すると、一過性の膜電流応答が惹起された（第5図）。このような一過性の膜電流応答（速やかな減衰過程を持つ膜電流変化）は、脱感作として知られている（例えば、Han *et al.*, 1997; Han & Slaughter, 1998; Hou *et al.*, 2008）。錐体水平細胞に対しグリシンを長時間投与すると、膜電流は10秒程で減衰（一過性）し、その後定常的且つ微弱な応答へと移行した。グリシン濃度を上げると、一過性のみならず定常的な膜電流も増加した（図は省略）。また、グリシン電流（第5図）とGABA電流（第4図）とを比較すると、膜電流応答の時間経過、電流－電圧関係そ

して逆転電位において顕著な違いが認められた。薬理学的実験は未だ実施していないが、本研究はアメリカナマズ網膜の錐体水平細胞にグリシン受容体が発現していることを強く示唆している。

Murakami *et al.* (1972) はグリシン投与によってコイ（魚類）網膜錐体水平細胞に持続性の過分極応答、そして Negishi & Drujan (1979) はグリシン投与によってシマクロサギ（魚類）網膜錐体水平細胞に持続性の脱分極応答が惹起されることを報じた。グリシン電流の逆転電位 (Cl^- の平衡電位) が暗時の膜電位よりも脱分極側 (Miller & Dacheux, 1983; Takahashi, *et al.*, 1995a, b) にあることを考慮すると、Negishi & Drujan (1979) の脱分極応答は錐体水平細胞に対するグリシンの直接作用、そして Murakami *et al.* (1972) の過分極応答は錐体水平細胞に対するグリシンの間接作用（他の神経細胞を介する影響）によると推測される。しかし、これまでの知見に基づき、網膜内に存在する水平細胞に対するグリシンの直接的あるいは間接的な作用、そして網膜内に存在する水平細胞に一過性のグリシン応答が発生しない理由を説明することは難しい。魚類網膜外網状層でのグリシンの機能を解明するため、今後網膜内に存在する水平細胞に対するグリシンの作用を詳細に調べる必要がある。

Tachibana & Okada (1991) はアメリカナマズ網膜から単離・培養した錐体水平細胞を用いた研究において、GABA は錐体水平細胞に膜電流応答を惹起するも、グリシンは無効であることを報じた。本研究では、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に GABA 感受性が認められること（第 4 図）、そしてグリシン感受性が約半数に認められること（第 5 図）、さらには桿体水平細胞に対し GABA もグリシンも無効であること（第 3 図）を明らかにした。Tachibana & Okada (1991) と本研究とで同じ動物種を実験材料として使用しているにもかかわらず、グリシン感受性に違いが認められた。この理由については不明であるが、実験に使用した個体の体長（Tachibana & Okada: 12~17 cm; 本研究: 35~45 cm）が両研究で大きく異なっており、これがグリシン感受性の違いを生んだ可能性がある。今後、動物の成長とグリシン受容体の発現の関係、グリシン感受性が錐体水平細胞の約半数にしか現れなかった理由そしてグリシン受容体の生理学および薬理学的性質などを網膜から単離・培養した水平細胞を用いて解析する必要がある。

脊椎動物網膜第 6 番目の神経細胞：Interplexiform 細胞

脊椎動物網膜には 5 種類の神経細胞が存在している。視細胞（錐体と桿体）は光受容機能を、他の 4 種類の神経細胞（双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞そして神経節細胞）は情報処理（特徴抽出）機能を担っている。これら以外に、第 6 番目の網膜内神経細胞として IP 細胞が報告されている（第 1 図参照）。近年、この IP 細胞は多くの動物で確認され、その機能解析が始まっている。IP 細胞は外網状層と内網状層の両層に神経突起を伸展しているた

め、重要な役割を演じていると考えられており、1980年代後半から1990年前半にかけて下等脊椎動物網膜の IP 細胞を対象に盛んに研究が行われた。

これまでの研究によって、魚類網膜ではドーパミン作動性 IP 細胞そして両生類網膜ではグリシン作動性 IP 細胞が水平細胞の機能を修飾することが明らかとなっている (Lasater & Dowling, 1985; Mangel & Dowling, 1985, 1987; Wu & Maple, 1998; Shen, 2005)。魚類網膜の錐体水平細胞に発現するドーパミン受容体が活性化すると、水平細胞間のギャップ結合の電気抵抗が増し、結果として水平細胞の受容野サイズが減少することが知られている (Lasater & Dowling, 1985; Miyachi & Murakami, 1991)。また、両生類網膜では、グリシンが水平細胞に対する桿体と錐体の入力バランスを調整していること、そしてグリシンがグルタミン酸受容体の活性を調整していることが報じられている (Witkovsky & Stone, 1987; Shen, 2005)。

下等脊椎動物網膜を中心にしてドーパミン作動性あるいはグリシン作動性 IP 細胞のシナプス連絡や機能が調べられてきたが、その成果は不十分であり、結果として IP 細胞が第 6 番目の網膜内神経細胞としての地位を確立するには至っていない。今後、哺乳動物を含む多くの動物種において、IP 細胞が視覚情報処理にどのように関わっているのかを解明することが望まれる。まずは、IP 細胞に関する研究が他の動物種よりも先行している魚類網膜において、ドーパミン作動性およびグリシン作動性 IP 細胞のシナプス連絡とこれらの機能、さらにドーパミン作動性ならびにグリシン作動性以外の IP 細胞が存在するのか否か、そして存在するのであればこれらの IP 細胞はどのような機能を有しているのかなど、を明らかにすることが急務であろう。

謝 辞

筆者は広島修道大学派遣研究制度を活用し、平成22年4月から平成23年3月までの1年間米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部眼科学教室において「脊椎動物網膜外網状層におけるシナプス連絡の神経生物学的研究」を実施した。本稿は、その研究の一部である。カリフォルニア大学サンフランシスコ校での研究実施に際し、実験室ならびに研究機器・器具・薬品類の使用を許可して下さった眼科学教室教授 David R. Copenhagen 博士に深甚なる感謝の意を表する。

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.
Borges, S. and Wilson, M. (1991), Dual effect of glycine horizontal cells of the tiger salamander retina, *J.*

- Neurophysiol., **66**: 1993–2001.
- Bormann, J. (1988), Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes, Trends Neurosci., **11**: 112–116.
- Bormann, J., Hamill, O. P. and Sakmann, B. (1987), Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons, J. Physiol., **385**: 243–286.
- Bowery, N. (1989), GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology, Trends Pharmacol. Sci., **10**: 401–407.
- 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., **281**: 125–137.
- 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.
- Crooks, J. and Kolb, H. (1992), Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine droxylase in the human retina, J. Comp. Neurol., **315** : 287–302.
- Davanger, S., Ottersen, O. P. and Storm-Mathisen, J. (1991), Glutamate, GABA and glycine in the human retina: An immunocytochemical investigation, J. Comp. Neurol., **311**: 483–494.
- 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.
- Dong, C.-J. and Werblin, F. S. (1995), Zinc downmodulates the GABA_C receptor current in cone horizontal cells acutely isolated from the catfish retina, J. Neurophysiol., **71**: 916–919.
- Dong, C.-J., Picayd, S. A. and Werblin, F. S. (1994), GABA transporters and GABA_C-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells, J. Neurosci., **14**: 2648–2658.
- Drew, C. A., Johnston, G. A. R. and Weatherby, R. P. (1984), Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes, Neurosci. Lett., **52**: 317–321.
- Enz, R., Brandstätter, H., Wässle, H. and Bormann, J. (1996), Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina, J. Neurosci., **16**: 4479–4490.
- Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of On and Off pathways to ganglion cells in carotid retina, Science, **198**: 1267–1269.
- Gallego, A. (1971), Horizontal and amacrine cells in mammal's retina, Vision Res., **3** (Suppl): 33–50.
- Gilbertson, T. A., Borges, S. and Wilson, M. (1991), The effects of glycine and GABA on isolated horizontal cells from salamander retina, J. Neurophysiol., **66**: 2002–2013.
- Greferath, U., Brandstatter, J. H., Wässle, H., Kirsch, J., Kuhse, J. and Grünert, U. (1994), Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: A study using immunocytochemistry and *in situ* hybridization, Vis. Neurosci., **11**: 721–729.
- Grünert, U. and Wässle, H. (1993), Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina, J. Comp. Neurol., **335**: 523–537.
- 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.
- Han, Y. and Slaughter, M. M. (1998), Protein kinases modulate two glycine currents in salamander retinal ganglion cells, J. Physiol., **508**: 681–690.
- Han, Y., Zhang, J. and Slaughter, M. M. (1997), Partition of transient and sustained inhibitory glycinergic input to retinal ganglion cells, J. Neurosci., **17**: 3392–3400.
- Hashimoto, Y. and Inokuchi, M. (1980), Identification of the interplexiform cell in the dace retina by dye-injection method, Brain Res., **197**: 331–340.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, Nature, **317**: 61–64.
- Hou, M., Duan, L. and Slaughter, M. M. (2008), Synaptic inhibition by glucine acting at a metabotropic recep-

- tor in tiger salamander retina, *J. Physiol.*, **586**: 2913–2926.
- 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.
- Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F. and Adebik, A. A. (2001), Molecular structure and physiological function of chloride channels, *Physiol. Rev.*, **82**: 503–568.
- Johnston, G. A. (1996), GABA_A receptor pharmacology, *Pharmacol. Ther.*, **69**: 173–198.
- Johnston, G. A. R., Curtis, D. R., Beart, P. M., Game, C. J. A., McCulloch, R. M. and Twitchin, B. (1975), Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation, *J. Neurochem.*, **24**: 157–160.
- Kaneda, M., Mochizuki, M., Aoki, K. and Kaneko, A. (1997), Modulation of GABA_C response by Ca²⁺ and other divalent cations in horizontal cells of the catfish retina, *J. Gen. Physiol.*, **110**: 741–747.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol.*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol.*, **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 Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1986), Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina, *J. Physiol.*, **373**: 443–461.
- 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.
- Kollonitsis, M. and Marc, R. E. (1990), Interplexiform cells of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **297**: 340–358.
- Kollonitsis, M. and Tomisich, G. (1998), Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina, *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**: 811–866.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1985), Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured horizontal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 3025–3029.
- Legendre, P., Muller, E., Badiu, C. I., Meier, J., Vannier, C. and Triller, A. (2002), Desensitization of homomeric $\alpha 1$ glycine receptor increases with receptor density, *Mol. Pharmacol.*, **62**: 817–827.
- Lewis, T. M., Schofield, P. R. and McClellan, M. L. (2002), Kinetic determinants of agonist action at the recombinant human glycine receptor, *J. Physiol.*, **549**: 361–374.
- MacDonald, R. I. and Olsen, R. W. (1994), GABA_A receptor channels, *Ann. Rev. Neurosci.*, **17**: 569–602.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1985), Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine, *Science*, **229**: 1107–1109.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1987), The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: effect of dopamine, light stimulation and time in the dark, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **231**: 91–121.
- Marc, R. E. (1989), The role of glycine in the mammalian retina, *Prog. Retin. Res.*, **8**: 67–107.
- Marc, R. E. and Liu, W. L. (1984), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **312**: 266–269.
- Massey, S. C. and Redburn, D. A. (1987), Transmitter circuits in the vertebrate retina, *Prog. Neurobiol.*, **28**: 55–96.

- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol.*, **334**: 325–349.
- Miller, R. F. and Dacheux, R. F. (1983), Intracellular chloride in retinal neurons: measurement and meaning, *Vision Res.*, **23**: 399–411.
- Mills, S. L. and Massey, S. C. (2000), A series of biotinylated tracers distinguishes three types of gap junction in the retina, *J. Neurosci.*, **20**: 8629–8636.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinæ By intracellular injection of cyclic AMP, *J. Physiol.*, **419**: 213–224.
- Murakami, M. and Shimoda, Y. (1977), Identification of amacrine and ganglion cells in the carp retina, *J. Physiol.*, **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.*, **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.*, **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, *Prog. Ret. Eye Res.*, **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.
- Negishi, K. and Drujan, B. D. (1979), Effect of some amino acids on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 351–363.
- 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.
- Poucho, R. G. and Goebel, D. J. (1990), Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine-containing neurons in the retina, In *Glycine Neurotransmission*, ed. Ottersen O. P. & Strom-Marhsen, J., pp 355–389, Wiley, Chichester.
- Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shiver, D. B., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. and Seeburg, P. H. (1989), Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology, *Nature*, **338**: 582–586.
- 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.
- Qian, H. and Dowling, J. E. (1993), Novel GABA responses from rod-driven horizontal cells, *Nature*, **361**: 162–164.
- 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., 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.-I. (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.
- Sassaoè-Pognetto, M., Wässle, H. and Grünert, U. (1994), Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the $\alpha 1$ subunit of the glycine receptor, *J. Neurosci.*, **14**: 5131–5146.
- Schonrock, B. and Bormann, J. (1993), Functional heterogeneity of hippocampal GABA_A receptors, *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 1042–1049.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Semyanov, A. V. (2002), GABA-ergic inhibition in the CNS: Types of GABA receptors and mechanisms of tonic GABA-mediated inhibitory action, *Neurophysiol.*, **34**: 71–80.
- Shen, W. (2005), Repetitive light stimulation inducing glycine receptor plasticity in the retinal neuron, *J. Neurophysiol.*, **94**: 2231–2238.
- 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.
- 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., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Stone, S. and Witkovsky, P. (1984), The action of γ -aminobutyric acid, glycine and their antagonists upon horizontal cells of the *Xenopus* retina, *J. Physiol.*, **353**: 249–264.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acid from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 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.
- 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.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the ON-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- 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. and Stone, S. (1987), GABA and glycine modify the balance of rod and cone inputs to horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Exp. Biol.*, **47**: 13–22.
- 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.
- Wu, S. M. and Maple, B. R. (1998), Amino acid neurotransmitters in the retina: a functional overview, *Vision Res.*, **38**: 1371–1384.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.
- Yazzula, S. (1986), GABAergic mechanism in the retina, *Prog. Retn. Res.*, **5**: 1–52.
- Zhou, Z. J., Gain, G. L. and Dowling, J. E. (1993), The excitatory and inhibitory amino acid receptors on horizontal cells isolated from the white perch retina, *J. Neurophysiol.*, **70**: 8–19.
- Zucker, C. L. and Dowling, J. R. (1987), Centrifugal fiber synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina, *Nature*, **330**: 166–168.