

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に対する L-グルタミンの効果

高橋 恭一

(受付 2012 年 3 月 29 日)

序 論

脊椎動物の中樞神経系において、L-グルタミン酸は窒素代謝、エネルギー代謝やタンパク質合成などの普遍的な生命現象に寄与する物質であると同時に、神経細胞間の情報伝達を担う主要な興奮性神経伝達物質でもある。L-グルタミン酸を神経伝達物質として放出する神経細胞が興奮性入力（脱分極性の膜電位変化）を受け取ると、この興奮は神経終末部にまで伝導し、この部分に発現する電位依存性カルシウムチャネルを活性化させる。この結果、神経細胞終末内部のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度は上昇し、終末内部に配備されているシナプス小胞が形質膜に向かって移動し、形質膜と融合する。融合に伴いシナプス小胞内の L-グルタミン酸は細胞外に放たれる。このような神経伝達物質放出の過程はエキソサイトシスと呼ばれ、膜電位変化から神経伝達物質の放出まで数ミリ秒以内に完了する。シナプス間隙に放出された L-グルタミン酸は、拡散によってシナプス下膜に到達する。

神経細胞の樹状突起（シナプス下膜）には、シナプス前神経細胞から放出された L-グルタミン酸を受容するためのグルタミン酸受容体が発現している。この受容体には、イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体と代謝調節型グルタミン酸受容体の 2 種類が存在する。L-グルタミン酸がイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体に結合すると、この受容体の構造が変化し、陽イオンチャネルが開く。この受容体は生理学および薬理学的な違いから、(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型、Kainic acid (KA) 型そして N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型の 3 種類に分類されている。これら 3 種類の受容体を構成するサブユニットタンパク質は異なっており、これらがアゴニスト認識、脱感作やイオン選択性などを形作っている（例えば、Tomita, 2010; Granger *et al.*, 2011）。一方、代謝調節型グルタミン酸受容体はイオンチャネルを持たず、共役する G タンパク質を介して陽イオンチャネルの開閉を制御している。この受容体は G タンパク質の違いから 3 種類に分類され、それぞれはアゴニスト認識や細胞内のセカンドメッセンジャー系などに違いが認められる（例えば、Niswender & Conn, 2010）。近年、イオンチャネル直結型および代謝調節型グルタミン酸受容体を発現する神経細胞は、学習や記憶をはじめとする脳の高次機能に重

要な役割を演じていることが明らかとなっている（例えば, Reidel *et al.*, 2003）。

神経細胞から放出された L-グルタミン酸は神経細胞外に長時間滞留すると、神経細胞に対して毒性を示すようになる（例えば, Lucas & Newhouse, 1957; Olney, 1969; Choi, 1992, 1994）。この毒性には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を伴う NMDA 型および AMPA 型グルタミン酸受容体の活性化が関与している（例えば, Olney *et al.*, 1989; Sheardown *et al.*, 1990; Lynch & Guttman, 2002）。近年、L-グルタミン酸による毒性はてんかんや脳虚血などの急性の疾患のみならずアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの長い経過を経て発症する神経性疾患の原因としても注目を集めている（例えば, Mark *et al.*, 2001; Foran & Trotti, 2009）。この毒性を避けるため、神経細胞から放出された L-グルタミン酸は放出した神経細胞あるいは周辺に配置された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って細胞内に取り込まれ、細胞外から速やかに除去される。このグルタミン酸トランスポーターは、これらを構成するサブユニットタンパク質の相違から、Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1) (別名, Glutamate-Aspartate Transporter [GLAST]), EAAT2 (別名, Glutamate Transporter 1 [GLT1]), EAAT3 (別名, Excitatory Amino-Acid Carrier 1 [EAAC1]), EAAT4, そして EAAT5 の 5 種類に分類されている（例えば, Danbolt, 2001; Gegelashvili *et al.*, 2001; Benarroch, 2010）。神経細胞あるいはグリア細胞にはこれらのトランスポーターが単独あるいは複数で発現し、細胞外から L-グルタミン酸を積極的に除去している。神経細胞に取り込まれた L-グルタミン酸は、細胞内で小房型グルタミン酸トランスポーター (Vesicular Glutamate transporter [VGLUT]) を介してシナプス小胞内に取り込まれ、再利用されると考えられている（例えば, Islam *et al.*, 2011）。一方、グリア細胞に取り込まれた L-グルタミン酸は、まず細胞内でグルタミン合成酵素によって L-グルタミンに変換され、その後グリア細胞膜に発現するグルタミントランスポーター (System A, System ASC, System L あるいは System N など) によって細胞外に輸送される（例えば, Norenberg & Martinetz-Hernandez, 1979; Bröer & Brookes, 2001; Chaudhry *et al.*, 2002）。この L-グルタミンは、近くの神経細胞に発現するグルタミントランスポーター (System A, System ASC, System L あるいは System N など) を介して細胞内に取り込まれる（例えば, Bröer & Brookes, 2001; Chaudhry *et al.*, 2002）。神経細胞内で、グルタミン酸合成酵素によって L-グルタミンは L-グルタミン酸に変換され、VGLUT を介してシナプス小胞内に取り込まれる。この L-グルタミン酸は、神経細胞の興奮に伴い放出される。グリア細胞を経由する L-グルタミン酸の再生系はグルタミン酸-グルタミンサイクルと呼ばれ、神経細胞への L-グルタミン酸供給の主要経路と考えられている（例えば, Magistretti & Pellerin, 1999; Shen *et al.*, 1999; Bröer & Brookes, 2001）。ところが、最近, Kam & Nicoll (2007) はラットの培養海馬細胞を用いた研究において、短期的にグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能しなくとも、神経細胞の L-グルタ

ミン酸放出に大きな影響が現れないことを示した。さらに、マウス網膜において、桿体が放出した L-グルタミン酸は桿体によって取り込まれ、ミュラー細胞（グリア細胞の一種）の関与は殆どないことが示された (Hasegawa *et al.*, 2006)。これらの研究は、神経細胞に L-グルタミン酸を供給する経路がグルタミン酸-グルタミンサイクル以外にも存在することを強く示唆している。

血漿や脳脊髄液には mM オーダーの L-グルタミンが存在することが知られている (例えば, Lehmann *et al.*, 1983; Lerma *et al.*, 1986)。細胞外に高濃度で存在する L-グルタミンは、神経細胞の興奮性に影響しないのであろうか。あるいは、高濃度の L-グルタミンは神経細胞に毒性を示さないのであろうか。これらを調査するため、いくつかの研究が行われてきた。Sands & Barish (1989) は、アフリカツメガエルの培養脊髄細胞に対する L-グルタミンの作用を調べる研究において、L-グルタミンの効果は L-グルタミンに予期せず混入している L-グルタミン酸によることを見つけ、L-グルタミン使用には特別な注意が必要であることを報告した。同年、Yamada & Rothman (1989) も、ラットの培養海馬細胞への L-グルタミンの作用が L-グルタミンに混入している L-グルタミン酸によることを報じた。この研究の中で、海馬細胞に対して L-グルタミン自体は生理活性や毒性を持たないことを示唆した。これらの研究が示すように、入手可能な L-グルタミンには L-グルタミン酸が混入している可能性があり、神経細胞に対する L-グルタミンの作用を調べることが難しい状況にある。最近、Kolbaev & Draguhn (2008) は、L-グルタミンが L-グルタミン酸を含んでいることを承知した上で、L-グルタミンをラットの培養海馬細胞に投与し、この細胞に発生する膜電流変化が混入する L-グルタミン酸ではなく L-グルタミンによることを報告した。この研究では、L-グルタミンが部分的に NMDA 型グルタミン酸受容体を活性化して膜電流を発生すること、そして L-グルタミンは未知の機序を介して膜電流を発生することを報じている。結論として、細胞外に高濃度で存在する L-グルタミンが培養海馬細胞に発現するグルタミン酸受容体を活性化し、脱分極を引き起こす可能性があることを指摘した。培養状態ではなく、脳内で他の神経細胞とシナプス連絡をしている海馬細胞に対して、血漿や脳脊髄液などに多量に存在する L-グルタミンが脱分極（興奮）を惹起するの可否かは極めて重要な問題であり、喫緊の課題となっている。

脊椎動物網膜は発生学的に脳（間脳）起源の神経組織であり、脳に比べて構造が単純であるため、古くから脳内のシナプス機構を解析するための好個のモデル組織として研究に使われてきた。しかし、両者の構造に著しい差異があることに加え、網膜は光受容機能を持つ感覚器であるという理由から、近年脳のモデル組織としての利用は殆どなくなっている。とはいえ、両者の研究成果が比較・検討されることは多い。網膜においても、L-グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質である (例えば, Thoreson & Witkovsky, 1999; Yang, 2004)。そ

して、眼球内にL-グルタミンが高濃度で存在することも知られている（例えば、Kwon *et al.*, 2005）。しかし、このL-グルタミンが網膜内の神経細胞の活動（興奮性や毒性）に影響するのか否かについては未だ殆ど調べられていない。最近、高橋（2013）はアメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞にL-15 リンガー液（Leibovitz's L-15 Medium を含むリンガー液）を灌流すると、膜電流変化が現れることを見出した。さらに、この膜電流変化がイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体阻害剤の投与で部分的に抑制されること、そしてLeibovitz's L-15 Medium の成分の一つであるL-グルタミンがこのグルタミン酸受容体を活性化する可能性があることを明らかにした。これらの成果を踏まえ、今回、アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞を利用し、L-グルタミンの作用を検討した。

実験材料と方法

アメリカナマズ網膜からの錐体水平細胞の単離

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、網膜から錐体水平細胞を単離し、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 リン酸水素二ナトリウム [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、1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて 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 の単離操作液を用いて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（ピペッティング [機械的単離操作]）した。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) で観察した。水平細胞が複数認められる試験管を残し, これらの試験管の細胞浮遊液を本研究に用いた。細胞浮遊液には樹状突起や軸索を有する細胞に加え, 多数の球体(視細胞, 双極細胞, アマクリン細胞や神経節細胞の細胞体) が認められた。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, これに基づき単離後の網膜細胞を識別することは可能であった(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)。特に, 細胞の大きさと特徴的な形態から, 錐体水平細胞の識別は容易であった。本研究では, 単離操作終了後低温(4°C) 維持して3日以内の細胞浮遊液中に生存する錐体水平細胞を生理実験に用いた。低温維持して3日以内であれば, 単離操作終了直後と概ね同じ振幅のグルタミン酸電流を惹起することが報告されている(高橋, 2012)。

水平細胞の膜電流導出とリンガー液の灌流

ピペットマンを用いて細胞浮遊液を 100 μ l 吸引し, これを倒立型位相差顕微鏡(TMD, Nikon) に装着した記録槽(容量; 455 μ l) に移した後, 水平細胞が記録槽底部(厚さが 0.017 mm のガラス板 [カバーガラス]) に沈むまで10分間程静置し, 正常リンガー液あるいは標準リンガー液を灌流した。記録槽底面のガラス板への水平細胞の接着は弱く剥がれ易いことを考慮し, 本研究では先端口径が比較的大きな Y-tube (直径: 約 250 μ m) を作製し, これを水平細胞から 5~7 mm の距離に置きリンガー液の灌流に利用した。記録槽底部のガラス板に付着した水平細胞が, リンガー液の灌流によって剥がれることは殆どなかった。各種の薬剤投与も, この Y-tube を用いて行った。Y-tube による溶液の灌流速度は 390 μ l/分であった。ただし, この灌流では水平細胞周辺の速やかな溶液灌流と交換(各種薬剤の水平細胞への導入と除去) を保証できず, 脱感作を示す膜電流応答を解析することは困難であった。

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)。膜電流記録用パッチ電極は 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 と1.5%寒天を含む塩橋に接続した銀-塩

化銀電極を用いた。膜電流記録用パッチ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）とデータ獲得には、Patchmaster（HEKA Instruments Inc.）を利用した。

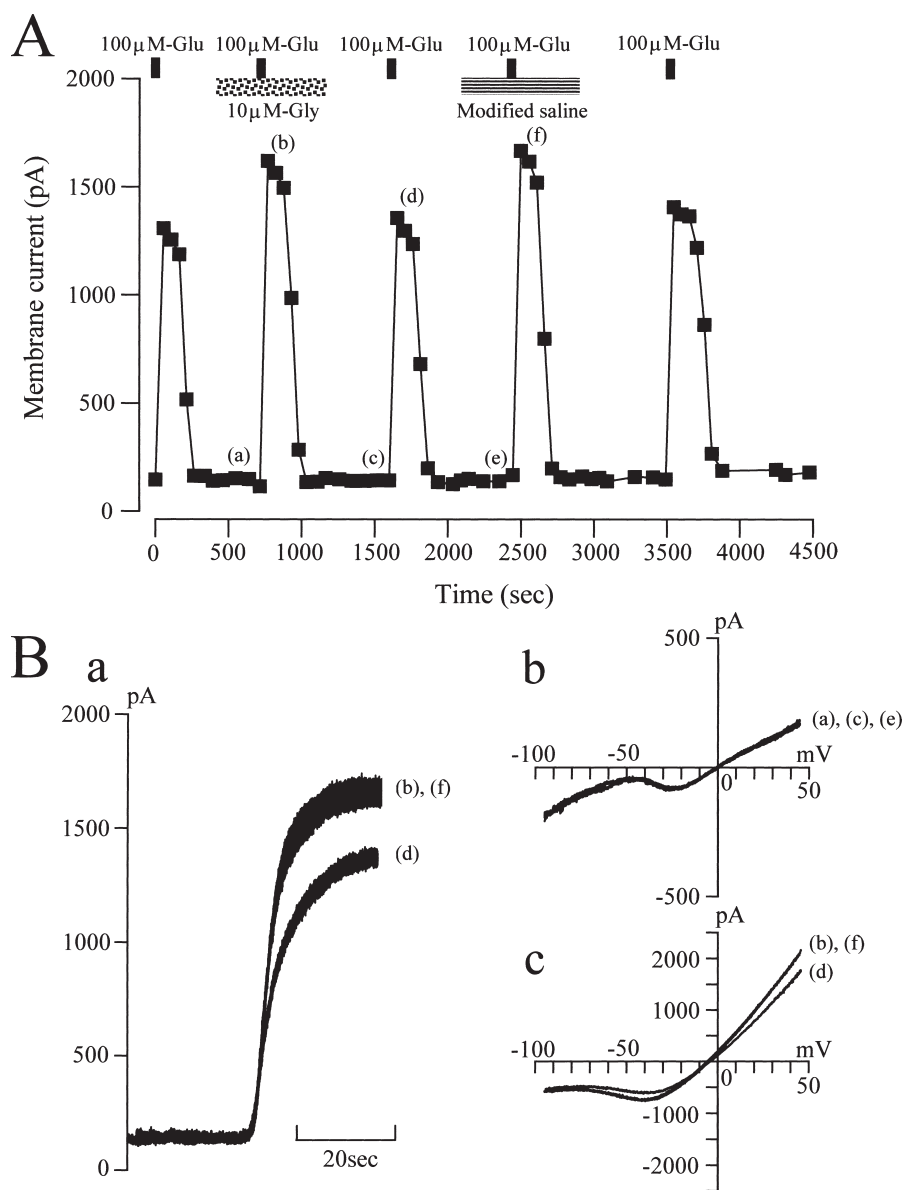
本研究では、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の膜電位を+35 mV（NMDA 型グルタミン酸受容体のマグネシウムイオン $[Mg^{2+}]$ による抑制作用が解除されている膜電位）に固定し、各種リンガー液の灌流や L-グルタミン酸などの投与に伴い発生する膜電流変化を記録・保存した。既述したように、本研究ではリンガー液の灌流が緩やかであり、これに伴いリンガー液の交換や薬剤の投与も緩やかであるため発生する膜電流変化も緩徐であり、結果として長時間の記録・保存を行う必要があった。本研究では、膜電流変化を50秒間記録・保存した。さらに長時間の膜電流記録が必要とき、50秒間の記録・保存を繰り返し複数の膜電流記録を得、これらを繋ぎ合わせた（第3図 A の挿入図参照）。50秒間の膜電流変化をデジタル化してハードディスクに保存する際若干の時間を要するため、膜電流記録間に数秒以内の未記録部分が生じた（第3図 A の挿入図参照）。また、水平細胞の膜電流に変化が認められないとき（例えば、リンガー液を交換しても膜電流に変化が認められないときあるいは薬剤投与に伴い発生した膜電流変化が定常状態に達しているとき）、記録・保存を中断した。20分以上にも亘る長時間の膜電流記録を行うとき、得られた各膜電流記録（50秒間の膜電流記録）の初期電流値を記録時間（膜電流記録を開始した時点を [0] とする）に対してプロットしグラフ化した。このグラフの各プロットは50秒間記録の初期電流値であるため、50秒間記録の途中で膜電流変化が生じた場合、グラフ上にこの変化が反映されることはない。50秒間膜電流記録の途中で生じた変化が生理応答である場合、グラフ化せず、膜電流記録をそのまま使用することにした。このグラフは膜電流の経時的変化を通覧する際大変便利であり、本研究での膜電流変化の表示に用いた（第3図 A 参照）。電流-電圧関係を調べる目的で、50秒間記録の合間に水平細胞に鋸波状の膜電位変化（-95～+45 mV, 500ミリ秒）を与え、発生する膜電流変化（電流-電圧関係）を記録した。水平細胞に対する薬剤投与の影響を調べる際、薬剤投与中の膜電流変化から投与前の膜電流変化を差し引き、イオンチャネル活性に基因する膜電流成分やリーク電流成分を除去した膜電流変化（電流-電圧関係）を求めた。保存した膜電流の解析には、Igor Ver. 5.0（Wavemetrics Inc.）を用いた。

リンガー液とパッチ電極内液の組成

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を灌流する正常リンガー液の組成は、120.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。本研究で採用している膜電位固定 (+35 mV; NMDA 型グルタミン酸受容体の Mg²⁺ による抑制作用が解除されている膜電位) では外向き整流性カリウムチャンネルが活性化する可能性があり、このカリウムチャンネル活性を抑えるため、正常リンガー液の NaCl を 20 mM 減じ、代わりに 10 mM 塩化セシウム (CsCl) と 10 mM Tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl) を加えた標準リンガー液を作製し使用した。

NMDA 型グルタミン酸受容体を構成するサブユニット (タンパク質) にはグリシン結合部位があり、この部位へのグリシンの結合に伴い NMDA 型グルタミン酸受容体の活性が上昇することが知られている (例えば, Johnson & Ascher, 1987; Tachibana & Okada, 1991)。本研究では L-グルタミン酸投与に伴い惹起される膜電流変化を増強する目的で、標準リンガー液にグリシン (10 μM) を添加して灌流した。研究を開始する前に、グリシンが水平細胞に膜電流変化を惹起せず、L-グルタミン酸投与に伴う膜電流変化を増強することを確認するために予備的実験を行った (第 1 図)。アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、正常リンガー液を約 40 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +150 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) を投与すると、水平細胞には 1310 pA 程の外向き電流が発生した (第 1 図)。これを洗い流し、正常リンガー液に 10 μM のグリシン (Gly) を添加して灌流した。水平細胞の膜電流に変化はなく、+140 pA に維持された。グリシンを含む正常リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸を投与すると、1620 pA の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を除去すると、膜電流は +135 pA にまで戻った。正常リンガー液からグリシンを除去し、L-グルタミン酸を投与すると、1355 pA の外向き電流が現れた。これを洗い流すと、膜電流は +135 pA に戻った。次に、標準リンガー液 (10 μM のグリシンを含む) を灌流した。このリンガー液の灌流では、膜電流に変化は認められなかった。標準リンガー液 (10 μM のグリシンを含む) の灌流中、L-グルタミン酸を投与すると、水平細胞には 1665 pA の外向き電流が発生し、これを洗い流すと、膜電流は +140 pA にまで戻った。標準リンガー液 (10 μM のグリシンを含む) を正常リンガー液に戻し、再度 L-グルタミン酸を投与した。1365 pA の外向き電流が発生し、洗い流すと膜電流は +180 pA まで戻った。リンガー液へのグリシンの添加により、100 μM の L-グルタミン酸投与によって発生する膜電流変化は 20~25% 程度増加することが明らかとなった。第 1 図 Ba には、正常リンガー液 (d)、10 μM のグリシンを添加した正常リンガー液 (b) そして 10 μM のグリシンを添加した標準リンガー液 (f) の灌流

中に投与したL-グルタミン酸に対する膜電流応答を重ねて表示した。グリシン添加に伴うグルタミン酸電流の増加は明らかである。第1図Bbには、正常リンガー液灌流中、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、得られた膜電流変化を示した。また、第1図Bcには、グリシン存在下および非存在下で鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を水平細胞に与えた際に得られた膜電流変化を示した。第1図Bcから、グリシンは総ての膜電位（ -70 mVよりも正の膜電位）でグルタミン酸電流を増大させ



ることが明らかとなった。単離操作液, Papain 溶液, 正常リンガー液, そして標準リンガー液などは作製後, 必ず浸透圧を測定した (5500 Vapor Pressure Osmometer, Wescor Inc.)。これらの溶液の浸透圧は, 265~280 mOsm/kg であった。

L-グルタミンには, L-グルタミン酸が混入している可能性がある (Sands & Barish, 1989; Yamada & Rothman, 1989)。この L-グルタミン酸を除去するため, グルタミン溶液をイオン交換樹脂 (Dowex 1 X 8; 100-200 mesh Chloride form) を潜らせた後で使用した。Dowex 樹脂を 50 ml プラスチック製遠心管 (Fisher Scientific Co.) に 15 ml 程加え, 蒸留水で 4 回洗浄し, 蒸留水を捨てた。この遠心管の中に, 100 mM に調整した L-グルタミンを 30 ml 加え, 冷蔵室 (4°C) でレシプロ式振盪器の上で一晩 (約10時間) 振盪した。Dowex 樹脂の水洗後, 蒸留水を完全に抜き取ることは困難であったため, Dowex 樹脂処理後のグルタミン保存液は 100 mM よりも若干低くなっていると推測される。この後, 遠心管 (Dowex 樹脂を含むグルタミン溶液) を遠心分離器 (1500 rpm で10分間) にかけて, 上澄みを微量遠心管 (Fisher Scientific Co.) に 1.5 ml ずつ分注して冷凍保存 (-20°C) した。L-グルタミンを含むリンガー液を灌流する際, 灌流直前に L-グルタミンをリンガー液に加えた。本研究の実施期間中, Dowex 樹脂処理を 3 回実施し, それぞれで得られた L-グルタミン保存液を実験

第 1 図: アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に発生するグルタミン酸電流に対するグリシンの効果

A: アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り, 記録槽に入れ約10分間静置した。その後, 正常リンガー液を約40分間灌流し, 水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると, この細胞には +150 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μ M) を投与すると, 水平細胞には 1310 pA 程の外向き電流が発生した。これを洗い流し, 正常リンガー液に 10 μ M のグリシン (Gly) を添加して灌流した。水平細胞の膜電流に変化はなく, +140 pA に維持された。グリシンを含む正常リンガー液の灌流中, L-グルタミン酸を投与すると, 1620 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を除去すると, 膜電流は +135 pA にまで戻った。正常リンガー液からグリシンを除去し, L-グルタミン酸を投与すると, 1355 pA 程の外向き電流が現れた。これを洗い流すと, 膜電流は +135 pA に戻った。次に, 標準リンガー液 (10 μ M のグリシンを含む) を灌流した。このリンガー液の灌流では, 膜電流に変化は認められなかった。標準リンガー液 (10 μ M のグリシンを含む) の灌流中, L-グルタミン酸を投与すると, 水平細胞には 1665 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を除去すると, 膜電流は +140 pA にまで戻った。標準リンガー液 (10 μ M のグリシンを含む) を正常リンガー液に戻し, 再度 L-グルタミン酸を投与した。1365 pA の外向き電流が発生し, 洗い流すと膜電流は +180 pA にまで戻った。リンガー液へのグリシン (10 μ M) の添加により, グルタミン酸電流は 20~25% 程度増加することが明らかとなった。B: Ba には, 正常リンガー液 (d), 10 μ M のグリシンを添加した正常リンガー液 (b) そして標準リンガー液 (10 μ M のグリシンを含む) (f) の灌流中に投与した L-グルタミン酸に対する膜電流応答を重ねて表示した。Bb には, 正常リンガー液灌流中, 水平細胞に鋸波状の膜電位変化 (-95~+45 mV, 500 ミリ秒) を与え, 得られた膜電流変化を重ねて表示した ((a), (c) と (e))。-40 mV 付近で発生する内向き電流は, L 型カルシウムチャネルの活性化を反映している。リンガー液には 10 mM CsCl と 10 mM TEA-Cl を添加し, またパッチ電極には 120 mM CsCl を充填しているため, 水平細胞にはカリウムチャネルの活性化に伴う膜電流成分は認められなかった。また, Bc には, グリシン存在下および非存在下での鋸波状の膜電位変化 (-95~+45 mV, 500 ミリ秒) を水平細胞に与えた際に得られた膜電流変化を示した ((b), (d) と (f))。Bc から, グリシンは -70 mV よりも正の膜電位で L-グルタミン酸投与に伴う膜電流を増大させることが明らかとなった。

に使用した。質量分析法を用いて、L-グルタミンに混入しているL-グルタミン酸の濃度ならびにDowex樹脂処理後のL-グルタミン酸濃度を推定した。L-グルタミン溶液（1 mM）中に約 2.25 μM のL-グルタミン酸が含まれていた。また、Dowex樹脂処理後のL-グルタミン溶液（約 1 mM）には、約 0.045 μM （1回目）、約 0.275 μM （2回目）そして約 0.34 μM （3回目）のL-グルタミン酸が含まれていた。Dowex樹脂処理した時期により、残存するL-グルタミン酸濃度に違いが認められたが、この理由は不明である。L-グルタミン酸とそのアゴニスト、そしてL-グルタミンは浸透圧の変化を考慮せず、リンガー液に添加し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-NaOHを用いて pH 7.6 に調整し灌流した。

カリウムチャネル活性を抑えるため、リンガー液に CsCl と TEA-Cl を添加することに加え、パッチ電極内液に KCl の代わりに CsCl を用いた。パッチ電極内液の組成は 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。本研究では、総ての実験においてこのパッチ電極内液を用いた。パッチ電極内液の浸透圧は、260~265 mOsm/kg であった。パッチ電極内液は、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-Aldrich Co. から購入した。また、Papain は Worthington Biochemical Co. そして D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) は Tocris Biosciences から購入した。

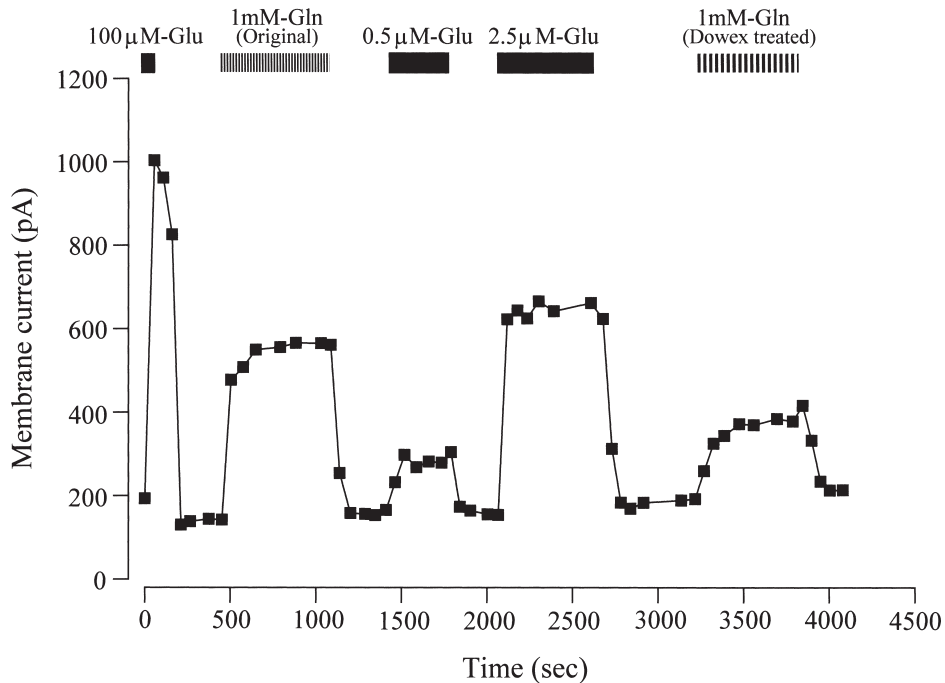
実験結果

アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に対するL-グルタミンの作用

L-グルタミンが水平細胞に膜電流変化を惹起するの否かを調べた（第2図）。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約40分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +200 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) を投与すると、水平細胞には 1000 pA 程の外向き電流が発生した（第2図）。L-グルタミン酸を洗い流すと、数分後に膜電流は +140 pA 付近にまで戻った。L-グルタミン (Gln (Original); 1 mM のL-グルタミンと約 2.25 μM のL-グルタミン酸を含む。) を投与すると、480 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン投与を続けると、外向き電流は緩やかに増加し、約4分後に 565 pA に到達した。L-グルタミンを洗い流し、膜電流が +155 pA に戻った後で、0.5 μM のL-グルタミン

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に対する L-グルタミンの効果

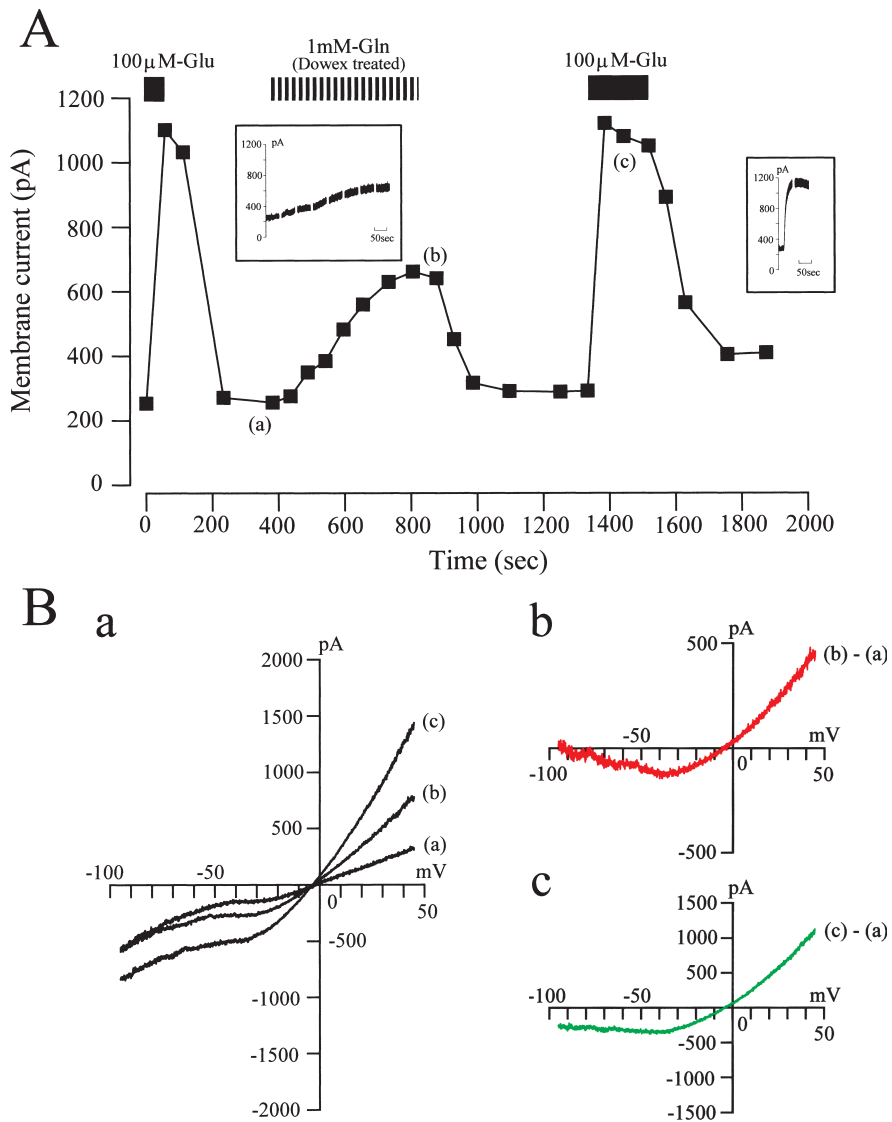


第2図：アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞に対する L-グルタミン酸と L-グルタミンの作用

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約40分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +200 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) を投与すると、水平細胞には 1000 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流すと、数分後に膜電流は +140 pA 付近にまで戻った。L-グルタミン (Gln (Original); 1 mM) を投与すると、480 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン投与を続けると、外向き電流は緩やかに増加し、約 4 分後に 565 pA に到達した。L-グルタミンを洗い流し、膜電流が +155 pA に戻った後で、0.5 μM の L-グルタミン酸を投与した。L-グルタミン酸投与では、約 2 分かけて +300 pA 程に到達した。これを洗い流すと、膜電流は直ぐに元の +155 pA にまで戻った。L-グルタミン酸濃度を 2.5 μM に上げて投与すると、650 pA 程の外向き電流が発生した。これを洗い流して、膜電流が +170 pA 付近に戻った後、Dowex 樹脂処理した L-グルタミン (Gln (Dowex treated); 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.34 μM の L-グルタミン酸を含む。) を投与した。水平細胞には緩やかな外向き電流が現れ、4 分程で 390 pA に到達した。これを洗い流すと、膜電流は +215 pA にまで戻った。

酸を投与した。L-グルタミン酸投与では、約 2 分かけて +300 pA 程に到達した。これを洗い流すと、膜電流は直ぐに元の +155 pA にまで戻った。L-グルタミン酸濃度を 2.5 μM に上げて投与すると、650 pA 程の外向き電流が現れた。これを洗い流して、膜電流が +170 pA 付近に戻った後、Dowex 樹脂処理した L-グルタミン (Gln (Dowex treated); 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.34 μM の L-グルタミン酸を含む。) を投与した。水平細胞には緩やかな時間経過の外向き電流が現れ、約 4 分後に 390 pA に到達した。洗い流すと、膜電流は +215 pA にまで戻った。

L-グルタミン (Gln (Original) ; 1 mM の L-グルタミンと約 2.25 μ M の L-グルタミン酸を含む。) 投与に伴う膜電流変化は, 2.5 μ M の L-グルタミン酸よりも 90 pA 程小さかった。また, Dowex 樹脂処理した L-グルタミン (Gln (Dowex treated) ; 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.34 μ M の L-グルタミン酸を含む。) 投与に伴う膜電流変化は, 0.5 μ M の L-グルタミン酸投与に比べて30%程大きかった。以上の結果は, L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生した膜電流変化が混入する L-グルタミン酸のみならず L-グルタミンン自体による可能性を示している。



L-グルタミン酸と L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の時間経過

L-グルタミン酸ならびに L-グルタミンの投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の時間経過を比較した (第 3 図)。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 30 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +250 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) と L-グルタミン (Gln (Dowex treated); 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.275 μM の L-グルタミン酸を含む。) の投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化を調べた (第 3 図)。L-グルタミン酸 (100 μM) を投与すると、水平細胞には 1100 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流すと、膜電流は +255 pA 程にまで戻った。L-グルタミン (約 1 mM の L-グルタミンと約 0.275 μM の L-グルタミン酸を含む。) を投与すると、水平細胞には極めて緩やかな時間経過の外向き電流が発生し、約 7 分後に 660 pA 程に到達した。これを洗い流すと、膜電流は +280 pA 程まで戻った。再度、L-グルタミン酸を投与したが、前回とほぼ同様の 1120 pA の外向き電流が現れた。ただし、これを洗い流しても、膜電流は +400 pA 付近にまでしか戻らなかった。第 3 図の水平細胞で得られたグルタミン電流は、本研究の他図に見られるグルタミン電

第 3 図 : L-グルタミン酸と L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の時間経過

A : アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μl を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 30 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +250 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン酸 (Glu; 100 μM) を投与すると、水平細胞には 1100 pA 程の外向き電流が発生した。L-グルタミン酸を洗い流して膜電流が +255 pA 程に戻った後、L-グルタミン (Gln (Dowex treated); 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.275 μM の L-グルタミン酸を含む。) を投与した。水平細胞には極めて緩やかな時間経過の外向き電流が発生し、約 7 分後に 660 pA 程に到達した。これを洗い流すと、膜電流は +280 pA 程まで戻った。再度、L-グルタミン酸を投与すると、前回投与と殆ど同じ 1120 pA の外向き電流が現れた。ただし、L-グルタミン酸を洗い流しても、膜電流は +400 pA 付近にまでしか戻らなかった。L-グルタミンおよび L-グルタミン酸投与に伴う膜電流変化 (50 秒毎の膜電流記録を繋ぎ合わせた連続記録) を挿入図として、カッコ内に示した。B : L-グルタミン酸の投与後 (標準リンガー液灌流中) (A (a) と Ba (a)), L-グルタミンの投与中 (A (b) と Ba (b)) そして L-グルタミン酸の投与中 (A (c) と Ba (c)) に、鋸波状の膜電位変化 (-95 ~ +45 mV, 500 ミリ秒) を与え、発生する膜電流変化 (電流 - 電圧関係) を記録し、重ねて表示した。-40 mV 付近から正の膜電位では、L 型カルシウムチャネルの活性化によって発生した内向き電流が認められた。両アミノ酸の水平細胞への影響を調べるために、L-グルタミン投与中に得た膜電流変化 (B (b)) から投与前の膜電流変化 (B (a)) を、また L-グルタミン酸投与中に得た膜電流変化 (B (c)) から投与前の膜電流変化 (B (a)) を差し引き、その差分を電流 - 電圧関係として表示した (Bb の (b) - (a) [赤色] と Bc の (c) - (a) [緑色])。L-グルタミン投与によって現れた膜電流変化は、膜電位が -40 mV よりも負に膜電位で減少し、また正の膜電位で増加した。この外向き整流作用を示す電流 - 電圧関係は、NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化による可能性を示している。L-グルタミン酸投与に伴う電流 - 電圧関係も L-グルタミンと似ていた。ただし、-40 mV よりも負の膜電位 (過分極側) において、L-グルタミン酸では定常的な膜電流が認められた。

流に比べてやや緩やかな時間経過を示した。

L-グルタミン酸の投与後（保持電流）（3図 A (a) と Ba (a)）、L-グルタミンの投与中（第3図 A (b) と Ba (b)）そしてL-グルタミン酸の投与中（第3図 A (c) と Ba (c)）に、鋸波状の膜電位変化（ $-95 \sim +45$ mV, 500ミリ秒）を与え、発生する膜電流変化（電流-電圧関係）を記録した。両アミノ酸の水平細胞への影響を調べるために、L-グルタミン投与中に得た膜電流変化（B (b)）から投与前の膜電流変化（B (a)）、およびL-グルタミン酸投与中に得た膜電流変化（B (c)）から投与前の膜電流変化（B (a)）を差し引き、その差分（電流-電圧関係）を求めた。L-グルタミン投与によって現れた膜電流変化は、 -40 mV よりも負の膜電位（過分極側）で減少し、また -40 mV よりも正の膜電位（脱分極側）で概ね直線的に増加した（Bbの (b) - (a) [赤色]）。この外向き整流作用を示す電流-電圧関係は、NMDA型グルタミン酸受容体の活性化によることを強く示唆している。L-グルタミン酸投与に伴う電流-電圧関係もL-グルタミンと同様であった（Bcの (c) - (a) [緑色]）。ただし、 -40 mV よりも負の膜電位（過分極側）において、L-グルタミン酸の投与では定常的な膜電流発生が認められた。この定常的な膜電流は、NMDA型以外、すなわちAMPA/KA型グルタミン酸受容体の活性化によると推察された。

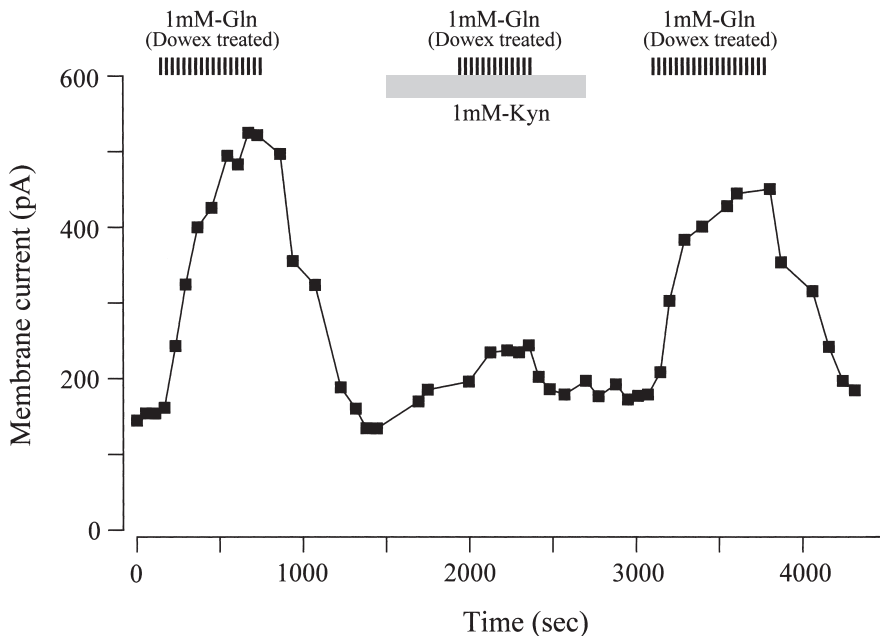
以上の結果は、L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 1 mMのL-グルタミンと約 0.275 μ M程のL-グルタミン酸を含む。）投与に伴い水平細胞に発生する時間経過の緩やかな膜電流がNMDA型グルタミン酸受容体の活性化による可能性が高いことを示している。

L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するL-グルタミン酸阻害剤の効果

L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化がイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体（特に、NMDA型グルタミン酸受容体）を活性化することによることを調べるため、この受容体の阻害剤を投与する実験を実施した（第4図、第5図と第6図）。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約30分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35$ mVに固定すると、この細胞には $+150$ pA程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 1 mMのL-グルタミンと約 0.34 μ MのL-グルタミン酸を含む。）を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約5分後に 525 pA に到達した。これを洗い流すと、膜電流はゆっくりと $+135$ pA程にまで戻った。ここでキヌレン酸（Kyn; 1 mM）を含む標準リンガー液を灌流した。この灌流に伴い 40 pA程の外向き電流が現れ、膜電流は $+180$ pA付近で維持された。キヌレン酸を含む標準リンガー液の灌流中、L-グルタミンを投与すると、水平細胞には 50

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に対する L-グルタミンの効果



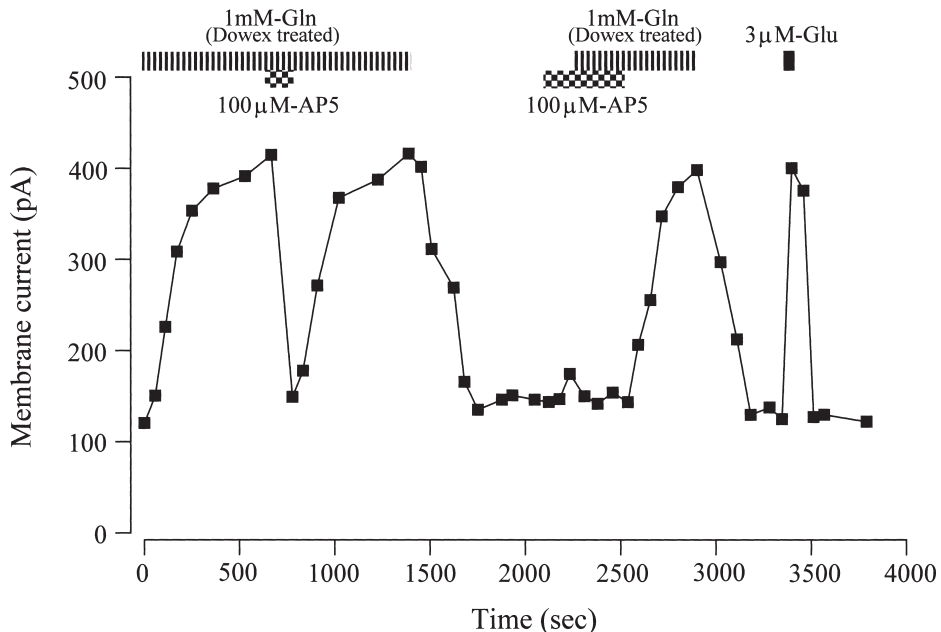
第4図：L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するキヌレン酸の効果

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約30分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、この細胞には $+150\ \text{pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ の L-グルタミンと約 $0.34\ \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸を含む。）を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約5分後に $525\ \text{pA}$ に到達した。これを洗い流すと、膜電流は緩やかに $+140\ \text{pA}$ に戻った。ここでキヌレン酸（Kyn; $1\ \text{mM}$ ）を含む標準リンガー液を灌流した。この灌流に伴い $40\ \text{pA}$ 程の外向き電流が現れ、膜電流は $+180\ \text{pA}$ 付近で維持された。キヌレン酸を含む標準リンガー液の灌流中、L-グルタミンを投与すると、水平細胞には $50\ \text{pA}$ 程の微弱な外向き電流が発生し、L-グルタミンを除去すると膜電流は $+180\ \text{pA}$ 付近にまで戻った。標準リンガー液からキヌレン酸を除去しても、膜電流は変わらず $+180\ \text{pA}$ 程で維持された。再度、L-グルタミンを投与すると、 $450\ \text{pA}$ 程の外向き電流が発生し、洗い流すと約 $+180\ \text{pA}$ にまで戻った。

pA 程の微弱な外向き電流が発生し、L-グルタミンを洗い流すと膜電流は $+180\ \text{pA}$ 付近にまで戻った。標準リンガー液からキヌレン酸を除去しても、膜電流は変わらず $+180\ \text{pA}$ 程で維持された。再度、L-グルタミンを投与すると、 $450\ \text{pA}$ 程の外向き電流が発生し、洗い流すと約 $+180\ \text{pA}$ にまで戻った（第4図）。本実験から、キヌレン酸はグルタミン電流の90%程度を抑制することが明らかとなった。

第4図と同じ個体から得られ、別の試験管に保存していた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ 採取して記録槽に入れ約10分の静置後、標準リンガー液を40分間灌流し膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、この細胞には $+120\ \text{pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ の L-グルタミンと約 $0.34\ \mu\text{M}$ の L-

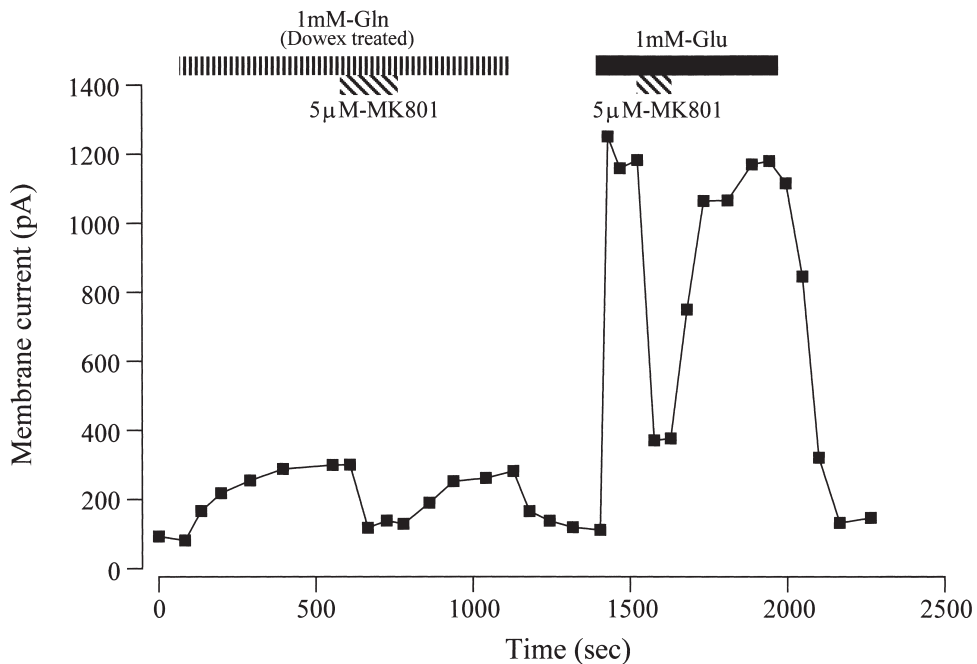
グルタミン酸を含む。)を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約6分後に415 pAに到達した。ここで、D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5: 100 μ M)を投与すると、膜電流は速やかに減少し+150 pAとなった。これを洗い流すと、膜電流は緩やかに回復し約4分後に+415 pAとなった。L-グルタミンを洗い流すと、膜電流は+140 pA付近にまで戻った。次に、AP5を含む標準リンガー液を灌流した。AP5の投与では膜電流に変化は認められず、+150 pAで維持された。AP5を加えた標準リンガー液を灌流中、L-グルタミンを投与すると、水平細胞には一過性の外向き電流が出現したが、膜



第5図：L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対するAP5の効果

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液(第4図と同じ個体から得られ、別の試験管に保存していた細胞浮遊液)から100 μ lを取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約40分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を+35 mVに固定すると、この細胞には+120 pA程の膜電流(保持電流)が現れた。L-グルタミン(Gln (Dowex treated); 約1 mM)のL-グルタミンと約0.34 μ MのL-グルタミン酸を含む。)を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約6分後に415 pAに到達した。ここで、D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5: 100 μ M)を投与すると、膜電流は速やかに減少し+150 pAとなった。これを洗い流すと、緩やかに回復し約4分後には+415 pAとなった。L-グルタミンを洗い流すと、膜電流は+140 pA付近にまで戻った。次に、AP5を含む標準リンガー液を灌流した。AP5の投与では膜電流に変化は認められず、+150 pA程で維持された。AP5を含む標準リンガー液の灌流中、L-グルタミンを投与すると、水平細胞には一過性の外向き電流が出現したが、直ぐに膜電流は元の+150 pA付近に戻った。AP5とL-グルタミンを含む標準リンガー液からAP5のみを除去すると、水平細胞には時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、約5分後に400 pA程に到達した。L-グルタミンを洗い流して、膜電流が+140 pAにまで戻った時点で、3 μ MのL-グルタミン酸を投与した。水平細胞には約400 pAの外向き電流が現れ、これを洗い流すと膜電流は+140 pA付近にまで戻った。

電流は直ちに元の +150 pA 付近にまで戻った。AP5 と L-グルタミンを加えた標準リンガー液から AP5 を除去すると、緩やかな時間経過の外向き電流が発生し、約 5 分後に 400 pA 程に到達した。L-グルタミンを除去し、膜電流が +140 pA にまで戻った時点で、3 μ M の L-グルタミン酸を投与した。水平細胞には約 400 pA の外向き電流が現れ、これを洗い流すと膜電流は +140 pA 付近にまで戻った (第 5 図)。L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化は、3 μ M の L-グルタミン酸投与と概ね等価であった。本実験から、AP5 はグルタミン電流を完全に抑制することが明らかとなった。



第 6 図 : L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化に対する MK801 の効果

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から 100 μ l を取り、記録槽に入れ約 10 分間静置した。その後、標準リンガー液を約 40 分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を +35 mV に固定すると、この細胞には +90 pA 程の膜電流 (保持電流) が現れた。L-グルタミン (Gln (Dowex treated) ; 約 1 mM の L-グルタミンと約 0.275 μ M の L-グルタミン酸を含む。) を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約 7 分後に 300 pA に到達した。L-グルタミンを含む標準リンガー液の灌流中、(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,b] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK801; 5 μ M) を投与すると、膜電流は速やかに減少し +115 pA となった。L-グルタミンと MK801 を含む標準リンガー液から MK801 を除去すると、膜電流は緩やかに +280 pA 付近にまで回復した。標準リンガー液から L-グルタミンを除去すると、膜電流は +110 pA にまで戻った。次に、水平細胞に 1 mM の L-グルタミン酸を投与すると外向き電流が発生し、1250 pA 程に到達した。L-グルタミン酸を含む標準リンガー液の灌流中、MK801 (5 μ M) を投与すると、膜電流は +370 pA にまで減少した。L-グルタミン酸と MK801 を含む標準リンガー液から MK801 を除去すると、+1180 pA 程まで回復した。標準リンガー液から L-グルタミン酸を除去すると、膜電流は +140 pA にまで戻った。

第4図および第5図の実験で使用した個体とは異なるアメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約40分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、この細胞には $+90\ \text{pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ の L-グルタミンと約 $0.275\ \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸を含む。）を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約7分後に $300\ \text{pA}$ に到達した。L-グルタミンを含む標準リンガー液の灌流中、(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,b] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK801; $5\ \mu\text{M}$) を投与すると、膜電流は速やかに減少し $+115\ \text{pA}$ となった。L-グルタミンと MK801 を含む標準リンガー液から MK801 を除去すると、膜電流は緩やかに $+280\ \text{pA}$ 付近にまで回復した。標準リンガー液から L-グルタミンを除去すると、膜電流は $+110\ \text{pA}$ にまで戻った。次に、水平細胞に $1\ \text{mM}$ の L-グルタミン酸を投与すると外向き電流が発生し、 $1250\ \text{pA}$ 程に到達した。L-グルタミン酸を含む標準リンガー液の灌流中、MK801 ($5\ \mu\text{M}$) を投与すると、膜電流は $+370\ \text{pA}$ にまで減少した。L-グルタミン酸と MK801 を含む標準リンガー液から MK801 を除去すると、 $+1180\ \text{pA}$ 程まで回復した。標準リンガー液から L-グルタミン酸を除去すると、膜電流は $+140\ \text{pA}$ にまで戻った（第6図）。本実験から、MK801 がグルタミン電流を殆ど抑制することが明らかとなった。

キヌレン酸の効果は4細胞で、AP5 の効果は4細胞で、そして MK-801 の効果は3細胞で実施し、概ね同じ結果が得られた。

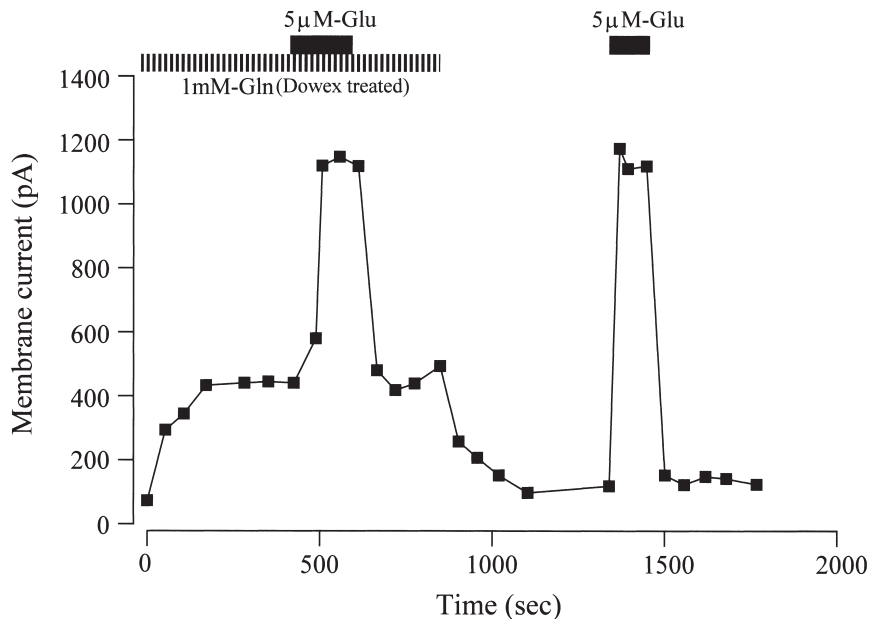
以上の結果（第4図、第5図と第6図）は、L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ の L-グルタミンと約 $0.275\ \mu\text{M}$ あるいは約 $0.34\ \mu\text{M}$ の L-グルタミン酸を含む。）投与で水平細胞に発生する膜電流変化が、NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化によることを強く示唆している。

L-グルタミンと L-グルタミン酸の同時投与に伴う水平細胞の膜電流変化

L-グルタミンあるいは L-グルタミン酸の投与に伴い水平細胞に発生する膜電流変化の時間経過は著しく異なっていた（第3図）が、両膜電流変化共にイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の阻害剤によって抑制されることが判明した（第4図、第5図と第6図参照）。この結果は、L-グルタミンがグルタミン酸受容体（おそらく、NMDA 型グルタミン酸受容体）を活性化し、膜電流変化を惹起していることを強く示唆している。そこで、L-グルタミンが L-グルタミン酸と同じ受容体に作用して膜電流変化を惹起しているのか否かを確認するため、両アミノ酸を同時に投与する実験を行った（第7図）。

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に

アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に対する L-グルタミンの効果



第7図：L-グルタミンとL-グルタミン酸の同時投与に伴う水平細胞の膜電流変化

アメリカナマズ網膜に単離操作を施し得られた細胞浮遊液から $100\ \mu\text{l}$ を取り、記録槽に入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約35分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、この細胞には $+75\ \text{pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ のL-グルタミンと約 $0.275\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を含む。）を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約3分後に $430\ \text{pA}$ に到達した。L-グルタミンを含む標準リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸（Glu； $5\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、外向き電流が発生し、 $1150\ \text{pA}$ 程に到達した。L-グルタミンとL-グルタミン酸を含む標準リンガー液からL-グルタミン酸を除去すると、 $+440\ \text{pA}$ 付近にまで回復した。さらに、L-グルタミンを除去すると、膜電流は約 $+100\ \text{pA}$ にまで戻った。次に、標準リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸（ $5\ \mu\text{M}$ ）を投与した。水平細胞には約 $1180\ \text{pA}$ の外向き電流が発生し、これを洗い流すと膜電流は $+120\ \text{pA}$ 程にまで戻った。

入れ約10分間静置した。その後、標準リンガー液を約35分間灌流し、水平細胞から膜電流を導出した。水平細胞の膜電位を $+35\ \text{mV}$ に固定すると、この細胞には $+75\ \text{pA}$ 程の膜電流（保持電流）が現れた。L-グルタミン（Gln (Dowex treated)；約 $1\ \text{mM}$ のL-グルタミンと約 $0.275\ \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を含む。）を投与すると、水平細胞には緩徐な時間経過の外向き電流が発生し、約3分後に $430\ \text{pA}$ に到達した。L-グルタミンを含む標準リンガー液の灌流中、L-グルタミン酸（Glu； $5\ \mu\text{M}$ ）を投与すると、外向き電流が発生し、 $1150\ \text{pA}$ に到達した。L-グルタミンとL-グルタミン酸を含む標準リンガー液からL-グルタミン酸を除去すると、 $440\ \text{pA}$ 付近にまで回復した。さらに、L-グルタミンを除去すると、膜電流は約 $+100\ \text{pA}$ にまで戻った。次に、水平細胞にL-グルタミン酸（ $5\ \mu\text{M}$ ）を投与した。約 $1180\ \text{pA}$ の外向き電流が発生し、これを除去すると $+120\ \text{pA}$ にまで戻った。L-グルタミンとL-グル

タミン酸を同時に投与しても、それぞれを単独投与したときに得られる膜電流変化の単純加算ではなかった。また、L-グルタミン存在下で発生したグルタミン酸電流の振幅は、L-グルタミン酸を単独で与えたときよりも小さいことが明らかとなった。同じ実験を2細胞で実施し、同様の結果を得た。

以上の結果は、L-グルタミンがL-グルタミン酸と同じしくみを介して膜電流変化を惹起していることを強く示唆している。

考 察

L-グルタミンの純度

Sigma-Aldrich Co. のカタログ (Web カタログを含む) には、L-グルタミン (カタログ番号: G3126) が0.5%未満のL-グルタミン酸を含んでいることを明記してある。L-グルタミン酸のL-グルタミンへの混入は、過去の研究で指摘されている。Yamada & Rothman (1989) は、ラット脳から得られた培養海馬細胞に対するL-グルタミンの生理活性や神経毒性を調べる過程で、Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Co. の旧会社名) から購入したL-グルタミンにL-グルタミン酸が混入していることを見つけた。この研究では、培養海馬細胞に対するL-グルタミンの作用が、混入するL-グルタミン酸によることを明らかにし、L-グルタミン自体は海馬細胞に対して生理活性や毒性を示さないことを示唆した。L-グルタミン酸のL-グルタミンへの混入については、アフリカツメガエルの培養脊髄神経細胞を用いた研究でも報じられている (Sands & Barish, 1989)。この研究では、L-グルタミンをFluka, FlowそしてAldrich (Sigma-Aldrich Co. の旧会社名) の3社から購入そして使用したことを論文に記載している。L-グルタミンは多くの薬品会社で製造されているが、何れの会社で製造されたL-グルタミンも純度は100%ではなく、不純物が含まれているらしい。

血漿や脳脊髄液には高濃度のL-グルタミンが含まれているため、神経細胞に対するL-グルタミンの作用を調べる際、L-グルタミン濃度を高く設定して使用することが多い。混入するL-グルタミン酸濃度が0.5%程であったとしても、仮にL-グルタミンを1 mMで使用すると、この溶液には5 μ M 近くのL-グルタミン酸が含まれる計算となる。このL-グルタミン酸濃度はグルタミン酸受容体を活性化するに足る濃度であり、研究結果に大きな影響を及ぼすに違いない。

本研究を開始する前に、L-グルタミンをSigma-Aldrich Co. (カタログ番号: G8540; Lot 番号: 11K09041) とMP Biomedicals (カタログ番号: 101806; Lot 番号: 6574F) から購入し、このL-グルタミンへのL-グルタミン酸混入の有無を調べた。Sigma-Aldrich Co. から購入したL-グルタミン (1 mM) に含まれるL-グルタミン酸濃度を質量分析法で推定する

と約 2.25 μM であり、MP Biomedicals の L-グルタミンにはこれ以上の濃度の L-グルタミン酸が含まれていることが明らかとなった。この推定結果を踏まえ、本研究では L-グルタミン酸の混入が少ない Sigma-Aldrich Co. の L-グルタミンを使用することにした。L-グルタミンから L-グルタミン酸を除去するため、イオン交換樹脂 (Dowex 1 X 8; 100–200 mesh Chloride form) を使用した。L-グルタミン溶液の Dowex 樹脂処理によって、L-グルタミン酸の混入を 15% 未満にまで低下させることができたが、完全に除去することはできなかった。本研究の実施期間中に 3 回の Dowex 樹脂処理を実施したが、処理後の L-グルタミン酸濃度に比較的大きな違いが認められた。しかし、この理由は不明のまま、原因は未だ究明していない。

脊椎動物網膜における L-グルタミン酸と L-グルタミン

脊椎動物網膜には、光受容のために 2 種類の視細胞 (錐体と桿体) が存在している。錐体は光に対する感受性が低いため昼間の光受容に、また桿体は感受性が高いため薄明 (夕方及び夜間) の光受容に寄与している (例えば, Rodieck, 1998)。これらの視細胞は暗時に脱分極状態にあり、神経伝達物質として L-グルタミン酸を放出している (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Takahashi & Murakami, 1991)。視細胞終末部内でシナプス小胞はシナプスリボン (細胞内構造物) に沿って並んで存在しており、暗時に開口放出する。脳などの神経細胞におけるシナプス小胞と存在状態が異なるため、網膜神経細胞でシナプスリボンが関与するシナプスを特別にリボンシナプスと呼んでいる (Heidelberger *et al.*, 2005; Fox & Sanes, 2007)。視細胞から放出された L-グルタミン酸はシナプス間隙を拡散し、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞のシナプス下膜に発現するグルタミン酸受容体に到達し、膜電位変化を生む。水平細胞と 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、そして ON 中心型双極細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体が発現し、それぞれの細胞に特有の光応答を形成している (Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 1973, 1979, 1983; Murakami *et al.*, 1972, 1975; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Kaneko & Tachibana, 1982; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Saito & Kujiraoka, 1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987; Takahashi & Murakami, 1988)。双極細胞では形態視の初期過程である同心円型中心-周辺拮抗的受容野 (コントラスト強調) がそして水平細胞では色覚の基礎過程である反対色応答が形成され、これらの情報はアマクリン細胞や神経節細胞にシナプス伝達される (Tomita, 1963, 1965; Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Toyoda & Tonosaki, 1978; Davis & Naka, 1980;

Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。神経節細胞の神経軸索は視神経と呼ばれ、網膜内で形成された視覚情報を脳へと伝播する。網膜内では、視細胞に加え双極細胞もリボンシナプスを介してL-グルタミン酸を放出していることが明らかとなっている (Tachibana & Okada, 1991; Heidelberger *et al.*, 2005)。網膜内にはグリア細胞の一種であるミュラー細胞が存在し、この細胞は視細胞あるいは双極細胞から放出されたL-グルタミン酸を両細胞と協力して細胞内に取り込み、網膜組織のL-グルタミン酸濃度を低く保つ役割を果たしていると考えられている (Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979; Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Bringmann *et al.*, 2009)。ミュラー細胞に取り込まれたL-グルタミン酸は、脳と同様に、グルタミン酸-グルタミンサイクルを経て神経細胞にまで運ばれ、そして放出に利用されると推測されている (例えば, Sarthy & Ripps, 2000; Bringmann *et al.*, 2009)。ただし、桿体では放出されたL-グルタミン酸の殆どが桿体によって取り込まれるため、L-グルタミン酸-グルタミンサイクルによる桿体へのL-グルタミン酸の供給は近年疑問視されている (Hasegawa *et al.*, 2006)。

水平細胞に対するL-グルタミンの効果

本研究で採用している灌流 (リンガー液の流速や液交換の速度) は、脱感作を解析できるほど充分速くない。特に、低濃度の薬剤を投与する際、薬効が当該細胞に速やかに現れ難いことが稀に観察された。例えば、 $0.5 \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を水平細胞に投与したとき、時間経過の緩やかな外向き電流が発生し、最大膜電流値に到達するまでに約2分を要した (第2図)。しかし、低濃度投与であっても、このように時間経過の緩やかな膜電流変化を示すことは少なく、多くは50秒以内に最大膜電流値に到達した (第2図における $2.5 \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸投与)。従って、本研究において薬剤投与に伴って発生する膜電流変化の時間経過は、リンガー液の流速や液交換の速度などに基因する物理的制約によるのではなく、膜電流発生のおそろく、受容体活性化の速度) を反映していると推測される。実際、第5図では、L-グルタミン酸 ($3 \mu\text{M}$) とL-グルタミン (約 1 mM のL-グルタミンと約 $0.34 \mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を含む。) の投与が水平細胞に概ね同じ振幅の膜電流変化を惹起するにもかかわらず、L-グルタミン投与に伴い発生する膜電流変化の時間経過がグルタミン酸投与に比べて極めて緩やかであることが明らかとなった。この結果は、L-グルタミンがL-グルタミン酸と異なるしくみで膜電流変化を発生していることを強く示唆している。また、第2図および第5図は、L-グルタミンを投与したときに現れる外向き電流の振幅がL-グルタミンに混入するL-グルタミン酸濃度で惹起される膜電流変化よりも大きいことを示していた。これらの結果を踏まえると、L-グルタミン投与に伴い水平細胞に発生する膜電流発生は、L-グ

ルタミンに混入する L-グルタミン酸によるイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の活性化に加え、L-グルタミン自体が水平細胞に作用し、膜電流変化を惹起している可能性を示している。Kolbaev & Draguhn (2008) が指摘しているように、L-グルタミンはグルタミン酸受容体の活性化や未知のしくみを活性化しているのかもしれない。

L-グルタミンによる水平細胞に発現する NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化

既述したように、イオンチャネル直結型グルタミン酸受容体は 3 種類に分類されている。(RS)- α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体は GluR1~GluR4 の 4 種類、Kainic acid (KA) 型グルタミン酸受容体は GluR5 から GluR7 および KA1 と KA2 の 5 種類、そして N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体は NR1 と NR2 の 2 種類のサブユニットタンパク質で構成されていることが報じられている (例えば, Tomita, 2010; Granger *et al.*, 2011)。それぞれの受容体のサブユニットタンパク質の違いが、イオンチャネルの活性化、脱感作、非競合的アンタゴニストやチャネル遮断薬による阻害のしくみに影響していると推測されている。

NMDA 型グルタミン酸受容体は NR1 と NR2 の 4 量体 (ヘテロ 2 量体の 2 セット) で構成されている。NR2 は、NR2A, NR2B, NR2C そして NR2D の 4 つに分類される (例えば, Petrenko *et al.*, 2003)。この受容体には NMDA (L-グルタミン酸) 結合部位、グリシン結合部位、ポリアミン結合 (認識) 部位そしてフェンサイクリジン (PCP) 結合 (認識) 部位が存在することが明らかとなっている。グリシン結合部位は NR1 に、そしては NMDA (L-グルタミン酸) 結合部位は NR2 に存在する。フェンサイクリジン (PCP) 結合部位は NR1/NR2A および NR1/NR2B の組み合わせのサブユニットタンパク質に、そしてポリアミン結合部位は NR1/NR2B の組み合わせのサブユニットタンパク質が存在すると考えられている。このように、どのサブユニットタンパク質が組み合わせるのかで、同じ NMD 型グルタミン酸受容体であっても生理学のおよび薬理学的性質に差異が生まれる。さらに、NMDA 型グルタミン酸受容体は、 -70 mV 付近から負の膜電位では Mg^{2+} による抑制を受け活性化しない。そして、亜鉛イオン (Zn^{2+}) も NMDA 型グルタミン酸受容体を調節していることが明らかとなっている。このように、NMDA 型グルタミン酸受容体は極めて多くの物質による制御を受けている。

本研究では、 $+35$ mV に膜電位固定 (NMDA 型グルタミン酸受容体の Mg^{2+} による抑制作用が解除されている膜電位) した水平細胞に L-グルタミンを投与すると、時間経過の緩やかな外向き電流を発生することが明らかとなった。しかも、第 3 図 Bb で得られたグルタミン電流は、膜電位が -40 mV よりも負で減少し、また正で増加する、いわゆる NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化によることを強く示唆していた。L-グルタミン投与に伴う膜電流

変化はキヌレン酸（総てのイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体の競合的阻害剤であり、また NMDA 型グルタミン酸受容体ではグリシン結合部位を阻害することが知られている。）投与によって殆ど抑制された（第 4 図）。そして、D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) (NMDA 型グルタミン酸受容体の競合的阻害剤) の投与では、グルタミン電流が完全に抑制されることが明らかとなった（第 5 図）。これらの実験結果は、L-グルタミンが NMDA 型グルタミン酸受容体アゴニストとして作用していることを示唆している。

キヌレン酸と AP5 に加え、本研究では NMDA 型グルタミン酸受容体の非競合的阻害剤である (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,b] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate (MK801) を投与する実験を行った（第 6 図）。この薬剤はキヌレン酸や AP5 と異なり、NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化に伴いイオンチャネルが開いたときチャネル内部に入り込み、PCP 部位に作用して抑制作用をもたらすことが知られている。また、MK801 は抑制作用が強く、その作用は不可逆的であることが報じられている (Rosenmund *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2005)。第 6 図の実験では、5 μ M の MK801 がグルタミン電流を殆ど完全に抑制し、そしてグルタミン酸電流を約 75% 抑制することが明らかとなった。MK801 の効果が不可逆的とはならず、比較液短時間で回復した理由については未だ不明である。

これらの阻害剤の実験結果を総合すると、グルタミン電流は NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化に伴い発生している可能性が高い。しかし、L-グルタミン投与に伴う膜電流発生が極めて緩やかな理由は不明であり、今後の研究を待たざるを得ない。

水平細胞における NMDA 型グルタミン酸受容体の機能

アメリカナマズ以外の硬骨魚類網膜の水平細胞には KA/AMPA 型グルタミン酸受容体のみが発現しており、従ってこの受容体が錐体から錐体水平細胞へのシナプス伝達に寄与していると考えられている (Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988; Okada *et al.*, 1999)。不思議なことに、アメリカナマズ網膜の錐体水平細胞には AMPA/KA 型以外に、NMDA 型グルタミン酸受容体も発現している (O'Dell & Christensen, 1986, 1989; Eliazof & Jahr, 1997)。アメリカナマズ網膜水平細胞に発現する NMDA 型グルタミン酸受容体が、水平細胞のどの部分に発現し、そしてどのような機能を有しているのかは未だ明らかになっていない。KA/AMPA 型グルタミン酸受容体に近接して NMDA 型グルタミン酸受容体が発現しているのであれば、Eliazof & Jahr (1997) の指摘通り、錐体-錐体水平細胞間シナプス連絡に寄与する可能性がある。一方、NMDA 型グルタミン酸受容体が水平細胞のシナプス外に発現しているのであれば、錐体と錐体水平細胞間シナプス間隙から漏れ出た L-グルタミン酸がこの受容体を活性化する可能性がある。近年、シナプス間隙から漏れ出た L-グルタミン酸によるシナプス領域外グルタミン酸受容体の活性化が注目を集めており、シナプスの可

塑性, グリア細胞からの神経伝達物質放出あるいは神経細胞の生存などに関係していることが報告されている (例えば, Häusser, 1997; Okubo *et al.*, 2010)。ただし, 網膜において, 錐体-錐体水平細胞シナプス間隙から漏れ出た L-グルタミン酸は水平細胞や水平細胞の周囲にあるミュラー細胞によって速やかに取り込まれるため, 細胞外には殆ど残存せず, 従ってシナプス領域外グルタミン酸受容体が活性化する可能性は非常に低いと考えられる。

アカゲザル眼球を用いて硝子体中の L-グルタミン濃度が測定され, 1 mM 弱存在することが明らかとなっている (例えば, Kwon *et al.*, 2005)。魚類眼球内の細胞外の L-グルタミン濃度は未だ測定されていないが, おそらくアカゲザル眼球での報告のように高く, このため明暗に関わらず水平細胞に発現する NMDA 型グルタミン酸受容体は L-グルタミンに曝されている可能性がある。結果として, Kolbaev & Draguhn (2008) が指摘したように, NMDA 型グルタミン酸受容体は活性化し, 水平細胞が脱分極することも予想される。L-グルタミンの作用を明らかにするには, 今後水平細胞周辺の L-グルタミン濃度の測定そして L-グルタミンによる水平細胞の脱分極の程度などに関してさらなる調査を行う必要がある。

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。また, 質量分析法により L-グルタミンならびに L-グルタミン酸の濃度測定に協力して下さったカリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部実験医学教室の Matthew Petrie 博士に感謝の意を表す。

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.
- Benarroch, E. E. (2010), Glutamate transporters: Diversity, function, and involvement in neurologic disease, *Neurology*, **74**: 259–264.
- 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., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grasche, J., Wierdemann, P., Albrecht, J. And Reichenbach, A. (2009), Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism, *Neurochem. Internat.*, **54**: 143–160.

- Bröer, S. and Brooks, N. (2001), Transfer of glutamine between astrocytes and neurons, *J. Neurochem.*, **77**: 705–719.
- 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.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J. and Edwards, R. H. (2002), The glutamine commute: take the N line and transfer to the A, *J. Cell Biol.*, **157**: 349–355.
- 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), Functional characteristics of lateral interactions between rods in the retina of the snapping turtle, *J. Physiol.*, **259**: 251–282.
- Choi, D. W. (1992), Excitotoxic cell death, *J. Neurobiol.*, **23**: 1261–1276.
- Choi, D. W. (1994), Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death, *Prog. Brain Res.*, **100**: 47–51.
- Danbolt, N. C. (2001), Glutamate uptake, *Prog. Neurobiol.*, **65**: 1–105.
- Davis, G. W. and Naka, K.-I. (1980), Spatial organization of catfish retinal neurons: I. Single- and random-bar stimulation, *J. Neurophysiol.*, **43**: 807–831.
- Eliasof, S. and Jahr, C. E. (1997), Rapid AMPA receptor desensitization in catfish cone horizontal cells, *Vis. Neurosci.*, **14**: 13–18.
- 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.
- Famiglietti, E. V. Jr, Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Foran, E. and Trotti, D. (2009), Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis, *Antioxid. Redox Signal.*, **11**: 1587–1602.
- Fox, M. A. and Sanes, J. R. (2007), Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses, *J. Comp. Neurol.*, **503**: 280–296.
- Gegelashvili, G., Robinson, M. B., Trotti, D. and Rauen, T. (2001), Regulation of glutamate transporters in health and disease, *Prog. Brain Res.*, **132**: 267–286
- Granger, A. J., Gray, A. A. Lu, W. and Nicoll, R. A. (2011), Genetic analysis of neuronal ionotropic glutamate receptor subunits, *J. Physiol.*, **589**: 4095–4101
- 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.
- Hasegawa, J., Obara, T., Tanaka, K. and Tachibana, M. (2006), High-density presynaptic transporters are required for glutamate removal from the first visual synapse, *Neuron*, **50**: 63–74.
- Häusser, B. B. (1997), Intersynaptic diffusion of neurotransmitter, *Trends Neurosci.*, **20**: 377–384.
- Heidelberger, R., Thoreson, W. B. and Witkovsky, P. (2005), Synaptic transmission at retinal ribbon synapses, *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**: 682–720.
- Islam, M. R., Muzaimi, M. and Abdullah, J. M. (2011), Glutamate receptors and transporters as comparative cues to the glutamatergic circuits of the avian and mammalian brain, *Orient Neuron Nexus*, **2**: 2–9
- Kam, K. and Nicoll, R. (2007), Excitatory synaptic transmission persists independently of the glutamate-glutamine cycle, *J. Neurosci.*, **27**: 9192–9200.
- 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.
- Kolbaev, S. and Draguhn, A. (2008), Glutamine-induced membrane currents in cultured rat hippocampal neurons, *Eur. J. Neurosci.*, **28**: 535–545.
- Kwon, Y. H., Rickman, D. W., Baruah, S., Zimmerman, M. B., Kim, C.-S., Boldt, H. C., Russel, S. R. and Hayreh, S. S. (2005), Vitreous and retinal amino acid concentrations in experimental central retinal artery occlusion in the primate, *Eye*, **19**: 455–463.
- Lehmann, A., Isacson, H. and Hamberger, A. (1983), Effects of *in vivo* administration of kainic acid on the extracellular amino acid pool in the rabbit hippocampus, *J. Neurochem.*, **40**: 1314–1320.
- Lerma, J., Herranz, A. S., Herreras, O., Abreira, V. and del Rio, R. M. (1986), *In vivo* determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus: A method based on brain dialysis and computerized analysis, *Brain Res.* **384**: 145–155.
- Linser, 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.
- Lucas, D. R. and Newhouse, J. P. (1957), The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, *AMA Arch. Ophthalmol.*, **58**: 193–201.
- Lynch, D. R. and Guttman, R. P. (2002), Excitotoxicity: Perspectives based on N-Methyl-D-Aspartate receptor subtype, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **300**: 717–723.
- Magistretti, P. J. and Pellerin, L. (1999), Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain, *News Physiol. Sci.*, **14**: 177–182.
- Mark, L. P., Prost, R. W., Ulmer, J. L., Smith, M. M., Daniels, D. L., Strottmann, J. M., Brown, W. D. and Haccin-Bey, L. (2001), Pictorial review of glutamate excitotoxicity: Fundamental concepts for neuroimaging, *Am. J. Neuroradiol.*, **22**: 1813–1824.
- 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.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinas 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., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **227**: 899–913.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina, *Vision Res.*, **15**: 456–458.
- Murakami, M., 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.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of

- the horizontal cells. *J. Physiol.*, **223**: 449–460.
- Niswender, C. M. and Conn, P. J. (2010), Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology and disease, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**: 295–322.
- Norenberg, M. D. and Martinez-Hernandez, A. (1979), Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain, *Brain Res.*, **161**: 303–310.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1986), N-methyl-n-aspartate receptors coexist with kainate and quisqualate receptors on single isolated catfish horizontal cells, *Brain Res.*, **381**: 59–362.
- O'Dell, T. and Christensen, B. N. (1989), Horizontal cells isolated from catfish retina contain two types of excitatory amino acid receptors, *J. Neurophysiol.*, **61**: 1097–1109.
- Okada, T., Schultz, K., Geutz, W., Hatt, H. And Weiler, R. (1999), AMPA-preferring receptors with high Ca^{2+} permeability mediate dendritic plasticity of retinal horizontal cells, *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 1085–1095.
- Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Inuma, S., Yamasaki, M., Wanatabe, M., Hirose, K. and Iino, M. (2010), Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**: 6526–6531.
- Olney, J. W. (1969), Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, **164**: 719–721.
- Olney, J. E., Labruyere, J. and Price, M. T. (1989), Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs, *Science*, **244**: 1360–1362.
- Otsuka, T. (1978), Combination of oil droplets with different types of photoreceptor in a freshwater turtle, *Geoclemys reevesii*, *Sensory Process*, **2**: 321–325.
- Petrenko, A. B., Yamakura, T., Baba, H. And Shimoji, K. (2003), The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: A review, *Anesth. Analg.*, **97**: 1108–1116.
- Riedel, G., Platt, B and Micheau, J. (2003), Glutamate receptor function in learning and memory, *Behav. Brain Res.*, **140**: 1–47.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1977), Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina, *Nature*, **268**: 654–655.
- Rodieck, R. W. (1998), How photoreceptors work. In *The first step in seeing*, Sunderland MA; Sinauer Associates, Inc., pp. 158–187.
- Rosenmund, C., Feltz, A. and Westbrook, G. L. (1995), Synaptic NMDA receptors channels have a low open probability, *J. Neurosci.*, **15**: 2788–2795.
- 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. (1984), Electrical and morphological properties of Off- center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 200–208.
- Sands, S. B. and Barish, M. E. (1989), NMDA receptor activation by residual glutamate in glutamine preparations: a cautionary note regarding weak NMDA receptor agonists, *Brain Res.*, **495**:193–197.

- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Sarthy, v. and Ripps, H. (2000), Metabolic interactions with neurons. In *The retinal Müller cell: Structure and function*, New York NY; Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 67–100.
- Schwartz, E. and Tachibana, M. (1990), Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina, *J. Physiol.*, **426**: 43–80.
- Sheardown, M. J., Nielsen, E. O., Hansen, A. J., Jacobsen, P. and Honore, T. (1990), 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia, *Science*, **247**: 571–574.
- Shen, J., Petersen, K., Behar, K. L., Brown, P., Nixon, T. W., Maison, G. F., Petroff, O. C., Shulman, G. I., Shulman, R. G. and Rothman, D. I. (1999), Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by *in vivo* ¹³C NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**: 8235–8240.
- 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.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **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 endogeneous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 高橋恭一 (2012), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞のグルタミン酸電流の経日変化. *人間環境学研究*, **10**: 1–30.
- 高橋恭一 (2013), アメリカナマズ網膜から単離した錐体水平細胞の膜電流——Leibovitz's L-15 Mediumの影響——, *人間環境学研究*, **11**: 1–28.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1988), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, *Neurosci. Res.*, **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.
- 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.
- Thomas, C. G., Miller, A. J. and Westbrook, G. L. (2005), Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1727–1734.
- Thoreson, W. B. and Witkovsky, P. (1999), Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina, *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**: 765–810.
- Tomita, S. (2010), Regulation of ionotropic glutamate receptors by their auxiliary subunits, *Physiology*, **25**: 41–49
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- Toyoda, J.-I. And Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400
- 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.
- 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., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3556–3560.

- Yamada, K. A. and Rothman, S. M. (1989), Glutamine currents in hippocampal neurons are attributable to contaminating glutamate, *Brain Res.*, **498**:351–354.
- Yang, X. L. (2004), Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons, *Prog. Neurobiol.*, **73**: 127–150.