

# トランプサンショウウオ網膜視細胞のグルタミン酸 トランスポーターの働き

高橋 恭一

(受付 2013年9月9日)

## 序 論

外界の光環境の変化は著しく、光強度の差は $10^8$ 倍にも及ぶことが知られている。脊椎動物は2種類の視細胞（錐体と桿体）を併用し、外界の光環境変化に対応している。錐体は光感受性が低く昼光視（昼間の視覚 [色覚を含む]）、そして桿体は光感受性が高く薄明視（夕方及び夜間の視覚）を司っている。両視細胞共に特異な形態を呈し、外節、内節およびシナプス終末の3つの部分からなる。錐体の外節は細胞膜が数百回も折り畳まれ、円錐状の層状構造を呈している（第4図参照）。また、桿体の外節は内部に二重膜円盤が数百枚以上積み重なり、円筒状の層状構造を呈している（第4図参照）。何れの視細胞の外節においても視物質（光感受性物質）は、重畳する膜上に存在している（錐体視物質は外節の細胞膜に、そして桿体視物質 [ロドプシン] は外節内にある円盤膜に存在する。）。また、この膜上のみならず外節内には光応答にかかわるタンパク質群も存在している。

網膜が光照射されると、錐体や桿体の外節に存在する視物質が活性化され、続いてトランスデュースン（Guanosine 5'-triphosphate [GTP] 結合タンパク質）そしてホスホジエステラーゼが活性化される。このホスホジエステラーゼは外節内に存在する cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) を Guanosine 5'-monophosphate (5'GMP) に分解し、一連の光化学反応が終了する（例えば、Kawamura, 1993, 1994）。視細胞外節の細胞膜には cGMP 依存性陽イオンチャネル（あるいは光感受性陽イオンチャネルとも呼ばれる）が発現し、このチャネルの開閉は外節内に存在する cGMP によって制御されている。暗時（細胞内に cGMP が多量に存在する状態）に cGMP 依存性陽イオンチャネルは開口した状態にあるため、主にナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) やカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が電気化学勾配に従って細胞外から細胞内に流入する。この結果、視細胞は脱分極状態となる。網膜が光照射されると、外節内の cGMP 濃度は減少し、cGMP 依存性陽イオンチャネルは閉塞する。このため、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は減少（あるいは停止）する（例えば、Haynes & Yaw, 1985; Pugh & Lamb, 1990, 1993; Watanabe & Murakami, 1991; Kawamura, 1993, 1994; Picones & Korenbrot, 1994）。この結果、視細胞は過分極する。両視細胞（錐体と桿体）の光受容ならびに cGMP 依存性陽

イオンチャンネル開閉のしくみが酷似しているにもかかわらず、光感受性には大きな差異があるため、その原因の究明が長年の懸案となっていた。最近、両視細胞の光感受性の差異が視物質活性化後に惹起される化学反応の効率（トランスデューシンとホスホジエステラーゼ）ならびに視物質の不活性化に関与する化学反応の効率（Gタンパク質共役型レセプターキナーゼ）に基因することが明らかにされた（例えば、Tachibanaki *et al.*, 2001, 2005; Vogalis *et al.*, 2011）。明暗に伴い視細胞外節で惹起された膜電位変化（cGMP 依存性陽イオンチャンネルの開閉に伴う陽イオンの移動を反映している。）は、内節に発現する各種の電位依存性イオンチャンネル（カリウムチャンネル、カルシウムチャンネル、h [内向き整流性] チャンネル、カルシウム依存性カリウムチャンネルおよびカルシウム依存性クロライドチャンネル）による修飾を受け、光応答を形成する（Bader *et al.*, 1979; Attwell & Wilson, 1980; Fain *et al.*, 1978a, b, 1980; Fain & Quandt, 1980; Takahashi, 1986; Barnes, 1994）。この光応答はシナプス終末にまで伝播される。暗時（脱分極時）にシナプス終末から神経伝達物質である L-グルタミン酸が放出され、明時（過分極時）に L-グルタミン酸の放出が減少あるいは停止する。

視細胞シナプス終末の細胞膜は陥入し、この窪みに双極細胞と水平細胞の樹状突起が入り込み化学シナプスを形成している。視細胞のシナプス終末にはシナプスリボンと呼ばれる特殊な構造が存在するため、この化学シナプスは特にリボンシナプスと呼ばれている（例えば、Sjöstrand, 1953, 1958; Sterling & Matthews, 2005; Dieck & Bandstätter, 2006）。リボンシナプスではシナプスリボンの周囲ならびに周辺に L-グルタミン酸を含むシナプス小胞が多数存在し、シナプス終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴い開口放出される（Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972, 1975; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995; Rieke & Schwartz, 1996; Heidelberger *et al.*, 2005; Fox & Sanes, 2007）。最近、この開口放出には二つのステップ、すなわち速やかな放出と持続的な放出が存在することが明らかとなった。しかし、リボンシナプスに関する詳細な知見は未だ得られていない。

網膜が光照射されると、視細胞から放出される L-グルタミン酸量は減少する。同時に、シナプス間隙に存在する L-グルタミン酸は速やかに除去される。この L-グルタミン酸の除去には、視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターが当たっている（Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995a, b; Yang & Wu, 1997; Eliasof *et al.*, 1988a, b）。視細胞に加え、ミュラー細胞（グリア細胞の一種）に発現するグルタミン酸トランスポーターも L-グルタミン酸の除去に関与していると考えられている（Brew & Attwell, 1987; Newman, 1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b）。トラフサンショウウオ網膜ではミュラー細胞の突起が視細胞内節とシナプス終末を取り

囲むように配置されているものの、視細胞と第二次神経細胞間のシナプス間隙にまでは達しておらず、このためミュラー細胞が視細胞によって放出されたL-グルタミン酸の除去にどの程度関与しているのかは明らかになっていない (Sarantis & Mobbs, 1992) (第4図参照)。近年、マウス (*Mus musculus*) 網膜において、桿体によって放出されたL-グルタミン酸は桿体に発現するグルタミン酸トランスポーターによって取り込まれ、ミュラー細胞は関与していないことが報告された (Hasegawa *et al.*, 2006)。他方、ジリス (*Spermophilus tridecemlineatus*) 網膜では、錐体によって放出されたL-グルタミン酸が錐体のみならずミュラー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除去される可能性があることが明らかにされた (Szmajda & DeVries, 2012)。これらの研究は、両視細胞においてシナプス間隙からL-グルタミン酸を除去するしくみが異なっていることを示唆している。

グルタミン酸トランスポーターによるL-グルタミン酸の取り込みは $\text{Na}^+$ 依存性且つ起電性であるため、網膜におけるグルタミン酸トランスポーター研究はこの起電性に着目して行われてきた。実際、上述の哺乳動物網膜視細胞に関する報告 (Hasegawa *et al.*, 2006; Szmajda & DeVries, 2012) を含め多くの研究において、グルタミン酸トランスポーター活性は視細胞の膜電流 (膜電位) 変化として、またシナプス間隙のL-グルタミン酸濃度の変化は第二次神経細胞の膜電流 (膜電位) 変化として捉えられている (例えば、Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995a, b; Eliasof *et al.*, 1988a, b)。残念ながら、視細胞によるL-グルタミン酸の取り込みを調べた研究 (Marc & Lam, 1981; Miller & Schwartz, 1983; Yang & Wu, 1997) は少なく、従って視細胞によって放出されたL-グルタミン酸がどのような時間経過でそしてどの程度視細胞に取り込まれるのか、さらにグルタミン酸トランスポーターの働きによってシナプス間隙のL-グルタミン酸濃度がどのような時間経過でそしてどの程度調節されるのかなどに関する詳細な解析は未だ行われていない。

最近、高橋 (2013) はトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜から視細胞層標本を作製し、この視細胞が放出するL-グルタミン酸をアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した水平細胞を利用して検出する方法を考案した。この方法は時間分解能が高く、視細胞から放出されるL-グルタミン酸の濃度変化を秒単位で検出することが可能である。本研究では高橋 (2013) が開発した方法を活用し、視細胞によって放出されたL-グルタミン酸が視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターを介してどの程度除去されるのかについて検討した。

## 実験材料と方法

### トラフサンショウウオ網膜を用いた視細胞層標本の作製

視細胞層標本の作製には、体長約 25~35 cm の幼生期のトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜を用いた。Cahill & Besharse (1992, 1993) の方法に従い、トラフサンショウウオ網膜から内顆粒層より高次の神経細胞を除去し、視細胞層のみからなる標本を作製した。

氷を用いて低温麻酔したトラフサンショウウオの頭部をギロチンで切断し、脳および脊髄の両側を穿刺後、眼球を摘出した。1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.6 に調整した正常リンガー液 (120.0 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 2.5 mM 塩化カリウム [KCl], 2.5 mM 塩化カルシウム [CaCl<sub>2</sub>], 1.0 mM 塩化マグネシウム [MgCl<sub>2</sub>], 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]) で満たしたプラスチックシャーレ (直径 60 mm; Fisher Scientific Co.) の中で、眼球から前眼部 (角膜と虹彩など) と水晶体を除去し、眼盃標本を作製した。微量遠心管に Hyaluronidase (320 U/ml) (Sigma H3884 [type IV-S]) あるいは Collagenase (12 U/ml) (LS005273, Worthington) と Hyaluronidase (360 U/ml) (LS002592, Worthington) の混合を含む正常リンガー液 (1.0 ml) を充填し、この中に眼盃標本を入れ、振盪器を使って約15分間室温 (20~23°C) で緩やかに攪拌した。この後、眼盃標本を正常リンガー液で 5 回洗浄し、眼球内の液体 (硝子体の残骸とリンガー液) を約 1 mm 幅の短冊状に切断した濾紙によって吸引除去した。円形に割り貫いたアクリル板に本標本を固定し、眼球内部を①蒸留水で 1% に希釈した Triton-X, ②蒸留水そして③正常リンガー液で灌流した。この灌流のために、注射器 (50 ml) の外筒を 3 本用意し、それぞれに①, ②そして③の溶液を加え、多連活栓を介して 30 ゲージの注射針に連結した。注射針は二次元マニピレーターに取り付け、注射針の先端が眼球の中央部となるよう調整した。注射器の外筒は眼盃標本よりも 40 cm 程高い位置に取り付け、それぞれの溶液をシリコンチューブ (内径 1.59 mm; Fisher Scientific Co.) を通じて注射針まで重力供給方式 (260  $\mu$ l/分) で供給した。眼盃標本を①, ②そして③の順番で、それぞれ 5~13 分間灌流した。眼盃標本の酵素処理から正常リンガー液の灌流までは室温で、そして室内灯を点灯したまま行った。

1% Triton-X 液、蒸留水および正常リンガー液の灌流後、眼球内部を観察すると、表層部 (硝子体側) の網膜組織は白濁していた。この眼盃標本を 1N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整した L-15 リンガー液 (Leibovitz's L-15 Medium [浸透圧調整のため 85% に希釈して使用], 0.3 mM アスコルビン酸, 10.0 mM HEPES, Penicillin [100 U/ml] と Streptomycin [100

$\mu\text{g/ml}$ ], 0.01 mg/ml BSA) の中に置き, 数時間から半日程経過すると, 眼球内の白濁部 (内顆粒層より高次の神経細胞群) が部分的に深部組織から剥がれたように盛り上がってきた。この盛り上がった部分に極細のピンセットを差し込み, 白濁部を注意深く剥ぎ取った。眼球内の白濁部の総てを剥ぎ取るとは難しかったが, 視神経乳頭付近を中心に 2.5 mm 角程を剥ぎ取るとは比較的容易であった。白濁部が剥がれた後の網膜組織には, 視細胞層のみが認められた (視細胞層標本)。この視細胞層標本を直ちに使用する場合は, 2 mm 角程の大きさに眼科用スプリング剪刀を使って切り取り, これをスポイドで吸い取って記録槽に移した。標本を直ちに使用しないとき, 視細胞層標本は L-15 リンガー液を含むプスチックシャーレに移し, 蓋付きの金属箱の中に入れて光を遮断した状態で恒温庫 (17°C) に保存した。視細胞層標本の保存に用いる L-15 リンガー液は, ポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  の Poly Ether Sulphone (PES) 膜フィルター (Nalgene) で濾過して使用した。上記の一連の処理・操作を実施する過程で, 網膜組織が色素上皮細胞層から剥離し, 眼球から外れることが多々あった。この場合, 剥離した網膜組織のみをプスチックシャーレに移し, このシャーレを金属箱の中に入れて保存した。視細胞層標本を L-15 リンガー液に保存したとき, 3 日程度は L-グルタミン酸の放出実験に供することができた。白濁部分の除去のみならず視細胞層標本の切り出しは, 実体顕微鏡 (SMZ, Nikon) 下で行った。この際, 手元に十分な照明を得るために, ダブルアームの光ファイバー照明装置を利用し, 強光で視細胞層標本を照射した。

#### アメリカナマズ網膜を用いた単離水平細胞の作製

イオンチャネル直結型グルタミン酸レセプターを持つ単離水平細胞の作製には, 体長約 35~45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い, アメリカナマズ網膜から錐体水平細胞を単離した。

氷を用いて低温麻酔したアメリカナマズの頭部をギロチンで切断し, 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 1N-NaOH を用いて pH 7.6 に調整した単離操作液 (125.0 mM NaCl, 1.0 mM リン酸水素二ナトリウム [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ], 2.5 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM 硫酸マグネシウム [ $\text{MgSO}_4$ ], 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml BSA) で数回洗浄し, 前眼部, 水晶体および硝子体を除去後, 眼球から網膜を剥離した。この剥離網膜を 2 mm 幅に切断し, 1N-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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM KCl, 10.0 mM Glucose, 1.0 mM ビルビン酸ナトリウム, 5.0 mM L-システイン, 5.0 mM Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -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。水平細胞の単離に用いる単離操作液と Papain 溶液は、ポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  の Poly Ether Sulphone (PES) 膜フィルター (Nalgene) で濾過して使用した。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  $\mu\text{l}$  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実験に用いた。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いるため、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、視細胞から放出される L-グルタミン酸の検出に錐体水平細胞 (以降、水平細胞と略す) を利用した。本研究では単離操作によって軸索が消失した水平細胞を利用し、膜電流を導出・記録した。単離操作終了後、細胞浮遊液は低温 (4°C) で保存し、単離後3日以内の細胞浮遊液を L-グルタミン酸の放出実験に用いた (高橋, 2012a)。

#### 水平細胞の膜電位固定と膜電流記録の方法

水平細胞に Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、膜電流を導出した (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、外径 1.5 mm そして内径 1.1 mm の Borosilicate 性ガラス管 (Garner Glass Co.) から作製した。電極抵抗は 5~8 M $\Omega$  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。本実験では水平細胞の膜電位を +35 mV に固定し, 惹起される膜電流変化を導出し, 必要に応じて 50 秒間記録・保存した。長時間の膜電流記録が必要なとき, 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 1 図 C 参照)。50 秒間の電流変化をハードディスクに保存する際若干の時間を要するため, 繋ぎ合わせて長時間記録を作成する際, 膜電流記録間に数秒の未記録部分が生じた (第 1 図 C 参照)。20 分以上にも亘る長時間の膜電流変化を記録・保存するとき, 得られた各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 (第 3 図参照)。また, 電流-電圧関係を調べるとき, 50 秒間記録・保存の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, 惹起された膜電流変化を記録・保存した (第 1 図 A と第 2 図挿入)。水平細胞に対する各種操作の影響 (標準リンガー液の灌流停止, グルタミン酸トランスポーター阻害剤の投与そして高  $K^+$  標準リンガー液の灌流) を調べる際, 各種操作実施中に得られた膜電流変化から各種操作前に得られた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を取り除いた膜電流変化 (電流-電圧関係) を求めた (第 2 図挿入)。保存した膜電流の解析には, Igor Ver.6.2 (Wavemetrics Inc.) を用いた。

#### 視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸の検出とリンガー液の灌流

眼球内を Triton-X および蒸留水で処理し, 白濁部を除去した眼盃標本あるいは白濁部を除去した後 L-15 リンガー液中に保存していた眼盃標本から視細胞層 (約 2.0 mm 角の大きさ) を切り取り, これをスポイドで吸引して倒立型位相差顕微鏡 (TMD, Nikon) に装着した記録槽 (容量: 455  $\mu$ l) 底部 (ガラス板) の中央に視細胞外節を下にして置いた (視細胞のシナプス終末部が上になるように設置した)。次に, アメリカナマズ網膜を Papain ならびに機械処理して得られた細胞浮遊液をピペットマンで 100  $\mu$ l 吸引し, 視細胞層標本の周辺にゆっくりと排出した。水平細胞が記録槽底部に落下し, 不動となった後, 水平細胞にハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーター (MP85, Sutter Instrument Co.) に装着したパッチ電極を近づけそして僅かに接触させた。このパッチ電極内液に陰圧を付加すると, 電極と細胞膜は密着し, ギガ  $\Omega$  シールが完成した。パッチ電極内液への陰圧をさらに強め, 電極内部の細胞膜を破壊すると, 膜電流の導出が可能となった (Whole-cell voltage-clamp 法) (Hamil

*et al.*, 1981)。水平細胞から膜電流導出が成功した時点で、標準リンガー液の灌流を開始した。

ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞を付着したパッチ電極を記録槽底部（厚さが 0.17 mm のガラス板 [カバーガラス]）のガラス板から約 900  $\mu\text{m}$  持ち上げ、視細胞層標本の上まで水平移動した。次に、視細胞層標本に向けて水平細胞を降下（600~650  $\mu\text{m}$  程度）すると、+35 mV に膜電位固定した水平細胞に外向き電流が現れた。さらに降下を継続すると、膜電流は徐々に増加し、やがて一定となった。この時点で、水平細胞の降下は止めた。水平細胞に発生した外向き電流は、視細胞層標本から自発的に放出された L-グルタミン酸による（高橋, 2013）。以上の操作は天井灯と倒立型位相差顕微鏡の照明を点灯した状態で行い、水平細胞の降下が終了した時点で顕微鏡の照明は消灯した。視細胞層標本に光照射する実験以外、天井灯は点灯したままであった。

本研究では視細胞の膜電位を変化させる方法として、光照射と 50 mM のカリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) を含む標準リンガー液 [高  $\text{K}^+$  標準リンガー液] の灌流を実施した。視細胞層標本に光照射する実験では、視細胞層標本を約 10 分間の暗状態に維持した後、顕微鏡照明（顕微鏡の光源 [ハロゲンランプ; 6 V, 30 W] を外部直流電源で駆動している。）を手動で点滅した。光強度は測定していないが、外部電源の電圧を 5 V に設定し光照射した（この光照射は、40 倍の対物レンズを利用して視細胞層標本や水平細胞を観察することができる程であった。）。

視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸を水平細胞で検出する実験を行うとき、先端口径が比較的大きな Y-tube（直径：約 250  $\mu\text{m}$ ）を作製し、これを標本から 5~7 mm の距離に置き、標準リンガー液を常時灌流した。薬剤投与も、この Y-tube を利用した。Y-tube による溶液の灌流速度は 390  $\mu\text{l}$ /分と緩やかであった。この Y-tube を用いた灌流において、パッチ電極から水平細胞が外れる、あるいは記録槽内で視細胞層標本が移動することはなかった。残念ながら、この Y-tube を用いた灌流では視細胞層標本ならびに水平細胞周辺の速やかな溶液灌流・溶液交換そして薬剤の導入・除去を達成することは難しかった。

#### リンガー液とパッチ電極内液の組成

視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸を水平細胞で検出する実験を行うときに灌流する標準リンガー液の組成は、100.0 mM NaCl, 10 mM 塩化セシウム ( $\text{CsCl}$ ), 10 mM Tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl), 2.5 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES と 0.01 mg/ml BSA であり、1N-水酸化カリウム ( $\text{KOH}$ ) を用いて pH 7.6 に調整して用いた。本研究で用いた水平細胞の膜電位 (+35 mV; NMDA 型グルタミン酸レセプターの  $\text{Mg}^{2+}$  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 CsCl と 10 mM TEA-Cl を加え、これを標準リンガー液とした。50 mM の  $K^+$  を含む標準リンガー液（高  $K^+$  標準リンガー液）の組成は、52.5 mM NaCl, 10 mM CsCl, 10 mM TEA-Cl, 50.0 mM KCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ , 1.0 mM  $MgCl_2$ , 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES と 0.01 mg/ml BSA であり、1N-KOH を用いて pH 7.6 に調整して用いた。また、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、標準リンガー液および高  $K^+$  標準リンガー液にグリシン（10  $\mu$ M）を添加して灌流した（例えば、Johnson & Ascher, 1987; Tachibana & Okada, 1991）。ただし、10  $\mu$ M のグリシンが水平細胞に膜電流変化を惹起することはなかった（高橋, 2012b）。正常リンガー液、L-15 リンガー液および標準リンガー液の浸透圧は、265~275 mOsm/kg であった。

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、パッチ電極内液には 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  $CaCl_2$ , 1.0 mM  $MgCl_2$ , 10.0 mM EGTA, 2.0 mM Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt ( $ATP-Mg^{2+}$ ), 1.0 mM Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate ( $GTP-Na^+$ ), 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。パッチ電極内液は、1N-水酸化セシウム (CsOH) を用いて pH 7.2 に調整し用いた。パッチ電極内液の浸透圧は、260~265 mOsm/kg であった。

薬品類の多くは、Sigma-Aldrich Co. から購入した。また、Papain, Hyaluronidase と Collagenase は Worthington Biochemical Co., DL-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA) は Tocris Biosciences, そして Penicillin と Streptomycin 混合液と Leibovitz's L-15 Medium は Gibco から購入した。

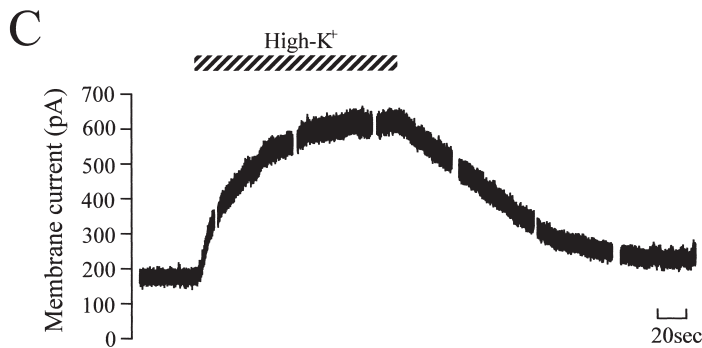
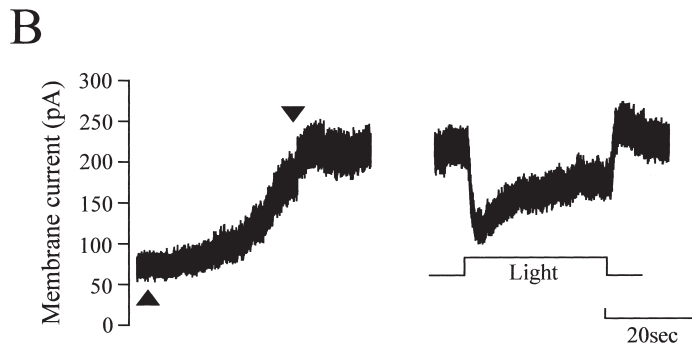
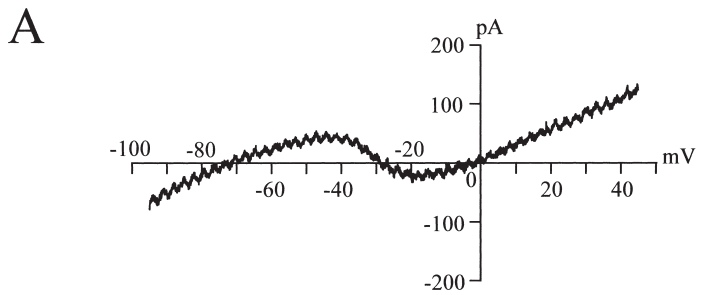
## 実験結果

### 視細胞層標本による L-グルタミン酸の放出

高橋 (2013) は、+35 mV に膜電位固定した水平細胞を視細胞層標本に近づけると水平細胞に外向き電流が現れ、この外向き電流は視細胞の脱分極によって顕著に増加し、キヌレン酸あるいはカドミウムイオン ( $Cd^{2+}$ ) の投与で抑制されることを見つけた。これらの結果は、水平細胞に惹起された外向き電流が視細胞層標本から放出された L-グルタミン酸によることを示している。

視細胞層標本が L-グルタミン酸を放出することを確認するため、水平細胞を視細胞層標本に近接させ、視細胞の膜電位を変える操作（光照射と高  $K^+$  標準リンガー液灌流）を実施した。トラフサンショウウオの眼球内部を 1% Triton-X 液、蒸留水そして正常リンガー液で 7

分間ずつ灌流し、その後 L-15 リンガー液 (17°C) 中に保存した。約 6 時間経過後、眼球内の白濁部 (内顆粒層より高次の神経細胞) を極細のピンセットを用いて取り除き、この視細胞標本を用いて放出実験を行った。白濁部を取り除いた網膜部分 (視細胞層標本) を約 2 mm 角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満した記録槽内に排出し、視細胞のシナプス終末が上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約 1 日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって 100  $\mu$ l 取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電



極による膜電流導出を開始した（第1図）。水平細胞からの膜電流導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を +35 mV に固定した水平細胞には、+75 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。−95 mV ~ +45 mV の鋸刃状の膜電位変化を与えると、−40 mV で活性化し、−20 mV 付近にピークを持つ内向き電流が惹起された（第1図A）。この内向き電流は、電位依存性カルシウム電流であると推測された（例えば、Shingai & Christensen, 1983, 1986; Dixon *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993）。ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部（ガラス板）から 900 μm 程持ち上げ、視細胞層標本の中心付近にまで水平移動した。水平細胞を視細胞層標本に向けて降下すると、外向き電流が発生した（第1図Bの上向き矢頭）。降下を続けると、外向き電流は増加し続け、+220 pA 程に達し概ね一定となった（第1図Bの下向き矢頭）。この時点で水平細胞の降下は止めた。倒立顕微鏡の照明と天井灯を消灯し、約11分間経過後、顕微鏡照明を手動で点滅した。光を照射（Light）すると、膜電流は +220 pA から +135 pA にまで速やかに減少し、照射にもかかわらず徐々に増加して約30秒後には +180 pA 付近に達した。消灯すると、膜電流は小さなりバウンドの後、+225 pA に戻った。4分後天井灯を点灯すると、水平細胞の膜電流は +160 pA まで減少し、約8分経過後 +170 pA 付近まで膜電流は増加し一定となった。ここで、標準リンガー液を高K<sup>+</sup>標準リンガー液（High-K<sup>+</sup>）に変え灌流を始めた（第1図C）。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に +615

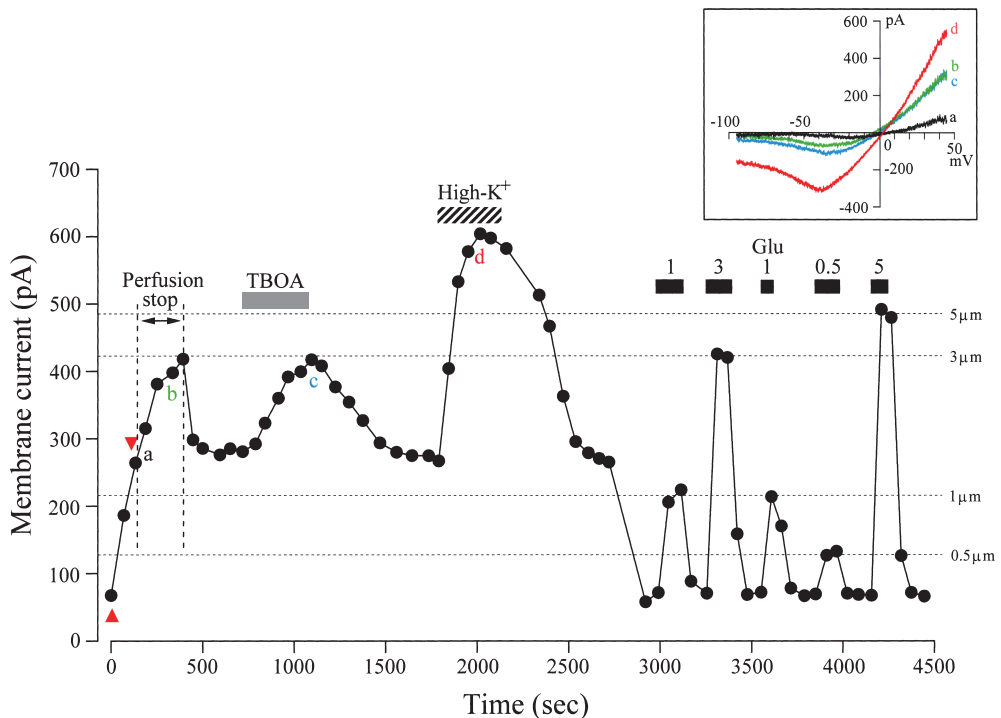
#### 第1図：視細胞層標本によるL-グルタミン酸の放出

トランプサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X液、蒸留水そして正常リンガー液で7分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液（17°C）中に保存した。約6時間経過後、眼球内の白濁部（内顆粒層より高次の神経細胞）を極細のピンセットを用いて取り除き、この視細胞標本を用いて放出実験を行った。白濁部を取り除いた網膜部分（視細胞層標本）を約2mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末が上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約1日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100 μl 取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した。水平細胞からの膜電流導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を +35 mV に固定した水平細胞には、+75 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。A：−95 mV ~ +45 mV の鋸刃状の膜電位変化を与えると、−40 mV で活性化し、−20 mV 付近にピークを持つ内向き電流が発生した。B：ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターを操作し、水平細胞が付着したパッチ電極を記録槽底部（ガラス板）から 900 μm 程持ち上げ、さらに視細胞層標本の中心付近まで水平移動した。水平細胞を視細胞層標本に向けて降下（上向き矢頭）すると、外向き電流が発生した。降下を続けると、外向き電流は増加し続け、+220 pA 程に達して一定となった（下向き矢頭）。この時点で水平細胞の降下は止めた。顕微鏡照明と天井灯を消灯して約11分間後、顕微鏡の照明を手動で点滅した。光を照射（Light）すると、膜電流は +220 pA から +135 pA にまで速やかに減少し、照射が継続しているにもかかわらず約30秒後には +180 pA 付近にまで増加した。消灯すると、膜電流は小さなりバウンドの後、+225 pA に戻った。C：天井灯を点灯すると、水平細胞の膜電流は +160 pA まで減少し、約8分経過後 +170 pA 付近まで膜電流は増加し一定となった。標準リンガー液を高K<sup>+</sup>標準リンガー液（High-K<sup>+</sup>）に変えて灌流を始めた。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に +615 pA 程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は徐々に元のレベルにまで回復した。

pA 程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は徐々に元のレベルへと回復した。高  $K^+$  標準リンガー液の灌流に伴う L-グルタミン酸の放出は総ての視細胞層標本で観察されたが、光照射に伴う L-グルタミン酸の放出量の増減は23の標本中僅か3例でしか観察されなかった。

以上の結果は、視細胞層標本が自発的に L-グルタミン酸を放出すること、そして脱分極刺激がこの放出を増加させることを示していた。この結果は、高橋 (2013) の結果と一致していた。

視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸のグルタミン酸トランスポーターによる除去暗時、視細胞は脱分極状態にあり、シナプス終末から L-グルタミン酸が放出されている (Miller & Schwartz, 1983; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989)。この 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 (双極細胞と水平細胞) の樹状突起にあるシナプスレセプターに到達・結合後、これらの細胞に膜電位変化を生む。明時、視細胞は過分極するため、シナプス終末による L-グルタミン酸放出は減少あるいは停止する。この過分極は視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターの活性を上げ、シナプス間隙からの L-グルタミン酸の回収を加速する (例えば, Eliasof *et al.*, 1998a, b)。しかし、視細胞から放出さ



れたL-グルタミン酸が視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どのような時間経過でそしてどの程度取り込まれるのかについては未だ充分な知見が得られていない。

まず、グルタミン酸トランスポーターの障害が視細胞層標本周辺のL-グルタミン酸濃度に影響するのか否かを検討した。トラフサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X液、蒸留水そして正常リンガー液で8分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液(17°C)中に保存した。約4時間経過後、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞)を極細のピンセットを用いて取り除き、この視細胞標本を用いて放出実験を行った。白濁部を取り除いた網膜部分(視細胞層標本)を約2mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞のシナプス終末が上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約7時間経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100 $\mu$ l取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した(第2図)。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を+35 mVに固定した水平細胞に

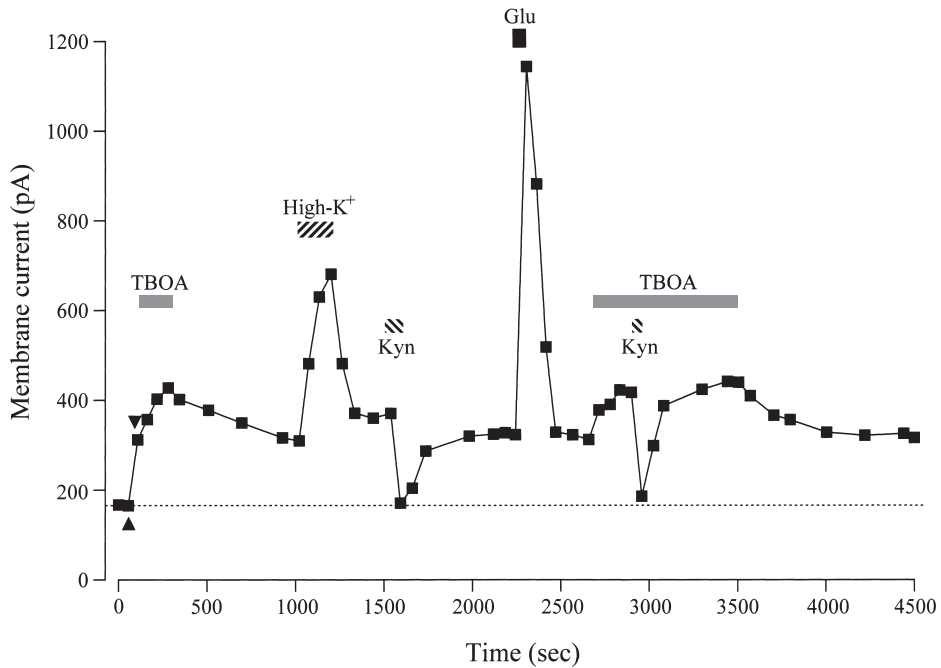
#### 第2図：視細胞層標本によるL-グルタミン酸放出に対するグルタミン酸トランスポーターの影響

トラフサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X液、蒸留水そして正常リンガー液で8分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液(17°C)中に保存した。約4時間経過後、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞)を極細のピンセットを用いて取り除き、この視細胞標本を用いて放出実験を行った。白濁部を取り除いた網膜部分(視細胞層標本)を約2mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約7時間経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100 $\mu$ l取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を+35 mVに固定した水平細胞には、+70 pA程の膜電流(保持電流)が現れた。この水平細胞が附着したパッチ電極を900 $\mu$ m程持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動し、水平細胞を降下すると、外向き電流が発生した。水平細胞の降下を続けると、この外向き電流は増大し、+260 pA程に達して一定となった(赤い矢頭で挟まれた部分)。この時点で水平細胞の降下は止めた。標準リンガー液の灌流を停止(Perfusion stop)すると、外向き電流はゆっくりと増加を始め、約4分後には+420 pAに達した。標準リンガー液の灌流を再開すると、約90秒後に膜電流は+285 pAにまで回復した。次に、TBOA(100 $\mu$ M)を投与すると、膜電流は徐々に増加し、約6分後には+400 pA程に達した。この膜電流は、TBOA投与中維持された。TBOAを洗い流すと、約12分後に元の膜電流レベルにまで戻った。最後に、標準リンガー液を高K<sup>+</sup>標準リンガー液に変えて灌流した。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に+600 pA程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は+260 pA付近にまで戻った。ここで、水平細胞を持ち上げて視細胞層標本から離すと、膜電流は急速に減少し+70 pAとなった。続いて、低濃度のL-グルタミン酸を水平細胞に投与し、惹起される膜電流変化を記録した。0.5 $\mu$ Mでは+125 pA、1 $\mu$ Mでは+220 pA、3 $\mu$ Mでは+425 pAそして5 $\mu$ Mでは+495 pAの膜電流値を得た。水平細胞の視細胞層標本への接近終了後(a)、標準リンガー液の灌流停止中(b)、TBOAの投与中(c)そして高K<sup>+</sup>標準リンガー液の灌流中(d)、水平細胞の膜電位を鋸波状に変化(-95~+45 mV, 500ミリ秒)させ、このとき発生する膜電流変化を記録した。各操作で得られた膜電流変化から本実験の開始時に得られた膜電流変化(主に電位依存性カルシウムチャネルの活性を反映している膜電流変化)を差し引き、電流-電圧関係を求めた(括弧内)。何れの電流-電圧関係においても、膜電流は-30~-40 mVより正の膜電位で概ね直線的に増加し、また負の膜電位で減少する、いわゆる外向き整流性を示した。

は、+70 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。この水平細胞が付着したパッチ電極を 900  $\mu\text{m}$  程持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動し、水平細胞を降下すると、外向き電流が発生した。水平細胞の降下を続けると、この外向き電流は増大し、+260 pA 程に達して一定となった（第 2 図の赤い矢頭で挟まれた部分）。この時点で水平細胞の降下は止めた。標準リンガー液の灌流を停止（Perfusion stop）すると、外向き電流はゆっくりと増加を始め、約 4 秒後には +420 pA に達した。標準リンガー液の灌流を再開すると、約 90 秒後に膜電流は +285 pA にまで回復した。次に、DL-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA; 100  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、膜電流は徐々に増加し、約 6 分後には +400 pA 程に達した。この膜電流は、TBOA 投与中維持された。TBOA を洗い流すと、約 12 分後に元の膜電流レベルにまで戻った。最後に、標準リンガー液を高  $\text{K}^+$  標準リンガー液に変えて灌流した。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に +600 pA 程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は +260 pA 付近にまで戻った。ここで、水平細胞を持ち上げて視細胞層標本から離すと、膜電流は急速に減少し約 +70 pA となった。続いて、既知の濃度の L-グルタミン酸を水平細胞に投与し、惹起される膜電流変化を記録した。0.5  $\mu\text{M}$  では +125 pA, 1  $\mu\text{M}$  では +220 pA, 3  $\mu\text{M}$  では +425 pA そして 5  $\mu\text{M}$  では +495 pA の膜電流値を得た。この膜電流値を参考に、視細胞層標本によって放出された L-グルタミン酸の細胞外濃度を推測した。この結果、自発的な放出による細胞外の L-グルタミン酸濃度は 1.3  $\mu\text{M}$  程であった。標準リンガー液の灌流停止そして TBOA の投与に伴って細胞外の L-グルタミン酸濃度は 3  $\mu\text{M}$  近くにまで上昇した。さらに、高  $\text{K}^+$  標準リンガー液を灌流（脱分極刺激）すると、細胞外の L-グルタミン酸濃度は 10  $\mu\text{M}$  程にまで上昇すると推測された。同様の方法を複数の視細胞層標本に適用し、L-グルタミン酸濃度を推測したが、第 2 図の実験で推測された濃度は他の標本に比べて高い値であった。水平細胞の視細胞層標本への接近終了後 (a), 標準リンガー液の灌流停止中 (b), TBOA の投与中 (c) そして高  $\text{K}^+$  標準リンガー液の灌流中 (d), 水平細胞の膜電位を鋸波状に変化 (-95 ~ +45 mV, 500 ミリ秒) させ、このとき発生する膜電流変化を記録した。各操作で得られた膜電流変化から本実験の開始時に得られた膜電流変化（主に電位依存性カルシウムチャネルの活性を反映している膜電流変化）を差し引き、電流-電圧関係を求めた（第 2 図挿入 [括弧内]）。何れの電流-電圧関係においても、膜電流は -30 ~ -40 mV より正の膜電位で概ね直線的に増加し、また負の膜電位で減少する、いわゆる外向き整流性が認められた。これは細胞外液に  $\text{Mg}^{2+}$  が存在するときの典型的な NMDA 型グルタミン酸レセプターの電流-電圧関係であり、従って水平細胞に惹起された外向き電流はイオンチャネル直結型グルタミン酸レセプターの活性化によることを示している。TBOA 投与に伴う外向き電流の増加と外向き整流性の顕在は、グルタミン酸トランスポーター阻害が視細胞層標本周辺（これは、水平細胞周辺でもある。）の L-グルタミン酸濃度を上昇させたことを示唆

している。13の標本において TBOA の投与実験を実施したが、総てにおいて外向き電流の増加が観察された。また、高  $K^+$  標準リンガー液の灌流中に TBOA を投与した場合にも、顕著な外向き電流の増加が認められた（図は掲載しない）。

次に、TBOA 投与に伴う外向き電流の増加が視細胞層周辺の L-グルタミン酸濃度上昇によるのか否かを調べた。トラフサンショウウオの眼球内部を 1% Triton-X 液、蒸留水そして正常リンガー液で 9 分間ずつ灌流し、その後 L-15 リンガー液 (17°C) 中に保存した。約 5 時間経過後、眼球内の白濁部（内顆粒層より高次の神経細胞）を極細のピンセットを用いて取り除き、この眼蓋標本を L-15 リンガー液中に約 8 時間保存 (17°C) 後 L-グルタミン酸の放出実験に使用した。白濁部を取り除いた網膜部分（視細胞層標本）を約 2 mm 角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞のシナプス終末が上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約 2 日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって 100  $\mu\ell$  取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した（第 3 図）。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を +35 mV に固定した水平細胞には、+165 pA 程の膜電流（保持電流）が現れた。この水平細胞が付着したパッチ電極を 900  $\mu\text{m}$  程持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動し、水平細胞を降下すると、外向き電流が現れた。水平細胞の降下を続けると、この外向き電流は増大し、+310 pA 程に達して一定となった（第 3 図の矢頭で挟まれた部分）。この時点で水平細胞の降下は止めた。TBOA (100  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、膜電流は徐々に増加し、+420 pA に達した。TBOA を洗い流すと、約 14 分後に元の膜電流レベルに戻った。次に、標準リンガー液を高  $K^+$  標準リンガー液に変えて灌流した。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に +630 pA 程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は +360 pA 付近にまで回復した。ここで、グルタミン酸レセプターの阻害剤であるキヌレン酸 (Kyn; 1 mM) を投与すると、外向き電流は減少し、+170 pA となった。キヌレン酸を洗い流すと、膜電流は +330 pA にまで回復した。L-グルタミン酸 (Glu; 10  $\mu\text{M}$ ) を投与すると、膜電流は +1145 pA にまで増加し、これを洗い流すと +320 pA 付近にまで回復した。再度、TBOA を投与すると、膜電流は +425 pA 付近に達し、一定となった。TBOA 投与中にキヌレン酸 (1 mM) を加えると、膜電流は急速に減少し、+185 pA に達した。キヌレン酸を洗い流すと、膜電流は +410 pA にまで回復した。TBOA を除去すると、膜電流はゆっくりと回復し +315 pA となった。この結果は、TBOA 投与に伴う水平細胞の外向き電流の増加がグルタミン酸レセプター活性の上昇によることを示している。つまり、視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターの阻害は、視細胞層標本周辺の L-グルタミン酸濃度を上昇させたことを示している。



第3図：グルタミン酸トランスポーター阻害に伴う視細胞層標本周辺のL-グルタミン酸濃度上昇

トラフサンショウウオの眼球内部を1% Triton-X液、蒸留水そして正常リンガー液で9分間ずつ灌流し、その後L-15リンガー液(17°C)中に保存した。約5時間経過後、眼球内の白濁部(内顆粒層より高次の神経細胞)を極細のピンセットを用いて取り除き、この眼蓋標本をL-15リンガー液中に約8時間保存(17°C)した。放出実験のために、白濁部を取り除いた網膜部分(視細胞層標本)を約2mm角に切り取り、これをスポイトで吸い取り標準リンガー液を満たした記録槽内に排出し、視細胞終末を上になるように置いた。次に、アメリカナマズ網膜への単離操作を終了して約2日経過後の細胞浮遊液をピペットマンによって100 $\mu$ l取り、記録槽内の視細胞層標本の近くに排出した。水平細胞が記録槽の底部に沈み、不動となった時点で、パッチ電極による膜電流導出を開始した。水平細胞から膜電流の導出が完了した後、標準リンガー液を灌流した。膜電位を+35mVに固定した水平細胞には、+165pA程の膜電流(保持電流)が現れた。この水平細胞が付着したパッチ電極を900 $\mu$ m程持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動し、水平細胞を降下すると、外向き電流が現れた。水平細胞の降下を続けると、この外向き電流は増大し、+310pA程に達して一定となった(矢頭で挟まれた部分)。この時点で水平細胞の降下は止めた。TBOA(100 $\mu$ M)を投与すると、膜電流は徐々に増加し、+420pAに達した。TBOAを洗い流すと、約14分後に元の膜電流レベルに戻った。次に、標準リンガー液を高K<sup>+</sup>標準リンガー液に変えて灌流した。水平細胞の外向き電流は増大を始め、最終的に+630pA程に達した。標準リンガー液に戻すと、膜電流は+360pA付近にまで回復した。ここで、グルタミン酸レセプターの阻害剤であるキヌレン酸(Kyn; 1mM)を投与すると、外向き電流は減少し、+170pAとなった。キヌレン酸を洗い流すと、膜電流は+330pAにまで回復した。ここで、L-グルタミン酸(Glu; 10 $\mu$ M)を投与すると、膜電流は+1145pAにまで増加し、これを洗い流すと+320pA付近にまで回復した。再度、TBOAを投与すると、膜電流は+425pA付近に達した。TBOA投与中キヌレン酸を加えると、膜電流は急速に減少し、+185pAに達した。キヌレン酸を洗い流すと、膜電流は+410pAにまで回復した。TBOAを除去すると、膜電流は+315pAとなった。



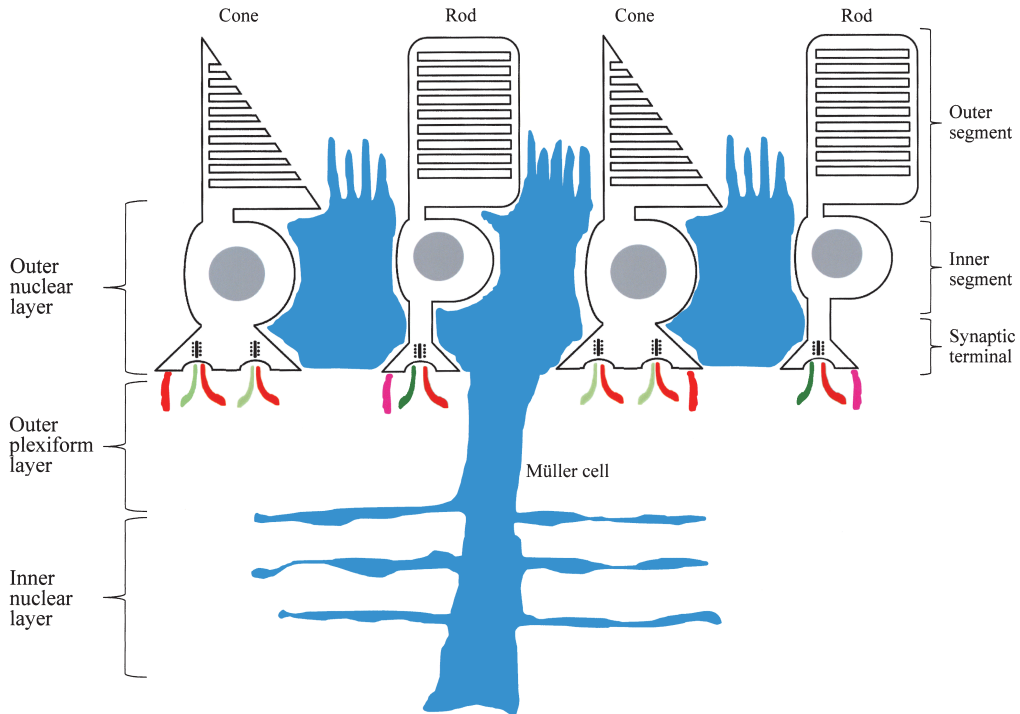
以上の結果は、視細胞層標本から放出されたL-グルタミン酸が視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターによって取り込まれていることを示している。

## 考 察

### トラフサンショウウオ網膜視細胞の特徴とミュラー細胞の配置

トラフサンショウウオ網膜では桿体と錐体に地理的偏りや特別な配置・配列は認められず、両視細胞共に網膜全体に分布している (Sherry *et al.*, 1998)。桿体と錐体の割合は, Attwell *et al.* (1984) によると52.5%と47.5%, Mariani (1986) によると65%と35%, Sherry *et al.* (1998) によると64%と36%そして Zhang *et al.* (2004) によると56%と44%であると報じられている。これらの報告を踏まえると, トラフサンショウウオ網膜では桿体が6割程そして錐体が4割程と考えられる。形態学的特徴に基づき, 桿体は2種類 (small rod と large rod) そして錐体は4種類 (small single cone, large single cone, principal member of double cone と accessory member of double cone) に分類されている (Mariani, 1986; Sherry *et al.*, 1998)。古くから, トラフサンショウウオ網膜視細胞の視物質に関する研究 (視物質の吸収スペクトルやスペクトル感度の調査) は行われており, 桿体は中波長光 (503~523 nm) と短波長光 (435 nm) に感受性を, そして錐体は長波長光 (610~620 nm), 短波長光 (430 nm) および紫外線 (<400 nm) に感受性を示すことなどが明らかとなっている (Harosi, 1975; Attwell *et al.*, 1982; Cornwall *et al.*, 1984; Makino *et al.*, 1990, 1991; Perry & McNaughton, 1991; Jones *et al.*, 1993; Makino & Dodd, 1996)。しかし, 6種類ある視細胞と波長感受性の対応は未だ不完全であり, 今後の研究を待たざるを得ない。

ミュラー細胞は視細胞 (外境界膜) から神経節細胞 (内境界膜) までを貫く極めて大きな細胞であり, 網膜空間の10%程度を占めている (第4図参照)。近年, ミュラー細胞の機能解析が進み, 従来から知られている網膜内の各種イオンや神経伝達物質を含む化学物質等の濃度調節以外にも多様な機能を有していることが明らかとなってきた (例えば, Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979; Harada *et al.*, 2002; Oku *et al.*, 2002; Osakada *et al.*, 2007; Franze *et al.*, 2007; Tomi & Hosoya, 2008)。トラフサンショウウオ網膜ミュラー細胞の突起は, 視細胞 (錐体と桿体) の細胞体とシナプス終末を取り巻くように配置され, その突起はL-グルタミン酸放出部から1~3  $\mu\text{m}$  の距離にあることが報告されている (Sarantis & Mobbs, 1992) (第4図参照)。ミュラー細胞にはグルタミン酸トランスポーターが発現しており, 視細胞の放出したL-グルタミン酸を取り除くために機能していると考えられているが, 詳細は不明である (Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof *et al.*, 1988a, b)。



第4図：トランプサンショウウオ網膜の視細胞とミュラー細胞

脊椎動物網膜には、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）が存在する。網膜内で同種の神経細胞は集まり、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（Outer nuclear layer）、そして双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部位を内顆粒層（Inner nuclear layer）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（Outer plexiform layer）、および双極細胞、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（Inner plexiform layer）と呼ぶ。網膜を構成する神経細胞の中で、視細胞のみが光受容能を有している。視細胞は、光感受性と形態的特徴に基づき桿体（Rod）と錐体（Cone）に分類される。何れの視細胞も特異な形態を呈し、外節、内節そしてシナプス終末の3つの部分から構成される。各部の機能は大きく異なり、外節（Outer segment）では光受容と膜電流変化の発生、内節（Inner segment）では光応答の形成そしてシナプス終末（Synaptic terminal）では神経伝達物質（L-グルタミン酸）の放出の役割を担っている。視細胞で発生した膜電位変化は双極細胞と水平細胞を経て、神経節細胞とアマクリン細胞にシナプス伝達される。網膜内でのシナプス伝達の過程で、三原色から反対色への変換、中心-周辺拮抗的受容野の形成あるいはON経路とOFF経路の形成などの特徴抽出が行われる。

トランプサンショウウオ網膜には、4種類の錐体と2種類の桿体が存在している。両視細胞の波長感受性については未だ完全に解明されていない。錐体では細胞体の直下にシナプス終末が存在するのに対し、桿体では細胞体とシナプス終末の間に細い線維構造が認められる。何れの視細胞のシナプス終末部にも陥入が見られ、この中に第二次神経細胞の樹状突起が進入し、リボンシナプスを形成している。両視細胞共にリボンシナプス以外にベールジャンクションが存在する。ミュラー細胞は視細胞（外境界膜）から神経節細胞（内境界膜）までを貫く極めて大きな細胞であり、この細胞の突起は視細胞（錐体と桿体）の細胞体とシナプス終末を取り巻くように配置されている。視細胞とミュラー細胞にはグルタミン酸トランスポーターが発現し、視細胞によって放出されたL-グルタミン酸を速やかに回収する役割を担っていると考えられている。図中には4視細胞（2錐体と2桿体）、3ミュラー細胞そして水平細胞と双極細胞の樹状突起を記載した。3ミュラー細胞の中で、周辺の2つのミュラー細胞は視細胞周辺部のみ記載した。

### 脊椎動物網膜視細胞のシナプス終末の構造

脊椎動物網膜視細胞（錐体と桿体）のシナプス終末では細胞膜が陥入し、この部分に第二次神経細胞（双極細胞や水平細胞）の樹状突起が入り込み、リボンシナプスを形成している（第4図参照）。この陥入を、錐体では **Pedicle** そして桿体では **Spherule** と呼ぶ（Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970）。錐体のシナプス終末には、複数の **Pedicle** が存在することが報告されている（**Pedicle** の数は、網膜内での視細胞の位置あるいは動物種によって大きく異なる）。この **Pedicle** には二つの水平細胞と一つの双極細胞（主に、ON型双極細胞）の樹状突起が入り込み、トライアド構造を形成している。桿体のシナプス終末には **Spherule** が一つあるいは二つ存在し、この内部に双極細胞と水平細胞の二つずつがそれぞれの樹状突起を伸展している。これらのリボンシナプスにおいて、視細胞から放出されたグルタミン酸はシナプス間隙を拡散し、第二次神経細胞の樹状突起に発現するシナプスレセプターに到達・結合し、イオンチャネルの開閉を生む。視細胞のシナプス終末では水平細胞と双極細胞の樹状突起の配置に地理的な差異があり、例えば錐体ではシナプス終末の放出部分から水平細胞の樹状突起（シナプスレセプターの発現する部位）まで 15~20 nm、また双極細胞の樹状突起（シナプスレセプターの発現する部位）まで 40~240 nm であることが報じられている（Dowling & Boycott, 1966; Raviola & Gilula, 1975; Rao-Mirotnik *et al.*, 1995; Calkins *et al.*, 1996）。このような距離の違いは、放出された L-グルタミン酸が両細胞の樹状突起に到達するまでの時間差を生み、水平細胞や双極細胞の光応答の立ち上がりや持続時間に影響すると推測されている。錐体のシナプス終末には **Pedicle** 以外に双極細胞（主に、OFF型双極細胞）とのシナプス結合が認められ、これをベーサルジャンクション（**Basal junction**）あるいはベーサルコンタクト（**Basal contact**）と呼んでいる（Lasansky, 1973）（第4図参照）。桿体において、ベーサルジャンクションは報告されていない。

Lasansky (1973) はトラフサンショウウオ網膜外網状層の電子顕微鏡観察を行い、㊶錐体と桿体は双極細胞ならびに水平細胞とシナプス連絡していること、㊷錐体と桿体は相互にシナプス連絡していること、㊸桿体では細胞体とシナプス終末が線維状構造で接続されていること、㊹桿体のシナプス終末には分岐が存在すること、㊺錐体では細胞体の直下にシナプス終末が存在すること、㊻錐体のみならず桿体にもベーサルジャンクションが存在すること、㊼錐体と桿体のシナプス小胞の大きさに違いがあること、そして㊽一つの水平細胞あるいは一つの双極細胞が桿体と錐体の両細胞とシナプス連絡していること、などの特徴を明らかにした。

### L-グルタミン酸検出器としての水平細胞の妥当性

アメリカナマズ網膜の水平細胞には、**Kainic acid (KA)** 型グルタミン酸レセプター、**(RS)-**

$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸レセプターそして N-methyl-D-glutamata (NMDA) 型グルタミン酸レセプターが発現している (O'Dell & Christensen, 1986, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Dixon *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993; Elisof & Jahr, 1997)。これらのイオンチャネル直結型グルタミン酸レセプターの中で、特に NMDA 型グルタミン酸レセプターが L-グルタミン酸に対して高い感受性を示すことが知られている。実際、Tachibana & Okada (1991) はこの水平細胞の NMDA 型グルタミン酸レセプターを利用し、キンギョ (*Carassius auratus*) 網膜から単離した双極細胞によって放出される L-グルタミン酸を検出した。本研究でも、トラフサンショウウオ網膜から作製した視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸を検出するため、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を利用した。第 2 図から明らかのように、アメリカナマズ網膜の水平細胞は  $0.5 \mu\text{M}$  という低濃度の L-グルタミン酸を検出できる程高い L-グルタミン酸感受性を有していた。また、第 2 図挿入 (括弧内) の電流-電圧関係は、L-グルタミン酸の検出に主として NMDA 型グルタミン酸レセプターが働いていることを示している。パッチ電極を用いて水平細胞から膜電流を導出した後、水平細胞を視細胞層標本に接近させると外向き電流が現れ、さらに水平細胞を視細胞層標本に近づけると外向き電流は増加し、やがて一定となった。この時点で、水平細胞の接近を中止し、L-グルタミン酸の放出実験を開始した (水平細胞と視細胞層標本間の距離は未だ測定しておらず、不明である)。放出実験終了後、複数の濃度の L-グルタミン酸を投与し、それぞれの濃度で得られた水平細胞の膜電流値から視細胞層標本周辺の L-グルタミン酸濃度を推測した。6 標本を用いた実験の内、4 標本において自発的な放出に伴う標本周辺の L-グルタミン酸濃度は  $0.5 \mu\text{M}$  程そして高  $\text{K}^+$  標準リンガー液の灌流に伴う標本周辺の L-グルタミン酸濃度は  $3 \mu\text{M}$  程であった。しかし、残り 2 標本の結果は、若干高い値を示した。1 標本は自発的な放出に伴う視細胞層標本周辺の L-グルタミン酸濃度は  $1 \mu\text{M}$  程そして高  $\text{K}^+$  標準リンガー液の灌流に伴う標本周辺の L-グルタミン酸濃度は  $5 \mu\text{M}$  程であった。残りの 1 標本は、本研究 (第 2 図) であった。これらの違いは視細胞層標本による L-グルタミン酸の放出量の違いを反映していると考えられるが、詳細は不明である。以上の実験 (第 1 図と第 2 図) は、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞が視細胞層標本によって放出される L-グルタミン酸を検出するために十分な感受性を有していることを示している。

アメリカナマズのみならずキンギョ網膜の水平細胞はメラノプシン (光感受性物質) を発現し、光感受性を有していることが報じられた (Bellingham *et al.* 2002; Hatter *et al.*, 2002; Drivenes *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2003)。水平細胞が光照射されるとメラノプシンが活性化され、水平細胞に発現する電位依存性 (L 型) カルシウムチャネルの活性が数分間以上に亘り修飾されることが明らかとなった (Cheng *et al.*, 2009)。アメリカナマズ網膜水平細胞

に発現する L 型カルシウムチャネルは  $-40$  mV 付近で活性化し、 $-10\sim 0$  mV にピークを持ち、そして  $-40$  mV 以下および  $+30$  mV 以上では活性化しない (第 2 図 A) (Shingai & Christensen, 1983, 1986; Tachibana, 1983; Lasater, 1986; Dixon *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 2009)。第 1 図 B の実験では視細胞層標本と同時に水平細胞も照射されるが、幸いなことに、水平細胞の膜電位は  $+35$  mV に固定されているため、L 型カルシウムチャネルが影響を受けることはない。さらに、照射に伴って水平細胞に惹起された膜電流変化は秒単位の現象であり、Cheng *et al.* (2009) の報告した分単位の現象とは大きく異なっている。これらを勘案すると、照射に伴い水平細胞に惹起された膜電流変化がメラノプシン由来でないことは明白である。つまり、光の点滅に伴い水平細胞に現れた膜電流変化は、視細胞層標本付近の L-グルタミン酸量の増減を反映している。

トラフサンショウウオ眼球から作製した視細胞層標本の細胞構成と L-グルタミン酸放出  
Schmitz & Witkovsky (1996) は、アフリカツメガエル (*Xenopus leavis*) 眼球を Triton-X と蒸留水処理して得られた視細胞層標本を光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡で観察し、視細胞のシナプス終末に水平細胞と双極細胞の突起が残存すること、そしてミュラー細胞の突起が視細胞内節付近に残存することを見つけた。さらに、死んだ細胞のみを選択的に染色する Tripan blue を用いて視細胞層標本を染色し光学顕微鏡観察した結果、視細胞のみならず少数の水平細胞が生存していることが明らかとなった。視細胞層標本作製技術を開発した Cahill & Besharse (1992) も光学顕微鏡による組織観察を行い、視細胞以外に水平細胞が生存していることを報告している。本研究ではトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜に Cahill & Besharse (1992, 1993) の開発した方法を適用し、視細胞層標本作製した。本標本の凍結切片を作製し、光学顕微鏡観察を行った結果、トラフサンショウウオ網膜から作製した視細胞層標本には視細胞以外に何れの細胞も存在しないことが判明した (高橋, 2013)。従って、本研究で水平細胞に惹起された外向き電流は、視細胞層標本によって放出された L-グルタミン酸によることは明白である (高橋, 2013)。

⑦トラフサンショウウオ眼球を Triton X や蒸留水などで処理するとき、①Triton X や蒸留水などでの処理後眼球内の白濁部を除去するとき、そして②白濁部を除去した網膜から視細胞層標本を切り出して記録槽に設置するとき、眼球 (網膜) あるいは視細胞層標本を天井灯、実体顕微鏡照明あるいは倒立顕微鏡照明によって照射する必要がある (少なくとも数分間は照射している)。このため、両視細胞は明順応状態にあると推測された。桿体視物質の再生には色素上皮細胞が、また錐体視物質の再生にはミュラー細胞と色素上皮細胞が必要なことを踏まえると、L-グルタミン酸の放出実験を開始する直前に視細胞層標本 (色素上皮細胞もミュラー細胞も存在しない。) を暗黒に保ったとしても、視物質が再生 (褪色からの

回復)される可能性は極めて低い(例えば, Wang *et al.*, 2009)。幸いなことに, 23標本への光照射実験のうち3標本において, 水平細胞に時間経過の速い膜電流変化が現れた(第1図B)。膜電流変化の時間経過を考慮すると, 視細胞層標本中の錐体に光感受性が残っていたことが窺える。光照射に応じてL-グルタミン酸の放出量を増減させる視細胞層標本は少数であったが, 実験を行った総ての標本において自発的なそして脱分極刺激(高 $K^+$ 標準リナゲル液の灌流)に伴うL-グルタミン酸放出が見られた。

### 視細胞によって放出されたL-グルタミン酸の行方

暗時, 視細胞からL-グルタミン酸は持続的に放出されているが, 網膜が光照射されると放出は直ちに減少あるいは停止する。同時に, L-グルタミン酸はシナプス間隙から速やかに除去される。このL-グルタミン酸除去には, 視細胞のみならずミュラー細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターが関与していると考えられている(例えば, (Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995a, b; Yang & Wu, 1997; Eliasof *et al.*, 1988a, b)。トラフサンショウウオ網膜ではミュラー細胞の突起がPediculeやSpherule内にまで伸展しておらず, ミュラー細胞が視細胞により放出されたL-グルタミン酸の取り込みにどの程度関与しているのかは明らかになっていない(Sarantis & Mobbs, 1992)。近年, マウス網膜の桿体では, 放出されたL-グルタミン酸の殆ど総てが桿体自身によって取り込まれ, ミュラー細胞は関与しないことが報告された(Hasegawa *et al.*, 2006)。その後, ジリス網膜では錐体から放出されたL-グルタミン酸が, 錐体のみならずミュラー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除去される可能性が示唆された(Szmajda & DeVries, 2011)。以上の報告は哺乳動物網膜において, 桿体と錐体とでシナプス間隙からL-グルタミン酸が除去されるしくみが異なっている可能性を示している。視細胞シナプス間隙からのL-グルタミン酸除去にミュラー細胞がどの程度関与しているのかを明らかにするには, 今後も詳細な解析を進める必要がある。

グルタミン酸トランスポーターは, 細胞膜とシナプス小胞に発現していることが知られている。現在, 細胞膜のグルタミン酸トランスポーター(Excitatory Amino Acid Transporter; EAAT)は5種のサブタイプ(EAAT1~EAAT5)に, またシナプス小胞のグルタミン酸トランスポーター(Vesicular Glutamate Transporter; VGLUT)は3種類のサブタイプ(VGLUT1~VGLUT3)に分類されている。トラフサンショウウオ網膜を構成する細胞には, sEAAT1, sEAAT2A, sEAAT2B, sEAAT5AとsEAAT5Bが発現していることが明らかになっている(salamander Excitatory Amino Acid Transporter; sEAAT)(Eliasof *et al.*, 1998a, b)。この中で, 視細胞(桿体と錐体)とミュラー細胞にはsEAAT1, sEAAT2A, sEAAT5AとsEAAT5Bが発現している(Eliasof *et al.*, 1998a, b)。しかし, なぜ複数のサブ

タイプが単一の細胞に発現しているのかについては明らかになっていない。

### 視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターの機能とシナプス間隙のL-グルタミン酸濃度

グルタミン酸トランスポーターの何れのサブタイプも  $\text{Na}^+$  依存性であり、1分子のL-グルタミン酸の取り込みに2～3分子の  $\text{Na}^+$  が細胞外から細胞内に共役輸送される。この際、細胞内から1分子の  $\text{K}^+$  を排出し、1分子の  $\text{H}^+$  を細胞内に取り込む（例えば、Eliasof *et al.*, 1998a）。また、グルタミン酸トランスポーターにはクロライドチャネルに連動しているサブタイプが存在することも明らかとなっている（Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Picaud *et al.*, 1995b）。グルタミン酸トランスポーターは細胞外の  $\text{Na}^+$  濃度上昇、細胞内の  $\text{K}^+$  濃度上昇あるいは膜電位の過分極側への移動に伴い活性が上昇することが知られている（例えば、Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof *et al.*, 1998a, b）。

視細胞は光照射に伴い過分極する。この過分極は視細胞によるL-グルタミン酸放出を減少あるいは停止させる。同時に、視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターの機能を亢進し、細胞外からのL-グルタミン酸除去を加速する。本研究で用いた視細胞層標本には視細胞（桿体と錐体）以外の何れの細胞も存在せず、光照射に伴う視細胞層標本周辺のL-グルタミン酸量の減少は視細胞によって放出されるL-グルタミン酸量の減少に加え、視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターによるL-グルタミン酸の回収を反映していると推測される（第1図B）。視細胞によって放出されたL-グルタミン酸の回収にグルタミン酸トランスポーターが関与していることは、TBOA（グルタミン酸トランスポーター阻害剤）投与に伴い視細胞層標本周辺のL-グルタミン酸濃度が上昇することから明らかである（第2図と第3図）。また、視細胞層標本周辺のL-グルタミン酸濃度の推測結果（第2図参照）を踏まえると、視細胞によって放出されたL-グルタミン酸の半分程が視細胞自身に回収される可能性がある。

## 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。

## 引用文献

- Attwell, D. and Wilson, M. (1980), Behaviour of the rod network in the tiger salamander mediated by membrane properties of individual rods, *J. Physiol.*, **309**: 287–315.
- Attwell, D., Werblin, F. S. and Wilson, M. (1982), The properties of single cone isolated from the tiger salamander retina, *J. Physiol.*, **328**: 259–283.
- Attwell, D., Wilson, M. and Wu, S. M. (1984), A quantitative analysis of interactions between photoreceptors in salamander (*Ambystoma*) retina, *J. Physiol.*, **352**: 707–737.
- 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.
- Bader, C. R., Macleish, P. R. and Schwartz, E. A. (1979), A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander, *J. Physiol.*, **296**: 1–26.
- Barnes, S (1994), After transduction: Response shaping and control of transmission by ion channels of the photoreceptors inner segment, *Neuroscience*, **3**: 447–459.
- Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A. R., Wells, D. J. and Foster, R. G. (2002), Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position, *Mol. Brain Res.*, **107**: 128–136.
- 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.
- Cahill, G. M. and Besharse, J. C. (1992), Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina, *Vis. Neurosci.*, **8**: 487–490.
- Cahill, G. M. and Besharse, J. C. (1993), Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal Photoreceptors, *Neuron*, **10**: 573–577.
- Calkins, D. J., Tsukamoto, Y. and Sterling, P. (1996), Foveal cones form basal as well as invaginating junction with diffuse ON bipolar cells, *Vision Res.*, **36**: 3373–3381.
- Cheng, N., Tsunenari, T. and Yau, K. W. (2009), Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts, *Nature*, **460**: 899–904.
- 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.
- Cornwall, M. C., McNichol, E. F., Jr. and Fein, A (1984), Absorbance and spectral sensitivity measurements of rod photoreceptors of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, *Vision Res.*, **24**: 1651–1659.
- Diek, S. tom and Brandstätter, J. H. (2006), Ribbon synapses of the retina, *Cell Tiss. Res.*, **326**: 339–346.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1993), Glutamate suppresses HVA calcium currents in catfish horizontal cells by raising intracellular proton concentration, *Neuron*, **11**: 267–277.
- Dowling, J. E. and Boycott, B. B. (1966), Organization of the primate retina: Electron microscopy, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **166**: 80–111.
- Drivenes, O., Sjøviknes, A. M., Ebbesson, L. O. E., Fjose, A., Seo, H.-C. and Helvik, J. V. (2003), Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain, *J. Comp. Neurol.*, **456**: 84–93.
- Eliasof, S. and Jahr, C. E. (1997), Rapid AMPA receptor desensitization in catfish cone horizontal Cells, *Vis. Neurosci.*, **14**: 13–18.
- Eliasof, S. and 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.



- Fain, G. L. and Quandt, F. N. (1980), The effects of tetraethylammonium and cobalt ions on responses to extrinsic current in the toad rods, *J. Physiol.*, **303**: 515–533.
- Fain, G. L., Gerschenfeld, H. M. and Quandt, F. N. (1980), Calcium spikes in the toad rods, *J. Physiol.*, **303**: 495–513.
- Fain, G. L., Quandt, F. N. and Gerschenfeld, H. M. (1978a), Calcium-dependent regenerative responses in rods, *Nature*, **269**: 707–710.
- Fain, G. L., Quandt, F. N., Bastian, B. L. and Gerschenfeld, H. M. (1978b), Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoreceptors, *Nature*, **272**: 467–469.
- 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.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A. and Guck, J. (2007), Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**: 8287–8292.
- 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.
- 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.
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L. S. and Wada, K. (2002), Microglia-Müller glial cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration, *J. Neurosci.*, **22**: 9228–9236.
- Harosi, F. (1975), Absorption spectra and linear dichroism of some amphibian photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, **66**: 357–382.
- 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.
- Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M. and Yau, K.-W. (2002), Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity, *Science*, **295**: 1065–70.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Heidelberger, R., Thoreson, W. B. and Witkovsky, P. (2005), Synaptic transmission at retinal Ribbon synapses, *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**: 682–720.
- Jenkins, A., Muñoz, M., Tarttelin, E. M., Bellingham, J., Foster, R. G. and Hankins, M. W. (2003), VA opsin, melanopsin, and an inherent light response within retinal interneurons, *Curr. Biol.*, **13**: 1269–1278.
- Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**: 529–531.
- Jones, G. J., Fein, A., Macnichel, E. F., Jr. and Cornwall, M. C. (1993), Visual pigment bleaching in isolated salamander retinal cones: Microspectrophotometry and light adaptation, *J. Gen. Physiol.*, **102**: 483–502.
- 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.
- 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.
- Kolb, H. (1970), Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **B258**: 261–283.
- Lasansky, A. (1973), Organization of the outer synaptic layer in the retina of the larval tiger salamander, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **B265**: 471–489.
- Lasater, E. M. (1986), Ionic currents of cultured horizontal cells isolated from white perch retina, *J. Neurophysiol.*, **55**: 499–513.

- 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.
- Makino, C. L. and Dodd, R. L. (1996), Multiple visual pigments in a photoreceptor of the salamander retina, *J. Gen. Physiol.*, **108**: 27–34.
- Makino, C. L., Taylor, W. R. and Baylor, D. A. (1991), Rapid change movements and photosensitivity of visual pigments in salamander rods and cones, *J. Physiol.*, **442**: 761–780.
- Makino, C. L., Kraft, T. W., Mathies, R. A., Lugtenburg, J., Miley, M. E., VAN DER Steen, R. and Baylor, D. A. (1990), Effects of modified chromophores on the spectral sensitivity of salamander, squirrel and macaque, *J. Physiol.*, **424**: 545–560.
- Mariani, A. P. (1986), Photoreceptors of the larval tiger salamander retina, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **227**: 483–492.
- Marc, R. E. and Lam, D. M. K. (1981), Uptake of aspartic and glutamic acid by photoreceptors in goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 7185–7189.
- 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.
- 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.
- Naka, K.-I. and Otsuka, T. (1974), Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. II. Morphological identification, *J. Neurophysiol.*, **38**: 72–91.
- Newman, E. (1987), Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study, *J. Neurosci.*, **7**: 2423–2432.
- Newman, E. (1991), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander, *J. Neurosci.*, **11**: 3972–3983.
- Newman, E. (1994), A physiological measure of carbonic anhydrase in muller cells, *Glia*, **11**: 291–299.
- Newman, E. (1995), Glial cell regulation and Extracellular potassium, In *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. and Ransom, B. R.), pp717–731, Oxford Press.
- Newman, E. (1996), Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium-bicarbonate cotransport, *J. Neurosci.*, **16**: 159–168.
- Newman, E. (1999), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat, *Glia*, **26**: 302–308.
- 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.
- Oku, H., Ikeda, T., Honma, Y., Sotozono, C., Nishida, K., Nakamura, Y., Kida, T. and Kinoshita, S. (2002), Gene expression of neurotrophins and their high-affinity Trk receptors in cultured human Müller cell, *Ophthalmic Res.*, **34**: 38–42.
- Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A. and Takahashi, M. (2007), Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals, *J. Neurosci.*, **27**: 4210–4219.
- Otsuka, T. (1978), Combination of oil droplets with different types of photoreceptor in a freshwater turtle,

- Geoclemys reevesii*, *Sensory Process*, **2**: 321–325.
- Perry, R. J. and McNaughton, P. A. (1991), Response properties of cones from the retina of the tiger salamander, *J. Physiol.*, **433**: 561–587.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Grant, G. B. and Werblin, F. S. (1995a), Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander, *J. Neurophysiol.*, **74**: 1760–1771.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Wellis, D. P., Lecar, H. and Werblin, F. S. (1995b), Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 9417–9421.
- 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.
- 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.
- Rao-Mirotznik, R., Harkins, A. B., Buchsbaum, G., and Sterling, P. (1995), Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse, *Neuron* **14**: 561–569.
- Raviola, E. and Gilula, N. B. (1975), Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits, *J. Cell Biol.*, **65**: 192–222.
- Rieke, F. and Schwartz, E. A. (1996), Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse, *J. Physiol.*, **493**: 1–8.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1977), Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina, *Nature*, **268**: 654–655.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1978), Glutamine synthetase in the developing rat retina: An immunohistochemical study, *Expt. Eye Res.*, **27**: 435–444.
- Sarantis, M. and Mobbs, P. (1992), The spatial relationship between Müller cell processes and the photoreceptor output synapse, *Brain Res.*, **584**: 299–304.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1996), Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptor layer of the *Xenopus* retina, *J. Neurosci. Meth.*, **68**: 55–60.
- 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.
- Sherry, D. M., Bui, D. D. and Degrip, W. J. (1998), Identification and distribution of photoreceptors subtypes in the neotenic salamander retina, *Vis. Neurosci.*, **15**: 1175–1187.
- 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.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1983), Sodium and calcium currents measured in isolated catfish horizontal cells under voltage clamp, *Neuroscience*, **10**: 839–897.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1986), Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*), *J. Neurophysiol.*, **56**: 32–49.
- Sjöstrand, F. S. (1953), Ultrastructure of the outer segment of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope, *Cell. Comp. Physiol.*, **42**: 15–44.
- Sjöstrand, F. S. (1958), Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from sections, *J. Ultrastruct. Res.*, **2**: 122–170.
- Sterling, P. and Matthews, G. (2005), Structure and function of ribbon synapses, *Trend. Neurosci.*, **28**: 20–29.
- Szmajda, B. A. and DeVries, S. H. (2011), Glutamate spillover between mammalian cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **31**: 13431–13441.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. (1983), Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **345**:

- 329–351.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. (1988), L-Glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process that may contribute to the interaction between photoreceptors *In situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5315–5319.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- Tachibanaki, S., Tsushima, S. and Kawamura, S. (2001), Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**: 14044–14049.
- Tachibanaki, S., Arinobu, D., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tsushima, S. and Kawamura, S. (2005), Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-activated visual pigment in cones, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**: 9329–9334.
- Takahashi, K.-I. (1986), Ion channels in *in situ* rod of the frog retina as revealed by intracellular current injection, *Keio J. Med.*, **35**: 162–179.
- 高橋恭一 (2012a), 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 (2012b), 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, *人間環境学研究*, **10**: 31–51.
- 高橋恭一 (2013), トラフサンショウウオ網膜視細胞から放出される L-グルタミン酸の検出法, *人間環境学研究*, **11**: 59–90.
- 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., Dixon, D. B. and Copenhagen, D. R. (1993), Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina, *J. Gen. Physiol.*, **101**: 695–714.
- 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.
- Tomi, M. and Hosoya, K. (2008), Molecular mechanisms of the inner blood-retinal barrier transporter, In *Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery* (eds. Tombran-Tink, J. and Barnstable, C. J.), pp139–154, Humana Press.
- 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.
- Vogalis, F., Shiraki, T., Kojima, D., Wada, Y., Nishiwaki, Y., Jarvinen, J. L. P., Sugiyama, J., Kawakami, J., Masai, I., Kawamura, S., Fukada, Y. and Lamb, T. D. (2011), Ectopic expression of cone-specific G-protein-coupled receptor kinase GRK7 in zebrafish rods leads to lower photosensitivity and altered responses, *J. Physiol.*, **589**: 2321–2348.
- Wang, J.-S., Estevez, M. E., Cornwell, M. C. and Kefalov, V. J. (2009), Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation, *Nature Neurosci.*, **12**: 295–302.
- 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.
- Yang, J.-H. and Wu, S. M. (1997), Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina, *Vision Res.*, **37**: 827–838.
- Zhang, J., Yang, Z. and Wu, S. M. (2004), Immunocytochemical analysis of spatial organization of photoreceptors and amacrine and ganglion cells in the tiger salamander retina, *Vis. Neurosci.*, **21**: 157–166.