

# 網膜生理学の新たな展開

——1980年以降の水平細胞機能解析を中心にして——

高 橋 恭 一

(受付 2016 年 9 月 6 日)

## 1. は じ め に

Galvani はカエルの下半身標本（カエルの皮を剥ぎ、脊柱、脊髄と脚筋肉を残した標本）を作製し、脊髄と脚の筋肉のそれぞれが異なる金属に接触（銅のフックに標本を吊るし、脚の筋肉が鉄製の柵に触れる。）したときに収縮することを見出した（Galvani, 1791）。雷や起電機による放電も筋肉を収縮させることを踏まえ、Galvani (1791) は筋肉が電気を蓄えており、金属に触れ回路を形成することで放電して筋肉が収縮すると推察した（動物電気説）。一方、Volta (1793) は Galvani の実験に興味を持ち同様の実験を行い、筋肉収縮が生物電気によるのではなく、2種の金属との接触が原因（後に、金属のイオン化傾向の違いに基づき電気を取り出すことができることに気が付き、電堆を発明した。）であると推察した（金属接触説）。同じような実験を行ったにもかかわらず、両学者の実験解釈は全く異なっていた。Galvani (1797) は金属を用いず、神経の切断端を筋肉に接触させることによって収縮させることに成功し、動物電気説の正当性を主張した。一方、Volta (1800) は電堆（電池）を発明した後、筋肉収縮の解釈は金属接触説へと傾いた。これ以降約30年もの間、動物電気に関する研究は殆ど行われなかった。

1820年頃、検流計が考案・作製され、筋肉や神経の損傷電流（静止電流）や活動電流を検出できるようになった（例えば、Nobili, 1828）。1840年過ぎには、Matteucci (1838, 1842) や Du Bois Reymond (1848, 1849, 1877) により、動物電気の研究が行われるようになった。興奮時に発生する活動電流は微弱かつ一過性（短時間）の現象であるため、正確な測定と記録は非常に難しかった。20世紀に入り、Einthoven (1902) は絃検流計を開発し、これによって検出される電流変化を写真撮影することに成功した（ヒトの心筋活動に伴って発生する電氣的記録（心電図）を記録した [Einthoven & Jolly, 1908]。）。続いて、Adrian & Matthews (1927a, b, 1928) は高増幅率の真空管増幅器を利用し、毛細管電位計により電位記録を写真撮影することにより、ヨーロッパアカガエル (*Rana temporaria*) 視神経線維から活動電位の細胞外誘導を行った。そして、ついに Hodgkin & Huxley (1939) はヨーロッパオオヤリイカ (*Loligo forbesi*) 巨大神経線から活動電位を細胞内誘導し、これを陰極線オシロスコープ

に映し出すことに成功した。Ling & Gerard (1949) は世界で初めてガラス管微小電極を用いてカエル縫工筋（脚の骨格筋）の膜電位の細胞内記録に成功し、その後この技術は急速に普及した。膜電位固定法が開発されると、神経細胞や感覚細胞の膜電流変化を調べることも可能となった (Cole, 1949; Marmont, 1949)。この方法を活用して、単一の興奮性細胞を用いた電気生理学的研究が益々盛んとなった。

網膜の研究でもガラス管微小電極が積極的に活用され、1970年代初頭には網膜を構成する神経細胞（視細胞 [桿体と錐体]、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）の光照射に対する膜電位変化が概ね解明された（例えば、Dowling & Werblin, 1969, 1971 Haggemdal; Werblin & Dowling, 1969）。次に、これらの膜電位変化発生に関わるしくみを解明すべく、㊦光学および電子顕微鏡を利用した網膜内神経細胞とシナプスの形態学的研究、㊧放射性同位体（ラジオアイソトープ）で標識した化学物質を用いた網膜内神経伝達物質の研究（ラジオアイソトープ法）そして㊨神経伝達物質候補やこの合成酵素の抗体を用いた網膜内シナプスの研究（免疫組織化学法）が始まった。この結果、1970年代後半には視細胞が神経伝達物質として L-グルタミン酸を放出している可能性、そして水平細胞が  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminogutytic acid; GABA) やグリシンを放出している可能性などが明らかとなった（例えば、Lam & Steinman, 1971; Lam, 1972b; Murakami *et al.*, 1972, 1975; Lam *et al.*, 1978; Marc & Lam, 1981a, b）。そして、網膜内神経細胞が形成する神経回路（神経細胞間のシナプス連絡）に関する知見も少しずつではあるが、蓄積していった (Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970; Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。

1980年代に入ると、網膜生理学の標本や記録法に大きな変化が表れた。網膜標本は従来から用いられている剥離網膜標本や眼盃網膜標本に加えて、㊩網膜をタンパク質分解酵素処理と機械処理して得られる単離（・培養）神経細胞そして㊪網膜を縦方向（視細胞側から神経節細胞側）に 100~200  $\mu\text{m}$  の厚さに切断して得られるスライス網膜標本が利用されるようになった（例えば、Werblin, 1978; Johnson & Lam, 1981; Tachibana, 1981, 1983）。1985年頃には膜電位あるいは膜電流を記録するためにガラス管微小電極法<sup>1)</sup>ではなく、パッチクランプ法が網膜研究でも導入され始めた。この結果、網膜を構成する神経細胞の細胞膜に発現するイオンチャネルやレセプターの解析が可能となり、網膜の電気生理学が再び息を吹き返した（例えば、Tachibana, 1985）。

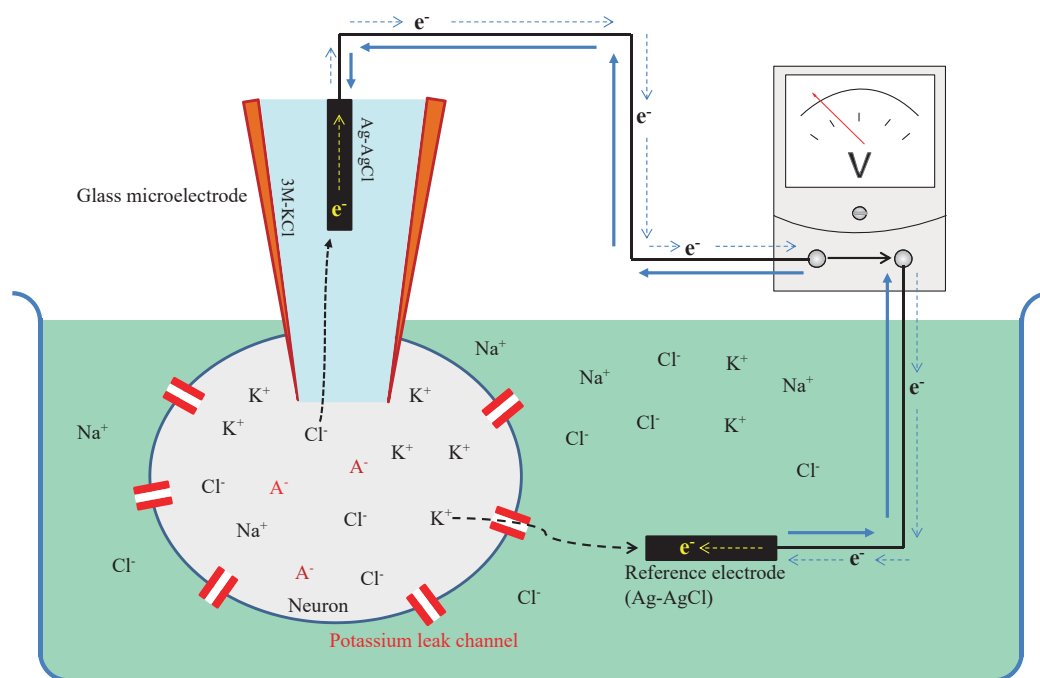
本論文では1950年以降の神経科学における研究法の変遷を通覧し、1980年以降の網膜研究の成果を、特に水平細胞の機能解析に着目して調査した。

## 2. ガラス管微小電極を利用した電気生理学 ——膜電位測定から膜電流測定へ——

Galvani (1791) による動物電気の発見から Hodgkin & Huxley (1939) による神経細胞の活動電位の細胞内誘導まで約140年が経過している。この間、数多くの物理・化学分野での発見とそれに基づく多くの発明が生物の生理機能の解明を支えてきた。特に、電気生理学での測定機器開発への貢献が著しかった。Ling & Gerard (1949) はガラス管微小電極を開発し、筋肉細胞や神経細胞の膜電位を細胞内誘導することが可能となり、電気生理学は大きく発展した。この技術により、筋肉細胞や神経細胞の静止電位や活動電位発生のしくみ、神経細胞－筋肉細胞間ならびに神経細胞間シナプスでの情報伝達のしくみなどが次々と解明された。

### 2-1 神経細胞の膜電位発生機序

Young (1936a, b, 1938) はイカ (*Sepia officinalis* [ヨーロッパコウイカ] と *Loligo pealii* [アメリカケンサキイカ]) の外套に巨大神経線維 (運動神経細胞) が存在すること、そしてこの神経がイカ外套の運動に関与していることを報告した。早速、Cole & Curtis (1939) はアメリカケンサキイカ外套にある巨大神経線維を切り出し、活動電位発生中のインピーダンス測定<sup>2)</sup>を行い、膜抵抗が減少することを明らかにした。この結果は、まさに Bernstein の膜説の証明であった (Bernstein, 1902)。同年、Hodgkin & Huxley (1939) はヨーロッパオオヤリイカの巨大神経線維 (直径約 500  $\mu\text{m}$ ) にガラス管電極 (直径約 100  $\mu\text{m}$ ) を挿入して細胞内外の膜電位測定を実施し、世界で初めて活動電位の細胞内誘導に成功した。活動電位の最大振幅は 80～95 mV であり、不思議なことに活動電位のピークは 0 mV を大きく凌駕し +40 mV 付近にまで達することを見出した (0 mV よりプラスの電位になることを、オーバーシュートと呼ぶ。)。Bernstein の膜説では神経細胞の興奮時に細胞膜のカリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) に対する透過性が消失して分極がなくなることを想定し、この変化こそが活動電位発生のしくみであると推測していた。このため、Hodgkin & Huxley (1939) の実験で明らかとなった活動電位のピークが 0 mV よりもプラスになることは驚きであり、少なくとも活動電位の発生を Bernstein の膜説で説明することができないことが明らかとなった。このため、活動電位発生には  $\text{K}^+$  以外のイオンが関与していると考えざるを得なくなった。この後、Boyle & Conway (1941) はヨーロッパアカガエル縫工筋を用いて静止時の細胞膜の透過性を調査し、 $\text{K}^+$  と塩化物イオン (クロライドイオン;  $\text{Cl}^-$ ) に透過性があることを見出した。また、Hodgkin & Katz (1949) はオーバーシュートの原因がナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) にあると推測し、巨大神経線維の細胞外液の  $\text{Na}^+$  濃度を変えて活動電位への影響を調査した。こ



第1図：神経細胞の静止電位測定（模式図）

3M-塩化カリウム（3M-KCl）を充填したガラス管微小電極内に銀-塩化銀線（Ag-AgCl）を差し込み、前置増幅器と主増幅内蔵型電圧計（Voltmeter）に接続した。非興奮時の神経細胞にこのガラス管微小電極を挿入し、細胞外液に置いた基準電極（Reference electrode）（銀-塩化銀線）との間の電位差を測定した。非興奮時の神経細胞ではナトリウムイオン（ $\text{Na}^+$ ）/カリウムイオン（ $\text{K}^+$ ）交換ポンプが機能し、 $\text{Na}^+$ を細胞外に汲み出しそして $\text{K}^+$ を細胞内に汲み入れているため、細胞内には $\text{K}^+$ そして細胞外には $\text{Na}^+$ が多くなっている。細胞内外の陰イオン濃度にも差があり、細胞内に有機陰イオン（ $\text{A}^-$ ）そして細胞外には塩化物イオン（ $\text{Cl}^-$ ）が多くなっている。非興奮時の神経細胞では漏洩性カリウムチャネル（Potassium leak channel）が開口し、このチャネルを通じて $\text{K}^+$ が細胞外に流出している。 $\text{K}^+$ の流出は拡散力とクーロン力に依存しており、 $\text{K}^+$ の平衡電位に達するとその移動は見かけ上なくなる。このとき、細胞外に比べて細胞内は60～90 mV 陰性となり、これを静止電位という。細胞膜を挟んで移動するのは $\text{K}^+$ のみならず $\text{Na}^+$ や $\text{Cl}^-$ も含まれる。このため、静止膜電位は $\text{K}^+$ の平衡電位とは一致しない。非興奮時の神経細胞ではイオンの移動は主に $\text{K}^+$ であるため、細胞内外のイオンに偏りが生じ、細胞内に陰イオンがそして細胞外に陽イオンが多くなる（ $\text{K}^+$ の移動に拡散力だけが働けば、細胞内外の $\text{K}^+$ 濃度は一定となるが、クーロン力が働くため細胞内外の $\text{K}^+$ 濃度は不自然な状態で平衡に達する。当然、細胞内外液の電気的中性条件は崩れ、細胞内外のイオンに偏りが生じる。）。細胞内で過剰となった陰イオンである $\text{Cl}^-$ はガラス管微小電極内に移動し、電子（ $e^-$ ）を銀-塩化銀電極に預ける。この結果、電子は金属線と機器類を経由して細胞外にある基準電極に達し、ここで過剰にある陽イオン（例えば、 $\text{K}^+$ ）に引き渡される。電流の流れは電子の流れとは逆であるため、細胞外の方が細胞内よりも陽性となる。小型の細胞（サイズが10～50  $\mu\text{m}$ ）から膜電位記録を得るため、ガラス管微小電極の先端を小さくする必要があり、結果として電極の電気抵抗（10～200 M $\Omega$ ）が著しく高くなる。高抵抗の電極を利用して膜電位を誘導・測定するには、入力インピーダンスの高い前置増幅器が必要である。

の結果、静止時（非活動時）に神経細胞の細胞膜の  $K^+$  透過性が高く、 $Na^+$  の透過性は低いが、活動時（興奮時）に  $Na^+$  の透過性が上昇することを見つけた。しかし、これらを定量的に解析する手法は未だ開発されていなかった。

Cole (1949) と Marmont (1949) は、細胞膜を一定の膜電位に保つために必要な膜電流を測定する方法を開発した。これは膜電位固定法と呼ばれ、1950年以降の電気生理学を牽引する画期的な手法であった。Hodgkin & Huxley (1952a-e) はこの膜電位固定法を利用して活動電位発生に関与する膜電流（イオン電流）の解析を行い、一過性のナトリウム電流とそれに続くカリウム電流を観察した。この結果から、活動電位は⑦細胞膜の  $Na^+$  に対する透過性が上昇し、 $Na^+$  が細胞内に流入して膜電位を脱分極させること、続いて④  $Na^+$  の透過性が急激に減少し、同時に  $K^+$  の透過性が増加して再分極することによって発生することが明らかとなった。さらに、膜電流の解析から、神経細胞膜を表現する電気的等価回路を導き出した（2-1-6参照）。そして、記録されたイオン電流の大きさや時間経過を考慮し、膜電位の時間経過を単純な6つの常微分方程式（これらを合わせて Hodgkin & Huxley の方程式と呼ぶ。）で表現することに成功した（2-1-2-2参照）。Hodgkin & Huxley (1952a-e) ではナトリウム電流とカリウム電流がそれぞれのイオンが別の通路を経由することを想定した。後年、Narahashi *et al.* (1964) は筋肉に発生する活動電位がフグ毒（テトロドトキシン）投与によって抑制されることから、 $Na^+$  が通過する経路（すなわちナトリウムチャンネル）が存在することを明らかにした。

以上の研究から、神経細胞膜にはイオンチャンネルが存在し、これらを各種のイオンが通過することで膜電流が発生すると考えられるようになった。

### 2-1-1 静止電位のイオン機序 —— Nernst の式と Goldman-Hodgkin-Katz の式 ——

Matteucci (1838, 1842) は筋肉の損傷に伴う電流（限界電流あるいは損傷電流）、そして筋収縮に伴い限界電流が消失することを観察した。その後、Du Bois Reymond (1848) は筋肉のみならず神経においても、正常面に対して切断面が電気的に陰性であることを明らかにした。この電位の差は、細胞の外側に対して内側が負に分極していることが原因である。従って、損傷部では細胞膜の損傷により分極が消失し、やがてこの部位の電位が細胞外部に近づくあるいは同じになると推測された。その後、神経細胞や筋細胞では興奮部とその隣接する非興奮部との間の電位差が生じ、この電位差によって生まれる電流が移動することによって興奮が伝播すると考えられた（例えば、Du Bois Reymond, 1948, 1849, 1877）。しかし、当時の科学技術では詳細な解析そして証明を行うことはできなかった。

物理化学の基礎を築いた van't Hoff (1887) は半透膜を介した浸透圧を定式化すること、続いて Nernst (1888) は電解質の拡散電位の定式化することに成功した。特に、Nernst の式



は細胞膜の両側に異なる濃度の電解質があり、これら電解質が細胞膜を選択的に透過する場合に発生する拡散電位の概念を確立し、その後の電気生理学的研究の解釈に大いに貢献した。Bernstein (1902) は細胞膜が陽イオンに対する選択的な透過性を有しており、特に  $K^+$  に対する透過性が高いと仮定した。このため、細胞内には負イオンが多く、そして細胞外には陽イオンが多いという電氣的二重層が形成され、静止電位が発生すると考えた。また、神経細胞は興奮すると、細胞膜の選択的透過性が消失すると推測した (Bernstein の膜説)。この膜説では、細胞の興奮に伴い細胞内外の電位差が消失すると想定された。

Bernstein の膜説では細胞膜が  $K^+$  に対して選択的透過性を持ち、 $K^+$  濃度が細胞外よりも細胞内で高く、しかも細胞膜は  $K^+$  を透過すると仮定した。 $K^+$  は濃度勾配に従って細胞内から細胞外へと移動しようとする拡散力が働き、これと反対方向 (細胞外から細胞内方向) にクーロン力が働くため、静止電位では  $K^+$  の出入りが平衡している。これが平衡電位であり、これを Nernst の式、 $E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$  で表現できる。ここで、 $E_K$  は  $K^+$  の平衡電位 (mV)、 $R$  は気体定数 (8.31 J/mol/K)、 $T$  は絶対温度 (K;  $C + 273^\circ C$ )、 $F$  はファラデー定数 (96500 C/mol)、 $[K]_o$  は細胞外の  $K^+$  濃度 (mM)、そして  $[K]_i$  は細胞内の  $K^+$  濃度 (mM) を指す。例えば、 $27^\circ C$  では  $E_K = 58 \log \frac{[K]_o}{[K]_i}$  (自然対数を常用対数に変換する。) となる。 $[K]_o$  が 2.5 mM そして  $[K]_i$  が 140 mM を代入すれば、 $E_K = 58 \log \frac{2.5}{140}$  となり、この結果  $K^+$  の平衡電位は  $-101.4$  mV となる。

既述したように、Hogekins & Huxley (1939) はイカの巨大神経線維から活動電位を細胞内誘導することに成功し、この電位のピークが 0 mV を超えて +30 mV にも達することを明らかにした。この結果を Bernstein の膜説で説明することはできなかった。Steinbach (1941) ならびに Steinbach & Spiegelman (1943) は、アメリカケンサキイカの巨大神経線維を用いて細胞内外の主要イオンの濃度測定を試みた。この結果、 $K^+$  濃度は細胞内が細胞外よりも約20倍高いこと、また細胞内の  $Na^+$  および  $Cl^-$  濃度は細胞外の約  $\frac{1}{10}$  であることを明らかにした。続いて、Boyle & Conway (1941) はヨーロッパアカガエルの縫工筋を摘出し、この筋細胞膜の静止状態でのイオン透過性を調査した。この結果、 $K^+$  と  $Cl^-$  に対する透過性はあるが、 $Na^+$  に対する透過性は低いことを見出した。これらの研究成果を踏まえると、活動電位のみならず静止電位についてもその発生のしくみを再検討 (Bernstein の膜説の再検討) することが必要となった。

神経細胞や筋細胞の静止電位では  $K^+$  のみならず  $Na^+$  と  $Cl^-$  の透過性も存在することを踏まえ、静止電位を表現するために3種のイオンを考慮した Goldman-Hodgkin-Katz の式 (略して GHK 方程式) が提唱された (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949)。具体的に、 $V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Na}[Na]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Na}[Na]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$  である。 $V_m$  は静止電位、 $P_{Na}$ 、 $P_K$  と  $P_{Cl}$  は  $Na^+$ 、 $K^+$  と  $Cl^-$  の透過係数 (透過係数はイオンの膜の透過し易さを表すパラメーターであり、コンダクタン

スと密接な関係にある。しかし、これを正確に求めることは難しい。幸いなことに、GHK 方程式において  $P_{Na}$ 、 $P_K$  と  $P_{Cl}$  では絶対値ではなく相対的な値を用いることができる。) を指す。例えば、27°C では  $V_m = 58 \log \frac{[K]_o + (P_{Na}/P_K)[Na]_o + (P_{Cl}/P_K)[Cl]_i}{[K]_i + (P_{Na}/P_K)[Na]_i + (P_{Cl}/P_K)[Cl]_o}$  となる。 $[Na]_o$  が 145 mM,  $[K]_o$  が 2.5 mM および  $[Cl]_o$  が 125 mM, そして  $[Na]_i$  が 25 mM,  $[K]_i$  が 140 mM および  $[Cl]_i$  が 10 mM のとき、27°C において  $Na^+$  の平衡電位は  $E_{Na} = 58 \log \frac{[Na]_o}{[Na]_i}$ ,  $K^+$  の平衡電位は  $E_K = 58 \log \frac{[K]_o}{[K]_i}$ , そして  $Cl^-$  の平衡電位は  $E_{Cl} = 58 \log \frac{[Cl]_i}{[Cl]_o}$  にそれぞれの濃度を代入して求めることができる。 $Na^+$  の平衡電位は 44.3 mV,  $K^+$  の平衡電位は -101.4 mV, そして  $Cl^-$  の平衡電位は -63.6 mV となる。細胞の静止状態におけるそれぞれのイオンの透過係数の比が、 $P_K$  を 1 とすると  $P_{Na}$  が 0.04,  $P_{Cl}$  が 0.45 であるので、これらを GHK 方程式に代入すると  $58 \log \frac{2.5 + (0.04)145 + (0.45)10}{140 + (0.04)25 + (0.45)125} = 58 \log \frac{12.8}{197.25}$  となり、これを計算すると -68.9 mV となる。細胞膜に  $Na^+$  や  $Cl^-$  の透過性が存在するのであるから、これらのイオン種を考慮した GHK 方程式が  $K^+$  の平衡電位よりも真の静止電位に近づくのは当然である。

## 2-1-2 活動電位のイオン機序

### 2-1-2-1 膜電位固定法の開発と膜電流の測定

ガラス管微小電極による膜電位の細胞内誘導によって、細胞外を基準電位 (0 mV) とした細胞内電位 (膜電位) を測定することが可能となった。しかし、膜電位を測定する方法では神経細胞の膜電位変化の発生に関わるしくみを詳細に調査することは困難であった。Hodgkin & Huxley (1949) は膜電位変化にイオンコンダクタンス (イオンチャネル) が関係していることを予見し、これを測定するために膜電位固定法を活用した (Hodgkin & Huxley, 1952a-e)。

細胞膜には、細胞膜を通過するイオンによる膜抵抗成分と細胞膜の容量に起因する膜容量成分が存在する。膜容量を介する電流成分は膜電位を変化させたときに一過性に流れるのみであり、膜抵抗を流れる電流 (イオンコンダクタンス [あるいはイオンチャネル] を経由する電流) と区別することは可能である。イオンの透過性はコンダクタンス (抵抗の逆数) で得られ、このコンダクタンスは膜電位と時間の二変数の関数となるが、膜電位固定法では膜電位を一定 (固定) にすることで時間の関数 (一変数の関数) として扱うことができ、イオンコンダクタンスを経由する電流のみを観察することができる。

Hodgkin & Huxley (1952a-e) の膜電位固定法を利用した実験では、ヤリイカ属のイカ (*Loligo*) の巨大神経線維内にガラス管で作製した固定電極を挿入し、細胞外に置いた電極の間の電位差 (膜電位) を一定 (固定) にし、膜電流を測定した。ところが、脊椎動物では神経細胞が小型であり、イカの巨大神経線維と同様の方法を適用することは不可能である。このため、通常のガラス管微小電極を利用した膜電圧固定法の開発が模索された。単一ガラス

管微小電極を利用する場合、細胞内に刺入した電極を介して膜電位固定と膜電流測定を行う必要がある（例えば、Wilson & Goldner, 1975; Bader *et al.*, 1979; Redman, 1992）。ガラス管微小電極の抵抗が非常に高いため、この電極を利用して膜電位を固定することは難しく、信頼性の高い実験結果を得ることは至難であった。このため、二連式ガラス管微小電極が開発され、膜電位固定と膜電流測定が異なる電極で行うようになった（例えば、Bader *et al.*, 1979; Dietzel *et al.*, 1992）。この方法は通電用と記録用の電極が近接しているため、電極間に容量結合が発生するという欠点があったが、小型の神経細胞においても漸く信頼性のある実験結果を得ることができるようになった。

やがて、パッチクランプ法が開発され、微小なパッチ膜の膜電圧を固定して、単一あるいは比較的少数のイオンチャネルに基因する膜電流を記録することが可能となった（Neher & Sakmann, 1976）（3-1参照）。同時に、このパッチ電極では細胞全体を膜電位固定することも容易となり、1980年以降膜電位固定法が急速に普及した。

### 2-1-2-2 Hodgkin & Huxley の式

イオンチャネルの概念が未だ確立していない時代、Hodgkin & Huxley (1952a-e) はイカの巨大神経線維に発生する活動電位を膜電位固定法によって解析し、活動電位が内向きに流れるナトリウム電流と外向きに流れるカリウム電流によって形成されていることを明らかにした。実験結果を踏まえ、活動電位を記述するための数理モデルを考案した。活動電位発生に関与するイオン電流の電位依存性や時間依存性を記述するために、細胞膜に  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を透過するコンダクタンス（ナトリウムコンダクタンスとカリウムコンダクタンス）を想定し、これらを  $m$ 、 $h$  と  $n$  のパラメーターで表現した。これらのパラメーターは 0 ～ 1 の値を取り、 $m$  はナトリウムコンダクタンスの活性化ゲートがゲートを開口している確率（現在は、ナトリウムチャネルの開口確率と考えられている。）、 $h$  はナトリウムコンダクタンスの不活性化ゲートがゲートを開口している確率、 $n$  はカリウムコンダクタンスの活性化ゲートがゲートを開口している確率を指している。このモデルでは、⑦細胞膜にはコンデンサーを流れる電流とイオン電流があること、④イオン電流としてナトリウム電流、カリウム電流とリーク電流があること、⑤各イオン電流はオームの法則 ( $I_{\text{ion}} = g_{\text{ion}} (V - E_{\text{ion}})$ ) に従うこと ( $I_{\text{ion}}$  はイオン電流、 $g_{\text{ion}}$  はイオンコンダクタンス [抵抗の逆数] と  $E_{\text{ion}}$  はイオンの平衡電位)、⑥膜の電気容量 ( $C_m$ ) と各イオンの平衡電位 ( $E_{\text{Na}}$ ,  $E_{\text{K}}$ ,  $E_{\text{L}}$ ) は変化しないこと、を条件としている。Hodgkin & Huxley (1952e) は、全膜電流 ( $I$ )、膜電位 ( $V$ )、時間 ( $t$ )、ナトリウムコンダクタンスの活性化パラメーター ( $m$ ) と不活性化パラメーター ( $h$ )、そしてカリウムコンダクタンスの活性化パラメーター ( $n$ ) の 6 変数からなる常微分方程式をたて、活動電位を定式化した ( $m$ 、 $n$  と  $h$  は 0 と 1 の間の数値を取る。また、以下の関数は 6.3°C を条



件としている。)

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + m^3 \cdot h \cdot G_{Na} \cdot (V - E_{Na}) + n^4 \cdot G_K \cdot (V - E_K) + g_L \cdot (V - E_L)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1 - m) - \beta_m \cdot m \quad \alpha_m = \frac{0.1(25 - V)}{\exp\left(\frac{25 - V}{10}\right) - 1} \quad \beta_m = 4 \exp\left(\frac{-V}{18}\right)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h \quad \alpha_h = 0.07 \exp\left(\frac{-V}{20}\right) \quad \beta_h = \frac{1}{\exp\left(\frac{30 - V}{10}\right) + 1}$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n \cdot (1 - n) - \beta_n \cdot n \quad \alpha_n = \frac{0.01(10 - V)}{\exp\left(\frac{10 - V}{10}\right) - 1} \quad \beta_n = 0.125 \exp\left(\frac{-V}{80}\right)$$

ここで、 $I$  は膜電流、 $C_m$  は膜容量、 $g_{Na}$ 、 $g_K$  と  $g_L$  はナトリウムコンダクタンス、カリウムコンダクタンスおよびリークコンダクタンス ( $G_{Na}$ 、 $G_K$  と  $G_L$  はそれぞれの最大コンダクタンス)、 $V$  は静止電位を基準とした膜電位、 $E_{Na}$ 、 $E_K$  と  $E_L$  は  $Na^+$ 、 $K^+$  およびリークイオン ( $Cl^-$  を想定している。) の平衡電位 (静止電位を基準とした平衡電位)、 $\alpha$  は閉状態から開状態へ移行する反応速度定数、 $\beta$  は開状態から閉状態へ平衡する反応速度定数を指す。それぞれのパラメーターの単位 ( $\alpha$  と  $\beta$  以外) は膜電流が  $\mu A/cm^2$ 、膜電位が  $mV$ 、コンダクタンスが  $mS/cm^2$ 、時間が  $msec$  そして膜容量 (電気容量) が  $\mu F/cm^2$  である。

Hodgkin & Huxley (1939, 1952a–e) は、ナトリウムコンダクタンスとカリウムコンダクタンスがナトリウムチャネルとカリウムチャネルに対応することを想定していた。実際、Narahashi *et al.* (1964) は低濃度のテトロドトキシン (フグ毒) を用いて、筋細胞のナトリウム電流が選択的に抑制されることを見出し、 $Na^+$  がナトリウムコンダクタンスを介して細胞内に流入する可能性を示した。1970年代半ば、Neher & Sakmann (1976) はパッチクランプ法を開発し、単一イオンチャネルを流れるイオン電流を検出することに成功した。1980年代に入り分子生物学的研究が開花すると、ナトリウムチャネルを構成するタンパク質のアミノ酸構造 (一次構造) が明らかとなった (Noda *et al.*, 1984)。

### 2-1-3 細胞内外のイオン分布 ——細胞膜に存在する輸送体——

Ringer (1882a, b; 1883a, b) はカエルから摘出した心臓を生存 (収縮) させるために、蒸留水に塩化ナトリウム (塩) のみならず塩化カリウムや塩化カルシウムなどを溶かした溶液を作製し灌流した。この溶液はリンガー液 (カエル用のリンガー液の成分は、塩化ナトリウム  $[NaCl]$ ; 133 mM, 塩化カリウム  $[KCl]$ ; 1.34 mM, 重炭酸ナトリウム  $[NaHCO_3]$ ; 2.76 mM と塩化カルシウム  $[CaCl_2]$ ; 1.25 mM である [Miller, 2004]。) と呼ばれ、今でも輸液の代表として動物実験のみならずヒトでも点滴などで用いられている。カエル以外の動物用

リンガー液も作製され、また必要に応じてブドウ糖や乳糖などが加えられた。Arrhenius (1884) は水に塩を加えると、塩は電気伝導体、すなわちイオンになることを見つけた。この発見により、動物の電気現象を説明するために提唱されていた Du Bois Reymond の荷電粒子（回転）説や Hermann の局所電流説は過去の学説となった。また、Overton (1899) は細胞膜が脂質である可能性を報じ、このため細胞内外に存在する物質（イオンも含む。）が細胞膜を通過することは困難であると考えられた。こんな折、Bernstein (1902) は膜説を提唱し、この後四半世紀この仮説が興奮性細胞の電氣的活動を説明するために使用された。

Hodgkin & Huxley (1939) はイカ巨大神経線維を利用して活動電位の細胞内誘導に成功し、活動電位のピークが 0 mV を超えてプラス（細胞内が細胞外よりも高電位になる。）になることを示した。しかし、この結果を Bernstein の膜説（活動電位の発生は  $K^+$  に対する選択的透過性が消失し、総てのイオンに対する透過性が上昇する。このため、細胞内外の電位差が無くなる。）で説明することはできなかった。この頃、Boyle & Conway (1941) はヨーロッパアカガエルの縫工筋を利用して細胞膜を挟むイオンの移動を測定した。この結果、静止状態の筋肉細胞では  $K^+$  と  $Cl^-$  に透過性があるものの、 $Na^+$  の透過性は認められないことを見出した。Steinbach & Spiegelman (1943) と Keynes & Lewis (1951) はイカ巨大神経線維内の細胞内液の各種のイオンの移動を測定し、細胞外液に比して細胞内に  $K^+$  が高濃度で存在することを報じた。続いて、Hodgkin & Katz (1949) も放射性同位体を用いて、静止状態のイカの巨大神経線では  $Na^+$  よりも  $K^+$  に透過性があるが、活動電位発生時に  $Na^+$  は  $K^+$  よりも透過性が高くなることを明らかにした。同時に、活動電位発生には細胞外の  $Na^+$  が必須であることも示した。これらの知見を踏まえ、興奮性細胞では静止時の膜電位は主に  $K^+$ 、そして活動時の膜電位（活動電位）は主に  $Na^+$  の透過性上昇を予見した。実際、Hodgkin & Huxley (1952a-e) は活動電位発生時に  $Na^+$  透過性の上昇のみならず  $K^+$  の透過性も上昇していることを証明した。つまり、活動電位のピークが +30 mV に達する理由が  $Na^+$  の透過性上昇によること、そして活動電位の時間経過が速い理由が  $K^+$  の透過性上昇によること明らかとなり、以降活動電位の発生に関し Bernstein の膜説は否定され、Hodgkin & Huxley のイオン説（あるいはナトリウム説）が定着した。

Keynes (1951) および Keynes & Lewis (1951) はナトリウムやカリウムの放射性同位体である  $^{24}Na$  や  $^{42}K$  を利用して、イカの巨大神経線維の活動電位発生に伴う両イオンの量を実測した。この結果、1 発の活動電位あたり  $3 \times 10^{-12} \sim 4 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$  のイオンが移動することが明らかとなった。例えば、直径が  $500 \mu\text{m}$  のイカ巨大神経線維（長さが 1 cm）において 1 発の活動電位発生に伴い細胞内に流入する  $Na^+$  量を  $3 \times 10^{-12} \text{ mol}$  と仮定すると、細胞内での  $Na^+$  の増加は約  $2.5 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^3$  と推測される。イカ巨大神経細胞内の  $Na^+$  濃度が約 10 mM ( $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/cm}^3$ ) であることを踏まえれば、1 発の活動電位の発生で

細胞内に増加する  $\text{Na}^+$  量は極めて少ない。しかし、活動電位が繰り返し発生すれば、 $\text{Na}^+$  の濃度上昇は無視できなくなる。また、直径の小さな神経軸索（脊椎動物では直径が  $0.1 \mu\text{m}$  程度の神経軸索が存在する。）では、その変化の程度が大きい。このため、活動電位発生後に  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を元に戻すしくみが必要である。

Hodgkin & Keynes (1955) はイカの巨大神経線維を用いて、 $\text{Na}^+$  を細胞外そして  $\text{K}^+$  を細胞内に交換輸送するシステムの存在を見出した。そして、この交換輸送が 2,4-Dinitrophenol や青酸化合物のみならずウアバインなどの化学物質によって修飾されること、そして ATP (Adenosine 5'-triphosphate) が必要な能動輸送であることも明らかにした。後に、 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の交換が 1 対 1 ではなく、 $\text{Na}^+$  が 3 に対して  $\text{K}^+$  が 2 の割合で交換されることが証明された。これが、Skou (1957) によって報じられた  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  交換ポンプ ( $\text{Na}^+$  ポンプや  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase と呼ばれる。) である。

現在、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  交換ポンプは総ての動物細胞の細胞膜に普遍的に存在する能動輸送体であり、細胞膜を隔てて  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の濃度勾配を作り出すしくみとしてよく知られている。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  交換ポンプは以外に、細胞膜には細胞内外のイオンの輸送に関わるポンプやトランスポーターが存在することが明らかとなっている（例えば、 $\text{Na}^+/\text{カルシウムイオン} [\text{Ca}^{2+}]$  交換輸送体、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体や  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$  交換輸送体など）。

#### 2-1-4 シナプス電位のイオン機序

1897年、Sherrington は脳内で神経細胞同士が繋がる構造をシナプスと命名した (Foster & Sherrington, 1897)。当時、シナプスにおいて神経細胞同士が物理的に繋がっているのか否かを光学顕微鏡で明らかにすることはできず、結果としてシナプス接続に関する論争が始まった。Cajal はシナプスで両神経細胞は繋がっていないとする説（ニューロン説）を唱え、一方 Golgi は網状説（シナプスで両神経細胞は連続して繋がっているとする説）で対抗した。1950年代に入り電子顕微鏡の使用が可能になり、シナプスを構成する 2 つの神経細胞間に隙間（シナプス間隙と呼ぶ。）があることが観察され、ニューロン説に軍配が上がった（例えば、Palade & Palay, 1954; DeRobertis & Bennett, 1955）。以降、多くのシナプスが化学シナプスであると考えられるようになった。

Loewi (1921) は迷走神経の刺激に伴い可溶性の化学物質（迷走神経物質と命名した。）が放出され、これが心臓に作用することを明らかにした。ニューロン説と網状説の決着が未だついていない折、この研究はシナプス伝達における化学物質の役割を示唆しており、ニューロン説を支持する有力な証拠となった。Dale (1914) は平滑筋や腺などに対する有機合成されたアセチルコリンの作用を詳細に調査し、ニコチン様作用とムスカリン様作用が存在することを報告した。後年、Dale & Dudley (1929), Dale & Feldberg (1934a, b) および Dale

*et al.* (1936) は、Loewi (1921) によって発見された迷走神経物質がアセチルコリンであることを明らかにした。1940年代に入ると、Dale はシナプスでのシグナル伝達が化学物質を介していることを主張（シナプス伝達の化学説）し、電気的シグナル伝達を主張（シナプス伝達の電気説）する Eccles と激しく対立した<sup>3)</sup>。しかし、Eccles はシナプス伝達に遅延（現在では、化学シナプスでは 0.5 msec 程度のシナプス遅延が生じることが明らかとなっている。）が存在すること、そして電気説では抑制性シナプス電位の発生を説明できないなどを踏まえ、シナプスの電気説を断念した（Brock *et al.*, 1951, 1952; Eccles, 1982）。その後、Eccles は抑制性シナプス後電位について詳細な研究を展開した。また、1934年と1952年に Dale が行った講演（Dale, 1934, 1952）を踏まえ、Eccle は Dale の法則（すなわち、「1つの神経細胞は1種類の神経伝達物質を放出する。」）を提案した（Eccles *et al.*, 1954）。この法則は長年正しいと考えられてきた、近年、神経終末に複数の化学物質が共存する報告（Hökfelt *et al.*, 1980）、あるいは実際に一つの神経細胞から2種類の神経伝達物質が放出されている報告（Lundberg, *et al.*, 1980）が現れた。

金属電極全盛の時代である1940年代初頭、神経細胞間のシナプスを対象とした詳細な研究を行うことは困難であったが、神経筋接合部（運動神経細胞と筋肉細胞間のシナプスを神経筋接合部と呼ぶ。）の研究は始まっていた。Katz & Kuffler (1941) および Eccles *et al.* (1941) はオーストラリア産のアマガエル (*Hyla aurea*) の神経筋標本の利用し、神経筋接合部に生じる膜電位変化を細胞外誘導する実験を行った。運動神経線維を刺激すると、筋肉に持続性の電位応答に続いて二相性の活動電位（細胞外誘導）が発生すること、クラーレ投与に伴い持続性の電位応答は徐々に減弱すること、そしてこの電位応答の振幅が約30%になると二相性活動電位が消失することを見出した。この持続性の電位応答は終板電位と呼ばれ、アセチルコリンやニコチン投与による影響が認められた。また、神経筋接合部に多量のアセチルコリンエステラーゼ存在すること、アセチルコリンエステラーゼ拮抗剤の投与で電位応答の時間経過が延長すること、そして神経組織でアセチルコリンが合成されていることなども報告された（Koelle & Friedenwald, 1949; Fatt & Katz, 1951; Couteaux, 1955; De Robertis, 1964; Whittaker, 1964）。これらの研究から、神経筋接合部におけるシナプス伝達のメカニズムとして、運動神経終末への活動電位の伝播→神経終末部からアセチルコリンの放出→筋肉細胞（筋線維）における終板電位の発生→筋肉細胞における活動電位の発生→筋肉細胞収縮の流れが明らかとなった（Eccles, 1948; Hunt & Kuffler, 1950; Rosenblueth, 1950）。1950年以降、ガラス管微小電極を用いて膜電位変化を細胞内誘導できるようになると、神経筋接合部の生理学的研究は一層進んだ。

Fatt & Katz (1950, 1952) はヨーロッパアカガエルの神経筋標本作製し、筋肉にガラス管微小電極を刺入し、膜電位変化を細胞内誘導した。運動神経線維への刺激を与えていない

にもかかわらず、筋肉に微弱な終板電位（約 0.5 mV 振幅を持ち、1 秒に 1 回程度の頻度で発生する膜電位変化）が発生することを見出し、微小終板電位と名付けた。そして、この微小終板電位が運動神経終末からのアセチルコリンの量子的放出（一定量のアセチルコリンが放出されること）であることを報じた。その後、Del Castillo と Katz (1954) はイギリス産のヨーロッパアカガエルの神経筋標本を低濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  と高濃度のマグネシウムイオン ( $\text{Mg}^{2+}$ ) に暴露し、神経伝達物質の放出を低下させた状態で微小終板電位の発生を調査し、この自発性微小終板電位の振幅がポアソン分布<sup>4)</sup>に従うことを見出した（生理的な条件下ではポアソン分布ではなく、二項分布を示すことが明らかとなっている。）。自発性微小終板電位の発生は神経終末の活動と連動していないが、放出が量子的に行われることを示す重要な発見であった。これらの成果に基づき、運動神経終末からのアセチルコリンの放出は量子的に行われ、この量子的放出は自発的に行われるのみならず、運動神経刺激によって量子的放出が増加すると考えられた。このような神経伝達物質の量子的放出は他でも証明され、量子仮説と呼ばれている（例えば、Johnson & Wernig, 1971）。1950年代半ば、電子顕微鏡が生物分野で使用され、シナプスの形態学的研究が開始された。化学シナプスの電子顕微鏡観察では、神経細胞同士のシナプスのみならず神経筋標本においてシナプス終末部にシナプス小胞が存在することが明らかにされた（例えば、Palade & Palay, 1954）。Heuser & Reese (1973) はカエルの運動神経終末の刺激後、シナプス小胞が細胞膜に融合していることを電子顕微鏡で観察し、この結果に基づきアセチルコリンの量子的放出はシナプス小胞単位で行われると推測した。1960年以降、電子顕微鏡を用いた神経研究は一層加速し、化学シナプスに加え、シナプス間隙が無く両細胞が接着した状態のシナプス（これを、電気シナプスと呼ぶ。）が存在することも明らかとなった（例えば、Furshpan & Potter, 1959）。

運動神経終末から放出されたアセチルコリンが筋肉に作用して終板電位を発生するしくみについて、Fatt & Katz (1951) は複数のイオンの透過性が上昇することを観察した。さらに、Takeuchi & Takeuchi (1960) はヒョウガエル (*Rana pipiens*) の筋肉細胞に膜電位固定法を適用し、ナトリウムならびにカリウムコンダクタンスが選択的に上昇することを明らかにした。Takeuchi & Takeuchi (1960) の成果を踏まえると、神経筋接合部における終板電位（シナプス電位）の逆転電位は  $V_r = \frac{\Delta g_{\text{Na}} E_{\text{Na}} + \Delta g_{\text{K}} E_{\text{K}}}{\Delta g_{\text{Na}} + \Delta g_{\text{K}}}$  となる。ここで、 $V_r$  は終板電位の逆転電位、 $\Delta g_{\text{Na}}$  と  $\Delta g_{\text{K}}$  は筋肉終板部のナトリウムコンダクタンスとカリウムコンダクタンス、そして  $E_{\text{Na}}$  と  $E_{\text{K}}$  は  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の平衡電位を指す。例えば、神経接合部で  $E_{\text{Na}}$  が +50 mV と  $E_{\text{K}}$  が -100 mV、 $\Delta g_{\text{Na}}$  と  $\Delta g_{\text{K}}$  の比が 9 対 5 であれば、これらの値を上記に代入し、 $V_r = \frac{(9)(+50) + (5)(-100)}{9+5} = -3.6 \text{ mV}$  となる。この研究以降、神経細胞間に形成されるシナプスでもシナプス電位発生 of のしくみの解析が始まった（例えば、Nishi & Koketsu, 1960; Eccles & Libet, 1961; Kobayashi & Libet, 1968, 1970; Libet & Tosaka, 1969）。興奮性シナプス後電位



のみならず抑制性シナプスにおける電位発生の研究も進み、抑制シナプスでは  $\text{Cl}^-$  が関与していることなども明らかとなった（例えば、Brock *et al.*, 1952; Fatt & Katz, 1953; Coombs *et al.*, 1955; Boistel & Fatt, 1958）

化学シナプスではシナプス前抑制も発見（Dudel & Kuffler, 1961）され、その後 Bliss & Lømo（1973）は海馬における長期増強や Ito *et al.*（1982）は小脳において長期抑圧が明らかとなった。現在、中枢神経系の機能解明では、神経組織内に形成された神経回路の解明ならびにこの回路を形成するシナプスの解明が必須となっている。

### 2-1-5 シナプス伝達のしくみ ——シナプスレセプターと膜輸送体——

筋肉と神経の電気現象を自作の検流計を用いて調査した Du Bois Reymond（1848, 1849, 1877）は、十分な科学的証拠を示すことなく、運動神経刺激によって放出された化学物質が筋肉に伝播し収縮させるという仮説、いわゆるシナプス伝達の化学説を発表した（Du Bois Reymond, 1848, 1877）。一方、Hermann（1879a, b）はシナプス伝達の電気説を提唱した。1950年半ば、化学説に軍配が上がるまで長年に亘る論争が続いた。これら両仮説が提唱される以前、Bernard（1856）はカエル神経筋標本を用いた研究により、クラレー<sup>5)</sup>を神経に作用させると神経刺激で筋収縮は生じるが、筋肉に作用させると神経刺激を行っても収縮しないことを発見し、この結果に基づきクラレーは神経筋接合部にのみ作用することを報じた。この研究はシナプス伝達の化学説を間接的に支持する証拠であった。このクラレーは、1950年以降神経筋接合部のメカニズム解明に大いに貢献した。

Langley（1898, 1901, 1905）は内臓の調節に関わる神経系の研究を進め、これらを自律神経系と呼び、この自律神経系が交感神経系と副交感神経系に分類されることを明らかにした。さらに、骨格筋はニコチン投与によって収縮すること、およびクラレー投与によって収縮が抑制されることから、生体には二つの薬物が共通に作用する場所があることを推測し、受容（体）物質と名づけた。これがレセプター（受容体）という概念を生むきっかけとなった。その後、Dale（1914）はアセチルコリンにニコチン様とムスカリン様の2つの異なる作用があることを示し、Loewi（1921）のカエルの摘出心臓実験の研究（可溶性の化学物質が迷走神経から分泌され、これが心臓の拍動を制御している。）へと繋がった。また、Clark（1926）はカエルの摘出臓器を利用し、アセチルコリンなどの濃度－反応曲線を求め、アセチルコリンなどの薬物はレセプターと結合する可能性を示した（つまり、薬物レセプターの存在を予想していた。）。当時、網状説とニューロン説が凌ぎを削っている最中、シナプス伝達に関しては電気説が優勢であり、化学説の火は細々と燃え続けている状態であった。その後もレセプターの実体を明らかにすべく研究は行われたが、これを証明するには至らなかった。1970年代に入り、放射性同位体である  $^{125}\text{I}$  や  $^3\text{H}$  でラベルした  $\alpha$ -ブングアロトキシン（台湾産のア

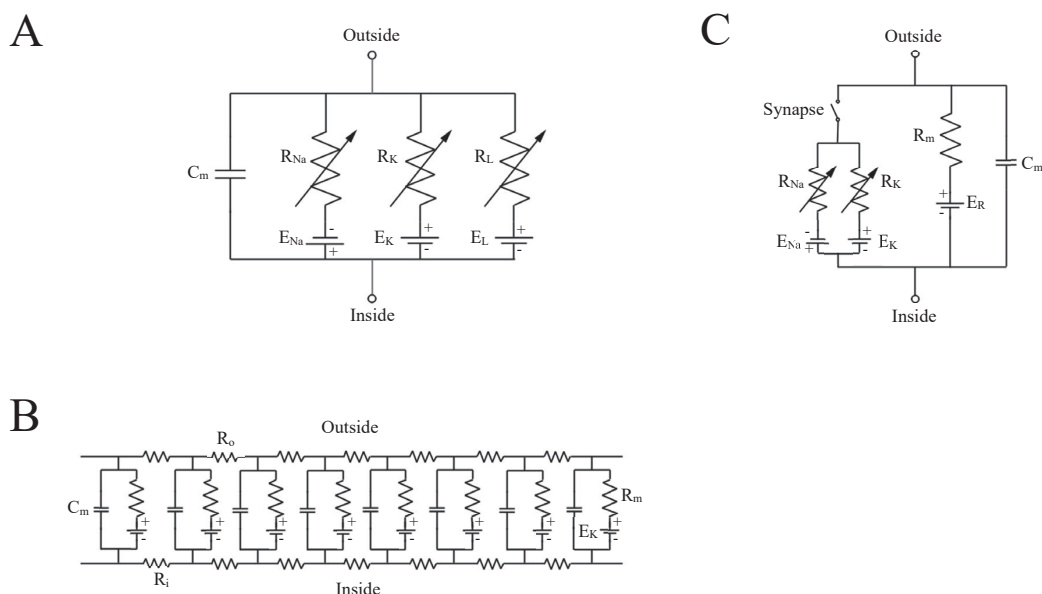
マガサヘビ [*Bungarus multicinctus*] の産生する毒素) がアセチルコリンレセプターに不可逆的に結合することを利用してレセプターの局在を明らかにする研究そしてアセチルコリンレセプターとアセチルコリンとの反応を分子レベルで解析する研究が行われ、アセチルコリンレセプターの存在が明らかにされた (例えば, Miledi & Potter, 1971; Katz & Miledi, 1972; Berg *et al.*, 1972; Chiu *et al.*, 1973)。

シナプス伝達に關与する化学物質 (神経伝達物質) としてアセチルコリン以外にもアドレナリンやノルアドレナリン, GABA やグリシンなどが知られている (例えば, Bowery & Smart, 2006; Verlenstein, 2002)。アセチルコリンの場合, シナプス間隙に放出された後, アセチルコリンエステラーゼによってコリンと酢酸に分解され, 神経伝達物質としての役割を終える (例えば, Nachmansohn, 1968)。しかし, これ以外の神経伝達物質では分解酵素が見つからず, 別の方法でシナプス間隙から除去されると推測された。その後, シナプス間隙に放出された神経伝達物質を回収するための候補として, 膜輸送体 (トランスポーター) が考えられるようになった。

1984年に, アセチルコリンレセプターや電位依存性ナトリウムチャネルの cDNA クローニング<sup>6)</sup> が行われ, イオンチャネルの一次構造 (アミノ酸配列)<sup>7)</sup> が解明された (Noda *et al.*, 1982, 1984a–c; Takai *et al.*, 1985)。爾来, 分子生物学手法がイオンチャネルとレセプターの研究にも利用されるようになった。さらに, 近年低温電子顕微鏡の開発によりアセチルコリンレセプターの立体構造が概ね明らかにされた (Toyoshima & Unwin, 1988, 1990; Unwin, 1995)。他のイオンチャネルやレセプターの立体構造の研究も鋭意進行している。また, 薬理学的研究も急速に進展し, イオンチャネルの阻害剤やレセプターのアゴニストやアンタゴニスト<sup>8)</sup> が多く発見され, それぞれの特性を明らかにするために活用された。この結果, それぞれのレセプターは細分化された。そして, レセプタータンパク質を用いた免疫組織化学研究によって, レセプタータンパク質の発現部位も明らかとなった。

## 2-1-6 神経細胞の電気特性 —— 等価回路 ——

Hodgkin & Huxley (1952a–e) はイカ外套にある巨大神経線維を膜電位固定して得られた実験結果に基づき, 脂質二重膜でできた細胞膜をコンデンサー,  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を選択的に透過する通路をコンダクタンス (抵抗の逆数), そして  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の細胞内外の不均衡から生じる平衡電位を電池と考え, これらの要素を Hodgkin & Huxley 方程式として数式化すると同時にこの方程式から神経細胞膜の電氣的等価回路を構築した (第 2 図 A 参照)。この研究以降, 細胞膜に存在するイオンコンダクタンス (イオンチャネル) を抵抗そして細胞膜の容量成分をコンデンサーと考え, 興奮性細胞の電氣的性質を表すために電氣的等価回路が多用されるようになった。



第2図：神経細胞の電気的等価回路

神経細胞が示す電気現象（例えば、静止膜電位や活動電位など）を理解するため、細胞膜で生じる電気的変化を電気回路に置き換えて考えることができる。この電気回路を等価回路と呼び、細胞内外の体液（各種のイオンが溶けた液体）に挟まれた細胞膜（絶縁体）をコンデンサー、そして細胞膜に存在するイオンチャネルを内部抵抗のある電池と想定する。

A：Hodgkin & Huxley (1954a-e) によるヤリイカ属のイカ (*Loligo*) の巨大軸索を用いた膜電位固定法を利用した研究により、活動電位の発生に関する電気的等価回路を構築した。 $C_m$  は細胞膜の膜容量、 $E_{Na}$ 、 $E_K$  と  $E_L$  は  $Na^+$ 、 $K^+$  とリークイオン（主に  $Cl^-$ ）の平衡電位、 $R_{Na}$ 、 $R_K$  と  $R_L$  は  $Na^+$ 、 $K^+$  とリークイオン（主に  $Cl^-$ ）の透過性あるいはコンダクタンス（電流の流れやすさ）の逆数（抵抗）である。透過性あるいはコンダクタンスは膜電位と時間の関数として機能するため、可変（矢印）抵抗として表わされている。

B：非興奮時の神経細胞（活動電位を発生していない状態の神経細胞）において、神経軸索を電気信号が伝導するときの電気的等価回路である。 $E_R$  は膜電位（静止電位）、 $R_m$  は膜抵抗、そして細胞膜の膜容量を  $C_m$  とし、伝導方向への軸索内部の抵抗を  $R_i$ 、そして軸索外部の抵抗を  $R_o$  で表す。軸索抵抗と膜抵抗があるために、神経軸索の一端に与えられた電気信号は伝導するにつれて減衰する。また、膜容量の充電に時間がかかるため、伝導には時間遅れが生じる。この考えはケーブル理論として知られている（例えば、Rall, 1967）。

C：興奮性シナプスにおいてシナプス伝達（例えば、運動神経細胞から筋肉細胞への Acetylcholine を介するシナプス伝達）が生じると、 $K^+$  および  $Na^+$  に透過性を持つイオンチャネルが開く（例えば、Takeuchi & Takeuchi, 1960）。シナプス電位の変化は神経伝達物質のシナプスレセプターへの結合に依存しており、神経細胞に発生する活動電位のように自己再生的ではない。これは活動電位発生の原因となるイオンチャネルとシナプス電位発生の原因となるイオンチャネルが機能的・構造的に異なることによることに基因する。C の図はシナプス後神経細胞のシナプスレセプター付近の細胞膜の様子を電気的等価回路で表現している。 $C_m$  は細胞膜の膜容量、 $E_{Na}$  と  $E_K$  は  $Na^+$  と  $K^+$  の平衡電位、 $R_{Na}$  と  $R_K$  はシナプスレセプターと連動する  $Na^+$  と  $K^+$  の透過性あるいはするコンダクタンス（電流の流れやすさ）の逆数（抵抗）、 $E_R$  は膜電位（静止電位）、そして  $R_m$  は膜抵抗（静止時の膜抵抗）を示している。抑制性シナプスの場合、例えばクロライドチャネルを考えれば良い。

1950年後半、神経細胞の樹状突起はシナプス入力を受け取る部位であり、その構造や膜の電気的性質の究明は急務となった。ところが、樹状突起は細くそして複雑に分枝しているため、ガラス管微小電極の利用が困難であった。Rall (1959) は樹状突起の電気的特性を明らかにするため、19世紀中頃に理論的な解析が行われた海底ケーブルの伝送理論を適用することを試みた。神経細胞は膜抵抗、膜容量ならびにイオン電流から構成される回路モデルで記述され、この等価回路を複数連結して樹状突起を表現した。さらに、Rall (1959, 1962, 1967, 1969) は特定の条件下で、分岐した樹状突起を1本のシリンダーとして見なすことができると考え、樹状突起の細胞膜の時空間特性はケーブル方程式で記述できることを明らかにした。この結果、任意の入力（刺激）が与えられた樹状突起の膜電位変化を解析することが可能となった。当然、ある点に加えられた微弱な膜電位変化（活動電位を発生しないほど微弱な膜電位変化）が樹状突起に沿って伝播する場合についても考察することができるようになった（第2図B参照）。

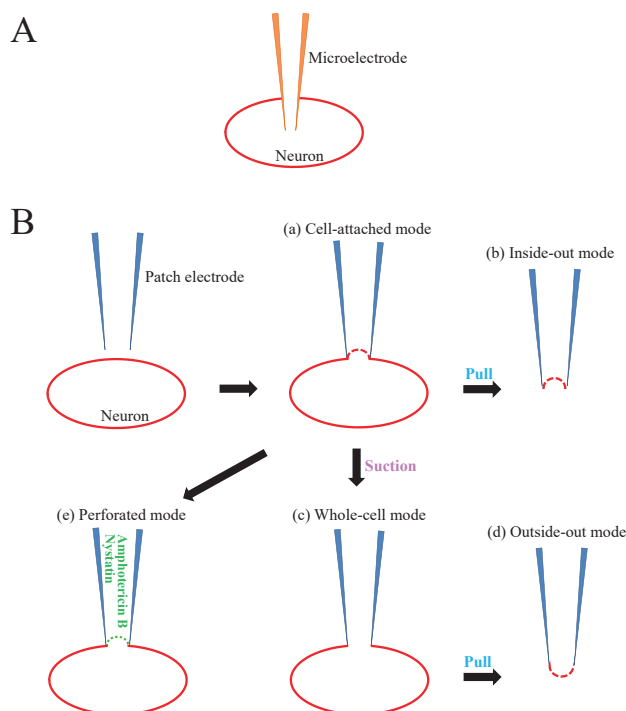
シナプス前神経細胞の神経終末に活動電位が到達すれば、神経伝達物質が放出され、シナプス間隙を拡散してシナプス後神経細胞膜のシナプスレセプターに結合することによって特定イオンのコンダクタンスが上昇する。この結果、興奮性シナプスであれば脱分極、そして抑制シナプスであれば過分極が生じる。このシナプスを介する電気的変化についても等価回路で表現することが可能となった (Coombs *et al.*, 1955; Eccles, 1959) (第2図C参照)。

### 3. 電気生理学の技術革新 ——ガラス管微小電極からパッチ電極へ——

電気生理学は、濾紙で作製された電極を用いて神経細胞や筋細胞の電気的活動を細胞外誘導することから始まった (Du Bois Reymond, 1848)。その後、記録電極が金属からガラス管へと変化し、細胞内誘導への道が開かれた。さらに、膜電位固定法の開発により膜電流（イオン電流）を導出し解析できるようになり、1960年代後半には膜電位変化がイオンチャネルの開閉によると考えられるようになった。この時点でイオンチャネルの実体は明らかにされてはいなかったが、テトロドトキシンなど薬物を用いた実験やノイズ解析実験<sup>9)</sup>によって、イオンチャネルの存在はかなり確かとなった。こんな折、単一イオンチャネルの電気的活動を捉える実験がついに成功した (Neher & Sakmann, 1976)。

#### 3-1 パッチクランプ法の開発

膜電位変化を細胞内誘導するには、細胞内と外の両方に電極を設置する必要がある。細胞外に設置する電極（不関電極）はともかく、細胞内に電極（記録電極）を設置するには大きな困難を伴う。Hodgkin & Huxley (1939, 1952a-e) はイカの巨大神経線維（直径が200～

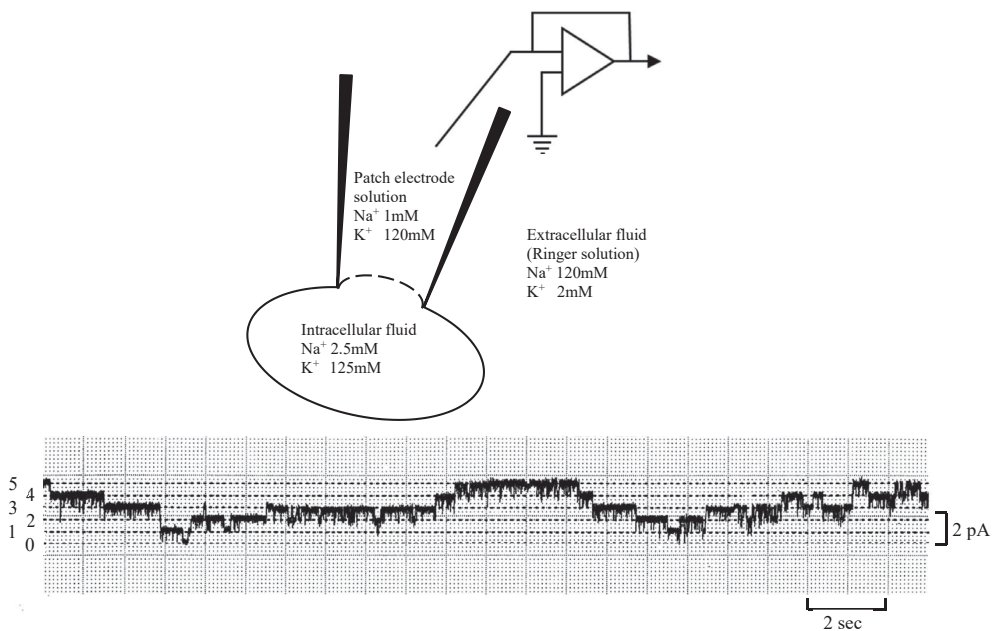


第3図：ガラス管微小電極法とパッチクランプ法の比較

A：1950年代，Hodgkin & Huxley (1954a-e) によって膜電位変化にイオンチャネルの関与が示唆されるようになると，膜電位固定法の必要性は次第に増加していった。神経細胞から膜電位変化を導出する方法として，先端孔径が $1\ \mu\text{m}$  以下のガラス管微小電極を細胞に刺入する方法が開発された (Ling & Gerard, 1949)。この方法は改良され，多くの神経細胞（のみならず筋肉細胞や感覚細胞）の膜電位変化を記録することが可能となり，静止電位や活動電位の存在が実証された。しかし，ガラス管微小電極を膜電位変化のしくみを解析するために膜電位固定法に適用することは難しく，詳細かつ正確な解析は容易でなかった。B: Neher & Sakmann (1976) は膜電位固定法を行うための新たな方法を開発し，パッチクランプ法と呼んだ。先端孔径が数 $\mu\text{m}$  のガラス電極（パッチ電極）を細胞に押しあて，さらに弱い陰圧を電極内に加えることによって，パッチ電極と細胞膜との間に高抵抗接着 ( $G\Omega$  [ギガオーム] シール) が形成される (a)。このとき，パッチ電極に囲まれた部分に存在するイオンチャネルを流れる微小なイオン電流を記録することができる (Cell-attached mode)。次に，Cell-attached mode からパッチ電極を引き上げると，パッチ膜部分だけを細胞から引き剥がした状態でイオンチャネルの膜電流を記録できる (Inside-out mode) (b)。Inside-out mode では細胞膜内面を灌流することが可能であり，細胞内活性物質（タンパクキナーゼや ATP など）によるイオンチャネルの活性調節を調査することができる。また，Cell-attached mode から電極に強い陰圧を与えてパッチ膜内の細胞膜を破碎すると，細胞膜全体に存在するイオンチャネルを流れる電流の総和を記録することができる (Whole-cell mode) (c)。Whole-cell mode では膜電流測定だけでなく，活動電位や静止膜電位などの細胞内電位の測定も可能である。また，Whole-cell mode からパッチ電極を引き上げると，パッチ電極に細胞膜の一部を残すことができる (Outside-out mode) (d)。Outside-out mode ではシナプスレセプターを含む細胞膜の小部分の解析が可能である。パッチ電極内液に Nystatin や Amphotericin B のような抗生物質を加えたパッチ電極を利用すれば， $G\Omega$  シール形成後，パッチ電極内の細胞膜に小さな孔（一価の陽イオンである  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  などに加え，一価の陰イオンである  $\text{Cl}^-$  に対して透過性を有する。）を開けることができる (Perforated mode) (e)。このため，細胞膜を破らずに細胞全体のイオンチャネル電流を記録することができる。この方法は細胞の内容成分の漏出を軽減し，細胞内環境を保持することが可能であるため，より生理的な解析が可能である。パッチクランプ法は電極先端と同程度の大きさの小型の細胞からも膜電位や膜電流を記録することができるという利点がある。

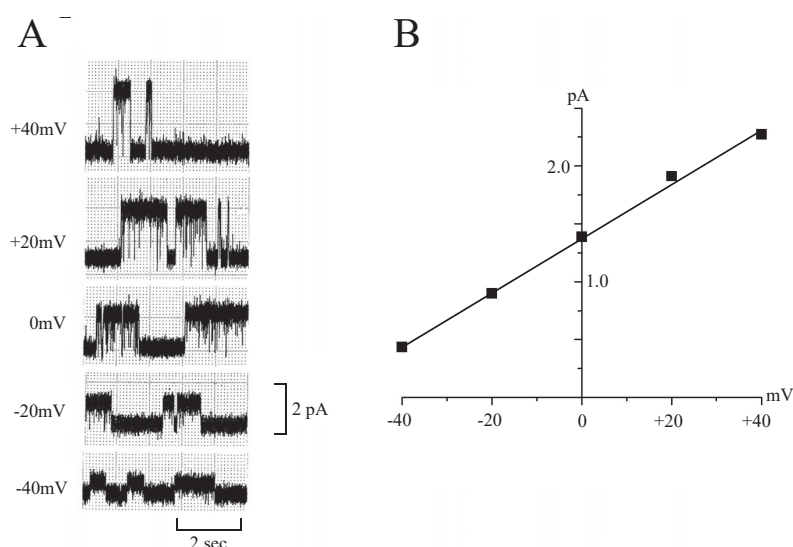


500  $\mu\text{m}$ )に着目し、この巨大神経線維内にガラス管電極（電解質を充填した 100  $\mu\text{m}$  のガラス管に銀塩化銀線を挿入して使用した。）を差し入れ。見事に活動電位を誘導することに成功した。しかし、多くの動物の神経細胞では細胞体の大きさが 5~100  $\mu\text{m}$ 、神経軸索は長いが細く、その直径は数  $\mu\text{m}$  以下であり、イカの巨大神経線維に実施した方法は適用できなかった。これを克服するため、Ling & Gerard (1949) はガラス管微小電極を作製し、これを細胞に刺入する方法を考案した。この方法を、細胞内電極法（あるいはガラス管微小電極法）と言う（第2図参照）。1  $\mu\text{m}$  よりも遥かに細い先端を持つガラス管微小電極の作製し、これを細胞内に刺入ことによって膜電位変化を誘導する（当然、電極は非常に高い電気抵抗を有するため、正確な膜電位測定を行うには前置増幅器を準備する必要がある。）。この方法は急速に世界中に普及し、20年程の間に興奮性細胞の細胞膜にはイオンチャネルやレセプターが存在することを示唆することができるようになった。とはいえ、ガラス管微小電極では細胞膜に発現するイオンチャネルの電気的活動を直接記録することはできなかった。



第4図：単離心室筋細胞からのイオンチャネル電流記録（Cell-attached mode）

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 心臓から単離した心室筋にパッチ電極を近づけ、接触させた後、電極内に微弱な陰圧を加えると、 $\text{G}\Omega$  シールが完成した。パッチ電極内液と細胞外液の間の電位差が無い状態で、イオンチャネル電流を導出した。パッチ電極内の細胞膜には同じ電流値を持つ複数のイオンチャネルが存在し、これらがチャネルの開閉を繰り返している。電流記録の左にある数字は、開口状態にあるチャネルの数を表している。チャネル電流記録の上方に、Cell-attached mode での記録法を表示した。細胞外液（External solution）、パッチ電極内液（Patch solution）と細胞内液（Internal solution）の  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の濃度を示した。細胞内液の  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  濃度については、カエル骨格筋で用いられる値を使用した。実験の詳細は本論文末の【補足説明】(1)に記述した。

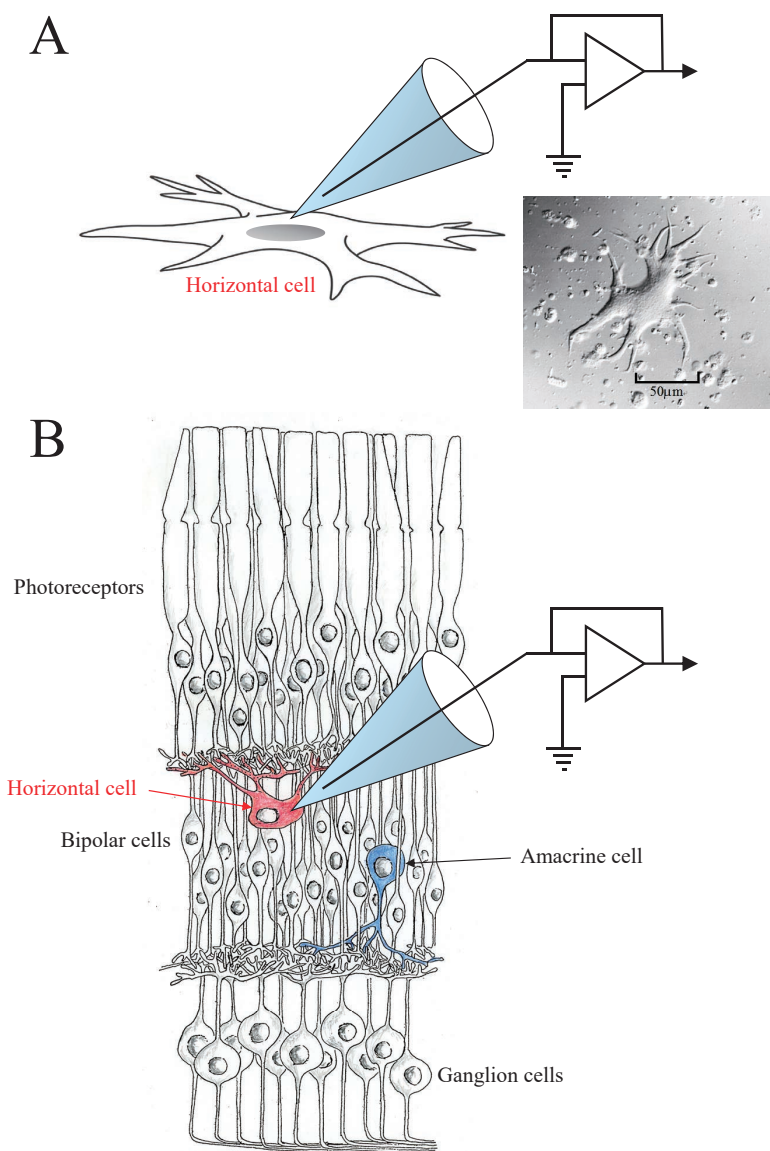


第5図：単離心室筋細胞のイオンチャンネル電流（Cell-attached mode）の膜電位依存性

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 心臓から単離した心室筋にパッチ電極を近づけ、接触させた後、電極内に微弱な陰圧を加えると、 $G\Omega$  シールが完成した。パッチ電極内液と細胞外液の間の電位差（電極電位）が無い状態で、イオンチャンネル電流を導出した。A：パッチ電極内の細胞膜には単一のイオンチャンネルのみが存在し、これらがチャンネルの開閉を繰り返している。電極電位を変化させると、イオンチャンネル電流もその振幅を変えた。電流記録の左には、電極電位を表示した。B：電極電位（横軸）に対するイオンチャンネル電流の振幅（縦軸）をプロットした。このグラフからイオンチャンネルのコンダクタンスを計算すると、約26ピコシーメンズ（pS）となった。長時間の記録が難しく、それぞれの電極電位におけるチャンネルの開閉状態を詳細に調査することができなかった。この単離心室筋の静止電位は不明であるが、電極電圧をプラスにすると電流値が増加（過分極に伴い電流値が増加）するため、内向き整流性カリウムチャンネルの開閉を記録した可能性が高い。実験の詳細は本論文末の【補足説明】(1)に記述した。

この問題を克服すべく、Neher & Sakmann (1976) は尖端孔径が数 $\mu\text{m}$  のガラス管電極（パッチ電極と呼ぶ。）を筋肉細胞の表面に押し当て、イオンチャンネルの電気的活動を記録することに挑戦した（第3図）。幸運なことに、単一アセチルコリン電流（アセチルコリンと連動するイオンチャンネルの一つが開閉するときに流れる電流）を記録することに成功した。この研究法をパッチクランプ法と呼び、この研究法の開発によってイオンの通路（すなわち、イオンチャンネル）の存在が初めて証明された（第3図）。Hamill *et al.* (1981) はこの方法に改良を加え、1980年半ば以降多くの研究者が活用できるようになった（第4図と第5図）。

パッチクランプ法では尖端孔径（1～5 $\mu\text{m}$ ）が比較的大きなガラス管電極を細胞膜に押し当て、その後電極内に僅かな陰圧を与えることで電極と細胞膜の間の電気抵抗（細胞膜とガラス管電極の間の電気抵抗をシール抵抗と呼ぶ。）が1 $G\Omega$ （ギガオーム）以上に達する。このため、S/N比の良好な膜電流記録を得ることができる。パッチクランプ法の利点は、第3図に示すように単一イオンチャンネル電流から細胞全体の膜電流まで各種の測定に応答できる



第 6 図：網膜生理学の発展に寄与する新たな標本

A：網膜を構成する 5 種類の神経細胞やミューラー細胞に発現するイオンチャネルを解析するため、網膜を酵素ならびに機械処理して単離細胞を作製した。網膜を機械処理する際、神経細胞から伸展する樹状突起や神経軸先が消失する。にもかかわらず、単離した神経細胞からレセプターやトランスポーターの活性に基因する膜電流変化が記録される。挿入図はアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した水平細胞の顕微鏡写真である。B：剥離網膜標本作製し、この標本を視細胞から神経節細胞の方向に 100~150 μm の厚さに切断した標本をスライス網膜標本と呼ぶ。この標本を顕微鏡観察すると、多くの球体（細胞体）ならびに層状構造（外網状層と内網状層）が認められる。細胞の位置や層状構造を指標にして、細胞を同定することは可能である。このスライス網膜標本を記録槽に置き、膜電流あるいは膜電位記録を行う。この標本を利用すれば、各神経細胞のシナプス連絡とそのしくみを解析することが可能である。低照明下で標本作製すれば、光応答を導出することもできる。

ことである。on-cell 法, inside-out 法, outside-out 法では主に単一のイオンチャネルの膜電流を記録でき, また Whole-cell 法では細胞全体の膜電流を得るのに用いることができる (例えば, Sakmann & Neher, 1984)。加えて, Perforated 法 (穿孔パッチ法とも言う。) を用いれば, 細胞内の成分を変化させずに, 細胞全体の膜電流を記録することも可能である (例えば, Horn & Korn, 1989, 1992)。

### 3-2 パッチクランプ法に適した神経標本

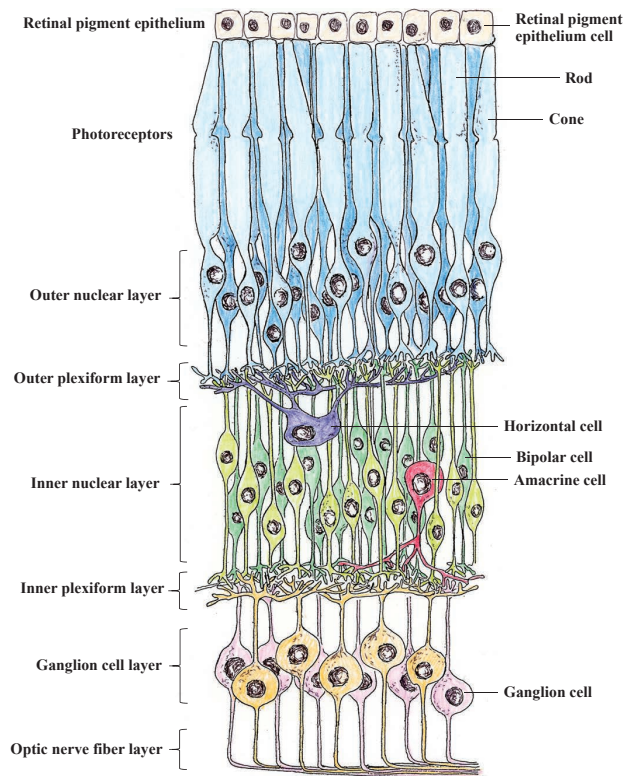
パッチクランプ法の開発により, ガラス管微小電極の刺入が困難な小型の細胞からも単一イオンチャネル電流や細胞全体の膜電流を導出・記録することが可能となった。パッチクランプ法による膜電流を誘導する場合, 光学顕微鏡下でガラス管電極を細胞に近づけそして接触させることで膜電流を導出する方法がよく用いられる<sup>10)</sup>。このため, 神経組織から単離・培養した神経細胞, あるいは神経組織を薄くスライスした標本の断面に露出した神経細胞を顕微鏡で観察しながらパッチクランプ法を適用する (第 6 図参照)。

## 4. 網膜の電気生理学

Cajal (1892) および Polyak (1941) は脊椎動物網膜の形態学的研究を精力的に行い, 5 種類の神経細胞が厚さ 100~300  $\mu\text{m}$  の神経組織 (網膜) を形作っていることを明らかにした (第 7 図参照)。網膜は10層の層状構造を呈し, 強膜側か, 網膜色素上皮細胞層 (Retinal pigment epithelium), 視細胞層 (Photoreceptors), 外境界膜 (Outer limiting membrane), 外顆粒層 (Outer nuclear layer), 外網状層 (Outer plexiform layer), 内顆粒層 (Inner nuclear layer), 内網状層 (Inner plexiform layer), 神経節細胞層 (Ganglion cell layer), 視神経線維層 (Optic nerve layer), そして内境界膜 (Inner limiting membrane) に分けられる。網膜色素上皮細胞層を除く 9 層は, 神経網膜と呼ばれる。

眼球内に入った光は前眼部 (角膜, 房水や水晶体) そして硝子体を通過し, 網膜 (神経網膜) の最外層にある視細胞 (錐体 [Cone] と桿体 [Rod]) に到達する。視細胞で捉えられた光情報は膜電位変化に変換され, 網膜内神経細胞 (双極細胞 [Bipolar cell], 水平細胞 [Horizontal cell], アマクリン細胞 [Amacrine cell] と神経節細胞 [Ganglion cell]) へとシナプス伝達される。外顆粒層には視細胞の細胞体, 内顆粒層には双極細胞, 水平細胞とアマクリン細胞の細胞体, そして神経節細胞層には神経節細胞の細胞体が存在する。また, 外網状層では視細胞, 双極細胞と水平細胞がシナプス接続, そして内網状層では双極細胞, アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス接続している。神経網膜での光受容と視覚情報処理の後, その出力は神経節細胞の突起 (視神経繊維) を経て脳へと伝播される (視神経線維層 [Optic





第7図：脊椎動物網膜の構成（模式図）

脊椎動物眼球は光透過部分を角膜、それ以外を強膜と呼ぶ。内部には房水、水晶体、硝子体、網膜、ブルッフ膜と脈絡膜などが存在し、それぞれは光受容と眼球維持に重要な役割を演じている。

脊椎動物網膜には5種類の神経細胞（錐体 [Cone] と桿体 [Rod]、水平細胞 [Horizontal cell]、双極細胞 [Bipolar cell]、アマクリン細胞 [Amacrine cell]、神経節細胞 [Ganglion cell]）が存在する。光感受性を有するのは視細胞だけであり、これ以外の神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞は光に対する感受性の高い桿体（薄明視）と低い錐体（昼光視）に分けられる。視細胞外節部分を視細胞層（Photoreceptors）、視細胞の細胞体部分を外顆粒層（Outer nuclear layer）、双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分を内顆粒層（Inner nuclear layer）、網膜の出力細胞である神経節細胞の細胞体が存在する部分を神経節細胞層（Ganglion cell layer）、そして神経節細胞の軸索が走行する層状構造を視神経軸層（Optic nerve fiber 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を形成する部分を外網状層（Outer plexiform layer）、そして双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス連絡を形成する部分を内網状層（Inner plexiform layer）と呼ぶ。視細胞において光信号が電気信号に変換された後、基本的に縦方向に配列された細胞群（視細胞→双極細胞→神経節細胞）を経て脳にまで運ばれる。この縦方向の流れは横方向に配置されている細胞群（水平細胞とアマクリン細胞）による処理を受ける。水平細胞は外網状層で、そしてアマクリン細胞は内網状層で視覚情報処理（色覚、形態視、運動視の基礎過程）を行う。視覚情報は、視神経（神経節細胞の軸索）を経て脳に達する。網膜組織内にはグリア細胞の一種であるミュラー細胞（本図では描かれていない）。さらに、視細胞の遠位側に網膜色素上皮細胞層（Retinal pigment epithelium）が存在する。ミュラー細胞は主に網膜内神経組織の物質代謝やイオン環境維持などを、また網膜色素上皮細胞は明暗順応、視細胞外節の維持そして網膜運動現象にも関わっている。

網膜色素上皮細胞、ミュラー細胞そして5種類の神経細胞が形作る薄層の組織網膜という。特に、5種類の神経細胞が構築する神経組織（神経組織の間には非神経性のミュラー細胞が存在している。）を神経網膜と呼ぶ。



nerve fiber layer]）。神経網膜にはミュラー細胞と呼ばれる大型のグリア細胞が網膜を縦に貫いており、神経細胞の機能調節に関与していると考えられている。このミュラー細胞の両端が外境界膜と内境界膜を形成している。

1970年頃までに行われた電気生理学的研究により、神経網膜を構成する神経細胞の光に対する膜電位応答は概ね明らかとなった。視細胞、双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞は緩電位応答、そしてアマクリン細胞の一部と神経節細胞は活動電位で応答する神経細胞である。電子顕微鏡観察により、各神経要素を繋ぐシナプスの構造も次第に明らかになりつつある。1970年以降、シナプスに関与する研究が始まった。

#### 4-1 脳の神経モデルとしての網膜

脊椎動物では発生が進む過程で、脳（神経外胚葉）の一部が突出して眼胞を形成する（例えば、Zhang *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2007; Heavner & Pevny, 2012）。表皮外胚葉と接する眼胞は、この部分を陥没させて眼杯を形作り、やがて網膜（神経網膜と色素上皮細胞層）となる（例えば、Reese, 2011）。つまり、網膜は細胞起源を脳と同じくしており、この点で視覚は他の感覚組織とは区別される。しかし、網膜と脳では構成する神経細胞の種類とこれらの神経細胞が形成する神経回路（形態学的な神経接続）が全く異なっている。

網膜では視細胞による光電位変換が行われた後、視覚情報は双極細胞、水平細胞そしてアマクリン細胞を経て神経節細胞へと伝えられる。神経節細胞以外の神経細胞は緩電位応答を示し、活動電位を発生することはない（一部のアマクリン細胞は、活動電位を発生する。）（例えば、Hubel & Wiesel, 1963, 1965; Wiesel & Hubel, 1963a, b; 1965a, b）。網膜内での情報処理は基本的に緩電位応答で行われるのに対して、脳での情報処理は活動電位が中心であり、網膜と脳とでは生理学的にも大きく異なっている<sup>11)</sup>。

網膜は中枢神経系由来であり、実験系として脳よりも格段取り扱いやすいという利点があるため、古くから脳の神経モデルとして取り扱われてきた。しかし、近年脳と網膜とでは神経構築や情報処理などに相違があることが明らかとなり、複雑な神経構築を持つ脳の神経モデルとして網膜を研究することは殆どなくなった。

#### 4-2 網膜の神経回路

1950年代半ば以降、脊椎動物の網膜研究にガラス管微小電極が適用され、単一神経細胞の膜電位変化を調査することが可能となった（例えば、Svaetichin, 1953, 1956）。1960年代後半になると、ガラス管微小電極にプロシオンイエローなどの色素を充填して細胞内に注入する細胞内染色が開発され、網膜を構成する神経細胞の膜電位変化（光照射に伴う膜電位変化）のみならず形態をも明らかにすることができるようになった（例えば、Kaneko, 1971a, b）。

視細胞、双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞（一部）は緩電位応答を示し、アマクリン細胞（一部）と神経節細胞は活動電位を発生することが示された（Dawling & Werblin, 1969; Werblin & Dawling, 1969）。さらに、ゴルジ鍍銀染色したあるいは細胞内染色した神経細胞を光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡でも観察することができるようになり、視細胞間や水平細胞間に電気シナプスが存在すること、そして網膜内の殆どの神経細胞は化学シナプで接続していることなどが明らかとなった（Yamada & Ishikawa, 1965; Naka & Rushton, 1967; O'Daly, 1967; Stell, 1967; Witkovsky & Dowling, 1969; Kaneko, 197b1）。1980年代初頭には、視細胞終末部に陥入が存在すること、この陥入内に双極細胞と水平細胞の神経突起が入り込み Triad（視細胞終末陥入の内部で、視細胞、双極細胞そして水平細胞が形作るシナプス連絡を指し、三つ組構造とも呼ばれる。）を形成すること、水平細胞は視細胞からシナプス入力を受けると同時に視細胞にシナプス出力していること、また ON 型双極細胞は内網状層 b 層で ON 型アマクリン細胞や ON 型神経節細胞と接続そして OFF 型双極細胞は内網状層 a 層で OFF 型アマクリン細胞や OFF 型神経節細胞と接続して ON 経路および OFF 経路を形成し、それぞれが独立して処理・伝達されていることなどが明らかとなった（Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970; Baylor *et al.*, 1971; Raviola & Gilula, 1975; Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975, 1977; Lamb & Simon, 1976; Famiglietti *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1978; Gold & Dowling, 1979）。網膜における視覚情報処理を解き明かすには、網膜を構成する神経細胞の繋がり（シナプス連絡あるいはシナプス接続）を把握するための生理学的研究が必要となった。

### 4-3 網膜の神経細胞とシナプス

#### 4-3-1 新たな網膜研究のための標本

1970年代後半、網膜内神経細胞が放出している神経伝達物質を調査する方法として、免疫組織化学法やラジオアイソトープ法が用いられ成果を収めた。これらの方法は神経伝達物質の局在を知るには良い方法であったが、神経伝達物質放出のしくみやシナプス後神経細胞への作用を解析するには不十分であった。当然、シナプス後神経細胞での膜電位変化を解明するには、シナプスレセプター<sup>12)</sup>とイオンチャネル<sup>13)</sup>の解析が不可避であり、このため電気生理学の実験が必至となった。

シナプスの機能を解明するには、シナプス前神経細胞による神経伝達物質放出のしくみ、シナプス間隙での神経伝達物質の動態、シナプス後神経細胞に発現するシナプスレセプターによる神経伝達物質受容と電位発生のしくみを調べる必要がある。ガラス管微小電極法は網膜組織内に埋もれた神経細胞の膜電位応答を誘導・記録すること、そしてその細胞の形態を把握するためには極めて有効な方法であった。しかし、ガラス管微小電極は神経細胞が示す

膜電位変化を導出するには最適の技法であったが、神経細胞の特定部分、例えばシナプスの生理学的解析を行うには不向きであった。これを解決すべく、従来から利用されてきた眼杯網膜標本あるいは剥離網膜標本以外の標本の開発が進められ、網膜組織内から単離した神経細胞を利用する研究そして網膜を薄くスライスした標本を利用する研究が始まった (Wu, 1985, 1987; Mittman *et al.*, 1990) (第4図参照)。

1980年代初頭、ガラス管微小電極による細胞内記録法に加えパッチクランプ法が網膜研究にも導入され始めた。しかし、剥離網膜標本や眼盂網膜標本では対象とする神経細胞が網膜組織に埋もれた状態にあり、これらの標本ではパッチクランプ法を適用することは困難であった。幸運なことに、ガラス管微小電極による研究の新たな展開を狙って開発された2つの標本が、パッチクランプ法を適用する標本として利用可能であった。第一の標本は、網膜組織内から単離した神経細胞である (第4図A)。網膜内神経細胞の大きさや形態は細胞内染色法によって明らかとなっており、単離した後も神経細胞の区別は容易であった<sup>14)</sup>。単離神経細胞は直ちに使用するか、あるいは数日間培養後ガラス管微小電極法やパッチクランプ法などに適用した。第二の標本は、網膜を 200  $\mu\text{m}$  程の厚さで縦方向 (視細胞から神経節細胞の方向) に切断したスライス網膜である (第4図B)。このスライス網膜標本の断面には網膜を構成する神経細胞の総てが露出しており、ノマルスキー型微分干渉顕微鏡を用いて断面を観察しつつガラス管微小電極法やパッチクランプ法を適用することが可能である。何れの標本も、イオンチャネルとリガンドレセプター (あるいはシナプスレセプター) の解析に用いられた。

1980年半ば以、上記2種類の標本にパッチクランプ法 (特に、ホールセルクランプ法) を適用する実験法が普及し、電気生理学は再び隆盛を迎えた。

#### 4-3-1-1 網膜から単離・培養した神経細胞を用いた電気生理学

Drujan & Svætichin (1972) は2種類のスズキ目魚類 (*Eugerres plumieri* と *Mugil brasiliensis*) 網膜をタンパク質分解酵素であるパパインで処理して、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞を単離し、これを用いて生化学および電気生理実験を試みた。同年、Lam (1972a) はカメ (*Pseudemys scripta elegans*) 網膜視細胞を単離し、生化学的実験を行った。Keneko *et al.* (1976) はマモンツキテンジクザメ (*Hemiscyllium ocellatum*) ならびに3種のエイ (*Rhinobatus armatus*, *Himantura granulata* と *Raja ocellata*) 網膜をトリプシン処理して得られた水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、膜電位を記録すると同時に、膜抵抗の測定や細胞外環境のイオン交換の実験を行った。また、Bader *et al.* (1978) はトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜をパパイン処理して得られた桿体にガラス管微小電極を刺入し、光応答を記録し、またこの応答の逆転電位を測定した。さらに、桿体細胞膜の

電流－電圧関係を測定し、内向きのみならず外向きの整流作用が存在することを明らかにした。これらの実験は網膜をタンパク質分解酵素で処理して得られた神経細胞は正常に機能することを示しており、1980年以降単離神経細胞を用いた研究が徐々に増加していった。

Tachibana (1981) はキンギョ (*Carassius auratus*) 網膜をパパイン処理して水平細胞を単離し、これを培養液寒天の中に封じこめ、数日間培養後使用した<sup>15)</sup> (第3図参照)。この細胞にガラス管微小電極を刺入し、培養水平細胞膜の性質を通電実験により調べると同時に各種薬剤 (イオンチャネル阻害剤) の影響を調べた。網膜内に存在する水平細胞は光照射に応じて緩電位性の膜電位変化を示すのみであるが、単離・培養するとカルシウム依存性活動電位を発生することが明らかとなった。Tachibana (1983) は同じ標本を利用し、培養水平細胞を膜電位固定し、膜電流を行った。この結果、水平細胞から異常整流性カリウム電流、一過性カリウム電流、遅延性カリウム電流と電位依存性カルシウム電流が記録された (Kaneko & Tachibana, 1985)。これらのイオン電流の解析に基づき、単離・培養水平細胞の電流－電圧関係が非線形である理由を説明することができるようになった。アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した水平細胞には、電位依存性ナトリウム電流も記録された (Johnson & Lam, 1981; Shingai & Christensen, 1983, 1986)。

不思議なことに、網膜から単離・培養した水平細胞はL-グルタミン酸に対する感受性を有していた (Lasater & Dowling, 1982; Ishida *et al.*, 1984; Tachibana, 1985)。網膜をパパイン処理して得られた水平細胞は視細胞あるいは他の神経細胞とのシナプス連絡を機械的に断たれているため、シナプスレセプターは消失していると推測された。とはいえ、視細胞から放出される神経伝達物質として興奮性アミノ酸が最有力候補であることを踏まえ、単離・培養水平細胞にはグルタミン酸レセプターが残存していると考えられた。この発見以降、キンギョ網膜から単離・培養した水平細胞はL-グルタミン酸に対する感受性しか有しないことから、視細胞の神経伝達物質としてL-グルタミン酸が放出されていると考えられるようになった。

1980年代半ば以降、網膜から単離 (・培養) した神経細胞の研究には専らパッチクランプ法が用いられた。

#### 4-3-1-2 スライス網膜標本を用いた電気生理学

Werblin (1978) はトラフサンショウウオ網膜を 200  $\mu\text{m}$  程の厚さに切断 (視細胞側から神経節細胞側に向けて切断後、この薄層のスライス標本を灌流槽に横たえて固定し、リンガー液を灌流し実験に用いた。) し、光学顕微鏡下で切断面に露出した桿体にガラス管微小電極を刺入して細胞膜の電気的性質を解析した (第4図参照)。このスライス網膜標本では切断面に網膜を構成する神経細胞の総てが露出し、これらを顕微鏡で観察できる。都合の良いことに、スライス網膜標本ではシナプスが残存しているため、光応答を観察することも可能であつ

た (Wu, 1985, 1987)。また、この標本にパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下で膜電流を観察することができるため、光応答発生に関与するイオンチャネルやシナプスレセプターの解析に加え網膜内神経細胞が形成する神経回路の解明にも応用可能であった (例えば, Mittman *et al.*, 1990; Lukasiewicz *et al.*, 1994; Euler & Wässle, 1998)。

1990年代後半には、スライス網膜標本の断面に現れる2種類の神経細胞から同時に膜電流を記録し、一方の細胞への通電刺激が他の細胞にどのように現れるのかを調査するような技術的に極めて難しい研究にも挑む研究者が現れた。DeVries & Schwartz (1999) はジュウサンセンギリス (*Spermophilus tridecemlineatus*) のスライス網膜標本を作製し、錐体と OFF 型双極細胞から膜電流応答を導出し、両者の関係を検討した。錐体から OFF 型双極細胞へのシナプス伝達には KA 型グルタミン酸レセプターが主に用いられており、このレセプターは暗時に放出される L-グルタミン酸によって脱感作状態にあること、そしてこの脱感作により OFF 型双極細胞の膜電位応答が飽和しないようになっていることなどを明らかにした。

スライス網膜標本では光学顕微鏡下で網膜を構成する神経細胞を直接観察すること、そしてパッチクランプ法ではガラス管微小電極の対象とはならないような小型の神経細胞から膜電流応答を導出できるという利点を有しており、1990年以降スライス網膜標本にパッチクランプ法を適用する研究法は網膜生理学で主流となった (例えば, Connaughton, 2003, Koike *et al.*, 2010)。

#### 4-3-1-3 細胞内生理活性物質の働き

パッチクランプ法と網膜から単離 (・培養) した神経細胞やスライス網膜標本の神経細胞の普及により、イオンチャネルやレセプターの研究が可能となった。パッチ電極の先端孔径が約  $1\ \mu\text{m}$  と比較的大きいため、この電極内に充填した溶液と細胞内液を入れ換えることも可能である。このため、細胞内のイオン濃度を変化させることや細胞内に生理活性物質やその拮抗剤を導入することも容易となり、イオンチャネル型レセプター以外に代謝型レセプター<sup>16)</sup> の解析も行われるようになった (例えば, Neher, 1988)。

神経細胞の機能を修飾する細胞内の生理活性物質として、 $\text{Ca}^{2+}$ <sup>17)</sup>、一酸化窒素 (NO)<sup>18)</sup>、Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP)、Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)、Protein kinase C (PKC)、Inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) や Diacylglycerol (DG あるいは DAG) などが知られており、これらはセカンドメッセンジャー<sup>19)</sup> として、細胞膜のイオンチャネルの開閉などの生理機能に関与していることが明らかとなった (例えば, Fesenko *et al.*, 1985; Villa *et al.*, 1995)。



#### 4-3-1-4 神経薬理学の発達

ガラス管微小電極の開発によって神経細胞の電気生理学的研究は急速に進み、静止電位、活動電位やシナプス電位の発生に関するイオン機序などが次々に明らかにされた。とはいえ、活動電位の発生機序を電気生理学的手法でのみ完全に解き明かすことはできず、自然毒（フグ毒 [テトロドトキシン]）による研究が決め手となって電位依存性ナトリウムチャネルの活性化が原因となっていることが突き止められた（Hodgkin & Huxley, 1952a–e; Narahashi *et al.*, 1964）。これ以降、天然活性物質が注目を集め、生命のしくみを明らかにするために用いられるようになった。イオンチャネルやレセプターの研究でも、自然界からのみならず合成された化学物質が威力を発揮した。

脊椎動物網膜視細胞の神経伝達物質として興奮性アミノ酸（L-グルタミン酸と L-アスパラギン酸）が有力であることが報じられた（Cervetto & MacNichol, 1972; Dowling & Ripps, 1972; Murakami *et al.*, 1972; Sugawara & Negishi, 1973）。この後、L-グルタミン酸と L-アスパラギン酸の何れが真の神経伝達物質であるのか明らかにするべく、網膜生理学分野では神経薬理学的手法がよく用いられるようになった。Wu & Dowling (1978) はコイ網膜水平細胞にガラス管微小電極を刺入して膜電位応答を導出し、L-アスパラギン酸が L-グルタミン酸よりも大きな効果を有すること、そして L-アスパラギン酸アンタゴニストである DL- $\alpha$ -aminoadipate が錐体と水平細胞間シナプスを阻害することを明らかにした。これに基づき、L-アスパラギン酸が錐体の神経伝達物質であると結論した。また、Rowe & Ruddock (1982a, b) はローチ (*Rutilus rutilus*)（コイ科の淡水魚）網膜水平細胞にガラス管微小電極を刺入して膜電位応答を導出し、興奮性アミノ酸アゴニストの影響を調べ、カイニン酸 (KA) とキスカル酸<sup>20)</sup> は有効であるが、N-Methyl- D-aspartate (NMDA) は無効であることを発見した。さらに、非 NMDA 型のアンタゴニストである L-glutamate diethyl ester (GDEE) と  $\gamma$ -D-glutamyl glycine (DGG) が水平細胞を過分極させることを見出した。これらの実験結果に基づき、水平細胞の興奮性アミノ酸レセプターは非 NMDA 型であり、興奮性アミノ酸が視細胞の真の神経伝達物質であると結論付けた。そして、L-アスパラギン酸に化学構造が類似した NMDA が水平細胞に無効であることを根拠に、視細胞は神経伝達物質として L-アスパラギン酸ではなく、L-グルタミン酸を放出していると予想した。1980年後半には、特異的なアンタゴニスト（non-NMDA アゴニストとして 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione [CNQX], 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dione-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide [NBQX] や 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione [DNQX], そして NMDA アゴニストとして 2-amino-5-phosphonopentanoic acid [AP-5] や 2-amino-7-phosphoheptanoic acid [AP-7]）が開発され、興奮性アミノ酸レセプターを正確に分類することができるようになった（例えば、Yang & Wu, 1989）。また、網膜から単離・培養した水平細胞に対して L-アスパラギン酸が無効で

あることを踏まえ、視細胞の神経伝達物質はL-グルタミン酸であるという考え方が主流となった（例えば、Ishida *et al.*, 1984）。

視細胞がシナプス結合する双極細胞についても、アゴニストやアンタゴニストの研究は盛んに行われた。OFF型双極細胞は水平細胞と同様にKA/(RS)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) が有効であった。ところが、ON型双極細胞にはKAやAMPAは無効であり、2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) がアゴニストとして作用することが判明した (Shiells *et al.*, 1981; Slaughter & Miller, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991)。後年、APB感受性グルタミン酸レセプター（代謝型グルタミン酸レセプター<sup>21)</sup>の一種）を介する受容機構が解明された（4-7を参照）(Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。

レセプターの研究にはアゴニストやアンタゴニスト、そしてイオンチャネルに対する各種の阻害剤の利用がこれらを解析するために極めて有効であることが判明した。

#### 4-3-1-5 免疫組織化学法による神経伝達物質の探査

1970年代に入ると、放射性同位体で標識した化学物質（例えば、L-グルタミン酸やGABAなど）を含むリンガー液中に網膜組織を保存し、一定期間後網膜内の神経細胞が発する放射線を検出するラジオアイソトープ法が普及し、神経細胞が放出する神経伝達物質が次第に明らかになっていった（例えば、Lam & Steinman, 1971; Lam, 1972b; Lam *et al.*, 1978）。

1970年後半には神経伝達物質やこれを合成するための酵素の抗体を作製し、これらに蛍光色素や金属を結合させて、網膜でのこれらの局在・分布を調査する免疫組織化学法が普及し始めた（例えば、Lam *et al.*, 1979; Vaughn *et al.*, 1981; Brandon & Lam, 1983）。1980年代半ば以降、免疫組織化学法は急速に発展し、神経伝達物質、神経伝達物質の合成酵素、シナプスレセプター、トランスポーターのみならず細胞内に存在する生理活性物質にも適用されるようになり、数多くの成果を生んだ。例えば、L-グルタミン酸、GABA、グリシン、アセチルコリン、セロトニン、サブスタンス P、生理活性のあるペプチド類やタンパク質キナーゼ類などの抗体が作製され、その局在が探求された（例えば、Vaney, 1990; Veruki & Wässle, 1996; Helboe & Møller, 1999; Straiker *et al.*, 1999; Liets *et al.*, 2006; Guduric-Fuchs *et al.*, 2009）。これらの抗体標本観察は光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡でも可能であり、シナプスの微細な構造も明らかとなった（例えば、Chun *et al.*, 1993; Jeon *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2001）。

Golgi 鍍銀染色法を利用した哺乳類網膜の形態学的解析により、双極細胞が13種、アマクリン細胞が29種そして神経節細胞が12種の異なるタイプが存在することが示唆された (Masland, 2011a, b)。これらに視細胞と水平細胞を加えると、60種近くの異なるタイプの神

神経細胞が網膜内に存在していることになる。従来から用いられてきた Golgi 鍍銀染色法では神経細胞の形態観察（光学および電子顕微鏡による観察）が主であったが、免疫組織化学法およびラジオアイソトープ法では形態観察に加え神経伝達物質のみならずレセプターやイオンチャネルの同定や局在調査のような機能解析も可能である。

#### 4-4 視細胞の光-電位変換機構

1970年代、視細胞の光電位変換機構に関し、光受容とイオンチャネルの開閉を繋ぐ物質として  $\text{Ca}^{2+}$  と cGMP が報告された。それぞれは  $\text{Ca}^{2+}$  説 (Hagins, 1972; Hagins & Yoshikami, 1974) および cGMP 説 (Nicol & Miller, 1978; Miller & Nicol, 1979) と呼ばれ、何れの主張にも軍配が上らず1980年代を迎えた。これに決着をつけたのは、パッチクランプ法を利用した Fesenko *et al.* (1985) であった。ヨーロッパアカガエル網膜から単離した桿体外節を用いて Inside-out 標本を作製し、この標本（外節膜の内側）に cGMP を投与すると、陽イオン電流 ( $\text{Na}^+$  や  $\text{Ca}^{2+}$  などを透過するイオンチャネル) が増加することを見出した。しかし、cGMP の代わりに  $\text{Ca}^{2+}$  を投与しても、その効果は認められなかった。この研究により、長年の懸案であった視細胞の光電位変換機構として cGMP 説が確定した。錐体でも、桿体と同様のメカニズムで光信号が膜電位変化に変換されと考えられている (Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994)。近年、視細胞（桿体と錐体）における光受容と膜電位応答発生に関する分子レベルの研究が盛んに行われている。この結果、錐体と桿体の応答の相違は、両視細胞の類似の光-電位発生機構に内在する複数の化学反応の効率の違いを反映している可能性が高いことが明らかになってきた（例えば、Kawamura & Tachibanaki, 2014）。

1970年代後半、両生類や爬虫類の網膜を用いて視細胞の電気生理学的研究は盛んに行われ、視細胞膜には複数の膜電流成分が存在することが明らかになった。1980年に入ると、網膜から単離した視細胞を用いた研究が行われるようになった。Bader *et al.* (1978, 1982) はサンショウウオ網膜から単離した視細胞において、電位依存性カルシウム電流、電依存性カリウム電流、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性カリウム電流、h 電流（内向き整流性陽イオン電流）と  $\text{Ca}^{2+}$  依存性クロライド電流が存在することを明らかにした。この時期、イオンチャネルの実体が概ね解明され、視細胞で見つけられたイオン電流はイオンチャネルを介して発生していると考えられた。

#### 4-5 視細胞の神経伝達物質

Svaetichin (1953, 1956) はガラス管微小電極を魚類 (Bream [コイ科に属する淡水魚], Perch [ペルカ科の淡水魚] や Mugil [ボラ科の海水魚] 【基本的に海水魚であるが、汽水域や

淡水域にも生息]]) 網膜水平細胞に刺入して膜電位の細胞内誘導を行い、光照射に伴い水平細胞が過分極することを明らかにした。この結果は水平細胞が視細胞から放出される興奮性神経伝達物質によって脱分極した状態にあり、光受容に伴う視細胞の過分極によって神経伝達物質の放出が減少することを示唆していた。Murakami *et al.* (1972) はコイ (*Cyprinus carpio*) 網膜の水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、L-アスパラギン酸とL-グルタミン酸を網膜全体に噴霧投与する実験を実施した。この結果、両アミノ酸共に水平細胞を脱分極させ、光応答を完全に消失させることを見出した。さらに、Murakami *et al.* (1975) は双極細胞(網膜に存在する第二次神経細胞)でも同様な実験を行なった。双極細胞は、光応答性の違いから、ON型とOFF型の2種類に分類される。ON型は光照射に伴い脱分極性応答を、OFF型は水平細胞同様に過分極性応答を発生する。つまり、視細胞から放出される神経伝達物質はON型双極細胞を過分極そしてOFF型双極細胞を脱分極させる。L-アスパラギン酸とL-グルタミン酸の投与実験を行い、両アミノ酸共にON型双極細胞を過分極、OFF型双極細胞を脱分極させ、そして光応答を消失させた。これらの研究は、両アミノ酸の何れかが視細胞から放出される神経伝達物質であることを示唆していた。同様の結果が、他の動物種でも報告された(Cervetto & MacNichol, 1972; Dowling & Ripps, 1972)。1975年代半ば以降、視細胞から放出される神経伝達物質が興奮性アミノ酸(L-アスパラギン酸あるいはL-グルタミン酸)の何れであるのかを明らかにする研究が本格化した。水平細胞に対する興奮性アミノ酸のアゴニストやアンタゴニストの影響に加え、単離(・培養)水平細胞はL-アスパラギン酸に感受性を示さないことなどから、次第にL-グルタミン酸が視細胞の神経伝達物質の有力候補と考えられるようになっていった(4-3-1-1, 4-3-1-4と4-3-1-5参照)。

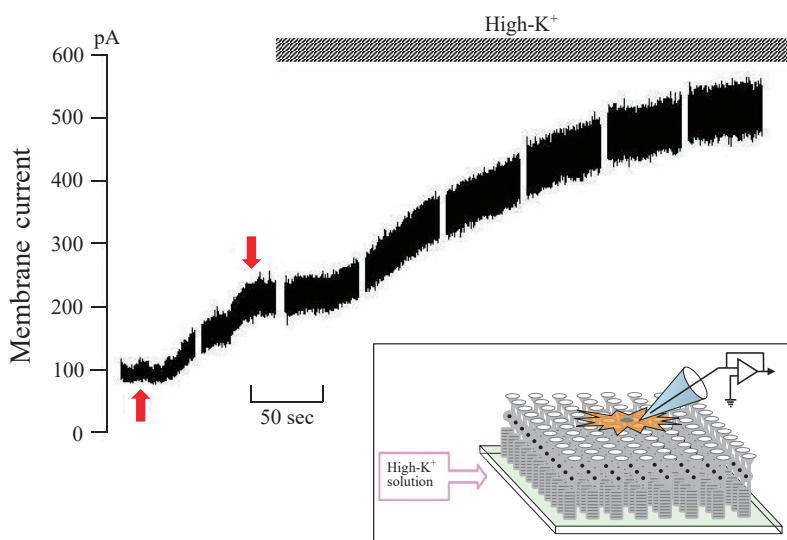
L-グルタミン酸が視細胞から放出される神経伝達物質であることを確定するには、㊦視細胞のシナプス終末にL-グルタミン酸が充分量存在すること、㊧視細胞(特に、シナプス終末)にL-グルタミン酸の合成系が存在すること、㊨視細胞と第二次神経細胞(水平細胞や双極細胞)のシナプス部分にL-グルタミン酸の不活性化機構(シナプス間隙のL-グルタミン酸濃度を減少させること)が存在すること、㊩刺激により視細胞からL-グルタミン酸が放出されること、そして㊪刺激によって水平細胞や双極細胞に惹起される膜電位応答と同様の膜電位応答がL-グルタミン酸投与によって誘発され、これらの応答の発生機序即ちイオン機序が一致すること、という基準を充足する必要がある。幸い、L-グルタミン酸の代謝系は総ての神経細胞に含まれているため、㊦と㊧は充足していると考えられた。このため、㊨、㊩と㊪に関する研究が精力的に行われた。L-グルタミン酸を神経伝達物質として使っている系では、シナプス終末から放出されたL-グルタミン酸はシナプス前および後神経細胞、あるいはグリア細胞に取り込まれ、シナプス間隙から除去されてシナプス伝達が終結すると考えられている。Marc & Lam (1981) は  $H^3$  で標識したL-グルタミン酸やL-アスパラギン酸を含む



リンガー液で網膜を短時間培養し、視細胞への標識物質の取り込みの有無を調べた。その結果、錐体では主に L-アスパラギン酸が、桿体では主に L-グルタミン酸が取り込まれることを見出した。その後、視細胞のシナプス終末ならびにミュラー細胞（ミュラー細胞は網膜を縦方向に貫くグリア細胞であり、その突起を視細胞終末部にまで伸ばしている。）にはグルタミン酸トランスポーターが発現し、細胞外のグルタミン酸を速やかに回収し、その濃度を下げることにも明らかになった（Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b）。これらの実験は、両アミノ酸の何れかが視細胞の神経伝達物質であることを示唆していた。しかし、両アミノ酸の何れが真の神経伝達物質であるのかに決着を付けることはできなかった。Copenhagen & Jahr (1989) と Ayoub *et al.* (1989) は、網膜から単離した視細胞から放出される化学物質を検出する方法を開発し、基準⑤の解明に挑戦した。Copenhagen & Jahr (1989) は、小脳由来の培養細胞から L-グルタミン酸に高感受性を示す NMDA 型グルタミン酸レセプターを持つ細胞膜片標本（パッチ標本）を作製し、これを検出器として使いアカミミガメ（*Pseudemys scripta elegans*）網膜視細胞終末から放出される神経伝達物質が L-グルタミン酸であるのか否かを調べた。視細胞を脱分極させたとき、視細胞終末部近傍においた NMDA 型グルタミン酸レセプター（グルタミン酸検出器）の活動が顕著に上昇することが明らかとなった。また、Ayoub *et al.* (1989) は酵素反応を利用して L-グルタミン酸の放出を検出する方法を考案した。L-グルタミン酸はグルタミン酸脱水素酵素により  $\alpha$ -ケトグルタル酸<sup>22)</sup> に分解される。同時に、補酵素である  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide adenine dinucleotide の酸化型を指す。) は水素原子と電子をそれぞれ一個受取り NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide の還元型を指す。) になる。 $\text{NAD}^+$  が 260 nm そして NADH が 340 nm の光に極大の吸収スペクトルを示すため、 $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$  の反応に伴う吸収スペクトルの違いを利用して L-グルタミン酸の分解を検出することが可能である。Ayoub *et al.* (1989) はミカゲハリトカゲ (*Sceloporus orcutt*) 網膜の視細胞を用い、グルタミン酸脱水素酵素と  $\text{NAD}^+$  の存在下で、視細胞を脱分極させると吸収スペクトルが変化することを見出した。以上 2 つの実験から、暗時（脱分極時）に視細胞は L-グルタミン酸を放出していることが濃厚となった。また、Schmitz & Witkovsky (1996, 1997) はアフリカツメガエルの眼球網膜標本を TritonX-100 で処理して視細胞以外の神経細胞を死滅させ、生き残った視細胞が脱分極に伴い放出する化学物質を分析する実験を行い、L-グルタミン酸が放出されていることを確認した。最近、高橋 (2013, 2014) はアメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を L-グルタミン酸検出器として用い、トラフサンショウウオ網膜視細胞標本から放出される L-グルタミン酸を検出することに成功している（第 8 図）。

L-グルタミン酸が視細胞の神経伝達物質であることを確定するには、基準④を充足する必要がある。双極細胞は細胞体のサイズが小さく、ガラス管微小電極を刺入することならびに



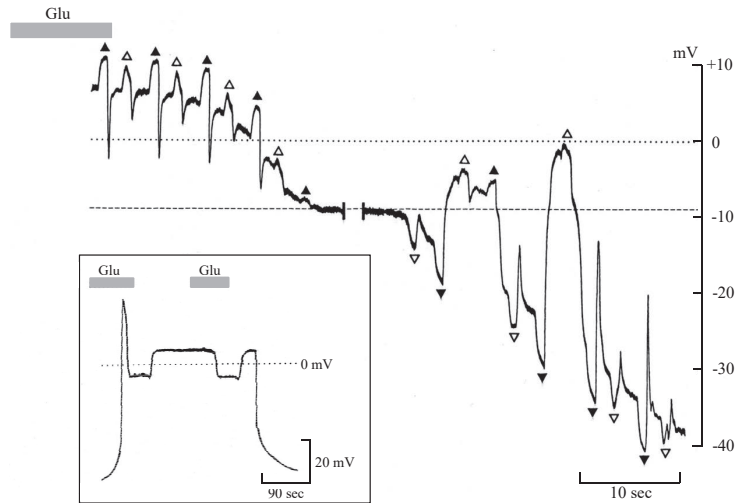


第8図：高 $K^+$ 刺激に伴うトラフサンショウウオ網膜視細胞からのL-グルタミン酸放出

トラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) の眼杯網膜標本を作製し、眼球内部を1% TritonX-100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9時間経過後、TritonX-100 や蒸留水に接した部分 (視細胞以外の総ての神経細胞) が死滅し、眼球内に白濁部として残る。この白濁部 (白濁部に視細胞以外のす) を極細のピンセットを用いて取り除くと、視細胞層だけが残存する眼杯網膜標本となる。この標本をL-15リンガー液中に、さらに約8時間暗室保存 (17°C) した。眼盃網膜標本から視細胞層を外し、これを約2 mm 角に切り、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 (*Ictalurus punctatus*) 網膜への単離操作を終了して22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 吸い取り、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、+100 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ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーターにより静かに約900  $\mu$ m 持ち上げ、視細胞層標本の中央部にまで水平移動した。水平細胞を視細胞層標本に向けて600~650  $\mu$ m 降下すると、外向き電流が徐々に現れる。降下を続けると、この膜電流はさらに増大して約+220 pA に達し概ね一定となった (赤い矢印で挟まれた部分)。この時点で水平細胞の降下は止め、標準リンガー液を高 $K^+$ 標準リンガー液を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、最終的に約+510 pA に到達した。この結果は、高 $K^+$ 標準リンガー液灌流による脱分極刺激が視細胞にL-グルタミン酸放出を促したことを示唆している。

括弧内には実験の様子を模式図で示した。実験の詳細は本論文末の【補足説明】(2) に記述した。

長時間の膜電位誘導が難しいため、視細胞と第二次神経細胞の間のシナプス研究には電極刺入が容易で且つ長時間膜電位の誘導が可能な水平細胞が用いられた。ところが、水平細胞同志はギャップ結合を介して電気シナプスを形成しているため、電極を通じた通電によって膜電位を変化させることが難しく、逆転電位の測定は不可能であると考えられていた。この問題を克服するため、Murakami & Takahashi (1987) は新たな逆転電位測定法を開発した。コイの剥離網膜標本を電位依存性イオンチャンネルの阻害剤を含む特殊なリンガー液で灌流す



第9図：コイ網膜L型水平細胞の光応答とグルタミン酸応答の逆転

コイ (*Cyprinus carpio*) 網膜には、3種類の錐体（赤色錐体、緑色錐体および青色錐体）と1種類の桿体が存在する。3種類の錐体はそれぞれ別の水平細胞（3種類の錐体水平細胞）とシナプス結合している。これら3種類の錐体水平細胞は光応答の特徴に基づき、L型水平細胞（あるいは単相性水平細胞〔桿体水平細胞と区別するために **Photopic L型水平細胞** と呼ぶことがある。〕；赤色光で最大の過分極応答を示す水平細胞であり、主に赤錐体からシナプス入力を受け取る。）、RG型水平細胞（あるいは二相性水平細胞；赤色光で脱分極性光応答そして青色光と緑色光で過分極性光応答を示す水平細胞であり、主に緑錐体からシナプス入力を受け取る。）およびRYB型水平細胞（あるいは三相性水平細胞；黄色光で脱分極性光応答そして青色光と赤色光で過分極性光応答を示す水平細胞であり、主に青錐体からシナプス入力を受け取る。）に分類される。一方、桿体は錐体水平細胞とのシナプス連絡はなく、桿体水平細胞（**Scotopic L型水平細胞**）とシナプス結合していることが知られている。

〔括弧内の挿入図〕L型水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、膜電位を測定した。正常リンガー液の灌流中、暗時の膜電位は  $-35\text{ mV}$  であった。620 nm (▲) と 480 nm (△) の単色光を交互に照射すると、約 20 mV と約 10 mV の過分極性応答が現れた。正常リンガー液を各種のイオンチャネル阻害剤を含む修飾リンガー液に交換すると、暗時の膜電位は過分極方向に移動し、 $-60\text{ mV}$  付近で安定した。光照射を中断し、5 mM のL-グルタミン酸 (Glu) を修飾リンガー液に加えて灌流すると、徐々に脱分極し、カルシウム依存性活動電位を発生した。L-グルタミン酸の投与を続けると、膜電位は  $-8\text{ mV}$  付近で一定になった（グルタミン酸電位）。L-グルタミン酸を洗い流すと、 $-8\text{ mV}$  から脱分極方向に移動し、 $+15\text{ mV}$  付近で一定となった（カルシウム依存性活動電位のプラトー電位）。再度、L-グルタミン酸を投与すると、 $-8\text{ mV}$  付近に膜電位が移動した。L-グルタミン酸を除去すると、プラトー電位に達した。その後、突然膜電位は負に移動した。

修飾リンガー液の灌流中にL-グルタミン酸を投与すると、カルシウム性活動電位が発生し、 $-8\text{ mV}$  付近で一定になった。その後、L-グルタミン酸を洗い流す、元の電位レベルには戻らず、プラトー電位へと移動して一定となった。この時点で光照射（620 nm と 480 nm の単色光）を行い、また再度L-グルタミン酸を投与した。プラトー電位で光を照射すると、脱分極性の膜電位応答が惹起された。L-グルタミン酸投与に伴い膜電位が  $-9\text{ mV}$  に達すると、光照射にもかかわらず、膜電位変化は消失した。L-グルタミン酸を洗い流すと、膜電位は過分極方向に移動した。このとき、光応答が現れ、過分極性であった。時々、不完全な活動電位の発生が見られたが、この際光応答は脱分極性であった。また、膜電位が過分極方向に移動するにつれて、過分極性の光応答の振幅は増大した。つまり、L-グルタミン酸の投与で到達した  $-8\text{ mV}$  付近では光応答が発生せず、この電位を挟んで、光応答の極性が反転した。この結果は、グルタミン酸電位と光応答の逆転電位が一致していることを示している。実験の詳細は本論文末の【補足説明】(3) に記述した。

ると、脱分極刺激に応じて水平細胞は時間経過の長いカルシウム性活動電位を発生することを見つけた (Murakami & Takahashi, 1987)。水平細胞に発生する活動電位はギャップ結合を通じて瞬時にして近隣の水平細胞に伝播するため、活動電位のプラトー電位では近隣細胞との電位差は存在しない。この活動電位を利用し、光応答、電気刺激に伴うシナプス応答及び L-グルタミン酸投与に伴う膜電位応答の逆転電位を測定することを試みた。水平細胞の膜電位が静止レベルにあるか活動電位のプラトー電位レベルにあるかでそれぞれの膜電位変化の極性が全く反対となり、また膜電位が  $-5 \sim -10$  mV となったとき、何れの膜電位変化も惹起されなかった (第 9 図)。この結果は 3 つの膜電位変化 (光応答、シナプス応答そして L-グルタミン酸投与に伴う応答) の逆転電位が一致しており、そのイオン機序が同一であることを示している。さらに、Miyachi & Murakami (1989) は、水平細胞間のギャップ結合を遮断する方法で、水平細胞の光応答の逆転電位が L-グルタミン酸投与に伴う膜電位変化と一致することを明らかにした。

神経伝達物質の基準⑤、⑥と⑦に関する実験の成功により、視細胞の神経伝達物質は L-グルタミン酸であることが確定した。

#### 4-6 錐体と水平細胞のシナプス

##### 4-6-1 視細胞の神経伝達物質放出のしくみ

視細胞シナプス終末は細胞膜が内側に陥入し、この部分に第二次神経細胞の樹状突起が入り込みシナプス連絡 (化学シナプス) している。この陥入を、錐体では Pedicle、そして桿体では Spherule と呼んでいる (Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970; Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。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 Triad を形成している。Triad ではシナプスリボンの正面に ON 型双極細胞の樹状突起が、またその脇に錐体水平細胞の樹状突起が位置している。陥入部以外にも双極細胞 (主に、OFF 型双極細胞) とのシナプス連絡が認められ、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) と呼ばれている (Lasansky, 1973)。桿体のシナプス終末には Spherule が一つあるいは二つ存在し、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 Spherule 内に伸展している。

視細胞のシナプスリボン周辺には多数のシナプス小胞が認められ、神経伝達物質が開口放出 (Exocytosis; エクソサイトーシス)<sup>23)</sup> している (Heidelberger *et al.*, 2005; Fox & Sanes, 2007)。シナプス終末の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に伴いシナプス小胞が細胞膜に移動そして融合し、内容物 (神経伝達物質) を細胞外に放出すると考えられている (例えば、

Schneggenburger & Neher, 2005; Heidelberger, 2007)。視細胞のシナプス終末には電位依存性 L 型カルシウムチャネルが発現し、これが神経伝達物質放出に不可欠である  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内供給路の一つとなっている (Heidelberger *et al.*, 1994; Mennerick & Matthews, 1996; Llobet *et al.*, 2003; Zenisek *et al.*, 2003)。このカルシウムチャネルの活性化域は  $-60 \text{ mV}$  より脱分極側にあり、暗時および明時における視細胞の膜電位変化域を概ねカバーしている。錐体と桿体とでは、L 型カルシウムチャネルを構成するタンパク質のサブユニットが異なることが知られている。これらのサブユニット ( $\alpha 1\text{D}$  subunit あるいは  $\alpha 1\text{F}$  subunit) を用いた免疫染色により、シナプスリボンの直下の細胞膜近辺に L 型カルシウムチャネルが集中して発現していることが確かめられている (例えば, Wässle *et al.*, 2003)。カルシウムチャネル以外に、細胞内にある  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫 (例えば, 滑面小胞体) からの放出も細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加に寄与している可能性が報告されている (Krizaj & Copenhagen, 2002)。

視細胞シナプス終末での開口放出は、視細胞内に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  センサーに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することによって始まると推測されている。視細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と神経伝達物質の放出の関係は極めて直線的であることが知られており、現在  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとしてシナプトタグミンが考えられている (Thoreson *et al.*, 2004; Heidelberger *et al.*, 2005; Rabl *et al.*, 2006)。シナプス小胞の膜は細胞膜と同じ脂質二重膜でできているため、細胞膜と容易に融合する。この融合は細胞膜の膜容量を測定することによって確認することが可能である (例えば, Innocenti & Heidelberger, 2008)。融合したシナプス小胞の膜はエンドサイトーシス (Endocytosis) を経て、シナプス小胞の膜として再利用される。このシナプス小胞の膜には小胞性グルタミン酸トランスポーター (ATP 依存性プロトンポンプを利用してグルタミン酸を取り込むトランスポーター) が発現し、これがグルタミン酸を小胞内に取り込む。このトランスポーターが機能する際、プロトン (水素イオン [ $\text{H}^+$ ]) も小胞内に取り込まれることが知られている (例えば, Liu & Edwards, 1997; DeVries, 2001)。このようにして小胞内に取り込まれたグルタミン酸の濃度は、 $100 \text{ mM}$  にも達する。視細胞のシナプス終末からグルタミン酸が放出されるとき、同時に  $\text{H}^+$  も放出されるため、結果として細胞外が酸性化する。この酸性化は、カルシウムチャネル活性を抑えることが報告されている (Barnes & Bui, 1991; Barnes *et al.*, 1993)。

しかし、リボンシナプスでの開口放出については未だ完全には解明されていない。

#### 4-6-2 水平細胞から錐体へのシナプス伝達

Baylor *et al.* (1971) は、アカミミガメ網膜の錐体にガラス管微小電極を刺入し、サイズの異なる光刺激 ( $70 \mu\text{m}$  と  $600 \mu\text{m}$  の円形の光照射) を網膜に与えたとき、惹起される光応答に違いがあることを見出した。大きな光刺激 ( $600 \mu\text{m}$ ) に対する光応答の振幅が微小光刺激

(70  $\mu\text{m}$ ) に対する応答振幅よりも小さいこと、さらに微小光照射によって錐体が過分極しているとき、この微小光に重ねてより大きな範囲を光照射すると、脱分極性成分が惹起されることであった。この脱分極応答の発生機序を探るため、錐体と錐体水平細胞の両方にガラス管微小電極を刺入し、通電により錐体水平細胞を過分極させると、錐体に脱分極応答が現れた。この通電実験から、暗時に水平細胞が脱分極しているとき、錐体に抑制性の出力（抑制性シナプス、あるいは負のフィードバックシナプス）を送っている可能性が明らかとなった（抑制性化学シナプス説）。後年、Toyoda & Tonosaki (1978) は錐体水平細胞への通電実験を実施し、Baylor *et al.* (1971) と同様の結果を得た。現在、錐体水平細胞から錐体への抑制性信号の伝播に関し、抑制性化学シナプス説に加え、細胞外電流説と細胞外 pH 説が唱えられている。しかし、結論は得られていない（例えば、Kramer & Davenport, 2015）。

#### 4-6-2-1 抑制性化学シナプス説

Stell & Lightfoot (1975) および Stell *et al.* (1975) は、キンギョ網膜の錐体と錐体水平細胞の間のシナプスを電子顕微鏡観察し、錐体水平細胞から錐体へのシナプスが抑制性である可能性を報じた（抑制性化学シナプス説）。同時期、生化学的および免疫組織学的手法を駆使し、錐体水平細胞から放出される神経伝達物質が GABA である可能性が明らかにされた（Lam & Steinman, 1971; Lam, 1976; Marc *et al.*, 1978; Lam *et al.*, 1978, 1979; Schwartz, 1982, 1987, 2002）。また、コイ網膜の赤色錐体に GABA<sub>A</sub> レセプターが存在することが電気生理学の実験によって明らかにされた（Murakami *et al.*, 1978, 1982a, b）。これらの知見を総合すると、暗時（脱分極状態）に錐体水平細胞は GABA を放出し、この GABA が錐体終末に発現する GABA<sub>A</sub> レセプターを活性化してクロライド電流を生み、錐体を過分極させると推測された（Cl<sup>-</sup> の平衡電位は暗時膜電位よりも過分極側 [-60 mV 付近] にある。）。この過分極は錐体終末に発現するカルシウムチャネル活性を低下させ、錐体による L-グルタミン酸放出を減少させると推測された（Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1978, 1982a, b）。

Kaneko & Tachibana (1986) は、カメ網膜から単離した錐体終末に GABA 感受性を見出し、水平細胞から錐体に対して抑制性化学シナプスを介して伝播されることを証明した（抑制性化学シナプス説）。1990年頃まで、この抑制性化学シナプス説（錐体水平細胞から錐体への抑制性化学シナプス）が同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成ならびに三原色過程から反対色過程への変換の主要なしくみであると考えられた。

1990年以降、錐体や錐体水平細胞に対し GABA およびこのアゴニストやアンタゴニストが顕著な効果を示さないこと、また錐体における Cl<sup>-</sup> の平衡電位が暗時の膜電位と概ね同じかあるいはむしろ脱分極側にある可能性があることなどが報じられ、抑制性化学シナプス説



は揺らぎ始めた (Perlman & Normann, 1990; Thoreson & Burkhardt, 1990; Burkhardt, 1993; Verweij *et al.*, 1996, 2003; Hirasawa & Kaneko, 2003)。

#### 4-6-2-2 細胞外電流説

錐体と第二次神経細胞 (双極細胞と錐体水平細胞) との間のシナプスが特殊な構造 (錐体神経終末の陥入型シナプス) をしていることに着目し, Byzov & Shura-Bura (1986) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックシグナルが化学的ではなく, 電氣的に伝播されるという説を発表した (細胞外電流説)。Kamermans *et al.* (2001) は, Byzov & Shura-Bura (1986) によって提唱された細胞外電流説に修正を加え, その妥当性を主張した。この研究では錐体終末の陥入部を流れる電流として, 錐体水平細胞に発生するグルタミン酸電流に加え, 錐体水平細胞膜に発現するヘミギャップ結合チャネルを介する膜電流を想定している (4-9 参照)。そして, ヘミギャップ結合チャネルが水平細胞の樹状突起 (錐体終末の陥入部に入り込んでいる水平細胞樹状突起) に発現していることを免疫組織化学的手法によって明らかにした。ヘミギャップ結合チャネルの開閉が錐体水平細胞の膜電位に依存していることを考慮すれば, 明暗変化に伴う水平細胞の膜電位変化がこのチャネル開閉状態に影響し, 最終的にシナプス間隙を流れる電流を増減させる可能性は充分にある。しかし, Dmitriev & Mangel (2006) はコンピュータシミュレーションを用いて細胞外電流説の妥当性を検討し, 錐体の膜電位ならびにカルシウムチャネル活性を変化させるほど充分な電位変化が細胞外 (錐体神経終末の陥入部分のシナプス間隙) に生じないことを報じた。また, Cadetti & Thoreson (2006) はカルベノキソロン (ギャップ結合チャネル阻害剤) の投与が錐体のカルシウムチャネル活性に影響しないことを見出した。これら 2 つの研究報告は, 細胞外電流説が錐体水平細胞から錐体への抑制性シグナル伝播のしくみとして機能しているという考えには否定的である。

最近, Fahrenfort *et al.* (2005), Klaasen *et al.* (2012) ならびに Vroman *et al.* (2013) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックシグナルがヘミギャップ結合チャネルをしてカルシウムチャネルに影響する可能性を報じた。また, ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 網膜から単離した水平細胞にはコネキシン55.5とコネキシン52.6が形成するヘミギャップ結合チャネルが発現し, このヘミギャップ結合チャネルが錐体への抑制信号形成に関与している可能性も明らかにされ, 細胞外電流説の勢いが増している (Sun *et al.*, 2012)。

#### 4-6-2-3 細胞外 pH 説

Hirasawa & Kaneko (2003) はアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) のスライス網膜標本にパッチクランプ法を適用し, 錐体水平細胞から錐体への抑制性シグナルの発生に関する

実験を行った。スライス標本を灌流するリンガー液に大量の pH 緩衝剤 (*N*-2-Hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [HEPES] や Tris-hydroxymethyl-aminomethane [Tris] など)を加えて細胞外の水素イオン濃度 (pH) 調節能を強化したとき、周辺受容野への照射に対する錐体の応答が減弱することを見出し、同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成に細胞外の  $H^+$  が関与している可能性を示した (細胞外 pH 説)。この説では ㉗ 暗時に脱分極状態にある水平細胞が  $H^+$  を放出し、㉘ 錐体-錐体水平細胞のシナプス間隙を酸性化するため、㉙ 錐体終末に発現する L 型カルシウムチャネル活性が低下してグルタミン酸放出量が減少すると推測している。Hirasawa & Kaneko (2003) は錐体神経終末の陥入部のシナプス間隙の pH 測定を試みたが、残念ながら成功していない。Vessey *et al.* (2005), Cadetti & Thoreson (2006) と Trenholm & Baldrige (2010) は同様の実験を行い、細胞外 pH 説を支持する結果を報じている。最近、Jouhou *et al.* (2007) はコイおよびキンギョ網膜から単離した水平細胞を利用し、水平細胞の細胞膜に電位依存性  $H^+$  輸送体が発現していること、水平細胞の脱分極刺激を与えると水平細胞周辺が酸性化すること、この酸性化は水平細胞に発現する電位依存性  $H^+$  輸送体を介する  $H^+$  の細胞外輸送による可能性の高いこと、そして  $H^+$  が水平細胞から錐体への抑制性シグナルに重要な役割を演じていることを報告した。

しかし、Molina *et al.* (2004), Kreitzer *et al.* (2007) と Jacoby *et al.* (2012) は 2 種のエイ (*Raja erinacea* と *Raja ocellata*) ならびにアメリカナマズ網膜から単離した水平細胞では脱分極刺激が水平細胞周辺をアルカリ化することを示しており、細胞外 pH 説に対して否定的である。

#### 4-7 ON 型双極細胞の光応答

脊椎動物網膜第二次神経細胞である双極細胞は、光照射に伴い過分極応答を示す OFF 型と脱分極応答を示す ON 型に分類される。暗時に視細胞 (桿体と錐体) が放出する L-グルタミン酸によって、OFF 型双極細胞は水平細胞と同様に脱分極状態にある。このため、光照射の終了によって過分極する。しかし、ON 型双極細胞は暗時に過分極した状態にあり、光照射に伴い脱分極する。ON 型および OFF 型の双極細胞は共に第二次神経細胞でありながら、全く逆の膜電位変化を惹起するしくみが長年謎であった。

OFF 型双極細胞は水平細胞と同様に、L-グルタミン酸によって開口する陽イオンチャネルを介して  $Na^+$  が流入するため暗時に脱分極していると考えられている (Kaneko & Shimazaki, 1975a; Kaneko & Saito, 1983; Saito & Kaneko, 1983)。一方、ON 型双極細胞については  $Cl^-$  が関与していると実験結果 (Miller & Dacheux, 1976) と  $Na^+$  が関与する実験結果 (Kaneko & Shimazaki, 1975b) が報じられている。さらに、Saito *et al.* (1978, 1979) は ON

型双極細胞への桿体からのシナプス入力は  $K^+$  あるいは  $Cl^-$  そして錐体からのシナプス入力は  $Na^+$  が関与している可能性が高いことを示している。

近年, ON 型双極細胞には APB (あるいは AP4) 感受性グルタミン酸レセプター (代謝型グルタミン酸レセプター) が存在し, これを介して受容野中心部の光応答が発生することが明らかとなった (Shiells *et al.*, 1981; Slaughter & Miller, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Copenhagen, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。この APB 感受性グルタミン酸レセプターを介する電位発生のおもなしくみは, 視細胞外節での光-電気信号変換機構に酷似している。すなわち, ①暗時に視細胞から放出された L-グルタミン酸が APB 感受性グルタミン酸レセプターに結合すると ON 型双極細胞内の G タンパク質が活性化し, この結果②ホスホジエステラーゼ活性が上昇する。このため, ③細胞内の cGMP が分解され, ④ cGMP 依存性陽イオンチャネルが閉じ過分極する。一方, 光照射に伴い視細胞から放出される L-グルタミン酸が減少あるいは停止すると, G タンパク質の活性化は起こらず, 細胞内の cGMP 濃度は高く維持されるため, 陽イオンチャネルは開いたままとなる。これが, 光照射に伴い ON 型双極細胞が脱分極するしくみである。このような APB 感受性グルタミン酸レセプターに関する知見は, 主に桿体とシナプス連絡を有する ON 型双極細胞から得られており, 錐体とシナプス連絡する双極細胞での研究は未だ充分ではない (Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。

1990年代入ると, 電気生理学的手法に遺伝子工学手法が加わり, ラット (*Rattus norvegicus*) 網膜の ON 型双極細胞に mGluR6 (代謝型グルタミン酸レセプターの一つ; Metabotropic glutamate receptor type 6の略) が発現・機能していることが明らかとなった (【注】21) 参照) (Nakajima *et al.*, 1993; Nomura *et al.*, 1994)。この報告以降, この mGluR6に関する研究は盛んに行われた。最近, このレセプターと TRPM1 (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1) チャネルが双極細胞の樹状突起に共存していることも明らかにされた (Koike *et al.*, 2010)。

#### 4-8 水平細胞に対するドーパミンの作用

網膜内のドーパミン作働性神経細胞の存在は, Häggendal & Malmfors (1963) によって最初に報告された。Ehinger & Nordenfeld (1977) もキンギョやウサギ (*Oryzolagus cuniculus*) において網膜内におけるドーパミン作働性神経細胞の局在を報告した。その後, Frederick *et al.* (1982) はヒト網膜のアマクリン細胞などがドーパミン作働性神経細胞である可能性を報告した。これらの知見から, 脊椎動物の冷血動物 (魚類, 両生類と爬虫類) から哺乳類 (ヒトを含む) に至るまで網膜内にドーパミン作働性神経細胞が存在することが確認され, ドー

パミンは神経伝達物質の一つであると考えられるようになった。

Dowling & Ehinger (1975, 1978) はキンギョ網膜において細胞体が内顆粒層（アマクリン細胞の細胞体付近）に存在し、この樹状突起が外網状層内および内網状層内でシナプスを形成する第6番目の神経細胞であることを見出して Interplexiform 細胞と名付けた。免疫組織化学的研究に基づき、魚類の Interplexiform 細胞はドーパミン作動性 (Dowling & Ehinger, 1975, 1978) とグリシン作動性 (Marc & Liu, 1981; Muller & Marc, 1990) に分けられた。ドーパミン作動性 Interplexiform 細胞は求心性神経細胞として、グリシン作動性細胞は遠心性神経細胞として機能していると考えられている (Marc & Liu, 1981; Zucker & Dowling, 1987; Kalloniatis & Marc, 1990)。ドーパミン作動性 Interplexiform 細胞はアマクリン細胞ならびに脳の求心性神経細胞からシナプス入力を受け取り、水平細胞と双極細胞に出力していることも明らかとなっている (Zucker & Dowling, 1987; Yazulla & Zucker, 1988)。また、長時間の暗順応に伴い Interplexiform 細胞から放出されるドーパミンが増加することが報告されている (Mangel & Dowling, 1985, 1987; Tornqvist, 1988; Yang *et al.*, 1988a, b) しかし、明順応後に増加するという報告もあり、未だ詳細は不明である (Shigematsu & Yamada, 1988; Baldrige & Ball, 1991; Dong & McReynolds, 1991; Umino *et al.*, 1991; Weiler & Akopian, 1992)。

下等脊椎動物網膜の水平細胞に対するドーパミンの作用は、比較的よく調べられている (Hedden & Dowling, 1978; Negishi & Drujan, 1979a–c; Laufer, 1982; Teranishi *et al.*, 1983, 1984; Piccolino *et al.*, 1984, 1987, 1989; Shigematsu & Yamada, 1988; Tornqvist, *et al.*, 1988; Popova, 2014)。ドーパミンが水平細胞に発現するドーパミン  $D_1$  レセプターに結合すると、G タンパク質の活性化を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが報じられている (Dowling & Watling, 1981; Watling & Dowling, 1981; Piccolino *et al.*, 1987)。このアデニル酸シクラーゼは ATP を基質にして cAMP を合成する。そして、cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化し、細胞内タンパク質をリン酸化する (Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。この結果、ギャップ結合チャネルは閉塞する (Van Buskirk & Dowling, 1981; Lasater & Dowling, 1985a, b; Lasater, 1987; DeVries & Schwartz, 1989)。つまり、ドーパミンは水平細胞間の電気シナプスの結合を減弱させて水平細胞の受容野を縮小し、水平細胞の光応答の横方向への伝播を抑制している (Teranishi *et al.*, 1983; Piccolino *et al.*, 1989)。水平細胞においてリン酸化されるタンパク質として、ギャップ結合チャネルタンパク質 (コネキシン) が報じられている (Lasater, 1987; Janssen-Bienhold *et al.*, 1993; McMahon *et al.*, 1994)。

最近では、ドーパミン  $D_1$  レセプター  $\rightarrow$  cAMP  $\rightarrow$  cAMP 依存性キナーゼを介する系 (Lasater 1987; DeVries & Schwartz, 1989) 以外に、細胞内  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ , cGMP, cGMP 依存性キナー

ぜ、アラキドン酸、PKCなどもギャップ結合の調節因子として働いていることが報告されている (Lasater, 1987; Miyachi & Murakami, 1989, 1991; Laufer *et al.*, 1989; Miyachi *et al.*, 1990, 1991, 1994)。

#### 4-9 単離水平細胞に惹起される奇妙な膜電流

網膜内で水平細胞同士はギャップ結合を介して電気シナプスを形成している (Yamada & Ishikawa, 1965; Naka & Rushton, 1967; Kaneko, 1971a)。DeVries & Schwartz (1989, 1992) は魚類網膜から単離 (・培養) した水平細胞にギャップ結合の片割れが存在していることを見つけ、これをヘミギャップ結合チャンネルと名付けた。このヘミギャップ結合チャンネルは、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の除去や細胞外へのキニンの添加により活性化、そしてハロサン、オクタノールやドーパミンの添加によって抑制されることが報じられた (DeVries & Schwartz, 1989, 1992; Malchow *et al.*, 1993, 1994; Dixon *et al.*, 1996)。

網膜組織内に水平細胞が存在するとき、水平細胞膜に発現しているヘミギャップ結合チャンネルは密着し、ギャップ結合チャンネルを形成する。網膜に単離操作を実施すると、水平細胞のギャップ結合は分断され、ヘミギャップ結合チャンネルの細胞外側部 (切断端) は突然細胞外液に曝される。つまり、ヘミギャップ結合チャンネルの細胞外切断端の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞内の nM オーダーから細胞外の mM オーダーへと一気に上昇し、このチャンネルは閉塞する。細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を下げると、ヘミギャップ結合チャンネルの細胞外切断端の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が細胞内へと近づくため、ヘミギャップ結合チャンネルが開口し、膜電流が発生すると推測される (DeVries & Schwartz, 1989; Malchow *et al.*, 1993; Dixon *et al.*, 1996)。

ギャップ結合の密着部では相対する細胞膜に埋め込まれたコネクソン (膜貫通タンパク質複合体) はお互い連結し、無機イオンや分子量 1 KD 以下の物質の輸送通路を形成している (例えば, Yeager & Nicholson, 1996; Harris, 2001; Nagy *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2004; Popova, 2014)。分子生物学的研究から、コネクソンは6つのコネキシン (サブユニットタンパク質) により構成されていること、さらにコネキシンには20種類程の亜種が存在することなどが判明している (例えば, Dermietzel *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 2000; Söhl & Willecke, 2004)。最近、網膜のギャップ結合研究にも漸く分子生物学的手法が取り入れられ、その解析が行われるようになってきた (例えば, コネキシン35: O'Brien *et al.*, 1996, コネキシン36: O'Brien *et al.*, 2012, コネキシン43: Kadle *et al.*, 1991; Giblin & Christensen, 1997; コネキシン50 or 57: Massey *et al.*, 2003)。

近年、網膜内に水平細胞が存在するときでさえ、水平細胞の細胞膜にはヘミギャップ結合チャンネルが発現し、このチャンネルが機能している可能性が報告された (Kamermans *et al.*, 2001; Fahrenfort *et al.*, 2005; Vroman *et al.*, 2013) (4-6-2-2参照)。中枢神経系ではグリア



細胞に発現するヘミギヤップ結合チャネルが物質通路として機能していることが報じられている (Ye *et al.*, 2003)。

#### 4-10 網膜から単離した細胞を活用した研究

単離神経細胞を作製する際、網膜を酵素処理した後、さらに機械的処理を行うため、神経細胞にある神経突起は切断・消失し、結果として単離神経細胞にシナプス部分は残存しないと推測されている。ところが、網膜から単離・培養した水平細胞は興奮性アミノ酸以外に、GABA やドーパミンにも反応することが明らかとなった (例えば, Lasater *et al.*, 1984; DeVries & Schwartz, 1989)。この結果は単離した水平細胞膜にこれらのシナプスレセプターが残存している可能性を示唆しており、これらの応答性を調査することはシナプス研究を進展させるために必要であると考えられた。網膜から水平細胞を含む総ての神経細胞とミュラー細胞が単離され、細胞膜の電気的性質 (各種のイオン電流) や化学物質に対する感受性が調査された。ただし、網膜内層に広範な神経突起を有するアマクリン細胞や神経節細胞では、単離に伴い神経突起の殆どが消失して概ね球体となるため、樹状突起に発現するイオンチャネルやレセプターの解析は望めない。

Tachibana & Okada (1991) はキンギョ網膜から双極細胞を単離し、この細胞を電気刺激することによって終末から放出される L-グルタミン酸を、アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞を用いて検出することを試み、成功した。この結果、網膜内で視覚情報伝達の最短経路、すなわち視細胞→双極細胞→神経節細胞の流れの中で、視細胞も双極細胞も神経伝達物質をして L-グルタミン酸を放出していることを示している。

網膜内から単離した神経細胞はイオンチャネルを介する膜電流やレセプターを介するで膜電流の解析以外に、生化学や免疫細胞化学などで用いられる標本としても用いられている。

#### 4-11 膜輸送体の研究

網膜は 5 層の神経細胞に加えて、これらの神経細胞の間に大型のグリア細胞であるミュラー細胞が配置された薄層の神経組織である。外界の光環境変化は視細胞で受容され、光-膜電位変換後化学シナプスを介して高次神経細胞に伝播される。網膜内での視覚情報処理は緩電位で行われることが明らかとなっている。

視覚情報伝達のため、シナプスで放出された神経伝達物質はシナプス後神経細胞の細胞膜にあるシナプスレセプターに作用し、その後速やかにシナプス間隙から消失する必要がある。例えば、網膜内にはアセチルコリンを神経伝達物質として放出しているアマクリン細胞 (第 3 次神経細胞) が存在する。アマクリン細胞から放出されたアセチルコリンはシナプス間隙に存在するアセチルコリンエステラーゼによってコリンと酢酸に分解され、その有効性を失

う。ところが、網膜において代表的な興奮性神経伝達物質である L-グルタミン酸および抑制性神経伝達物質である GABA は放出された後、放出した神経細胞自身あるいはミユラー細胞などに発現するトランスポーターを介して細胞内に回収され、シナプス間隙から除去される。最近の研究によって、網膜組織にはグルタミン酸トランスポーター、GABA トランスポーターやグリシントランスポーター以外にも、神経伝達物質に対応する多くのトランスポーターが存在していることが明らかになってきた（例えば、Barnstable, 1993; Hosoya & Tachikawa, 2009; Bringmann *et al.*, 2013; Do Nascimento *et al.*, 2013）。そして、それぞれのトランスポーターには複数の亜種が存在することも報告されている（例えば、Zhou & Danbolt, 2013）。

物質輸送にイオンの濃度差を利用しているトランスポーターがある。例えば、細胞内外の  $\text{Na}^+$  の濃度差を利用している場合、イオン（電荷）が移動するので、トランスポーターの活動を電気生理学的手法で調査することができる。例えば、視細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターは  $\text{Na}^+$  と関連（L-グルタミン酸 1 分子の取り込みに連動して 2 ～ 3 分子の  $\text{Na}^+$  の流入、1 分子の  $\text{H}^+$  の細胞内への流入と細胞外へ 1 分子の  $\text{K}^+$  の流出が生じる。そして、これらのイオンの移動以外に、L-グルタミン酸の取り込みと連動していない  $\text{Cl}^-$  の流入がある。）しており、その働きを電気生理学的に検出できるため、これまでに詳細に解析されてきた（Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995a, b; Yang & Wu, 1997; Eliasof *et al.*, 1998a, b）。マウス（*Mus musculus*）網膜桿体に発現するグルタミン酸トランスポーターは桿体によって放出された L-グルタミン酸の殆ど取り込むことが報じられている（Hasegawa *et al.*, 2006）。一方で、ジュウサンセンジリス網膜では、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ユ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報じられている（Szmajda & DeVries, 2011）。これらの研究を踏まえると、桿体と錐体ではシナプス間隙から L-グルタミン酸が除去されるしくみが異なっていることが予想される。

抑制性神経伝達物質の代表である GABA も、放出後直ちに放出した神経細胞やグリア細胞によって取り込まれる。このトランスポーターも起電性であり、GABA1 分子の取り込みに連動して 2 ～ 3 分子の  $\text{Na}^+$  の細胞内への流入、そして 1 ～ 2 分子の  $\text{Cl}^-$  の移動が生じる。網膜水平細胞の細胞膜には、GABA トランスポーターが発現している（Lam & Steinman, 1971; Schwartz, 1982, 1987, 2002; Takahashi *et al.*, 1995）。この GABA トランスポーターは GABA を細胞外から細胞内へ輸送（取り込み作用）するのみならず、細胞内から細胞外へ輸送（放出作用）する機能も有している（Schwartz, 1982, 1987, 2002）。従って、通常の化学シナプスにおける神経伝達物質の放出とは異なり、水平細胞では GABA トランスポーターを介して GABA が放出される可能性が報じられている（Schwartz, 1982, 1987, 2002）。

この GABA 放出は  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とせず、膜電位変化（脱分極）にのみに依存している (Schwartz, 1982, 1987, 2002)。放出された GABA は錐体に到達し、錐体を過分極させる可能性がある（つまり、この研究は抑制性化学シナプス説を支持すると考えられる。）(4-6-2-1 参照)。

神経機能を理解するには神経細胞やシナプスの究明に加え、神経伝達物質を回収するためのしくみ（トランスポーター）の解明も必須であり、起電性を持つトランスポーターに関しては電気生理学的研究の対象として多くの成果を得ている。また、非起電性のトランスポーターの研究については、ラジオアイソトープ法や免疫組織化学法を用いた研究が盛んに行われている（例えば、Chaudhry *et al.*, 1999; Pow, 2001）。

#### 4-12 網膜研究の新たな展開

##### 4-12-1 ミュラー細胞の役割

脊椎動物網膜に存在する 5 種類の神経細胞（視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）は光受容と視覚情報処理（例えば、色覚、形態視や運動視などの基礎過程形成）に、そしてグリア細胞の一種であるミュラー細胞は神経細胞の機能維持に必要な細胞外環境の整備及び神経細胞への栄養補給に当たっている（例えば、Newman & Reichenbach, 1996）。

網膜内には多種のイオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , や  $\text{H}^+$  など) と多種の化学物質 (L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, グリシン, GABA, アセチルコリン, セロトニン, ドーパミン, エンケファリン, コレシストキニン, サブスタンス P, やソマトスタチンなど) が存在し、これらの網膜内分布や濃度は神経細胞やシナプスの活動により大きく変動すると考えられている。例えば、外界の光環境変化に応じて視細胞を始め多くの神経細胞が活動すると、シナプス間隙の L-グルタミン酸濃度や GABA 濃度の上昇のみならず細胞外  $\text{K}^+$  濃度や  $\text{H}^+$  濃度などの変化を惹起する (Newman, 1995)。従って、時々刻々変化する外界の光環境を正確に捉えるには各種のイオンを含む細胞外物質の増減は直ちに調整される必要があり、このためにミュラー細胞は機能している。ミュラー細胞の細胞膜には  $\text{Na}^+$ -重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) 共輸送体や  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  対向輸送体（細胞内外の水素イオン濃度調節）、グルタミン酸トランスポーターや GABA トランスポーター（細胞外に放出された神経伝達物質の除去）、各種の電位依存性イオンチャネル（カルシウムチャネルやカリウムチャネルなど）やリガンド依存性レセプター（グルタミン酸レセプターや GABA レセプターなど）などが発現し、また細胞内には炭酸脱水素酵素、グルタミン合成酵素や cAMP 系などを調節する機序も存備わっていることが明らかになっている (Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979; Newman, 1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999; Brecha & Weigmann, 1994; Johnson

*et al.*, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Bringmann *et al.*, 2000; Pannicke *et al.*, 2000)。

哺乳動物の脳ではグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能していることが知られている (例えば, Hertz, 1979; Shank & Aprison, 1981; Tani *et al.*, 2014)。このサイクルでは, ①神経終末から放出された L-グルタミン酸がグルタミン酸トランスポーターを介してグリア細胞内に取り込まれ, ② L-グルタミン酸は細胞内のグルタミン合成酵素によって L-グルタミンに変換され細胞外に輸送される, ③この L-グルタミンはシナプス前神経細胞内に取り込まれ, グルタミン酸合成酵素によって L-グルタミン酸に変換され, ⑤神経伝達物質として放出されると考えられている。脊椎動物網膜においても, 視細胞や双極細胞の一部が L-グルタミン酸を神経伝達物質として放出していること (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972, 1975; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1988, 1991; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991), 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 L-グルタミン酸を取り込むこと (Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Eliasof *et al.*, 1998a, b), 視細胞に L-グルタミンを取り込むしくみが存在すること (Boulland *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003), そしてミュラー細胞にグルタミン合成酵素が存在すること (Reipe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979) が報告されている。網膜内で, 少なくとも視細胞と双極細胞は L-グルタミン酸を神経伝達物質として放出しており, これらのシナプス伝達にグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能している可能性が高い。ただし, マウス網膜の桿体-双極細胞間シナプスでは, 桿体から放出された L-グルタミン酸の殆どが桿体自身に発現するグルタミン酸トランスポーターにより取り込まれることが報告されている (Hasegawa *et al.*, 1997)。

ここ数年, 中枢神経系でのグリア細胞の研究が盛んに行われ, 神経機能のみならず発生や免疫にも重要な役割を担っていることが明らかになってきた。これらを勘案すると, 網膜におけるミュラー細胞の機能解析をさらに進める必要があろう。

#### 4-12-2 不思議な光感覚 ——視細胞以外の光感受性細胞の存在——

盲人への強光照射がメラトニン合成を抑制することが報じられている (Czeisler *et al.*, 1995; Lockley *et al.*, 1997)。また, 視細胞を有しないマウスが示す日周変化が明暗に同調すること, そして瞳孔反射を示すことも明らかになっている (Ebihara & Tsuji, 1980; Yoshimura & Ebihara, 1996; Freedman *et al.*, 1999; Lucas & Foster, 1999; Lucas *et al.*, 2001)。これらの報告は網膜に視細胞 (桿体と錐体) 以外の光感受性を有する細胞が存在することを示唆しており, 実際にヒトとマウスの網膜神経節細胞に視物質の一種であるメラノプシンが存在することが明らかにされた (Gooley *et al.*, 2001; Hannibal *et al.*, 2002; Hatter *et al.*, 2002;

Provencio *et al.*, 2002)。視細胞以外の光感受性細胞として神経節細胞が認知され、最近では内因性光感受性網膜神経節細胞 (Intrinsically photosensitive retinal ganglion cell; ipRGC) と呼ばれている。

錐体と桿体を光受容器とする網膜組織が形作る視覚機能として、明暗、色覚、形態視や運動視などが挙げられるが、内因性光感受性神経節細胞ではイメージ形成を伴わない視覚が形成され则认为られている。マウス網膜を用いた研究では神経節細胞の約 2 % がメラノプシンを含み、この神経節細胞の神経軸索 (視神経線維) は既存の視覚経路とは違い、視交叉上核に投射することが知られている (Hatter *et al.*, 2002)。視交叉上核は睡眠・覚醒や血中ホルモン濃度などの日周リズムを調整する生物時計が存在する場所として知られおり、内因性光感受性神経節細胞からの視覚情報は日周リズム形成に関与していると推測されている (Berson *et al.*, 2002)。近年、内因性光感受性神経節細胞を介する視覚経路は瞳孔反射に関与すること、さらに明るさの検出にも役立っている可能性があることが示された (Bailes *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2010, 2012; Ecker *et al.*, 2010; Sexton *et al.*, 2012)。

ヒト網膜に存在する桿体と錐体の光吸収特性はそれぞれ異なり、青色錐体 (430 nm)、緑色錐体 (530 nm)、赤色錐体 (561 nm) と桿体 (491 nm) である (例えば, Schnapf *et al.*, 1988)。盲人のメラトニン合成抑制効果と日周期リズムの同調で確認された内因性光感受性神経節細胞の光感受性は 480 nm (青色) 付近にあり、錐体や桿体とは一致しない (Lockley *et al.*, 2003; Zaidi *et al.*, 2007; Bailes & Lucas, 2013)。視細胞と内因性光感受性神経節細胞の生理学的な違いは、視細胞 (桿体と錐体) が光照射に伴い過分極性応答を示すのに対し、光感受性神経節細胞は脱分極性応答を発生することである (実際には、光受容に伴う脱分極によって活動電位を発生する。) (Berson *et al.*, 2002)。神経節細胞の細胞膜に存在するメラノプシンの密度は錐体や桿体の 1 万分の 1 であり、光電気変換には比較的強い光が必要であるが、神経節細胞の膜電位変化は大きくかつ持続的である (Do *et al.*, 2009)。

神経節細胞以外に、水平細胞にも光感受性が存在する可能性が報じられた (Bellingham *et al.* 2002; Drivenes *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2003)。Cheng *et al.* (2009) は硬骨魚 (アメリカナマズとキンギョ) の水平細胞にメラノプシンが存在し光感受性を示すこと、この結果電位依存性カルシウムチャネル活性が変化することを明らかにした。下等脊椎動物では神経節細胞のみならず水平細胞にもイメージ形成には寄与しない光感受性が存在するようである。今後、これららの機能解析をさらに進める必要がある。

#### 4-13 おわりに ——網膜機能の解明に向けて——

##### 4-13-1 水平細胞の役割

水平細胞は魚類から哺乳類に至るまでの総ての脊椎動物網膜に第二次神経細胞として存在



し、視細胞からのシナプス入力を受け取り、おそらく視細胞にシナプス出力を送っている（例えば、Baylor *et al.*, 1971; Thoreson *et al.*, 2008; Packer *et al.*, 2010; Jackman *et al.*, 2011）。色覚を有する下等脊椎動物では水平細胞は4～5種類そして色覚を有しない動物では2種類、また哺乳動物網膜には1～3種類の水平細胞が存在する。

網膜内に存在する水平細胞は、暗時に視細胞が放出するL-グルタミン酸を受け取り脱分極しており、光照射に伴って過分極する（ただし、色覚を有する下等脊椎動物網膜のC型水平細胞の発生する光応答は波長依存性を示すため、光照射に対して脱分極性光応答を示すこともある）。網膜内から単離（・培養）した水平細胞の細胞膜を調査すると、電位依存性カルシウムチャンネルや電位依存性ナトリウムチャンネル以外に複数のイオンチャンネルが発現している（例えば、Shingai & Christensen, 1983, 1986; Tachibana, 1983）。不思議なことに、単離（・培養）水平細胞にはカルシウム依存性活動電位が発生することも報告されている（例えば、Johnson & Lam, 1981; Tachibana, 1981）。しかし、生理的条件下の水平細胞（網膜内に存在し、水平細胞周辺のイオン環境が正常状態のとき）は、光照射に対して緩電位型の膜電位変化を示す神経細胞として機能している。

水平細胞同士はギャップ結合によって電気シナプス結合しているため、その受容野は極めて大きく数mmにも及ぶ（例えば、Kaneko, 1971a）。この広範な受容野情報は錐体に抑制性信号として伝播されるため、錐体の周辺部に抑制効果が生まれる（例えば、Baylor *et al.*, 1971）。結果として、双極細胞の中心-周辺拮抗的受容野の周辺部応答が形成されると考えられている（例えば、Marchiafava, 1978; Toyoda & Tonosaki, 1978; Dacey *et al.*, 2000）。下等脊椎動物網膜では、水平細胞から錐体への抑制性信号が三原色過程から反対色過程への色覚変換にも関与していると考えられている（例えば、Stell, 1975; Stell *et al.*, 1975; Murakami *et al.*, 1982a, b）。ただし、哺乳動物網膜水平細胞が反対色過程の形成に関与しているのか否かについては未だ確定していない（例えば、Dacey, 1999, 2000）。また、水平細胞から桿体への抑制性信号も報告され、錐体と同様に双極細胞の周辺応答を形成していると推測されている（Thoreson *et al.*, 2008）。水平細胞間のギャップ結合はドーパミンのみならずNOやレチノイン酸などによっても修飾されることを勘案すると、周囲の明暗状況以外にも周辺受容野形成に影響する要因が存在することが窺える。

Maksimova (1969) はキタカワカマス (*Esox lucius*) 網膜のL型水平細胞から膜電位変化を細胞内記録すると同時に、神経節細胞の発する活動電位を細胞外記録し、水平細胞に与えた細胞内通電刺激が神経節細胞に与える影響について調べた。結果として、水平細胞が神経節細胞の光応答形成に関与していることが示された。この研究は水平細胞の機能を明らかにしようとする最初の試みであり、この報告から半世紀近くが経過しようとしている今でさえ、水平細胞の役割を正確に説明することは難しい。とはいえ、これまでに得られた水平細胞に

関する知見を総合すると、網膜内視覚情報処理における水平細胞の役割として、形態視の基礎となる中心－周辺拮抗的受容野の形成ならびに色覚の基礎となる三原色過程から反対色過程への変換が妥当のようである。

#### 4-13-2 網膜における視覚情報処理の現状

網膜の機能を解明するには、出力細胞である神経節細胞の働きを理解することである。神経節細胞は活動電位を発生する細胞群であり、光刺激に対する応答性に基づき ON 型、OFF 型そして ON-OFF 型に分類される（例えば、Adrian & Matthews, 1927a, b, 1928; Hartline, 1938）。これらの分類は同心円状の受容野を持つことを前提とした分類であるが、哺乳類のような高等な動物では複雑な特徴抽出が行われており、ON 型、OFF 型そして ON-OFF 型とは異なる分類が採用されている。例えば、ネコ網膜神経節細胞では受容野特性や軸索伝送速度などの生理学的違いから、X 細胞、Y 細胞と W 細胞に分類されている（例えば、Enroth-Cugell & Robson, 1966; Cleland & Levick, 1974a, b; Stone & Fukuda, 1974）。また、神経節細胞は形態学的な分類も行われ、 $\alpha$  細胞、 $\beta$  細胞と  $\gamma$  細胞と名付けられている。後年、これらの  $\alpha$  細胞、 $\beta$  細胞と  $\gamma$  細胞は X 細胞、Y 細胞と W 細胞と一致していることが明らかとなった（例えば、Boycott & Wässle, 1974）。ヒトを含む霊長類網膜神経節細胞では細胞体と樹状突起の形態学的特徴から、パラソル細胞、ミジェット細胞とその他の細胞に分類されている（例えば、Schiller & Malpeli, 1977; Perry & Cowey, 1984; Shapley & Perry, 1986; Watanabe & Rodieck, 1989）。このように、神経節細胞の研究は古くから行われているものの、生理学的にも形態学的にも未だ充分とは言えない状況にある。

ウサギ網膜では方位選択性及び方向選択性を示す神経節細胞が報告されており、色や形に加え動きなどの視覚情報も神経節細胞を介して脳に伝播されているに違いない（例えば、Barlow *et al.*, 1964; Barlow & Levick, 1965）。最近、Baden *et al.* (2016) はカルシウムイメージ法を利用してマウス網膜の神経節細胞を調査した結果、32もの機能的に異なる神経節細胞が存在し、これらが脳に出力していることを報告した。これまでの形態学および生理学的検索によって得た神経節細胞の分類よりも多く、網膜内の神経細胞による情報処理が現有の知見を遥かに超え、極めて複雑である可能性があることを示している。今後、網膜を構成する神経細胞とこれらが形成するシナプスについてさらに詳細な研究が必要となり、このため新たな研究法の開発が必要となっている。

#### 化学物質の名称

化学物質（薬品を含む）の名称は、日本語（カタカナ）表記に努めた。しかし、薬品名称

が長く、略記が一般的に用いられる化学物質の場合、カタカナ表記を避けた。

## 謝 辞

網膜の神経構築に関する模式図（第6図Bと第7図）を描く際、David H. Hubel 著の「Eye, Brain, and Vision」（1988）の38ページにある網膜の模式図を参考にした。本論文第6図Bと第7図の作図に際し、丁寧な指導をして下さった高橋 洋子氏に深甚なる謝意を表する。

## 引 用 文 献

- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1927a), The action of light on the eye. Part I. The discharge of impulses in the optic nerve and its relation to the electric changes in the retina, *J. Physiol.*, **63**: 378–414.
- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1927b), The action of light on the eye. Part II. The processes involved in retinal excitation, *J. Physiol.*, **64**: 279–301.
- Adrian, E. D. and Matthews, R. (1928), The action of light of the eye. Part III. The interaction of retinal neurons, *J. Physiol.*, **65**: 273–298.
- Anderson, C. R. and Stevens, C. F. (1973), Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction, *J. Physiol.*, **235**: 655–691.
- Arrhenius, S. (1884), Recherches sur la conductivité galvanique des électrolytes, doctoral dissertation, Stockholm, Royal publishing house, P.A. Norstedt & söner.
- Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. and Wilson, M. (1987), Neurotransmitter-induced currents in retinal bipolar cells of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, *J. Physiol.*, **387**: 125–161.
- 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.
- Baden, T., Berens, P., Katrin Franke, K., Rosón, M. R., Bethge, M. and Euler, T. (2016), The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse, *Nature*, **529**: 345–350.
- Bader, C. R., MacLeish, P. R. and Schwartz, E. A. (1978), Responses to light of solitary rod photoreceptors isolated from tiger salamander retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 3507–3511.
- Bader, C. R., MacLeish, P. R. and Schwartz, E. A. (1979), A voltage-clamp study of the light responses in solitary rods of tiger salamander, *J. Physiol.*, **296**: 1–26.
- Bader, C. R., Bertrand, D. and Schwartz, E. A. (1982), Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina, *J. Physiol.*, **331**: 253–284.
- Bailes, H. J. and Lucas, R. J. (2010), Melanopsin and inner retinal photoreception, *Cell Mol. Life Sci.*, **67**: 99–111.
- Bailes, H. J. and Lucas, R. J. (2013), Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ( $I_{\max} \approx 479 \text{ nm}$ ) supporting activation of  $G_{q/11}$  and  $G_{i/o}$  signalling cascades, *Proc. Roy. Soc. B*, **280**: 20122987 (1–9).
- Baldridge, W. H. and Ball, A. K. (1991), Background illumination reduces horizontal cell receptive-field size in both normal and 6-hydroxydopamine-lesioned goldfish retinas, *Vis. Neurosci.*, **7**: 441–450.
- Barlow, H. B. and Levick, W. R. (1965), The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina, *J. Physiol.*, **178**: 477–504.
- Barlow, H. B., Hill, R. M. and Levick, W. R. (1964), Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit, *J. Physiol.*, **173**: 377–407.
- Barnes, S. and Bui, Q. (1991), Modulation of calcium-activated chloride current via pH-induced changes of calcium channel properties in cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **11**: 4015–4023.

- Barnes, S., Merchant, V. and Mahmud, F. (1993), Modulation of transmission gain by protons at the photoreceptor output synapse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 10081–10085.
- Barnstable, C. J. (1993), Glutamate and GABA in retinal circuitry, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **3**: 520–525.
- Baylor, D. A., Fuortes, M. G. F. and O'Bryan, P. M. (1971), Receptive fields of cones in the retina of the turtle, *J. Physiol.*, **214**: 265–294.
- 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.
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. and Markus Müntener, M. (2000), Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease, *Physiol. Rev.*, **80**: 1215–1265.
- Berg, D. K., Kelly, R. B., Sargent, P. B., Williamson, P. and Hall, Z. H. (1972), Binding of  $\alpha$ -bungarotoxin to acetylcholine receptors in mammalian muscle, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 147–151.
- Bernard, C. (1856), Analyse physiologique des propriétés des systèmes musculaires et nerveux au moyen du curare, *C. R. Acad. Sci.*, **43**: 825–829.
- Bernstein, J. (1902), Untersuchungen zur thermodynamik der bioelektrischen ström, *Pflüg. Arch.*, **92**: 521–562.
- Berson, A. M., Dunn, F. A. and Takao, M. (2002), Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock, *Science*, **295**: 1070–1073.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. and Gassmann, M. (2004), Molecular structure and physiological functions of GABA<sub>B</sub> receptors, *Physiol. Rev.*, **84**: 835–867.
- Bliss, T. N. P. and Lømo, T. (1973), Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the Dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path, *J. Physiol.*, **232**: 331–356.
- Boistel, J. and Fatt, P. (1958), Membrane permeability change during transmitter action in crustacean muscle, *J. Physiol.*, **144**: 176–191.
- Boulland, J.-L., Osen, K. K., Levy, L. M., Danbolt, N. C., Edwards, R. H., Strom-Mathisen, J. and Chaudhry, F. A. (2002), Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle, *Eur. J. Neurosci.*, **15**: 1615–1631.
- Bowery, N. G. and Smart, T. G. (2006), GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history, *Br. J. Pharmacol.*, **147**: S109–S119.
- Boycott, B. B. and Wässle, H. (1974), The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina, *J. Physiol.*, **240**: 397–419.
- Boyle, P. J. and Conway, E. J. (1941), Potassium accumulation in muscle and associated changes, *J. Physiol.*, **100**: 1–63.
- Brandon, C. and Lam, D. M.-K. (1983), L-Glutamic acid: A neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 5117–5121.
- Brecha, N. C. and Weigmann, C. (1994), Expression of GAT-1, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **345**: 602–611.
- Brew, H. and Attwell, D. (1987), Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells, *Nature*, **327**: 6722–6731.
- Bringmann, A., Schopf, S. and Reichenbach, A. (2000), Developmental regulation of calcium channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurophysiol.*, **84**: 2975–2983.
- Bringmann, A., Grosche, A., Pannicke, T. and Reichenbach, A. (2013), GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells, *Front. Endocrin.*, **4**: 254–260.
- Brock, L. G., Combs, J. S. and Eccles, J. C. (1951), The recording of potentials from motor neurons with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **117**: 431–460.
- Brock, L. G., Coombs, J. S. and Eccles, J. C. (1952), The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode, *J. Physiol.*, **117**: 431–460.
- Brown, T. M., Gias, C., Hatori, M., Keding, S. R., Semo, M., Coffey, P. J., Gigg, J., Piggins, H. D., Panda, S. and Lucas, R. J. (2010), Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system, *PLoS Biol.*, **8**: e1000558 (1–14).
- Brown, T. M., Tsujimura, S., Allen, A. E., Wynne, J., Bedford, R., Vickery, G., Vugler, A. and Lucas, R. J.

- (2012), Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans, *Curr. Biol.*, **22**: 1134–1141.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. (1993), Synaptic feedback, depolarization, and color opponency in cone photoreceptors, *Visual Neurosci.*, **10**: 981–989.
- 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.
- Byzov, A. L. and Shura-Bura, T. M. (1986), Electrical feedback mechanism in the processing of signals in the outer plexiform layer of the retina, *Vision Res.*, **26**: 33–44.
- Cadetti, L. and Thoreson, W. B. (2006), Feedback effects of horizontal cell membrane potential on cone calcium currents studied with simultaneous recordings, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1992–1995.
- 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.
- Cajal, S. R. (1892), *La rétine des vertébrés*, *La Cellule*, **9**: 119–257. (S. A. Thorpe & M. Glickstein (1973), trans., “The structure of the retina”, Springfield, Charles C. Thomas publisher.)
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A. and Stella, A. M. G. (2007), Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**: 766–775.
- Castañeda-Castellanos, D. R., Alexander C Flint, A. C. and Arnold R Kriegstein, A. R. (2006), Blind patch clamp recordings in embryonic and adult mammalian brain slices, *Nature Protoc.*, **1**: 532–542.
- Cervetto, L. and MacNichol, E. F. Jr. (1972), Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate, *Science*, **178**: 767–769.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R. and Edwards R. H. (1999), Molecular analysis of System N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission, *Cell*, **99**: 769–780.
- Cheng, N., Tsunenari, T. and Yau, K. W. (2009), Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts, *Nature*, **460**: 899–904.
- Chiu, T. H., Dolly, J. O. and Barnard, E. A. (1973), Solubilization from skeletal muscle of two components that specifically bind  $\alpha$ -bungarotoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**: 205–213.
- Chun, M.-H., HAN, S.-H., CHUNG, J.-W. and Wässle, H. (1993), Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **332**: 421–432.
- Clapham, D. E. (2007), Calcium signaling, *Cell*, **131**: 1047–1058.
- Clark, A. J. (1926), The reaction between acetylcholine and muscle cells, *J. Physiol.*, **61**: 530–546.
- Cleland, B. G. and Levick, W. R. (1974a), Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat’s Retina, *J. Physiol.*, **240**: 421–456.
- Cleland, B. G. and Levick, W. R. (1974b), Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat’s retina and an overall classification, *J. Physiol.*, **240**: 457–492.
- Cole, K. S. (1941), Rectification and inductance in the squid giant axon, *J. Gen. Physiol.*, **25**: 29–51.
- Cole, K. S. (1949), Dynamic electrical characteristics of squid axon membrane, *Arch. Sci. Physiol.*, **3**: 253–258.
- Cole, K. S. and Curtis, H. J. (1939), Electric impedance of the squid giant axon during activity, *J. Gen. Physiol.*, **22**: 649–670.
- Collingridge, G. L. and Lester, R. A. (1989), Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system, *Pharmacol. Rev.*, **40**: 143–210.
- Connaughton, V. P. (2003), Zebrafish retinal slice preparation, *Meth. Cell Sci.*, **25**: 49–58.
- Coombs, J. S., Eccles, J. C. and Fatt, P. (1955), The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory postsynaptic potential, *J. Physiol.*, **130**: 326–373.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.



- Couteaux, R. (1955), Localization of cholinesterase at neuromuscular junctions, *Intern. Rev. Cytol.*, **4**: 335–375.
- Czeisler, C. A., Shanahan, T. L., Klerman, E. B., Martens, H., Brotman, D. J., Emens, J. S., Klein, T. and Rizzo, J. F. 3rd. (1995), Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light, *N. Engl. J. Med.*, **332**: 6–11.
- Dacey, D. M. (1999), Primate retina: Cell types, circuits and color opponency, *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**: 737–763.
- Dacey, D. M. (2000), Parallel pathways for spectral coding in primate retina, *Ann. Rev. Neurosci.*, **23**: 743–775.
- Dacey, D. M., Packer, O. S., Diller, L., Brainard, D., Peterson, B. and Lee, B. (2000), Center surround receptive field structure of cone bipolar cells in primate retina, *Vision Res.*, **40**: 1801–1811.
- Dale, H. H. (1914), The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **6**: 147–190.
- Dale, H. H. (1934), Pharmacology and nerve endings (Walter Ernest Dixon Memorial Lecture), *Proc. R. Soc. Med.*, **28**: 319–332.
- Dale, H. H. (1952), Transmission of effects from nerve-endings (Lecture), Oxford University Press.
- Dale, H. H. and Dudley, H. W. (1929), The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse, *J. Physiol.*, **68**: 87–123.
- Dale, H. H. and Feldberg, W. (1934a), The chemical transmitter of secretory impulses to the sweat glands of the cat, *J. Physiol.*, **82**: 121–128.
- Dale, H. H. and Feldberg, W. (1934b), The chemical transmitter of vagus effects to the stomach, *J. Physiol.*, **81**: 320–334.
- Dale, H. H., Feldberg, W. and Vogt, M. (1936), Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings, *J. Physiol.*, **86**: 353–380.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L. and Snyder, S. H. (1992), A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide, *Ann. Neurol.*, **32**: 297–311.
- De Robertis, E. (1964), Electron microscope and chemical study of binding sites of brain biogenic amines, *Prog. Brain Res.*, **8**: 118–136.
- De Robertis, E. D. P. and Bennett, H. S. (1955), Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 47–58.
- Del Castillo, J. and Katz, B. (1954), Quantal components of the end-plate potential, *J. Physiol.*, **124**: 560–573.
- Dermietzel, R., Kremer, M., Paputsoglu, G., Stang, A., Skerrett, I. M., Gomès, D., Srinivas, M., Janssen-Bienhold, U., Weiler, R., Nicholson, B. J., Bruzzone, R. and Spray, D. C. (2000), Molecular and Functional Diversity of Neural Connexins in the Retina, *J. Neurosci.*, **20**: 8331–8343.
- DeVries, S. H. (2001), Exocytosed protons feedback to suppress the  $\text{Ca}^{2+}$  current in mammalian cone photoreceptors, *Neuron*, **36**: 1107–1117.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1989), Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers, *J. Physiol.*, **414**: 351–375.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1992), Hemi-gap junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol.*, **445**: 201–230.
- DeVries, S. H. and Schwartz, E. A. (1999), Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and Off bipolar cells in a mammalian retina, *Nature*, **397**: 157–160.
- Dietzel, I. D., Bruns, D., Polder, H.-R. and Lux, D. D. (1992), Voltage clamp recording, In *Practical electrophysiological methods* (eds. Kettenmann, H. and Grantyn, R.), New York, A John Wiley & Sons, Inc., pp. 256–262.
- Dingledine, R., Borges, K., DEREK Bowie, D. and Traynells, S. F. (1999), The glutamate receptor ion channels, *Pharmacol. Rev.*, **51**: 7–55.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I., Bieda, M. and Copenhagen, D. R. (1996), Quinine, intracellular pH and modulation of hemi-gap junctions in catfish horizontal cells, *Vision Res.*, **36**: 3925–3931.
- Dmitriev, A. V. and Mangel, A. C. (2006), Electrical feedback in the cone pedicle: A computational analysis,

- J. Neurophysiol., **95**: 1419–1427.
- Do, M. T. H., Kang, S. H., Xue, T., Zhong, H., Liao, H.-W., Bergles, D. E. and Yau, K.-W. (2009), Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells, *Nature*, **457**: 281–287.
- Do Nascimento, J. L. M., Sawada, L. A., Oliveira, K. R. M., Crespo-López, M. E., Oliveira da Silva, A. M. H., Hamoy, M., Yoshioka e Silva, C. Y., Bastos, G. N. T. and Soeiro-Pantoja, W. M. (2013), GABA and glutamate transporters: new events and function in the vertebrate retina, *Psychol. Neurosci.*, **6**: 145–150.
- Dong, C. J. and McReynolds, J. S. (1991), The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina, *J. Physiol.*, **440**: 291–309.
- Dowling, J. E. and Boycott, B. B. (1966), Organization of the primate retina: Electron microscopy, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **166**: 80–111.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1975), Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and *Cebus* monkey retina, *Science*, **188**: 270–273.
- Dowling, J. E. and Ehinger, B. (1978), The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **201**: 7–26.
- Dowling J. E. and Ripps H. (1972), Adaptation in skate photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, **60**: 698–719.
- Dowling, J. E. and Watling, K. J. (1981), Dopaminergic mechanisms in the teleost retina: II. Factors affecting the accumulation of cyclic AMP in pieces of intact carp retina, *J. Neurochem.*, **36**: 569–579.
- Dowling, J. E. and Werblin, F. S. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus Maculosus*. I. Synaptic structure, *J. Neurophysiol.*, **32**: 315–338.
- Dowling, J. E. and Werblin, F. S. (1971), Synaptic organization of the vertebrate retina, *Vision Res.*, **11**: 1–15.
- 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.
- Drujan, B. D. and Svætichin, G. (1972), Characterization of different classes of isolated retinal cells, *Vision Res.*, **12**: 1777–1784.
- Du Bois-Reymond, E. (1848), *Untersuchungen über Thierische Elektrizität, Erster Band*, Berlin: Georg Reimer.
- Du Bois-Reymond, E. (1849), *Untersuchungen über Thierische Elektrizität, Zweiter Band, Erste Abtheilung*, Berlin: Georg Reimer.
- Du Bois-Reymond, E. (1877), *Gesammelte Abhandlungen zur Allgemeinen Muskel- und Nervenphysik*, Leipzig, Veit & Co.
- Dudel, J. and Kuffler, S. W. (1961), Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction, *J. Physiol.*, **155**: 543–562.
- Ebashi, S. and Kodama, A. (1965), A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin, *J. Biochem.*, **58**: 107–108.
- Ebihara, S. and Tsuji, K. (1980), Entrainment of the circadian activity rhythm to the light cycle: Effective light intensity for a Zeitgeber in the retinal degenerate C3H mouse and the normal C57BL mouse, *Physiol. Behav.*, **24**: 523–527.
- Eccles, J. C. (1948), Conduction and Synaptic Transmission in the Nervous System, *Ann. Rev. Physiol.*, **10**: 93–116.
- Eccles, J. C. (1959), Excitatory and inhibitory synaptic action, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**: 247–264.
- Eccles, J. C. (1982), The synapse: From electrical to chemical transmission, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**: 525–539.
- Eccles, R. M. and Libet, B. (1961), Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia, *J. Physiol.*, **157**: 484–503.
- Eccles, J. C., Fatt, P. and Koketsu, K. (1954), Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons, *J. Physiol.*, **126**: 524–562.
- Eccles, J. C., Katz, B. and Kuffler, S. W. (1941), Nature of the end-plate potential in curarized Muscle, *J. Neurophysiol.*, **4**: 362–387.
- Ecker, J. L., Dumitrescu, O. N., Wong, K. Y., Alam, N. M., Chen, S. K., LeGates, T., Renna, J. M., Prusky, G. T., Berson, D. M. and Hattar, S. (2010), Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision, *Neuron*, **67**: 49–60.

- Ehinger, B. and Nordenfelt, L. (1977), Destruction of retinal dopamine containing neurons in rabbit and goldfish, *Exp. Eye Res.*, **24**: 179–186.
- Einthoven, W. (1902), Galvanometrische registratie van het menselijk electrocardiogram. In *Herinneringsbundel Professor S. S. Rosenstein*, pp. 101–107, Leiden, Eduard Ijdo.
- Einthoven, W. and Jolly, W. A. (1908), The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **1**: 373–416.
- 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.
- Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y. (1970), Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres, *Nature*, **228**: 34–36.
- Enroth-Cugell, C. and Robson, J. G. (1966), The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat, *J. Physiol.* **187**: 517–552.
- Erlanger, J. and Gasser, H. S. (1937), *Electrical signs of nervous activity*, Philadelphia, University of Pennsylvania Press.
- Euler, T. and Wässle, H. (1998), Different contributions of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors to rod and cone bipolar cells in a rat retinal slice preparation, *J. Neurophysiol.*, **79**: 1384–1395.
- Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977), Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp, *Science*, **198**: 1267–1269.
- Fahrenfort, I., Klooster, J., Sjoerdsma, T. and Kamermans, M. (2005), The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones, *Prog. Brain Res.*, **147**: 219–229.
- Fatt, P. and Katz, B. (1950), Some observations on biological noise, *Nature*, **166**: 597–598.
- Fatt, P. and Katz, B. (1951), An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular Electrode, *J. Physiol.*, **115**: 320–370.
- Fatt, P. and Katz, B. (1952), Spontaneous subthreshold activity at motor endings, *J. Physiol.*, **117**: 109–128.
- Fatt, P. and Katz, B. (1953), The effect of inhibitory nerve impulses on crustacean muscle fiber, *J. Physiol.*, **121**: 37–389.
- Fesenko, E. E., Kolochnikov, S. S. and Lyubarsky, A. L. (1985), Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment, *Nature*, **313**: 310–313.
- Foster, M. and Sherrington, C. S. (1897), *A text book of physiology*, Vol. 3: The central nervous system (7th Edition), New York, Macmillan.
- 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.
- Frederick, J. M., Rayborn, M. E., Laties, A. M., Lam, D. M.-K. and Hollyfield, J. G. (1982), Dopaminergic neurons in the human retina, *J. Comp. Neurol.*, **210**: 65–79.
- Freedman, M. S., Lucas, R. J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z. and Foster, R. (1999), Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors, *Science*, **284**: 502–504.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980), The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, **288**: 373–376.
- Furshpan, E. J. and Potter, D. D. (1959), Transmission at the giant motor synapses of the crayfish, *J. Physiol.*, **145**: 289–325.
- Galvani, L. (1791), *De viribus electricitatis in motu musculari commentaries*, Bon. Sci. Art. Inst. Acad. Comm., **7**: 363–418.
- Galvani, L. (1797), *Memorie sulla elettricità animale al celebre abate Lazzaro Spallanzani*, Bologna, Le Stampe Del Sassi.
- Garthwaite, J. (1991), Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, *Trends Neurosci.*

- 14: 60–67.
- Giblin, L. J. and Christensen, B. N. (1997), Connexin43 immunoreactivity in the catfish retina, *Brain Res.*, **755**: 146–150.
- Gold, G. H. and Dowling, J. E. (1979), Photoreceptor coupling in retina of the toad, *Bufo marinus* I. Anatomy, *J. Neurophysiol.*, **42**: 292–310.
- Goldman, D. E. (1943), Potential, impedance, and rectification in membranes, *J. Gen. Physiol.*, **27**: 37–60.
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E. and Saper, C. B. (2001), Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract, *Nat. Neurosci.*, **4**: 1165.
- Gordon, G. R. J., Mulligan, S. J. and MacVicar, B. A. (2007), Astrocyte control of the cerebrovasculature, *Glia*, **55**: 1214–1421.
- Grienberger, C. and Konnerth, A. (2012), Imaging calcium in neurons, *Neuron*, **73**: 862–885.
- Griffith, H. R. and Johnson, G. E. (1942), The use of curare in general anesthesia, *Anesthesiology*, **3**: 418–420.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985), A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440–3450.
- Guduric-Fuchs, L., Ringland, L. J., Gu, P., Dellett, M., Archer, D. B. and Cogliati, T. (2009), Immunohistochemical study of pig retinal development, *Mol. Vis.*, **15**: 1915–1928.
- Häggendal, J. and Malmfors, T. (1963), Evidence of dopamine-containing neurons in the retina of rabbits, *Acta Physiol. Scand.*, **59**: 295–296.
- Hagins, W. A. (1972), The visual process: Excitatory mechanisms in the primary receptor cells, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1**: 131–158.
- Hagins, W. A. and Yoshikami, S. (1974), A role for  $\text{Ca}^{2+}$  in excitation of retinal rods and cones, *Exp. Eye Res.*, **18**: 299–305.
- 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.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B. and Fahrenkrug, J. (2002), The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract, *J. Neurosci.*, **22**: RC191 (1–7).
- Hardingham, N., Dachtler, J. and Fox, K. (2013), The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis, *Front. Cell Neurosci.*, **7**: article 190 (1–19).
- Harris, A. L. (2001), Emerging issues of connexin channels: Biophysics fills the gap, *Q. Rev. Biophys.*, **34**: 325–472.
- Hartline, H. K. (1938), The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina, *Am. J. Physiol.*, **121**: 400–415.
- 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**: 1065–1070.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Hedden, W. L. and Dowling, J. E. (1978), The interplexiform cell system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurons, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **201**: 27–55.
- Heavner, W. and Pevny, L. (2012), Eye Development and Retinogenesis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**: 1–17.
- Heidelberger, R. (2007), Mechanisms of tonic, graded release: lessons from the vertebrate photoreceptor, *J. Physiol.*, **585**: 663–667.
- Heidelberger, R., Thoreson, W. B. and Witkovsky, P. (2005), Synaptic transmission at retinal ribbon synapses, *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**: 682–720.
- Heidelberger, R., Heineman, C., Neher, E. and Matthews, G. (1994), Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal, *Nature*, **371**: 513–515.
- Helboe, L. and Møller, M. (1999), Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes sst1

- and sst2 in the rat retina, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **40**: 2376–2382.
- Hermann, L. (1879a), *Handbuch der Physiologie*, Band 1: *Handbuch der Physiologie der Bewegungsapparate*, Leipzig, F. C. W. Vogel.
- Hermann, L. (1879b), *Handbuch der Physiologie*, Band 2: *Handbuch der Physiologie des Nervensystems*, Leipzig, F. C. W. Vogel.
- Hertz, L. (1979), Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters, *Prog. Neurobiol.*, **13**: 277–323.
- Heuser, J. E. and Reese, T. S. (1973), Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction, *J. Cell Biol.*, **57**: 315–44.
- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Å., Lundberg, J. M. and Schultzberg, M. (1980), Peptidergic neurons, *Nature*, **284**: 515–521.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1939), Action potentials recorded from inside a nerve fiber, *Nature*, **225**: 451–453.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952a), Propagation of electrical signals along giant nerve fibres, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **140**: 177–183.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952b), Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 449–472.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952c), The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 473–496.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952d), The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*, *J. Physiol.*, **116**: 497–506.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952e), A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**: 500–544.
- Hodgkin, A. L. and Katz, B. (1949), The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid, *J. Physiol.*, **108**: 37–77.
- Hodgkin, A. L. and Keynes, R. D. (1955), The potassium permeability of a giant nerve fibre, *J. Physiol.*, **128**: 61–88.
- Horn, R. and Korn, S. J. (1989), Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording, *J. Gen. Physiol.*, **94**: 789–812.
- Horn, R. and Korn, S. J. (1992), Prevention of rundown in electrophysiological recordings, *Method. Enzymol.*, **207**: 149–155.
- Hosoya, K.-I. and Tachikawa, M. (2009), Inner blood-retinal barrier transporter: Role of retinal drug delivery, *Pharm. Res.*, **26**: 2055–2065.
- Hubel, D. H. and Wiesel, T. N. (1963), Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens, *J. Neurophysiol.*, **26**: 994–1002.
- Hubel, D. H. and Wiesel, T. N. (1965), Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint, *J. Neurophysiol.*, **28**: 1041–1059.
- Hunt, C. C. and Kuffler, S. W. (1950), Pharmacology of the neuromuscular junction, *Pharmacol. Rev.*, **2**: 96–120.
- Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. and Kadowitz, P. J. (1986), Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**: 893–900.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987), Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 9265–9269.
- Iino, M. (1990), Biphasic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeca, *J. Gen. Physiol.*, **95**: 1103–1122.
- Innocenti, B. and Heidelberger, R. (2008), Mechanisms contributing to tonic release at the cone photoreceptor



- ribbon synapse, *J. Neurophysiol.*, **99**: 25–36.
- Ishida, A. T., Stell, W. T. and Lightfoot, D. O. (1980), Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **191**: 315–335.
- Ishida, A. T., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1984), Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius auratus* to L-glutamate and related amino acids, *J. Physiol.*, **348**: 255–270.
- Ito, M., Sakurai, M. and Tongroach, P. (1982), Climbing fibre-induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells, *J. Physiol.*, **324**: 113–134.
- Jackman, S. L., Babai, N., Chambers, J. J., Thoreson, W. B. and Kramer, R. H. (2011), A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors, *PLoS. Biol.*, **9**: e1001057 (1–15).
- Jacoby, J., Kreitzer, M. A., Alford, S., Qian, H., Tchernookova, B. K., Naylor, E. R. and Malchow, R. P. (2012), Extracellular pH dynamics of retinal horizontal cells examined using electrochemical and fluorometric methods, *J. Neurophysiol.*, **107**: 868–879.
- Janssen-Bienhold, U., Nagel, H. and Weiler, R. (1993), In vitro phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: Effects of the skate of light adaptation, *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 584–593.
- Jenkins, A., Muñoz, M., Tartelin, 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.
- Jeon, C.-J., Strettoi, E. and Masland, R. H. (1998), The major cell populations of the mouse retina, *J. Neurosci.*, **18**: 8936–8946.
- Johnson, D. and Lam, D. M.-K. (1981), Regenerative and passive membrane properties of isolated horizontal cells from a teleost retina, *Nature*, **292**: 451–454.
- Johnson, E. W. and Wernig, A. (1971), The binomial nature of transmitter release at the crayfish neuromuscular junction, *J. Physiol.*, **218**: 757–767.
- Johnson, J., Chen, T. K., Rickman, D. W., Evans, C. and Brecha, N. C. (1996), Multiple gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **375**: 212–224.
- Jouhou, H., Yamamoto, K., Homma, A., Hara, M., Kaneko, A. and Yamada, M. (2007), Depolarization of isolated horizontal cells of fish acidifies their immediate surrounding by activating V-ATPase, *J. Physiol.*, **585**: 401–412.
- Kadle, R., Zhang, J. T. and Nicholson, B. J. (1991), Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43, *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 363–369.
- Kalloniatis, M. and Marc, R. E. (1990), Interplexiform cells of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **297**: 340–358.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T. and Weiler, R. (2001), Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina, *Science*, **292**: 1178–1180.
- Kaneda, M. and Kaneko, A. (1991), Voltage-gated sodium currents in isolated retinal ganglion cells of the cat: relation between the inactivation kinetics and the cell type, *Neurosci. Res.*, **11**: 261–275.
- Kaneko, A. (1971a), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1971b), Physiology of the Retina, Physiological studies of single retinal cells and their morphological identification, *Vision Res.*, **11**: 17–26.
- 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 Shimazaki, H. (1975a), Effects of external ions on the synaptic transmission from photoreceptors to horizontal cells in the carp retina, *J. Physiol.*, **252**: 509–522.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1975b), Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **40**: 537–546.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1985), Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier potassium current in horizontal cells of *Carassius auratus* retina, *J. Physiol.*, **358**: 169–182.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1986), Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the

- turtle retina, *J. Physiol.*, **373**: 443–461.
- Kaneko, A., Lam, D. M.-K. and Wiesel, T. N. (1976), Isolated horizontal cells of elasmobranch retinæ, *Brain Res.*, **105**: 567–572.
- Kang, W.-S., Lim, M.-Y., Lee, E.-J., Kim, I.-B., Oh, S.-J., Brecha, N. C., Park, C.-B. and Chun, M.-H. (2001), Light- and electron-microscopic analysis of neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the guinea pig retina, *Cell Tiss. Res.*, **306**: 363–371.
- Katz, B. and Kuffler, S. W. (1941), Multiple motor innervation of the frog's sartorius muscle, *J. Neurophysiol.*, **4**: 209–223.
- Katz, B. and Miledi, R. (1970), Membrane noise produced by acetylcholine, *Nature*, **226**: 962–963.
- Katz, B. and Miledi, R. (1971), Further observation on acetylcholine noise, *Nature*, **232**: 124–126.
- Katz, B. and Miledi, R. (1972), The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components, *J. Physiol.*, **224**: 665–699.
- Kawamura, S. and Tachibanaki, S. (2014), Phototransduction. in vertebrate photoreceptors: Functional molecular bases, In *Vertebrate photoreceptors* (eds. by Furukawa, T., Hurley, J. and Kawamura, S.), Tokyo, Springer, pp. 23–45.
- Keynes, R. D. (1951), The leakage of radioactive potassium from stimulated nerve, *J. Physiol.*, **113**: 99–114.
- Keynes, R. D. and Lewis, P. R. (1951), The sodium and potassium content of cephalopod nerve fibres, *J. Physiol.*, **114**: 152–181.
- King, H. (1935), Curare alkaloids. Part I. Tubocurarine, *J. Chem. Soc.*, 1381–1389.
- Klaassen, L. J., Fahrenfort, I. and Kamermans, M. (2012), Connexin hemichannel mediated ephaptic inhibition in the retina, *Brain Res.*, **1487**: 25–38.
- Kobayashi, H. and Libet, B. (1968), Generation of slow post-synaptic potentials without increase in ionic conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **60**: 1304–1311.
- Kobayashi, H. and Libet, B. (1970), Actions of noradrenaline and acetylcholine on sympathetic ganglion cells, *J. Physiol.*, **208**: 353–372.
- Koelle, G. B. and Friedenwald, J. S. (1949), A histochemical method for localizing cholinesterase activity, *Exp. Biol. Med.*, **70**: 617–622.
- Koike, C., Obara, T., Uriu, Y., Numata, T., Sanuki, R., Miyata, K., Koyasu, T., Ueno, S., Funabiki, K., Tani, A., Ueda, H., Kondo, M., Mori, Y., Tachibana, M. and Furukawa, T. (2010), TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**: 332–337.
- Kolb, H. (1970), Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **B258**: 261–283.
- Kramer, R. H. and Davenport, C. M. (2015), Lateral inhibition in the vertebrate retina: The case of missing neurotransmitter, *PLoS. Biol.*, **13**: e10002322 (1–8).
- Kreitzer, M. A., Collis, L. P., Molina, A. J. A., Smith, P. J. S. and Malchow, R. P. (2007), Modulation of extracellular proton fluxes from retinal horizontal cells of the catfish by depolarization and glutamate, *J. Gen. Physiol.*, **130**: 169–182.
- Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (2002), Calcium regulation in photoreceptors, *Front. Biosci.*, **7**: 2023–2044.
- Lam, D. M.-K. (1972a), Biosynthesis of acetylcholine in Turtle Photoreceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 1987–1991.
- Lam, D. M.-K. (1972b), The biosynthesis and content of gamma-aminobutyric acid in the goldfish retina, *J. Cell Biol.*, **54**: 225–231.
- Lam, D. M. (1976), Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **40**: 571–579.
- Lam, D. M.-K. and Steinman, L. (1971), The uptake of [ $\gamma$ - $^3$ H] aminobutyric acid in the goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 2777–2781.
- Lam, D. M.-K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978),  $\gamma$ -Aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 6310–6315.
- Lam, D. M.-K., Su, T., Swain, L., Marc, R. E., Brandon, C. and Wu, J.-Y. (1979), Immunocytochemical local-

- ization of L-glutamic acid decarboxylase in the goldfish retina, *Nature*, **278**: 565–567.
- Lamb, T. D. and Simon, E. J. (1976), The relation between intercellular coupling and electrical noise in turtle photoreceptors, *J. Physiol.*, **263**: 257–286.
- Lamb, T. D., Collin, S. P. and Pugh, E. N. (2007), Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup, *Nature Rev. Neurosci.*, **8**: 960–975.
- Langley, J. N. (1898), On the union of cranial autonomic (visceral) fibres with nerve cells of the superior cervical ganglion, *J. Physiol.*, **23**: 240–270.
- Langley, J. N. (1901), On the stimulation and paralysis of nerve cells and nerve endings, *J. Physiol.*, **27**: 224–236.
- Langley, J. N. (1905), On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari, *J. Physiol.*, **33**: 374–413.
- 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. (1987), Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 7319–7323.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1982), Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 936–940.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1985a), Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 3025–3029.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1985b), Electrical coupling between pairs of isolated fish horizontal cells is modulated by dopamine and cAMP, In *Gap junction* (eds. Bennet, M. V. L. and Spray, D. C.), New York, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 393–404.
- Lasater, E. M., Dowling, J. E. and Ripps, H. (1984), Pharmacological properties of isolated horizontal cell and bipolar cells from the skate retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1966–1975.
- Laufer, M. (1982), Electrophysiological studies of drug actions on horizontal cells, In *The S-potentials* (eds. Drujan, B. D. and Laufer, M.), New York, Alan R. Liss, pp. 257–279.
- Laufer, M., Salas, R., Medina, R. and Drujan, B. (1989), Cyclic adenosine monophosphate as a second messenger in horizontal cell uncoupling in the teleost retina, *J. Neurosci. Res.*, **24**: 299–310.
- Libet, B. and Tosaka, T. (1969), Slow inhibitory and excitatory post-synaptic responses in single cells of mammalian sympathetic ganglia, *J. Neurophysiol.*, **32**: 43–50.
- Liets, L. C., Eliasieh, K., van der List, D. A. and Chalupa, L. M. (2006), Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**: 12156–12160.
- Ling, G. and Gerard, R. W. (1949), The normal membrane potential of frog sartorius fibers, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**: 383–396.
- 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.
- Liu, Y. and Edwards, R. H. (1997), The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration, *Ann. Rev. Neurosci.*, **20**: 125–156.
- Llobet, A., Cooke, A. and Lagnado, L. (2003), Exocytosis at the ribbon synapse of retinal bipolar cells studied in patches of presynaptic membrane, *J. Neurosci.*, **23**: 2706–2714.
- Lockley, S. W., Brainard, G. C. and Czeisler, C. A. (2003), High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**: 4502–4505.
- Lockley, S. W., Skene, D. J., Tabandeh, H., Bird, A. C., Defrance, R. and Arendt, J. (1997), Relationship between napping and melatonin in the blind, *J. Biol. Rhythms.*, **12**: 16–25.
- Loewi, O. (1921), Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenzirkulation, *Pflügers Arch. Gesamte Physiol.*, **189**: 239–242.
- Lucas, R. J. and Foster, R. G. (1999), Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin, *Endocrinology*, **140**: 1520–1524.
- Lucas, R. J., Douglas, R. H. and Foster, R. G. (2001), Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice, *Nat. Neurosci.*, **4**: 621–626.

- Lukasiewicz, P. D., Maple, B. R. and Werbin, F. S. (1994), A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina, *J. Neurosci.*, **14**: 1202–1212.
- Lundberg, J. M., Änggård, A., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T. and Mutt, V. (1980), Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: Functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion, *Proc Natl. Acad. Sci.*, **76**: 1651–1655.
- Maksimova, E. M. (1969), Effect of intracellular polarization of horizontal cells on ganglion cell activity in the fish retina, *Biofizika*, **14**: 537–544.
- Malchow, R. P., Qian, H. and Ripps, H. (1993), Evidence for hemi-gap junctional channels in isolated horizontal cells of the skate retina, *J. Neurosci. Res.*, **35**: 237–245.
- Malchow, R. P., Qian, H. and Ripps, H. (1994), A novel action of quinine and quinidine on the membrane conductance of neurons from the vertebrate retina, *J. Gen. Physiol.*, **104**: 1039–1055.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1985), Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine, *Science*, **229**: 1107–1109.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1987), The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: Effects of dopamine, light stimulation and time in the dark, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **23**: 91–121.
- 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.
- Marc, R. E. and Liu, W.-L. S. (1981), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **311**: 266–269.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABA-ergic pathway in the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–245.
- Marchiafava, P. L. (1978), Horizontal cells influence membrane potential of bipolar cells in the retina of the turtle, *Nature*, **275**: 141–142.
- Marmont, G. (1949), Studies on the axon membrane. I. A new method, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**: 351–382.
- Masland, R. H. (2011a), Cell populations of the retina: The Proctor lecture, *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **52**: 4581–4591.
- Masland, R. H. (2011b), The Neuronal Organization of the Retina, *Neuron*, **76**: 266–280.
- Massey, S. C., O'Brien, J. J., Trexler, E. B., Li, W., Keung, J. W., Mills, S. L. and O'Brien, J. (2003), Multiple neuronal connexins in the mammalian retina, *Cell Commun. Adhes.*, **10**: 425–430.
- Matteucci, C. (1838), Sur le courant électrique ou propre de la grenouille, *Bibl. Univ. Genève*, **15**: 157–168.
- Matteucci, C. (1842), Deuxième mémoire sur le courant électrique propre de la grenouille et sur celui des animaux à sang chaud, *Ann. Chim. Phys.*, **6** (Ser. III): 301–339.
- McMahon, D. G., Rischert, J. C. and Dowling, J. E. (1994), Protein content and cAMP-dependent phosphorylation of fractionated white perch retina, *Brain Res.*, **659**: 110–116.
- Mennerick, S. and Matthews, G. (1996), Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons, *Neuron*, **17**: 1241–1249.
- Miledi, R. and Potter, L. T. (1971), acetylcholine receptors in muscle fibres, *Nature*, **233**: 599–603.
- Miller, D. J. (2004), Sydney Ringer; Physiological saline, calcium and the contraction of the heart, *J. Physiol.*, **555.3**: 585–587.
- Miller, R. F. and Dacheux, R. F. (1976), Synaptic organization and ionic basis of on and off channels in mudpuppy retina. I. Intracellular analysis of chloride-sensitive electrogenic properties of receptors, horizontal cells, bipolar cells, and amacrine cells, *J. Gen. Physiol.*, **67**: 639–659.
- Miller, W. H. and G. D. Nicol (1979), Evidence that cyclic GMP regulates membrane potential in rod photoreceptors, *Nature*, **280**: 64–66.
- 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.
- Mittman, S., Taylor, W. R. and Copenhagen, D. R. (1990), Concomitant activation of two types of glutamate receptor mediates excitation of salamander retinal ganglion cells, *J. Physiol.*, **428**: 175–197.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinæ by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol.*, **419**: 213–224.

- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1991), Synaptic inputs to turtle horizontal cells analyzed after blocking gap junctions by intracellular injection of cyclic nucleotide, *Vision Res.*, **31**: 631–635.
- Miyachi, E.-I., Kato, C. and Nakaki, T. (1994), Arachidonic acid blocks gap junctions between retinal horizontal cells, *Neuroreport*, **5**: 485–488.
- Miyachi, E.-I., Miyakawa, A. and Murakami, M. (1991), Modulation of electrical coupling between retinal horizontal cells by intracellular messengers, *Neurosci. Res.*, **Suppl.15**: 41–49.
- Miyachi, E.-I., Murakami, M. and Nakaki, T. (1990), Arginine blocks gap junctions between retinal horizontal cells, *Neuroreport*, **1**: 107–110.
- Molina, A. J. A., Verzi, M. P., Birnbaum, A. D., Yamoah, E. N., Hammar, K., Smith, P. J. S. and Malchow, R. P. (2004), Neurotransmitter modulation of extracellular pH fluxes from isolated retinal horizontal cells of the skate, *J. Physiol.*, **560**: 639–657.
- Muller, J. F. and Marc, R. E. (1990), GABA-ergic and glycinergic pathways in the inner plexiform layer of the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **291**: 281–304.
- 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.*, **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. and Nakatani, K. (1978), Effects of GABA on neuronal activities in the distal retina of the carp, *Sensory Proc.*, **2**: 334–338.
- 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.
- Nachmansohn, D. (1968), Proteins in bioelectricity: The control of ion movements across excitable membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **61**: 1034–1041.
- Nagy, J. I., Dudek, F. E. and Rash, J. E. (2004), Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system, *Brain Res. Rev.*, **47**: 191–215.
- Naka, K.-I. and Rushton, W. A. H. (1967), The generation and spread of S-potentials in fish (*Cyprinidae*), *J. Physiol.*, **192**: 437–461.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1993), Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate, *J. Biol. Chem.*, **268**: 11868–11873.
- Narahashi, T., Moore, J. W. and Scott, W. R. (1964), Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **47**: 965–974.
- Nawy, S. and Copenhagen, D. R. (1987), Multiple classes of glutamate receptor on depolarizing bipolar cells in retina, *Nature*, **325**: 56–58.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990), Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells, *Nature*, **346**: 269–271.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1991), cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter, *Neuron*, **7**: 677–683.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979a), Reciprocal changes in center and surrounding S potentials of fish retina in response to dopamine, *Neurochem. Res.*, **4**: 313–318.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979b), Effects of catecholamines and related compounds on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 311–334.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979c), Similarities in effects of catecholamine and dopamine on horizontal cells in the fish retina, *J. Neurosci. Res.*, **4**: 335–349.
- Neher, E. (1988), The use of the patch clamp technique to study second messenger-mediated cellular events, *Neurosci.*, **26**: 727–734.



- Neher, E. and Sakmann, B. (1976), Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers, *Nature*, **260**: 799–802.
- Nelson, R., Famiglietti, E. V. Jr. and Kolb, H. (1978), Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina, *J. Neurophysiol.*, **41**: 472–483.
- Nernst, W. (1888), Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion, *Z. Phys. Chem.*, **3**: 613–637.
- 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.), New York, Oxford University Press, pp. 717–731.
- Newman, E. (1996), Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium-bicarbonate cotransport, *J. Neurosci.*, **16**: 159–168.
- Newman, E. (1999), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat, *Glia*, **26**: 302–308.
- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996), The Müller cell: a functional element of the retina, *Trends. Neurosci.*, **19**: 307–312.
- Nicol, G. D. and Miller, W. H. (1978), Cyclic GMP injected into retinal rod outer segments Increases latency and amplitude of response to illumination, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 5217–5220.
- Nishi, S. and Koketsu, K. (1960), Electrical properties and activities of single sympathetic neurons in frogs, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **55**: 15–30.
- Niswender, C. M and Conn, P. J. (2010), Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**: 295–322.
- Nobili, L. (1828), Comparaison entre les deux galvanomètres les plus sensibles, la grenouille et le multiplicateur à deux aiguilles, suivi de quelques résultats nouveaux, *Ann. Chim. Phys.*, **38**: 225–245.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. (1982), Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence, *Nature*, **299**: 793–797.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. (1983a), Primary structures of  $\beta$ - and  $\delta$ -subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences, *Nature*, **301**: 251–255.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. and Numa, S. (1983b), Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits, *Nature*, **302**: 528–532.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S. and Numa, S. (1983c), Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding  $\alpha$ -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor, *Nature*, **305**: 818–823.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miuyata, T. and Numa, S. (1984), Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence, *Nature*, **312**: 121–127.
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1994), Developmentally-regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate-receptor in rat rod bipolar cells, *Cell*, **77**: 361–369.
- O'Brien, J., Al-Ubaidi, M. R. and Ripps, H. (1996), Connexin 35: A gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina, *Mol. Biol. Cell*, **7**: 233–243.
- O'Brien, J. J., Chen, X., MacLeish, P. R., O'Brien, J. and Massey, S. C. (2012), Photoreceptor Coupling mediated by Connexin 36 in the Primate Retina, *J. Neurosci.*, **32**: 4675–4687.

- O'Daly, J. A. (1967), ATPase activity at the functional contacts between retinal cells which produce S-potential, *Nature*, **216**: 1329–1331.
- Overton, E. (1899), Ueber die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie Notizen über die Wassergewächse des Ober-Engadins, *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich.*, **44**: 88–135.
- Packer, O. S., Verweij, J., Li, P. H., Schnapf, J. L. and Dacey, D. M. (2010), Blue-yellow opponency in primate S cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **30**: 568–572.
- Palade, G. E. and Palay, S. L. (1954), Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anat. Rec.*, **118**: 335–336.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S. (1988), Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*, **333**: 664–666.
- Pannicke, T., Fischer, W., Biedermann, B., Schädlich, H., Grosche, J., Faude, F., Wiedemann, P., Allgaier, C., Illes, P., Burnstock, G. and Reichenbach, A. (2000), P2X<sub>7</sub> receptors in Müller glial cells from the human retina, *J. Neurosci.*, **20**: 5965–5972.
- Perlman, I. and Normann R. A. (1990), The effects of GABA and related drugs on horizontal cells in the isolated turtle retina, *Vis. Neurosci.*, **5**: 469–477.
- Perry, V. H. and Cowey, A. (1984), Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey, *Neuroscience*, **12**: 1125–1137.
- 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.*, **92**: 9417–9421.
- Piccolino, M., Neyton, J. and Gerschenfeld, H. M. (1984), Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina, *J. Neurosci.*, **4**: 2477–2488.
- Piccolino, M., Witkovsky, P. and Trimarchi, C. (1987), Dopaminergic mechanisms underlying the reduction of electrical coupling between horizontal cells of the turtle retina induced by *d*-amphetamine, bicuculline, and veratridine, *J. Neurosci.*, **7**: 2273–2284.
- Piccolino, M., Demontis, G., Witkovsky, P., Strettoi, E., Cappagli, G. C., Porceddu, M. L., de Montis, M. G., Pepitoni, S., Biggio, G., Meller, E. and Bohmaker, K. (1989), Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the control of horizontal cell electrical coupling in the turtle retina, *Eur. J. Neurosci.*, **1**: 247–257.
- 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.
- Polyak, S. (1941), *The retina*, Chicago, The University of Chicago Press.
- Popova, E. (2014), Role of dopamine in distal retina, *J. Comp. Physiol. A*, **200**: 333–358.
- Pow, D. V. (2001), Amino acids and their transporters in the retina, *Neurochem. Int.*, **38**: 463–484.
- Provencio, I., Rollag, M. D. and Castrucci, A. M. (2002), Photoreceptive net in the mammalian retina, *Nature*, **415**: 493–494.
- Puopolo, M., Bean, B. P. and Raviola, E. (2005), Spontaneous activity of isolated dopaminergic periglomerular cells of the main olfactory bulb, *J. Neurophysiol.*, **94**: 3618–3627.
- Rabl, K., Cadetti, L. and Thoreson, W. B. (2006), Paired-pulse depression at photoreceptor synapses, *J. Neurosci.*, **26**: 2555–2563.
- Rall, W. (1959), Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Exp. Neurol.*, **1**: 491–527.
- Rall, W. (1962), Electrophysiology of a dendritic neuron model, *Biophys. J.*, **2**: 145–167.
- Rall, W. (1967), Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input, *J. Neurophysiol.*, **30**: 1138–1168.
- Rall, W. (1969), Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons, *Biophys. J.*, **9**: 1483–1508.
- 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 Bio.*, **65**: 192–222.
- Redman, S. J. (1992), Single-electrode voltage clamp, In *Practical electrophysiological methods* (eds. Kettenmann, H. and Grantyn, R.), New York, A John Wiley & Sons, Inc., pp. 263–270.
- Reese, B. E. (2011), Development of the retina and optic pathway, *Vision Res.*, **51**: 613–632.
- 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.
- Ringer, S. (1882a), Regarding the action of hydrate of soda, hydrate of ammonia, and hydrate of potash on the ventricle of the frog's heart, *J. Physiol.*, **3**: 195–202.
- Ringer, S. (1882b), Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle, *J. Physiol.*, **3**: 380–393.
- Ringer, S. (1883a), A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart, *J. Physiol.*, **4**: 29–42.
- Ringer, S. (1883b), A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricle contraction, *J. Physiol.*, **4**: 222–225.
- Rosenberg, P. A. and Dichter, M. A. (1989), Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture, *J. Neurosci.*, **9**: 2854–2863.
- Rosenblueth, A. (1950), *The transmission of nerve impulses at neuro-effector junctions and peripheral synapses*, New York, The Technology Press of Massachusetts Institute of Technology and John Wiley and Sons, Inc.
- 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. 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., 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. (1979), Ionic mechanisms of two types of On-center bipolar cells in the carp retina, I. The responses to central illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 73–90.
- Sakmann, B. and Neher, E. (1984), Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes, *Ann. Rev. Physiol.*, **46**: 455–472.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Schiller, P. H. and Malpeli, J. G. (1977), Properties and tectal projections of monkey retinal ganglion cells, *J. Neurophysiol.*, **40**: 428–445.
- 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.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1997), Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel, *Neuroscience*, **78**: 1209–1216.
- Schnapf, J. L., Kraft, T. W., Nunn, B. J. and Baylor, D. A. (1988), Spectral sensitivity of primate photoreceptors, *Vis. Neurosci.*, **1**: 255–261.
- Schneggenburger, R. and Neher, E. (2005), Presynaptic calcium and control of vesicle fusion, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**: 266–274.
- Schwartz, E. A. (1982), Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, *J. Physiol.*, **323**: 211–227.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release  $\gamma$ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Schwartz, E. A. (2002), Transport-mediated synapses in the retina, *Physiol. Rev.*, **82**: 875–891.
- 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.
- Sexton, T., Buhr, E. and Van Gelder, R. N. (2012), Melanopsin and mechanisms of nonvisual ocular photoreception, *J. Biol. Chem.*, **287**: 1649–1656.
- Shank, R. P. and Aprison, M. H. (1977), Present status and significance of the glutamine cycle in neural tissues, *Life Sci.*, **28**: 837–842.
- Shapley, R. and Perry, V. H. (1986), Cat and monkey retinal ganglion cells and their visual functional roles, *Trends Neurosci.*, **9**: 229–235.
- Shiells, R. A., Falk, G. and Naghshineh, S. (1981), Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells, *Nature*, **294**: 592–594.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1990), Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **242**: 91–94.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992a), The glutamate-receptor linked cGMP cascade of the retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 17–20.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992b), Properties of the cGMP-activated channel of retinal on-bipolar cells, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 21–25.
- Shigematsu, Y. and Yamada, M. (1988), Effects of dopamine on spatial properties of horizontal cell responses, *Neurosci. Res.*, **Suppl.8**: 69–80.
- 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.
- Sigel, E. and Steinmann, M. E. (2012), Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors, *J. Biol. Chem.*, **287**: 40224–40231.
- Skou, J. C. (1957), The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**: 394–401.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2004), Gap junctions and the connexin protein family, *Cardiovas. Res.*, **62**: 228–232.
- Söhl, G., Güldenagel, M., Traub, O. and Willecke, K. (2000), Connexin expression in the retina, *Brain Res. Rev.*, **32**: 138–145.
- Steinbach, H. B. (1941), Chloride in the giant axons of the squid, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **17**: 57–64.
- Steinbach, H. B. and Spiegelman, S. (1943), The sodium and potassium balance in squid nerve axoplasm, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **22**: 187–196.
- Stell, W. K. (1967), The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina, *Am. J. Anat.*, **121**: 401–432.
- Stell, W. K. (1975), Horizontal cell axons and axon terminals in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 503–519.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 473–502.
- Stell, W. K., Ishida, A. T. and Lightfoot, D. O. (1977), Structure basis for On and Off-center response in retinal bipolar cells, *Science*, **198**: 1269–1271.
- 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.
- Stevens, C. F. (1972), Inferences about membrane properties from electrical noise measurements, *Biophys. J.*, **12**: 1028–1047.
- Stone, J. and Fukuda, Y. (1974), Properties of cat retinal ganglion cells: A comparison of W-cells with X- and Y-cells, *J. Neurophysiol.*, **37**: 722–748.
- Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H. J. and Maguire, G. (1999), Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: Localization and function of an endogenous signaling system, *Prog. Natl. Acad. Sci.*, **96**: 14565–14570.

- Südhof, T. C. (2012), Calcium control of neurotransmitter release, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**: a011353 (1–15).
- Sugawara, K. and Negishi, K. (1973), Effects of some amino acids on light-induced responses in the isolated carp retina, *Vision Res.*, **13**: 2479–2489.
- Sun, Z., Risner, M. L., van Asselt, J. B., Zhang, D.-Q., Kamermans, M. and McMahon, D. G. (2012), Connexin hemichannels of zebrafish retinal horizontal cells: Physiological and molecular basis for contribution to synaptic feedback, *J. Neurophysiol.*, **107**: 2624–2632.
- Svaetichin, G. (1953), The cone action potential, *Acta Physiol. Scand.*, **29** (Suppl. 106): 565–600.
- Svaetichin, G. (1956), Spectral response curves from single cones, *Acta Physiol. Scand.*, **39** (Suppl. 134): 17–46.
- 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. (1985), Perbility changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from *Carassius auratus*, *J. Physiol.*, **348**: 153–167.
- 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 (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.
- 高橋恭一 (2014), 脊椎動物網膜視細胞の神経伝達物質——グルタミン酸の放出と再利用——, 広島修道大学研究叢書第147号.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1987), Reversal potentials of rod horizontal cell responses in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl.6**: 165–174.
- 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.
- Takahashi, K.-I., Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (2003), SN1 catalyzes transport of glutamine across Müller cells in retina, In *The neural basis of early vision* (ed. Kaneko, A.), Tokyo, Springer, pp. 46–47.
- Takahashi, K. -I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995), Actions of nipecotic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from catfish retina, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 457–473.
- Takai, T., Noda, M., Mishina, M., Shimizu, S., Furutani, Y., Kayano, T., Ikeda, T., Kubo, T., Takahashi, H., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. (1985), Cloning, sequencing and expression of cDNA for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle, *Nature*, **315**: 761–764.
- Takeuchi, A. and Takeuchi, N. (1960), On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter, *J. Physiol.*, **154**: 52–67.
- Tani, H., Dulla, C. G., Farzampour, Z., Taylor-Weiner, A., Huguenard, J. R. and Reimer, R. J. (2014), A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release, *Neuron*, **81**: 888–900.
- Teranishi, T. and Negishi, K. and Kato, S. (1983), Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina, *Nature*, **301**: 243–246.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1984), Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in carp retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1271–1280.
- Thoreson, W. B. and Burkhardt, D. A. (1990), Effects of synaptic clocking agents on the depolarizing responses



- of turtle cones evoked by surround illumination, *Visual Neurosci.*, **5**: 571–583.
- Thoreson, W. B., Babai, N. and Bartoletti, T. M. (2008), Feedback from horizontal cells to rod photoreceptors in vertebrate retina, *J. Neurosci.*, **28**: 5691–5695.
- Thoreson, W. B., Rabl, K., Townes-Anderson, E. and Heidelberger, R. (2004), A highly  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse, *Neuron*, **42**: 595–605.
- Timothy, J. B. (1988), Calcium and neuronal function, *Neurosurg. Rev.*, **11**: 119–129.
- Törnqvist, K., Yang, X. L. and Dowling, J. E. (1988), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells, *J. Neurosci.*, **8**: 2279–2288.
- Tonge, D. A., de Burgh, H. T., Docherty, R., Humphries, M. J., Craig, S. E. and Pizzey, J. (2012), Fibronectin supports neurite outgrowth and axonal regeneration of adult brain neurons in vitro, *Brain Res.*, **1453**: 8–16.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-center bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–401.
- Toyoshima, C. and Unwin, N. (1988), Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes, *Nature*, **336**: 247–250.
- Toyoshima, C. and Unwin, N. (1990), Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction, *J. Cell Biol.*, **111**: 2623–2635.
- Trenholm, S. and Baldrige, W. H. (2010), The effect of aminosulfonate buffers on the light responses and intracellular pH of goldfish retinal horizontal cells, *J. Neurochem.*, **115**: 102–111.
- 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.
- Tsien, R. Y. (1980), New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype Structures, *Biochem.*, **19**: 396–2404.
- Umino, O., Lee, Y. and Dowling, J. E. (1991), Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina, *Vis. Neurosci.*, **7**: 451–458.
- Unwin, N. (1995), acetylcholine receptor channel imaged in the open state, *Nature*, **373**: 37–43.
- Valenstein, E. S. (2002), The Discovery of Chemical Neurotransmitters, *Brain Cognition*, **49**: 73–95.
- Van Buskirk, R. and Dowling, J. E. (1981), Isolated horizontal cells from carp retina demonstrate dopamine dependent accumulation of cyclic AMP, *Proc Natl. Acad. Sci.*, **78**: 7825–7829.
- Vaney, D. I. (1990), The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina, *Prog. Ret. Res.*, **9**: 49–100.
- van't Hoff, J. H. (1887), Die Rolle osmotischen Drucks in der Analogie zwischen Lösungen und Gasen, *Z. Phys. Chem.*, **1**: 481–508.
- Vaughn, J. E., Famiglietti, E. V. Jr., Barber, R. P. Jr., Saito, K., Roberts, E. and Ribak, C. E. (1981), GABAergic amacrine cells in rat retina: Immunocytochemical identification and synaptic connectivity, *J. Comp. Neurol.*, **197**: 113–127.
- Verweij, J., Kamermans, M. and Sperkrijse, H. (1996), Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium-current activation range, *Vision Res.*, **36**: 3943–3953.
- Verweij, J., Hornstein, E. P. and Schnapf, J. L. (2003), Surround antagonism in macaque cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **23**: 10249–10257.
- Veruki, M. L. and Wässle, H. (1996), Immunohistochemical localization of dopamine  $\text{D}_1$  receptors in rat retina, *Eur. J. Neurosci.*, **8**: 2286–2297.
- Vessey, J. P., Stratis, A. K., Daniels, B. A., Da Silva, N., Jonz, M. G., Lalonde, M. R., Baldrige, W. H., Barnes, S. (2005), Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse, *J. Neurosci.*, **25**: 4108–4117.
- Villa, P., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995), L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat, *J. Neurosci.*, **15**: 571–3582.
- Volta, A. (1793), Account of some discoveries made by Mr. Galvani from Mr. Alexander Volta to Mr. Tiberius Cavallo (in French), *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, **83**: 10–44.
- Volta, A. (1800), On the electricity excited by the mere contact of conducting substances of different kinds (in French), *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.*, **90**: 403–431.

- Vroman, R., Lauw, J., Klaassen, L. J. and Kamermans, M. (2013), Ephaptic communication in the Vertebrate retina, *Front. Hum. Neurosci.*, **7**: 1–4.
- Wang, H.-G., Lu, F.-M., Jin, I., Udo, H., Kandel, E. R., de Vente, J., Walter, U., Lohmann, S. M., Hawkins, R. D. and Antonova, U. (2005), Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins, *Neuron*, **45**: 389–403.
- Wässle, H., Haverkamp, S., Grünert, U. and Morgans, C. W. (2003), The cone pedicle, the first synapse in the retina. In *The Neural Basis of Early Vision*, pp. 19–38, Springer Verlag, Tokyo.
- 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.
- Watanabe, M. and Rodieck, R. W. (1989), Parasol and midgenet ganglion cells of the primate retina, *J. Comp. Neurol.*, **289**: 434–454.
- Watkins, J. C., Pook, P. K. C., Sunter, D. C., Davies, J. and Honorè, T. (1990a), Experiments with kainate and quisqualate agonists and antagonists in relation to the sub-classification of non-NMDA receptors, In *Excitatory Amino Acids and Neuronal Plasticity* (Ed. Ben-Ari, Y.), New York, Plenum Press, pp. 49–55.
- Watkins, J. C., Krosgaard-Larsen, P. and Honorè, T. (1990b), Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists, *Trends. Pharmacol. Sci.*, **11**: 25–33.
- Watling, K. J. and Dowling, J. E. (1981), Dopaminergic mechanisms in the teleost retina: I. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in homogenates of carp retina: Effects of agonists, antagonists and ergots, *J. Neurochem.*, **36**: 559–568.
- Weber, P. A., Chang, H.-C. Spaeth, K. E., Nitsche, J. M. and Nicholson, B. J. (2004), The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities, *Biophys. J.*, **87**: 958–973.
- Weiler, R. and Akopian, A. (1992), Effects of background illuminations on the receptive field size of horizontal cells in the turtle retina are mediated by dopamine, *Neurosci. Lett.*, **140**: 121–124.
- Werblin, F. S. (1978), Transmission along and between rods in the tiger salamander retina, *J. Physiol.*, **280**: 449–470.
- 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.
- Whittaker, V. P. (1964), Investigations on the storage sites of biogenic amines in the central nervous system, *Prog. Brain Res.*, **8**: 90–117.
- Wiesel, T. N. and Hubel, D. H. (1963a), Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body, *J. Neurophysiol.*, **26**: 978–993.
- Wiesel, T. N. and Hubel, D. H. (1963b), Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye, *J. Neurophysiol.*, **26**: 1003–1017.
- Wiesel, T. N. and Hubel, D. H. (1965a), Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens, *J. Neurophysiol.*, **28**: 1029–1040.
- Wiesel, T. N. and Hubel, D. H. (1965b), Extent of recovery from the effects of visual deprivation in Kittens, *J. Neurophysiol.*, **28**: 1060–1072.
- Willard, S. S. and Koochekpour, S. (2013), Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways, *Int. J. Biol. Sci.*, **9**: 948–959.
- Wilson, W. A. and Goldner, M. H. (1975), Voltage clamping with a single electrode, *J. Neurobiol.*, **6**: 411–422.
- Witkovsky, P. and Dowling, J. E. (1969), Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **100**: 60–82.
- Wojcik, S. M. and Brose, N. (2007), Regulation of membrane fusion in synaptic excitation-secretion coupling: speed and accuracy matter, *Neuron*, **55**: 11–24.
- Wu, S. M. (1985), Synaptic transmission from rods to bipolar cells in the tiger salamander retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 3944–3947.
- Wu, S. M. (1987), Synaptic connections between neurons in living slices of the larval tiger salamander retina, *J. Neurosci. Meth.*, **20**: 139–149.

- Wu, S. M. and Dowling, J. E. (1978), L-Aspartate: Evidence for a role in cone photoreceptor synaptic transmission in the carp retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 5205–5209.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinæ, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphobutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.
- Yang, X. L. and Wu, S. M. (1989), Effects of CNQX, APB, PDA and kynurenic acid on horizontal cells of the tiger salamander retina, *Vis. Neurosci.*, **3**: 207–212.
- Yang, J. H. and Wu, S. M. (1997), Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina, *Vision Res.*, **37**: 827–838.
- Yang, X. L., Tornqvist, K. and Dowling, J. E. (1988a), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. I. Effects of prolonged darkness and background illumination on light responsiveness, *J. Neurosci.*, **8**: 2259–2268.
- Yang, X. L., Tornqvist, K. and Dowling, J. E. (1988b), Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. II. Role of interplexiform cells and dopamine in regulating light responsiveness, *J. Neurosci.*, **8**: 2269–2278.
- Yazulla, S. and Zucker, C. L. (1988), Synaptic organization of dopaminergic interplexiform cells in the goldfish retina, *Vis. Neurosci.*, **1**: 13–29.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkoc, S. and Ransom, B. R. (2003), Functional Hemichannels in Astrocytes: A Novel Mechanism of Glutamate Release, *J. Neurosci.*, **23**: 3588–3596.
- Yeager, M. and Nicholson, B. J. (1996), Structure of gap junction intercellular channels, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**: 183–192.
- Young, J. Z. (1936a), The structure of nerve fibres in cephalopods and Crustacea, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **121**: 319–337.
- Young, J. Z. (1936b), The giant nerve fibers and epistellar body of cephalopods, *Q. J. Microsc. Sci.*, **78**: 367–386.
- Young, J. Z. (1938), The functioning of the giant nerve fibres of the squid, *J. Exp. Biol.*, **15**: 170–185.
- Yoshimura, T. and Ebihara, S. (1996), Spectral sensitivity of photoreceptors mediating phase-shifts of circadian rhythms in retinally degenerate CBA/J (rd/rd) and normal CBA/N (+/+) mice, *J. Comp. Physiol. A*, **178**: 797–802.
- Zaidi, F. H., Hull, J. T., Peirson, S. N., Wulff, K., Aeschbach, D., Gooley, J. J., Brainard, G. C., Gregory-Evans, K., Rizzo, J. F. 3rd., Czeisler, C. A., Foster, R. G., Moseley, M. J. and Lockley, S. W. (2007), Short-wavelength light sensitivity of circadian, pupillary, and visual awareness in humans lacking an outer retina, *Curr. Biol.*, **17**: 2122–2128.
- Zenisek, D., Davila, V., Wan, L. and Almers, W. (2003), Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells, *J. Neurosci.*, **23**: 2538–2548.
- Zhang, S. S.-M., Fu, X. Y. and Barnstable, C. J. (2002), Molecular Aspects of Vertebrate Retinal Development, *Mol. Neurobiol.*, **26**: 137–152.
- Zhou, Y. and Danbolt, N. C. (2013), GABA and glutamate transporters in brain, *Front. Endocrin.*, **4**: 1–14.
- Zucker, C. L. and Dowling, J. E. (1987), Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina, *Nature*, **330**: 166–168.

## 参 考 資 料

- Bresadola, M. (2008), Animal electricity at the end of the eighteenth century: The many facets of a great scientific controversy, *J. Hist. Neurosci.*, **17**: 8–32.
- Einthoven, W. (1901), Un nouveau galvanometer, *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.*, **6**: 623–633.
- Einthoven, W. (1903), Die galvanometrische Registrierung des menschlichen Elektrokardiogramms, zugleich eine Beurtheilung der Anwendung des Kapillar-Electrometers in Physiologie, *Pflügers Arch*, **99**: 472–480.

- 後藤昌義 (1957), 人体の電気現象とその応用, 永井書店.
- Hubel, D. H. (1988), *Eye, brain, and vision*, New York, W. H. Freeman.
- 勝木保次 (編) (1967), 生理学体系Ⅵ 感覚の生理学, 医学書院.
- 川喜多愛郎 (1977), 近代医学の史的基盤 (上, 下), 岩波書店.
- McComas, A. J. (2011), *Galvani's spark: The story of the nerve impulse* (1<sup>st</sup> edition), England, Oxford University Press, Inc. (酒井正樹・高畑雅一 (訳) (2014), 神経インパルス物語, 共立出版).
- 本川弘一 (1952), 電気生理学, 岩波書店.
- Piccolino, M. (1998), History of neuroscience Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani, *Brain Res. Bull.*, **46**: 381–407.
- Piccolino, M., Strettoi, E. and Laurenzi, E. (1989), Santiago Ramon Y Cajal, the retina and the neuron theory, *Doc. Ophthalmol.*, **71**: 123–141.
- 酒井正樹 (2013), これでわかるニューロンの電気現象, 共立出版.
- 杉 晴夫 (2006), 生体はどのようにして情報を処理しているのか?, 講談社.
- 外山敬介 (2010), ノーベル賞の生命科学入門 脳と神経のはたらき, 講談社.
- 内園耕二 (1967), 生体の電気現象 (I), コロナ社.

### 【注】

- 1) ガラス管微小電極法は細胞内電極法とも言われ, 単一筋肉細胞や単一神経細胞などの膜電位を電気生理学的に調べるために考案された方法である。1~1.5 mm のガラス管に熱を加えて引っ張り, 先端孔径 0.5  $\mu\text{m}$  またはそれ以下にまで細くしたガラスピペット (ガラス管微小電極あるいは細胞内電極と呼ぶ。) を作製し, この内部に塩化カリウム (KCl) などの電解質溶液を充填して使用する。この電解質溶液の中に銀-塩化銀線 (この塩化銀で被覆した銀線は, 電解質溶液と金属の境界面にイオンが蓄積することを防ぐため, 電気生理学では多用されている。) を置き, この銀-塩化銀線と前置増幅器・主増幅器内蔵型電圧計を金属線を介して接続した。膜電位を測定する場合, 細胞内にガラス管微小電極を刺入し, 細胞外にある基準電極 (銀-塩化銀電極) との間の電位差を測定する。第1図では, 非興奮時 (安静時) の神経細胞の膜電位を導出するための装置と電気の流れを模式化した。
- 2) 交流回路の全抵抗をインピーダンスと言い, 抵抗, 容量そしてインダクタンスからなる。Cole & Curtis (1939) が実験を行った頃, 神経細胞の細胞膜は容量と抵抗からなると推測されていた。従って, 細胞膜の容量が活動電位の発生の有無で大きく変化しないことを踏まえれば, インピーダンス測定によって抵抗成分が変化したと考えることができ, つまり膜の透過性が変化したと考えることができた。後年, 神経細胞の細胞膜に抵抗と容量以外にインダクタンスを加える必要性が報告されている (例えば, Cole, 1941)。しかし, インダクタンスの実体については明らかになっていない。
- 3) Du Bois Reymond (1877) はシナプス伝達が化学的である可能性, そして Hermann (1879b) は電気的である可能性を示唆した。以降, 化学説を主張する Dale と Loewi ならびに電気説を主張する Erlanger と Gasser が凌ぎを削った (Loewi, 1921; Erlanger & Gasser, 1937; Dale & Feldberg, 1934a, b)。1940 年以降も化学説を主張する Dale と電気説を主張する Eccles が真実を求めて実験を重ねるも, 中々結論を得ることはできなかった。しかし, 1950 年半ば, Eccles 一派は自分たちの電気生理学の実験結果を踏まえ電気説を放棄し, 化学説が勝利した (Eccles, 1982)。
- 4) 観測される現象は確率的に変動するものが多く, 観測データを説明するために統計モデルがよく使用される。確率分布の分布形は確率変数によって決まり, 確率変数は離散型と連続型に分けることができる。離散型確率分布として二項分布, ポアソン分布や幾何分布などが, 一方連続型確率分布として正規分布,  $\chi^2$  乗分布や t 分布などが知られている。Del Castillo と Katz (1954) は自発性微小終板電位の振幅を統計処理した結果, ポアソン分布に適合することを見つけた。
- 5) 南米の原住民がツツラフジ科の *Chondrodendron tomentosum* の樹皮から作製した物質であり, 矢毒として狩りに用いる。Bernard (1856) がその効果をカエルの神経筋標本で調査し, 筋肉側にその作用部位があることを明らかにした。クラーレの主成分はツボクラリンであることが明らかになっている (King, 1935)。クラーレは脊椎動物の神経筋接合部において, 筋肉のシナプス後膜 (アセチルコリンレセプター) に結合し, 神経伝達物質であるアセチルコリンの作用を阻害する。つまり, 運動神経と筋肉の情報伝達

を遮断する。Griffith & Johnson (1942) は、クラーレを筋弛緩剤として麻酔に使用した。現在でも、合成されたクラーレが臨床現場で使用されている。

- 6) ヒトを始めとする真核生物において、遺伝子から mRNA に転写される際、先ず mRNA 前駆体からイントロン（遺伝子に不要な塩基配列）が除去され、エクソン（遺伝子を構成する塩基配列）のみからなる成熟 mRNA が作られる。この成熟 mRNA に逆転写酵素を作用させて合成された DNA を complementary DNA（相補的 DNA あるいは cDNA）と呼ぶ。cDNA はイントロンを含まない状態の遺伝子（塩基配列）を知ることができ、ため、遺伝子クローニングに広く利用されている。cDNA はタンパク質に翻訳される領域の配列が開始コドンから終止コドンまで総て含まれており、タンパク質の一次構造（アミノ酸配列）を解明するために大変便利である。
- 7) 細胞膜に発現するイオンチャネル、レセプターやトランスポーターなどはタンパク質でできている。タンパク質はアミノ酸がペプチド結合した高分子であり、基本的にアミノ酸の配列は遺伝子に刻まれている。遺伝子にコードされた情報に基づき配置されたアミノ酸をタンパク質の一次構造と呼ぶ。アミノ酸を水素結合などにより  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートと呼ばれる平面を形成する。これがタンパク質の二次構造である。この二次構造は水素結合、共有結合（ジスルフィド結合）、疎水性相互作用や静電的相互作用により立体（三次元）構造を形成する。これがタンパク質の贅辞構造である。さらに、複数のタンパク質が一つの機能体を形成するとき、タンパク質が4次構造を形成すると表現することがある。
- 8) ホルモンレセプターやシナプスレセプターは生体内にある生理活性物質（ホルモンや神経伝達物質）が結合し、その作用を発揮する。アゴニストとはレセプターに結合して、生体内にある生理活性物質と同様の生体反応を示す薬剤（リガンドとも言う。）を指す。他方、アンタゴニストとはレセプターに結合することで、生理活性物質の機能を妨げる薬剤を指す。
- 9) ガラス管微小電極でカエル骨格筋を膜電位固定し、膜電流を導出すると、揺らぎが認められた（Katz & Miledi, 1970, 1971）。この揺らぎを対象とした研究をノイズ解析と呼び、イオンチャネルの単一チャネルコンダクタンスや細胞に発現するチャネル数を推定することができる。ノイズ解析は、常電流ノイズ解析と非定常ノイズ解析に分けることができる（Stevens, 1972; Anderson & Stevens, 1973）。ノイズ解析によって、膜電位変化がイオンチャネルの開閉を伴うことが明らかとなった。パッチクランプ法が開発される前、ノイズ解析は盛んに行われた。
- 10) 顕微鏡観察が困難な組織内に埋もれ、顕微鏡による確認が困難な神経細胞を対象として膜電流記録を行うパッチクランプ法を、特にブラインドパッチ法と呼ぶ（例えば、Castañeda-Castellanos *et al.*, 2006）。パッチ電極を通じて矩形波電流を流し、この波形の変化を観察しながら、電極を細胞に接触させ膜電流を導出する。複数の細胞種が混在する組織においてブラインドパッチ法を適用する場合、どの種の細胞から記録を得ているのかが不明であるため、電極内液に標識物質を加えて実験終了後細胞を同定する必要がある。
- 11) シナプス伝達に伴い樹状突起に発生するシナプス後電位（緩電位応答 [アナログ信号]）は、神経軸索起始部で活動電位の発生を促す。活動電位の発生頻度はシナプス後電位の振幅と時間経過に依存している。神経軸索の終末に到達した活動電位は、シナプス終末から神経伝達物質を放出させる。神経伝達物質の放出量（と放出時間）は活動電位の発生頻度と持続時間に依存している。特異な形態を持つ神経細胞が細く・長い突起（神経軸索）を介して電位変化を伝播するために、進化の過程でイオンチャネルを獲得し、これを巧みに利用して活動電位（デジタル信号）を発生させるようになったに違いない。しかし、神経細胞同士の情報伝達（シナプス伝達）ではシナプス間隙が存在するため、デジタル信号は一旦神経終末で終了し、神経伝達物質の放出というアナログ信号に置き換えられる。つまり、脳での情報処理がデジタルで行われるという表現には、シナプス伝達がアナログ処理であるという事実が含まれていることになる。
- 12) シナプスは、電気シナプスと化学シナプスに分類される。電気シナプスではシナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞がギャップ結合し、このギャップ結合チャネルを介してイオンは自由に移動することができる。このため、膜電位変化はこのギャップ結合をそのまま通過する。一方、化学シナプスにはシナプス間隙が存在するため、シナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞を繋ぐ化学物質が存在し、神経伝達物質と言う。シナプス前神経細胞の脱分極に伴い放出された神経伝達物質はシナプス間隙を拡散し、シナプス後神経細胞に到達する。シナプス後神経細胞にはシナプスレセプターが発現し、神経伝達物質と結合して、イオンチャネルを活性化して膜電位変化を引き起こす。現在、網膜の神経伝達物質として L-グルタミン酸、GABA、グリシン、ドーパミンやアセチルコリン以外に数種類の神経伝達物質が知ら

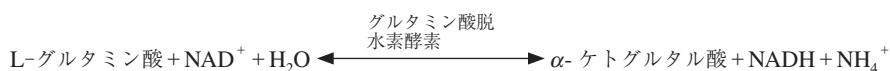


- れている。当然、これらの神経伝達物質に対応するシナプスレセプターが存在することが明らかとなっている。1種類の神経伝達物質に対して複数のシナプスレセプターが存在することがある。例えば、GABAレセプターにはGABA<sub>A</sub>、GABA<sub>B</sub>そしてGABA<sub>C</sub>レセプターの3種類が報じられている。
- 13) 脂質二重膜でできた細胞膜には多くのタンパク質が存在している。シナプスレセプターやイオンチャネルなどもタンパク質の一つであり、細胞膜にイオンの通路を形成する。イオンチャネルの通路の選択性は高く、例えばナトリウムチャネルはNa<sup>+</sup>のみをクロライドチャネルはCl<sup>-</sup>のみを通過させる。チャネルを介するイオンの駆動力は細胞内外の電位差とイオン濃度による。イオンチャネルの開閉は多くのしくみで制御されている。膜電位により開閉が制御されているイオンチャネルを電位依存性イオンチャネル、化学物質（薬剤）の有無により開閉が制御されているイオンチャネルをリガンド依存性イオンチャネルと呼ぶ。これら以外に、機械的変異や温度差などによって開閉するイオンチャネルも知られている。網膜の神経細胞に発現する電位依存性イオンチャネルとして、カルシウムチャネル、ナトリウムチャネル、カリウムチャネルやクロライドチャネルなどが知られている、それぞれは、さらにサブタイプに分類される。リガンド依存性イオンチャネルとして、グルタミン酸レセプターチャネル、GABAレセプターチャネル、グリシンレセプターチャネル、アセチルコリンレセプターチャネルなどが知られている、これらのリガンド依存性イオンチャネルもサブタイプが存在している。
  - 14) 網膜をバブリン処理ならびに機械処理して神経細胞を単離したとき、視細胞、双極細胞と水平細胞は極めて特異な形態を呈しているため、その区別は容易である。しかし、アマクリン細胞と神経節細胞は網膜内から単離された後、神経軸索や神経突起が消失して概ね球形となり、両者の区別は困難であった。単離した神経節細胞を実験に供したいとき、神経節細胞を染色する方法が開発された（例えば、Kaneda & Kaneko, 1991）。単離操作を行う以前に神経節細胞が達する脳内部位に予め色素を投与する（ネコでは外側膝状体と上丘に2%の1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate [DiI]を注入し、数日後に単離操作を行う。この間、DiIは神経軸索を逆行性に移動し、網膜内にある細胞体を赤く染色する。）。従って、単離後色素で染色された球体細胞が神経節細胞である。ただし、単離後球形を呈するアマクリン細胞を神経節細胞と区別する方法がなく、アマクリン細胞の研究は専らスライス網膜標本で行われた。
  - 15) 単離操作終了後、神経細胞を含む懸濁液をガラス板（カバーガラスなど）の上に置き、Leibovitz's L-15 MediumやMedium 199のような培養液（魚類網膜細胞で一般的に使用されている。）を加え静置する。数時間経過すると少数の細胞はガラスに接着するが、生理実験に供するためリンガー液を灌流すると単離細胞の多くはガラス板から剥がれてしまう。数日間経過後、単離細胞の一部はガラス板に強固に接着し、リンガー液の灌流にも耐えうようになり、生理実験が可能となる。しかし、樹状突起が残存するような単離細胞の場合、突起の一部がガラス板から剥がれ、ガラス管微小電極やパッチ電極での記録が困難になることがある。Tachibana (1981, 1983)は寒天中に単離水平細胞（水平細胞は細胞体の大きさが50 μmを超える大きな神経細胞である。）を封入し、動きを止めて生理実験を行った。その後、ガラス板にコンカナバリン A を塗布することで単離細胞が不動となることが明らかとなり、この方法が用いられるようになった（例えば、Puopolo *et al.*, 2005）。コンカナバリン A 以外に、ポリ-L-リシンなども使用された（例えば、Rosenberg & Dichter, 1989）。近年、LamininやFibronectinなどのタンパク質をガラス板に塗布することで、単離細胞の着床が良くなることがわかり汎用されている（例えば、Tonge *et al.*, 2012）。
  - 16) 細胞膜あるいは細胞質（細胞核内も含む）には、外界のみならず身体内由来の各種の変化を受けとるための分子（あるいはその複合体）が存在している。この分子（あるいはその複合体）をレセプター（受容体）と呼ぶ。例えば、脊椎動物味覚細胞には味分子に対する味レセプター、化学シナプスではシナプス後神経細胞にシナプスレセプター、あるいはホルモンの標的細胞にはホルモンレセプターが発現している。神経伝達物質の受容にかかわるシナプスレセプターは膜貫通型レセプターであり、細胞膜に埋められて存在している。これらのレセプターはイオンチャネルと直接的に連動するイオンチャネル型レセプターと、Gタンパク質を介してイオンチャネルと間接的に連動する代謝型レセプターに分類される。シナプスレセプターがイオンチャネル型レセプターであれば、シナプスレセプターへの神経物質の結合に伴いイオンチャネルの開閉が生じる。一方、代謝型レセプターであれば、シナプスレセプターへの神経物質の結合に伴いGタンパク質が活性化し、その後細胞内でセカンドメッセンジャーが働き、最終的にイオチャネルの開閉に結びつく。脊椎動物網膜視細胞は神経伝達物質としてL-グルタミン酸を放出している。第二次神経細胞である水平細胞およびOFF型双極細胞にはイオンチャネル型グルタミン酸レセプ

- ターが発現している。しかし、ON型双極細胞には代謝型グルタミン酸レセプターが存在している。このため、視細胞によるL-グルタミン酸の放出により、水平細胞とOFF型双極細胞は脱分極、一方ON型双極細胞は過分極を生じる。このように、ある化学物質がこれを受容するレセプターの相違により、全く異なる生理応答を引き起こすことを示している。
- 17) カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞外では 1 mM 程度、そして細胞内では nM オーダーであることが知られている。筋肉の収縮に  $\text{Ca}^{2+}$  が必須であることが明らかになって以降、 $\text{Ca}^{2+}$  の重要性が脚光を浴びるようになった (Ebashi & Kodama, 1965)。視細胞でも  $\text{Ca}^{2+}$  説が光電位変化のしくみに関与するという報告があり、詳細な研究が進められてきた (Hagins, 1972; Hagins & Yoshikami, 1974)。1980年代、cGMP 説が確定 (Fesenko *et al.*, 1985) すると、 $\text{Ca}^{2+}$  は視細胞内で感度調節などに関与することが明らかとなった (Kawamura & Tachibanaki, 2014)。 $\text{Ca}^{2+}$  の重要性はシナプス伝達でも明らかとなり、神経伝達物質の放出には必須のイオンとなっている (Tachibana & Okada, 1991)。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定は非常に難しい技術であったが、Tsien (1980) が  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素を開発し、その測定は非常に容易になり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  研究は急速に進展した (Grynkiewicz, *et al.*, 1985)。ちょうどこの時期、パッチクランプ法が普及し、カルシウムチャネルの解析も進み、現在多くの機能にこのチャネルが関与していることが知られている。細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  供給路としてカルシウムチャネル以外に、細胞内小器官の一つである小胞体が  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫として細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増減に関与していることも明らかとなっている (Endo *et al.*, 1970; Iino, 1990)。現在、 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内シグナル伝達を担う代表的なセカンドメッセンジャーの一つであり、広範な細胞機能の制御に関与していることが知られている (例えば、Timothy, 1988; Berchtold, *et al.*, 2000; Clapham, 2007)。網膜や脳神経系においても、神経伝達物質放出、シナプス可塑性や神経細胞死などに関与している (例えば、Grienberger & Konnerth, 2012; Südhof, 2012)。また、各種グリア細胞機能の制御にも不可欠である (例えば、Sharma & Ping, 2014)。
  - 18) 一酸化窒素 (NO) は不安定な気体であり、酸素に触れると速やか (半減期は数秒である) に酸化されて二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) となる。不思議なことに、このような不安定な気体が血管内皮細胞由来の血管平滑筋弛緩因子として循環制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった (Furchgot & Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988)。生体内で NO は一酸化窒素合成酵素の作用によってアルギニンから合成され、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を介して cGMP 産生を促すことが知られている (Ignarro *et al.*, 1986)。近年、中枢神経系でも NO の役割が明らかになっている (例えば、Garthwaite, 1991; Dawson *et al.*, 1992)。NO はシナプス可塑性の調節 (小脳の長期抑圧、海馬の長期増強や大脳皮質の長期増強など)、脳血流量の調節や神経細胞死への関与していることが報じられている (例えば、Calabrese *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2007; Hardingham *et al.*, 2013)。NO の放出部位としてシナプス前神経細胞や後神経細胞などが知られている (例えば、Wang *et al.*, 2005)。
  - 19) シナプス前神経細胞の興奮に伴い放出された神経伝達物質はシナプス後神経細胞の細胞膜に発現するシナプスレセプターに結合し、膜電位変化を引き起こす。シナプスレセプターがイオンチャネル型レセプターであれば、神経伝達物質の結合によってレセプターに連動するイオンチャネルが開口し、イオンが移動する。例えば、 $\text{GABA}_A$  レセプターに GABA が結合すると、クロライドチャネルの開口が生じる (例えば、Sigel & Steinmann, 2012)。また、シナプスレセプターが代謝型レセプターであれば、神経伝達物質の結合によって、レセプターと連動する酵素が活性化し、さらなる化学反応の連鎖を引き起こす。この結果として、イオンチャネルの開口あるいは閉塞が生じる (イオンチャネルの開閉以外に、細胞内の生理活性物質に影響することもある)。例えば、 $\text{GABA}_B$  レセプターに GABA が結合すると、G タンパク質が活性化し、アデニル酸シクラーゼの活性調節を介してカリウムチャネルの開口が生じる (あるいは、カルシウムチャネルが閉塞することも知られている) (例えば、Bettler *et al.*, 2004)。このように、イオンチャネル型と代謝型のレセプターではイオンチャネルの開口までのプロセスに大きな差異が認められる。
  - 20) 現在、イオンチャネル型グルタミン酸レセプターは、薬理的に AMPA 型、NMDA 型およびカイニン酸型に分類される。これらのレセプターは生理学的にも異なっており、例えば⑦ AMPA レセプターは速い興奮性情報の伝播を担う、⑧ NMDA レセプターは  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  に加え  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を示すため、カルシウム依存性酵素の活性を調節してシナプスの形態や情報伝達の効率に影響する、そして⑨カイニン酸レセプターはシナプス前神経細胞に発現して神経伝達物質の放出を調節するなどが知られている (例えば、Dingledine *et al.*, 1999)。この薬理学的分類が使われる以前、AMPA 型グルタミン酸レセプターはキスカル酸型レセプターと呼ばれていた。中枢神経系において、AMPA の方がキスカル酸よりも特異

性が高いため、AMPA 型と呼ばれるようになった（例えば、Watkins *et al.*, 1990a）。不思議なことに、昆虫や甲殻類など無脊椎動物のキスカル酸レセプターは AMPA に反応しないことが知られている（例えば、Collingridge & Lester, 1989; Watkins *et al.*, 1990b）。

- 21) グルタミン酸レセプターにはイオンチャネル型と代謝型が存在する。代謝型グルタミン酸レセプターは、8 つのサブタイプに分類されている（Metabotropic glutamate receptor type 1[ mGluR1] ~ mGluR8）。これらはレセプターの構造、薬理学的特性および情報伝達系の違いにより 3 グループ（グループⅠ：mGluR1と mGluR5；グループⅡ：mGluR2と mGluR3；グループⅢ：mGluR4, mGluR6, mGluR7と mGluR8）に分けられる（例えば、Willard & Koochekpour, 2013）。例えば、グループⅡに属する mGluR2および mGluR3レセプター（mGluR2/3レセプター）は G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが知られている。アデニル酸シクラーゼは ATP から cAMP を合成する酵素であり、これを抑制することで細胞内の cAMP 量は減少する。mGluR2/3レセプターの活性化によって、カリウムチャネルの活性化やカルシウムチャネルの抑制が生じることが知られている（例えば、Niswender & Conn, 2010）。勿論、イオンチャネル以外にも cAMP 減少に伴い複数の生理現象が影響を受ける。このように、cAMP は情報の流れの 2 番目にいるため、セカンドメッセンジャーと呼ばれる。セカンドメッセンジャーには cAMP の他に、cGMP（サイクリック GMP）、ジアシルグリセロールなどが知られている。
- 22) L-グルタミン酸はグルタミン酸脱水素酵素が存在すると、補酵素である NAD<sup>+</sup>（Nicotinamide adenine dinucleotide の酸化型）によってアミノ基を脱離して  $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換される。この際、NAD<sup>+</sup> から NADH（Nicotinamide adenine dinucleotide の還元型）に変化し、アンモニア（NH<sub>4</sub><sup>+</sup>）を生じる。このグルタミン酸脱水素酵素は  $\alpha$ -ケトグルタル酸とアンモニアが存在すると、L-グルタミン酸を合成する。つまり、両方向の化学反応に関与する酵素である。



NAD<sup>+</sup> はニコチンアミドヌクレオチドおよびアデノシンからなる物質である。NAD<sup>+</sup> はヌクレオチドが基本骨格となるために、波長 260 nm（この波長は、DNA の光吸収極大域である。）の紫外線を良く吸収する。また、NADH は波長 340 nm の紫外線を吸収し、NAD<sup>+</sup>  $\longleftrightarrow$  NADH の変化は波長 340 nm の吸光度の測定によって比較的簡単に測定することができる。ただし、この測定には限界があり、微量な L-グルタミン酸濃度変化を検出することは難しい。

- 23) 脊椎動物中枢神経系の化学シナプスでは、シナプス終末内に神経伝達物質が充填されたシナプス小胞が多数（10～100程度）存在し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇に伴いこの小胞が細胞膜と融合して内容物である神経伝達物質を細胞外に放出することが知られている（例えば、Schneggenburger & Neher, 2005）。これを、開口放出（Exocytosis：エキソサイトーシス）と呼ぶ。この放出過程は、シナプス小胞の細胞膜付近への移動（トランスロケーション）→細胞膜への付着（ドッキング）→放出準備過程（プライミング [エネルギーを消費する過程]）→シナプス小胞と細胞膜の融合→開口放出という一連の経過を辿ることが明らかになっている（例えば、Wojcik & Brose, 2007）。視細胞ならびに双極細胞のシナプス終末を電子顕微鏡観察すると、多数のシナプス小胞が観察され、開口放出によって神経伝達物質が放出されていることが伺える。しかし、中枢神経系の化学シナプスには存在しないシナプスリボンという特異な細胞内構造が網膜には認められる（Heidelberger *et al.*, 2005; Fox & Sanes, 2007）。

## 【補 足 説 明】

### （1）第 4 図および第 5 図の実験

#### 【実験材料と方法】

##### 単離心室筋作製法

氷を用いて低温麻酔したウシガエル（*Rana catesbeiana*）の頭部を切断し、脳および脊髄の両側を穿刺した。心臓を摘出し、心室筋を 2 mm 角に剪刃を用いて切断した。この心室筋断片を 1N-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], 2.0 mM 塩化カリウム [KCl], 1.0 mM 塩化カルシウム [CaCl<sub>2</sub>], 5.0 mM 塩化マグネシウム [MgCl<sub>2</sub>], 10.0 mM ブドウ糖 [Glucose], 10.0 mM



Tris-hydroxymethyl-aminomethane [Tris], 0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン [BSA] [A-9647]) で数回洗浄し、その後断片を1N-水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて pH 7.0 に調整したコラゲナーゼ溶液 (10 U/ml Collagenase Type2 [LS004174, Worthington Biochemical Co.], 120.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 5.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10.0 mM Glucose, 10.0 mM Tris, 0.01 mg/ml BSA) に移し、28°C で40分間振盪した。この後、コラゲナーゼ溶液を除去し、心室筋断片を4°C の正常リンガー液で用いて数回洗浄し、機械的操作を加え、心室筋を単離した。室温の正常リンガー液中で、殆どの単離心室筋は周期的収縮を繰り返した。約1時間後、収縮しなくなった単離心室筋を実験に使用した。薬品類の多くは、Nacalai Tesque Inc., Kanto Chemical Co. と Katayama Chemical Co. から購入した。また、BSA は Sigma Chemical Co. から購入した。

#### 単離心室筋から単一イオンチャンネル電流記録法

単離心室筋を含む懸濁液を記録用槽に入れ、心室筋が安定した後実験を開始した。ハックスリー型手動微動式三次元マニピュレーター (MP85, Sutter Instrument Co.) に装着したパッチ電極を単離心室筋細胞に近づけ、僅かに接触させた。パッチ電極内液には 120.0 mM KCl, 1.0 mM NaCl, 1.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5.0 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) を加えた。1N-水酸化カリウム (KOH) を用いて pH 7.4 に調整して用いた。このパッチ電極内液に微弱な陰圧を加えると、電極と細胞膜は密着し、 $\text{G}\Omega$  (ギガオーム) シールが完成した。このとき、チャンネルの開閉に基づくチャンネル電流が記録された。パッチ電極内の細胞膜には複数のチャンネルが含まれていることが多く、またチャンネル電流サイズが異なることもあった。チャンネル電流記録では上向きがチャンネルの開状態 (内向き電流) を示している。Cell-attached mode によるチャンネル電流記録では正確な膜電位を知ることは困難であるが、第7図のパッチ電極と細胞外液の間の電位 (電極電位) を変化させる実験に基づき内向き整流性カリウムチャンネルの開閉が原因であろうと推測された。

#### パッチ電極作製法と実験装置

膜電流記録用パッチ電極はパッチ電極製作器 (PP-83, 成茂科学) を使い、Borosilicate 性ガラス管 (外径は 1 mm, 内径 0.5 mm; Sutter Instrument Co.) を用いて作製した。電極抵抗は 2~5  $\text{M}\Omega$  であった。不閉電極として、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。膜電流記録は室温 (20~23°C) で実施した。膜電流は Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (CEZ-2300, 日本光電) に内蔵した 4 次ベッセルフィルター (1 KHz) を経由後、ペンレコーダー (RJG-4100, 日本光電) に直接記録した。

#### (2) 第8図の実験

##### 【実験材料と方法】

#### アメリカナマズ網膜から水平細胞の単離

実験には数時間以上暗順応した体長約 35~45 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜を用い、Tachibana (1981) の方法に従って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 に調整したパパイン溶液 (10 U/ml パパイン [LS003126], 125.0 mM NaCl, 1.0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 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 ( $\beta$ -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、パパイン溶液を除去し、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パパイン溶液は、ポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  の Poly Ether Sulphone (PES) 膜フィルター (Nalgene) で濾過後使用した。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、先端孔径を約 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) を滅菌済みガラス製試験管 (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、細胞浮遊液には樹状突起や軸索を有する双極細胞や水平細胞に加え、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。細胞の大きさの特徴的な形態から、錐体水平細胞の識別は容易であった。

#### 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法

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、視細胞層のみの標本を作製した。本研究で実施した視細胞層標本作製法を概説する。水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-NaOH を用いて pH 7.6 に調整した正常リンガー液 (20.0 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES, 0.01 mg/ml 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、眼盞標本を作製した。ヒアルロニダーゼ (320 U/ml) (H3884 [type IV-S]) あるいはコラゲナーゼ (12 U/ml) (LS005273) とヒアルロニダーゼ (360 U/ml) (LS002592) の混合を含む正常リンガー液 (1.0 ml) を充填した微量遠心管の中に眼盞標本を入れ、振盪器を使って約 15 分間室温 (20~23°C) でゆっくりと振盪した。この後、眼盞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。円形に刳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 TritonX-100, 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ュ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。注射器の外筒は眼盞標本よりも 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。眼盞標本を①, ②そして③の順番で、それぞれ 5~13 分間灌流した。眼盞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 % TritonX-100 液、蒸留水および正常リンガー液での眼球内灌流後、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。この眼盞標本を 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 [41300-021] [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, ペニシリン [100 U/ml] とストレプトマイシン [100  $\mu$ g/ml], 0.01 mg/ml BSA) あるいは正常リンガー液を加えたプラスチックシャーレの中に置き、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。この視細胞層標本を直ちに使用する場合、網膜を眼球内から外し、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。

#### パッチ電極内液の組成

パッチ電極内液の組成は 120.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 1.0 mM NaCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 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。

#### 単離水平細胞の膜電流導出法

単離水平細胞に、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、G $\Omega$  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、膜電流が導出された (Whole-cell mode) (第図 3 参照) (Hamil *et al.*, 1981)。膜電流記録用パッチ電極は Brown-Flamingo 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 $\Omega$  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 (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 次バッセルフィルター (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 (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) とデータ獲得 (膜電流記録) には、Patchmaster (HEKA Instruments Inc.) を利用した。



### 視細胞層標本を灌流するリンガー液の組成

視細胞層標本から放出される L-グルタミン酸を検出する実験には、単離水平細胞で用いた正常リンガー液を用いた。視細胞を脱分極するため、50 mM-K<sup>+</sup>を含む正常リンガー液を灌流した。高 K<sup>+</sup> 正常リンガー液の組成は 72.5 mM NaCl, 50.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。リンガー液には 0.01 mg/ml BSA を添加し、1N-KOH を用いて pH 7.6 に調整して用いた。正常リンガー液と高 K<sup>+</sup> 正常リンガー液の浸透圧は、265~275 mOsm/kg であった。リンガー液の灌流と交換には、Y-tube を用いた。実験は室温で実施した。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。パパインとコラゲナーゼは Worthington Biochemical Co., そして Leibovitz's L-15 Medium とペニシリン-ストレプトマイシン溶液は GIBCO から購入した。

### (3) 第9図の実験

#### 【実験材料と方法】

#### 標本作製と灌流液の組成

実験には、体長約 30 cm のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。約 2 時間暗順応させたコイを低温麻酔し、断頭後、脳および脊髄の両側を穿刺した。眼球摘出後、前眼部、水晶体および硝子体は除去し、その後視細胞側を上にして濾紙上に付着させ、剥離網膜標本作製し実験に用いた。以上の手術は低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を記録槽内に置き、リンガー液を 1 ml/分の流量で灌流した。液温は、恒温装置で約 20°C に維持した。コイの正常リンガー液の組成は、102.0 mM NaCl, 28.0 mM 重炭酸ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>), 2.6 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10.0 mM Glucose, 5.0 mM Tris であった。また、カルシウム活動電位を発生させるためのリンガー液 (修飾リンガー液) の組成は、76.0 mM NaCl, 5.0 mM 塩化バリウム (BaCl<sub>2</sub>), 20.0 mM Tetraethylammonium Chloride (TEA-Cl), 10.0 mM 4-aminopyridine (4-AP), 10.0 mM CsCl, 2.6 mM KCl, 10.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10.0 mM glucose, 5.0 mM Tris であった。これらの溶液に L-グルタミン酸 (5 mM) を添加する場合、浸透圧を考慮せずに、リンガー液に添加した。何れのリンガー液も、1N-塩酸 (HCl) を用いて pH 7.8 に調整して、灌流した。薬品類の多くは、Nacalai Tesque Inc., Kanto Chemical Co. と Katayama Chemical Co. から購入した。4-AP は Sigma Chemical Co. から購入した。

#### 水平細胞からの膜電位導出法

膜電位応答の細胞内記録には、ガラス管微小電極を用いた。ガラス管微小電極は電極作製機 (PN-3, 成茂科学) を使って、Omega dot タイプの borosilicate 性ガラス管から作製した。電極内には 4M-酢酸カリウム (CH<sub>3</sub>COOK) を充填し用いた。電極抵抗は 40~80 MΩ であった。記録槽の底部に銀-塩化銀板を置き、これを不関電極とした。膜電位応答は、微小電極用前置増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) を介してオシロスコープ (VC-10, 日本光電) で観察し、FM データレコーダー (A-45, Sony-Magnescape) を利用して磁気テープに記録した。必要に応じて、膜電位応答をデータレコーダーから再生し、ペンレコーダー (RJG-4100, 日本光電) に記録した。刺入した神経細胞の種類は、暗時の膜電位や光応答 (光刺激のサイズ) そして膜電位が記録される深さ (ガラス管微小電極先端の位置) から容易に識別できた。

#### 光刺激

光照射の光源として 150 W キセノン放電管 (ウシオ電機) を用いた。この光源が発する光をビームスプリッターによって 2 方向に分け、それぞれの光路に回折格子を置き単色光を得た (Tomita *et al.*, 1967)。光路の一方から 480 nm (青色) そして他方から 620 nm (赤色) の単色光を等光量子化 ( $8.2 \times 10^5$  photons/ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ) して網膜に照射した。光照射時間は、何れも 800 msec であった。