

脊椎動物網膜の電気シナプス

——水平細胞のギャップ結合を中心にして——

高橋 恭一

(受付 2018年8月20日)

1. はじめに

脊椎動物網膜には5種類の神経細胞が存在する。これらの神経細胞のうち、視細胞のみが光感受性を有する。暗時、視細胞外節内では Guanylate cyclase (グアニル酸シクラーゼ) によって cyclic Guanosine-3', 5'-monophosphate (cGMP) が合成され、これが視細胞外節膜に発現する cGMP 依存性陽イオンチャネル (光感受性陽イオンチャネルとも呼ばれている。) を開口している。このため、このチャネルを通じて細胞外のナトリウムイオン (Na^+) やカルシウムイオン (Ca^{2+}) が細胞内に流入し、視細胞は脱分極状態を呈する。視細胞外節に存在する視物質が光を感知すると、外節内部で一連の酵素反応 (化学反応) が進行し、結果として外節内の cGMP は分解され、その量を減ずる。このため、cGMP 依存性陽イオンチャネルを介する陽イオンの細胞内流入は減弱もしくは停止し、視細胞は過分極する。このように、網膜への光照射は視細胞外節での視物質の光化学反応ならびに外節内での一連の酵素反応の引き金となり、最終的に陽イオンチャネルの閉塞へと結びつき、最終的に視細胞の膜電位変化を生む。

視細胞には光感受性が異なる2つのタイプ、桿体と錐体が存在する。視物質として Rhodopsin (ロドプシン) を発現する視細胞を桿体と呼び、両生類以外の脊椎動物では1種類しか存在しない。一方、錐体にある錐体視物質には波長感受性の異なる複数が存在している。両視細胞の違いとして波長感受性が異なることに加え、桿体は錐体に比べて光感度が高く、そして光応答の時間分解が低いことが挙げられる。このため、桿体が機能する薄明条件では動きの速い物体を捉えることが難しく、錐体が機能する明所条件では動きの速い物体を捉えることが可能である。桿体と錐体とでは光感度と時間分解能に違いがあるものの、両視細胞の光受容から膜電位発生までのしくみは概ね共通している。最近の研究では、両細胞に存在する視物質の光受容後に進行する一連の酵素反応の中で、Transducin (トランスデューシン) が活性化する反応と Phosphodiesterase (フォスフォジエステラーゼ) が cGMP を Guanosine-5'-phosphoric acid (5'GMP) に分解する反応の違いが認められることが明らかになっている (例えば, Kawamura & Tachibanaki, 2012; Tachibanaki *et al.*, 2012)。視細胞外節で発生し

た膜電位変化は、視細胞内節に発現する各種のイオンチャネルによって修飾され、視細胞終末へと伝播される。視細胞終末の膜電位変化は、終末（第2次神経細胞である双極細胞および水平細胞とシナプス連絡する視細胞の終末部位）から放出される L-Glutamate（L-グルタミン酸）の放出量に変換される。つまり、暗時に視細胞が脱分極状態にあるとき L-Glutamate 放出量は増加し、また明時に視細胞が過分極状態にあるとき放出量が減少もしくは停止する。

暗時に視細胞終末から放出された L-Glutamate はシナプス間隙を拡散し、双極細胞の樹状突起に発現するシナプスレセプターを活性化する。明暗変化に伴い視細胞終末から放出される L-Glutamate の放出量は増減するため、これに伴い双極細胞の膜電位は変化する。双極細胞の樹状突起に惹起された膜電位変化は瞬時に双極細胞終末にまで伝播され、神経伝達物質の放出量に変換される。現在、双極細胞の神経伝達物質も L-Glutamate であることが明らかとなっている（例えば、Slaughter & Miller, 1983; Ehinger *et al.*, 1988; Marc *et al.*, 1990; Tachibana & Okada, 1991; Matsui *et al.*, 1998; Wu & Maple, 1998）。つまり、視細胞－双極細胞－神経節細胞（第3次神経細胞）の視覚情報伝達に関わる化学シナプスでは、L-Glutamate が神経伝達物質として放出されている。網膜には、視細胞－双極細胞－神経節細胞を経て視覚情報を脳に直接伝播するための経路を構築する神経細胞群以外に、第2次神経細胞として水平細胞そして第3次神経細胞としてアマクリン細胞が存在し、これらの細胞は主に視覚情報の空間的な修飾に与っている（例えば、Diamond, 2017）。実際、水平細胞やアマクリン細胞が双極細胞や神経節細胞に認められる中心－周辺拮抗的受容野形成や色対比形成に関与している可能性が古くから知られている（例えば、Wagner *et al.*, 1960; Daw, 1968; Kaneko, 1973; Kaneko & Tachibana, 1981）。これらの神経細胞が放出する神経伝達物質に関する解析も進んでおり、水平細胞は神経伝達物質として γ -Aminobutyric acid (γ -アミノ酪酸; GABA) や Glycine (グリシン)、またアマクリン細胞は GABA, Glycine に加え Acetylcholine (アセチルコリン), Dopamine (ドーパミン), Serotonin (セロトニン), Substance P (サブスタンス P) や Neuropeptide (神経ペプチド) などを利用していることも明らかになっている（例えば、Kolb, 2013）。

脊椎動物網膜内に存在する神経細胞群はそれぞれが化学シナプスを介して接続しているのみならず電気シナプスによって接続していることも確認されている（例えば、Bloomfield & Völgyi, 2009）。現在、化学シナプスおよび電気シナプスによる神経接続が網膜内での視覚情報処理を可能にしていると考えられている（例えば、Bloomfield & Völgyi, 2009）。化学シナプスを介する伝達と異なり、電気シナプスでは両細胞の細胞膜が密着し、それぞれの細胞膜に発現するヘミチャネルが結合してギャップ結合チャネルを形成する（第1図と第2図参照）。このギャップ結合チャネルを通じて両細胞の細胞質は繋がっており、電気シナプスを介して接続する細胞同士は細胞質に存在するイオンが両細胞間を自由に移動することができる。

このため、一方の神経細胞に生じた膜電位変化は他方の神経細胞にシナプス遅延なく伝播される。そして、基本的に伝播方向は両方向性となる。さらに、このギャップ結合チャンネルはイオンに加え、セカンドメッセンジャー¹⁾のような小分子も移動することが明らかとなっている（例えば、Bennett & Zukin, 2004; Völgyi *et al.*, 2013; Belousov *et al.*, 2017）。最近の研究によって、網膜を構成する殆ど全ての神経細胞に電気シナプスが存在することが報じられている（例えば、Bloomfield & Völgyi, 2009; Völgyi *et al.*, 2013）。これらを踏まえると、網膜における視覚情報処理の全貌を掴むには、化学シナプスに加え電気シナプスの機能を明らかにすることが必須であり、現在鋭意研究が進められている。

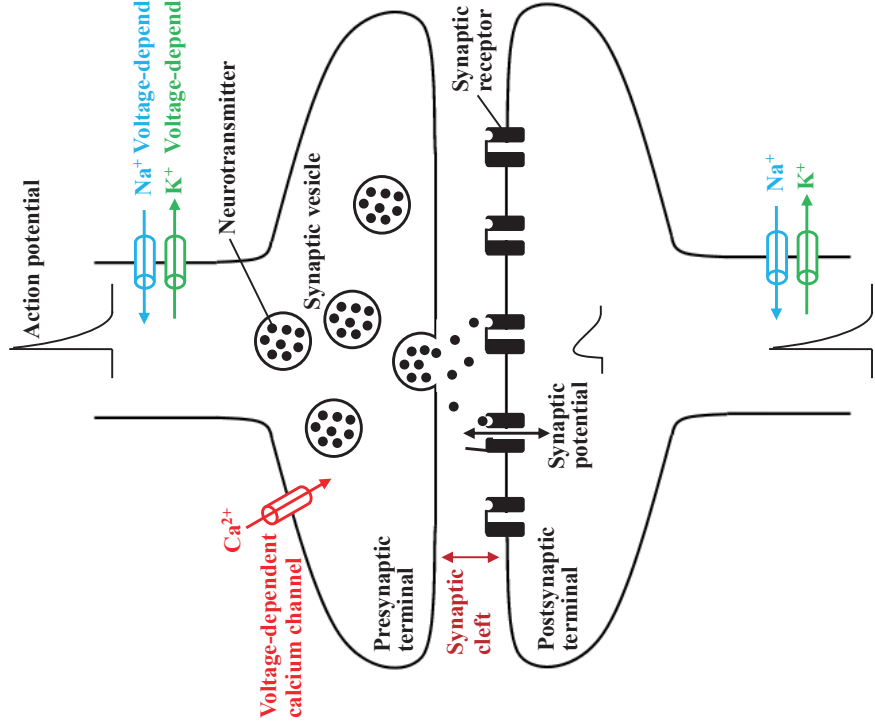
本論文では脊椎動物網膜を構成する神経細胞間に見られるシナプスのうち、特に水平細胞間の電気シナプスに着目し、その役割を調査した。

2. シナプス研究²⁾の歴史

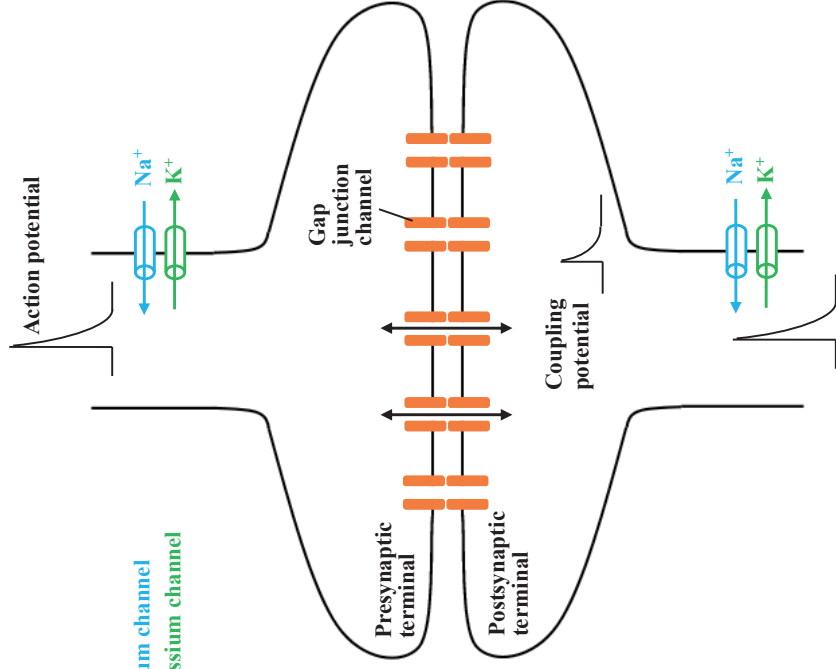
Du Bois Reymond (1848) は自作した検流計を用いて、筋肉や神経が発生する微弱な電流を検出することに成功した。そして、Du Bois Reymond (1877) は神経が筋肉を収縮させるために神経からの興奮が電氣的に筋肉に伝播される以外に、神経による化学物質の分泌が原因である可能性についても言及している（神経から筋への興奮伝播に関する電気説と化学説を指す。）(Grundfest, 1959; Mcgeer *et al.*, 1978; Eccles, 1982)。一方、Hermann (1879a, b) は神経から筋肉への興奮伝播が電氣的に行われると考えていた。以降、興奮伝播に関する化学説と電気説の争いは長年続いた。Loewi (1921) はカエルの摘出心臓実験（迷走神経から可溶性の化学物質が分泌され、これが心臓の拍動を制御している。）を報じ、漸く化学説が決定的となった。このLoewi (1921) の研究は、19世紀末に始まったGolgi が提唱する網状説（神経線維はその末端で連続し、網状構造を呈するという説）とCajal が提唱するニューロン説（神経細胞は独立し、非連続の存在であるという説）の長きに亘る論争にも終止符を打ち、ニューロン説に軍配が上がった。とはいえ、ニューロン説が完全に証明されるためには、電子顕微鏡³⁾によるシナプス間隙の観察が不可避であった（例えば、Palade & Paley, 1954; De Robertis & Bennet, 1955）。

ニューロン説が確定し、シナプスの化学説が証明された後、新たなシナプス連絡がザリガニの巨大運動神経間シナプスで発見された（Furshpan & Potter, 1959）。このシナプスの生理学的小および形態学的研究により、化学シナプスとは異なるタイプのシナプス、すなわち電気シナプスが存在することが明らかとなった（Bennet *et al.*, 1963; Robertson *et al.*, 1963; Furshpan, 1964）。当初、電気シナプスは無脊椎動物や下等脊椎動物の神経系で見出されたが、その後哺乳動物の中樞神経系でもその存在が確認された（Janssen-Bienhold & Nicholls,

A (Chemical synapse)



B (Electrical synapse)



1969; Grinnell, 1970; McMahon & Brown, 1994; Llinas *et al.*, 1974; Christie *et al.*, 1989; MacVicar & Dudek, 1981; DeVries *et al.*, 2002; Galarreta & Hestrin, 1999)。そして、電気シナプスは神経軸索-樹状突起、神経軸索-細胞体、神経軸索-神経軸索、樹状突起-樹状突起や細胞体-細胞体などあらゆる部位に存在することが報じられた（例えば、Nagy *et al.*, 2018）。勿論、神経系以外に心筋と平滑筋などの興奮性細胞のみならず、上皮性細胞間や胎生期の細胞間などのような非興奮性細胞においても電気シナプスが存在することが現在明らかとなっている（例えば、Dewey & Barr, 1962, 1964; Lentz & Trinkaus, 1971; Bellairs *et al.*, 1975; Shibata & Yamamoto, 1977）。

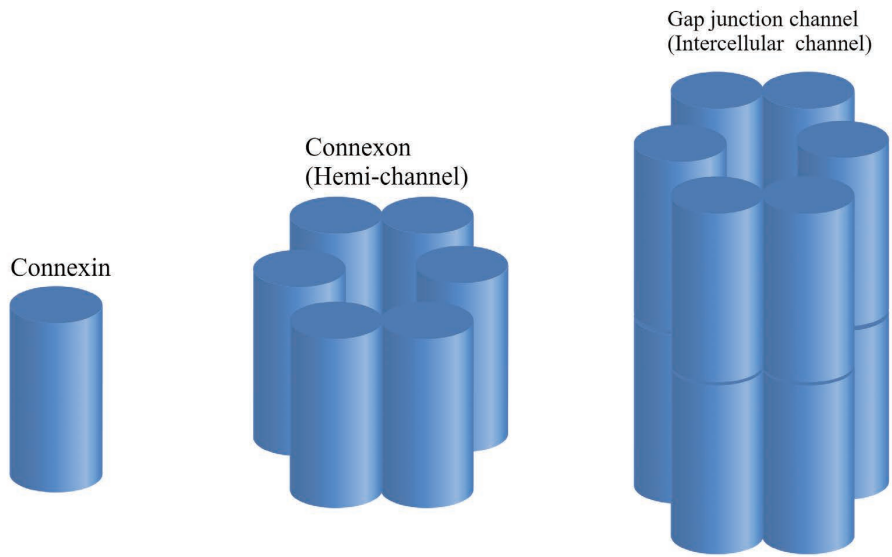
3. 電気シナプスの研究

化学シナプスでは、シナプス前神経細胞（軸索終末部）とシナプス後神経細胞（樹状突起部あるいは細胞体）の間に 20~40 nm のシナプス間隙を有している。シナプス前神経細胞の軸索終末部（神経伝達物質を放出する部位を、特にシナプス終末とも呼ぶ。）から放出された神経伝達物質（化学物質）はシナプス間隙を拡散し、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到達・結合してシナプス伝達が終了する（第 1 図 A 参照）。シナプス前神経細胞の軸索終末から神経伝達物質が放出されてシナプスレセプターへ到達・結合し、

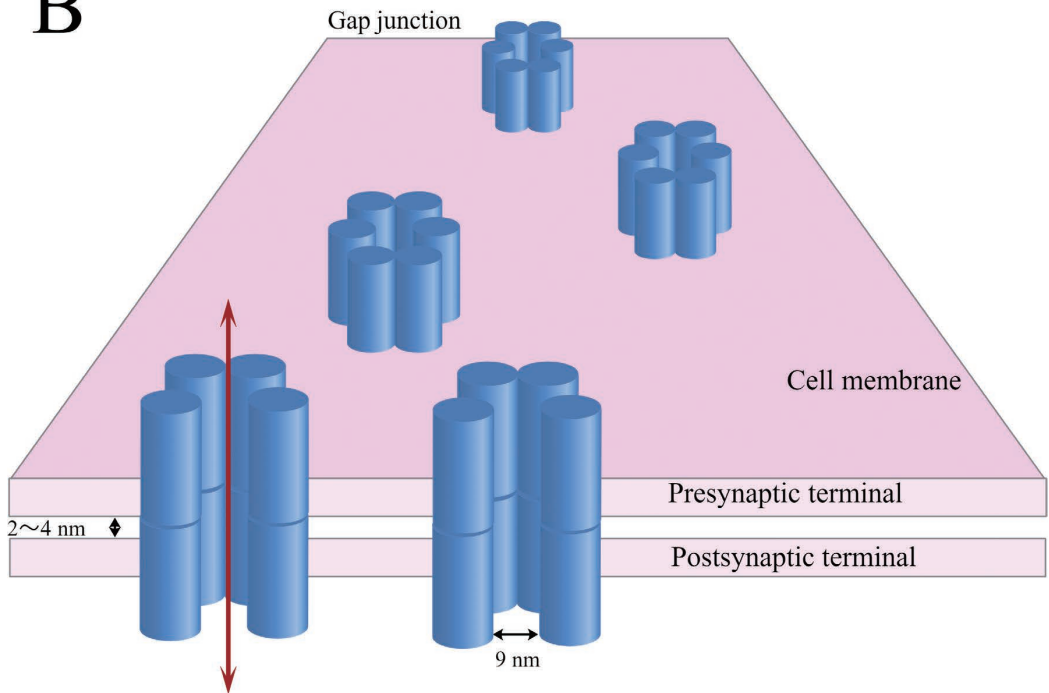
第 1 図：化学シナプスと電気シナプスを介するシナプス伝達

神経細胞と神経細胞の接続部分をシナプスといい、化学シナプス (Chemical synapse) (A) と電気シナプス (Electrical synapse) (B) に分類することができる。A：化学シナプスでは神経細胞間に 20~40 nm のシナプス間隙 (Synaptic cleft) が存在する。このため電気信号がシナプス前神経細胞の軸索終末 (シナプス終末 [Presynaptic terminal] ともいう。) からシナプス後神経細胞の樹状突起 (Postsynaptic terminal) (あるいは細胞体) に直接伝播することはない。化学シナプスではシナプス前神経細胞終末で電気信号を化学信号に変換し、シナプス後神経細胞では化学信号を電気信号に変換している。シナプス前神経細胞に発現する電位依存性ナトリウムチャネル (Voltage-dependent sodium channel) と電位依存性カリウムチャネル (Voltage-dependent potassium channel) の活性化に伴い発生する活動電位 (Action potential) がシナプス前神経細胞のシナプス終末に達すると、この終末部に発現する電位依存性カルシウムチャネル (Voltage-dependent calcium channel) が開口する。このチャネルを通じて Ca^{2+} が細胞内に流入し、この結果カルシウムチャネルの近くに存在するシナプス小胞 (Synaptic vesicle) が細胞内を移動して細胞膜と融合し、シナプス小胞内に蓄積されている神経伝達物質 (Neurotransmitter) がシナプス間隙に放出される (この放出を開口放出と呼ぶ)。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の樹状突起部に発現するシナプスレセプター (Synaptic receptor) に結合し、例えば陽イオンチャネルを開口する。この結果、樹状突起部には脱分極性のシナプス電位 (Synaptic potential) が発生し、シナプス後神経細胞に活動電位発生が発生する。化学シナプスでは電気信号→化学信号→電気信号という変換ステップが存在するため、シナプス伝達にシナプス遅延が生じる。B：電気シナプスでは、シナプス間隙が 2~4 nm と極めて狭い。シナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞にはヘミチャネルが発現し、電気シナプスではこれらのチャネルが接続してギャップ結合チャネル (Gap junction channel) を形成している。このため、両細胞の細胞内がギャップ結合チャネルを介して繋がりが、イオンや小さな分子が移動可能である。ギャップ結合チャネルが多数存在する部分では電気抵抗が極めて低く、シナプス前神経細胞の膜電位変化を直接シナプス後神経細胞に伝えることができる。このため、シナプス遅延はない。

A



B



シナプスレセプターと連動するイオンチャネルが開口してシナプス電位が発生するまで 0.3～1 m 秒のシナプス遅延が生まれる。一方、電気シナプスでは両神経細胞の細胞膜は 2～4 nm と近接し、ギャップ結合チャネルを介して細胞質が連続しているため、一方の神経細胞に膜電位変化が生じると、このチャネルを通じてイオンが移動し、シナプス遅延なく他方の神経細胞に膜電位変化が伝播される（第 1 図 B 参照）。化学シナプスにおける膜電位変化の伝播は一方方向性であるのに対し、電気シナプスでは一部の例外を除いて膜電位変化の伝播は両方向性（あるいは双方向性）である。

3-1 電気シナプスの形態学的研究

化学シナプスと電気シナプスでは、シナプス間隙に顕著な違いが認められる。しかし、この違いを光学顕微鏡で観察することはできず、1950年代半ば電子顕微鏡が生物学に応用されるようになって漸くシナプス間隙の存在を確認することが可能となった（例えば、Palade & Paley, 1954; De Robertis & Bennet, 1955）（注 3 参照）。電気シナプスを電子顕微鏡観察すると、電気シナプスのシナプス間隙は化学シナプスよりも顕著に狭く、シナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞の細胞膜が密着（癒着）しているように見える。生物組織を電子顕微鏡によって観察するには、①観察しようとする組織を約 1 mm の小片に切断し、②この小片をアルコールに続いてパラホルムアルデヒドによる前固定し、③四酸化オスミウムによって固定後、④組織標本を脱水してエポキシ樹脂に包埋し、⑤ガラスナイフに続いてダイヤモンドナイフによって厚さ 100 nm 以内の超薄切片を作製する必要がある（コントラストを上げるため、ウランや鉛といった重金属をタンパク質や脂質に接着して標本を染色する場合もある）。この超薄切片を作製する際、偶然細胞膜と平行に切断されることがあり、この標本を電子顕微鏡観察すると、細胞表面に長辺が約 9 nm の六角形、そしてその中心に約 1 nm の芯のような構造が認められた（例えば、Revel & Karnovsky, 1967）。後年開発された凍結切断レプリカ法⁴⁾を用いて細胞膜を切断してその内面を観察すると、やはり多数の 8～9 nm の粒子が存在し、その中心に 1.5～2 nm の芯のような構造が観察された（例えば、Chalcroft & Bullivant, 1970）。このため、電気シナプスを形成する 2 細胞の連絡部では六角形の構造が対

第 2 図：電気シナプス（ギャップ結合）の分子構築イメージ

A：ギャップ結合チャネル（Gap junction channel, あるいは Intercellular channel）はシナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞に発現するヘミチャネル（Hemi-channel）が連結して形成される。ヘミチャネルはコネクソン（Connexon）とも呼ばれ、6つのコネキシンタンパク質（Connexin）からなる重合体である。B：化学シナプスと異なり、電気シナプスではシナプス間隙が極めて狭く、2～4 nm しかない。シナプス前神経細胞終末（Presynaptic terminal）とシナプス後神経細胞終末（Postsynaptic terminal）の細胞膜（Cell membrane）に発現するヘミチャネルは、お互い連結してギャップ結合チャネルを形成する。ギャップ結合チャネルは約 9 nm の通路であり、分子量約 1,000 以下のイオンや分子が通過する（赤色の矢印）。

合し、中心に 1.5~2 nm の小孔（物質通路）を有すると推測された。このような構造が電気シナプス部分に多数存在しており、これをギャップ結合と呼んでいる。

現在、ギャップ結合で観察される微小な六角形はコネクソン（半チャンネルあるいはヘミチャンネルとも呼ばれる。）と呼ばれ、コネキシンタンパク質が 6 つ集合した 6 量体あることが知られている。つまり、シナプス前神経細胞膜にあるコネクソンとシナプス後神経細胞膜にあるコネクソンが接合し、細胞外環境から隔絶した管状の物質通路（ギャップ結合チャンネル）⁵⁾を形成する（第 2 図参照）。このギャップ結合チャンネルの内径は約 1.6 nm と比較的大きいため、分子量 1,000 以下の分子やイオンを非選択的に透過するが、分子量 2,000 を超える分子は透過しない（例えば、Kumar & Gilula, 1996）。イオンに関しては、陽イオンがより透過し易いギャップ結合チャンネル、あるいは陰イオンがより透過し易いギャップ結合チャンネルが存在することが報じられている（Veenstra *et al.*, 1994a, b; Harris, 2001）。近年、原子間力顕微鏡⁶⁾による観察の結果、Ca²⁺の有無に伴いコネクソンの中央部の孔サイズが 1.5 nm から 0.6 nm にまで変化することが明らかとなった（例えば、Müller *et al.*, 2002）。

中枢神経系や網膜などに存在するギャップ結合を構成するコネキシンを明らかにすべく、電子顕微鏡による高解像度の観察を可能にする免疫標識レプリカ法⁷⁾を用いた研究が近年盛んに行われている。

3-2 電気シナプスの生理学的研究

化学シナプスではシナプス前神経細胞の軸索終末部とシナプス後神経細胞の樹状突起（あるいは細胞体）との間に 20~40 nm でシナプス間隙が存在するため、シナプス前神経細胞に生じた膜電位変化（例えば、活動電位）がシナプス間隙を乗り越えてシナプス後神経細胞に伝播することはない。このため、シナプス前神経細胞の軸索終末部では神経伝達物質を放出し、シナプス後神経細胞の樹状突起（あるいは細胞体）に膜電位変化を伝播している（第 1 図 A 参照）。ところが、電気シナプスではギャップ結合チャンネルを介してシナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞の細胞質が繋がっているため、シナプス前神経細胞の膜電位変化発生に関与するイオンは瞬時にシナプス後神経細胞へと移動し、シナプス遅延なく膜電位変化を惹起することができる。

電気シナプスの生理学的研究は、ザリガニの巨大神経にある不思議なシナプスから始まった（Furshpan & Potter, 1959）。ザリガニの神経系には内外 2 対の巨大神経線維（内側巨大神経線維と外側巨大神経線維）が存在し、頭部から尾部に向けて走行している。内側巨大神経線維は単一神経線維であるのに対し、外側巨大神経線維は神経節毎に細胞体を持つ神経線維が体節シナプスを形成し頭部から尾部の神経節に至る長い神経線維を形成している。

腹部の各神経節には巨大運動神経線維が存在し、外側巨大神経線維との間に巨大運動シナ

プスを形成している。この巨大運動神経線維は腹部の屈筋を支配し、ザリガニの後方への遊泳を可能にしている（例えば、Wiersma, 1947）。Furshpan & Potter (1959) は外側巨大神経線維と巨大運動神経線維のそれぞれに各2本のガラス管微小電極を刺入し、一方を通電刺激用として他方を膜電位導出用として用い、巨大運動シナプスのシナプス伝達について調査した。微弱な通電刺激を与えて外側巨大神経線維を脱分極させると、殆どシナプス遅延なく巨大運動神経線維に脱分極が現れた。さらに、強い通電刺激によって外側巨大神経線維に活動電位を発生させると、巨大運動神経線維にも活動電位が現れた。しかし、巨大運動神経線維を電気刺激しても、外側巨大神経線維には膜電位変化は殆ど認められなかった。この実験から、巨大運動シナプスには顕著な整流作用が存在することが明らかとなった。この整流作用は、両巨大神経線維の入力抵抗の差異によると考えられた。一方、Watanabe & Grundfest (1961) はザリガニ外側巨大神経線維の隣接する体節シナプスにそれぞれ2本のガラス管微小電極を刺入し、この体節シナプスのシナプス伝達を調査した。外側巨大神経線維の体節シナプスでも、シナプス遅延は殆どなく膜電位変化が伝達された。そして、体節シナプスでは巨大運動シナプスと異なり、通電刺激は両方向に有効であり、整流作用は認められなかった。以上の研究から、ザリガニの巨大運動シナプスならびに体節シナプスの何れもが電気シナプスであることが証明された。

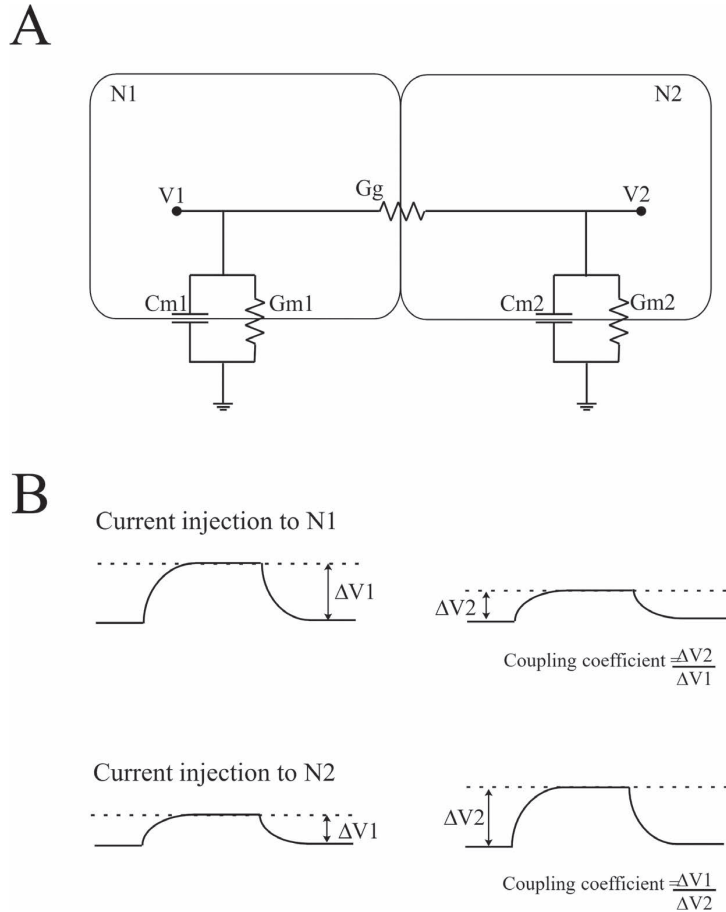
当初、電気シナプスは無脊椎動物や下等脊椎動物の神経系で見出されたため、高等動物にはないと考えられた。しかし、その後哺乳動物の中樞神経系でもその存在が次第に報告されるようになった (Baylor & Nicholls, 1969; Grinnell, 1970; McMahon & Brown, 1994; Llinas *et al.*, 1974; Christie *et al.*, 1989; MacVicar & Dudek, 1981; DeVries *et al.*, 2002; Galarreta & Hestrin, 1999)。

3-2-1 ギャップ結合の電気生理学的解析

2つの神経細胞に存在する電気シナプスの性質を解析する方法として、これまで電気生理学的方法が良く用いられてきた。2つの神経細胞のそれぞれに2本のガラス管微小電極を刺入し、一方の神経細胞に通電刺激を与え、両神経細胞に惹起される膜電位変化を導出し、これらを比較する手法である（この手法が適用できるのは、大型の神経細胞のみである）。2つの神経細胞が電気シナプスを介して結合している場合、一方の神経細胞に通電刺激を与えると、他方の神経細胞にシナプス遅延なく膜電位変化が現れる。通電刺激を与えた細胞と電気シナプスを介して結合した細胞に現れる膜電位変化を比較することで、両細胞の結合抵抗（あるいは結合コンダクタンス [抵抗の逆数で表される。]）や結合係数⁸⁾などを求めることができる（例えば、Bennett, 1966）。今でも、結合係数の測定は2つの細胞間の結合の強弱を推測するために良く使われている。また、電気シナプス結合している2つの神経細胞そ

それぞれの膜抵抗や膜容量⁹⁾も、結合の強弱のみならず結合の周波数特性に影響する重要な因子であるため測定されることが多い。

Neher & Sakmann (1976) によるパッチクランプ法の開発とその後の Hamill *et al.* (1981)



第 3 図：電気シナプスの等価回路と結合係数

A：2つの神経細胞がギャップ結合を介して電気シナプスを形成しているときの等価回路である。神経細胞 1 (N1) と神経細胞 2 (N2) の細胞膜には、膜容量 (Cm1 と Cm2) と膜コンダクタンス (Gm1 と Gm2) (膜抵抗の逆数を指す。) があり、それぞれの細胞は電気シナプスのギャップ結合コンダクタンス (Gg) で繋がっている。神経細胞 1 と 2 の膜電位は V1 と V2 である。B：両神経細胞間にある電気シナプスの結合の強さ測定するため、両細胞 (N1 と N2) にガラス管微小電極を刺入し、一方に通電刺激 (Current injection) を与え、それぞれの神経細胞 (N1 と N2) に生じる膜電位変化を測定し、これらから結合係数 (Coupling coefficient) を求めることができる。N1 への通電刺激 (Current injection to N1) に伴い N1 に惹起される膜電位変化 (ΔV_1) と N2 に惹起される膜電位変化 (ΔV_2) を測定し、結合係数 $\frac{\Delta V_2}{\Delta V_1}$ が得られる。また、N2 への通電刺激 (Current injection to N2) に伴い N2 と N1 に惹起される膜電位変化から、結合係数 $\frac{\Delta V_1}{\Delta V_2}$ が得られる。両細胞への電流注入実験によって得られる結合係数は、同種の神経細胞間の場合は概ね一致するが、2つの神経細胞が異なるタイプの細胞のとき差異が生じることがある。

による汎用化によって、ガラス管微小電極では解析できなかった小型の神経細胞から膜電位あるいは膜電流記録を得ることができるようになった（例えば、Levavi-Sivan *et al.*, 2005）。2つの神経細胞のそれぞれにパッチ電極を適用して膜電位（膜電流固定法）を導出し、一方に通電刺激を行い、両神経細胞に惹起される膜電位変化を比較することによって結合係数を求めることができる。また、両神経細胞に膜電位固定を行い、一方の神経細胞の膜電位を段階的に変化させて両神経細胞の膜電流変化を導出すれば、細胞間の結合係数のみならず電気シナプスのギャップ結合コンダクタンス¹⁰⁾を求めることも可能である。同じ実験を逆方向に行えば、整流性の有無についても調査することができる。この方法では細胞内がパッチ電極内液で洗い流されるという欠点もあるが、細胞内に特定の薬剤やイオンを投与し、この薬剤のギャップ結合に及ぼす影響を調査することもできるという利点もある。

ギャップ結合コンダクタンスは、ギャップ結合を構成するコネキシンタンパク質によって決まる。実際、コネキシンタンパク質を構成するアミノ酸を置換する実験から、N末端付近のアミノ酸配列（タンパク質を構成するアミノ酸の最初22かあるいは23を指す。）が、単一ギャップ結合チャンネルコンダクタンス、通過イオンの種類と透過性、およびギャップ結合する2細胞の膜電位の差に応じた開閉状態を決めていることが明らかとなっている（例えば、Beyer *et al.*, 2012）。現在、ギャップ結合を構成する単一ギャップ結合チャンネルのコンダクタンスは、10~300 pSであることが知られている（例えば、Harris, 2001）。Cx36の単一ギャップ結合チャンネルコンダクタンスは10~15 pSであるが、Cx44.1の単一ギャップ結合チャンネルコンダクタンスは約280 pSであることが報じられ、両者のコンダクタンスには約20倍もの違いが存在する（Srinivas *et al.*, 1999; Dermietzel *et al.*, 2000; Teubner *et al.*, 2000）。また、Cx36以外のコネキシンタンパク質で構成されるギャップ結合チャンネルでは、ギャップ結合で結ばれた2細胞の膜電位が等電位であるとき、コンダクタンスは最大となることも明らかである（例外的に、Cx55.5を発現する2細胞では等電位の時ギャップ結合コンダクタンスが減少する。）（Dermietzel *et al.*, 2000）。

ギャップ結合全体のコンダクタンスは、ギャップ結合を構成する単一ギャップ結合チャンネルの数、そして開口状態にある単一ギャップ結合チャンネルの割合によって決まる。不思議なことに、脳に発現しているCx36では開口状態の単一ギャップ結合チャンネルの割合が4~9%と極めて低いことが報じられている（Lin & Faber, 1988, Teubner *et al.*, 2000, Galaretta and Hesterin, 2002; Perada *et al.*, 2003）。ギャップ結合を構成するコネクソンが異なるタイプのコネキシンで構成される、あるいは一つのギャップ結合の中に単一コネキシンでできたコネクソンと異なるタイプのコネキシンでできたギャップ結合チャンネルが混在する報告も現れ、ギャップ結合の多様性が次第に明らかになっている（例えば、Evans & Martin, 2002）。

3-2-2 ギャップ結合の可視化

ガラス管微小電極を用いて電気シナプスの有無を調べるために、電極内に色素を充填し、この色素を細胞内に注入して周辺の細胞への拡散を調査する方法も有効である。Leowenstein & Kanno (1964) はショウジョウバエ (*Drosophila flavorepleta*) の唾液腺細胞間の電気シナプスを利用し、ガラス管微小電極を刺入した細胞に注入した fluorescein (分子量: 376) が近隣の細胞に拡散することを確かめた。以降、ギャップ結合研究に色素の拡散実験が積極的に活用されるようになった。1970年代初め色素として、Procion yellow (分子量: 669) が用いられたが、1970年代後半に Lucifer yellow (分子量: 457) が開発されると、この色素が専ら用いられた。1980年代末に Neurobiotin (分子量: 323) が使われるようになると、この色素を注入した細胞は光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡でも観察が可能のため、ギャップ結合部位を特定することが可能となった (Vaney, 1991; Penn *et al.*, 1994; Hidaka *et al.*, 2004)。さらに、ギャップ結合チャンネルを構成するコネクシンのサブタイプを明らかにするため、例えば Lucifer yellow を注入した細胞を含む組織標本を抗コネクシン36抗体に加え、Alexa Fluor546 結合した二次抗体を反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡¹¹⁾ で観察する方法が開発された (日高, 2006)。電気シナプスが存在する部位 (例えば、電気シナプスが樹状突起間にある。) のみならずギャップ結合チャンネルを構成するコネクシンのサブタイプまで特定することができるようになったが、共焦点レーザー顕微鏡による観察では十分な分解能を得ることが困難であった。このため、近年抗コネクシン抗体で標識された部分を電子顕微鏡観察する方法が開発された (例えば, Kuraoka *et al.*, 1993)。この研究により、同一ギャップ結合内に異なるコネクシンタンパク質がランダムに配置されていることが明らかとなった (Kuraoka *et al.*, 1993)。

3-3 電気シナプスの分子生物学的研究

電気シナプスはシナプス前神経細胞の細胞膜とシナプス後神経細胞の細胞膜が 2~4 nm の狭い隙間を挟んで対向し、両細胞膜上にはコネクソンが向かい合うように並ぶ。コネクソンは、コネクシンタンパク質が 6 個集合した 6 量体である。コネクシンはこの 6 量体が輪状構造を取り、それぞれの細胞膜でヘミチャンネルを形成し、このチャンネルが両細胞膜表面から突出して接着結合して管状構造 (通路)、すなわちギャップ結合チャンネルを形成する (両細胞のヘミチャンネルを合わせると、12個のコネクシンによってギャップ結合チャンネルが形成されている。) (第 2 図参照)。ギャップ結合チャンネルでできた通路を介してシナプス前神経細胞とシナプス後神経細胞の細胞質は繋がり、イオンや低分子物質の移動が可能となる。多細胞生物において、ギャップ結合は骨格筋以外の殆どの組織に認められる。ただし、ギャップ結合の構造 (分子構造) は脊椎動物と無脊椎動物とで必ずしも一致していないことも明らかになっ

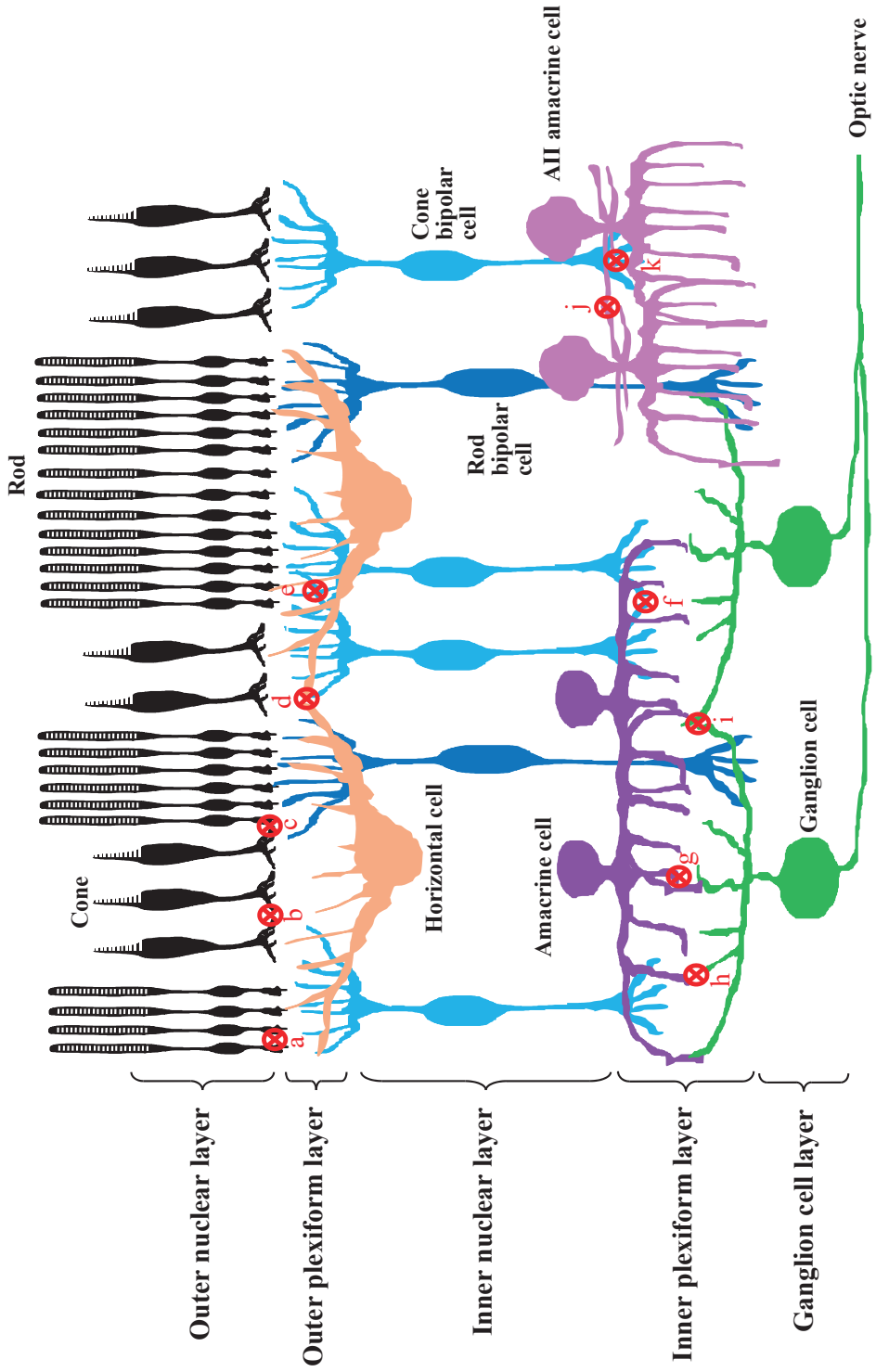
ている（例えば、Panchin, 2005）。

電気シナプス（あるいはギャップ結合）ではそれぞれの細胞膜が近接し、この部分にギャップ結合チャンネルが高密度に集合している。このため、界面活性剤処理や水酸化ナトリウム処理ならびに密度勾配遠心法を併用することにより高純度のチャンネルタンパク質を含む試料を容易に得ることができる（Hertzberg & Gilula, 1979）。肝臓と心筋から得られた試料を SDS-PAGE¹²⁾（電気泳動法の1つ）を用いて分析し、両組織に分子量の異なるコネキシンタンパク質が存在することが明らかとなった（Manjunath *et al.*, 1985）。その後、cDNA のクローニング¹³⁾ およびゲノム解析¹⁴⁾ を利用してアミノ酸配列が解読され、20種以上のコネキシンタンパク質ファミリーが存在することが確認された（例えば、Söhl & Willecke, 2004）。アミノ酸配列の解読により、肝臓ではアミノ酸283個が配列した分子量 32 KD とアミノ酸226個の 26 KD、心臓ではアミノ酸382個が配列した分子量 43 KD のコネキシンタンパク質が報告されている（コネキシンは分子量に基づき、コネキシン32 (Cx32)、コネキシン26 (Cx26) とコネキシン43 (Cx43) などのように呼ばれている。）（Kumar & Gilula, 1986; Paul, 1986; Beyer *et al.*, 1987; Nicholson *et al.*, 1987）。動物種間の相同性は非常に高く、ラット (*Rattus norvegicus*) Cx32 のアミノ酸配列はマウス (*Mus musculus*) と同一であり、ヒト (*Homo sapiens*) とは4アミノ酸が違うに過ぎない。免疫組織化学法¹⁵⁾ や NorthernBlot 法¹⁶⁾ などによる解析から、コネキシンタンパク質の分子種が組織特異性を有し、また同じ組織内にも複数のコネキシンタンパク質¹⁷⁾ が共存することも明らかとなっている（Fujimoto *et al.*, 1997）。例えば、肝細胞では Cx32 と Cx26、血管平滑筋では Cx43、血管内皮細胞では Cx40 と Cx37、膵臓β細胞では Cx36、膵臓外分泌腺細胞では Cx32、そして神経細胞では Cx36 などが明らかになっている（例えば、Kuraoka *et al.*, 1993）。

免疫標識レプリカ法の普及により、同一ギャップ結合領域に異なるサブタイプのコネキシンがコネクソンを形成することが明らかとなっている。実際、異なるコネキシン mRNA をアフリカツメガエル卵細胞に混合注入して発現させる実験系を用いて、異なるコネキシンがギャップ結合チャンネルを形成することも確認されている（HeLa 細胞を利用する実験系も利用されている。）（例えば、Paul *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1998）。異なるコネキシン分子種の混在するコネクソンにおいて、通路が形成されるコネキシンの組み合わせ（Cx32 と Cx26）と、形成されない組み合わせ（Cx43 と Cx26）があることも判明している（例えば、Evans & Martin, 2002; Gemel *et al.*, 2004）。

4. 網膜の電気シナプス

脊椎動物網膜を構成する神経細胞には化学シナプスのみならず同種ならびに異種の神経細



胞間に電気シナプスが存在する（第4図）（例えば、Völgyi *et al.*, 2013）。この電気シナプスは、錐体-錐体、桿体-桿体、桿体-錐体、水平細胞-水平細胞、双極細胞-双極細胞（樹状突起と軸索終末の2か所）、アマクリン細胞-アマクリン細胞、神経節細胞-神経節細胞、神経節細胞-アマクリン細胞、錐体双極細胞-AIIアマクリン細胞（哺乳動物のみ）とAIIアマクリン細胞-AIIアマクリン細胞（哺乳動物のみ）で確認されている（Müller細胞 [グリア細胞の1種]の間にも電気シナプスの存在が報じられている [Ceelen *et al.*, 2001; Zahs & Ceelen, 2006]。）（Völgyi *et al.*, 2013）。ただし、これらの電気シナプスの結合強度（結合抵抗や結合係数によって測られる両細胞のシナプス結合の強弱を指す。）には大きな差異があり、同種の神経細胞間にある電気シナプスの結合強度は高いが、異種の神経細胞間にある電気シナプスの結合強度は同種ほど高くない（例えば、Völgyi *et al.*, 2013）。

同種神経細胞間にある電気シナプスは、受容野拡大ならびにノイズ減少のために機能していると考えられている（例えば、Cook & Becker, 1995; Völgyi *et al.*, 2013）。一方、異種神経細胞間にある電気シナプスは、それぞれの神経細胞の機能の拡張に関与していると推測されている。例えば、桿体と錐体とでは動作する光強度と分光感度が大きく異なっているが、錐体-桿体間に電気シナプスが存在することで、それぞれの視細胞の動作範囲を広げることが可能である。また、哺乳動物網膜では、桿体→桿体優位ON型双極細胞（桿体双極細胞）→AIIアマクリン細胞という化学シナプスで連絡する神経経路が存在するが、このAIIアマクリン

第4図：脊椎動物網膜の構造（模式図）と電気シナプスの部位

脊椎動物網膜は、基本的に5種類の神経細胞（視細胞 [Coneと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]）で構成される（第6番目の神経細胞である Interplexiform 細胞とミュラー細胞は描記していない）。視細胞は、光に対する感度の高い桿体（薄明視）と低い錐体（昼光視）に分類される。視細胞以外の神経細胞は網膜内でシナプス接続（正確に表現すると、網膜内の神経細胞は化学シナプスによって接続している。）し、視覚情報処理にあたる。5種類の神経細胞は規則正しく配置し、これらの神経細胞の細胞体と樹状突起が層状構造を形成する。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層（Outer nuclear layer）、そして双極細胞、水平細胞とアマクリン細胞の細胞体が存在する部分を内顆粒層（Inner nuclear layer）と呼ぶ（桿体と錐体が並ぶ構造を視細胞層 [Photoreceptor layer] と呼ぶことがある。）。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位を外網状層（Outer plexiform layer）、そして双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞がシナプス連絡する部位を内網状層（Inner plexiform layer）と呼ぶ。外網状層と内網状層でのシナプス連絡を経て、視覚情報は神経節細胞に収斂する。神経節細胞の配置された構造を神経節細胞層（Ganglion cell layer）と呼ぶ。外界の光環境変化は視細胞でキャッチされて膜電位変化に変換後、縦方向に配列された細胞群（視細胞→双極細胞→神経節細胞）を経由して脳に達する。この縦方向の流れは、水平細胞とアマクリン細胞による処理を受ける。神経節細胞の神経軸索は、視神経（Optic nerve）と呼ばれる。眼球に入った光は網膜で処理され、視神経を経て脳へと伝播される。網膜内の神経細胞には、化学シナプスを介する接続以外に電気シナプスによる接続も確認されている。実際、網膜内に存在する殆ど全ての神経細胞は電気シナプスを介して接続していることが報じられている（a：桿体-桿体、b：錐体-錐体、c：桿体-錐体、d：水平細胞-水平細胞、e：双極細胞-双極細胞【樹状突起間】、f：双極細胞-双極細胞【軸索終末間】、g：アマクリン細胞-アマクリン細胞、h：神経節細胞-アマクリン細胞、i：神経節細胞-神経節細胞、j：AIIアマクリン細胞-AIIアマクリン細胞 [哺乳動物のみ] と k：錐体双極細胞-AIIアマクリン細胞 [哺乳動物のみ]）。

細胞は錐体優位 ON 型双極細胞（錐体双極細胞）と電気シナプスを介して結合しているため、錐体経路に桿体情報を付加することができる（例えば、Cook & Becker, 1995; Völgyi *et al.*, 2013）。このように、異種神経細胞間の電気シナプスには、機能の拡張があると考えられる。しかし、詳細は未だ明らかになっていない。

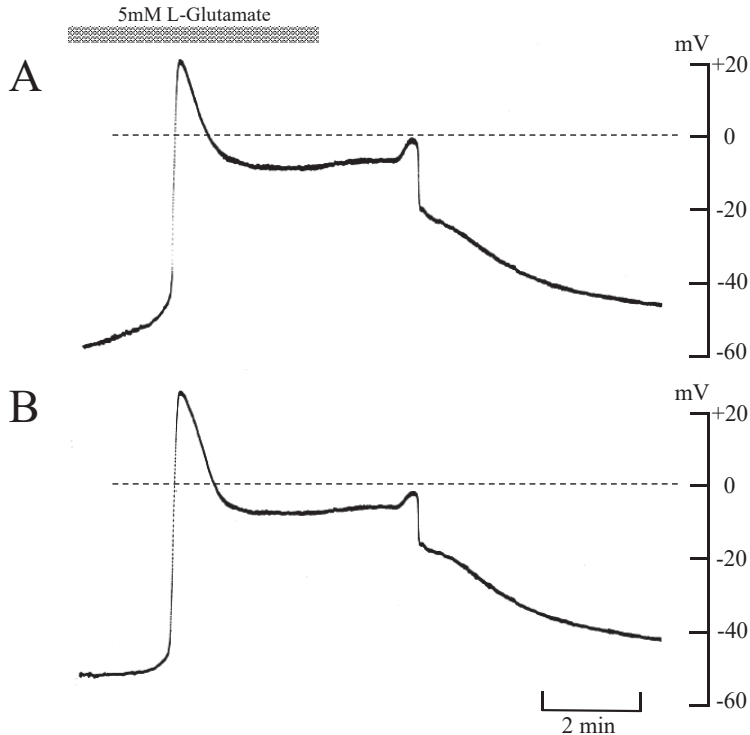
4-1 網膜水平細胞の電気シナプス

4-1-1 S 電位と水平細胞の関係

網膜の生理研究にガラス管微小電極を適用した Svaetichin (1953, 1956) は、反対色過程の光応答（緩電位性の膜電位変化）を示す 3 タイプの細胞（L 型錐体、RG 型錐体と YB 型錐体）を見出した。Svaetichin は光応答を発生する細胞を錐体と報告したが、Tomita (1957) はこの膜電位変化を記録するには錐体よりも深い位置までガラス管微小電極を挿入する必要があること（この膜電位は、錐体よりも中枢側の構造にまで電極を進めないと導出できなかった。）を見出し、Svaetichin によって報告された膜電位変化が錐体で発生するという結論に疑義を唱えた。1958 年、Svaetichin 自身も錐体であることを否定した（MacNichol & Svaetichin, 1958）。Tomita の研究グループも Svaetichin (1953, 1956) が報じた光応答と同様の膜電位変化を記録しており、これを網膜内活動電位（Intraretinal action potential; 略して EIRG と呼んだ。）と呼んでいた。Svaetichin (1953, 1956) や Tomita *et al.* (1957) によって見出された膜電位変化の発生源が不明であることを踏まえ、Motokawa (Tomita *et al.*, 1959 を参照) はこの膜電位変化を S 電位（S-potential; S は Svaetichin の頭文字である。）と呼ぶことを提案し、徐々にこの名称が普及して現在に至る。後年、この細胞は水平細胞であることが判明した（例えば、Steinberg & Schmidt, 1970; Kaneko, 1971）。

Tomita *et al.* (1958) はキンギョ（*Carassius auratus*）網膜の S 電位の応答振幅が、網膜を光照射する面積に依存し、照射面積が大きいほど膜電位変化が大きく、膜電位変化が飽和するには数 mm にも及ぶ領域への光照射が必要であることを示した。同様の結果は、ブリーム（*Abramis brama*）（コイ科の淡水魚）網膜の S 電位でも報告された（Gouras, 1960）。Norton *et al.* (1968) はコイ（*Cyprinus carpio*）網膜に存在する 3 タイプの S 電位を対象にして、膜電位変化と照射光（円型）の直径の関係を調べた。この結果、何れのタイプにおいても、一定振幅の S 電位を発生するために必要な光量は、照射する円型光の直径を大きくするにつれて減少することを明らかにした。また、S 電位は光を照射する領域によって拮抗作用を示すことがなく、均一であることが示された。飽和した S 電位を得るには極めて広い領域を光照射せねばならず、これは S 電位発生に関与する細胞が非常に大きいか、あるいは S 電位が細胞内誘導ではない可能性が当時考えられた。

Kaneko (1971) は S 電位を発生する細胞を明らかにする目的で、サメ（*Mustelus canis*）



第 5 図： 2 つの単相性水平細胞の膜電位変化の同時記録

コイ網膜から剥離網膜標本を作製し、1.5 mm 離れた 2 つの単相性水平細胞にガラス管微小電極を刺入し、両水平細胞からの膜電位変化を同時記録した。単相性水平細胞であることをスペクトル応答で確認後 (400~740 nm の単色光を 20 nm 毎に照射し、総ての単色光照射によって水平細胞に惹起される膜電位変化 [光応答ともいう。] が過分極性であること確認した。)、剥離網膜標本を灌流している正常リンガー液を修飾リンガー液に交換した。修飾リンガー液の灌流に伴い、両水平細胞の暗時の膜電位は -38 mV から -56 mV、そして -43 mV から -59 mV へと変化した。単色光照射を止め、修飾リンガー液に L-Glutamate (5 mM) を溶かして灌流投与した。A の水平細胞は L-Glutamate 投与に伴い徐々に脱分極し、カルシウム依存性活動電位を発生した。B の水平細胞には顕著な脱分極は観察されなかったが、活動電位は A の水平細胞と同期して現れた。その後、両水平細胞の膜電位はグルタミン酸応答に保持された (補助説明 (2) を参照)。修飾リンガー液から L-Glutamate を除去し始めると、L-Glutamate 濃度が徐々に減少するため、両水平細胞共に膜電位はグルタミン酸応答からプラトー電位へと緩やかに移行を始めた。約 2 分後、両水平細胞共に膜電位は突然プラトー電位に向かって移動した (コイ剥離網膜標本をリンガー液で灌流する灌流槽 [網膜標本を設置する灌流槽は直径約 10 mm、高さ約 5 mm の円筒形である。] は大きいため、灌流槽内に一定流速で L-Glutamate を導入しても、灌流槽内の L-Glutamate が均一になるには長い時間を要する。このため、短時間で L-Glutamate の効果を確認したいとき、高濃度を利用することが多い。勿論、灌流槽内から L-Glutamate を除去する場合も、灌流槽内の L-Glutamate の濃度低下には時間を要し、この過程で灌流槽内の L-Glutamate 濃度は不均一が生じる。特に、高濃度の L-Glutamate を除去する際、灌流槽内に大きな濃度の不均一が生まれるに違いない。本実験では 5 mM という高濃度の L-Glutamate を用いており、これを除去するには通常数分間以上が必要となる (本実験のように、比較的短い時間で L-Glutamate が除去される場合も稀に見られる。)。しかし、プラトー電位が突然終了したため、約 -20 mV まで過分極し、その後ゆっくりと元の膜電位レベルに向かって移動した。両水平細胞での活動電位発生、その後の膜電位変化は殆ど一致しており、近隣の同種の水平細胞が電気シナプスを介して等電位であることを示している。これは、網膜内で水平細胞は機能的合胞体を形成していることを示している。

網膜を材料とし、ガラス管微小電極による膜電位測定および電極から色素を射出して細胞を染色する実験を試みた。S 電位を導出し、ガラス管微小電極に充填した Procion brilliant red あるいは Procion yellow を電気泳動的に電極外に射出すると、水平細胞が染色された。また、2本のガラス管微小電極を近接させて S 電位を導出し、一方の細胞に通電刺激を行うと他方の細胞に膜電位変化が現れた。さらに、1つの水平細胞に Procion yellow を注入すると、色素を注入した細胞のみならず周辺の水平細胞にもこの色素が拡散した。これらの実験結果は S 電位を発生する細胞が水平細胞であり、この細胞は電気シナプスを介して結合していることを明らかにした。水平細胞の光応答 (S 電位) が飽和するために数 mm にも及ぶ広い領域への光照射が必要な理由は、水平細胞間に存在する電気シナプスによることが明らかとなった (第 5 図参照)。

水平細胞には、複数のタイプが存在する。魚類から鳥類までは 1~4 タイプ、哺乳類では概ね 2 タイプである (霊長類の中には、3 タイプ存在することが知られている。) (高橋, 2018)。このタイプの違いは錐体および桿体の種類と密接に関係している。例えば、コイ網膜には 3 種の異なる波長感受性を有する錐体と 1 種の桿体が存在し、現在 3 タイプの錐体水平細胞と 1 タイプの桿体水平細胞の都合 4 タイプがあることが知られている (現在、コイ網膜錐体には、青色錐体、緑色錐体と赤色錐体の以外に、紫外光錐体が存在することが明らかとなっている [Hawryshyn & Hárosi, 1990], しかし、紫外光錐体の機能については未だ十分に解析されていない。) (例えば, Tomita, 1965; Kaneko & Yamada, 1972; Mitarai *et al.*, 1974; Hashimoto *et al.*, 1976; Weiler 1978; Tsukamoto *et al.*, 1987)。一方、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜には錐体と桿体それぞれ 1 タイプずつ存在するが、それぞれのタイプに対応して錐体水平細胞と桿体水平細胞がそれぞれ 1 タイプ存在することが明らかになっている (Hidaka *et al.*, 1986; Sakai & Naka, 1986)。Kaneko & Stuart (1980, 1984) はコイ網膜に存在する 4 タイプの水平細胞に Lucifer yellow を充填したガラス管微小電極を刺入し、分光特性から水平細胞を特定した後、この細胞に色素を注入した。この結果、同タイプの水平細胞にのみ色素が拡散することが明らかとなった。また、水平細胞の軸索終末に色素を注入したときにも、同タイプの水平細胞の軸索終末に色素が拡散することを示した。この結果から、水平細胞間に形成される電気シナプスは同タイプに限られることが明らかとなった。

水平細胞が電気シナプスを介して繋がることによって水平細胞の受容野は著しく拡大し、これが双極細胞ならびに神経節細胞の中心-周辺拮抗的受容の周辺受容野形成に重要な役割を演じていると考えられている (例えば, Barlow, 1953, 1961; Kuffler, 1953; Werblin & Dowling, 1969; Matsumoto & Naka, 1972; Kaneko, 1973; Schwartz, 1974; Srinivasan *et al.*, 1982; Burkhardt, 1993; Kamermans & Spekreijse, 1999)。さらに、下等脊椎動物網膜では双極細胞の中心受容野と周辺受容野の何れにも反対色応答が認められるが、この応答は水平細

第1表：脊椎動物網膜のギャップ結合を構成するコネキシン

| 動物の分類 | 動物の種 | 学名 | コネキシンの種類 | 文献 |
|-------|----------|---|--|--|
| 軟骨魚綱 | エイ | <i>Raja erinacea</i> & <i>Raja ocellata</i> | Cx35/36 | O'Brien <i>et al.</i> , 1996 |
| | バス | <i>Morone saxatilis</i> & <i>Morone chrysops</i> | Cx34.7, Cx35/36 | O'Brien <i>et al.</i> , 2004 |
| 硬骨魚綱 | コイ | <i>Cyprinus carpio</i> | Cx35/36, Cx43, Cx49.5, Cx52.6, Cx53.8, Cx55.5 | Janssen-Bienhold <i>et al.</i> , 1998, Liu <i>et al.</i> , 2009, Greb <i>et al.</i> , 2017 |
| | ゼブラフィッシュ | <i>Danio rerio</i> | Cx27.5, Cx35/36, Cx43, Cx44.1, Cx52.6, Cx55.5 | Janssen-Bienhold <i>et al.</i> , 1998, Dermietzel <i>et al.</i> , 2000, Zoidl <i>et al.</i> , 2004, Shields <i>et al.</i> , 2007 |
| 両生綱 | サンショウウオ | <i>Ambystoma tigrinum</i> | Cx35/36 | Zhang & Wu, 2004 |
| | イモリ | <i>Cynops pyrrhogaster</i> | Cx43 | Kihara <i>et al.</i> , 2008 |
| 爬虫綱 | カメ | <i>Pseudemys scripta</i> <i>elegans</i> | Cx26, Cx43 | Janssen-Bienhold <i>et al.</i> , 1998, Pottek <i>et al.</i> , 2003 |
| 鳥綱 | ニワトリ | <i>Gallus gallus</i> <i>domesticus</i> | Cx26, Cx32, Cx35/36, Cx43, Cx45, Cx50, Cx56 | Becker <i>et al.</i> , 2002, Kihara <i>et al.</i> , 2008, 2009 |
| | マウス | <i>Mus musculus</i> | Cx30.2, Cx35/36, Cx43, Cx45, Cx57 | Deans <i>et al.</i> , 2002, Han & Massey, 2005, Hansen <i>et al.</i> , 2005, Lin <i>et al.</i> , 2005, Schubert <i>et al.</i> , 2005a, b, Kihara <i>et al.</i> , 2006a, b, Janssen-Bienhold <i>et al.</i> , 2009, Palacios- Prado <i>et al.</i> , 2009, Müller <i>et al.</i> , 2010, Pan <i>et al.</i> , 2010, Hilgen <i>et al.</i> , 2011 |
| 哺乳綱 | ラット | <i>Rattus norvegicus</i> | Cx30, Cx35/36, Cx43, Cx45, | Hidaka <i>et al.</i> , 2002, Zahs <i>et al.</i> , 2003 |
| | モルモット | <i>Cavia porcellus</i> | Cx35/36 | Lee <i>et al.</i> , 2003 |
| ウサギ目 | ウサギ | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | Cx35/36, Cx43, Cx50, Cx57 | Johansson <i>et al.</i> , 1999, O'Brien <i>et al.</i> , 2004, Huang <i>et al.</i> , 2005, O'Brien <i>et al.</i> , 2006, Zahs & Ceelen, 2006, Cha <i>et al.</i> , 2012 |
| | 霊長目 | サル | Cx35/36 | Pottek <i>et al.</i> , 2003, O'Brien <i>et al.</i> , 2012 |
| | ヒト | <i>Homo sapiens</i> | Cx35/36, Cx43, Cx59, Cx62 | Zahs & Ceelen, 2006, Kerr <i>et al.</i> , 2010, Söhl <i>et al.</i> , 2010 |

エイやパーチ網膜でCx36が発見されたが、後に齧歯類や哺乳類網膜でもCx36に相同性のあるCx35が発見された。このため、両者を区別せずに、Cx35/36と表現した。

胞が三原色過程（錐体）を反対色過程（双極細胞）に変換することによって生じると推測されている（例えば、Stell *et al.*, 1975; Toyoda & Tonosaki, 1978; Kaneko & Tachibana, 1981; Murakami *et al.*, 1982a, b; Kamermans *et al.*, 2001; Hirasawa & Kaneko, 2003）。

4-1-2 網膜水平細胞の電気シナプス：ギャップ結合を構成するコネキシンタイプ

水平細胞に電気シナプスが存在することは、①水平細胞の受容野が水平細胞の細胞体と樹状突起の形態学的拡がりよりも遥かに大きいこと、②特定の水平細胞に与えられた通電刺激が周辺の同タイプの水平細胞に伝播して膜電位を変化させること、③水平細胞に注入した Procion yellow や Lucifer yellow のような蛍光色素あるいは Biocytin や Neurobiotin のような化学物質が周辺の水平細胞に拡散することなどによって証明されている。これまでに、魚類から哺乳類に至る多くの動物種の網膜において、水平細胞の電気シナプスが調査されてきた。動物種により若干の相違はあるものの、細胞体-細胞体、樹状突起-樹状突起そして軸索終末-軸索終末にギャップ結合が存在することが確認されている（例えば、哺乳類：Raviola & Gilula, 1975; Kolb, 1977, 爬虫類：Witkovsky *et al.*, 1983; Kolb & Jones, 1984, 魚類：Baldridge *et al.*, 1989）。また、コイ網膜単相性（L型）水平細胞では軸索と軸索終末にもギャップ結合が存在し、このギャップ結合が錐体とシナプス接続していない軸索終末にも光応答が惹起される原因となっていることが突き止められている（Kouyama & Watanabe, 1986; Yagi, 1988）。

近年、分子生物学的手法を駆使してギャップ結合の分子構成を解明する研究が、神経細胞、心筋細胞や平滑筋を用いて始まった。まず、ギャップ結合を構成するタンパク質が解析され、ギャップ結合部分の細胞膜の分離・精製ならびに SDS-PAGE によるタンパク質分子量の測定が行われ、ギャップ結合を構成するタンパク質はコネキシンであること、そしてこの分子の分子量が 20~50 kD の複数分子種が存在することが明らかとなった。続いて、ギャップ結合部から分離したタンパク質に特異的な抗体を作製し、これに標識を付けて免疫組織化学的研究が行われ、多様なコネキシンの組織内での分布を調査することも可能となった。さらに、ゲノム解析を中心とした遺伝子クローニングによって、複数の動物種で核酸塩基配列の解析に基づきコネキシンタンパク質のアミノ酸配列が決定され、また遺伝子ファミリー群の同定も可能となった。網膜にもこれらの方法が導入され、細胞間にあるギャップ結合の分子種の識別も次々と明らかになっている。例えば、コイ網膜水平細胞では Cx35/36, Cx49.5, Cx52.6, Cx53.8 と Cx55.5 (Liu *et al.*, 2009; Greb *et al.*, 2017), ゼブラフィッシュ網膜水平細胞では Cx52.6 と Cx55.5 (Zoidle *et al.*, 2004), カメ網膜水平細胞では、Cx26 と Cx43 (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009), マウス網膜水平細胞では Cx57 (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009; Palacios-Prado *et al.*, 2009), そしてウサギ網膜水平細胞では Cx50 と Cx57 (Huang

et al., 2005; O'Brien *et al.*, 2006; Cha *et al.*, 2012) などが報告されている (第 1 表参照)。

4-1-3 水平細胞の電気シナプス調節への Interplexiform 細胞の関与

脊椎動物網膜には、第 6 番目の神経細胞が存在する (例えば, Ehinger, 1967; Ehinger & Falck, 1969; Ehinger *et al.*, 1969; Boycott *et al.*, 1975; Dowling and Ehinger, 1975, 1978; Kolb and West, 1977)。この新たな細胞は細胞体がアマクリン細胞と同じ内顆粒層にあり、神経突起を内網状層と外網状層の両層に伸展していることから、Interplexiform 細胞と命名された。Interplexiform 細胞は Dopamine を含んでいること (後年, Dopamine 以外にグリシンを含む Interplexiform 細胞が存在することも報告されている [Marc & Liu, 1984]), 双極細胞ならびに水平細胞にシナプス出力していること, そしてアマクリン細胞との間に両方向性のシナプスを形成していることが明らかとなっている (Ehinger & Falck, 1969; Ehinger *et al.*, 1969; Dowling & Ehinger, 1975, 1978)。この Interplexiform 細胞は脳に端を発する求心性神経細胞からシナプス入力を受け取っていることが報じられている (Zucker & Dowling, 1987; Yazulla & Zucker, 1988)。

Hedden & Dowling (1978) はキンギョ網膜において、Dopamine 投与が L 型水平細胞を脱分極させ、光応答を減少させることを見出した。Negishi & Drujan (1979) はモハラ (*Eugerres plumieri*) (クロサギ科の海水魚) 網膜水平細胞にガラス管微小電極を刺入して膜電位変化を導出し、電極を刺入した水平細胞を中心にして 0.5 mm の円形をした光 (中心光), あるいは内径が 2.0 mm と外径が 4.0 mm の輪状をした光 (中心部 2.0 mm の暗黒で、2.0 mm から 4.0 mm の部分を光刺激 [ドーナツ型の光刺激]) (環状光) を交互に照射し、それぞれの光応答 (光刺激に対する膜電位変化) に対する Dopamine 投与の影響を調べた。この結果、Dopamine 投与は中心光照射に対する光応答を約 40% 増加させ、また環状光照射に対する光応答を約 40% 減少させることが明らかとなった。つまり、Dopamine は水平細胞の応答性と受容野サイズに影響することを示している。その後、Teranishi *et al.* (1983) はコイ剥離網膜にガラス管微小電極を刺入して水平細胞から膜電位応答を導出し、0.5 mm のサイズの光刺激を 5 mm ずつ直線状に移動させ、これらの光刺激に対する光応答を観察した。電極刺入部に光照射すると大きな膜電位変化が得られるが、光刺激を電極刺入部から遠ざけるにつれて光応答は小さくなった。Dopamine 投与により、電極刺入部への光照射で惹起される光応答は顕著に増強、そして電極刺入部から離れるにつれて光応答は顕著に減弱した。この結果は、水平細胞間の電気シナプスによる膜電位変化の伝播が Dopamine によって阻害されたことを示唆している。つまり、Dopamine が水平細胞間電気シナプスの修飾物質である可能性を示していた。その後の研究により、水平細胞には Dopamine D1 レセプターが存在することが明らかとなった (Dong & McReynolds, 1991; DeVries & Schwartz, 1991)。

網膜を長期間暗黒に維持すると網膜神経節細胞の周辺応答が減弱もしくは消失すること、また双極細胞の周辺応答が Dopamine 投与によって減弱することが報じられている (Barlow *et al.*, 1957; Donner & Reuter, 1965; Masland & Ames, 1976; Hedden & Dowling, 1978)。これらの結果は、網膜を長時間暗黒に保つことが網膜内の Dopamine 量増加を促す可能性を示している。Mangel & Dowling (1985) はコイ網膜 L 型水平細胞の膜電位変化に対する長時間の暗黒と Dopamine 投与の影響を比較した。コイを 20~40 分間暗黒 (短時間の暗黒) と 100~110 分間暗所 (長時間の暗黒) に維持し、その後作製した網膜標本にガラス管微小電極を適用して膜電位の導出を行った。1.6 mm 未満のサイズの光照射に対する L 型水平細胞の膜電位変化は短時間暗黒に維持した網膜よりも長時間暗黒に維持した網膜の方が大きく、1.6 mm を超えるサイズの光照射に対する膜電位変化は 1.6 mm 未満の結果と逆となった。Mangel & Dowling (1985, 1987) は、長時間暗黒に維持した網膜の水平細胞と 25 μ M Dopamine 投与した網膜の水平細胞の比較実験を行い、網膜を長時間暗黒に維持することと網膜に対する Dopamine 投与が同様の効果を有していることを見つけた。これらの結果に基づき、Mangel & Dowling (1985, 1987) は長時間の暗黒によって Interplexiform 細胞から Dopamine が放出され、これが水平細胞 (あるいは、双極細胞にも作用した可能性がある。) に作用したと推測した。Mangel & Dowling (1985, 1987) によって得られた研究成果は複数の研究グループによって確認されたが、一方で水平細胞に対する Dopamine 投与の効果が長時間の暗黒 (暗順応) ではなく、明条件下 (明順応) で現れる効果と似ていると報じる研究報告も現れ、未だ決着を見ていない (暗順応後放出: Mangel & Dowling, 1985, 1987; Yang *et al.*, 1988a, b; Tornqvist, 1988; Umino *et al.*, 1991) (明順応後放出: Shigematsu & Yamada, 1988; Baldridge & Ball, 1991; Dong & McReynolds, 1991; Weiler & Akopian, 1992; Hankins, 1995)。

4-1-4 水平細胞間電気シナプスの Dopamine による制御

Van Buskirk & Dowling (1981) はコイ網膜を酵素処理して得られた単離水平細胞を利用し、Dopamine 投与が水平細胞内に Adenosine 3',5'-phosphoric acid (cAMP) 蓄積を促すこと、そして Dopamine 拮抗剤である Haloperidol などの投与が cAMP 蓄積を阻害することを見つけた。さらに、カメ (*Pseudemys scripta elegans*) 網膜 H1 型水平細胞の軸索終末に対して cAMP 産生を促すアデニル酸シクラーゼ (Adenylate cyclase) の活性を刺激する Forskolin や 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) などが、Dopamine と同様に電気シナプスの膜抵抗を増加させることが報じられた (Piccolino *et al.*, 1984)。これらの研究から、Dopamine は水平細胞に作用して細胞内のアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内で cAMP 産生を増加させることによって電気シナプスを修飾していると推測された。

Lasater (1987) は、パーチ (*Roccus americana*) 網膜から単離した水平細胞に形成される

電気シナプス（ギャップ結合）を解析に利用した。両細胞にパッチ電極を適用し、電圧固定下で膜電流を導出した。一方の水平細胞の膜電位を変化させ、他の水平細胞で膜電流変化を測定し、結合コンダクタンスと結合係数が Dopamine の有無でどのように変化するのかを測定した。Dopamine 投与により、結合コンダクタンスおよび結合係数の何れもが減少した。また、パッチ電極を通じて 8-Bromoadenosine 3',5'-phosphoric acid (8-bromo-cAMP) を水平細胞内に注入することによって、水平細胞間の結合コンダクタンスが顕著に減少することも観察した。さらに、Lasater (1987) はバス (*Roccus chrysops*) から単離した水平細胞に形成されたギャップ結合を用い、cAMP 依存性プロテインキナーゼをパッチ電極から細胞内に投与する実験を試みた。このキナーゼも Dopamine と同様に結合コンダクタンスを低下させ、さらにキナーゼ抑制剤である Walsh inhibitor が Dopamine の作用を抑えることを明らかにした。その後、McMahon *et al.* (1989) はパーチ (*Roccus americana*) 網膜から単離した水平細胞間に形成されたギャップ結合にパッチ電極を適用し、ギャップ結合チャンネルに関する膜電流のノイズ解析を行い、単一ギャップ結合チャンネルの結合コンダクタンスと開口確率を求めた。Dopamine によるギャップ結合チャンネルを介する膜電流の減弱が結合コンダクタンスの減少によるのではなく、Dopamine は開口確率を減少させることによることを見出した。これらの結果を総合すると、cAMP 依存性プロテインキナーゼはギャップ結合を構成するタンパク質（おそらく、コネキシンタンパク質）をリン酸化し、ギャップ結合チャンネルの開口確率を減少させて水平細胞間電気シナプスのシナプス伝達効率を下げていることが示唆される。

4-1-5 水平細胞のギャップ結合チャンネルを調整する各種のしくみ

網膜内の Dopamine は水平細胞膜に発現する DopamineD₁ レセプターに結合すると、細胞内のアデニル酸シクラーゼを活性化し、Adenosine 5'-triphosphoric acid (ATP) から cAMP の産生（あるいは合成）を開始する。細胞内で増加した cAMP は cAMP-dependent protein kinase (cAMP 依存性プロテインキナーゼ) を活性化し、コネキシンタンパク質のリン酸化を経てギャップ結合チャンネルの開口確率を減少させると考えられている (McMahon *et al.*, 1989)。網膜内で Dopamine を産生する細胞として Interplexiform 細胞とアマクリン細胞が知られているが、水平細胞とシナプス連絡が存在するのは Interplexiform 細胞のみである。残念ながら、Interplexiform 細胞による Dopamine 放出のタイミングが明暗の何れであるのかは未だ明らかではない。最近、Witkovsky (2004) は Dopamine 放出がサーカディアンリズム¹⁸⁾（概日周期あるいは日周リズム）と光の両方によって制御されており、錐体と桿体が入り替わる夕方頃に網膜内の Dopamine 量が上昇することを報じている。

一酸化窒素 (NO) は細胞膜を通過し、細胞内に入り可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble

Guanylate cyclase) を活性化して細胞内 cGMP を増加させることが知られている。この cGMP は cGMP-dependent protein kinase (cGMP 依存性プロテインキナーゼ) を活性化し、ギャップ結合チャンネルのコンダクタンスを減少させる (McMahon & Ponomareva, 1996; Lu & McMahon, 1997; Pottek *et al.*, 1997; Xin & Bloomfield, 2000)。生体内で NO は一酸化窒素合成酵素によって Arginine (アルギニン) から Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸; NADPH) (補酵素の一種) の助けを借りて合成される。脊椎動物網膜でも水平細胞を含む複数のタイプの神経細胞に一酸化窒素合成酵素が存在することが明らかにされている (例えば, Weiler & Kewitz, 1993; Liepe *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1996)。明暗の何れの条件下で NO 放出が増加するのかは、未だ明らかにはなっていない。

暗順応した網膜における水平細胞の受容野が Retinoic acid (レチノイン酸) 投与によって縮小し、さらに同タイプ水平細胞間の色素拡散が減少することが報告されている (Weiler *et al.*, 1999, 2001)。この Retinoic acid の作用は、ギャップ結合チャンネルの閉塞によると考えられている。実際, Zhang & McMahon (2000) はバス (Hybrid striped bass [*Roccus chrysops* × *Roccus saxitalis*]) 網膜から単離した水平細胞を用い、Retinoic acid がギャップ結合チャンネルの開口確率を減少させることを明らかにした。そして、Retinoic acid の効果は細胞内の水素イオン (H^+) と Ca^{2+} の濃度変化とは無関係であること、ならびに Dopamine や NO から独立していることも明らかにした。光照射に伴い視細胞外節に存在する 11cis-retinal は All trans-retinal に変化するが、この All trans-retinal は色素上皮細胞に運ばれ、一部が Retinal dehydrogenase (レチナルデヒドロゲナーゼ) によって酸化されて Retinoic acid の産生を生む。この Retinoic acid は網膜外層に向かって拡散し、水平細胞の細胞膜を容易に通過し細胞内に進入すると考えられている (Weiler *et al.*, 2001)。また、水平細胞に対する Retinoic acid の作用は、明順応と酷似しているという報告がある (Weiler *et al.*, 1998)。

細胞内 Ca^{2+} は Calmodulin (カルモデュリン) を介してギャップ結合チャンネルの開閉に影響すると考えられている (Peracchia, 2004; Zou *et al.*, 2014)。しかし、細胞内 Ca^{2+} の濃度について詳細は明らかになっていない (例えば, Peracchia, 2004)。ナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した錐体水平細胞を接着させて形成したギャップ結合を利用した解析では、細胞内 Ca^{2+} が 100~700 nM の生理的濃度ではギャップ結合チャンネルのコンダクタンスに大きな変化がないこと (しかし、細胞内 Ca^{2+} は Dopamine 投与に伴うギャップ結合制御に関与しない。) を報じている (DeVries & Schwartz, 1989)。水平細胞のギャップ結合チャンネルに対する Ca^{2+} ならびに Calmodulin の作用については今後の解析を待たざるを得ない。

細胞内 H^+ がギャップ結合チャンネルの開閉に影響することは古くから知られていた (例えば, Turin & Warner, 1977, 1980; Spray *et al.*, 1981)。コイ網膜水平細胞についても、 NH_3

(アンモニア) 投与 (NH_4Cl 投与は細胞内をアルカリ化する。) が電気シナプスの結合強化, そして二酸化炭素 (CO_2) 投与 (CO_2 投与は細胞内を酸性化する。) が電気シナプスの結合抑制をもたらすことが既に知られていた (Negishi *et al.*, 1985)。後年, ナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した錐体水平細胞を接着させて形成したギャップ結合を利用した研究では, 細胞内酸性化がギャップ結合チャネルコンダクタンスを減少させること (細胞内 H^+ は cAMP を介するギャップ結合制御に関与しない。) が明らかになった (DeVries & Schwartz, 1989)。しかし, 網膜水平細胞のギャップ結合チャネルに対する細胞内 H^+ の影響に関する研究は未だ不十分であり, なお詳細な解析が必要である。

ナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した錐体水平細胞を接着させてギャップ結合を形成し, 両水平細胞にパッチ電極を適用してギャップ結合の膜電位依存性を調査した。一方の水平細胞を -20 mV に膜電位固定し, 他方を種々の膜電位に変化させると, 両水平細胞に膜電位差があるときのみ膜電流が発生し, 両細胞が等電位ときには流れないことが明らかとなった (DeVries & Schwartz, 1989)。この結果は, ギャップ結合を介して流れる膜電流は, 両水平細胞の膜電位差にのみ依存していることを示している。ところが, 最近ギャップ結合チャネルの開閉は細胞間の膜電位差のみならず, それぞれの細胞の膜電位にも依存していることが明らかになっている (Verselis *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1999; Revilla *et al.*, 1999; Ri *et al.*, 1999; Barrio *et al.*, 2000)。

5. 終わりに

脊椎動物網膜を構成する細胞のタイプとその配置は魚類から哺乳類まで比較的良好に保存されている。動物が夜行性かあるいは昼行性 (昼行性動物の場合, 多原色色覚を有するののかも関係する。) によって視細胞 (錐体と桿体) のタイプが大きく異なり, この結果として視細胞入力を受け取る水平細胞にも複数のタイプが現れる (高橋, 2018)。色覚を有する下等脊椎動物網膜の水平細胞は 3 ~ 4 タイプ, また哺乳類網膜では概ね 2 タイプが基本である。何れの水平細胞も活動電位を発生せず, 光照射に対して緩電位性の膜電位変化を示す。同タイプの水平細胞は電気シナプスを介して結合している。このため, 水平細胞の受容野は比較的大きく, 魚類では数 mm にも達することが知られている (Tomita *et al.*, 1958; Gouras, 1960; Norman *et al.*, 1967; Kaneko, 1971)。

水平細胞は電気シナプスを介する広範な受容野を活かし, 双極細胞や神経節細胞の中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容形成に関与している (例えば, Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978)。また, 下等脊椎動物網膜では, 視細胞における三原色過程が反対色過程に変換されるために水平細胞は重要な役割を演じている (例え

ば, Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1991; Witkovsky *et al.*, 1995)。動物種に関わらず, 同タイプの水平細胞には電気シナプスが存在するが, 分子生物学的には電気シナプスを構成するギャップ結合チャネル分子, すなわちコネキシンには動物種差が認められる (例えば, Cook & Becker, 1995; Völgyi *et al.*, 2013)。近年, コネキシンには約20のサブタイプの存在が報じられている (例えば, Söhl & Willecke, 2004)。このようなサブタイプの違いは, おそらく長い生物進化の過程を反映していると推測される。しかし, 網膜におけるコネキシンサブタイプの違いが, 生理学的に大きな差を生んでいるという報告は今のところない。

今後, それぞれの動物種の網膜水平細胞に発現するコネキシンを同定し, これらが構成するコネクソンの違いがギャップ結合チャネルの機能差を生んでいるのか否かを詳細に解析する必要がある。網膜を構成する総ての細胞腫にギャップ結合が存在することが判明しており, 視細胞から神経節細胞までの総ての細胞にあるギャップ結合がどのような役割を演じているのかも明らかにする必要がある。網膜内での視覚情報処理を理解するには, 網膜を構成する各神経細胞が形成する化学シナプスのみならず電気シナプスの機能解明が急務である。

本論文では, 網膜内の神経細胞間に存在する電気シナプスを膜電位変化の伝達機構の一つとして注目した。しかし, ギャップ結合チャネルは膜電位発生に必要なイオン以外に, セカンドメッセンジャーを含む小分子の細胞間移動を可能にする仕組みでもある。小分子移動通路としてのギャップ結合に着目した研究は未だ不十分であり, 今後の研究が待たれる。

【引用文献】

- Baldrige, 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.
- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. G. (1989), Gap junction particle density of horizontal cells in goldfish retinas lesioned with 6-OHDA, *J. Comp. Neurol.*, **287**: 238–246.
- Barlow, H. B. (1953), Action potentials from the frog's retina, *J. Physiol.*, **119**: 58–68.
- Barlow, H. B. (1961), Possible principles underlying the transformation of sensory messages, In *Sensory communication* (Ed. W. A. Rosenblith), pp. 217–234, MIT Press, Cambridge.
- Barlow, H. B., Fitzhugh, R. and Kuffler, S. W. (1957), Dark adaptation, absolute threshold and Purkinje shift in single units of the cat's retina, *J. Physiol.*, **137**: 327–337.
- Barrio, L. C., Revilla, A., Gómez-Hernández, J. M., deMiguel, M. and González, D. (2000), Membrane potential dependence of gap junctions in vertebrates, In C. Peracchia (Ed.), *Gap junctions: Molecular basis of cell communication in health and disease*, pp. 175–188, San Diego, Academic press.
- Baylor, D. A. and Nicholls, J. G. (1969), Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurones in the central nervous system of the leech, *J. Physiol.*, **203**: 591–609.
- Becker, D. L., Bonness, V., Catsicas, M. and Mobbs, P. (2002), Changing patterns of ganglion cell coupling and connexin expression during chick retinal development, *J. Neurobiol.*, **52**: 280–293.
- Bellairs, R., Breathnach, A. S. and Gross, M. (1975), Freeze-fracture replication of junctional complexes in unincubated and incubated chick embryos, *Cell Tiss. Res.*, **162**: 235–52.

- Belousov, A. B., Fontes, J. D., Freitas-Andrade, M. and Naus, C. C. (2017), Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease, *BMC Cell Biol.*, **18** (Suppl. 1): 1–11 (doi: 10.1186/s12860-016-0120-x).
- Bennett, M. V. (1966), Physiology of electrotonic junctions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **137**: 509–539.
- Bennett, M. V. and Zukin, R. S. (2004), Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain, *Neuron*, **41**: 495–511.
- Bennett, M. V., Aljure, E., Nakajima, Y. and Pappas, G. D. (1963), Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: electrophysiology and ultrastructure, *Science*, **141**: 262–264.
- Beyer, E. C., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. (1987), Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver, *J. Cell Biol.*, **105**: 2621–2629.
- Beyer, E. C., Lipkind, G. M., Kyle, J. W. and Berthoud, V. M. (2012), Structural organization of intercellular channels II. Amino terminal domain of the connexins: Sequence, functional roles, and structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**: 1823–1830.
- Bloomfield, S. A. and Völgyi, B. (2009), The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina, *Nature Rev. Neurosci.*, **10**: 495–506.
- Boycott, B. B., Dowling, J. E., Fisher, S. K., Kolb, H. and Laties, A. M. (1975), Interplexiform cells of the mammalian retina and their comparison with catecholamine-containing retinal cells, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **191**: 353–368.
- 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, *Vis. 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.
- Ceelen, P. W., Lockridge, A. and Newman, E. A. (2001), Electrical coupling between glial cells in the rat retina, *Glia*, **35**: 1–13.
- Cajal, R. S. (1891), Significación fisiológica de las expansiones protoplásmica y nerviosas de las células de la sustancia gris. Congreso medico valenciano (cited in “Cajal, R. S. (1909), *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés*, tome I, Paris, Maloine.”).
- Cao, F., Eckert, R., Elfgang, C., Nitsche, J. M., Snyder, S. A., Hülser, D. F., Willecke, K. and Nicholson, B. J. (1998), A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes, *J. Cell Sci.*, **111**: 31–43.
- Cha, J., Kim, H.-L., Pan, F., Chun, M.-H., Massey, S. C. and Kim, I.-B. (2012), Variety of horizontal cell gap junctions in the rabbit retina, *Neurosci. Lett.*, **510**: 99–103.
- Chalcraft, J. P. and Bullivant, S. (1970), An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture, *J. Cell Biol.*, **47**: 49–60.
- Christie, M. J., Williams, J. T. and North, R. A., (1989), Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats, *J. Neurosci.*, **9**: 3584–3589.
- Cook, J. E. and Becker, D. L. (1995), Gap junctions in the vertebrate retina, *Microsc. Res. Tech.*, **31**: 408–419.
- Daw, N. W. (1968), Colour-coded ganglion cells in goldfish retina: extension of their receptive fields by means of new stimuli, *J. Physiol.*, **197**: 567–592.
- Deans, M. R., Völgyi, B., Goodenough, D. A., Bloomfield, S. A. and Paul, D. L. (2002), Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina, *Neuron*, **36**: 703–712.
- Dermietzel, R., Kremer, M., Paputsoglu, G., Stang, A., Skerrett, I. M., Gomes, 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.
- De Robertis, E. D. and Bennett, H. S. (1955), Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 47–58.

- 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., Qi, X., Smith, R., Makous, W. and Sterling, P. (2002), Electrical coupling between mammalian cones, *Curr. Biol.*, **12**: 1900–1907.
- Dewey, M. M. and Barr, L. (1962), Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus, *Science*, **137**: 670–672.
- Dewey, M. M. and Barr, L. (1964), A study of the structure and distribution of the nexus, *J. Cell Biol.*, **23**: 553–585.
- Diamond, J. S. (2017), Inhibitory interneurons in the retina: Types, circuitry, and function, *Ann. Rev. Vis. Sci.*, **3**: 1–24.
- 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.
- Donner, K. O. and Reuter, T. (1965), The dark-adaptation of single units in the frog's retina and its relation to the regeneration of rhodopsin, *Vision Res.*, **5**: 615–632.
- 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.
- Du Bois-Reymond, E. (1848), *Untersuchungen über Thierische Electricität, Erster Band*, Berlin: Georg Reimer.
- Du Bois-Reymond, E. (1877), *Gesammelte Abhandlungen zur Allgemeinen Muskel- und Nervenphysik*, Leipzig, Veit & Co.
- Eccles, J. C. (1982), The synapse: From electrical to chemical transmission, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**: 525–539.
- Ehinger, B. (1967), Adrenergic nerves in the avian eye and ciliary ganglion, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **82**: 577–588.
- Ehinger, B. and Falck, B. (1969), Adrenergic retinal neurons of some New World monkeys, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **100**: 364–375.
- Ehinger, B., Falck, B. and Laties, A. M. (1969), Adrenergic neurons in teleost retina, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **97**: 285–397.
- Ehinger, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. and Dowling, J. E. (1988), Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 8321–8325.
- Evans, W. H. and Martin, P. E. M. (2002), Gap junctions: structure and function (Review), *Mol. Membr. Biol.*, **19**: 121–136.
- Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A. and Shibata, Y. (1997), Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap Junction formation, *J. Cell Sci.*, **110**: 311–322.
- Furshpan, E. J. (1964), Electrical transmission at an excitatory synapse in a vertebrate brain, *Science*, **144**: 878–880.
- Furshpan, E. J. and Potter, D. D. (1959), Transmission at the giant motor synapses of the crayfish, *J. Physiol.*, **145**: 289–325.
- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S. A., Ripperger, J. and Schibler, U. (2004), The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology, *Chromosoma*, **113**: 103–112.
- Galarreta, M. and Hestrin, S. (1999), A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses, *Nature*, **402**: 72–75.
- Galarreta, M. and Hestrin, S. (2002), Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 12438–12443.
- Gemel, J., Valiunas, V., Brink, P. R. and Beyer, E. C. (2004), Connexin43 and connexin26 form gap junctions, but not heteromeric channels in co-expressing cells, *J. Cell Sci.*, **117**: 2469–2480.
- Goldstein, I. M., Ostwald, P. and Roth, S. (1996), Nitric oxide: A review of its role in retinal function and disease, *Vision Res.*, **18**: 2979–2994.
- Golgi, C. (1873), Sulla struttura della sostanza grigiadela cervello, *Gazetta Medica Lomberda*, **33**: 244–246.

- Gouras, P. (1960), Graded potentials of bream retina, *J. Physiol.*, **152**: 487–505.
- Greb, H., Hermann, S., Dirks, P., Ommen, G., Kretschmer, V., Schultz, K., Zoidl, G., Weiler, R. and Janssen-Bienhold, U. (2017), Complexity of gap junctions between horizontal cells of the carp retina, *Neuroscience*, **340**: 8–22.
- Grinnell, A. D. (1970), Electrical interaction between antidromically stimulated frog motoneurons and dorsal root afferents: enhancement by gallamine and TEA, *J. Physiol.*, **210**: 17–43.
- Grundfest, H. (1959), Synaptic and ephaptic transmission, In *Handbook of physiology Section 1: Neurophysiology, Volume 1* (Ed. J. Field), pp. 147–197, Waverly Press, Inc., Baltimore.
- Hamill, O. P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981), Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.*, **391**: 85–100.
- Han, Y. and Massey, S. C. (2005), Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: subtype-specific expression of connexins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**: 13313–13318.
- Hankins, M. W. (1995), Horizontal cell coupling and its regulation, In M. B. A. Djamgoz, S. N. Archer and S. Vallergera (Eds.), *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina*, pp. 195–220, London, Chapman & Hall.
- Hansen, K. A., Torborg, C. L., Elstrott, J. and Feller, M. B. (2005), Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina, *J. Comp. Neurol.*, **493**: 309–320.
- Harris, A. L. (2001), Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap, *Q. Rev. Biophys.*, **34**: 325–472.
- Hashimoto, Y., Kato, A., Inokuchi, M. and Watanabe, K. (1976), Re-examination of horizontal cells in the carp retina with procion yellow electrode, *Vision Res.*, **16**: 25–29.
- Hawryshyn, C. W. and Hárosi, F. I. (1990), Ultraviolet photoreception in carp: Microspectrophotometry and behaviorally determined action spectra, *Vision Res.*, **31**: 567–576.
- 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.
- 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.
- Hertzberg, E. L. and Gilula, N. B. (1979), Isolation and characterization of gap junctions from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **254**: 2138–2147.
- 日高 聰 (2006), 同期興奮を引き起こす網膜神経節細胞間の電気シナプスの構造機能解析, *顕微鏡*, **41**: 117–119.
- Hidaka, S., Akahori, Y. and Kurosawa, Y. (2004), Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells, *J. Neurosci.*, **24**: 10553–10567.
- Hidaka, S., Christensen, B. N. and Naka, K.-I. (1986), The synaptic ultrastructure in the outer plexiform layer of the catfish retina: a three-dimensional study with HVEM and conventional EM of Golgi-impregnated bipolar and horizontal cells, *J. Comp. Neurol.*, **247**: 181–199.
- Hidaka, S., Kato, T. and Miyachi, E. (2002), Expression of gap junction connexin36 in adult rat retinal ganglion cells, *J. Integr. Neurosci.*, **1**: 3–22.
- Hilgen, G., von Maltzahn, J., Willecke, K., Weiler, R. and Dedek, K. (2011), Subcellular distribution of connexin45 in OFF bipolar cells of the mouse retina, *J. Comp. Neurol.*, **519**: 433–450.
- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca²⁺ channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Huang, H., Li, H. and He, S. G. (2005), Identification of connexin 50 and 57 mRNA in A type horizontal cells of the rabbit retina, *Cell. Res.*, **15**: 207–211.
- Janssen-Bienhold, U., Dermietzel, R. and Weiler, R. (1998), Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates, *J. Comp. Neurol.*, **396**: 310–321.
- Janssen-Bienhold, U., Trümpler, J., Hilgen, G., Schultz, K., Müller, L. P., Sonntag, S., Dedek, K., Dirks, P., Willecke, K. and Weiler, R. (2009), Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap

- junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light, *J. Comp. Neurol.*, **513**: 363–374.
- Johansson, K., Bruun, A. and Ehinger, B. (1999), Gap junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina, *J. Comp. Neurol.*, **407**: 395–403.
- Kamermans, M. and Spekreijse, H. (1999), The feedback pathway from horizontal cells to cones: A mini review with a look ahead, *Vision Res.*, **39**: 2449–2468.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Blenhold, U., Sjoerdsma, T. and Weiler, R. (2001), Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina, *Science*, **292**: 1178–1180.
- Kawamura, S. and Tachibanaki, S. (2012), Explaining the functional differences of rods vs cones, *WIREs Membr. Transp. Signal.*, **1**: 675–683.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol.*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol.*, **235**: 133–153.
- Kaneko, A. (1983), Retina bipolar cells: their function and morphology, *Trends Neurosci.*, **6**: 219–223.
- Kaneko, A. and Stuart, A. E. (1980), Coupling between horizontal cells in the carp retina examined by diffusion of lucifer yellow, *Biol. Bull.*, **159**: 486.
- Kaneko, A. and Stuart, A. E. (1984), Coupling between horizontal cells in the carp retina revealed by diffusion of Lucifer yellow, *Neurosci. Lett.*, **47**: 1–7.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1981), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Kaneko, A. and Yamada, M. (1972), S-potentials in the dark-adapted retina of the carp, *J. Physiol.*, **227**: 261–273.
- Kerr, N. M., Johnson, C. S., de Souza, C. F., Chee, K. S., Good, W. R., Green, C. R. and DaneshMeyer, H. V. (2010), Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**: 4028–4034.
- Kihara, A. H., de Castro, L. M., Moriscot, A. S. and Hamassaki, D. E. (2006a), Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina, *J. Neurosci. Res.*, **83**: 1331–1341.
- Kihara, A. H., Mantovani de Castro, L., Belmonte, M. A., Yan, C. Y., Moriscot, A. S. and Hamassaki, D. E. (2006b), Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina, *J. Neurobiol.*, **66**: 1397–1410.
- Kihara, A. H., Paschon, V., Akamine, P. S., Saito, K. C., Leonelli, M., Jiang, J. X., Hamassaki, D. E. and Britto, L. R. (2008), Differential expression of connexins during histogenesis of the chick retina, *Dev. Neurobiol.*, **68**: 1287–1302.
- Kihara, A. H., Paschon, V., Cardoso, C. M., Higa, G. S., Castro, L. M., Hamassaki, D. E. and Britto, L. R. (2009), Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in the essentially rodless retina of *Gallus gallus*, *J. Comp. Neurol.*, **512**: 651–663.
- Kolb, H. (1977), The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations, *J. Neurocytol.*, **6**: 131–153.
- Kolb, H. (2013), Neurotransmitters in the retina, In H. Kolb, R. Nelson, E. Fernandez, B. Jones (eds.), *Web-vision: The organization of the retina and visual system* (<http://webvision.med.utah.edu/>).
- Kolb, H. and Jones, J. L. (1984), Synaptic organization of the outer plexiform layer of the turtle retina: an electron microscope study of serial sections, *J. Neurocytol.*, **13**: 567–591.
- Kolb, H. and West, R. W. (1977), Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat, *J. Neurocytol.*, **6**: 155–170.
- Kouyama, N. and Watanabe, K. (1986), Gap-junctional contacts of luminosity-type horizontal cells in the carp retina: A novel pathway of signal conduction from the cell body to the axon terminal, *J. Comp. Neurol.*, **249**: 404–410.
- Kuffler, S. W. (1953), Discharge patterns and functional organization of mammalian retina, *J. Neurophysiol.*, **16**: 37–68.

- Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1986), Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein, *J. Cell Biol.*, **103**: 767–776.
- Kumar, N. M. and Gilula, N. B. (1996), The gap junction review communication channel, *Cell*, **84**: 381–388.
- Kuraoka, A., Iida, H., Hatae, T., Shibata, Y., Itoh, M. and Kurita, T. (1993), Localization of gap junction proteins, connexins 32 and 26, in rat and guinea pig liver as revealed by quick-freeze, deep-etch immunoelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **41**: 971–980.
- 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.
- Lee, E. J., Han, J. W., Kim, H. J., Kim, I. B., Lee, M. Y., Oh, S. J., Chung, J. W. and Chun, M. H. (2003), The immunocytochemical localization of connexin 36 at rod and cone gap junctions in the guinea pig retina, *Eur. J. Neurosci.*, **18**: 2925–2934.
- Lentz, T. L. and Trinkaus, J. P. (1971), Differentiation of the junctional complex of surface cells in the developing *Fundulus* blastoderm, *J. Cell Biol.*, **48**: 455–472.
- Levavi-Sivan, B., Bloch, C. L., Gutnick, M. J. and Fleiderer, A. (2005), Electrotonic Coupling in the Anterior Pituitary of a Teleost Fish, *Endocrinol.*, **146**: 1048–1052.
- Liepe, B. A., Stone, C., Koistinaho, J. and Copenhagen, D. R. (1994), Nitric oxide synthase in Müller cells and neurons of salamander and fish retina, *J. Neurosci.*, **14**: 7641–7654.
- Lin, J. W. and Faber, D. S. (1988), Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials, *J. Neurosci.*, **8**: 1302–1312.
- Lin, B., Jakobs, T. C. and Masland, R. H. (2005), Different functional types of bipolar cells use different gap-junctional proteins, *J. Neurosci.*, **25**: 6696–6701.
- Liu, C. R., Xu, L., Zhong, Y. M., Li, R. X. and Yang, X. L. (2009), Expression of connexin 35/36 in retinal horizontal and bipolar cells of carp, *Neuroscience*, **164**: 1161–1169.
- Llinas, R., Baker, R. and Sotelo, C. (1974), Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive, *J. Neurophysiol.*, **37**: 560–571.
- Loewenstein, W. R. and Kanno, Y. (1964), Studies on an epithelial (gland) cell junction I. Modifications of surface membrane permeability, *J. Cell Biol.*, **22**: 565–586.
- Loewi, O. (1921), Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, *Pflügera Arch. Gesamte Physiol.*, **189**: 239–242.
- Lu, C. and McMahon, D. G. (1997), Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide, *J. Physiol.*, **499**: 689–699.
- MacNochol, E. F. Jr. and Svartichin, G. (1958), Electric responses from the isolated retinas of fishes, *Am. J. Ophthalmol.*, **46**: 26–40.
- MacVicar, B. A. and Dudek, F. E. (1981), Electrotonic coupling between pyramidal cells: a direct demonstration in rat hippocampal slices, *Science*, **213**: 782–785.
- Maeda, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. and Tsukihara, T. (2009), Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution, *Nature*, **458**: 597–602.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1985), Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine, *Science*, **229**: 1107–1109.
- Mangel, S. C. and Dowling, J. E. (1987), The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: Effects of dopamine, light stimulation and time in the dark, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **23**: 91–12.
- Manjunath, D. K., Goings, G. E. and Page, E. (1985), Proteolysis of cardiac gap junctions during their isolation from rat hearts, *J. Membr. Biol.*, **85**: 159–168.
- Marc, R. E. and Liu, W. S. L. (1984), Horizontal cell synapses onto glycine-accumulating interplexiform cells, *Nature*, **311**: 266–269.
- Marc, R. E., Liu, W.-L. S., Kalloniatis, M., Raiguel, S. F. and Van Haesendonck, E. (1990), Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **10**: 4006–4034.
- Masland, R. H. and Ames, A. (1976), Responses to acetylcholine of ganglion cells in an isolated mammalian retina, *J. Neurophysiol.*, **39**: 1220–1235.

- Matsui, K., Hosoi, N. and Tachibana, M. (1998), Excitatory synaptic transmission in the inner retina: Paired recordings of bipolar cells and neurons of the ganglion cell layer, *J. Neurosci.*, **18**: 4500–4510.
- Matsumoto, N. and Naka, K.-I. (1972), Identification of intracellular responses in the frog retina, *Brain Res.*, **42**: 59–71.
- McGeer, P. L., Eccles, J. C. and McGeer, E. G. (1978), Chemical synaptic transmission at peripheral synapses, In *Molecular neurobiology of the mammalian brain*, pp. 67–100, Plenum press, New York.
- McMahon, D. G. and Brown, D. R. (1994), Modulation of gap-junction channel gating at zebrafish retinal electrical synapses, *J. Neurophysiol.*, **72**: 2257–2268.
- McMahon, D. G. and Ponomareva, L. V. (1996), Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors, *J. Neurophysiol.*, **76**: 2307–2315.
- McMahon, D. G., Knapp, A. G. and Dowling, J. E. (1989), Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**: 7639–7643.
- Minsky, M. (1961), “Microscopy apparatus”, US Patent #3,013,467.
- Mitarai, G., Asano, T. and Miyake, Y. (1974), Identification of five types of S-potential and their corresponding generating sites in the horizontal cells of the carp retina, *Jap. J. Ophthalmol.*, **18**: 161–176.
- Müller, D. J., Hand, G. M., Engel, A. and Sosinsky, G. E. (2002), Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions, *EMBO J.*, **21**: 3598–3607.
- Müller, L. P., Dedek, K., Janssen-Bienhold, U., Meyer, A., Kreuzberg, M. M., Lorenz, S., Willecke, K. and Weiler, R. (2010), Expression and modulation of connexin 30.2, a novel gap junction protein in the mouse retina, *Vis. Neurosci.*, **27**: 91–101.
- 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., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, *Prog. Retin. Eye Res.*, **14**: 197–221.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Naafs, M. A. B. (2017), Second messengers in endocrinology: A mini-review of the cyclic nucleotides, *Endocrinol. Metab. Int. J.*, **5**: 00144 (pp. 1–4).
- Nagy, J. I., Pereda, A. E. and Rash, J. E. (2018), Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**: 102–123.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells, *J. Physiol.*, **223**: 449–460.
- Negishi, K. and Drujan, B. (1979), Reciprocal changes in center and surrounding S potentials of fish retina in response to dopamine, *Neurochem. Res.*, **4**: 313–318.
- Negishi, K., Teranishi, T. and Kato, S. (1985), Opposite effects of ammonia and carbon dioxide on dye coupling between horizontal cells in the carp retina, *Brain Res.*, **342**: 330–339.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976), Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers, *Nature*, **260**: 799–802.
- Nicholson, B. J., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K. and Revel, J. P. (1987), Two homologous protein components of hepatic gap junctions, *Nature*, **329**: 732–734.
- Norton, A. L., Spekreijse, H., Wolfbarsht, M. L. and Wagner, H. G. (1968), Receptive field organization of the S-potential, *Science*, **160**: 1021–1022.
- 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., Nguyen, H. B. and Mills, S. L. (2004), Cone photoreceptors in bass retina use two connexins to mediate electrical coupling, *J. Neurosci.*, **24**: 5632–5642.
- O’Brien, J. J., Li, W., Pan, F., Keung, J., O’Brien, J. and Massey, S. C. (2006), Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina, *J. Neurosci.*, **26**: 11624–

- 11636.
- O'Brien, J. J., Chen, X., Macleish, P. R., O'Brien, J. and Massey, S. C. (2012), Photoreceptor coupling mediated by connexin36 in the primate retina, *J. Neurosci.*, **32**: 4675–4687.
- Oh, S., Rubin, J. B., Bennett, M. V., Verselis, V. K. and Bargiello, T. A. (1999), Molecular determinants of electrical rectification of single channel conductance in gap junctions formed by connexins 26 and 32, *J. Gen. Physiol.*, **114**: 339–364.
- Okamura, H. (2007), Suprachiasmatic nucleus clock time in the mammalian circadian system, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**: 551–556.
- Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. and Gina E. Sosinsky, G. E. (2007), Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**: 1034–1039.
- Oshima, A., Tani, K., Toloue, M. M., Hiroaki, Y., Smock, A., Inukai, S., Cone, A., Nicholson, B. J., Sosinsky, G. E. and Fujiyoshi, Y. (2011), Asymmetric configurations and N-terminal rearrangements in connexin26 gap junction channels, *J. Mol. Biol.*, **405**: 724–735.
- Palacios-Prado, N., Sonntag, S., Skeberdis, V. A., Willecke, K. and Bukauskas, F. F. (2009), Gating, permselectivity and pH-dependent modulation of channels formed by connexin57, a major connexin of horizontal cells in the mouse retina, *J. Physiol.*, **587**: 3251–3269.
- Palade, G. E. and Palay, S. L. (1954), Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anat. Rec.*, **118**: 335–336.
- Pan, F., Paul, D. L., Bloomfield, S. A. and Völgyi, B. (2010), Connexin36 is required for gap junctional coupling of most ganglion cell subtypes in the mouse retina, *J. Comp. Neurol.*, **518**: 911–927.
- Panchin, Y. V. (2005), Evolution of gap junction proteins: the pannexin alternative, *J. Exp. Biol.*, **208**: 1415–1419.
- Pereda, A., O'Brien, J., Nagy, J. I., Bukauskas, F., Davidson, K. G., Kamasawa, N., Yasumura, T. and Rash, J. E. (2003), Connexin35 mediates electrical transmission at mixed synapses on Mauthner cells, *J. Neurosci.*, **23**: 7489–7503.
- Paul, D. L. (1986), Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein, *J. Cell Biol.*, **103**: 123–134.
- Paul, D. L., Ebihara, L., Takemoto, L. J., Swenson, K. L. and Goodenough, D. A. (1991), Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes, *J. Cell Biol.*, **115**: 1077–1089.
- Penn, A. A., Wong, R. O. and Shatz, C. J. (1994), Neuronal coupling in the developing mammalian retina, *J. Neurosci.*, **14**: 3805–3815.
- Peracchia, C. (2004), Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1662**: 61–80.
- 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.
- Pottek, M., Schultz, K. and Weiler, R. (1997), Effects of nitric oxide on the horizontal cell network and dopamine release in the carp retina, *Vision Res.*, **37**: 1091–1102.
- Pottek, M., Hoppenstedt, W., Janssen-Bienhold, U., Schultz, K., Perlman, I. and Weiler, R. (2003), Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina, *J. Comp. Neurol.*, **466**: 468–477.
- Raviola, E. and Gilula, N. B. (1975), Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina: A freeze-fracture study in monkeys and rabbits, *J. Cell Biol.*, **65**: 192–222.
- Revel, J. P. and Karnovsky, M. J. (1967), Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver, *J. Cell Biol.*, **33**: C7–C12.
- Revilla, A., Castro, C. and Barrio, L. C. (1999), Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin-32 and connexin-43 junctions, *Biophys. J.*, **77**: 1374–1383.
- Ri, Y., Ballesteros, J. A., Abrams, C. K., Oh, S., Verselis, V. K., Weinstein, H. and Bargiello, T. A. (1999), The role of a conserved proline residue in mediating conformational changes associated with voltage gating of Cx32 gap junctions, *Biophys. J.*, **76**: 2887–2898.

- Robertson, J. D., Bodenheimer, T. S. and Stage, D. E. (1963), The ultrastructure of Mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains, *J. Cell Biol.*, **19**: 159–199.
- Sakai, H. and Naka, K.-I. (1986), Synaptic organization of the cone horizontal cells in the catfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **245**: 107–115.
- Schubert, T., Degen, J., Willecke, K., Hormuzdi, S. G., Monyer, H. and Weiler, R. (2005a), Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina, *J. Comp. Neurol.*, **485**: 191–201.
- Schubert, T., Maxeiner, S., Krüger, O., Willecke, K. and Weiler, R. (2005b), Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina, *J. Comp. Neurol.*, **490**: 29–39.
- Schwartz, E. A. (1974), Response of bipolar cells in the retina of the turtle, *J. Physiol.*, **236**: 211–224.
- Sherrington, C. S. (1897), The central nervous system, In M. Foster (Ed.), *A textbook of Physiology Part III*, New York, Macmillan & Co.
- Shibata, Y. and Yamamoto, T. (1977), Gap junctions in the cardiac muscle cells of the lamprey, *Cell Tiss. Res.*, **178**: 477–482.
- Shields, C. R., Klooster, J., Claassen, Y., Ul-Hussain, M., Zoidl, G., Dermietzel, R. and Kamermans, M. (2007), Retinal horizontal cell-specific promoter activity and protein expression of zebrafish connexin 52.6 and connexin 55.5, *J. Comp. Neurol.*, **501**: 765–779.
- Shigematsu, Y. and Yamada, M. (1988), Effects of dopamine on spatial properties of horizontal cell responses, *Neurosci. Res.*, **Suppl.8**: 69–80.
- Slaughter, M. M. and Miller, R. F. (1983), Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter, *Nature*, **303**: 537–538.
- Snyder, S. M. (2009), Neurotransmitters, receptors, and second messengers galorein 40 years, *J. Neurosci.*, **29**: 12717–12721.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2004), Gap junctions and the connexin protein family, *Cardiovasc. Res.*, **62**: 228–232.
- Söhl, G., Jousen, A., Kociok, N. and Willecke, K. (2010), Expression of connexin genes in the human retina, *BMC Ophthalmol.*, **10**: 27.
- Srinivas, M., Costa, M., Gao, Y., Fort, A., Fishman, G. I. and Spray, D. C. (1999), Voltage dependence of macroscopic and unitary currents of gap junction channels formed by mouse connexin50 expressed in rat neuroblastoma cells, *J. Physiol.*, **517**: 673–689.
- Srinivasan, M. V., Laughlin, S. B. and Dubs, A. (1982), Predictive coding: a fresh view of inhibition in the retina, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **216**: 427–459.
- Spray, D. C., Harris, A. L. and Bennett, M. V. (1981), Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH, *Science*, **211**: 712–715.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G. and Leeper, H. F. (1975), Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- Tachibanaki, S., Yonetsu, S., Fukaya, S., Koshitani, Y. and Kawamura, S. (2012), Low activation and fast inactivation of transducin in carp cones, *J. Biol. Chem.*, **287**: 41186–41194.
- 高橋恭一 (2018), 脊椎動物網膜水平細胞の形態学的・生理学的特徴, *人間環境学研究*, **16**: 1–40.
- 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. (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1983), Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina, *Nature*, **301**: 243–246.
- Teubner, B., Degen, J., Söhl, G., Güldenagel, M., Bukauskas, F. F., Trexler, E. B., Verselis, V. K., De Zeeuw, C. I., Lee, C. G., Kozak, C. A., Petrasch-Parwez, E., Dermietzel, R. and Willecke, K. (2000), Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein, *J. Membr. Biol.*, **176**: 249–262.

- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- Tomita, T., Kaneko, T., Murakami, M. and Pautler, E. L. (1967), Spectral response curves of single cones in the carp, *Vision Res.*, **2**: 519–531.
- Tomita, T., Murakami, M., Sato, Y. and Hashimoto, Y. (1959), Further study on the origin of the so-called cone action potential (s-potential). Its histological determination, *Jpn. J. Physiol.*, **9**: 63–69.
- Tomita, T., Tosaka, T., Watanabe, K. and Sato, Y. (1958), The fish in ERG response to different types of illumination, *Jpn. J. Physiol.*, **8**: 41–50.
- Tornqvist, 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.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400.
- Tsukamoto, Y., Yamada, M. and Kaneko, A. (1987), Morphological and physiological studies of rod-driven horizontal cells with special reference to the question of whether they have axons and axon terminals, *J. Comp. Neurol.*, **255**: 305–316.
- Turin, L. and Warner, A. (1977), Carbon dioxide reversibly abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryo, *Nature*, **270**: 56–57.
- Turin, L. and Warner, A. (1980), Intracellular pH in early *Xenopus* embryos: its effect on current flow between blastomeres, *J. Physiol.*, **300**: 489–504.
- 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, P. N. T. and Ennis, P. D. (1984), Two configurations of a channel forming membrane protein, *Nature*, **307**: 609–613.
- 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. (1991), Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin, *Neurosci. Lett.*, **125**: 187–190.
- Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beyer, E. C., Ramanan, S. V. and Brink, P. R. (1994a), Connexin37 forms high conductance gap junction channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities, *Biophys. J.*, **66**: 1915–1928.
- Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beyer, E. C. and Brink, P. R. (1994b), Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45, *Circ. Res.*, **75**: 483–490.
- Verselis, V. K., Ginter, C. S. and Bargiello, T. A. (1994), Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins, *Nature*, **368**: 348–351.
- Völgyi, B., Kovács-Oller, T., Atlasz, T., Wilhelm, M. and Gábríel, R. (2013), Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme?, *Prog. Retin. Eye Res.*, **34**: 1–18.
- Wagner, H. G., MacNichol, E. F. Jr. and Wolbarsht, M. L. (1960), The response properties of single ganglion cells in the goldfish retina, *J. Gen. Physiol.*, **43**: 45–62.
- Waldeyer-Hartz, H. W. G. (1891), Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems, Leipzig, Verlag von Georg Thieme.
- Watanabe, A. and Grundfest, H. (1961), Impulses propagation at the septal and commissural junctions of crayfish lateral giant axons, *J. Gen. Physiol.*, **45**: 267–308.
- Weiler, R. (1978), Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnation and procion-yellow injection, *Cell Tiss. Res.*, **195**: 515–526.
- 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.
- Weiler, R. and Kewitz, B. (1993), The marker for nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, co-localizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina, *Neurosci. Lett.*, **158**: 151–154.
- Weiler, R., He, S. and Vaney, D. I. (1999), Retinoic acid modulates gap junctional permeability between

- horizontal cells of the mammalian retina, *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 3346–3350.
- Weiler, R., Pottek, M., Schultz, K. and Janssen-Bienhold, U. (2001), Retinoic acid, a neuromodulator in the retina, *Prog. Brain Res.*, **131**: 309–318.
- Weiler, R., Schultz, K., Pottek, M., Tieding, S. and Janssen-Bienhold, U. (1998), Retinoic acid has light-adaptive effects on horizontal cells in the retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 7139–7144.
- Wiersma, C. A. G. (1947), Giant nerve fiber systems of crayfish: A contribution to comparative physiology of synapse, *J. Neurophysiol.*, **10**: 23–38.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Witkovsky, P. (2004), Dopamine and retinal function, *Doc. Ophthalmol.*, **108**: 17–40.
- Witkovsky, P., Owen, W. G. and Woodworth, M. (1983), Gap junctions among the perikarya, dendrites, and axon terminals of the luminosity-type horizontal cell of the turtle retina, *J. Comp. Neurol.*, **216**: 359–368.
- Witkovsky, P., Gabriel, R., Krizaj, D. and Akopian, A. (1995), Feedback from luminosity horizontal cells mediates depolarizing responses of chromaticity horizontal cells in the *Xenopus* retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**: 3556–3560.
- Wu, S. M. and Maple, B. R. (1998), Amino acid neurotransmitters in the retina: a functional overview, *Vision Res.*, **38**: 1371–1384.
- Xin, D. and Bloomfield, S. A. (2000), Effects of nitric oxide on horizontal cells in the rabbit retina, *Vis. Neurosci.*, **17**: 799–811.
- Yagi, T. (1988), Interaction between the soma and the axon terminal of retinal horizontal cells in *Cyprinus carpio*, *J. Physiol.*, **375**: 121–135.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000), Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats, *Science*, **288**: 682–685.
- 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.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, K. H., Buhr, E. D., Siepenka, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. and Takahashi, J. S. (2004), PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**: 5339–5346.
- Zahs, K. R. and Ceelen, P. W. (2006), Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia, *Vis. Neurosci.*, **23**: 1–10.
- Zahs, K. R., Kofuji, P., Meier, C. and Dermietzel, R. (2003), Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **455**: 531–546.
- Zhang, D.-Q. and McMahon, D. G. (2000), Direct gating by retinoic acid of retinal electrical synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**: 14754–14759.
- Zhang, J. and Wu, S. M. (2004), Connexin35/36 gap junction proteins are expressed in photoreceptors of the tiger salamander retina, *J. Comp. Neurol.*, **470**: 1–12.
- Zoidl, G., Bruzzone, R., Weickert, S., Kremer, M., Zoidl, C., Mitropoulou, G., Srinivas, M., Spray, D. C. and Dermietzel, R. (2004), Molecular cloning and functional expression of zCx52.6: a novel connexin with hemichannel-forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina, *J. Biol. Chem.*, **279**: 2913–2921.
- Zou, J., Salarián, M., Chen, Y., Veenstra, R., Louis, C. F. and Yang, J. J. (2014), Gap junction regulation by calmodulin, *FEBS Lett.*, **588**: 1430–1438.

Zucker, C. L. and Dowling, J. E. (1987), Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina, *Nature*, **330**: 166–168.

【注】

- 1) 神経伝達物質やホルモンはそれぞれのレセプターと結合し、細胞活動に影響する（例えば、Snyder, 2009; Naaf, 2017）。シナプス前神経細胞の軸索終末から放出された神経伝達物質がシナプス後神経細胞の樹状突起（あるいは細胞体）に発現するシナプスレセプターに結合すると、このレセプターと連動するイオンチャネルの開閉が生じ、膜電位変化が現れる。ところが、シナプスレセプターへの神経伝達物質の結合に伴い細胞内に存在する低分子化合物が活性化し、この後複数の化学変化を経て最終的にイオンチャネルの開閉に結びつくしくみが明らかとなっている（例えば、Snyder, 2009）。この低分子化合物のことをセカンドメッセンジャーという。そして、神経伝達物質やホルモンのように細胞外で情報を運ぶ伝達物質をファーストメッセンジャーという。セカンドメッセンジャーとして、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロール（Diacylglycerol; DG）、イノシトール三リン酸（Inositol trisphosphate; IP₃）、Ca²⁺ や一酸化窒素（Nitric oxide; NO）などが知られている。
- 2) 19世紀後半、Golgi (1873) は鍍銀法を開発し、神経細胞の形態を詳細にスケッチすることに成功した。Golgi は神経細胞同士が樹状突起を介して融合し、神経組織は網状構造を形成するという説（網状説）を提唱した。一方、Cajal は Golgi の開発した鍍銀法を用い、神経組織の研究を始め、やがて神経細胞同士は接触しているだけで融合していないとする説（ニューロン説）を提唱した。Waldeyer-Hartz (1891) は神経組織を構成する単位にニューロンという名称を与えた。その後、ニューロン説を支持する Sherrington (1897) はニューロンとニューロンのつなぎ目のことをシナプスと命名した。網状説とニューロン説は長期間真っ向から対立したが、Loewi (1921) の研究以降、次第にニューロン説が優勢となっていった。しかし、光学顕微鏡観察ではシナプスに間隙があるのか否かを明らかにすることはできず、後年電子顕微鏡の開発によってシナプス間隙が証明され、漸くニューロン説に真の軍配が上がった。ガラス管微小電極を用いた研究の開始により、シナプス伝達に神経伝達物質が介在することが示され、神経細胞同士が化学的に繋がっていることが明らかとなった。一方で、無脊椎動物の神経系で化学的伝達では説明ができない現象が見つかり、シナプスには電気的伝達（電気シナプス）も存在することが示された。脊椎動物でも電気的なシナプスが見つかり、シナプス研究は化学的および電気的伝達の両面で行われるようになった。
- 3) 光学顕微鏡の分解能（2点を識別できる最小距離あるいは解像度の限界）は、照射する入射光が試料に当たり散乱する光を対物レンズで収斂させ画像化する。識別できる最小距離（ d ）は、 $d = 0.61 \times \frac{\lambda}{NA}$ で表される。 λ は使用する光の波長、 NA は対物レンズの開口数を指す。 $NA = n \cdot \sin\theta$ （ n は物体が存在する空間側媒質の屈折率、 θ は物体から反射して対物レンズに入る光の中で最も外側の光が軸となす角度）であるため、 $d = 0.61 \times \frac{\lambda}{n \sin\theta}$ となる。一般的に、使用する入射光の波長は 400~700 nm 所以对物レンズの開口数は約 1~1.6 であるため、光学顕微鏡の分解能は約 200 nm が限界となる。一方、電子顕微鏡は、光の代わりに電子線を、ガラス製の対物レンズの代わりに、磁界型の電子レンズを用いる。電子線の波長は、光の10万分の1以下（例えば 100 KV では $\lambda = 0.0037$ nm）である。電子顕微鏡に用いられる電子レンズは球面収差を取り除くことが不可能であり、光学顕微鏡で用いた $d = 0.61 \times \frac{\lambda}{NA}$ を使用することができない。電子顕微鏡の識別できる最小距離（ d ）は、 $d = 0.65 \times Cs^{\frac{1}{4}} \times \lambda^{\frac{3}{4}}$ で表される。 Cs は球面収差係数を指す。電子顕微鏡で高分解能の画像を得るには、電子線の波長を短くする必要がある。現在、1000 KV の超高圧電子顕微鏡の分解能が最も良く、その値は約 0.1 nm である。
- 4) 透過電子顕微鏡の試料作製方法の1つである。生体試料を液体ヘリウムで凍結固定後、真空中で試料表面をナイフで切断し、この切断面あるいは試料中の水を昇華させて白金を蒸着させる。白金蒸着面に炭素の薄膜を形成し、試料を除去する。白金と炭素からなる試料表面のレプリカを透過型電子顕微鏡で観察する。細胞膜（脂質二重膜）を凍結切断するとき疎水性面に沿って割れることがあり、細胞質側の切断面を外側から見た面を P 面そして細胞外に接した切断面を細胞質側から見た面を E 面と呼ぶ。さらに、凍結切断レプリカ法では、切断面以外に細胞質に接した膜の表面と細胞外液に接した膜の表面が露出されるが、それらをそれぞれ PS 面と ES 面と呼ぶ。2 nm を越える分解能が得られ、例えば細胞膜内におけるタンパク質粒子の高コントラスト像（三次元構造）を観察することができる。凍結切断レプリ

手法を利用したギャップ結合の電子顕微鏡観察では、P面に約9 nmの粒子とE面に小さな窪みが観察される。

- 5) ギャップ結合チャンネルの開閉モデルとして、Unwin & Ennis (1984) はチャンネルを構成するサブユニットを変化させることによって閉塞するというサブユニットローテーションモデルを提唱している。しかし、Harris (2001) は Ca^{2+} 、pH、膜電位や化学物質などによるギャップ結合チャンネルの開閉を説明するために、このモデルは充分でないことを明らかにした。近年、Cx26で構成されるギャップ結合チャンネルの電子線結晶構造解析が行われ、チャンネルの膜貫通部分にプラグのような電子密度の高い部分が存在することから、新たな開閉モデルとしてプラグゲーティングモデルが提唱された (Oshima *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2009; Oshima *et al.*, 2011)。このモデルではギャップ結合チャンネルの物質透過領域にあるN末端領域が膜電位センサーのみならずプラグ形成に重要であることが示唆されている。コネキシンには異なるサブタイプが知られており、それぞれのコネキシンの集合体としてのギャップ結合チャンネルの開閉制御とプラグゲーティングモデルとの関連についてはさらなる解析が必要である。
- 6) 原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy [AFM]) は、試料表面を微小プローブで往復スキャンし、試料表面の形状を計測し高分解能のイメージングを得ることができる顕微鏡の一種である。微小プローブを正確に制御することによって、原子サイズまで分解能を高めることができる。
- 7) 試料作製に凍結切断レプリカ法を適用すると、細胞膜が疎水性面に沿って切断され、脂質二重膜の疎水性面が露出されることがある。この疎水性面に白金と炭素を蒸着させてレプリカ作製後、界面活性剤である Sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いて洗浄すれば、細胞膜のタンパク質はレプリカに付着したままとなる。このタンパク質を免疫抗体で標識し、染色の有無を電子顕微鏡観察すれば、タンパク質の正体を明らかにすることができる。
- 8) 2つの神経細胞がギャップ結合を介して電気シナプスを形成しているとき、両細胞間の結合の強さ測定するために、両細胞 (N1 と N2) にガラス管微小電極を刺入し、一方の細胞 (N1) に通電刺激を与え、両細胞 (N1 と N2) に生じる膜電位変化を測定・比較する方法が用いられる。通常、N1への通電刺激に伴い N1に惹起される膜電位変化 (ΔV_1) と N2に惹起される膜電位変化 (ΔV_2) を測定し、 $\frac{\Delta V_2}{\Delta V_1}$ を結合係数 (Coupling coefficient) としてギャップ結合の強さの指標にしている。第3図には2つの神経細胞ならびにギャップ結合の電気的特性を図式化した。それぞれの神経細胞の細胞膜は、膜容量 (C_{m1} と C_{m2}) と膜コンダクタンス (G_{m1} と G_{m2}) で構成されている。また、2つの神経細胞はギャップ結合コンダクタンス (G_g) によって繋がっている。N1への電流注入 (Current injection) に伴い N1 と N2 に発生する膜電位変化から求められる結合係数は、 $\frac{\Delta V_2}{\Delta V_1} = \frac{G_g}{G_g + G_{m2}}$ 、そして N2 への電流注入 (Current injection) に伴い N2 と N1 に発生する膜電位変化から求められる結合係数は、 $\frac{\Delta V_1}{\Delta V_2} = \frac{G_g}{G_g + G_{m1}}$ となる。両細胞への通電実験によって得られる結合係数は、両細胞が同種のときは概ね一致するが、両細胞が異なるとき大きな差異が生じることがある (両細胞の膜コンダクタンスが異なれば、結合係数も異なる)。さらに、細胞膜には膜容量があり、これに電荷が蓄積するために時間を要し、結果としてギャップ結合はローパスフィルターとして働く。このフィルターの特性を調べるため、N1の細胞に様々な周波数の正弦波状電流注入を行い、N2に生じる膜電位変化を測定し、各周波数に対する膜電位変化の相対値をプロットする方法が用いられる。ローパスフィルターが機能するとき、例えば N1 に時間経過の速い活動電位が発生しても、N2 にはこの速い変化は十分に伝播されない。勿論、緩徐な膜電位変化の場合、活動電位ほどの顕著な減衰は生じない。
- 9) 細胞膜に通電刺激を与えたときに現れる膜電位変化は、コンデンサーと抵抗が並列に並ぶ等価回路で近似することができる。この抵抗成分が膜抵抗、そしてコンデンサー成分が膜容量である。膜抵抗と膜容量は神経や筋での時定数や長さ定数に関係し、その細胞の応答特性に影響する。実際に測定される膜抵抗は小さな細胞ほど大きく、またその膜面積に反比例する。細胞膜は主にリン脂質の二重膜構造を呈し、これを貫通して膜タンパクが存在する。膜タンパクの一つであるイオンチャンネルは種々のイオンに対する選択的透過性を実現しており、その種類と密度が膜抵抗を決めると考えられる。多くのイオンチャンネルは電位依存性を示すため、膜抵抗は膜電位によって異なる。例えば、活動電位発生の際、膜抵抗は著しく減少する。また化学シナプスにおいて、シナプスレセプターに連動するイオンチャンネルの活性化によってシナプス電位が発生する際も、膜抵抗の減少がみられる。また、単位面積当たりの細胞膜の容量はほぼ一定で約 $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ である。
- 10) 直流回路において、抵抗の逆数をコンダクタンスという。コンダクタンスが上昇することは、電流が流れやすくなることを意味する。例えば、神経細胞の興奮に伴い細胞膜上に配置されたナトリウムナ

ルが一斉に開口したとき、細胞膜の Na^+ に対するコンダクタンスが上昇すると表現する。一方、神経細胞が非興奮状態（非活動状態）では、細胞膜にあるカリウムコンダクタンスが上昇している。ギャップ結合コンダクタンスはギャップ結合を介する 2 細胞間の電流の流れやすさの目安である。

- 11) Minsky (1953) によって共焦点顕微鏡の原理が開発され、1980年代光源としてレーザー光が一般化し、共焦点レーザー顕微鏡として普及した。光を試料の全面に照射する一般的な光学顕微鏡と異なり、共焦点レーザー顕微鏡ではレーザー光を厚みのある試料の特定の狭い範囲に照射して焦点を合わせて像を検出する。このため、生きた標本の観察も可能である。また、試料の様々な箇所の画像をパソコン上で再構築し、立体画像を作ることも可能である。
- 12) SDS はタンパク質変性作用が強い界面活性剤であり、タンパク質の主ペプチド鎖部分に一定の割合で結合する性質がある。このため、SDS の存在下でタンパク質は直鎖状に近い構造を取る。SDS を作用させたタンパク質試料を Poly acrylamide gel electrophoresis (PAGE) (ポリアクリルアミドゲル電気泳動ともいう。)にて分析すると、ペプチド鎖長に応じてタンパク質を分離することができる。この方法で、対象とするタンパク質も分子量を測定することができる。
- 13) 細胞内から目的とするタンパク質を作る mRNA を探し出し、逆転写酵素を利用して DNA を合成する。この DNA を complementary DNA (cDNA) と呼ぶ。この cDNA には、遺伝子の上で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含まれているため、タンパク質を構成するアミノ酸配列の一次構造を解明するために利用される。
- 14) ゲノム解析とは、生物のゲノムが持つ遺伝情報を総合的に解析する手法を指す。ゲノム解析では、ゲノムを構成する DNA に保存された塩基の配列を決めることから始まる。しかし、塩基配列のデータからだけでは、遺伝子の所在や役割を明らかにすることは困難である。そこで、転写・翻訳によって作られるメッセンジャー RNA (mRNA) やタンパク質など調査し、大腸菌などの微生物で明らかになった遺伝子データなどを参考に、また他の生物種間での相同性の比較などを通じて塩基配列を比較し、最終的に遺伝子の働きを明らかにする。
- 15) 免疫組織化学法は特定の抗原に結合する抗体との抗原抗体反応を利用し、抗原物質の局在部位そしてこの抗原物質を発現する細胞を可視化するための手法を指す。標的抗原とその特異的抗体を反応させ、その後抗体と結合する標識二次抗体を反応させる方法が一般的である。標識の種類により、蛍光抗体法と酵素抗体法に分けられる。蛍光抗体法では Fluorescein isothiocyanate (フルオレセイン・イソチオシアネート; FITC) や Rhodamine-B isothiocyanate (ローダミン-B イソチオシアネート; RITC) などを用い、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光部位を検出する。また、酵素抗体法では西洋ワサビから抽出した Horseradish peroxidase (ペルオキシダーゼ; HRP) や Alkaline Phosphatase (アルカリフォスファターゼ) を用い、光学顕微鏡により染色部位を検出する。Horseradish peroxidase を用いると、光学顕微鏡のみならず電子顕微鏡での検出が可能であり、さらに検出感度も高いことが知られている。
- 16) Northern blot 法とは、分子生物学研究において特定の配列を持つ RNA 断片を検出するための手法を指す。一般的には、細胞から分離・抽出した RNA を電気泳動によって展開し、調査対象の RNA 配列に相補的な配列を持つ核酸プローブを結合させることで標的 RNA の量とサイズを検出する。この核酸プローブの標識として放射線同位元素 ^{32}P を利用する場合は X 線フィルムで、また標識として Digoxigenine (ジゴキシゲニン) や Biotin (ビオチン) を用いた場合は抗体を用いて核酸プローブの位置と量を検出する。最近、Northern blot 法よりも定量的に mRNA 量を測定できる定量 PCR 法や、多数の mRNA 量を検出するマイクロアレイ法が用いられることが多い。Northern blot 法は mRNA を検出する方法であるが、DNA を検出する Southern blot 法やタンパク質を検出する Western blot 法が知られている。
- 17) 現在、cDNA のクローニングおよびゲノム解析によって、20種以上のコネキシンタンパク質ファミリーが確認されている。コネキシン遺伝子ファミリーは、アミノ酸配列の親水性プロットによる解析から、N 末端および C 末端のいずれもが細胞質内にあり、細胞膜を 4 回貫通し、2つの細胞外ループと 1つの細胞内ループを形成する。膜貫通領と細胞外ループ領域のアミノ酸配列はコネキシン間で相同性が高く、これらの領域はギャップ結合に共通した基本構造とみなされている。
- 18) 生物には約 24 時間周期で活動する現象が数多く観察され、これは体内に生物時計（体内時計）が存在するためであると考えられている。この生物時計は細菌からヒト (*Homo sapiens*) まで普遍的に存在している。長年の研究により、哺乳類では脳内の視交叉上核（視床下部の一部）が生物時計の中核であることが確認された（例えば、Okamura, 2007）。そして、1980年代、時計遺伝子が発見されている。現在、

哺乳類では Per, Cry, Clock や Bmal など複数の時計遺伝子が機能していることが知られている（例えば, Gachon *et al.*, 2004）。時計遺伝子の発見以降, 分子レベルの研究が盛んに行われ, 殆どの臓器や組織に概日時計があり, 時刻を刻んでいることが明らかになっている（例えば, Yamazaki *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2004）。現在, 視交叉上核は身体全体のサーカディアンリズムを同調させる役割を担っており, 視交叉上核には中枢時計そしてそれ以外の臓器・組織・細胞には末梢時計があると考えられている。

【補助説明】

(1) 第5図の実験

【実験材料と方法】

実験には, 体長約 30 cm のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。コイを約 2 時間暗順応させた後, 低温麻醉下で断頭し, 眼球を摘出した。前眼部, 水晶体及び硝子体は除去し, その後網膜を剥離した。視細胞側を上にして濾紙上に付着させ, 実験に用いた。以上の操作は低光量の赤色照明下で行った。

剥離網膜標本を灌流槽内に置き, リンガー液を毎分 1 分の流量で灌流した。液温は, 恒温装置で約 20°C に保った。コイの正常リンガー液の組成は, 102.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 28.0 mM 重炭酸ナトリウム (NaHCO₃), 2.6 mM 塩化カリウム (KCl), 1.0 mM 塩化カルシウム (CaCl₂), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 10.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 5.0 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris) であった。本実験では水平細胞からの膜電位変化を導出後, 正常リンガー液を修飾リンガー液に変えて灌流した。修飾リンガー液の組成は, 76.0 mM NaCl, 5.0 mM 塩化バリウム (BaCl₂), 20.0 mM Tetraethylammonium Chloride (TEA-Cl), 10.0 mM 4-aminopyridine (4-AP), 10.0 mM 塩化セシウム (CsCl), 2.6 mM KCl, 10.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 30 μM Tetrodotoxin (TTX) 10.0 mM Glucose, 5.0 mM Tris であった。修飾リンガー液の灌流により, 水平細胞の細胞膜に発現する電位依存性ナトリウムチャンネルと各種の電位依存性カリウムチャンネル由来するイオン電流は抑制され, 電位依存性カルシウムチャンネルのみが機能している。修飾リンガー液に 5 mM L-Glutamate を添加する場合, 浸透圧調整のため, NaCl を減少させた。何れのリンガー液も, 1 N 塩酸 (HCl) を用いて pH7.8 に調整し灌流した。

膜電位の細胞内誘導には, ガラス管微小電極法を用いた。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 タイプの硼珪酸ガラス管 (φ 約 1.2 mm) から作製した。電極内には 4 M 酢酸カリウム (CH₃COOK) を充填して用いた。電極抵抗は 40~80 MΩ であった。灌流槽の底部に銀-塩化銀板を置き, これを不関電極とした。水平細胞の膜電位変化は, 微小電極用前置増幅器 (MEZ-8201, 日本光電) に接続したオシロスコープ (VC-10, 日本光電) で観察した。本実験では 2 つの同種水平細胞から膜電位を導出するため, 電極と前置増幅器を 2 セット用意した。それぞれの電極の先端を 1.5 mm 離して設置し, 水平細胞からの膜電位測定に利用した。2 つの水平細胞の膜電位変化と光刺激のタイミングは, 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, 膜電位変化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) で描画した。

コイ網膜には 4 種類の水平細胞 (単相性水平細胞, 二相性水平細胞, 三相性水平細胞と桿体水平細胞) が存在し, これらは単波長光に対する応答性の違いによって容易に識別できる。剥離網膜標本への光刺激には, キセノンランプから発する光をビームスプリッターにより 2 経路に分割し, 両経路共に等光量子化 (8.2×10^5 photons/μm²/sec) した単色光を 800 msec の照射時間で網膜全体に照射した (Tomita *et al.*, 1967)。光量は, 光路に各種濃度の ND フィルター (Neutral density filter) を置き調節した。実験開始時には 480 nm と 620 nm の波長光を交互に照射しながら, 微動マニピュレーターに装着したガラス管微小電極を網膜表面から徐々に深部へと進めてゆく。大きな過分極性の膜電位の振れが生じ, 480 nm と 620 nm の波長光刺激に伴い膜電位変化が現れたとき, 400~740 nm までの単色光を 20 nm 刻みで照射し, 水平細胞のタイプを同定した。本実験では単相性水平細胞 (専ら赤色錐体からシナプス入力を受け取っている水平細胞) を利用した。

薬品類の多くは, 関東化学株式会社とナカライテスク株式会社から購入した。TTX は三共株式会社, 4-AP は Sigma Chemical Co. から購入した。

(2) 第5図の実験

【機能的合胞体を形成する水平細胞における電気生理学的実験の困難—カルシウム依存性活動電位を利用した L-Glutamate 応答の逆転電位測定法の開発—】

暗時, 視細胞から放出される L-Glutamate によって水平細胞は脱分極状態にある。明時, 視細胞から放出さ

れる L-Glutamate が減少もしくは停止するため、水平細胞は過分極する。視細胞から放出される L-Glutamate によって水平細胞に生じる膜電位変化のイオン機構を解明するには、この細胞にガラス管微小電極を刺入し、通電刺激により膜電位を変化させる実験が求められる。ところが、水平細胞は電気シナプス（ギャップ結合）を介して連絡しているため、通電刺激によって膜電位を正確に保持することが難しく、イオン機構を詳細に解析することはできなかった。

コイの剥離網膜標本を各種のイオンチャンネル阻害剤を含む修飾リンガー液で灌流すると、水平細胞にカルシウム依存性活動電位が発生し、しかもこの活動電位は電気シナプスを介して結合する近隣の水平細胞（水平細胞の機能的合胞体ともいう。）に同期していることを見出した（Murakami & Takahashi, 1987）。当然、正常リンガー液から修飾リンガー液への変更によって、水平細胞の膜電位（s 暗時）も過分極側へと移動した（暗時の水平細胞の膜電位は正常リンガー液中で $-30 \sim -45$ mV であるが、修飾リンガー液中では $-55 \sim -65$ mV となった）。カルシウム依存性活動電位を発生させるには水平細胞を脱分極させる必要があり、このためガラス管微小電極による脱分極性通電刺激あるいは L-Glutamate 投与に伴う脱分極を利用した。ナトリウム依存性活動電位の時間経過は約 1 msec と短い、カルシウム依存性活動電位の時間経過は数秒間にも及ぶ。不思議なことに、カルシウム依存性活動電位には十数秒から数分間にも及ぶ時間経過の長いプラトー電位が現れることがあった。カルシウム依存性活動電位のピーク電位は $+20 \sim +30$ mV、そしてプラトー電位は $+10 \sim +20$ mV であった。剥離網膜標本を L-Glutamate を添加した修飾リンガー液で灌流すると、水平細胞は $-55 \sim -65$ mV から緩やかな脱分極を経てカルシウム依存性活動電位を発生し、やがて $-5 \sim -10$ mV に達した。そして、修飾リンガー液中に L-Glutamate が存在する限り、水平細胞の膜電位は $-5 \sim -10$ mV に保持された。修飾リンガー液から L-Glutamate を除去すると、 $-5 \sim -10$ mV から元の膜電位レベル（ $-55 \sim -65$ mV）に戻る水平細胞が大半であるが、一部 $-5 \sim -10$ mV から脱分極に転じプラトー電位へと移行する水平細胞も存在した。L-Glutamate の除去後にプラトー電位へと移行した水平細胞では L-Glutamate によってプラトー電位が抑えられたと推測された（剥離網膜標本を用いた灌流実験では修飾リンガー液から L-Glutamate を完全に除去するには数分間以上の時間が必要であり、L-Glutamate 濃度が次第に低下して行過程でプラトー電位が出現してきたと考えられる。すなわち、カルシウム依存性活動電位発生に関与するカルシウムチャンネルの活動 L-Glutamate 応答発生に関与するイオンチャンネル [グルタミン酸レセプターに連動するイオンチャンネル] の活動の間で闘ぎあいが生じ、グルタミン酸レセプターと連動するイオンチャンネルが優勢であったことを示唆している）。勿論、第 5 図のように、L-Glutamate が残存する間にプラトー電位が突然終了すれば、水平細胞の膜電位は過分極し、徐々に元の膜電位レベル（ $-55 \sim -65$ mV）へと回復する。回復までの時間は、残存する L-Glutamate 濃度に依存している。これらの結果を踏まえると、L-Glutamate 投与に伴って水平細胞に現れる膜電位（ $-5 \sim -10$ mV）はグルタミン酸応答（L-Glutamate 投与に伴い水平細胞に惹起される膜電位変化を指す。）の逆転電位（逆転電位とは細胞内外のイオン種に依存し、細胞膜を通過するイオンによって生じる膜電流が極性を逆転する膜電位を指す。）であり、この逆転電位には Na^+ と K^+ の透過性が関与していると推測された。幸いなことに、修飾リンガー液の灌流中にも、水平細胞は光照射に伴う膜電位変化（光応答ともいう。）を発生するため、カルシウム依存性活動電位を活用して光応答の逆転電位を測定することにも成功した（Murakami & Takahashi, 1987）。この結果、水平細胞の光応答とグルタミン酸応答の逆転電位（逆転電位の一一致は、イオン機構が同じであることを意味している。）は完全に一致し、視細胞の神経伝達物質が L-Glutamate であることの有力な証明となった（Murakami & Takahashi, 1987; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Murakami *et al.*, 1995）。電気シナプスにより機能的合体を形成する水平細胞に通電刺激を適用してグルタミン酸応答の逆転電位を測定することは 1980 年半ばまで不可能であったが、Murakami & Takahashi (1987) によるカルシウム依存性活動電位を活用する方法の開発によって漸く逆転電位の測定が可能となった。